



HAL
open science

Caractérisation phénotypique et fonctionnelle du compartiment stromal des organes lymphoïdes au cours du lupus

Sophia Lecomte

► **To cite this version:**

Sophia Lecomte. Caractérisation phénotypique et fonctionnelle du compartiment stromal des organes lymphoïdes au cours du lupus. Immunologie. Université de Strasbourg, 2020. Français. ⟨NNT : 2020STRAJ056⟩. ⟨tel-05580315⟩

HAL Id: tel-05580315

<https://theses.hal.science/tel-05580315v1>

Submitted on 4 Apr 2026

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.



HAL Authorization



DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la vie et de la santé
CNRS UPR3572 I2CT

THÈSE présentée par :

Sophia Lecomte

soutenue le : **23 juillet 2020**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**
Discipline/ Spécialité : Immunologie

**Caractérisation phénotypique et
fonctionnelle du compartiment stromal des
organes lymphoïdes au cours du lupus**

THÈSE dirigée par :

Mme DUMORTIER Hélène Directrice de recherche, CNRS UPR3572, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme SENGENES Coralie Chargée de recherches, INSERM U1031, Université de Toulouse

Mme TARTE Karin Professeur, INSERM U1236, Université de Rennes 1

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme FOURNEL Sylvie Professeur, CNRS UMR 7199, Université de Strasbourg

Remerciements

Je souhaite remercier dans un premier temps les membres de mon jury, Dr Coralie SENGENES, Pr Karin TARTE et Pr Sylvie FOURNEL qui ont accepté de prendre le temps d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie ma directrice de thèse Dr.Hélène DUMORTIER pour sa disponibilité, ses conseils et son soutien et plus particulièrement durant la période de confinement qui a été difficile à gérer.

J'aimerais aussi remercier chaleureusement tous les membres de l'équipe, passés et présents : Fanny, Hayet, Jacques-Eric, Renaud, Pierre-Marie, Cerise, Flora, Romain, Matthieu, Lucie et Annaïck. Merci pour nos échanges et vos conseils. Merci à toi Hayet pour ta disponibilité et ta bienveillance pour l'équipe. Merci Lucie pour ton aide, ta gentillesse et bien sûr ton soutien ces derniers mois ;) ce fut un plaisir de partager le bureau 139 avec toi ☺. Mention spéciale pour toi, Romain, tu as été là dès le début de mon master jusqu'à la 3^e année de ma thèse, et même après en fait ;). Je te remercie pour ta grande gentillesse, tu as toujours été disponible et à l'écoute pour toutes mes questions scientifiques ou juste parce que je n'avais pas de mémoire et que j'oubliais où étaient rangées les choses xD. Je n'oublierai jamais tes t-shirt et chaussures colorés qui mettaient une touche de couleur et de bonne humeur dans le labo ! J'espère que tu les mets toujours en post-doc ! A Annaïck, notre dernière venue, qui reprendra le projet. Tu as pu commencer dans le vif du sujet ;) mais je n'ai aucun doute sur tes capacités de pouvoir réaliser une thèse et mener à bien ce projet. J'ai eu la chance de pouvoir te connaître et travailler avec toi quelques mois. Malgré la période un peu chaotique et stressante, tu as été d'un grand soutien moral et scientifique pour moi. Je te souhaite le meilleur pour la suite et n'oublie pas : crois en toi. ;)

Parce que ce projet n'aurait pas pu se faire sans le travail de Monique, Delphine et Fabien avec les souris. Merci pour votre disponibilité et votre compréhension par rapport à tous les changements de dernière minute.

Un grand merci également à toi, Jean-Daniel, pour ton aide et ta disponibilité pour tout ce qui concerne la microscopie et l'informatique.

Je voudrais aussi remercier tous les membres actuels et passés de l'unité 3572 pour la bonne ambiance et les services rendus. Merci à la « Chris team » Chris, Vincent, Abdou, Adrien, Quentin, Astrid, Wacym, Layal, et tous les autres... pour vos conseils sur les manips et sur les cellules stromales si capricieuses. Merci à toute l'équipe de Pauline pour leurs conseils. Plus particulièrement merci à toi, Nadège pour ton aide sur les manips biomol, pour ton sourire et toutes les bonnes choses que tu nous as ramené à manger ! Enfin toute l'équipe des chimistes et le bureau des chimistes pour les breakfasts du jeudi matin ;). Merci à Dingkun et She pour ces fabuleux mets chinois ! Merci à tout le groupe du « Lake », Cristina, Giacomo, Amalia, Diane (Diane je reviendrai à toi plus loin ;)). A Rym, je te remercie pour ton aide dans le domaine de la chimie, pour ta bienveillance et ton sourire au labo !

J'aimerais aussi remercier toutes les personnes présentes à la bibliothèque, Annaïck, Quentin, Martin, David, Yannick, Léa, Alix, ... Merci de m'avoir « accueillie » quand je suis descendue et pour votre silence dans la bibliothèque qui m'a permis de travailler sereinement.

Merci beaucoup à l'équipe de Noël : Matteo, Janina et Chloé. Janina, tu as une place privilégiée plus loin ;) Matteo, merci pour ton amitié et d'avoir eu la patience de me faire découvrir l'escalade ☺ ! Merci à toi aussi Chloé, pour ton écoute et ton soutien surtout ces derniers mois. Je suis très heureuse d'avoir pu te connaître et partager tous ces moments depuis notre master. Tu es une belle personne et une maman formidable, je te souhaite beaucoup de bonheur avec ta petite famille !

Une thèse dans un labo ce n'est pas un simple travail avec des collègues, ça devient un peu notre maison à force d'y passer de longues soirées (devant le Gallios qui devient notre nouvel « ami ») et des week-ends, et nos collègues deviennent des amis. Je vais donc essayer de tous vous remercier et d'être aussi brève que possible sinon je vais encore pleurer, vous me connaissez ;).

Parce qu'une thèse est beaucoup plus agréable à gérer avec la présence de supers collègues et amis. J'ai eu la chance de rencontrer des amis formidables au cours de ma thèse, toute l'équipe de Doctors and co : Janina, Diane, Maud, Matt, Farouk, Laurie, Adriano, Margot, Ben, Pauline, Flora et Simone.

Sans vous ma thèse n'aurait pas eu le même goût (moins d'alcool et moins de sport c'est sûr, haha) et vous avez tous été d'un très grand soutien pour moi quand ma vie perso a pris un

tournant inattendu ! Je vous remercie pour nos pauses café-soleil, nos soirées magiques, nos petits-déj, l'agricas, nos apéros ...

Merci tout particulièrement à Diane, Farouk et Janina pour leurs corrections et leurs conseils ;). Diane, notre maman, tu étais un peu mon modèle en thèse et même si tu es partie pour Toulouse dès que je regarde la cathédrale je pense à toi et je la trouve encore plus belle qu'avant ;). Et Fafa (ou foufi, pchut il faut que je l'écrive quelque part pour ne pas oublier), notre politicien, j'ai toujours pu compter sur toi, merci !!

Mon petit Ben, je souris encore en repensant au début, dans la bibliothèque, où on ne se parlait pas... mais maintenant une phrase, des paragraphes ou même un roman ne suffirait pas à décrire notre amitié ! Et comme tu sais que tu comptes beaucoup pour moi je ne vais pas m'étendre davantage ;) Et bien évidemment ma popo, je ne t'oublie pas et c'est tout pareil pour toi ! Ce super trip Eurovélo, c'était une expérience et un voyage sportif que j'ai adoré faire avec vous, vous êtes des amies en or !! Tout est parti de ton idée Flora lorsqu'on s'est rencontré en master. Merci Flora pour nos pauses déj, tes encouragements et ta motivation pour de nouveaux défis sportifs ! A quand le prochain ??

Janina, ma sœur jumelle ou mon âme-sœur, qu'importe je sais très bien que tu comprendras tout ce qu'il y a derrière ces mots, ils se suffisent à eux-mêmes et décrivent l'essentiel ☺ Merci pour ton écoute, ton soutien, ta présence inconditionnelle et ton amitié !

Comment remercier Janina sans penser au dernier membre du groupe des 3 blondes : Olivier ! Merci pour ta patience avec moi, ton soutien, et tes encouragements ! Nos pauses café et agricas vont me manquer... Heureusement il y a l'absinthe et les trails ;) Ah oui et je vais t'avouer un petit secret, même si je faisais du sport quand j'étais jeune (un peu) je pense en avoir fait 2 x plus depuis à cause (grâce) à toi, merci ;) ! Merci à vous deux pour nos courses, nos repas, nos soirées et votre soutien qui m'a permis de tenir bon ces derniers mois !

Merci à Janina, Diane, Sam, Gautier, Thomas et Quentin pour les soirées, les randonnées et notre voyage à Prague (tout particulièrement à Gautier qui s'est retenu de ronfler ! haha).

J'ai aussi pu compter sur la présence de mes plus fidèles amies : Stephanie, Marie, Elodie et Lucille. Ma Steph devenue une petite luxembourgeoise ! Nos footings et nos soirées me manquent depuis que tu es si loin, mais heureusement que nos retrouvailles se font comme si on ne s'était jamais quittées !

A Lucille et Elodie, qui l'aurait cru, il y a 10 ans de cela quand on s'est rencontrées à Horizon et dans l'amphi des P1, qu'on en serait là aujourd'hui 😊. Heureusement nos années de médecine sont loin derrière nous maintenant mais notre amitié, elle, est toujours là !

A Marie, il y a des rencontres qu'on n'oublie jamais, comme ce premier jour de fac en TP où tu t'es assise à côté de moi et à partir de là on a formé un binôme de choc à toute épreuve !! A nouveau, il est bien trop difficile en quelques lignes de te remercier et de résumer notre amitié ! Mais je saurai le faire avec un bon resto pour fêter ça ! Merci pour ta présence, ton humour, tes encouragements et ta joie de vivre qui contamine (petit jeu de mot obligé pour l'année 2020) et bien sûr tes innombrables corrections !

A Anthony, tu fais partie de ces personnes qui d'un coup sont entrées dans ma vie et ont apporté de beaux changements ! Alors je n'ai pas trouvé d'appartement grâce à toi mais quelque chose de bien plus précieux, un ami fidèle et sincère ! Je te remercie pour ta patience (oui parce qu'il en faut quand je radote), pour tes blagues, pour ta bienveillance, ta confiance et tes encouragements !

Pour terminer j'aimerai remercier les personnes les plus importantes dans ma vie, mes parents, mes frères Adrien et François, mon papi et ma mamie, ma marraine Christine et ma mémé qui nous a quittés cette année et qui j'en suis sûre aurait été très fière de moi. Merci à vous de me soutenir dans tous mes projets ! J'ai la chance incroyable d'avoir une famille formidable, vous êtes mes fondations, ma force et mon bonheur et je ne vous le dis sans doute pas assez souvent mais je vous aime !

Abréviations

Ac : Anticorps	Db : double brin
ACR : American College of Rheumatology	DEAF1 : Deformed Epidermal Autoregulatory Factor 1
ADN : Acide DésoxyRibonucléique	DN : cellules double-négatives
Ag : Antigène	EAE : Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
AIA : Antigen-Induced Arthritis	EBV : Virus d'Epstein Bar
AID : Activation-Induced cytidine Deaminase	EOPS : Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques
AIRE : Auto-Immune Regulator	EpCAM : Epithelial cell Adhesion Molecule
ANCA : AntiNeutrophil Cytoplasmic Antibodies	EULAR : European League Against Rheumatism
APC : Antigen presenting cells	FAP : Fibroblast Activation Protein- α
ARNm : Acide Ribonucléique messenger	FC : Fragment constant
Auto-Ac : Auto-anticorps	FCGR : Fc Gamma Receptor
Auto-Ag : Auto-antigène	FDC : Follicular Dendritic Cells
BAFF : B cell Activating Factor	Foxp3 : Forkhead box P3
BALB : Bagg ALBino	FPKM : Fragments Per Kilobase Million
BCR : B-cell receptor	FRC : Fibroblastic Reticular Cells
BEC : Blood endothelial Cells	GO : Gene Ontology
BLK : B Lymphocyte Kinase	GVH : Graft Versus Host
BRC : B cell zone reticular cells	GWAS : Genome-Wide Association Studies
BTK : Bruton's Tyrosine Kinase	HEV : High Endothelial Venule
BTLA : B and T Lymphocyte Attenuator	IAP : Integrin Alpha 7 ⁺ Pericytes
CCL : C-C motif Ligand	iBALT : inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue
CCR : C-C motif Chemokine Receptor	ICAM : InterCellular Adhesion Molecule 1
CD : Cluster de Différenciation	ICOS : Inducible T-cell COStimulator
cGAMP : Cyclic GMP-AMP	IFN : InterFéroN
cGAS : Cyclic GMP-AMP Synthase	IFNAR : Interferon- α/β receptor
CIITA : Class II TransActivator	Ig : Immunoglobuline
CLEC2 : C-type LECTin-like receptor 2	IL : Interleukine
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	ILC : Innate lymphoid cell
CR : Complement Receptor	JAK : Janus Kinase
CRC : CXCL12-expressing reticular cells	kLN : ganglions lymphatiques rénaux
CTLA4 : Costimulatory molécule cytotoxique T Tymphocyte associated Antigen 4	LB : Lymphocyte B
CTV : Cell Trace Violet	LEC : Lymphatic endothelial Cells
CXCL : C-X-C motif Ligand	LED : Lupus Erythémateux Disséminé
CXCR : C-X-C motif Chemokine Receptor	
LPR : lympho-prolifération	
LT : Lymphocyte T	

LTi : Lymphoid Tissue Inducer
LTo : Lymphoid Tissue Organizer
LT α 1 β 2/ LT β : Lymphotoxine beta
ROR γ T : RAR-related Orphan Receptor gamma
LT β R : Lymphotoxine beta Receptor
Lyve-1 : Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor
MAdCAM-1 : Mucosal vascular Addressin Cell Adhesion Molecule 1
MARCO : MAcrophage Receptor with COLlagenous structure
miR : micro-ARN
mLN : ganglions lymphatiques mésentériques
MRC : Marginal Reticular Cells
mTEC : Medullary Thymic Epithelial Cells
NET : Neutrophil Extracellular Traps
NF- κ B : Nuclear Factor-kappa B
NK : Natural killer cells
NOD : Non-Obese Diabetic
NZB : New Zealand Black
NZW : New Zealand White
OLS : Organe Lymphoïde Secondaire
OLT : Organe Lymphoïde Tertiaire
OVA : Ovalbumine
PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns
PCA : Principal Component Analysis
PECAM : Platelet endothelial cell adhesion molecule
PD-L1 : Programmed Death-Ligand 1
PD1 : Programmed cell Death 1
pDC : Cellules Dendritiques plasmacytoïdes
PDGF : platelet-derived growth factor
PDGFR : platelet-derived growth factor receptor
PDPN : Podoplanine
PNAd : Peripheral lymph Node Addressin
Prox1 : Prospero homebox protein 1
PTPN : Protein Tyrosine Phosphatase, Non receptor
RANK/RANKL : Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B / Ligand
RNP : RiboNucleoProtein
S1P : Sphingosine-1-Phosphate
SLEDAI : Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
SLICC : Systemic Lupus International Collaborating Clinics
sLN : ganglions lymphatiques cutanés
Sm : Smith
SNP : Single Nucléotide Polymorphism
snRNP : small nuclear RNP
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
STING : STimulator of INterferon Genes
TCR : T Cell Receptor
TFH : LT folliculaires auxiliaires
TGF β : Transforming Growth Factor beta
Th : T auxiliaires
TIN : Transcript Integrity Numbers
TLR : Toll Like Receptor
TNF α : Tumor Necrosis Factor α
TRC : T cell zone Reticular Cells
Treg : LT régulateur
VCAM 1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
Yaa : Y-linked autoimmune acceleration
ZAP70 : Zeta Associated protein of 70 kDa

Table des matières

Introduction	1
A. Le Lupus Erythémateux Disséminé.....	3
I. Épidémiologie.....	3
II. Les symptômes lupiques	3
1. Les manifestations cliniques	4
2. Les manifestations biologiques	6
III. L'étiologie.....	7
1. Les facteurs génétiques et épigénétiques.....	7
2. Les facteurs environnementaux.....	11
a. Les rayonnements ultraviolets	11
b. Les hormones	12
c. L'exposition à la silice.....	12
d. La fumée de cigarette	12
e. Les médicaments	13
f. Les infections	13
3. Le microbiote	14
IV. La physiopathologie du lupus.....	14
1. Le rôle de l'immunité innée	15
a. Un défaut de clairance apoptotique	15
a. Le rôle des NETs.....	15
b. La signature IFN α	17
c. Le rôle des Toll-like receptors et des senseurs d'acides nucléiques	18
2. L'activation de l'immunité adaptative.....	21
a. Les lymphocytes T	21
b. Les LB et la production d'auto-anticorps	26
V. Les traitements du lupus	29
1. Les traitements classiques	29
2. Les biothérapies et futurs traitements.....	30
VI. Les modèles murins classiques pour l'étude du LED.....	32
1. Les modèles murins spontanés.....	32
a. La souris NZB/W F1	32
b. Le modèle MRL lpr/lpr	33
c. Le modèle murin Fc γ RIIb ^{-/-}	33
d. Le modèle BXSB-Yaa	34

2.	Les modèles murins inductibles	34
a.	Le modèle de lupus induit au pristane	34
b.	Le modèle de la maladie du greffon contre l'hôte	35
B.	Le compartiment stromal des ganglions lymphatiques	35
I.	Structure et fonction générale des ganglions lymphatiques	35
II.	Les cellules stromales : les régulateurs des réponses immunitaires	38
1.	Les différentes sous-populations de cellules stromales	39
2.	Les diverses fonctions des cellules stromales.....	42
a.	Le recrutement et l'organisation des cellules hématopoïétiques dans le ganglion lymphatique.....	42
b.	La distribution des antigènes au ganglion lymphatique.....	44
c.	La régulation des réponses immunitaires	45
d.	La tolérance périphérique des lymphocytes T	48
e.	La dynamique du compartiment stromal lors des réponses immunitaires	52
3.	Le rôle des cellules stromales des ganglions lymphatiques dans des situations pathologiques : cas du cancer et des maladies auto-immunes	55
a.	Les cellules stromales des ganglions lymphatiques drainant une tumeur	55
b.	Les cellules stromales des ganglions lymphatiques dans les maladies auto-immunes	56
C.	L'ontogénèse des organes lymphoïdes	58
I.	Les organes lymphoïdes secondaires : le ganglion lymphatique.....	59
1.	Les modèles de formation du ganglion lymphatique.....	59
2.	L'origine des cellules stromales mésenchymateuses.....	63
II.	Les organes lymphoïdes tertiaires	64
1.	Définition et structure des organes lymphoïdes tertiaires.....	64
2.	Mécanismes de formation des organes lymphoïdes tertiaires	66
3.	Les cellules stromales dans les organes lymphoïdes tertiaires	69
4.	Le rôle des organes lymphoïdes tertiaires dans diverses pathologies.....	70
a.	Les OLT lors d'infections	70
b.	Les OLT dans les cancers.....	71
c.	Les OLT et les maladies auto-immunes	73
d.	Les OLT dans le contexte de la pathologie du lupus	75
D.	Hypothèses et objectifs de l'étude.....	77
	<i>Matériels et méthodes</i>	80
A.	Les modèles murins.....	82
B.	Digestion enzymatique et isolement des cellules stromales	82
C.	Cytométrie en flux.....	84
D.	Expériences allogéniques.....	84

E.	Séquençage ARN.....	85
F.	Extraction d'ARN et transcription inverse.....	86
G.	qPCR	86
H.	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) : dosage des auto-anticorps dans les sérums du modèle murin de lupus induit.....	87
I.	Expériences d'endocytose d'auto-Ag.....	87
J.	Histologie et quantification de l'aire des ganglions lymphatiques.....	88
K.	Microscopie.....	88
L.	Analyses statistiques.....	89
	<i>Résultats.....</i>	<i>91</i>
A.	Chapitre 1 : Plasticité du compartiment stromal des ganglions lymphatiques chez la souris lupique NZB/W.....	93
	I. Avant-propos.....	93
	II. Caractérisation quantitative du compartiment stromal des ganglions lymphatiques.....	94
	III. Étude du profil phénotypique et fonctionnel des cellules stromales des ganglions lymphatiques ...	101
	1. Les cellules stromales présentent des molécules du CMH-II à leur surface.....	101
	2. L'expression des molécules du CMH-II par les cellules stromales est fonctionnelle	105
	3. Les cellules stromales expriment des molécules de co-stimulation et de co-inhibition	106
	a. La molécule de co-stimulation CD86	106
	b. La molécule co- inhibitrice PD-L1	109
	IV. Les cellules stromales sont-elles capables de présenter des auto-Ag lupiques ?.....	111
	V. Analyse transcriptomique comparative des cellules stromales des ganglions lymphatiques rénaux au cours de la pathologie lupique	115
	1. Contrôle qualité et validation des échantillons séquencés.....	119
	2. Les cellules stromales des souris lupiques présentent des variations d'expression des gènes associés à la régulation des cellules immunitaires	124
	a. Les chimiokines CCL19 et CCL21 et la cytokine IL-7	124
	b. Les chimiokines CXCL13 et CXCL12 et le facteur BAFF	126
	3. Le compartiment stromal des souris lupiques présente des modifications de l'expression des gènes associés à la présentation antigénique.....	129
	4. Les FRC et LEC des souris lupiques expriment différemment les gènes codant pour les molécules de co-stimulation CD86 et de co-inhibition PD-L1	134
	5. L'expression des gènes codant pour des chimiokines inflammatoires par les cellules stromales des souris lupiques suggère leur participation au contexte inflammatoire	136
	6. Le compartiment stromal des souris lupiques malades présente une signature transcriptomique activée en lien avec l'inflammation	138

a.	Les variations d'expression des gènes du développement des vaisseaux et de la matrice extracellulaire suggèrent un remodelage du microenvironnement stromal des ganglions lymphatiques rénaux au cours de la réponse auto-immune	141
b.	Les cellules stromales lupiques pourraient participer au maintien de l'inflammation chronique via l'expression de gènes de la réponse inflammatoire	146
c.	Les cellules stromales des souris lupiques malades expriment fortement des gènes codant pour des molécules favorisant les réponses cellulaires auto-immunes	147
d.	Les LEC de souris lupiques malades expriment fortement des gènes codant pour des Ag des reins	149
7.	Le profil transcriptomique du compartiment stromal des souris pré-lupiques met en évidence des caractéristiques intrinsèques au fond génétique	150
VI.	Conclusion/discussion	153
B.	Chapitre 2 : Étude du compartiment stromal au sein des organes lymphoïdes tertiaires	
	168	
I.	Avant-propos	168
II.	Publication N°1	170
III.	Mise en évidence de la présence d'un compartiment stromal dans les OLT des reins de souris lupiques NZB/W	203
IV.	Caractérisation du compartiment stromal des organes lymphoïdes dans le modèle murin de lupus induit au pristane	206
1.	Manifestations cliniques et biologiques générales du modèle murin de lupus induit	206
2.	Étude du compartiment stromal des ganglions lymphatiques	211
3.	Caractérisation des organes lymphoïdes ectopiques de type lipogranulomes	214
V.	Conclusion/Discussion	217
	<i>Conclusion et Discussion</i>	224
	<i>Bibliographie</i>	239

Liste des figures

Figure 1 Critères de classification pour le lupus érythémateux disséminé proposé par l'ACR et l'EULAR (2019). Adapté d'après Aringer et al. 2019.....	5
Figure 2 Les manifestations cliniques du LED.....	6
Figure 3 Gènes de susceptibilité du LED.....	9
Figure 4 La spirale de la pathologie du lupus.....	16
Figure 5 Le rôle de l'immunité innée dans le développement du LED.....	20
Figure 6 Altération de la voie de signalisation du TCR chez les patients lupiques.....	22
Figure 7 Structure des ganglions lymphatiques.....	37
Figure 8 La sélection des LB dans le centre germinatif.....	39
Figure 9 Les cellules stromales du ganglion lymphatique.....	41
Figure 10 Caractéristiques générales des FRC.....	43
Figure 11 Mécanismes d'induction de la tolérance des LT par les LEC.....	50
Figure 12 Mécanismes d'expansion des vaisseaux sanguins des ganglions lymphatiques.....	53
Figure 13 Mécanismes d'extension du réseau de FRC dans les ganglions lymphatiques.....	54
Figure 14 Modèle de formation bicellulaire des ganglions lymphatiques.....	60
Figure 15 Nouveau modèle de développement des ganglions lymphatiques.....	62
Figure 16 Comparaison de la structure des ganglions et des OLT.....	66
Figure 17 Mécanismes potentiels de formation des OLT.....	67
Figure 18 Processus d'identification des populations de cellules stromales dans les ganglions lymphatiques. ...	96
Figure 19 Le compartiment stromal des ganglions lymphatiques rénaux évolue avec l'inflammation locale.....	98
Figure 20 Réorganisation spécifique du compartiment stromal des ganglions lymphatiques rénaux au cours de la pathologie lupique.	101
Figure 21 Mise en évidence de l'expression de surface des molécules du CMH-II par les cellules stromales des ganglions lymphatiques.....	104
Figure 22 Les cellules stromales présentent une expression fonctionnelle des molécules du CMH-II.....	107
Figure 23 Expression de la molécule de co-stimulation CD86 par les cellules stromales.....	108
Figure 24 Expression de la molécule inhibitrice PD-L1 par les cellules stromales.....	111
Figure 25 Étude de la capacité d'endocytose de nucléosomes par les cellules stromales.....	114
Figure 26 Préparation des échantillons pour le séquençage ARN et analyses différentielles effectuées à partir de ces échantillons.....	117
Figure 27 Nombre total de fragments séquencés (exprimé en millions) pour chaque échantillon.....	118
Figure 28 Alignement des fragments séquencés sur le génome de <i>Mus musculus</i>	120
Figure 29 Analyse des composantes principales des gènes exprimés pour chaque échantillon.....	121
Figure 30 Validation des populations de cellules stromales par séquençage ARN.....	123
Figure 31 Les cellules stromales expriment des gènes associés à la régulation de la migration et de la survie des LT.....	126

<i>Figure 32 Les cellules stromales expriment des gènes associés à la régulation de la migration et du développement des LB.....</i>	<i>128</i>
<i>Figure 33 Les cellules stromales expriment les gènes codant pour les molécules du CMH-II.....</i>	<i>131</i>
<i>Figure 34 Le gène CIITA est faiblement exprimé par les cellules stromales.....</i>	<i>134</i>
<i>Figure 35 Les cellules stromales expriment les gènes codant pour les molécules CD86 et PD-L1.....</i>	<i>136</i>
<i>Figure 36 Les gènes de cytokines inflammatoires sont exprimés par les cellules stromales.....</i>	<i>137</i>
<i>Figure 37 Carte de fréquentation de l'expression des gènes différenciellement exprimés entre des souris NZB/W âgées malades et des souris NZB/W jeunes pré-lupiques.....</i>	<i>140</i>
<i>Figure 38 Analyse des gènes différenciellement exprimés par les LEC de souris lupiques malades par rapport aux souris pré-lupiques.....</i>	<i>142</i>
<i>Figure 39 Analyse des gènes différenciellement exprimés par les FRC de souris lupiques malades par rapport aux souris pré-lupiques.....</i>	<i>144</i>
<i>Figure 40 Analyse des gènes différenciellement exprimés par les BEC de souris lupiques malades par rapport aux souris pré-lupiques.....</i>	<i>144</i>
<i>Figure 41 Carte de fréquentation de l'expression des gènes différenciellement exprimés entre des souris pré-lupiques NZB/W jeunes et des souris contrôles BALB/W jeunes.....</i>	<i>152</i>
<i>Figure 42 Mise en évidence par cytométrie en flux de la présence des cellules stromales dans les OLT rénaux chez les souris NZB/W malades.....</i>	<i>205</i>
<i>Figure 43 Suivi clinique et biologique du développement de la pathologie lupique chez le modèle murin de lupus induit au pristane.....</i>	<i>208</i>
<i>Figure 44 Évaluation de l'atteinte rénale chez le modèle murin de lupus induit au pristane.....</i>	<i>210</i>
<i>Figure 45 Caractérisation du compartiment stromal des ganglions lymphatiques en réponse à l'injection de pristane chez les souris BALB/c.....</i>	<i>213</i>
<i>Figure 46 Mise en évidence de la présence de cellules stromales dans les lipogranulomes.....</i>	<i>215</i>
<i>Figure 47 Les cellules immunitaires sont présentes au sein des lipogranulomes.....</i>	<i>217</i>

Introduction

A. Le Lupus Erythémateux Disséminé

Le Lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie auto-immune chronique affectant plusieurs organes dont la peau, les articulations, le système nerveux et les reins. Des facteurs environnementaux associés à un terrain génétique favorable contribuent au développement de la maladie. Le LED est caractérisé par la production d'auto-anticorps (auto-Ac) ciblant entre autres des antigènes (Ag) du soi nucléaires. Les complexes immuns résultants de cette interaction auto-Ac - Ag du soi peuvent se déposer au niveau d'organes cibles, activer la voie du complément, entraîner une inflammation locale et des dommages des organes.

I. Épidémiologie

En France, le LED est presque considéré comme une maladie rare selon la définition de l'Union Européenne (prévalence inférieure à 50 sur 100 000 personnes). En effet, son incidence est de 3.32 cas pour 100 000 personnes par an et sa prévalence est de 47.1 pour 100 000 habitants soit environ 1 personne sur 2000 (**Arnaud et al., 2014**). L'incidence et la prévalence varient considérablement selon le groupe ethnique. Aux Etats-Unis, par exemple, celles-ci sont 2 à 5 fois plus élevées parmi les populations d'origine africaine que parmi les américains d'origine européenne. De plus, la majorité des patients atteints du LED sont des femmes en âge de procréer, avec un *sex-ratio* de 9 femmes pour 1 homme (**Carter et al., 2016**).

II. Les symptômes lupiques

Le lupus est une maladie complexe avec des caractéristiques cliniques variables ce qui rend le diagnostic difficile à établir. Afin de faciliter ce dernier, l'« American College of Rheumatology » (ACR) a constitué une liste de critères de classification du LED publiée en 1982 puis révisée en 1997 qui a été utilisée dans le monde entier (**Hochberg, 1997**). Depuis, nos connaissances sur la pathologie ont évolué et le groupe « Systemic Lupus International Collaborating Clinics » (SLICC) a mis en place de nouveaux critères plus sensibles en 2012. Cependant l'utilisation de deux classifications distinctes n'est pas envisageable pour une maladie si complexe. C'est pourquoi très récemment, une collaboration internationale entre l'ACR et l'« European League Against Rheumatism » (EULAR) a proposé une nouvelle classification au congrès européen de Rhumatologie de 2017. Celle-ci se distingue des deux autres par un premier critère d'inclusion qui est la positivité du sérum pour les Ac anti-nucléaires à une dilution d'au moins 1/80 puis un score minimum de 10 points permet de

classifier la pathologie comme un lupus. Ce nouveau système se veut plus sensible et plus spécifique et permettrait de mieux stratifier les patients dans les études cliniques (**Aringer et al., 2019**) (**Figure 1**).

En plus de se manifester de diverses manières au niveau cliniques, le LED est une pathologie qui évolue par une alternance de phases, des phases de poussées où les manifestations cliniques sont les plus importantes et des phases de quiescence qui sont asymptomatiques. Afin d'évaluer l'intensité de la maladie, les cliniciens se réfèrent au score d'activité appelé « Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index » (SLEDAI). Il référence 24 symptômes auxquels un score est attribué en fonction de la gravité de la manifestation. L'addition des différentes valeurs correspond au score d'activité du patient le jour de la consultation (**Bombardier et al., 1992**).

1. Les manifestations cliniques

De façon générale, les patients ressentent un affaiblissement, une fatigue physique et de la fièvre dans 30 à 50 % des cas. Les atteintes cutanées sont les plus fréquentes sous la forme d'érythème sur les zones du corps photoexposées comme le visage, le décolleté et le dos des mains. Une autre manifestation lupique fréquemment observée est l'arthrite au niveau des mains et des genoux. Celle-ci se traduit par une raideur et un gonflement des articulations de façon symétrique et dans la majorité des cas elle n'entraîne pas de déformation (**Grossman, 2009**). Cependant, l'atteinte rénale reste la complication la plus sévère du LED car si elle n'est pas prise en charge à temps elle peut aboutir à une insuffisance rénale terminale chez le patient. La néphrite lupique affecte environ 40 % des patients atteints de LED mais la prévalence peut varier selon les groupes ethniques (**Hanly et al., 2016**).

La glomérulonéphrite, le type d'atteinte rénale le plus fréquemment observé, est liée en partie aux dépôts d'immunoglobulines et de complément dans les glomérules. Elle se traduit par la présence de sang, de protéines dans les urines et par une diminution de la fonction rénale. Une biopsie rénale est effectuée pour confirmer le diagnostic et caractériser l'activité et la chronicité de la maladie. En 2003, la société internationale de néphrologie et la société de pathologie rénale ont établi une classification des six différentes glomérulonéphrites lupiques afin de déterminer le pronostic rénal et prescrire le traitement approprié (**Weening et al., 2004**).

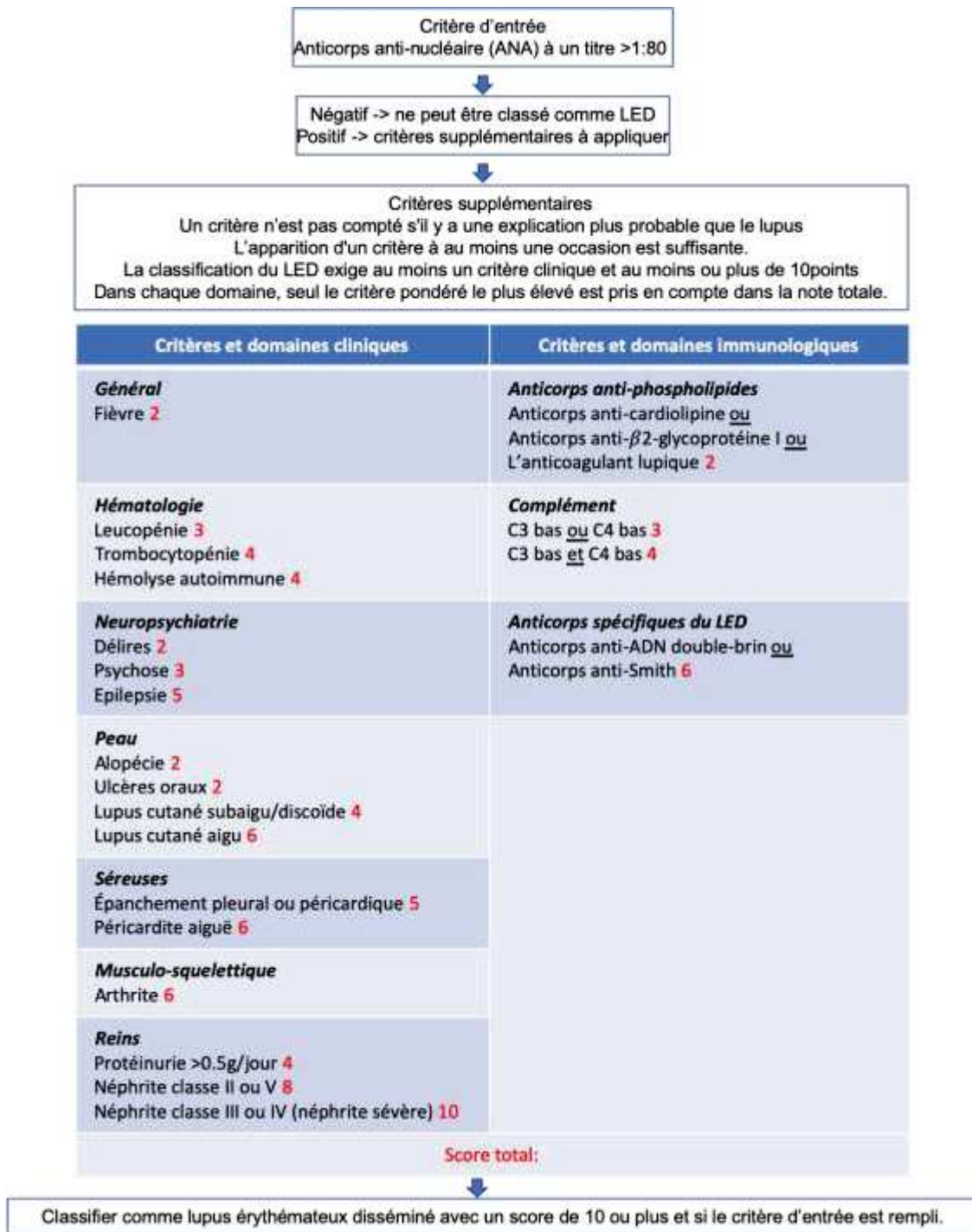


Figure 1 Critères de classification pour le lupus érythémateux disséminé proposé par l'ACR et l'EULAR (2019). Adapté d'après Aringer et al. 2019.

D'autres atteintes viscérales sont observées chez les patients lupiques, elles peuvent toucher les poumons, le cœur, le système vasculaire et le système nerveux central causant des troubles cognitifs (Figure 2).

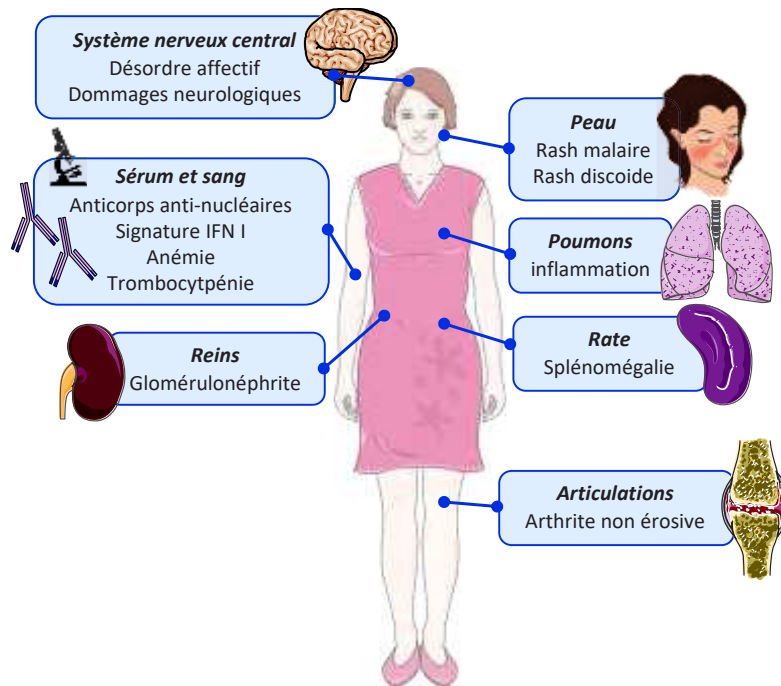


Figure 2 Les manifestations cliniques du LED

Les symptômes du lupus sont très variés pendant les poussées. En dehors du masque de loup bien connu, les patients peuvent présenter des atteintes viscérales telles que la glomérulonéphrite qui reste l'atteinte la plus sévère.

2. Les manifestations biologiques

Le lupus se caractérise aussi par plusieurs anomalies hématologiques. Chez les patients lupiques, les cytopénies sont classiques et fréquentes, telles que les thrombopénies ou les lymphopénies souvent observées chez les patients en phase active. Les taux sériques de complément sont également diminués et résultent le plus souvent d'une consommation du complément au cours de la pathologie (Fayyaz et al., 2015).

Une des caractéristiques majeures du lupus est la présence d'auto-Ac circulants dans le sang et dirigés contre des éléments nucléaires. Les Ac les plus couramment observés chez les patients, reconnaissent l'ADN double brin (ADNdb), les histones, les nucléosomes (un assemblage d'ADN et d'histones) ou des ribonucléoprotéines (RNP) (un complexe d'ARN et de protéines). Les Ac anti-ADN ont été les premiers à être décrits dans le LED et sont présents dans 60 à 90 % des patients lupiques (Ceppellini et al., 1957). La détection de ces auto-Ac est utilisée comme marqueur dans le diagnostic et peut être associée plus spécifiquement à certaines manifestations cliniques du LED comme la néphrite lupique (Conrad et al., 2012). Les auto-Ac anti-nucléosomes sont également associés à la sévérité de l'atteinte rénale et sont corrélés avec l'activité de la maladie chez les patients lupiques (Hung et al., 2011). Le lupus se caractérise aussi par la production d'Ac dirigés contre les RNP, dont les « small nuclear ribonucleoprotein » snRNP composant le spliceosome qui intervient dans le processus

d'épissage de l'ARN messenger. Parmi ces auto-Ac anti-snRNP, les Ac anti-U1-RNP et les Ac anti-Smith (Sm) sont caractéristiques du lupus (**Migliorini et al., 2005**). Les auto-Ac anti-Sm sont utilisés comme marqueur de diagnostic et sont présents chez 30 à 40 % des populations afro-américaines et asiatiques (**Arroyo-Ávila et al., 2015**). Par ailleurs, bien que plus fréquemment retrouvés chez les patients atteints du syndrome de Sjögren, les auto-Ac anti-RNP anti-Ro (SSA) et anti-La (SSB) sont également retrouvés chez les patients lupiques. Ces auto-Ac reconnaissent respectivement les protéines Ro du complexe Ro-RNP et la protéine La/SSB intervenant dans le métabolisme des ARN. Les Ac anti-Ro/SSA sont plutôt associés aux atteintes cutanées de lupus érythémateux alors que les Ac anti-La/SSB sont associés à des atteintes pulmonaires, du système nerveux central, et à des péricardites (**Lee et al. 1994; Yasuma et al. 1990**).

Enfin, il a été mis en évidence, chez les patients atteints de néphrite lupique, la présence d'auto-Ac dirigés contre le complément. Les auto Ac anti-C1q sont détectés dans le sérum de quasiment tous les patients ayant une atteinte rénale active comparés aux sérums des patients avec une néphrite inactive (**Trendelenburg et al., 2006**). De plus, il a été montré que des Ac anti-C1q provenant de patients lupiques sont capables d'activer la voie du complément *in vitro*, ce qui suggère qu'ils pourraient avoir un rôle dans les dommages tissulaires générés au cours de la glomérulonéphrite (**Thanei et al., 2015**). Bien que les Ac anti-phospholipides ne soient pas spécifiques au LED, ils sont retrouvés chez 30 à 40 % des patients lupiques et ils peuvent être responsables de thromboses veineuses ou artérielles (**Dema and Charles, 2016**). La détection de ces auto-Ac est un des critères de classification pour le LED proposé par l'ACR et l'EULAR en 2019.

III. L'étiologie

A l'heure actuelle, les causes précises de la pathologie ne sont pas clairement connues. C'est une combinaison de facteurs incluant des prédispositions génétiques, des facteurs environnementaux comme les ultraviolets (UV), les médicaments ou les infections qui vont mener à une rupture de tolérance et à une sur-activation du système immunitaire aboutissant aux dommages tissulaires de la pathologie lupique précédemment décrits.

I. Les facteurs génétiques et épigénétiques

Les facteurs génétiques ont une place importante dans le déclenchement de la maladie. Le risque individuel de développer le LED ou d'autres maladies auto-immunes est augmenté dans

les familles comprenant un membre atteint de lupus. En effet, le taux d'héritabilité du LED a été estimé à 44 % (**Kuo et al., 2015**). Bien que le développement du LED soit associé à un ensemble d'anomalies génétiques, il existe de rares cas où des mutations d'un seul gène sont impliquées. Parmi les déficiences monogéniques, on retrouve entre autres les gènes intervenant dans la voie du complément (C1q), la dégradation des acides nucléiques (DNASE1L3), la signalisation des lymphocytes B (LB) (« Protein Kinase C Delta type » PRKCD codant pour la protéine kinase C δ) et dans la réparation de l'ADN (« Three Prime Repair Exonuclease 1 » TREX1) (**Ghodke-Puranik and Niewold, 2015**).

Les études de type « Genome-Wide Association Studies » (GWAS) de séquençage du génome entier ont permis de mettre en évidence plusieurs gènes de susceptibilité du lupus. Ces études permettent d'identifier des mutations ponctuelles appelées « single nucléotide polymorphism » (SNP), qui correspondent au changement d'un nucléotide dans le génome d'une personne malade par rapport à un individu sain. Plus de 100 loci de susceptibilité ont été ainsi associés au LED, dont la plupart sont situés au niveau de régions non codantes régulant l'expression de gènes (**Kwon et al., 2019**).

Ces SNP peuvent être regroupés en trois grandes catégories : les mutations affectant la clairance des complexes immuns et des corps apoptotiques, les anomalies génétiques conduisant à une activation excessive du système immunitaire inné et celles conduisant à l'activation anormale des lymphocytes B et T. Parmi les gènes codant pour des protéines associées aux mécanismes d'apoptose et de clairance nous pouvons citer par exemple ATG5 (« Autophagy Related 5 »), DNASE1 et FCGR (« Fc Gamma Receptor ») codant pour les récepteurs liant la partie constante des Ac de type IgG. Un défaut au sein de ces voies de dégradation engendre la libération dans le milieu extracellulaire de protéines et d'acides nucléiques qui deviennent alors une source d'auto-Ag. Au niveau des gènes du système immunitaire inné identifiés, nous retrouvons des gènes clés de la voie de signalisation des interférons (IFN) « Interferon Regulatory Factor 5 » (IRF5), IRF7, « Signal Transducer and Activator of Transcription 4 » (STAT4) et les gènes codant pour les « Toll-like Receptor » (TLR) détectant les acides nucléiques (TLR7, 8, 9). Enfin, des polymorphismes sont aussi observés sur des gènes engagés dans la signalisation des lymphocytes T (LT) « Protein Tyrosine Phosphatase, Non receptor type 22 » (PTPN22), « Tumor Necrosis Factor SuperFamily 4 » (TNFSF4), CD3 ζ , et des LB, « B Lymphocyte Kinase » (BLK), « LCK/YES Novel Tyrosine Kinase » (LYN) et au niveau du locus du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II). L'ensemble de ces modifications génétiques contribue à la rupture de tolérance caractéristique du lupus (**Moulton et al., 2017; Teruel and Alarcón-Riquelme, 2016**) (**Figure 3**).

Comme énoncé précédemment, le LED affecte majoritairement les femmes. Les hormones, en particulier les œstrogènes, jouent un rôle important dans la régulation des cytokines et contribuent à la pathologie (Moulton, 2018), cependant la prédisposition des femmes ne peut être expliquée uniquement par ces facteurs. Les femmes possèdent deux copies du chromosome X et l'une des deux doit être inactivée afin de n'exprimer qu'une moitié des gènes. Un défaut de l'inactivation du chromosome X pourrait donc être impliqué dans le développement du lupus. Hewagama *et al* ont montré que les gènes codant pour « C-X-C motif Receptor 3 » (CXCR3) et CD40 Ligand (CD40L), présents sur le chromosome X, sont surexprimés dans les LT CD4⁺ des patientes lupiques (Hewagama *et al.*, 2013). D'autres gènes seraient affectés par un défaut du mécanisme d'inactivation du chromosome X comme les gènes codant pour les TLR 7 et 8 conduisant à une augmentation de leur expression et une production des IFN de type I (Christou *et al.*, 2019) (Figure 3).

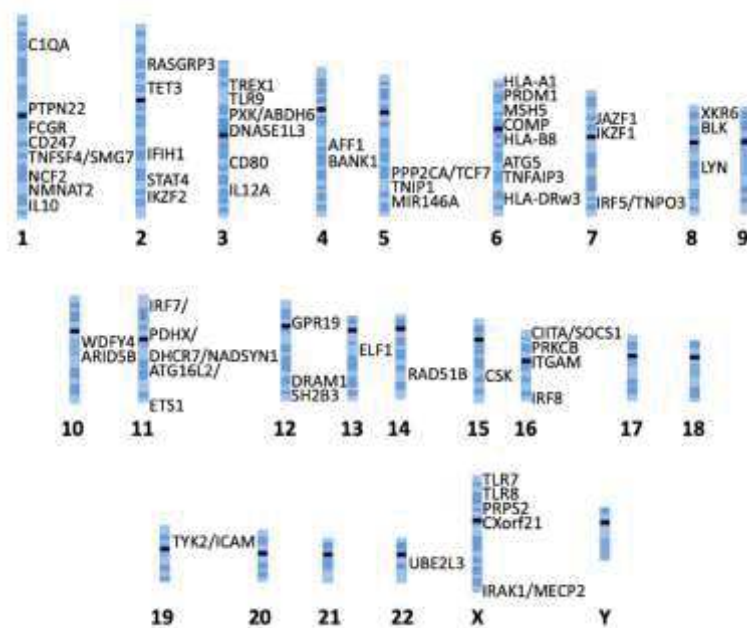


Figure 3 Gènes de susceptibilité du LED.

Les loci et gènes associés au lupus sont positionnés approximativement sur la carte du génome humain. D'après Moulton *et al.* 2017.

Ce processus d'inactivation du chromosome X est l'un des processus d'épigénétique parmi d'autres qui viennent compléter ce que la génétique à elle seule ne peut expliquer. En effet, les modifications des histones, la méthylation de l'ADN, et les ARN non codants induisent des changements d'expression génique héréditaires mais qui n'altèrent pas les séquences ADN. Une des preuves de l'importance de l'épigénétique dans la survenue de la maladie lupique a été

apportée par une étude portant sur des jumeaux monozygotes. Les jumeaux atteints de lupus présentaient une hypométhylation sur l'ensemble de leur ADN par rapport à leur jumeaux sains **(Javierre et al., 2010)**. L'hypométhylation au niveau des régions régulatrices de gènes associés au LED est l'une des modifications souvent retrouvée chez les LT CD4⁺ des patients lupiques, ce qui entraîne une surexpression des gènes et contribue à la progression de la maladie. Ceci a par exemple été montré avec le gène codant pour CD70 (une molécule de co-stimulation et ligand de CD27), hypométhylé et surexprimé par les LT CD4⁺, ce qui aboutit à une augmentation de la stimulation des LB et à la production d'IgG **(Lu et al., 2005)**. Récemment, des analyses de méthylation de l'ADN à l'échelle du génome ont également mis en évidence une hypométhylation de plusieurs gènes régulés par la signalisation des IFN de type I chez les patients lupiques dont IRF7 (activé principalement par la voie de signalisation du TLR7) suggérant une hypersensibilité à l'IFN de type I. Les auteurs de cette étude proposent d'utiliser le statut de méthylation de ces gènes comme biomarqueur à des fins de diagnostic des maladies auto-immunes ayant une signature IFN de type I **(Chen et al., 2019)**.

Les modifications des histones influencent également l'expression des gènes au cours du lupus. De façon similaire à la méthylation de l'ADN, les histones H3 et H4 sont hypoacétylées dans les cellules spléniques d'un modèle de lupus murin MRL lpr/lpr **(Garcia et al., 2005)** et dans les LT CD4⁺ des patients lupiques **(Hu et al., 2008)**. Il existe également des auto-Ac reconnaissant des modifications particulières d'histones dont le taux est corrélé à l'activité de la maladie et associé à l'atteinte rénale (comme l'acétylation de l'histone H2BP) **(Dieker et al., 2016)**. De plus, l'inhibition des histones désacétylases chez les souris lupiques « New Zealand black NZB x New Zealand white NZW » F1 (NZB/W) réduit les cytokines inflammatoires dans le sérum, diminue la proportion de LT auxiliaires 17 (Th17), augmente celle des LT régulateurs (Tregs) et améliore l'atteinte rénale **(Regna et al., 2014)**.

Ces dernières années, un nombre important de publications a révélé le rôle des micro-ARN dans le contrôle des fonctions immunitaires et de l'auto-immunité. Les micro-ARN sont des petits ARN d'environ 22 nucléotides, non codants, régulant l'expression génétique en induisant la dégradation des ARNm ou en inhibant leur traduction. Il a été montré que l'expression de miR-146a est diminuée dans les cellules circulantes de patients lupiques et son expression est inversement corrélée à l'activité de la maladie. Ce micro-ARN intervient dans la voie de signalisation des IFN en ciblant IRF5 et STAT1 **(Tang et al., 2009)**. A l'inverse, d'autres micro-ARN sont surexprimés au cours du lupus. Par exemple, l'expression de miR-155 est

retrouvée augmentée dans les LB, ce qui dérégulerait la traduction de l'enzyme « Activation-Induced cytidine Deaminase » (AID), une enzyme clé des processus d'hypermutation somatique (**Teng et al., 2008**). Par ailleurs, l'absence de miR-155 chez un modèle murin de lupus induit au pristane permet de diminuer le taux d'auto-Ac, les dommages rénaux, ainsi que l'expression des gènes dépendant de la signalisation IFN de type I (**Leiss et al., 2017**).

Ces études mettent en lumière l'importance des prédispositions génétiques dans le développement de la maladie. Toutefois, ces dernières ne permettent pas d'expliquer toutes les causes du LED, et comme décrit ci-dessus, les différents niveaux de régulation de l'expression des gènes viennent rajouter un élément de complexité. D'autre part, une troisième donnée influence aussi la survenue du lupus : ce sont les facteurs environnementaux qui peuvent activer directement le système immunitaire ou influencer sur l'épigénétique.

2. Les facteurs environnementaux

Ces différents facteurs environnementaux sont nombreux et comprennent des éléments extrinsèques tels que les rayonnements UV, la pollution, la cigarette ou des agents intrinsèques comme par exemple des infections ou le régime alimentaire.

a. Les rayonnements ultraviolets

Les patients lupiques présentent une photosensibilité non négligeable et l'exposition aux UV est reconnue pour créer et/ou aggraver des lésions cutanées. En effet, les rayonnements UV stimulent la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine (IL-1) et l'IL-6 (**Wlaschek et al., 1994**). Les UV auraient également un rôle dans l'incidence de la pathologie via l'induction de cassures dans l'ADN et la génération de mutations génétiques induisant une altération de l'expression des gènes ou l'apoptose cellulaire (**Barbhaiya and Costenbader 2014**). Récemment, il a été montré que l'exposition aux UV-B diminue la méthylation de l'ADN des LT CD4⁺ de patients lupiques, un élément intervenant dans la progression de la maladie, faisant ainsi le lien entre facteur environnemental et épigénétique (**Zhang et al. 2017**). Enfin, les UV sont à l'origine de la production de vitamine D mais le rôle de celle-ci dans la pathologie lupique est controversé. Plusieurs études ont mis en évidence une plus faible concentration de vitamine D chez les patients lupiques par rapport aux personnes non malades (**Hassanalilou et al., 2017**), cependant les faibles taux de vitamine D chez les patients ne sont

pas associés à l'activité de la maladie (**Kim et al., 2011**). La diminution de la vitamine D pourrait donc être une conséquence de la photosensibilité des patients.

b. Les hormones

La proportion considérable de femmes atteintes de lupus par rapport aux hommes (ratio de 9 pour 1) démontre l'importance du genre dans la pathologie. Les hormones naturelles jouent un rôle dans la régulation du système immunitaire, en effet, la prévalence est plus forte pour les femmes entre la puberté et la ménopause. Les œstrogènes peuvent se lier directement à leur récepteur présent sur les cellules immunitaires et contrôler l'expression des gènes. Dans un modèle murin spontané de lupus (NZB/W), la suppression du récepteur aux œstrogènes dans les LB diminue la production d'auto-Ac et réduit l'atteinte rénale (**Tabor and Gould, 2017**). Chez l'Homme, des études ont associé la prise d'hormones contraceptives ou post-ménopause avec une augmentation du risque de développer le LED (**Costenbader et al., 2007**). Outre les hormones naturelles de la femme, des perturbateurs endocriniens sont également impliqués dans la survenue du lupus, tel que le Bisphenol A. Ce composé chimique de synthèse stimulerait la production des IFN de type I et l'activation de l'inflammasome des cellules myéloïdes chez des souris lupiques NZB/W (**Panchanathan et al., 2015**). Ces études doivent cependant être confirmées chez les patients.

c. L'exposition à la silice

L'exposition à la poussière de silice est un facteur de risque reconnu dans la survenue du LED (**Miller et al., 2012**). Des études ont décrit une relation de dose réponse qui augmente avec l'intensité et le temps d'exposition à la silice (**Parks et al., 1999**). Les personnes travaillant dans des mines et la construction de bâtiment sont les plus exposées. Selon les données expérimentales, la silice induirait un stress oxydatif, l'apoptose (pouvant favoriser la libération d'antigènes intracellulaires lors d'un défaut de clairance) ainsi que l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires et l'activation des LT (**Pollard, 2016**).

d. La fumée de cigarette

Bien que le lien entre tabagisme et lupus est moins évident que pour d'autres maladies auto-immunes, il semble cependant que le risque de développer le LED est plus élevé chez les fumeurs par rapport aux non-fumeurs (**Costenbader et al., 2004**). Récemment, une étude a mis en évidence un lien entre la consommation de cigarette et le risque de développer une pathologie

lupique avec des auto-Ac ADNdb, alors qu'aucune association n'a été faite entre le tabagisme et le risque de développer un LED sans auto-Ac ADNdb (**Barbhaiya et al., 2018**). La fumée de cigarette pourrait d'une part induire un stress oxydatif et directement endommager l'ADN et créer des mutations génétiques. D'autre part, certains composants de la fumée de cigarette semblent stimuler l'expression de CD95 et de CD4 par les LB et LT respectivement et augmenterait la production de cytokines pro-inflammatoires, ce qui participerait à la sur-activation du système immunitaire (**Arnson et al., 2010**).

e. Les médicaments

Certains médicaments peuvent induire une maladie semblable au LED. Les plus connus sont le procaïnamide, un anti-arythmique utilisé pour le traitement des arythmies cardiaques et l'hydralazine, un relaxant musculaire traitant l'hypertension artérielle. Tous deux inhibent la méthylation de l'ADN en agissant sur l'ADN-méthyl-transférase 1 (DNMT1) ayant pour conséquence l'augmentation de l'expression de LFA-1 (« Lymphocyte Function-Associated Antigen 1 ») et l'auto-réactivité des LT (**Cornacchia et al., 1988**). Récemment, les inhibiteurs du TNF α , prescrits dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, ont été associés aux cas de lupus médicamenteux. L'utilisation de ces anti-TNF semble induire la production d'auto-Ac anti-nucléaire ce qui participerait à la survenue d'un lupus (**Zhu et al., 2010**). Cependant les manifestations cliniques du lupus induit par les médicaments diffèrent du LED. Généralement les atteintes des organes, telles que la glomérulonéphrite, ne sont pas observées et l'arrêt des médicaments atténue souvent les symptômes (**He and Sawalha, 2018**).

f. Les infections

Les infections durant l'enfance pourraient être liées au développement de LED plusieurs années après. Le virus d'Epstein Bar (EBV) est parmi les agents pathogènes le plus souvent associé au lupus. Il a été décrit des taux de séropositivité pour EBV plus élevés chez les adultes et les enfants atteints de lupus que dans le reste de la population (**James et al., 1997**). Un des mécanismes proposés pour faire le lien entre auto-immunité et infection est le mimétisme moléculaire. En effet, il y a des épitopes communs entre l'antigène « Epstein-Barr nuclear antigen 1 » (EBNA1) du virus EBV et les protéines du soi du spliceosome Smith (Sm) et Ro, (en particulier la sous-unité de 60 kDa), ainsi l'infection peut potentialiser la génération d'auto-Ac anti-Sm et anti-Ro (**McClain et al., 2005**). De plus, les patients lupiques auraient une réponse immunitaire défectueuse contre le virus EBV qui ne peut être expliquée par les

traitements immunosuppresseurs mais probablement due à une réponse cellulaire T non adaptée **(Kang et al., 2004)**.

3. Le microbiote

Ces dernières années, plusieurs études ont suggéré un lien entre le microbiote et les maladies auto-immunes telles que le diabète de type I, la sclérose en plaques et le LED. Le microbiote représente l'ensemble des microorganismes non pathogènes (bactéries, virus, champignons) présents au niveau de l'appareil digestif. Il a récemment été montré chez un modèle murin de la sclérose en plaques que les plasmocytes producteurs d'IgA formés au niveau de l'intestin jouent un rôle dans la suppression de l'inflammation neurologique **(Rojas et al., 2019)**. Dans le cas du LED, les femmes atteintes de lupus présentent un ratio plus faible de *Firmicutes* /*Bacteroidetes* par rapport à la population générale, et ce même lors des phases inactives **(Hevia et al., 2014)**. Cette dysbiose intestinale favoriserait la différenciation des LT en T1h7, participant à l'inflammation, alors qu'un enrichissement du microbiote avec des bactéries induisant la différenciation en LT régulateur (LTreg) permet de rétablir des réponses tolérogènes **(López et al., 2016a)**. De plus, la transplantation des bactéries intestinales de souris lupiques à des souris saines sans germes conduit à la production d'auto-Ac anti-ADN, la stimulation des réponses inflammatoires et l'augmentation de l'expression de gènes liés à la signalisation des IFN de type I (IRF7) **(Ma et al., 2019)**.

IV. La physiopathologie du lupus

A l'heure actuelle, il est encore difficile d'établir un ordre précis des événements déclenchant le lupus. C'est une combinaison de facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux qui influence la survenue de la maladie. Alors que la composante immunologique est quant à elle nécessaire au développement du lupus, il a été proposé qu'un défaut de clairance apoptotique pourrait être le point de départ de la rupture de tolérance. En effet, une déficience dans les voies de mort cellulaire, comme l'apoptose et la NETose, associée à un excès d'apoptose engendré par les différents facteurs génétiques et environnementaux, contribuent à la libération d'antigènes nucléaires (tels que l'ADN) normalement inaccessibles au système immunitaire **(Figure 4)**.

1. Le rôle de l'immunité innée

a. Un défaut de clairance apoptotique

L'apoptose est une mort cellulaire programmée permettant de maintenir l'homéostasie tissulaire. Les phagocytes éliminent par ce processus les débris, les cellules endommagées et mortes afin d'éviter l'activation du système immunitaire. L'apoptose est initiée intrinsèquement (par la cellule elle-même) ou par la voie extrinsèque résultant d'une communication entre le système immunitaire et la cellule endommagée. Un ensemble de caspases est activé en cascade enclenchant la dégradation de l'ADN et la formation de corps apoptotiques, qui seront par la suite éliminés par les phagocytes. Afin d'être reconnues, les cellules apoptotiques exposent, entre autres signaux, la phosphatidylserine sur le feuillet externe de leur membrane plasmique tout en maintenant son intégrité pour limiter la libération de constituants cellulaires dans le milieu environnant **(Elmore, 2007)**.

Différentes études ont mis en évidence un défaut de clairance apoptotique dans le LED. En effet, les macrophages de patients lupiques montrent une diminution de leur capacité à ingérer du matériel apoptotique **(Svensson, 1980)(Herrmann et al., 1998)**. De plus, les cellules souches hématopoïétiques de patients montrent des défauts de différenciation en macrophages **(Munoz et al., 2010)**. Par ailleurs, il a été décrit chez certains patients qu'une diminution d'un type spécifique de macrophages (« tingible body macrophages ») induit une accumulation de cellules apoptotiques dans les centres germinatifs des ganglions lymphatiques. Par conséquent, les auto-Ag nucléaires libérés peuvent être captés par les cellules dendritiques folliculaires (FDC) et favoriser la génération de LB auto-réactifs **(Baumann et al., 2002)**.

a. Le rôle des NETs

Les neutrophiles sont les leucocytes les plus abondants du système immunitaire inné. Ils ont une capacité de phagocytose, de sécrétion de cytokines, d'agent antimicrobiens et sont responsables de la libération des « Neutrophil Extracellular Traps » (NETs). Ce sont des projections de chromatine associées à des protéines cytoplasmiques antimicrobiennes. Ces NETs agissent comme mécanisme de défense en piégeant les pathogènes et ils peuvent être libérés au cours de la mort cellulaire spécifique des neutrophiles : la NETose **(Frangou et al., 2019)**.

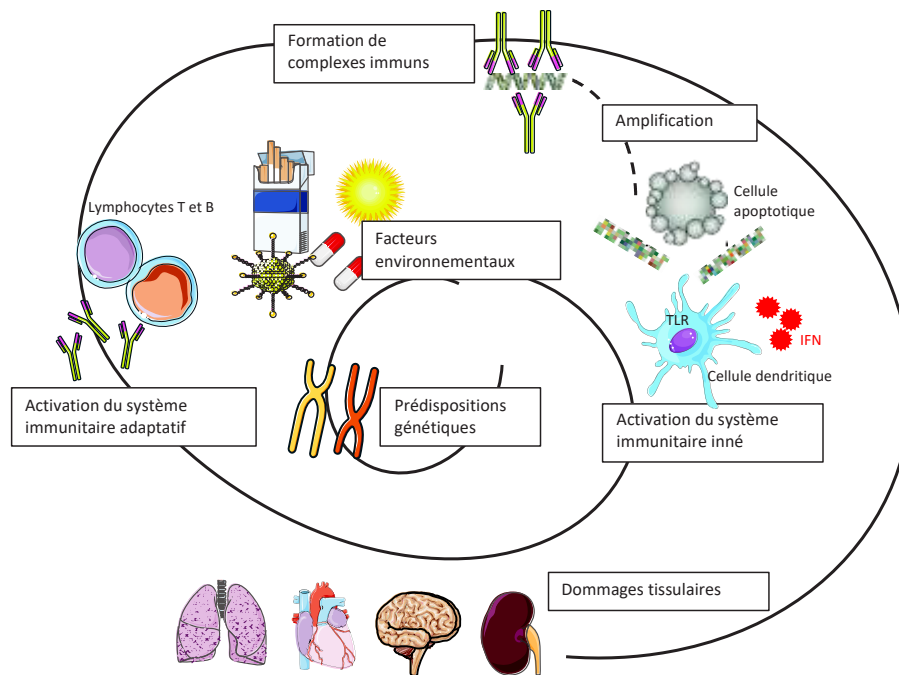


Figure 4 La spirale de la pathologie du lupus

Les personnes présentant certains polymorphismes génétiques sont plus susceptibles de développer un lupus. Ces prédispositions génétiques combinées avec différents facteurs environnementaux contribuent à l'initiation et à la perpétuation de la maladie. La combinaison de ces facteurs peut engendrer un excès d'apoptose et l'activation du système immunitaire inné ce qui induit la présentation accrue d'Ag aux lymphocytes T (LT) et la libération de cytokines pro-inflammatoires dont l'IFN de type I. Ces phénomènes vont faciliter l'activation du système immunitaire adaptatif et la production d'auto-Ac anti-nucléaires pouvant former des complexes immuns capables de stimuler le système immunitaire inné, entre autres par l'intermédiaire des TLR. Les complexes immuns générés créent, d'une part, une boucle d'amplification conduisant à l'activation d'un plus grand nombre de cellules auto-réactives et d'autre part, ils peuvent aller se déposer dans les organes cibles tels que les reins, le cœur, les poumons... et engendrer des dommages tissulaires. D'après (Liu and Davidson 2012).

Du fait de la libération de matériel nucléaire, ce processus a rapidement été considéré comme une source potentielle d'auto-Ag, dans les maladies auto-immunes. Les neutrophiles de patients lupiques présentent plusieurs anomalies. Un taux élevé de neutrophiles apoptotiques dans le sang des patients atteints de LED est corrélé avec l'activité de la maladie (**Courtney et al., 1999**). Il a aussi été décrit une population anormale de neutrophiles (les granulocytes de faible densité) chez les patients lupiques. Ces granulocytes présentent une capacité accrue de synthèse de NETs, une augmentation de la libération de protéines bactéricides et d'auto-Ag ce qui stimulerait le production d'IFN de type I par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) (**Villanueva et al., 2011**).

Comme dans l'apoptose, un défaut d'élimination des NETs est impliqué dans la survenue du LED. En conditions physiologiques, les NETs sont dégradés par les macrophages et grâce à la DNase I et la protéine du complément C1q (**Farrera and Fadeel, 2013**). Hakkim et al. ont montré que certains patients présentent une faible dégradation des NETs. Deux mécanismes seraient en cause : la présence d'inhibiteurs de la DNase I ou des auto-Ac tels que des Ac anti-

NETs (ou « Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies » ANCA) (**Hakkim et al., 2010**) ou des Ac anti-DNAse (**Yeh et al., 2003**) empêchant leur reconnaissance par cette même enzyme. Ce défaut de clairance des NETs est corrélé avec un titre d'auto-Ac (anti-ADN, anti-NETs) élevé et un risque de développer une atteinte rénale (**Hakkim et al., 2010**).

Si les corps apoptotiques et les NETs ne sont pas correctement éliminés par le système immunitaire inné, ils peuvent être une source potentielle d'auto-Ag, favorisant la rupture de tolérance et la production d'auto-Ac par les LB auto-réactifs.

b. La signature IFN α

En 1982, Preble et al. ont mis en évidence pour la première fois des taux élevés d'IFN α dans le sérum de patients lupiques (**Preble et al., 1982**). En 2003, plusieurs groupes ont confirmé la présence d'IFN α dans le sang de patients atteints de lupus ainsi qu'un niveau d'expression élevé de certains gènes stimulés par l'IFN, qui est depuis appelé "la signature IFN" (**Baechler et al., 2003; Bennett et al., 2003; Crow et al., 2003**). Cette signature IFN, ainsi que la production locale d'IFN α , ont également été détectées dans les reins des patients lupiques présentant une glomérulonéphrite (**Castellano et al., 2015**). Bien que l'IFN α soit une cytokine classiquement produite en réponse aux infections virales, la signature IFN est observée chez 60 à 80 % des patients lupiques (**Crow, 2014**). Il a été montré que les pDC sont les principales cellules productrices de l'IFN α (**Lövgren et al., 2004**). Les acides nucléiques, libérés par les mécanismes cités précédemment, associés aux IgG sous forme de complexes immuns, sont endocytés via le récepteur Fc γ RIIa à la surface des pDC. Les acides nucléiques se retrouvent ainsi au sein des endosomes et interagissent avec les récepteurs TLR7 ou TLR9 qui activent la voie de signalisation des IFN (**Lövgren et al., 2006**).

Les effets des IFN de type I sur le système immunitaire sont nombreux et dépendent des cellules cibles ainsi que de la liaison aux différentes sous-unités du récepteur aux IFN. La différenciation des monocytes en cellules dendritiques matures et compétentes pour la présentation antigénique est influencée par l'IFN α (**Blanco et al., 2001**). En effet, l'IFN α induit l'expression des molécules du CMH et de molécules de co-stimulation (CD80, CD86, CD40) par les cellules dendritiques, ce qui est associé à une augmentation de leur capacité de stimulation des LT (**McNab et al., 2015**). Les IFN de type I induisent également une expression accrue de « B-cell Activating Factor » (BAFF, une cytokine nécessaire au développement et à la prolifération des LB), favorisent la différenciation des Th17 et suppriment l'activité

régulatrice des Treg (**López et al., 2016b**). L'ensemble de ces éléments maintient un contexte inflammatoire et soutient l'expansion des cellules auto-réactives.

Chez la souris, le rôle de l'IFN α dans le développement de la pathologie a été démontré dans un modèle murin spontané de lupus (NZB/W). Les souris traitées avec de l'IFN α présentent un développement de la maladie accéléré par rapport aux souris non traitées. La production d'auto-Ac est plus rapide, l'atteinte rénale ainsi que la mort due à cette défaillance surviennent plus précocement chez les souris traitées (**Mathian et al., 2005**). Chez ce même modèle murin, l'IFN α induit l'infiltration des macrophages dans les reins et l'expression de métalloprotéinases participant aux lésions tissulaires (**Triantafyllopoulou et al., 2010**). A l'inverse, une déficience du récepteur aux IFN de type I chez les souris lupiques induit une diminution de la sévérité des symptômes et une réduction des marqueurs biologiques (**Santiago-Raber et al., 2003**).

c. Le rôle des Toll-like receptors et des senseurs d'acides nucléiques

Les TLR sont des récepteurs membranaires ou intracytoplasmiques ayant un rôle central dans le système immunitaire inné. Ils reconnaissent des molécules particulières associées aux pathogènes appelées « pathogen associated molecular patterns » (PAMP). Les TLR à la surface des cellules (TLR1, 2, 4, 5, 6) reconnaissent principalement des composants bactériens tel que les lipopolysaccharides par le TLR4 et la flagelline pour le TLR5. Les TLR intracellulaires sont présents dans les endosomes et détectent les acides nucléiques dérivés de bactéries et de virus. Ces TLR intracellulaires incluent le récepteur TLR3 réagissant avec l'ARN double brin, les récepteurs TLR7 et 8 reconnaissant l'ARN simple brin, et enfin le récepteur TLR 9 se liant aux motifs CpG non méthylés de l'ADN (**Kawasaki and Kawai, 2014**). Cependant, ces TLR peuvent également répondre aux acides nucléiques endogènes produits au cours de l'inflammation et des dommages cellulaires (**Barrat et al., 2005**) (**Figure 5**).

Au cours du LED, les complexes immuns, formés par les auto-Ac et des auto-Ag tels que l'ARN et l'ADN, sont reconnus par le BCR des LB ou par le récepteur FC γ R des cellules dendritiques. Suite à leur internalisation par ces dernières, ces complexes se lient aux TLR7 et TLR9 ce qui active la voie de signalisation des IFN (**Lau et al., 2005; Lövgren et al., 2004**). Il a été observé un niveau d'expression plus élevé des ARNm codant pour les TLR7, TLR9 et de l'IFN α dans les cellules mononuclées des patients lupiques par rapport aux cellules d'individus sains (**Komatsuda et al., 2008**). De plus, l'implication du récepteur TLR7 dans la pathologie a été démontrée chez plusieurs modèles murins de lupus. Les souris lupiques BXSB-Yaa possèdent une mutation sur le chromosome Y, Yaa (« Y-linked autoimmune acceleration »), qui

correspond à une translocation de gènes du chromosome X sur le chromosome Y, induisant la duplication de plusieurs gènes, dont le gène codant pour TLR7. La sur-expression de TLR7 est responsable du phénotype auto-immun associé à cette mutation chez ces souris (**Pisitkun et al., 2006**). De plus, une abolition de la voie de signalisation du récepteur TLR7 conduit à une diminution de la production des auto-Ac anti-RNP (**Kono et al., 2009**). Dans le modèle murin de lupus induit au pristane, la production d'IFN de type I est dépendante de TLR7 et l'inhibition de la voie de signalisation de ce récepteur diminue fortement l'inflammation, la production d'auto-Ac et empêche le développement de la glomérulonéphrite (**Lee, Kumagai, et al. 2008; Smith et al. 2019**). Bien que la délétion de TLR 7 dans les cellules B diminue l'auto-immunité et la production d'auto-Ac anti-ARN et anti-Sm/RNP, la suppression de TLR9 produit l'effet inverse et exacerbe l'inflammation et la glomérulonéphrite chez les souris lupiques, malgré une diminution du taux d'auto-Ac anti-ADN (**Jackson et al., 2014**). En effet, les données concernant le rôle de TLR9 sont controversées. D'une part, l'expression du récepteur TLR 9 est augmentée dans les LB et les cellules dendritiques des patients présentant une pathologie sévère, cependant ces cellules sont moins actives et moins sensibles à la stimulation du récepteur TLR 9 via son ligand (**Zorro et al., 2009**). D'autre part, une étude récente a décrit un nouveau mécanisme qui pourrait contribuer au rôle régulateur du récepteur TLR 9 dans la pathologie lupique. Lors de la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages, l'ADN de cellules apoptotiques se lie au récepteur TLR9 et induit l'expression du facteur de transcription « Aryl hydrocarbon Receptor » (AhR). Cette activation conduit à la production de la cytokine immuno-modulatrice IL-10. De plus, la délétion du récepteur TLR 9 ou de AhR accroît l'auto-immunité chez les souris lupiques déficientes pour le récepteur du fragment constant (Fc) (B6.Fcgr2b^{-/-}) (**Shinde et al., 2018**).

Ces données mettent en évidence le rôle important de la reconnaissance des complexes immuns et des TLR dans l'activation du système immunitaire inné, la production des IFN de type I et le développement de la pathologie lupique. D'autres études suggèrent que l'activation du système immunitaire inné et la production d'IFN de type I peuvent aussi être indépendantes des TLR et induites par les senseurs des acides nucléiques cytoplasmiques. Par exemple, l'activation de la voie de signalisation comprenant le récepteur « cyclic GMP-AMP synthase » (cGAS) qui est sensible à l'ADNdb a récemment été mise en évidence chez certains patients atteints de lupus (**An et al., 2017**) (**Figure 5**). La protéine cGAS réagit avec de l'ADN cytosolique, pouvant provenir d'un stress cellulaire, pour former la molécule « cyclic GMP-AMP » (cGAMP) qui par la suite se liera à « STimulator of INterferon Genes » (STING) et conduira à la transcription de gènes pro-inflammatoires.

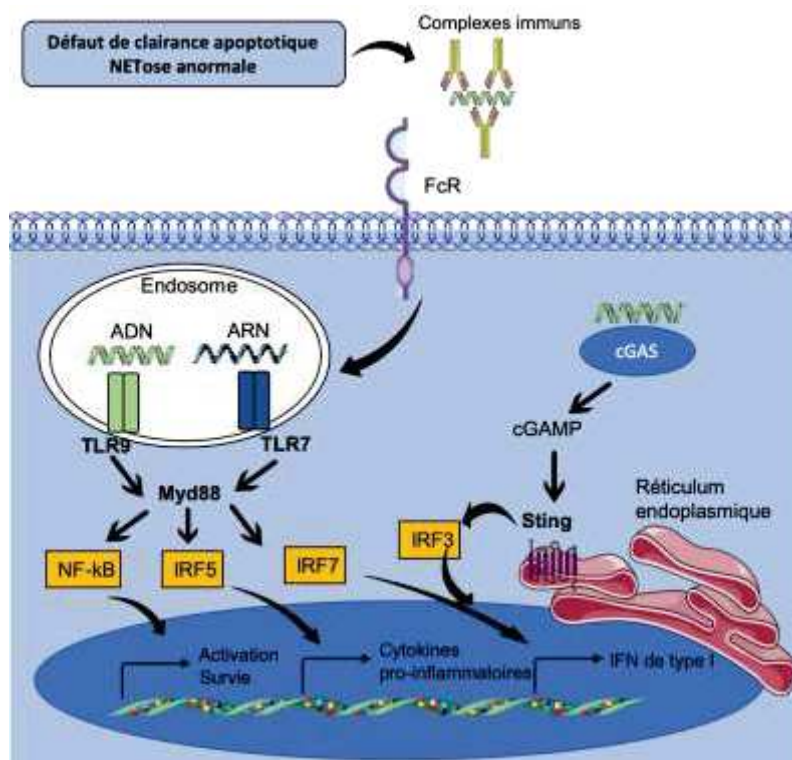


Figure 5 Le rôle de l'immunité innée dans le développement du LED

Le défaut de clairance apoptotique et des NETs contribue à la libération d'auto-Ag et à la reconnaissance du matériel nucléaire par les auto-Ac. Les complexes immuns formés peuvent être alors captés par les cellules de l'immunité innée (les macrophages, les cellules dendritiques et les pDC) exprimant les récepteurs au Fc des immunoglobulines (FcR). Suite à la phagocytose de ces débris apoptotiques, l'ADN et l'ARN sont reconnus par différents senseurs des acides nucléiques dont les TLR et cGAS déclenchant les voies de signalisation qui induisent l'expression de gènes codants pour des cytokines inflammatoires et l'IFN de type I. Ces divers mécanismes favorisent la mise en place de la signature IFN α observée dans le LED et contribuent à activer le système immunitaire adaptatif. D'après (Liu and Davidson, 2012).

Ce second messager, cGAMP, n'est présent que très brièvement dans les cellules, ce qui limite sa détection, les auteurs suggèrent donc que l'activation de cette voie pourrait être augmentée chez un plus grand nombre de patients lupiques que ce qui est observé. De plus, une mutation familiale de STING a été mise en évidence dans le développement d'une pathologie de type lupique chez ces patients présentant entre autres des atteintes pulmonaire et articulaire, un rash malaire et une signature IFN de type I (Jeremiah et al., 2014). Une augmentation de l'expression des gènes associés aux IFN ainsi qu'une infiltration inflammatoire des poumons et des reins ont également été décrites dans un modèle murin ayant un gain de fonction de STING (Bouis et al., 2019).

Les défauts dans la voie d'élimination des cellules mortes et l'activation du système immunitaire inné apparaissent être en première ligne dans la rupture de tolérance, cependant les

acteurs de l'immunité adaptative, les LT et LB, jouent un rôle essentiel dans le développement et le maintien de la pathologie lupique.

2. L'activation de l'immunité adaptative

L'immunité adaptative implique l'expansion clonale des lymphocytes et la génération d'effecteurs T et B à longue durée de vie. Lors des processus de réarrangements des gènes codant pour le TCR et le BCR, des lymphocytes auto-réactifs sont continuellement générés. Ces mécanismes permettent en première intention d'obtenir un large répertoire de cellules réagissant contre les divers pathogènes. Par la suite, les lymphocytes potentiellement auto-réactifs, dans les centres germinatifs pour les LB ou le thymus pour les LT, peuvent d'une part réarranger leurs récepteurs afin de ne plus reconnaître les Ag du soi ou être éliminés au niveau de différents points de contrôle du développement par les mécanismes de délétion. D'autre part, en périphérie, ils peuvent être supprimés par les cellules régulatrices ou devenir insensible à l'activation (l'anergie). Dans le LED, ces mécanismes de régulation peuvent être altérés par les facteurs génétiques et/ou environnementaux. Le lupus est une maladie auto-immune où la génération d'auto-Ac par les plasmocytes contribue fortement aux atteintes, cependant, plusieurs études ont mis en évidence la contribution des LT dans la pathologie notamment en apportant l'aide nécessaire aux LB.

a. Les lymphocytes T

Les LT isolés de patients lupiques présentent un phénotype altéré avec des défaillances dans les voies de signalisation incluant le récepteur des LT, une production de cytokines anormale et une distribution différente des sous-populations de LT (**Moulton et al., 2017**).

Un des premiers phénomènes décrit est la signalisation aberrante via le récepteur TCR (« T Cell Receptor ») (**Figure 6**). Le complexe du TCR est formé par deux sous-unités (TCR α et TCR β) et reconnaît les peptides antigéniques présentés par le CMH à la surface des cellules présentatrices d'Ag. Le TCR est lui-même associé avec le complexe CD3 constitué de différentes sous-unités qui seront phosphorylées pour permettre la transduction du signal suite à la reconnaissance de l'Ag.

Chez les LT isolés de patients lupiques, le niveau d'expression de la chaîne ζ de CD3 est significativement plus faible par rapport aux LT des individus sains (**Brundula et al., 1999**). De plus, il a été décrit que la chaîne ζ de CD3 est substituée par son homologue, la chaîne γ du récepteur Fc (**Enyedy et al., 2001**). Cependant, la chaîne γ du récepteur Fc recrute la kinase

« Spleen Tyrosine Kinase » (Syk), à la place de la protéine « Zeta-chain-Associated Protein of 70 kDa » (ZAP-70) normalement recrutée par CD3. L'affinité de l'interaction Fc γ R-Syk est 100 fois plus forte que celle de la chaîne ζ du TCR-ZAP-70 ce qui induit une hyper-activation de la voie de signalisation du TCR, une augmentation du flux calcique et une diminution de la production d'IL-2 (**Nambiar et al., 2003a**). La reconstitution de la chaîne ζ de CD3 dans les LT de patients permet de restaurer le flux de calcium ainsi que la production d'IL-2 (**Nambiar et al., 2003b**). Il a également été décrit dans un modèle murin de lupus et chez les patients atteints du LED que les LT présentent une pré-agrégation des complexes TCR-CD3 avec des molécules de co-stimulation au niveau des radeaux lipidiques membranaires, suggérant que les LT sont préparés à être activés (**Deng and Tsokos, 2008; Jury et al., 2004**). En effet, chez les individus sains, les molécules du TCR et CD3 se retrouvent normalement dispersées à la surface de la membrane des LT et exclues de ces radeaux lipidiques. Lors d'une rencontre avec le complexe CMH-Ag et le TCR, les molécules du TCR et CD3 s'associent avec les radeaux lipidiques contenant des molécules de stimulation et forment, avec les cellules présentatrices d'Ag, la synapse immunologique (**Kabouridis and Jury, 2008**). De manière intéressante, des molécules co-inhibitrices telles que « Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4 » (CTLA-4) et « B- and T-lymphocyte attenuator » (BTLA) se retrouvent exclues de ces radeaux lipidiques dans les cellules T de patients lupiques, ce qui va empêcher l'inhibition et contribuer à l'hyper-activation de la voie de signalisation du TCR dans les LT (**Jury et al. 2010; Sawaf et al. 2018**) (**Figure 6**).

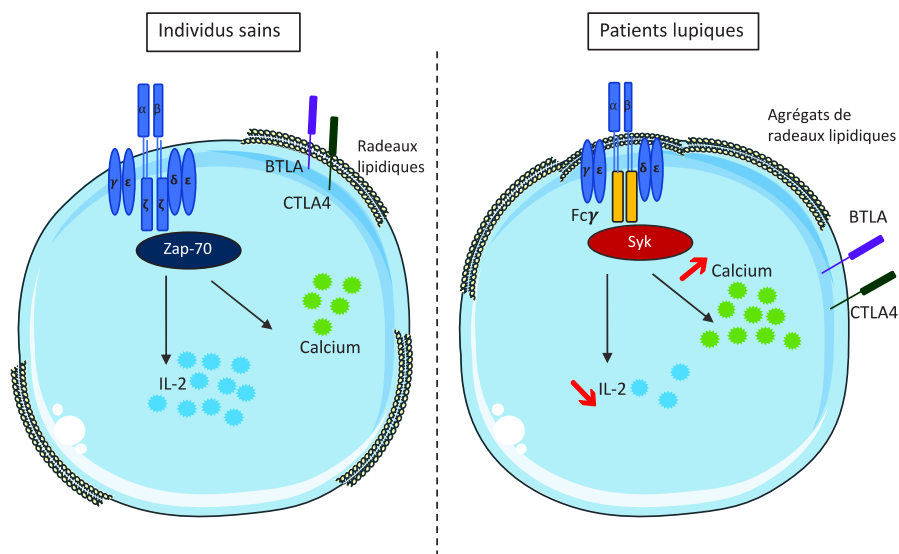


Figure 6 Altération de la voie de signalisation du TCR chez les patients lupiques

Chez les individus sains, le récepteur TCR des LT est associé au complexe CD3, constitué de différentes chaînes permettant de relayer le signal au niveau intracellulaire. Suite à l'engagement du TCR avec un Ag, la phosphorylation de la chaîne ζ induit le recrutement de la protéine Zap-70. Chez les patients lupiques cette chaîne

ζ du complexe CD3 est remplacée par la chaîne γ du récepteur Fc et recrute la protéine Syk au lieu de la protéine ZAP-70, ce qui aboutit à une signalisation plus forte du TCR, dont l'augmentation du flux de calcium et une diminution de la production d'IL-2. Lors de l'activation des LT chez les individus sains, les TCR se regroupent en cluster au niveau des radeaux lipidiques, ce qui permet entre autres de rapprocher les molécules co-inhibitrices telles que BTLA pour induire une potentielle régulation négative. En revanche, chez les patients lupiques, le TCR est « pré-clusterisé » au niveau de ces radeaux lipidiques et les molécules inhibitrices en sont exclues ce qui facilite l'activation des LT.

On distingue également des anomalies de répartition parmi les différentes populations de LT chez les patients lupiques par rapport aux individus sains.

Les LT CD4⁺ jouent un rôle crucial en apportant de l'aide au LB pour la production d'Ac et dans la régulation de la réponse immunitaire. Ils sont divisés en différentes sous-populations (Th1, Th2, Th17, Treg...) en fonction des cytokines sécrétées et des facteurs de transcription exprimés.

Les LT folliculaires auxiliaires (TFH) CD4⁺ ont été largement étudiés dans le lupus du fait de leur fonction essentielle dans la maturation des LB et leur différenciation en cellules sécrétrices d'Ac dans les centres germinatifs. Ces cellules TFH sont caractérisées par l'expression de CXCR5, « Programmed cell Death 1 » (PD1), « Inducible T-cell COStimulator » (ICOS) et OX40, et elles expriment le facteur de transcription « B-cell lymphoma 6 protein » (Bcl6) nécessaire à leur fonction. Les TFH sécrètent la cytokine IL-21 qui permet ainsi la différenciation plasmocytaire, l'hypermutation somatique et la commutation isotypique par les LB (**Kim et al., 2018**). L'IL-21 a été retrouvée augmentée dans le sérum des patients lupiques et ceci est corrélé avec le nombre de cellules TFH et avec l'activité de la maladie (**Wang et al., 2014**). Cette observation est confirmée chez un modèle murin de lupus BXSB-Yaa qui présente une augmentation de l'IL-21 sécrétée par des cellules de type TFH. Les souris BXSB-Yaa déficientes pour le récepteur de l'IL-21 n'ont pas d'atteinte rénale ni de mortalité précoce (**Bubier et al., 2009**). Par ailleurs, notre laboratoire a pu montrer que les souris NZB/W présentaient un nombre accru de TFH et que ces derniers produisaient plus d'IL-21 (**Le Coz et al., données non publiées**). De plus, une étude récente a montré que l'inhibition du métabolisme du glucose permet de diminuer le nombre de TFH auto-réactifs chez les souris lupiques sans affecter les TFH dépendant d'une réponse aux pathogènes, ce qui laisse suggérer un métabolisme différent dans les Lymphocytes TFH auto-réactifs (**Choi et al., 2018**). Plusieurs équipes ont également mis en évidence une augmentation de la proportion des cellules TFH circulantes dans le sang des patients lupiques (**Simpson et al., 2010**) dont notre laboratoire qui s'est intéressé plus particulièrement à la dérégulation de la balance des diverses populations de TFH (TFH1, TFH2 et TFH17) (**Le Coz et al. 2013**). Les patients présentent en effet une

diminution des TFH1 en faveur d'une augmentation de la proportion de TFH2 (TFH fournissant l'aide aux LB) ce qui est corrélé au score de la maladie.

Une autre population de LT participe à l'inflammation et à la production des auto-Ac dans le lupus. Les cellules Th17 expriment le facteur de transcription « RAR-related Orphan Receptor gamma » (ROR γ T) et sont les principales productrices de l'IL-17. Le sérum des patients lupiques présentent un niveau élevé de la cytokine IL-17 par rapport aux individus sains (**Chen et al., 2010**). Cette étude a suggéré une corrélation entre le niveau sérique élevé de cette cytokine et le score SLEDAI, cependant d'autres études ne mettent pas en évidence de lien entre l'augmentation d'IL-17 et l'activité de la maladie (**Vincent et al., 2013; Zhao et al., 2010**). Malgré ces données, l'IL-17 semble impliquée dans la néphrite lupique. En effet, chez les patients lupiques ayant une atteinte rénale, l'expression de gènes liés aux cellules Th17 est augmentée par rapport aux personnes saines (**Kwan et al., 2009**). L'implication de cette cytokine a également été mise en évidence dans les modèles murins. Une augmentation de la cytokine IL-17 est retrouvée dans un modèle murin présentant des caractéristiques similaires au LED humain, les souris MRL lpr/lpr qui ont une mutation spontanée du gène FAS (appelée lpr, pour lympho-prolifération) affectant l'apoptose des lymphocytes. De plus, l'infiltration de LT produisant l'IL-17 dans les reins de ces souris est impliquée dans le développement de l'atteinte rénale (**Zhang et al., 2009**). Le rôle de l'IL-17 a également été démontré dans l'induction et le maintien de centres germinatifs dans un modèle murin (BXD) de maladie auto-immune développant spontanément une glomérulonéphrite, des auto-Ac et une arthrite (**Hsu et al., 2008**). Par ailleurs, l'inhibition de l'IL-17 chez les souris Roquin^{san/san}, ayant un phénotype auto-immun, permet d'améliorer l'atteinte rénale, d'augmenter le nombre de LT régulateurs et à l'inverse de diminuer les centres germinatifs ainsi que la différenciation des LT et LB folliculaires (**Lee et al., 2019**).

Les lymphocytes Th17 ne sont pas les seuls producteurs de cette cytokine. En effet, les cellules T double négatives (DN) anormalement présentes dans la pathologie lupique sont également responsables de la production d'IL-17. Les LT DN n'expriment ni le marqueur CD4 ni le marqueur CD8 et pourraient provenir du thymus en ayant échappé à la sélection négative, ou dériver de LT CD8⁺ périphériques activés et dont l'expression du marqueur CD8 est perdue (**Brandt and Hedrich, 2018**). En 2008, une étude a mis en lumière le rôle des cellules DN dans la pathologie lupique. Les LT DN de patients lupiques produisent une forte quantité d'IL-17 et d'IFN γ et s'accumulent dans les reins, suggérant leur implication dans l'atteinte rénale (**Crispín et al., 2008**). L'expression excessive d'un facteur de transcription « cAMP responsive element

modulator » (CREM) α a été évoquée comme principale cause dans la génération des cellules T DN chez les patients lupiques. En effet, ce facteur de transcription, exprimé à un niveau élevé dans les LT lupiques, joue un rôle dans la diminution de l'expression de CD8 et de l'IL-2 et augmenterait la production d'IL-17 (**Hedrich et al., 2012; Rauen et al., 2011**). De plus, ces cellules contribueraient à la production d'(auto)-Ac en fournissant de l'aide aux LB (**Sieling et al., 2000**). La présence de ces cellules T DN est aussi observée chez le modèle murin MRL lpr/lpr qui développe une lymphadénopathie résultant d'une hyperprolifération et une accumulation des cellules T DN (**Balomenos et al., 1997**).

Enfin, une autre sous-population de LT joue également un rôle important dans la régulation des réponses immunitaires et la rupture de tolérance au cours du LED, les LT régulateurs (Treg). En condition physiologique, ils limitent la prolifération et l'activation des leucocytes afin de maintenir une homéostasie du système immunitaire. Les LTreg murins sont caractérisés par l'expression des marqueurs CD4, CD25 (la chaîne α du récepteur à l'IL-2) et le facteur de transcription « Forkhead box P3 » (FoxP3). Chez la souris lupique NZB/W jeune, la proportion de cellules Treg semble plus faible dans la rate et les ganglions lymphatiques, sauf pour les ganglions rénaux, comparée à celle des souris saines. Cependant, la fréquence des lymphocytes Treg dans les ganglions rénaux est élevée et corrélée à l'infiltration cellulaire et l'inflammation des reins (chez les souris NZB/W âgées), ce qui reflète une réaction précoce à l'inflammation locale mais qui ne permet pas de prévenir les lésions de l'organe (**Scalapino et al., 2006**). Cette diminution du pourcentage de LTreg dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS) est aussi observée au cours du développement de la pathologie chez la souris MRL lpr/lpr et résulterait d'une insuffisance de l'IL-2 (**Yang et al., 2008**). D'un point de vue fonctionnel, les LTreg auraient une capacité réduite à inhiber la prolifération des LT effecteurs chez la souris MRL lpr/lpr (**Parietti et al., 2008**).

Chez l'Homme, les études concernant les cellules Treg sont contradictoires. En effet, certaines études ont montré une diminution de leur nombre ainsi qu'un défaut de fonctionnalité chez les patients lupiques (**Bonelli et al., 2008; Lyssuk et al., 2007**)(**Lyssuk et al., 2007**)(**Lyssuk et al., 2007**)(**Lyssuk et al., 2007**) alors que d'autres n'observent pas d'anomalies par rapport aux individus sains (**Vargas-Rojas et al., 2008**). Cette différence vient notamment du fait que les marqueurs utilisés pour identifier ces cellules peuvent varier d'une étude à une autre et peuvent influencer sur la pureté de la population analysée. Récemment, Li et collaborateurs ont publié une méta-analyse des données sur les modifications des Treg relevées chez les patients lupiques (**Li et al., 2019**). En résumé, le nombre absolu des cellules Treg serait plus faible chez les patients lupiques actifs que chez les individus sains. Cependant, sur l'ensemble des études publiées

analysées il n'y aurait pas d'anomalie de la capacité suppressive des LTreg chez les patients lupiques (**Li et al., 2019**). Ainsi, le faible nombre de LTreg serait insuffisant pour limiter l'inflammation et serait donc un acteur dans le développement de la pathologie chez l'Homme.

b. Les LB et la production d'auto-anticorps

Ces cellules jouent un rôle majeur dans la physiopathologie du LED de par la production d'auto-Ac, de cytokines et par la présentation d'Ag aux cellules T. Il est reconnu que les LB auto-réactifs se différenciant en plasmocytes sécrétant des auto-Ac sont au centre du développement du LED. En effet, la suppression des LB chez la souris NZW x BXSB F1, avec un traitement continu d'Ac anti-IgM, empêche la production d'auto-Ac ainsi que la survenue des dommages tissulaires comme la glomérulonéphrite (**Cerny et al., 1987**).

Comme décrit précédemment, la dérégulation des LT dans le LED influence la survie, la prolifération et la différenciation des LB, cependant des anomalies liées directement aux cellules B contribuent également au développement de la maladie. En effet, des processus permettant d'éliminer les LB auto-réactifs sont altérés au cours du lupus (**Wardemann and Nussenzweig, 2007**). En condition physiologique, les mécanismes de tolérance centrale dans la moelle osseuse et de tolérance périphérique dans les OLS permettent d'éviter la génération de LB auto-réactifs. Lors du développement des LB dans la moelle osseuse, les réarrangements génétiques aléatoires peuvent générer un BCR reconnaissant des Ag du soi. Ces cellules B immatures, dont le BCR reconnaît des Ag du soi avec une forte affinité, subissent soit un réarrangement de leur BCR (**Tiegs et al., 1993**) soit sont éliminés par délétion clonale ou anergie. Chez la souris MRL lpr/lpr, cette capacité à éditer le BCR est réduite, ce qui favorise la fuite de LB auto-réactifs en périphérie (**Lamoureux et al., 2007**). Si les LB immatures passent ces processus de sélection négative, elles deviennent des cellules B matures après leur migration dans la rate.

Chez les patients lupiques, il a été montré une augmentation du nombre de cellules B naïves matures par rapport aux individus sains, suggérant une altération de la sélection négative en périphérie (**Yurasov et al., 2005**). Les LB auto-réactifs peuvent également être générés dans les centres germinatifs lors des processus d'hypermutation somatique. En effet, il a été montré que les auto-Ac anti-ADN proviennent de clones exprimant des immunoglobulines fortement réarrangées et présentent des parties variables hautement mutées (**Winkler et al., 1992**). Ceci suggère que les cellules produisant ces auto-Ac ont subi les processus de réarrangements dans les centres germinatifs suite à leur activation par l'Ag mais que dernières n'ont pas été

éliminées. Par ailleurs, il a été relevé une forte proportion des LB du centre germinatif dans la circulation sanguine des patients atteints de LED (**Odendahl et al., 2000**) pouvant résulter d'une forte activité des centres germinatifs et/ou d'un défaut de sélection des LB sortant des centres germinatifs. En effet, de nombreuses cellules B auto-réactives sont également présentes dans les centres germinatifs de patients lupiques (**Cappione et al., 2005**), ce qui suggère que les processus de sélection négative présents chez les individus sains semblent défectueux dans le LED.

Par ailleurs, il existe des défauts intrinsèques aux LB en conditions lupiques qui peuvent faciliter l'activation des LB et contribuer à la génération de cellules B auto-réactives et au phénotype activé des LB. En effet, plusieurs gènes de susceptibilité associés à la signalisation du BCR ont été identifiés par les études de GWAS (**Teruel and Alarcón-Riquelme, 2016**). Parmi eux sont retrouvés les gènes codant pour les protéines BLK, « C-terminal Src Kinase » (CSK) ou PTPN22. Un défaut d'expression des gènes codant pour BLK et CSK conduit à une hypersensibilité du BCR ainsi qu'à une sur-activation des LB (**Suurmond et al., 2016**). De plus, une variation allélique de PTPN22, une tyrosine phosphatase impliquée dans la régulation négative du BCR, diminue la phosphorylation des protéines de la voie de signalisation du BCR. Les LB porteurs de ce polymorphisme expriment plus fortement les gènes impliqués dans la signalisation de CD40, des TLR ainsi que le récepteur à l'IL-21 (**Menard et al., 2011**). La version allélique codant pour la tyrosine kinase CSK qui joue un rôle dans la signalisation du BCR est surexprimée dans les cellules B lupiques (**Manjarrez-Orduño et al., 2012**). Par ailleurs, les kinases Syk et « Bruton's tyrosine kinase » (Btk), faisant la communication entre les voies de signalisation du BCR, des TLR et « Janus Kinase » (JAK)/STAT, possèdent une activité anormalement élevée dans les LB de patients lupiques par rapport aux individus sains, contribuant ainsi à leur hyper-activation (**Iwata and Tanaka, 2016**).

Comme parmi les populations de LT, les proportions des populations de LB se trouvent modifiées chez les patients lupiques. Les patients en phase active présentent une lymphopénie des LB naïfs ($CD19^+CD27^-$) alors que le nombre des LB transitionnels ($CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$), LB mémoires switchés ($CD19^+CD27^+IgD^-$), LB DN ($CD19^+CD27^-IgD^-$), plasmablastes ($CD19^+CD27^{hi}IgD^{hi}$) et plasmocytes ($CD19^{dim}CD27^{hi}CD138^+CD20^-$) est augmenté (**Odendahl et al., 2000; Wei et al., 2007**).

Les LB mémoires ayant subi la commutation de classe ($CD19^+CD27^+IgD^-$) sont en plus forte proportion et semblent être moins sensibles aux immunosuppresseurs et persister pendant les phases de quiescence de la maladie (**Korganow et al., 2010; Odendahl et al., 2000**).

Une autre population de cellules B mémoires est augmentée au cours du lupus, ce sont les cellules B DN (IgD⁻CD27⁻). Leur augmentation est corrélée à l'activité de la maladie, à la production d'auto-Ac et à l'atteinte rénale chez les patients lupiques **(Wei et al., 2007)**. Il a été montré récemment que parmi ces cellules DN, un sous-groupe, les DN2 (CD27⁻ IgD⁻ CXCR5⁻ CD11c⁺) dérivent de cellules B naïves et sont pré-activées pour devenir des plasmablastes chez les patients lupiques **(Jenks et al., 2018)**.

Par ailleurs, comme pour les LT il existe une population de LB régulateurs (Breg). Chez l'Homme, ces cellules Breg sont caractérisées par les marqueurs CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} et par la sécrétion de cytokines immuno-modulatrices IL-10 et « Transforming Growth Factor β » (TGF- β). Ces cellules semblent avoir une capacité suppressive diminuée chez les patients lupiques **(Blair et al., 2010)**. Récemment, une étude a montré que le pourcentage de cellules Breg produisant de l'IL-10 est diminué chez les patients lupiques présentant une atteinte rénale par rapport aux individus sains **(Heinemann et al., 2016)**. Enfin, ces LBreg sont également capables de supprimer les manifestations de la maladie chez deux modèles murins de lupus : NZB/W et MRL lpr/lpr **(Matsushita, 2014)**.

Les plasmocytes, responsables de la sécrétion des auto-Ac, proviendraient majoritairement d'une différenciation excessive des LB dans les centres germinatifs, en effet l'utilisation d'un Ac anti-CD40L permet de diminuer leur nombre chez les patients atteints de LED **(Grammer et al., 2003)**. Ces plasmocytes sont également présents dans les reins des souris lupiques NZB/W **(Lacotte et al., 2010)** ainsi que dans les reins des patients atteints de néphrite lupique **(Espeli et al., 2011)**.

Les auto-Ac produits par ces plasmocytes sont les principaux effecteurs de la maladie, particulièrement lorsqu'ils forment des complexes immuns avec leur auto-Ag. En effet, ces complexes immuns peuvent se déposer dans différents tissus et induire le recrutement de molécules du complément. Ceci génère un contexte inflammatoire local pouvant créer des dommages cellulaires et tissulaires **(Rekvig et al., 2012)**. Dans le LED, ces auto-Ac sont principalement dirigés contre des Ag du soi d'origine nucléaire : l'ADN (anti-ADNdb), les ribonucléoprotéines (anti-Sm, anti-RNP) ou les histones (*cf. chapitre manifestations cliniques des symptômes du LED*). Les Ac anti-ADN ont une grande implication dans la néphrite lupique. Ils peuvent soit se déposer sous forme de complexes immuns au niveau des glomérules soit réagir avec des composants de la membrane glomérulaire tel que l' α -actinine, la laminine ou le collagène **(Mostoslavsky et al., 2001)**. De plus, les fragments de chromatine pouvant également

provenir de la mort cellulaire locale, ont une forte affinité pour les composants de la membrane glomérulaire, amplifiant la formation de complexes immuns et l'inflammation locale (**Mjelle et al., 2007**).

Pour résumer, le lupus est une maladie complexe résultant d'une combinaison d'éléments. Un ensemble de facteurs environnementaux associés à des prédispositions génétiques induisant des anomalies du système immunitaire inné et adaptatif aboutissent à la rupture de tolérance et à la production d'auto-Ac.

V. Les traitements du lupus

Le lupus est une pathologie hétérogène et donc difficilement traitable. En effet, elle affecte plusieurs organes plus ou moins sévèrement selon les patients et évolue par poussées avec des phases actives et inactives. Actuellement, il n'existe pas de rémission complète du lupus. Les traitements mis en place permettent d'agir uniquement sur les symptômes de la maladie pour préserver les organes et limiter les poussées, l'objectif étant également de réduire le handicap créé par les atteintes cutanées, rhumatologiques... afin d'éviter un trop fort impact professionnel et social.

Dans un premier temps, l'éducation du patient est importante et peut éviter, par des gestes de la vie quotidienne, d'aggraver les symptômes. L'exposition au soleil peut générer des lésions cutanées ainsi éviter de s'exposer au soleil et porter de la crème solaire à indice maximal est donc fortement recommandé. Il est également nécessaire de mettre en place un sevrage tabagique. En effet, le tabac augmente le risque de maladie cardiovasculaire déjà plus élevé chez les patients en raison de l'inflammation chronique et la prise de nombreux traitements médicamenteux. De plus, sachant que les hormones jouent un rôle dans le développement de la maladie, les pilules contenant des œstrogènes ne sont pas prescrites aux patientes atteintes de LED. Leur grossesse doit être bien encadrée et suivie pour éviter des complications pour la mère et l'enfant.

I. Les traitements classiques

Les traitements recommandés pour les formes de lupus légères à modérées sont les anti-malariques, les corticostéroïdes et les anti-inflammatoires non stéroïdiens, qui peuvent être associés à une thérapie immunosuppressive pour les formes les plus sévères telles que la néphrite lupique.

L'hydroxychloroquine est un anti-malarique connu sous le nom de « Plaquénil » qui a montré son efficacité sur la survie des patients lupiques. Il est recommandé en première intention comme pour les formes sévères du lupus. C'est un immuno-modulateur avec peu d'effets secondaires qui permet d'améliorer les atteintes articulaires, cutanées et de diminuer le risque d'athérosclérose et de thrombose. Il agirait sur l'activité des cellules de l'immunité innée notamment en interférant dans la voie de dégradation lysosomale et via l'inhibition des récepteurs TLR 7 et 9 (**Sibilia and Pasquali, 2008**).

Les corticostéroïdes sont des anti-inflammatoires souvent utilisés lors des poussées sévères. Cependant, leur utilisation chronique engendre de nombreux effets secondaires tels que des risques d'infection accrus, de diabète de type II et d'hypertension artérielle. Ils diminuent la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IL-6, TNF- α) et réduisent le nombre de LT, monocytes dans la circulation (**Kasturi and Sammaritano, 2016**).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens peuvent également soulager la douleur, cependant leur utilisation chez les patients atteints de néphrite lupique est contre-indiquée.

Les traitements immunosuppresseurs sont prescrits dans les cas de formes sévères pour éviter des séquelles viscérales définitives. Parmi eux, le cyclophosphamide qui bloque la synthèse d'ADN et donc la prolifération cellulaire. Il est utilisé dans le traitement de la néphrite lupique, des atteintes neurologiques et pulmonaires. Un autre agent immunosuppresseur utilisé pour le traitement de la néphrite lupique est le mycophenolate mofetil. Il inhibe la prolifération des leucocytes, bloque la synthèse des guanosines et diminue la production d'oxyde nitrique par les macrophages (**Allison, 2005**). Il a également des effets positifs sur les manifestations cutanées et hématologiques. Enfin, pour les patients présentant des symptômes dermatologiques et de l'arthrite inflammatoire, le methotrexate est couramment prescrit. C'est un antagoniste de l'acide folique qui inhibe la synthèse des purines et des pyrimidines, il est donc tératogène et ne peut être utilisé chez les patientes enceintes (**Durcan et al., 2019**).

2. Les biothérapies et futurs traitements

La plupart de ces traitements classiques présentent des effets secondaires et agissent sur l'ensemble du système immunitaire. Des biothérapies ont été développées afin de cibler spécifiquement les facteurs impliqués dans le lupus. Le belimumab est le premier traitement spécifique du LED qui possède une autorisation de mise sur le marché en Europe et aux États-Unis. C'est un Ac monoclonal humanisé ciblant BAFF, un facteur essentiel à la survie et au

développement des LB. Son administration induit la suppression des cellules B naïves et activées et réduit la production des auto-Ac anti-ADN (**Baker et al., 2003**). Le Rituximab est une autre thérapie ciblant aussi les LB également prescrite dans les cas polyarthrite rhumatoïde. C'est un Ac monoclonal chimérique souris/humain dirigé contre CD20, un marqueur spécifique des cellules B. Cependant, dans le cas du LED, son efficacité est incomplète car il ne permet pas une déplétion totale des LB, notamment des plasmocytes qui n'expriment pas le marqueur CD20 (**Felten et al., 2019**).

D'autres stratégies thérapeutiques ciblant les cellules B, les cytokines inflammatoires, les molécules de co-stimulation ou la signalisation intracellulaire sont en cours d'essais cliniques. Voici quelques exemples : L'abatacept est une protéine de fusion entre une immunoglobuline et la molécule CTLA4. Cette molécule inhibitrice se lie aux molécules CD80 ou CD86 avec une plus forte affinité que CD28 et inhibe par conséquent les signaux de co-stimulation aux LT. Cette molécule est utilisée dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et semble avoir des effets bénéfiques sur les manifestations rénales et articulaires du LED (**Pimentel-Quiroz et al., 2016**). Comme pour le belilumab, il est possible de cibler d'autres cytokines importantes dans le développement de la maladie telles que les IFN de type I. Des Ac monoclonaux dirigés contre les IFN α , comme le silfalimumab, ont montré des effets prometteurs dans des effets cliniques de phase II (**Khamashta et al., 2016**). Le rontalizumab cible, quant à lui, le récepteur aux IFN (IFNAR) mais son efficacité n'est pas complète car il n'améliore l'activité de la maladie que chez les patients ayant une faible signature IFN (**Kalunian et al., 2016**). Des stratégies thérapeutiques sont également en cours de développement pour cibler les principales productrices des IFN α , les pDC. Par ailleurs, comme décrit précédemment les IFN de type I activent l'expression de gènes via la voie de signalisation JAK. Des inhibiteurs de cette voie sont en cours d'essais cliniques tels que le tofacitinib ou le baricitinib. En phase II, le baricitinib en association avec une thérapie classique a montré une amélioration des symptômes chez les patients lupiques en phase active (**Wallace et al., 2018**). Enfin, notre laboratoire est à l'origine du développement du lupuzor, un peptide de 21 acides aminés provenant de la ribonucléoprotéine U1-70K phosphorylé à la position de la sérine 140 (**Monneaux et al., 2003**). Le lupuzor a montré un effet tolérogène et immuno-modulateur sur les cellules de patients lupiques et chez le modèle murin MRL lpr/lpr (**Zimmer et al., 2013**) mais n'a malheureusement pas eu les effets escomptés lors d'un essai clinique de phase III.

VI. Les modèles murins classiques pour l'étude du LED

La complexité et l'hétérogénéité du lupus rendent difficile l'étude de l'étiologie de cette maladie directement chez les patients. Divers modèles murins ont été mis au point pour disséquer les mécanismes cellulaires et génétiques du LED, pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques ainsi que pour tester l'efficacité de nouveaux des traitements. Bien que l'utilisation de modèles animaux puisse présenter certains inconvénients en raison des différences génétiques et physiologiques avec l'Homme, ces modèles ont l'avantage de développer la maladie sur une courte durée permettant d'étudier le cycle complet, l'ensemble des interactions cellulaires et des dommages tissulaires. Divers modèles murins ont été créés, certains développant la maladie spontanément et d'autres après induction, la plupart partageant l'atteinte rénale et la production d'auto-Ac caractéristiques du LED humain.

1. Les modèles murins spontanés

a. La souris NZB/W F1

Le modèle spontané NZB/W F1 est le plus ancien modèle murin classique pour l'étude du lupus, il a été généré par un croisement entre une femelle NZB et un mâle NZW. Les souris NZB présentent certains symptômes auto-immuns tels qu'une anémie hémolytique et une atteinte rénale liée aux complexes immuns tandis que les souris NZW développent parfois des auto-Ac et une néphrite tardive (**Helyer and Howie, 1963**). Les souris F1 ont un phénotype similaire au LED humain, avec une lymphadénopathie, une splénomégalie, un taux élevé d'auto-Ac anti-nucléaires, dont des IgG anti-ADN, et une glomérulonéphrite médiée par les complexes immuns (**Andrews et al., 1978**). De façon intéressante, comme chez l'homme, la pathologie se manifeste majoritairement chez les femelles. En effet, chez les femelles NZB/W, les signes du lupus apparaissent à environ 6 mois et leur taux de survie est de 50 % à 8 mois et demi, tandis que les souris mâles NZB/W développent plus tardivement la maladie (après plus d'un an) et leur survie est de 50 % à 15 mois (**Dixon et al., 1978**). Ce modèle a permis de mettre en évidence l'importance des œstrogènes dans la pathologie lupique. En effet, l'ovariectomie des femelles NZB/W induit un retard de l'apparition des symptômes du lupus et une diminution du taux d'auto-Ac (**Roubinian et al., 1978**). Par ailleurs, des auto-Ac caractéristiques du lupus chez l'Homme sont également retrouvés chez ce modèle murin. En effet, ces souris produisent des auto-Ac anti-ADNdb, anti-chromatine, anti-histones (H1, H2A, H2B) et anti-RNP (Ro, Sm, U1-70k) (**Bender et al., 2014; Lacotte et al., 2010; Monneaux et al., 2001**) Enfin, plusieurs

études ont démontré la contribution de l'haplotype du CMH (H2^{d/z}) avec le développement de la pathologie, reflétant une participation co-dominante de chaque souche (**Hirose et al., 1986**).

b. Le modèle MRL lpr/lpr

La souche MRL lpr/lpr, générée par plusieurs croisements de différentes souches de souris (LG/J, AKR/J, C3H/HeDi, et C57BL/6), porte une mutation spontanée nommée lpr pour lympho-prolifération. Cette mutation lpr affecte l'expression du gène FAS, un régulateur majeur de l'apoptose des cellules immunitaires (**Watson et al., 1992**) ce qui conduit à une hyperprolifération des LT, LB et principalement des cellules T DN CD4⁺CD8⁻ induisant une lymphadénopathie. Ces cellules DN sont également observées chez les patients lupiques (**Crispín et al., 2008**) (*cf. chapitre les lymphocytes T dans l'activation de l'immunité adaptative*). Les souris MRL lpr/lpr développent elles aussi des auto-Ac caractéristiques du LED tels que, les anti-ADN, anti-nucléosomes, anti-phospholipides, anti-RNP. Ces souris présentent une forme sévère du lupus, avec une hyper-activité des LB, des complexes immuns circulants, des atteintes rénales et articulaires, des éruptions cutanées. Elles sont également utilisées pour l'étude du lupus neurologique. En raison de ces nombreuses manifestations et d'un développement rapide de la pathologie ce modèle est souvent utilisé pour tester de nouvelles cibles thérapeutiques (**Richard and Gilkeson, 2018**). Cependant, contrairement au modèle NZB/W, la souche MRL lpr/lpr ne montre pas de différence de symptômes et de mortalité entre les femelles et les mâles. De plus, différemment du lupus humain où la signature IFN type I est importante dans le développement de la maladie, la pathologie chez les souris MRL lpr/lpr semble être liée à l'IFN γ (**Carvalho-Pinto et al., 2002**).

c. Le modèle murin Fc γ RIIb^{-/-}

Le gène FC γ RIIB code pour le récepteur Fc γ RIIb qui joue un rôle dans la régulation négative de la transduction du signal après fixation d'IgG. Une absence totale de ce récepteur chez des souris C57BL/6 conduit à l'apparition d'une auto-immunité liée à un défaut de tolérance des LB. Ces souris développent des auto-Ac anti-ADN, anti-chromatine, une splénomégalie et une néphrite lupique. L'atteinte rénale est associée à une infiltration de LB et de macrophages ainsi qu'un dépôt glomérulaire d'IgG et de complément (**Bolland and Ravetch, 2000**). De plus, il a été montré, chez différents modèles murins et chez l'Homme, l'existence de polymorphismes au niveau du promoteur de ce gène qui sont associés à une diminution de l'expression du récepteur Fc γ RIIb (**Pritchard et al., 2000; Tsuchiya et al., 2006**).

d. Le modèle BXSB-Yaa

Ce modèle est différent des autres car il n'affecte que les souris mâles. La mutation Yaa correspond à une translocation d'une région du chromosome X sur le chromosome Y. Cette région contenant le gène codant pour le TLR7 induit une expression accrue du TLR7 chez ces souris (**Pisitkun et al., 2006**). Cette altération génétique est considérée comme un élément accélérant de la maladie, en effet ce facteur de risque n'est pas suffisant pour induire le lupus mais il augmente la sévérité de la pathologie sur un fond génétique auto-immun (**Izui et al., 1988**). Cette découverte a mis en évidence le rôle important de la production des IFN de type I via l'activation du récepteur TLR7 au cours du LED. De plus, ces souris développent, comme les modèles précédents, une hyperplasie des OLS, la production d'auto-Ac anti-nucléaires et une atteinte rénale liée aux dépôts des complexes immuns qui est la première cause de mortalité chez ces souris (**Crampton et al., 2014**).

2. Les modèles murins inductibles

Contrairement aux modèles spontanés chez lesquels les facteurs génétiques jouent un rôle majeur dans le développement de la pathologie, les modèles inductibles présentent des signes lupiques après une exposition à certains agents environnementaux. En effet, le lupus chez l'Homme étant la résultante de causes génétiques et environnementales, l'utilisation de ces modèles a toute son importance dans la compréhension du LED.

a. Le modèle de lupus induit au pristane

Un des modèles les plus utilisés est le modèle de lupus induit au pristane. Le pristane (ou 2,6,10,14-Tetramethylpentadecane) est une huile minérale qui, lorsqu'elle est injectée dans le péritoine induit la formation d'ascite. Satoh *et al* ont montré, plusieurs mois après l'injection de pristane chez des souris saines, l'apparition d'une maladie semblable au lupus, avec une glomérulonéphrite médiée par les complexes immuns, une légère arthrite érosive et de nombreux auto-Ac associés au lupus (**Satoh et al., 1995**). La réponse auto-immune peut légèrement varier selon les souches de souris injectées, en effet les souris C57BL/6 montrent une plus faible réponse auto-immune par rapport aux souris BALB/c (**Satoh et al., 2000**). La sécrétion d'auto-Ac (tel que les Ac anti-Su, anti-Sm, anti-U1RNP, anti-ADN, et anti-histones) est observée chez les souris BALB/c après l'administration de pristane, à un niveau comparable à ce qui est mesuré chez les souris MRL lpr/lpr. De plus, plusieurs études ont montré que

l'induction du lupus par le pristane était fortement dépendante de la production excessive des IFN de type I. La déficience du récepteur aux IFN chez des souris injectées, provoque l'absence de signature IFN, réduit la production d'auto-Ac, anti-RNP et anti-ADN, et améliore significativement l'atteinte rénale (**Nacionales et al., 2007**). Dans ce modèle, les principaux producteurs d'IFN de type I semblent être les monocytes immatures s'accumulant dans la cavité péritonéale (**Lee, Weinstein, et al. 2008**). De façon intéressante, l'injection de pristane induit une néogenèse lymphoïde dans la cavité péritonéale. Ces organes lymphoïdes ectopiques sont appelés lipogranulomes, et ressemblent fortement aux ganglions lymphatiques. En effet, ils contiennent des LT, des LB, et des cellules dendritiques organisées en zones distinctes ainsi que des vaisseaux spécialisés dans l'adressage des lymphocytes, les HEV (« High Endothelial Venules »). La présence des chimiokines lymphoïdes telles que « C-C motif Ligand 21 » (CCL21), CCL19, « C-X-C motif Ligand 13 » (CXCL13), CXCL12 et l'expression des gènes associés aux IFN de type I ont aussi été observées (**Nacionales et al., 2006**). Outre le fait de présenter plusieurs caractéristiques des OLS, ces structures contiennent également des centres germinatifs et des cellules sécrétrices d'Ac (**Nacionales et al., 2009**).

b. Le modèle de la maladie du greffon contre l'hôte

Un autre modèle murin de lupus induit est la maladie du greffon contre l'hôte (« graft versus host » GVH), induit par des expériences de greffe de moelle osseuse d'un parent donneur au receveur F1. Selon les souches utilisées dans ces expériences, il est possible d'induire une maladie GVH aiguë avec des auto-Ac et une néphrite, alors que d'autres combinaisons conduisent au développement d'une maladie chronique GVH. La pathologie GVH étant principalement médiée par les LT, ces modèles ont permis de définir le rôle des LT auto-réactifs dans les lésions tissulaires et dans la production des auto-Ac par les cellules B (**Schroeder and DiPersio, 2011**).

B. Le compartiment stromal des ganglions lymphatiques

I. Structure et fonction générale des ganglions lymphatiques

Les ganglions lymphatiques sont des organes lymphoïdes secondaires qui drainent la lymphe provenant du compartiment interstitiel. Ce sont des structures encapsulées en forme de haricot constituées majoritairement de cellules immunitaires et d'une petite proportion de cellules non hématopoïétiques, les cellules stromales (le compartiment stromal sera présenté

dans le chapitre suivant). Structurellement, les ganglions lymphatiques sont organisés en plusieurs unités appelées lobules lymphoïdes comprenant trois zones, le cortex, le paracortex et la médulla (**Figure 7**).

La lymphe arrive au ganglion au niveau du cortex via les vaisseaux lymphatiques afférents situés directement sous la capsule délivrant ainsi les Ag, les microorganismes, des débris cellulaires et les cellules présentatrices d'Ag (APC) provenant des tissus périphériques. Ce sont les macrophages bordant le sinus sous-capsulaire qui capturent et phagocytent ces Ag ou présentent directement des Ag opsonisés par le complément, via le récepteur au complément CR3, aux LB dans les follicules sous-jacents (**Carrasco and Batista, 2007**).

Les follicules primaires, situés également dans le cortex, sont constitués des LB et d'un réseau de FDC impliquées dans la présentation antigénique aux LB grâce à l'expression des récepteurs du complément (CD21/35) et des récepteurs du fragment constant des immunoglobulines (FcγRIIb et FcεRII). Après activation, les LB prolifèrent et forment le follicule secondaire, aussi nommé centre germinatif. Ces structures jouent un rôle clé dans la mise en place des réponses adaptatives. En effet, c'est au sein des centres germinatifs que se produisent la génération de cellules B mémoires et les mécanismes d'hypermutation somatique et de commutation de classe qui permettent la création du répertoire d'Ac (**Stebegg et al., 2018**).

On retrouve ensuite dans le para-cortex, la zone T constituée de LT CD4⁺ et CD8⁺, de cellules dendritiques, et d'un réseau de cellules réticulaires fibroblastiques (FRC) produisant des fibres réticulaires de collagène. L'arrivée des lymphocytes dans le ganglion se fait principalement par le sang via des vaisseaux sanguins particuliers, nommés HEV. Ces vaisseaux, situés à l'interface entre les zones B et les zones T expriment des molécules spécifiques nécessaires à l'entrée des lymphocytes dans le ganglion tel que PNAd (« Peripheral lymph Node Addressin ») et CCL21 (« CC-Chemokine ligand 21 ») (**Miyasaka and Tanaka, 2004**). Il a été montré que les lymphocytes naïfs peuvent également entrer par les vaisseaux lymphatiques grâce à l'expression, par ces derniers, de LYVE1 (« Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 ») et de la chimiokine CCL21 (**Debes et al., 2005**).

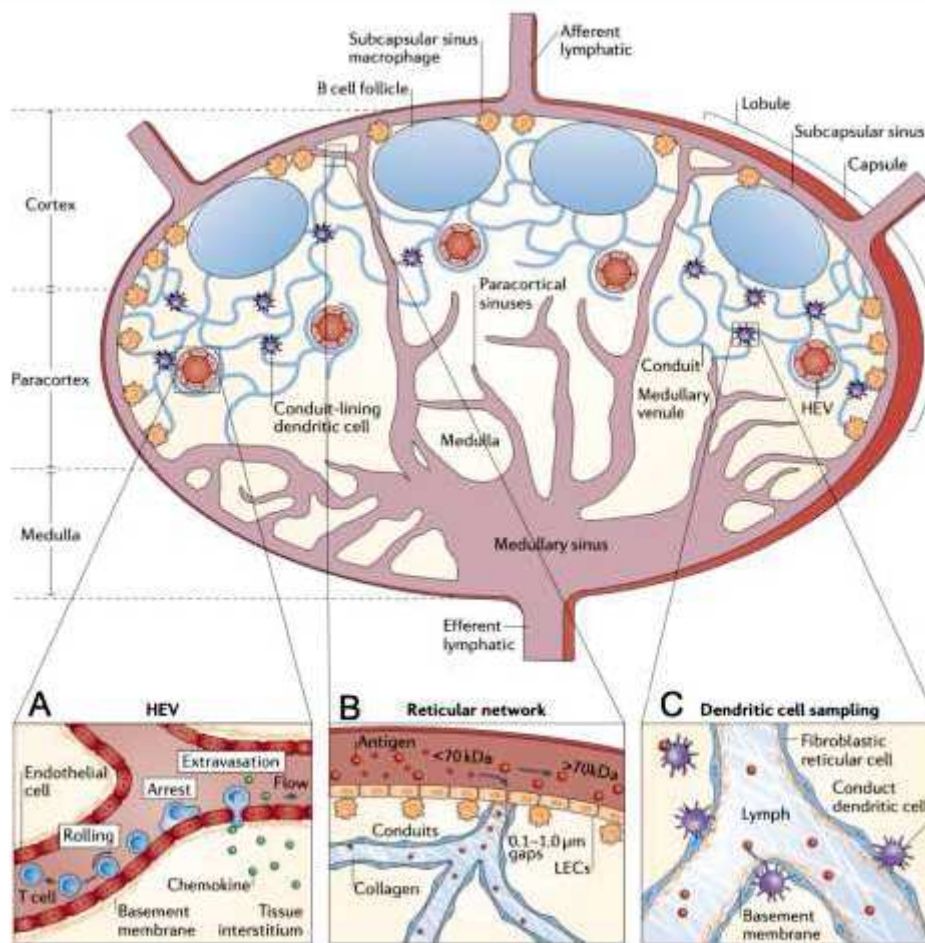


Figure 7 Structure des ganglions lymphatiques

Représentation schématique d'une coupe transversale de ganglion lymphatique. Celui-ci peut être divisé en trois zones distinctes : le cortex contenant les follicules B situés sous le sinus sous-capsulaire, le paracortex associé majoritairement à la zone T dans laquelle les LT et cellules dendritiques interagissent entre elles, puis la médulla contenant les sinus médullaires. A) Les lymphocytes naïfs entrent dans le ganglion au niveau du paracortex par les HEV. B) La lymphe, contenant entre autres les Ag provenant des tissus périphériques, transite par les vaisseaux lymphatiques afférents et permet la distribution des Ag au niveau du sinus sous-capsulaire ainsi qu'au sein de la structure réticulaire formée par les cellules réticulaires fibroblastiques (FRC). C) Les cellules dendritiques échantillonnent les Ag circulants dans les conduits construits par les FRC dans la zone T. Reproduit d'après (Schudel et al., 2019) avec autorisation.

De plus, c'est dans la zone T que les LT naïfs interagissent avec les cellules dendritiques. Le TCR, exprimé par les LT, reconnaît spécifiquement l'Ag présenté dans le contexte du CMH-I ou du CMH-II par les cellules dendritiques. L'activation des LT se fait ensuite en trois étapes : une première phase d'interaction transitoire et répétée avec les cellules dendritiques, puis un contact prolongé permettant la signalisation via le TCR et la production de cytokines associées, enfin, une dernière phase durant laquelle les LT sont à nouveau mobiles et prolifèrent rapidement (Mempel et al., 2004). L'activation des LT $CD4^+$ induit une diminution de l'expression de « C-C chemokine receptor type 7 » (CCR7) et une augmentation de l'expression du récepteur CXCR5 ce qui leur permet de migrer à l'interface entre la zone T et le follicule B.

De façon simultanée, les LB activés dans le follicule B expriment à leur surface les deux récepteurs (CCR7 et CXCR5) afin de se diriger à la jonction avec la zone T pour entrer en contact avec les LT activés et induire leur différenciation en LTFH **(Reif et al. 2002)**. Ces LTFH jouent un rôle important dans la sélection des centrocytes dans le centre germinatif. La liaison entre la molécule de co-stimulation ICOS exprimée par les LTFH et de son ligand ICOSL présent à la surface des LB est nécessaire à leur différenciation complète pour leur entrée dans le centre germinatif **(Xu et al., 2013)**. Les centres germinatifs sont divisés en deux zones distinctes en fonction de leur apparence en histologie : la zone claire et la zone sombre **(Figure 8)**. La zone sombre est la plus proche de la zone T et est le site de génération des clones de LB ou centroblastes. Suite au processus d'hypermutation somatique, ces centroblastes migrent dans la zone claire où ils sont appelés centrocytes. Les mécanismes de maturation d'affinité dans la zone claire permettent de sélectionner les clones de LB ayant la plus forte affinité pour l'antigène grâce à l'interaction avec les FDC et les LTFH. Après avoir reçu les signaux de survie des cellules TFH, les centrocytes retournent dans la zone sombre pour d'autres cycles de prolifération et d'hypermutation somatique. Enfin, après plusieurs allers-retours entre la zone claire et la zone sombre, ils quittent le centre germinatif sous la forme, soit de cellules B mémoires soit de plasmocytes sécrétant des anticorps de haute affinité **(Meyer-Hermann et al., 2012; Stebegg et al., 2018)**. Ces plasmocytes ainsi que les lymphocytes T et B n'ayant pas rencontré leurs antigènes vont quitter le ganglion via les cordons médullaires qui se rejoignent pour constituer le vaisseau lymphatique efférent du ganglion. Ces vaisseaux font partie du compartiment stromal des ganglions lymphatiques.

II. Les cellules stromales : les régulateurs des réponses immunitaires

L'organisation du ganglion lymphatique ne peut se faire sans les cellules stromales non hématopoïétiques. En effet, elles construisent une micro-architecture en définissant les différents compartiments vus précédemment et en fournissant une structure pour le transport de la lymphe, des Ag et la migration des lymphocytes. Ces cellules sont d'origine mésenchymateuse ou endothéliale et représentent entre 1 et 2 % de la totalité des cellules du ganglion **(Fletcher et al., 2011)**.

Il est désormais reconnu que cette composante structurale joue un rôle majeur dans la régulation des réponses immunitaires adaptatives, grâce à la production de signaux variés et en créant un environnement optimal pour l'activation des lymphocytes.

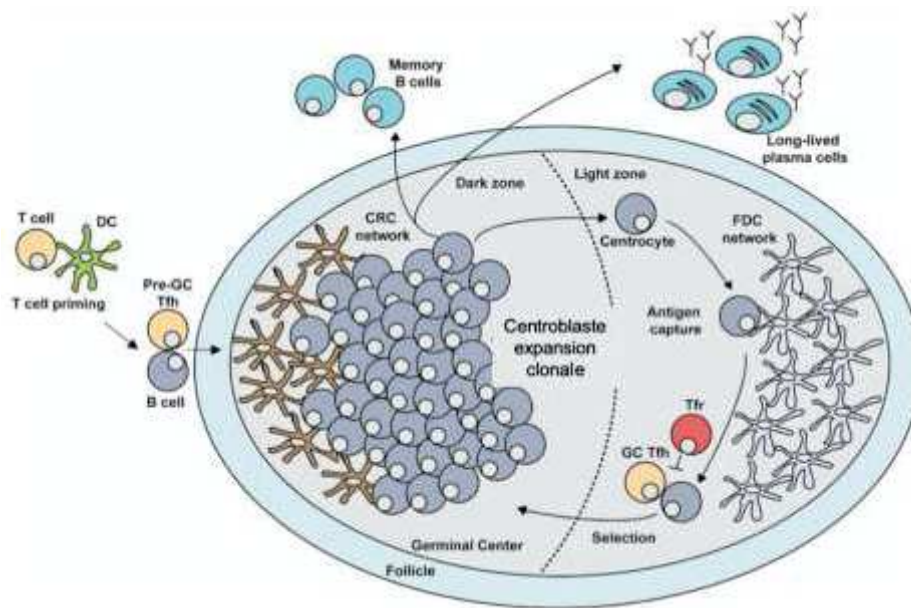


Figure 8 La sélection des LB dans le centre germinatif

Les centres germinatifs formés dans le follicule B lors d'une réponse immunitaire sont divisés en deux compartiments distincts. Lorsque les LB sont activés ils entrent dans la zone sombre où ils subissent plusieurs cycles de prolifération et de mutation (induites par l'enzyme AID (« Activation-Induced cytidine Deaminase ») durant le processus d'hypermutation somatique), ils sont appelés centroblastes à ce stade. Puis les centroblastes pénètrent alors dans la zone claire où ils seront sélectionnés suivant leur affinité pour l'Ag, dans cette zone ils sont nommés centrocytes. Les centrocytes capturent l'Ag présenté par les cellules dendritiques folliculaires (FDC) qu'ils internalisent et présentent ensuite aux cellules T auxiliaires folliculaires (TFH) afin de subir une sélection. Les LB de faible affinité pour l'Ag meurent par apoptose. Puis les LB retournent dans la zone sombre pour subir d'autres cycles de différenciation. Après plusieurs cycles, les LB se différencient en plasmocytes sécrétant les Ac ou en cellules B mémoires. D'après (Stebegg et al., 2018) avec autorisation.

1. Les différentes sous-populations de cellules stromales

Les cellules stromales représentent une population hétérogène qui peut être divisée en sous-groupes selon l'expression des glycoprotéines de surface CD31 (« Platelet endothelial cell adhesion molecule » PECAM-1) et gp38 (ou podoplanine (PDPN)) et l'absence d'expression du marqueur hématopoïétique CD45.

Un premier groupe est composé des cellules fibroblastiques exprimant uniquement la PDPN comprenant, entre autres, les FDC et les FRC, évoquées précédemment. Classiquement, les FRC font référence aux cellules stromales myofibroblastiques qui forment un réseau en 3D permettant la migration des leucocytes dans la zone T, elles sont aussi appelées TRC (« T cell zone Reticular Cells ») (**Figure 9**). A la jonction des follicules B, c'est une population particulière de FRC qui est présente, elles sont nommées BRC (« B cell zone reticular cells »). Puis dans le follicule B et le centre germinatif on retrouve les FDC. Au niveau cortical, le sinus sous-capsulaire est colonisé par des cellules réticulaires marginales (MRC) phénotypiquement différentes des FRC et des FDC. Le rôle de chacune de ces populations sera évoqué dans les paragraphes suivants. Pour terminer, ce groupe comprend deux autres sous-populations de FRC

encore peu connues et peu étudiées, les FRC médullaires localisées dans les cordons médullaires (**Huang et al., 2018**) et les FRC de type péricytes entourant et maintenant l'intégrité des HEV (**Herzog et al., 2013**).

Le deuxième et le troisième groupe de cellules stromales sont composés de cellules endothéliales. D'une part, les cellules endothéliales sanguines (BEC), exprimant uniquement le marqueur CD31, forment les capillaires sanguins et les HEV dans les ganglions. Les cellules endothéliales lymphatiques (LEC), quant à elles, présentent à leur surface les deux glycoprotéines gp38 et CD31 et constituent les vaisseaux lymphatiques afférents et efférents. Enfin, les cellules n'exprimant ni CD31 ni la PDPN sont appelées les cellules réticulaires double négatives (NB : dans les paragraphes suivants, les cellules dites doubles négatives correspondront aux cellules stromales et non aux cellules T DN retrouvées chez le modèle murin MRL lpr/lpr et les patients lupiques). Ces cellules représentent entre 10 et 20 % des cellules non hématopoïétiques du ganglion et restent encore peu caractérisées. Par une approche transcriptomique, Malhotra et ses collaborateurs ont mis en évidence des ressemblances entre ces cellules double négatives et les FRC (**Malhotra et al., 2012**). En effet, ces cellules expriment des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance similaires à ceux produits par les FRC. Cependant, les cellules DN montrent des différences majeures avec les FRC : elles ne produisent pas d'IL-7, une cytokine caractéristique des FRC, et elles présentent une expression plus élevée des gènes responsables de la structure et des fonctions contractiles. De plus, la moitié des cellules double négatives expriment l'intégrine $\alpha 7$ dont la fonction est associée aux fibres musculaires, ce qui a permis de les localiser autour de certains vaisseaux dans le cortex et la médulla des ganglions lymphatiques. Bien que leur fonction ne soit pas encore décrite, cette sous-population de cellules double négatives a été nommée IAP (« Integrin Alpha 7⁺ Pericytes »). Les 50 % restants ne sont pas encore clairement identifiés.

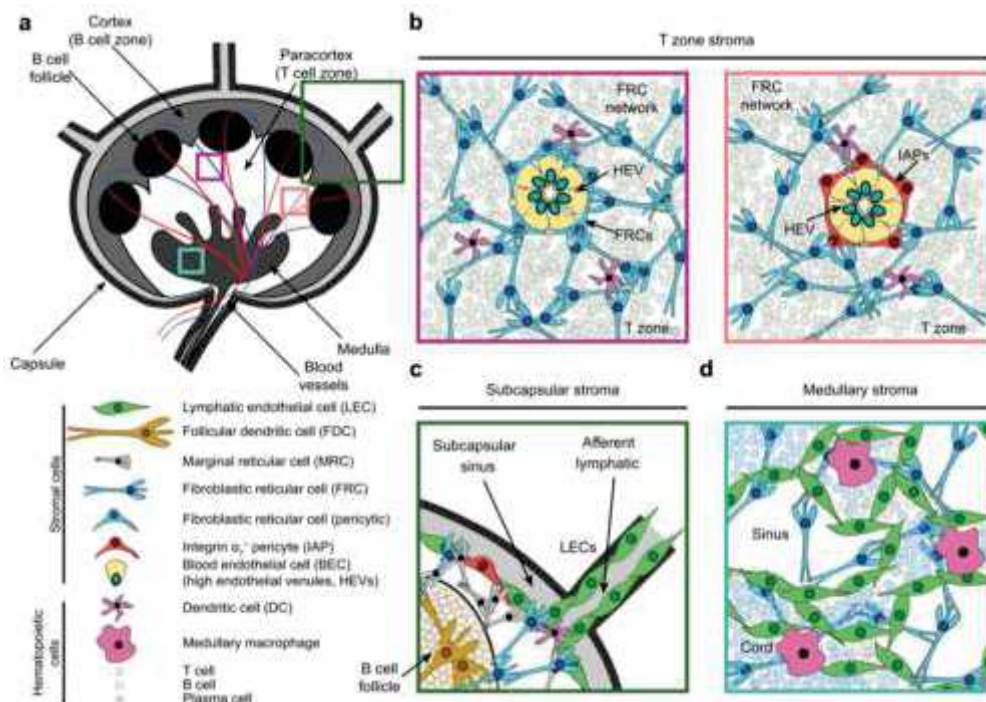


Figure 9 Les cellules stromales du ganglion lymphatique

A) Parmi les cellules non hématopoïétiques, on distingue deux grands types de cellules stromales : les cellules de type fibroblastique et les cellules de type endothélial. B) Les cellules endothéliales sanguines (BEC) (jaune) constituent les vaisseaux sanguins et les HEV. Ces HEV sont entourés par des cellules réticulaires fibroblastiques (FRC) de type péricyte qui sont étroitement liées au réseau de FRC adjacent. Les FRC (bleu) forment un réseau dense qui s'étend dans toute la zone T du ganglion lymphatique permettant la circulation de LT naïfs et des cellules dendritiques. Une petite proportion de HEV est aussi enveloppée par les péricytes IAP (rouge). C) Au niveau du paracortex, les cellules endothéliales lymphatiques (LEC) (vert) forment le vaisseau lymphatique afférent. Juste en dessous du sinus sous capsulaire se trouvent les cellules réticulaires marginales (MRC) (gris) qui participent à l'organisation et au transport d'Ag au follicule B. Les cellules dendritiques folliculaires (FDC) sont localisées au sein du follicule B et jouent un rôle dans la sélection des LB dans le centre germinatif. D) La médulla contient les vaisseaux lymphatiques efférents assurant la sortie des lymphocytes du ganglion et un réseau de FRC médullaires. Reproduit d'après (Malhotra et al., 2013) avec autorisation.

Par ailleurs, grâce à la technique de séquençage d'ARN sur cellule unique, Rodda *et al.* ont récemment mis en évidence l'existence de 9 clusters de cellules stromales parmi les FRC et les cellules double négatives (Rodda et al., 2018). On retrouve les FDC, les MRC, une population fibroblastique localisée autour des HEV similaire aux IAP, deux sous-populations de cellules stromales dans les cordons médullaires, trois types différents de TRC dont les FRC classiquement décrites, une population de cellules dans la zone sombre des centres germinatifs exprimant CXCL12 et enfin des cellules stromales bordant la capsule et les vaisseaux médullaires. Cette approche a permis d'identifier des marqueurs spécifiques et une localisation propre pour des cellules stromales encore peu caractérisées.

2. Les diverses fonctions des cellules stromales

a. Le recrutement et l'organisation des cellules hématopoïétiques dans le ganglion lymphatique

Les cellules stromales fournissent en continu des signaux physiques et chimiques permettant le recrutement et la rencontre des lymphocytes avec leur Ag dans les organes lymphoïdes. Les lymphocytes naïfs entrent dans le ganglion via les HEV par le mécanisme de diapédèse. Le nom de ces vaisseaux vient de la morphologie cuboïde des BEC qui les bordent. Cette forme particulière résulte de la création de poches de lymphocytes qui sont retenus par les BEC jusqu'à ce que l'espace soit disponible dans le ganglion, afin de maintenir un équilibre entre les cellules entrantes et sortantes (**Mionnet et al., 2011**). Le processus de migration des lymphocytes nécessite plusieurs interactions avec les BEC. Premièrement, les lymphocytes ralentissent et s'accrochent aux BEC par la liaison de la L-Selectine aux sialomucines appelées PNAd uniquement à la surface des HEV. Puis, la liaison des chimiokines CCL21 et CCL19, sécrétées dans la lumière des HEV, au récepteur CCR7 exprimé par les leucocytes, induit un changement de conformation des intégrines et la fixation des leucocytes aux cellules endothéliales pour permettre leur migration à travers les HEV et leur entrée dans le ganglion (**Girard et al., 2012**). Les FRC qui entourent les HEV permettent de maintenir leur intégrité lors du flux de lymphocytes. En effet, la liaison de la PDPN exprimée par les FRC avec « C-type lectin receptor-2 » (CLEC-2) à la surface des plaquettes provoque la libération du facteur S1P (sphingosine-1-phosphate) par ces dernières et l'augmentation de l'expression de cadhérine par les BEC (**Herzog et al., 2013**). Suite à leur entrée par les HEV, les LT naïfs circulent dans la zone T du ganglion à la recherche de l'Ag (présenté par les cellules dendritiques) spécifiquement reconnu par leur TCR, grâce au réseau 3D de microtubules construit par les FRC. Ce sont des conduits formés d'un assemblage de composants de la matrice extracellulaire, tels que le collagène et la laminine, sécrétés et entourés par les FRC (**Gentek and Bajénoff, 2017; Malhotra et al., 2012**) (**Figure 10**).

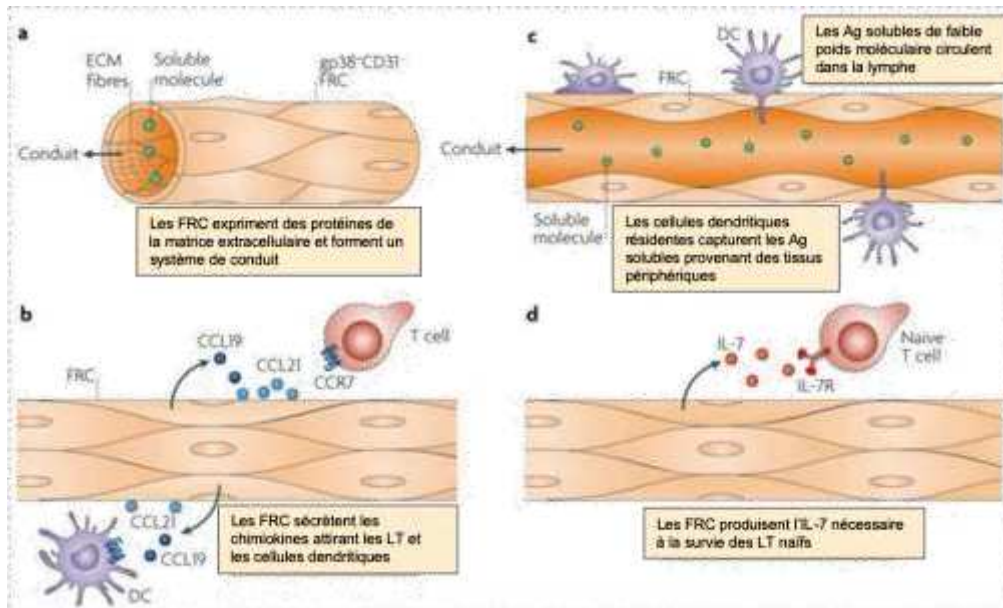


Figure 10 Caractéristiques générales des FRC

A) Les FRC sécrètent diverses protéines de la matrice extracellulaire autour desquelles elles vont s'enrouler pour former des conduits. B) Les FRC assurent le recrutement des lymphocytes et des cellules dendritiques par la production des chimiokines CCL19 et CCL21. C) Les cellules dendritiques résidentes étendent des prolongements dans les conduits tapissés par les FRC et capturent les antigènes solubles délivrés par la lymphe. D) Les FRC produisent l'IL-7 nécessaire à la survie des LT naïfs. Adapté d'après (Turley et al., 2010) avec autorisation.

Mis à part les BEC sécrétant CCL21, les FRC sont aussi les principales productrices des chimiokines CCL19 et CCL21 qui permettent le recrutement et la migration des leucocytes et des cellules dendritiques CCR7⁺ dans la zone T. Il a été montré que les souris déficientes pour ces chimiokines présentent une réduction du nombre de LT naïfs et de cellules dendritiques ainsi qu'une désorganisation de la zone T des ganglions (Gunn et al., 1999). De plus, la liaison entre CLEC-2 exprimée par les cellules dendritiques et la PDPN à la surface des FRC est nécessaire au déplacement de ces cellules le long du réseau dans la zone T (Acton et al., 2012). Les FRC et les LEC assurent la survie de ces lymphocytes T naïfs dans le ganglion grâce à la production d'IL-7. Ce facteur anti-apoptotique permet de maintenir une réserve de LT CD4⁺ et CD8⁺ prêts à être activés dans la zone T (Link et al., 2007; Onder et al., 2012).

De façon intéressante, deux études ont mis en lumière le rôle essentiel des FRC dans le maintien de l'homéostasie et l'architecture du ganglion. En effet, l'élimination conditionnelle des FRC, grâce à l'expression du récepteur de la toxine diphtérique sous le contrôle des promoteurs des gènes « fibroblast activation protein- α » (FAP) ou CCL19, induit une diminution des facteurs caractéristiques des FRC, tels que CCL21, la perte rapide des cellules dendritiques, des LT et LB naïfs, ainsi qu'une réduction de la réponse immunitaire (Denton et al., 2014; Novkovic et al., 2018).

Les LB sont eux aussi régulés par les cellules fibroblastiques. Suite à leur entrée par les HEV, les LB naïfs utilisent le réseau de FRC pour migrer jusqu'aux follicules B dans le cortex. Les cellules B naïves exprimant le récepteur CXCR5 répondent à la chimiokine CXCL13 produite par les FDC et par les cellules réticulaires proches des follicules B (Mionnet et al., 2013) au cours d'une inflammation. Ces cellules stromales fibroblastiques sécrètent aussi BAFF, un facteur important pour la survie et la différenciation des LB (Cremasco et al., 2014). Elles sont localisées à proximité du sinus sous-capsulaire où les Ag solubles arrivent au ganglion et peuvent être captés par les LB. L'élimination des FDC affecte l'organisation des follicules B mais ne diminue pas le nombre total de cellules B ni l'expression de CXCL13 (Wang et al., 2011). En revanche, la déplétion des FRC, suite à l'injection de la toxine diphtérique chez les souris exprimant le récepteur de cette toxine sous le contrôle du promoteur du gène CCL19 (Ccl19-Cre x Rosa26-diphtheria toxin receptor DTR), provoque également une réduction de la viabilité des cellules B résultant d'une diminution du facteur BAFF (Cremasco et al., 2014). Dans ce modèle, la suppression des FRC semble également affecter la population de cellules fibroblastiques à la jonction de la zone T et la zone B, exprimant la PDPN, BAFF et CXCL13, et qui ont été nommées par la suite BRC.

b. La distribution des antigènes au ganglion lymphatique

Les LEC forment les vaisseaux lymphatiques afférents permettant l'entrée des cellules dendritiques (présentant les Ag) et des Ag solubles au niveau du paracortex du ganglion jusqu'à la médulla. Ces cellules endothéliales sécrètent et immobilisent à leur surface la chimiokine CCL21 générant ainsi un gradient suivi par les cellules dendritiques exprimant CCR7 (Weber et al., 2013). Il a été montré que les cellules dendritiques activées peuvent aussi exprimer l'autre ligand du récepteur CCR7, la chimiokine CCL19. Comme la chimiokine CCL19, sécrétée aussi par les autres cellules stromales, n'est pas accroché par les LEC, celle-ci diffuse dans la lymphe et permet la migration des cellules dendritiques selon un flux chimiotactique (Randolph et al., 2005). Une fois entrées dans le vaisseau, les cellules se laissent emporter par le flux lymphatique jusqu'au sinus sous-capsulaire. Comme les FRC, les LEC expriment la PDPN et l'interaction avec la molécule CLEC-2 exprimée par les cellules dendritiques assure la migration de ces dernières des tissus périphériques au ganglion et la traversée du sinus sous-capsulaire (Acton et al., 2012). Bien que le transport des Ag via les cellules dendritiques soit reconnu comme la source majeure de distribution des Ag au ganglion, ceux-ci peuvent aussi circuler dans la lymphe de façon libre. Les particules de faible poids moléculaire pénètrent

rapidement dans le ganglion et se retrouvent dans les conduits du follicule B et dans la zone T. Ces Ag solubles sont alors accessibles aux FDC et LB dans le follicule B ainsi qu'aux cellules dendritiques qui peuvent les présenter directement aux lymphocytes T dans la zone T (**Roosendaal et al., 2009; Sixt et al., 2005**). A l'inverse, les Ag sont capturés directement par les macrophages du sinus sous-capsulaire pour être transférées aux cellules B dans le cortex (**Junt et al., 2007**). Il a été montré qu'en conditions inflammatoires, les LEC en prolifération au niveau du sinus sous-capsulaire sont capables de stocker des Ag pendant un certain temps, ce qui augmente la production d'IFN γ et d'IL-2 par les LT CD8⁺ mémoires et la protection contre les infections (**Tamburini et al., 2014**). La présentation des Ag archivés ne se ferait pas directement par les LEC mais par transfert aux cellules dendritiques qui les présenteront de façon croisée dans le contexte du CMH-I aux LT CD8⁺ (**Kedl et al., 2017**).

Les MRC sont une autre population de cellules stromales présente sur la route des Ag sous le sinus sous-capsulaire, ce qui suggère qu'elles auraient un rôle dans leur distribution au ganglion. Chez la souris, les MRC n'expriment ni CD35 ni CCL21, indiquant que ce sont des cellules phénotypiquement différentes des FRC et des FDC. Cependant, ces cellules mésenchymateuses produisent la chimiokine CXCL13 attirant les LB CXCR5⁺ et il a été suggéré qu'elles joueraient un rôle dans la migration des cellules B à l'extérieur du follicule grâce à l'expression de molécules d'adhésion telles que « Mucosal addressin cell adhesion molecule » (MadCAM) (**Katakai et al., 2008**). Les MRC semblent aussi être importantes dans l'homéostasie des LT en produisant le facteur de survie des LT naïfs, l'IL-7 (**Katakai et al., 2004**). De plus, il a été montré que les MRC, de nature fibroblastique, sont capables, comme les FRC, de construire des conduits sous le sinus sous-capsulaire, facilitant ainsi le transport d'Ag solubles vers les LB et les FDC dans le follicule (**Bajénoff and Germain, 2009**).

L'ensemble de ces mécanismes mis en place par les cellules stromales assure la distribution des Ag dans le ganglion afin d'activer les cellules T et B naïves pour initier la réponse immunitaire adaptative.

c. La régulation des réponses immunitaires

Le rôle des cellules stromales n'est pas seulement d'organiser les leucocytes dans le ganglion ; en effet, le stroma contribue aussi activement au développement des réponses immunitaires adaptatives. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle des FRC dans l'initiation des réponses immunitaires antivirales. Ainsi, Chai et ses collaborateurs ont montré que la suppression de l'expression du récepteur de la lymphotoxine- β (LT β) par les FRC, en utilisant le modèle murin Ccl19-cre x Ltbr^{fl/fl}, induit une diminution de l'expression de la PDPN, de l'IL-

7 et des chimiokines CCL19 et CCL21. Ces modifications du réseau de FRC sont associées à un défaut d'élimination du pathogène chez les souris infectées par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV), ce qui suggère que le développement complet des FRC est essentiel pour assurer la fonction optimale des ganglions au cours d'une infection (**Chai et al., 2013**). Les réponses antivirales sont également impactées lors de la déplétion complète des FRC dans le ganglion. Cette perte provoque une réduction du nombre et de l'activation des LT CD4⁺ et CD8⁺ dans le ganglion, et donc une réponse plus faible des LT et LB suite à l'inoculation du virus influenza A à ces souris (**Denton et al., 2014**). Par ailleurs, l'infection par le VIH cause une fibrose des tissus lymphoïdes, endommageant le réseau de FRC et diminuant la production d'IL-7. Il en résulte une apoptose des LT naïfs ce qui contribue à l'immunodéficience caractéristique de cette infection virale (**Zeng et al., 2011**).

Outre le fait de participer à l'activation des cellules immunitaires, les FRC ont aussi des propriétés suppressives. En effet, ces cellules stromales sont capables d'inhiber la prolifération des LT après leur activation par les cellules dendritiques. Lors des mécanismes d'activation, les FRC sont exposées à une variété de cytokines, sécrétées par les LT, dont l'IFN γ et le «Tumor necrosis factor- α » (TNF- α), ce qui déclenche une augmentation de l'expression de l'oxyde nitrique synthase 2 (Nos2) par les cellules stromales. L'oxyde nitrique généré par cette enzyme agit de façon paracrine sur les LT et ralentit leur prolifération. Inversement, les expériences de prolifération réalisées *in vitro* avec des FRC déficientes pour Nos2 ou des inhibiteurs de l'oxyde nitrique ne bloquent pas la prolifération des LT (**Khan et al., 2011; Lukacs-Kornek et al., 2011; Siegert et al., 2011**). De façon similaire aux FRC, les LEC ont aussi cette capacité suppressive de la prolifération des LT CD4⁺ et LT CD8⁺ grâce à la sécrétion de l'oxyde nitrique (**Lukacs-Kornek et al., 2011**). Bien que ces mécanismes paraissent contre-intuitifs, la régulation de la prolifération des LT est importante pour différentes raisons. D'une part, cela pourrait permettre de générer davantage de clones de LT et d'assurer le contact avec les cellules dendritiques et l'accessibilité aux facteurs de survie. D'autre part, l'expansion incontrôlée des leucocytes peut avoir des effets néfastes sur l'intégrité du réseau de FRC et le ganglion.

Comme décrit précédemment, les FRC localisées à la jonction des follicules B et productrices de la cytokine CXCL13 sont aussi des régulatrices des cellules B. L'équipe de Shannon Turley a mis en évidence l'impact de l'absence des FRC dans l'immunité humorale. Suite à l'infection virale, des souris (Ccl19-Cre x Rosa26-DTR) dont les FRC ont été supprimées des ganglions, présentent une diminution des taux d'Ac IgM et IgG anti-influenza par rapport aux souris contrôles. De plus, les follicules B des souris sont désorganisés et la viabilité des LB est réduite (**Cremasco et al., 2014**). Cependant, les principales cellules stromales régulatrices de

l'homéostasie des LB et de la réponse immunitaire B sont les FDC. Celles-ci, organisées en réseau dans le follicule B, majoritairement dans la zone claire des centres germinatifs, jouent un rôle important dans la structure et la fonction de ces derniers. En effet, il a été montré que la suppression des FDC, suite à l'injection de la toxine diphtérique dans le modèle murin CD21-Cre × Rosa-DTR, impacte la localisation des LB dans les centres germinatifs ce qui provoque leur désorganisation complète (**Wang et al., 2011**). C'est la sécrétion de la chimiokine CXCL13 et du facteur BAFF par les FDC qui est responsable de la migration et de la survie des LB. Ces cellules mésenchymateuses sont aussi des cellules présentatrices d'Ag. Elles capturent des Ag sous forme de complexes immuns grâce à l'expression des récepteurs du complément (CD21/35) et des récepteurs du fragment constant des immunoglobulines (FcγRIIb et FcεRII) et les retiennent pendant une longue période de temps (**Heesters et al., 2014**). Les LB spécifiques d'un Ag pourront alors capturer l'Ag à la surface des FDC, l'internaliser, le traiter puis le présenter aux LTFH pour recevoir des signaux de survie (**Suzuki et al., 2009**). Les FDC régulent également la production d'IgG et les processus d'hypermutation somatique via la sécrétion d'IL-6 dans les centres germinatifs (**Wu et al., 2009**). Par ailleurs, il a été récemment décrit qu'une deuxième population de cellules stromales pourrait jouer un rôle dans la migration des cellules B dans les centres germinatifs, elles sont appelées CRC pour « CXCL12-expressing reticular cells ». Ces cellules forment un réseau dans la zone sombre et sont différentes des FRC et des FDC puisqu'elles n'expriment pas les récepteurs permettant la présentation d'Ag. La sécrétion de CXCL12 est nécessaire à l'adressage des LB exprimant CXCR4 dans la zone sombre du centre germinatif (**Rodda et al., 2015**). De plus, ces deux types de cellules stromales (FDC et CRC) réguleraient l'adressage des LTFH dans les centres germinatifs car ces derniers expriment les récepteurs aux chimiokines CXCL13 et CXCL12 (CXCR5 et CXCR4) (**Elsner et al., 2012**).

D'autre part, une étude récente a identifié une nouvelle population de cellules stromales au sein des cordons médullaires, impliquées dans la régulation des plasmocytes. Ces FRC médullaires sont phénotypiquement et fonctionnellement distinctes des FRC de la zone T. Les FRC médullaires construisent un réseau de matrice extracellulaire légèrement différent de celui de la zone T et produisent les facteurs de survie des cellules B tels qu'IL-6, BAFF et CXCL12. La création d'un environnement propice au développement des cellules B par ces cellules réticulaires dans la médulla suggère qu'elles sont importantes dans la mise en place d'une immunité humorale rapide (**Huang et al., 2018**).

Enfin, les cellules stromales seraient aussi impliquées dans l'immunité innée grâce à l'expression de récepteurs permettant la détection de PAMP. Les études de séquençage récentes ont permis de mettre en évidence l'expression de certains TLR par les cellules stromales des ganglions lymphatiques (**Berendam et al., 2019; Malhotra et al., 2012**). Par exemple, les FRC, LEC et BEC, exprimant le récepteur TLR4, répondent à l'activation par le LPS en augmentant l'expression de gènes de la voie des IFN de type I et de la présentation antigénique tel que le CMH-II (**Malhotra et al., 2012**). L'activation des FDC par le ligand du récepteur TLR4 induit leur maturation, les mécanismes d'hypermutation somatique dans les centres germinatifs et la production d'immunoglobulines de forte affinité (**Garin et al., 2010**). De façon intéressante, les FRC et les FDC expriment aussi le récepteur TLR7 reconnaissant l'ARN simple brin et dont l'implication a été démontrée au cours du lupus (**Das et al., 2017; Gil-Cruz et al., 2016**). Il a été montré dans un modèle murin du lupus que l'internalisation de complexes immuns, contenant des RNP, via la molécule CD21 à la surface des FDC, active de façon excessive le récepteur TLR7. Il en résulte une augmentation de la sécrétion des IFN de type I qui contribuent à la maturation des LB des centres germinatifs et à la production d'auto-Ac (**Das et al., 2017**). L'ensemble de ces données met en lumière le rôle essentiel des cellules stromales lors de l'initiation des réponses immunitaires innées et adaptatives.

d. La tolérance périphérique des lymphocytes T

La tolérance des LT est induite essentiellement dans le thymus par des processus de délétion clonale, c'est la tolérance centrale. Lors de leur maturation dans le thymus, les LT sont sélectionnés, dans un premier temps positivement, s'ils reconnaissent les molécules du CMH du soi exprimées par les cellules thymiques et deviennent alors des LT CD4⁺ ou CD8⁺. Dans un deuxième temps, les LT ayant une trop forte affinité pour un peptide du soi présenté dans le contexte du CMH-I ou II par les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTEC) et par les cellules dendritiques, seront éliminés par délétion clonale. Cette étape de sélection négative est permise grâce aux mTEC qui expriment une variété d'Ag des tissus périphériques, sous le contrôle du facteur de transcription « Auto-Immune REgulator » (AIRE). Cependant, les mécanismes de la tolérance centrale n'éliminent pas tous les LT auto-réactifs à la sortie du thymus. La présentation d'un Ag du soi par les cellules dendritiques en périphérie, en absence d'un signal de co-stimulation et de cytokines inflammatoires, induira l'apoptose, l'anergie des ou la régulation par les LTreg des LT auto-réactifs (**Audiger et al., 2017**).

Ces dernières années, plusieurs études ont mis en lumière le rôle des cellules stromales des ganglions lymphatiques dans l'induction de la tolérance des LT CD4⁺ et CD8⁺ (**Hirosue and Dubrot, 2015**). Bien que n'étant pas reconnues comme des cellules présentatrices d'Ag classiques, les FRC, LEC et BEC expriment, elles aussi, des Ag de tissus périphérique et des composants des voies de l'apprêtement et de présentation des Ag tels que les molécules du CMH-I et CMH-II (**Fletcher et al. 2010; Malhotra et al. 2012; Berendam et al. 2019**). En 2007, le groupe de Victor H. Engelhard a montré que les cellules stromales des ganglions lymphatiques mésentériques expriment de façon endogène la tyrosinase, une enzyme spécifique des mélanocytes, permettant l'induction de la tolérance de LT CD8⁺ auto-réactifs (**Nichols et al., 2007**). Pour ce faire, les auteurs ont généré un modèle murin transgénique exprimant un TCR spécifique pour un épitope de la tyrosinase présenté dans le contexte du CMH-I. Bien que cet Ag du soi soit retrouvé dans le thymus, les LT transgéniques ne semblent pas être supprimés par les mécanismes de tolérance centrale. L'apoptose de ces cellules T nécessite l'expression de la tyrosinase par des cellules non hématopoïétiques et radio-résistantes retrouvées dans les ganglions lymphatiques périphériques. Cette équipe a par la suite démontré que cet Ag des tissus périphériques est transcrit de façon indépendante du facteur de transcription AIRE par les LEC des ganglions lymphatiques et est présenté via le CMH-I aux LT CD8⁺ induisant ainsi leur apoptose (**Cohen et al., 2010**). Outre la tyrosinase, les LEC expriment d'autres Ag des tissus périphériques, tels que le polypeptide pancréatique (Ppy) habituellement retrouvé dans les îlots pancréatiques (**Yip et al., 2009**). Chaque sous-population de cellules stromales semble exprimer un répertoire d'Ag de tissus périphériques différent et propre à chacune, et non spécifique à l'organe ou tissu drainé. Par exemple, les FRC seraient les seules cellules stromales des ganglions lymphatiques à exprimer la protéine « melan-A », une autre protéine spécifique des mélanocytes, alors que l'expression de l'Ag « Retinal S-Antigen » a été retrouvée exclusivement dans les BEC (**Fletcher et al., 2010**). La transcription de ces Ag du soi par les cellules stromales, chez les Souris et chez l'Homme, semble être sous le contrôle du facteur de transcription « Deformed Epidermal Autoregulatory Factor 1 » (Deaf1), structurellement similaire au gène AIRE, qui contient également un domaine SAND (**Yip et al., 2009, 2013**).

Tel que décrit précédemment (*II2b.la distribution des Ag au ganglion*), suite à une vaccination les LEC peuvent collecter et retenir des Ag pendant une longue période de temps (**Kedl et al., 2017; Tamburini et al., 2014**). En absence d'inflammation, les LEC sont aussi capables d'archiver des Ag exogènes et de réaliser une présentation croisée dépendante de l'expression de « Transporter associated with Antigen Processing 1 » (TAP1). Suite à l'interaction avec les

LT CD8⁺ spécifiques d'un Ag, les LEC sur-expriment les molécules CMH-I et « Programmed Death-Ligand 1 » (PD-L1), mais pas les molécules de co-stimulation (CD80, CD86 ou CD40), ce qui conduit à la prolifération des cellules T suivie de leur apoptose (**Hirosue et al., 2014**) (**Figure 11**). De plus, il a été mis en évidence que la liaison de la molécule de co-inhibition PD-L1 à la surface des LEC, au récepteur PD-1 exprimé par les LT CD8⁺, joue un rôle important dans l'induction de la tolérance chez ces derniers. En effet, il a été montré que le transfert de cellules T CD8⁺ ayant un TCR transgénique reconnaissant un épitope de la tyrosinase, chez des souris receveuses exprimant la tyrosinase et dont les cellules radio-résistantes non hématopoïétiques n'expriment pas PD-L1, provoque une accumulation de LT CD8⁺ auto-réactifs et le développement d'un vitiligo auto-immun chez ce modèle murin. Le blocage de PD-1 ou l'engagement des molécules de co-stimulation (OX-40, CD137) à la surface des cellules T CD8⁺ transgéniques suffit à inhiber la tolérance induite par les LEC PD-L1⁺ et à déclencher une réponse auto-immune (**Tewalt et al., 2012**).

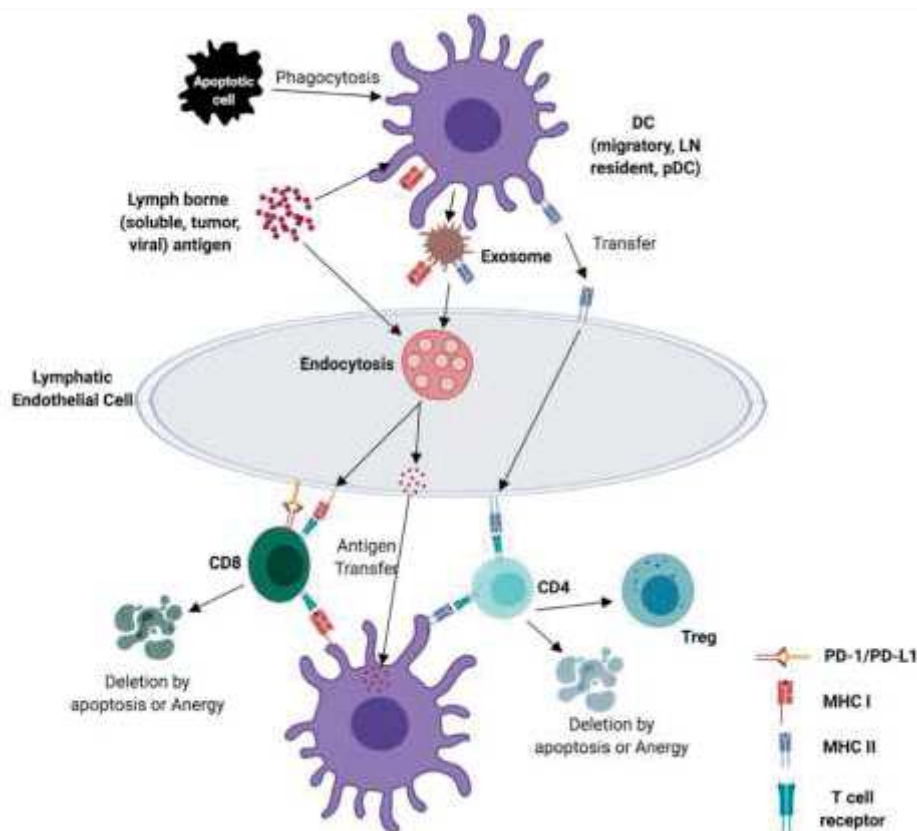


Figure 11 Mécanismes d'induction de la tolérance des LT par les LEC

Les LEC expriment de façon endogène des Ag de tissus périphériques. Ils peuvent aussi capturer des Ag directement de la lymphe et par transfert direct des cellules dendritiques ou via des exosomes. Les Ag sont endocytés puis présentés directement dans le contexte du CMH-I aux LT CD8⁺. Ces Ag peuvent aussi être transférés aux cellules dendritiques qui, elles, les présenteront dans le contexte du CMH-I ou du CMH-II aux LT CD8⁺ ou CD4⁺. Les complexes Ag - CMH-II acquis par transfert direct sont présentés directement aux LT CD4⁺.

En absence d'inflammation, la présentation d'Ag induit la différenciation des LT CD4⁺ en LTreg ou la tolérance des LT CD4⁺ et des LT CD8⁺ par apoptose ou anergie. Reproduit d'après (Saxena et al., 2019) avec autorisation.

Par ailleurs, ce sont les LEC, présentes au niveau des sinus médullaires des ganglions lymphatiques, qui expriment le plus fortement PD-L1 comparativement aux LEC d'autres tissus non lymphoïdes. De façon intéressante, l'augmentation de l'expression de PD-L1 à la surface de ces LEC est médiée par les LB via la signalisation par le récepteur de la Lymphotoxine- β (LT β R) (Cohen et al., 2014). Il a également été montré que lors d'une infection virale, les FRC expriment plus fortement les molécules du CMH-I et PD-L1, ce qui induit la tolérance des LT CD8⁺ et permet de limiter la destruction du réseau de conduits formé par les FRC (Mueller et al., 2007a).

Bien que la présentation d'Ag de tissus périphériques par le CMH-I et l'induction de la tolérance des LT CD8⁺ aient été démontrées par plusieurs équipes, la présentation par le CMH-II et l'induction de la tolérance chez les LT CD4⁺ par les cellules stromales est, quant à elle, moins bien comprise. En condition basale et inflammatoire, les cellules stromales des ganglions lymphatiques expriment les molécules de CMH-II (Baptista et al., 2014; Berendam et al., 2019; Malhotra et al., 2012; Rouhani et al., 2015). L'expression endogène des molécules du CMH-II par les FRC, LEC et BEC serait sous le contrôle du promoteur IV (inductible par l'IFN γ) du gène régulateur « Class II TransActivator » (CIITA). Cependant, les cellules stromales acquièrent aussi l'expression de complexes CMH-II-peptide par un transfert à partir des cellules dendritiques, par contact cellulaire direct ou par l'intermédiaire d'exosomes ; la présentation de ces complexes aux LT CD4⁺ inhibe alors leur prolifération et induit leur anergie (Dubrot et al., 2014).

Par ailleurs, l'équipe de V.H Engelhard a mis en évidence que les LEC sont capables, elles aussi et à l'inverse, de transférer des Ag aux cellules dendritiques qui les présenteront aux cellules T CD4⁺ pour induire leur anergie (Figure 11). En effet, ils ont montré que les LEC ne présentent pas directement la β -galactosidase (utilisée comme Ag de tissus périphériques dans leur modèle murin) dans le contexte des molécules du CMH-II aux LT CD4⁺ (Rouhani et al., 2015). Les auteurs suggèrent que l'absence de présentation par le CMH-II serait due au fait que les LEC n'expriment que faiblement, dans un contexte non inflammatoire, les protéines H2-M (correspondant à l'homologue HLA-DM chez l'Homme) nécessaires au chargement du peptide pour la présentation par les molécules du CMH-II (Berendam et al., 2019; Rouhani et al., 2015). Cependant, Baptista et collaborateurs ont, quant à eux, mis en évidence la présence

d'ARNm codant pour H2-M dans les LEC. En utilisant un modèle murin transgénique, ils ont montré que les LEC exprimant l'ovalbumine (OVA) étaient capables de présenter ce peptide transgénique via le CMH-II et de contribuer au maintien de LTreg OT-II de type naïfs ($CD4^+FoxP3^+CD62L^+$) (**Baptista et al., 2014**). Dans cette étude, la transplantation d'un ganglion lymphatique dans lequel l'ensemble des cellules stromales n'exprime pas les molécules du CMH-II, chez des souris receveuses saines, diminue le nombre de LTreg.

Enfin, concernant les FRC, Pasztoi et collaborateurs ont mis en évidence les propriétés tolérogènes élevées de FRC immortalisées provenant de ganglions mésentériques par rapport à celles provenant de ganglions périphériques. Ces FRC produisent des microvésicules contenant la cytokine TGF- β qui joue un rôle dans l'induction de LTreg, ce qui pourrait contribuer à la tolérance intestinale *in vivo* (**Pasztoi et al., 2017**).

Ces différentes données mettent en évidence le rôle des cellules stromales dans le maintien de la tolérance périphérique des LT $CD8^+$ et $CD4^+$ grâce à divers mécanismes de présentation directe ou indirecte des Ag du soi.

e. La dynamique du compartiment stromal lors des réponses immunitaires

L'une des caractéristiques uniques des ganglions lymphatiques est leur capacité à changer de taille rapidement lors des réponses immunitaires. Leur volume peut augmenter jusqu'à 20 fois par rapport à l'état basal. Cette expansion résulte principalement de l'afflux de lymphocytes et de leur prolifération dans le ganglion.

Le remodelage des ganglions lymphatiques s'opère en plusieurs phases : l'initiation, l'expansion et la quiescence. La phase d'initiation se passe lors des deux premiers jours suivant l'immunisation, la perméabilité des HEV est élevée pour permettre l'entrée des lymphocytes naïfs et le taux de prolifération des BEC augmente. Puis, la phase d'expansion, pendant la première semaine après immunisation, est caractérisée par une augmentation de la prolifération des cellules endothéliales et des cellules réticulaires. Enfin, la phase de quiescence pendant laquelle le compartiment stromal se stabilise de façon transitoire. Le taux de prolifération des cellules stromales commence à diminuer, bien que le nombre des FRC, BEC et LEC reste plus élevé qu'à l'état basal. Cette phase est associée au développement des centres germinatifs et à l'accumulation de plasmocytes (**Dasoveanu et al., 2016**). Les cellules stromales participent activement aux mécanismes soutenant l'expansion et le retour à l'état basal. Deux études ont mis en évidence des changements transcriptionnels du compartiment stromal en réponse à l'inflammation, tels que l'augmentation de l'expression des gènes de la voie des IFN de type I,

de l'expression des gènes codant pour les molécules du CMH-II ainsi que pour des cytokines inflammatoires (comme CXCL9) (Gregory et al., 2017; Malhotra et al., 2012). Gregory *et al* ont notamment montré que ces changements de profils transcriptionnels étaient rapides, transitoires (pendant l'infection par le virus herpes simplex HSV-1) et propres à chacune des sous-populations de cellules stromales (Gregory et al., 2017).

Lors de la phase d'expansion, les HEV augmentent en nombre, en longueur et créent des arborescences. Il a été montré, grâce aux techniques de « fate-mapping », que les nouvelles cellules endothéliales générées agissent comme des progénitrices pour créer un nouveau branchement à partir d'un HEV pré-existant permettant ainsi leur élongation. Le retour à l'homéostasie se fait par l'élimination au hasard des cellules endothéliales (Mondor et al., 2016) (Figure 12). Cette prolifération des BEC est permise grâce au facteur « Vascular Endothelial Growth Factor » (VEGF) produit principalement par les FRC en réponse à la LT β (Chyou et al., 2008). Comme pour les BEC, le facteur clé pour la prolifération des LEC est VEGF, ce qui permet l'expansion des vaisseaux lymphatiques dans les ganglions après l'infection virale (Gregory et al., 2017).

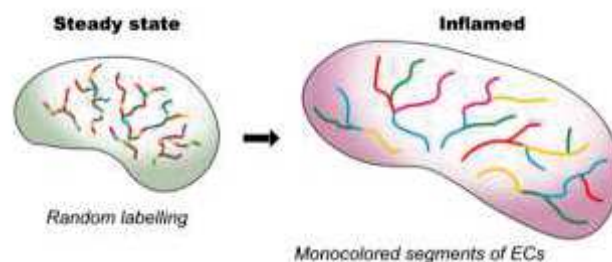


Figure 12 Mécanismes d'expansion des vaisseaux sanguins des ganglions lymphatiques

La technique de « fate mapping » a permis de révéler le développement des vaisseaux sanguins au cours d'une réponse immunitaire. A l'état basal, le marquage des vaisseaux sanguins est aléatoire. En revanche lors d'une inflammation, le système vasculaire des ganglions enflammés est constitué de grands segments monocolores, ce qui indique que peu de cellules endothéliales se divisent pour s'étendre largement dans le ganglion lymphatique. Reproduit d'après (Thierry et al., 2019) avec autorisation.

Le facteur VEGF est également produit par les macrophages en réponse à l'inflammation, qui via la sécrétion de ce facteur, jouent un rôle important dans la régulation de la lymphangiogenèse. Lors d'une inflammation les cellules stromales ne reçoivent pas seulement des signaux des cellules immunitaires, mais fournissent également des facteurs aux cellules immunitaires. En effet, une équipe au laboratoire a récemment mis en évidence le rôle des LEC, dans la reconstitution de la niche de ces macrophages du sinus suite à leur destruction lors d'une

réponse inflammatoire grâce à l'activation de la voie de signalisation « Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B » (RANK) /RANK ligand (RANKL) (Camara et al., 2019).

Au sein des follicules B, le réseau de FDC s'étend pour apporter un support aux LB naifs entrants et aux cellules B en prolifération et en maturation. Là aussi, grâce à la technique de « fate-mapping », il a été possible de montrer que les FDC dérivent des MRC et prolifèrent depuis le sinus sous-capsulaire avec une organisation en colonne jusque dans le follicule B (Jarjour et al., 2014).

Enfin, concernant le réseau de FRC, il devient d'abord plus lâche au début de la phase d'expansion. L'interaction entre la PDPN des FRC et Clec2 exprimée par les cellules dendritiques diminue la capacité de contraction des cellules fibroblastiques ce qui permet l'élargissement du ganglion avant la prolifération des cellules stromales fibroblastiques (Astarita et al., 2015). Puis suite à cette phase initiale d'étirement du réseau, les FRC commencent à proliférer, dont le plus haut degré de prolifération est constaté entre les jours 4 et 10 après l'immunisation avec un nombre important de FRC. Bien que leur nombre diminue suite à la résolution de l'inflammation, un nombre élevé de FRC est maintenu pendant les 3 mois après l'infection (Figure 13). La production de $LT\beta$ par les cellules B serait nécessaire à ce maintien (Gregory et al., 2017). De plus, cette étude a permis de montrer que lors d'une ré-infection virale, le réseau de FRC s'élargissait moins que lors de l'infection initiale, suggérant qu'une plus faible prolifération de FRC est requise pour atteindre le même niveau de réponse des ganglions lymphatiques.

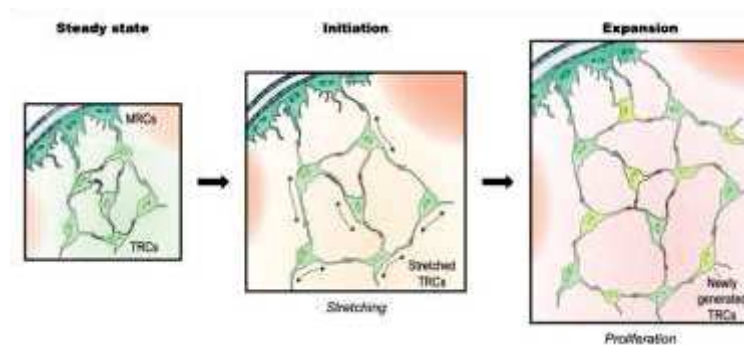


Figure 13 Mécanismes d'extension du réseau de FRC dans les ganglions lymphatiques

Lors de la phase d'initiation de la réponse immunitaire, le réseau de FRC s'étire pour s'adapter à l'augmentation du nombre de lymphocytes dans le ganglion. Puis, suite à cette première phase, les FRC prolifèrent pour faciliter l'expansion du réseau dans la zone T. Reproduit d'après (Thierry et al., 2019) avec autorisation.

3. Le rôle des cellules stromales des ganglions lymphatiques dans des situations pathologiques : cas du cancer et des maladies auto-immunes

Comme décrit précédemment, le compartiment stromal est un acteur important dans l'élaboration des réponses immunitaires et dans le maintien de la tolérance périphérique. Par conséquent, il pourrait participer à la dérégulation de ces réponses au cours de situations pathologiques telles que les maladies auto-immunes et le cancer.

a. Les cellules stromales des ganglions lymphatiques drainant une tumeur

Le microenvironnement tumoral modifie activement le phénotype des cellules stromales des ganglions lymphatiques drainants et des vaisseaux lymphatiques associés à la tumeur. Lors de la croissance de la tumeur, les LEC se développent en réponse à la production de VEGF-C par les macrophages et les cellules cancéreuses. Ce processus de lymphangiogenèse permet l'expansion d'un réseau lymphatique connectant la tumeur et les ganglions lymphatiques, facilitant ainsi la dissémination des cellules tumorales et donc des métastases (**Garnier et al., 2019**). Entre autres, VEGF-C induit l'augmentation de la sécrétion de CCL21 par les LEC permettant l'évasion des cellules tumorales exprimant le récepteur CCR7 (**Issa et al., 2009**). Les LEC présentes dans le sinus sous-capsulaire du ganglion lymphatique drainant la tumeur jouent également un rôle dans l'entrée des cellules tumorales dans le ganglion via la sécrétion de la chimiokine CCL1, chez l'homme et la souris (**Das et al., 2013**). De plus, il a été montré dans deux modèles murins distincts de tumeurs, que les LEC des vaisseaux lymphatiques associés à la tumeur ont une expression élevée de la molécule PD-L1 et qu'elles sont capables d'inhiber l'activation des LT CD8⁺ de façon similaire à l'induction de la tolérance par les LEC des ganglions lymphatiques (**Dieterich et al., 2017**). D'autre part, il a été mis en évidence par une analyse transcriptomique, que les tumeurs induisent, avant l'apparition de métastases, une reprogrammation du phénotype des FRC présentes dans le ganglion lymphatique drainant (**Riedel et al., 2016**). Les auteurs ont montré chez un modèle murin de mélanome que les FRC du ganglion lymphatique drainant la tumeur prolifèrent mais présentent un plus faible niveau d'expression des gènes codant pour la chimiokine CCL21 et la cytokine IL-7. La réduction du taux de ces deux molécules entraîne une désorganisation des zones T et B et un défaut de localisation des cellules immunitaires. Par conséquent, une altération de l'architecture des ganglions lymphatiques drainant la tumeur impacterait les réponses immunitaires anti-tumorales et favoriserait le développement de métastases. Cette même équipe a par la suite

identifié l'acide lactique, sécrété par les cellules cancéreuses, comme étant l'un des éléments capables d'induire des modifications du phénotype des FRC des ganglions (**Riedel et al., 2018**).

b. Les cellules stromales des ganglions lymphatiques dans les maladies auto-immunes

Quelques études se sont intéressées à la caractérisation des cellules stromales des ganglions lymphatiques drainant des organes atteints au cours de maladies auto-immunes, telles que le diabète de type I, la polyarthrite rhumatoïde et le lupus.

Le diabète de type I résulte d'une destruction des cellules β des îlots pancréatiques par des LT CD8 auto-réactifs, présents suite à une rupture de tolérance centrale et/ou périphérique, chez des individus génétiquement susceptibles. Yip et collaborateurs ont mis en évidence la présence d'un variant du facteur de transcription Deaf1 (DEAF1-VAR) dans les cellules stromales des ganglions lymphatiques drainant le pancréas chez les souris « non-obese diabetic » (NOD) et chez les patients diabétiques de type I. Ce variant affecte la fonction du facteur Deaf1, ce qui diminue l'expression des gènes codant pour des Ag de tissus périphériques, ainsi que ceux impliqués dans la présentation antigénique dans les cellules stromales, principalement les FRC (**Yip et al., 2009, 2013**). Ces données suggèrent que l'absence de présentation, par les cellules stromales d'Ag de tissus périphériques aux LT pourrait contribuer à la rupture de tolérance périphérique et au développement de LT auto-réactifs. Cette équipe a par la suite montré que l'augmentation de l'expression de DEAF1-VAR est corrélée avec le début de la maladie chez les souris NOD. De plus, l'inflammation et l'hyperglycémie provoquent l'épissage anormal de DEAF1 et par conséquent l'expression de DEAF1-VAR (**Yip et al., 2015**), laissant penser que ce mécanisme, impliqué dans la rupture de tolérance, pourrait être une conséquence plutôt qu'une cause de la pathologie. Son rôle exact dans la pathogénèse reste donc à déterminer. Cependant, chez l'Homme, la caractérisation des ganglions drainant le pancréas chez les patients diabétiques a montré de façon inattendue que les cellules stromales présentent une augmentation, potentiellement induite par l'inflammation, de l'expression des gènes associés à la tolérance dont ceux codant pour CMH-II et PD-L1 (**Postigo-Fernandez et al., 2019**). Bien que les cellules stromales montrent un phénotype tolérogène, il se pourrait que le faible niveau d'expression d'Ag de tissus périphériques par ces dernières ne soit pas suffisant pour induire la tolérance des LT dans le diabète de type I.

Récemment, une autre étude a mis en lumière l'importance du rôle de maintien de la tolérance périphérique par les cellules stromales dans l'auto-immunité. Les auteurs ont utilisé un modèle

murin dont l'expression des molécules de CMH-II est supprimée uniquement dans les cellules stromales des ganglions lymphatiques (souris déficientes pour le promoteur IV de la CIITA mais dont l'expression a été restaurée pour les cellules épithéliales thymiques corticales). Cette absence d'expression provoque le développement d'une réponse auto-immune au cours du vieillissement des souris. En effet, les souris âgées de plus d'un an, dont les cellules stromales n'expriment plus les molécules du CMH-II, présentent une infiltration des LTCD4⁺ et LTCD8⁺ dans les glandes salivaires et la moelle épinière ainsi qu'une augmentation des LTCD4⁺ produisant de l'IFN γ dans l'intestin, associée à une production de différents auto-Ac, par rapport aux souris de même âge dont les cellules stromales expriment le CMH-II. De plus, l'absence d'expression du CMH-II par les LEC réduit la proportion de LTreg dans les ganglions lymphatiques des souris âgées (**Dubrot et al., 2018**).

Dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde, une maladie auto-immune affectant les articulations, les cellules stromales isolées des ganglions lymphatiques inguinaux présentent un profil transcriptionnel différent entre les patients atteints d'une polyarthrite et les patients à risque par rapport aux individus sains. Les cellules stromales des patients à risque, n'ayant pas encore d'atteinte articulaire mais dont le taux sérique d'auto-Ac (auto-Ac anti-protéines citrullinées ou anti-facteur rhumatoïde) est positif, expriment différemment des gènes du cycle cellulaire par rapport aux individus sains, ce qui diminue leur taux de prolifération *in vitro*. Les auteurs suggèrent que cette altération de la prolifération des cellules stromales pourrait traduire un défaut de ces dernières pour faire face à l'inflammation, ce qui influencerait les activités immuno-modulatrices lors de la phase précoce de la polyarthrite. De plus, une hypométhylation des loci CpG des gènes associés à l'apprêtement et à la présentation d'Ag a été observée chez les individus sains comparé aux patients à risque et atteints de polyarthrite. Ces modifications épigénétiques suggèrent que ces gènes pourraient être plus facilement transcrits. Cependant les auteurs précisent que d'autres études seront nécessaires pour déterminer si la présentation antigénique par les cellules stromales limite ou induit l'auto-immunité (**Karouzakis et al., 2019**).

Dans le cas du LED, encore peu d'études se sont intéressées à une potentielle dérégulation du compartiment stromal des ganglions lymphatiques. Dans le modèle murin MRL lpr/lpr, il a été montré que l'augmentation consécutive du volume des ganglions lymphatiques est associée à une expansion des cellules endothéliales, formant entre autres les HEV (**Chyou et al., 2012**), et à une production élevée d'IL-7 et à une expansion des FRC qui la produisent (**Gonzalez-Quintial et al., 2011**). Cette cytokine induit la prolifération des LT auto-réactifs mais n'agit pas sur les cellules T DN (CD4⁻CD8⁻), qui probablement suite à leur conversion à partir des

LT CD8⁺, sous-expriment le récepteur à l'IL-7. Un traitement avec un Ac anti-IL-7 chez ces souris permet de diminuer le taux d'auto-Ac et le nombre de lymphocytes, (par conséquent, les cellules T DN) et d'améliorer l'atteinte rénale. Par ailleurs, Kasinath et collaborateurs ont mis en évidence des modifications du compartiment stromal des ganglions lymphatiques rénaux dans un modèle murin de glomérulonéphrite à croissants (le modèle « nephrotoxic nephritis » NTN induit par l'injection de sérum néphrotoxique). En réponse à l'inflammation, l'expansion des HEV et des vaisseaux lymphatiques des ganglions lymphatiques rénaux est associée à une augmentation de la densité du réseau de FRC résultant d'une sécrétion accrue de fibres de la matrice extracellulaire, par rapport à ce qui est observé dans les ganglions lymphatiques ne drainant pas les reins. De plus, l'ablation des ganglions rénaux, la suppression des FRC (dans un modèle murin inductible), ou un traitement avec un Ac-anti-PDPN permettent d'améliorer l'atteinte rénale chez ces souris. Les auteurs suggèrent que l'activation des FRC supporterait le développement des LTh17 qui jouent un rôle dans la pathogénèse (**Kasinath et al., 2019**). Bien que ce modèle n'implique pas une rupture de tolérance dans la survenue de l'atteinte rénale, contrairement à ce qui est observé dans la pathologie lupique, il permet, néanmoins, de mettre en évidence l'importance du microenvironnement des ganglions lymphatiques au cours des réponses immunitaires.

C. L'ontogénèse des organes lymphoïdes

Les ganglions lymphatiques sont positionnés au niveau de sites stratégiques du corps pour permettre le développement optimal des réponses immunitaires. Leur localisation aux jonctions vasculaires et lymphatiques assure une surveillance constante des tissus périphériques. C'est au cours du développement embryonnaire que sont formés les organes lymphoïdes secondaires, dont les ganglions lymphatiques, grâce à des signaux moléculaires et cellulaires spécifiques. Ces processus d'ontogénèse lymphoïde peuvent être réactivés lors d'une inflammation chronique et conduire à la formation de structures lymphoïdes ectopiques, appelées organes lymphoïdes tertiaires (OLT). Les mécanismes responsables de la formation des OLS en conditions normales permettent d'apporter des pistes pour la compréhension du développement des OLT.

I. Les organes lymphoïdes secondaires : le ganglion lymphatique

1. Les modèles de formation du ganglion lymphatique

La mise en place des tissus lymphoïdes au cours de l'embryogénèse nécessite l'interaction entre deux types cellulaires : les « Lymphoid Tissue inducers » (LTi) et les « Lymphoid Tissue organisers » (LTo). Les LTo sont des cellules d'origine mésenchymateuse qui donneront par la suite les différentes sous-populations de cellules stromales présentes dans les organes lymphoïdes. Les LTi ont, pour leur part, une origine hématopoïétique et colonisent le ganglion lymphatique en cours de développement. Ces cellules sont de phénotype $CD45^+ IL7R\alpha^+ CD3^- CD4^+$ et ont été isolées chez la souris à partir du foie fœtal (**Mebius et al., 2001**). La sécrétion par les LTi de la lymphotoxine $\alpha 1\beta 2$ ($LT\alpha 1\beta 2$) active les LTo exprimant le récepteur $LT\beta R$ qui produiront diverses chimiokines et molécules d'adhésion permettant le recrutement de davantage de LTi ainsi que des LT et LB pour coloniser l'ébauche du ganglion (**Figure 14**).

Chez la souris, la plupart des ganglions ne se développent pas en absence de CXCL13 ou du récepteur CXCR5 (**Luther et al., 2003; Ohl et al., 2003**). L'expression de la chimiokine CXCL13 semble précéder celle de la lymphotoxine, en effet, cette chimiokine est détectée dans l'ébauche des ganglions chez les embryons de souris déficientes pour la lymphotoxine α (**van de Pavert et al., 2009**). Ceci suggère que la chimiokine CXCL13 permet de recruter les LTi au point de formation du ganglion lymphatique. La production de cette chimiokine semble avoir pour origine les cellules mésenchymateuses présentes sur le site de l'ébauche du ganglion (**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**). Il a été montré que l'acide rétinoïque est essentiel pour l'expression de CXCL13 par les cellules mésenchymateuses. Les fibres nerveuses à proximité de la zone où se forment le ganglion expriment l'enzyme « RetinAldehyde DeHydrogenase 2 » (RALDH2) permettant la synthèse d'acide rétinoïque (**van de Pavert et al., 2009**).

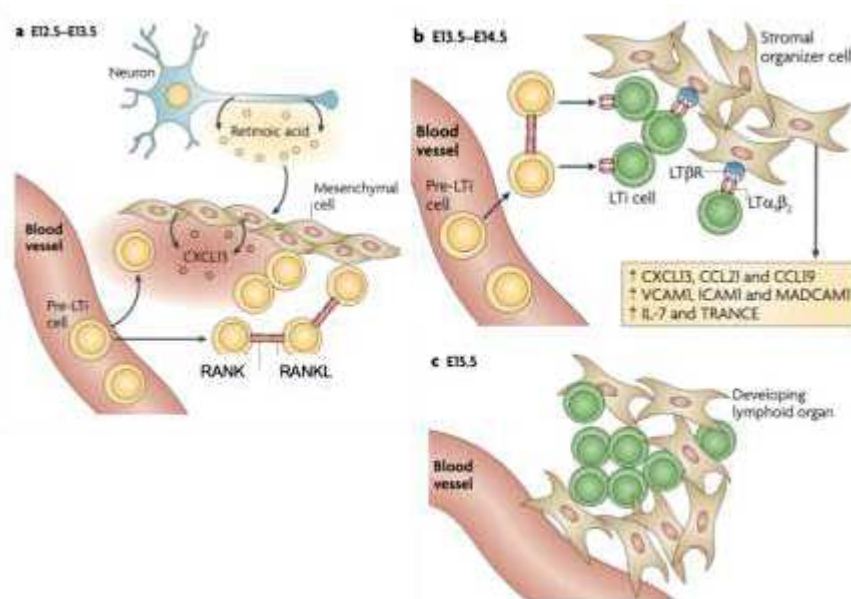


Figure 14 Modèle de formation bicellulaire des ganglions lymphatiques

L'ontogénèse des OLS nécessite un contact étroit entre les LTi et les LTo. a) Chez la souris, aux jours embryonnaires 12,5 - 13,5, l'acide rétinoïque, probablement produit par les fibres nerveuses, induit l'expression de la chimiokine CXCL13 par les cellules mésenchymateuses. Ceci permet le recrutement des précurseurs des LTi de la circulation sanguine pour former les premiers groupes de cellules. Par contact homologue (RANK-RANKL) celles-ci vont exprimer à leur surface la $LT\alpha 1\beta 2$. b) L'interaction de la $LT\alpha 1\beta 2$ avec son récepteur $LT\beta R$ à la surface des cellules mésenchymateuses déclenche leur maturation en LTo et la production de molécules d'adhésion et des facteurs impliqués dans le recrutement et le maintien des LT et LB (CXCL13, CCL21, CCL19). c) Ces facteurs vont permettre le développement du ganglion lymphatique où peu à peu les lymphocytes vont remplacer les LTi et les LTo vont se différencier en cellules stromales. Reproduit d'après (van de Pavert and Mebius, 2010) avec autorisation.

Par conséquent, l'expression de CXCL13 par ces cellules mésenchymateuses, induite par l'acide rétinoïque, permet le recrutement des LTi sur le site d'initiation pour former les premiers regroupements de LTi. Cette première étape correspond à la phase d'accumulation des LTi. Puis, afin d'interagir avec les LTo, les LTi doivent exprimer à leur surface la lymphotoxine, qui peut être induite chez ces dernières par l'IL-7 ou l'engagement de la voie RANK /RANKL (Yoshida et al., 2002). Les LTi exprimant à la fois RANK et RANKL, il a été suggéré que leur regroupement en clusters au niveau de l'ébauche du ganglion permet leur interaction en trans et donc la production de la lymphotoxine (Vondenhoff et al., 2009). Lorsque la lymphotoxine est exprimée, les LTi entrent en contact avec les cellules mésenchymateuses $LT\beta R^+$ présentes pour induire leur différenciation en LTo, ce qui correspond à l'étape de stimulation des LTi. Ces LTo produiront alors les chimiokines homéostatiques (CXCL13, CCL19, CCL21) et des molécules d'adhésion comme « InterCellular Adhesion Molecule 1 » (ICAM1), « Vascular Cell Adhesion Molecule 1 » (VCAM1) et MadCAM qui vont permettre le recrutement d'un plus grand nombre de LTi ainsi que leur rétention. De plus, les LTo peuvent aussi synthétiser l'IL-7 et exprimer RANKL, permettant d'activer les nouveaux LTi arrivant au site de formation.

Cette dernière étape d'activation permet de créer une boucle d'amplification positive (**Yoshida et al., 2002**). Enfin, ces structures seront colonisées par des lymphocytes et les LTo se différencieront en cellules stromales ganglionnaires pour constituer les ganglions lymphatiques organisés et matures.

Ce processus de formation des ganglions lymphatiques correspond au modèle bicellulaire qui a été élaboré à partir de données obtenues de souris déficientes pour certains gènes (RANK, LT β R et le récepteur de l'acide rétinoïque) qui ne développent pas de ganglions lymphatiques (**Dougall et al. 1999; Fütterer et al. 1998; Eberl et al. 2004**). Cependant, ce modèle comporte quelques limitations et incohérences qui ont conduit à reconsidérer la manière dont les ganglions se mettent en place. L'une des principales prédictions du modèle « à deux cellules » est que l'absence de signalisation par la lymphotoxine entraînerait un défaut de l'organogénèse des ganglions. Toutefois, deux études ont montré un développement des ganglions lymphatiques chez les souris dont le récepteur de la lymphotoxine a été supprimé des cellules mésenchymateuses exprimant CCL19, donc des LTo (**Chai et al., 2013**) ou exprimant CXCL13, donc les précurseurs des LTo (**Onder et al., 2017**). Par ailleurs, lorsque la signalisation de la lymphotoxine est abolie dans les LEC et BEC, la formation des ganglions lymphatiques périphériques est presque inexistante et les quelques ganglions formés présentent des HEV incomplètement différenciés (**Onder et al., 2013**). Cela confirme que la signalisation par la lymphotoxine joue un rôle important dans le développement des ganglions. De plus, d'après le modèle bicellulaire, les LTi quitteraient le foie fœtal et se retrouveraient dans la circulation sanguine avant d'être attirées par la chimiokine CXCL13 au niveau de l'ébauche du ganglion (**van de Pavert et al., 2009**). Après la naissance et à l'âge adulte, les progéniteurs hématopoïétiques sortent d'abord dans la circulation sanguine, migrent dans les tissus périphériques puis rejoignent les vaisseaux lymphatiques avant de gagner les ganglions lymphatiques (**Massberg et al., 2007**). Onder et collaborateurs ont émis l'hypothèse que la migration des LTi serait similaire. En effet, ils ont montré que les LTi circulent via les vaisseaux lymphatiques et sont retenus au niveau du site de formation des ganglions par les cellules LTo de type endothélial lymphatique de manière dépendante de la chimiokine CCL21 (**Figure 15**).

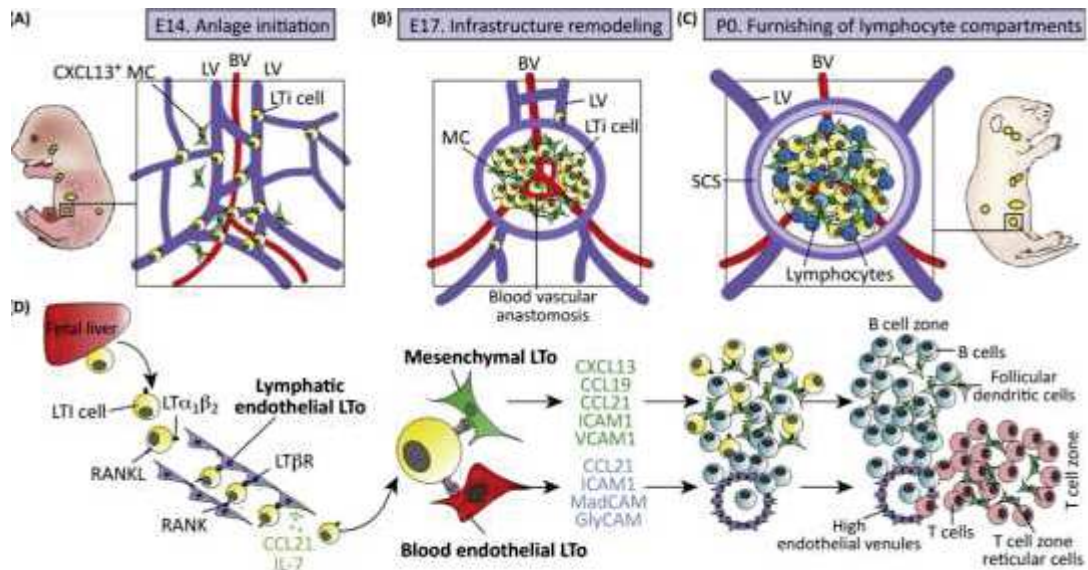


Figure 15 Nouveau modèle de développement des ganglions lymphatiques

A) Chez la souris, au jour embryonnaire 14 lors de la phase d'initiation du développement des ganglions lymphatiques, les LTi débutent leur sortie du foie fœtal pour migrer à travers les vaisseaux lymphatiques (LV) en suivant un gradient de concentration de la chimiokine CCL21. Les LTi interagissent avec les cellules LTo endothéliales lymphatiques par le biais de RANK et $LT\beta R$. B) Au jour embryonnaire 17, les LTi s'accumulent au niveau de l'ébauche du ganglion. L'interaction des LTi avec les LTo mésenchymateuses et endothéliales sanguines induit une boucle d'amplification positive avec augmentation de l'expression des chimiokines et des molécules d'adhésion. L'interaction avec le récepteur de la LT va permettre la maturation des LTo et leur différenciation en BEC et en sous-populations de cellules réticulaires fibroblastiques. C) Au jour postnatal P0, le recrutement de lymphocytes naifs via la circulation sanguine favorise l'établissement des compartiments cellulaires distincts. Adapté d'après (Onder and Ludewig, 2018) avec autorisation. MC : cellules mésenchymateuses, BV vaisseaux sanguins, SCS : sinus sous-capsulaire

Le premier contact entre les LTi et les LEC est principalement dépendant de l'interaction RANK-RANKL (Onder et al., 2017). De plus, il a récemment été mis en évidence que l'expression du récepteur de la lymphotoxine par ces LTo lymphatiques est nécessaire au maintien des LTi et à la maturation des ganglions lymphatiques, ce qui confirme le rôle important des LEC dans l'ontogénèse des ganglions (Wang et al., 2018). Ces résultats suggèrent un processus d'initiation plus complexe que ce que l'on pensait auparavant avec une contribution des cellules endothéliales dans l'organogénèse des ganglions. Toutefois, les cellules mésenchymateuses exprimant CXCL13 sont retrouvées au niveau de l'ébauche du ganglion et seront activées par les LTi dans un deuxième temps lorsque suffisamment de cellules LTi se seront accumulées (Bénézech et al., 2012; Onder et al., 2017) (Figure 15).

En résumé, le nouveau modèle de mise en place des ganglions lymphatiques serait le suivant : au jour embryonnaire 14, les LTi sont recrutées par des LTo lymphatiques exprimant un gradient de CCL21 au niveau de l'ébauche du ganglion tandis que les cellules mésenchymateuses exprimant CXCL13 apparaissent entre les vaisseaux lymphatiques. Durant cette phase d'initiation, les LTi interagissent avec les LTo lymphatiques via RANK/RANKL et

LT α 1 β 2/LT β R. Une fois que suffisamment de L T_i se sont accumulées, l'interaction de ces cellules, entre elles, induit une boucle d'amplification avec une augmentation de l'expression des chimiokines et des molécules d'adhésion, permettant le recrutement d'un plus grand nombre de L T_i et une réorganisation des vaisseaux sanguins et lymphatiques autour de l'ébauche. Les LEC vont former le sinus sous-capsulaire et confinent ainsi le volume du ganglion. Il y a une expansion des L T_o sanguines qui formeront les vaisseaux sanguins et les HEV. Puis les cellules L T_o mésenchymateuses entameront leur maturation en différentes cellules stromales fibroblastiques telles que les FRC et les FDC présentes dans les ganglions après la naissance. Ce modèle suggère donc qu'il existe différentes populations de L T_o qui contribuent à l'organogénèse des ganglions lymphatiques.

2. L'origine des cellules stromales mésenchymateuses

Comme évoqué dans le paragraphe précédent, les progéniteurs des LEC, formant les vaisseaux lymphatiques des ganglions, proviennent de L T_o lymphatiques. Chez la souris, au jour embryonnaire 10, les premières cellules endothéliales lymphatiques sont générées à partir des cellules endothéliales de la veine cardinale embryonnaire à proximité du système nerveux central en développement. Ces cellules seront reprogrammées et exprimeront le facteur de transcription « Prospero homeobox protein 1 » (Prox1) essentiel au développement et au maintien des vaisseaux lymphatiques (**Srinivasan et al., 2007**). Entre les jours embryonnaires 12 et 13, les réseaux lymphatiques et sanguins ont évolué et commencent à s'infiltrer dans divers organes. L'activation des BEC formant les HEV du ganglion se produit à partir du jour embryonnaire 16, après l'accumulation des L T_i sur le site de formation du ganglion. En effet, l'expression des molécules ICAM1 et MadCAM par les BEC nécessite l'activation de la voie de signalisation par le récepteur de la lymphotoxine et par RANK/RANKL (**Onder et al., 2017**).

Concernant l'origine des cellules stromales mésenchymateuses, il a été suggéré que les progéniteurs des L T_o de type mésenchymateux dériveraient des adipocytes des coussins adipeux chez la souris (**Bénézech et al., 2012**). Dans cette étude, les auteurs ont pu mettre en évidence que les précurseurs des adipocytes avaient le potentiel de se différencier en adipocytes ou en cellules stromales via la signalisation par la lymphotoxine. L'activation du récepteur de la lymphotoxine à la surface des précurseurs d'adipocytes bloque l'expression de gènes clés tels que « Peroxisome proliferator-activated receptors » (Ppar) et « CCAAT/enhancer-binding protein alpha » (Cebp α), nécessaires pour la différenciation en adipocytes. Ces progéniteurs

migrent sur le site de l'ébauche du ganglion, adoptent un phénotype de cellules LTo en augmentant l'expression des molécules d'adhésion ICAM1, VCAM1 et de la chimiokine CXCL13 et s'intègrent ainsi dans le réseau stromal en développement du ganglion lymphatique. De façon intéressante, cette capacité de migration des pré-adipocytes vers les ganglions lymphatiques et la participation à la formation du compartiment stromal est conservée chez l'adulte, ce qui a pu être démontré grâce à des expériences de greffes de précurseurs d'adipocytes sous la capsule du rein chez la souris (**Bénézech et al., 2012**).

Par ailleurs, grâce à un modèle murin de « fate-mapping » une étude récente a identifié un nouveau progéniteur des cellules stromales des ganglions lymphatiques (**Denton et al., 2019a**). Les auteurs ont montré que les FRC, FDC et MRC ont pour origine une cellule mésenchymateuse LTo exprimant la protéine « Fibroblast activation protein alpha » (FAP). Cette protéine avait précédemment été identifiée comme un marqueur des FRC dans les ganglions lymphatiques (**Denton et al., 2014**). Ces LTo FAP⁺, présentes dans l'ébauche du ganglion au jour embryonnaire 14, expriment le récepteur de la lymphotoxine mais faiblement MAdCAM1 et pas ICAM1. Au jour embryonnaire 15, elles donnent naissance aux cellules stromales mésenchymateuses observées dans les ganglions adultes. Considérant que l'expression des molécules d'adhésion est en aval de la signalisation par la lymphotoxine (**Bénézech et al., 2010**), les LTo FAP⁺ seraient semblables aux cellules LTo CXCL13⁺ présentes à l'ébauche du ganglion (**Onder et al., 2017**). De plus, lors d'une infection virale, les fibroblastes exprimant FAP peuvent se différencier en cellules stromales supportant la formation de structures lymphoïdes dans les poumons suite à l'infection par le virus influenza (**Denton et al., 2019a**). Cependant, dans cette étude, les auteurs n'ont pas évoqué un rôle potentiel des pré-adipocytes comme progéniteurs des cellules stromales dans les ganglions lymphatiques et les structures lymphoïdes ectopiques. La contribution des deux types de précurseurs dans l'origine des cellules stromales mésenchymateuses reste à approfondir.

II. Les organes lymphoïdes tertiaires

1. Définition et structure des organes lymphoïdes tertiaires

Le développement des OLS est un processus bien contrôlé ne prenant place habituellement que lors de la vie embryonnaire. Cependant, lors d'une inflammation persistante dans les tissus périphériques, il est possible d'observer la formation d'organes lymphoïdes ectopiques. Une des caractéristiques centrales de l'inflammation locale est l'interaction entre les cellules immunitaires et le compartiment stromal propre au tissu (différent de celui des

ganglions lymphatiques) représenté par les fibroblastes, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales sanguines et lymphatiques. Les molécules inflammatoires produites par les cellules résidentes dans les tissus vont contrôler le recrutement et l'activation des cellules immunitaires. L'infiltration cellulaire est traditionnellement considérée comme un afflux diffus de leucocytes. Toutefois, lors d'une inflammation chronique, les leucocytes peuvent aussi former des agrégats organisés. Ces structures sophistiquées ressemblent histologiquement aux OLS, par conséquent, on les appelle organes lymphoïdes tertiaires (**Figure 16**). Afin de définir si ces structures sont de véritables OLT ou de « simples » infiltrats cellulaires, différents critères sont observés : Ils contiennent des LT et LB séparés en deux zones distinctes, un réseau de FRC et des vaisseaux de type HEV dans la zone T ainsi que des FDC et des LB du centre germinatif dans la zone B. Comme dans les OLS, des vaisseaux lymphatiques sont aussi présents, bien que leur rôle reste encore à caractériser. Cependant, ces structures ne sont pas encapsulées, contrairement aux OLS, et plusieurs groupes utilisent le terme d'OLT pour des infiltrats qui ne possèdent pas tous les critères cités (**Neyt et al., 2012**).

La formation d'OLT peut survenir dans plusieurs contextes pathologiques comme les infections, les cancers, les rejets de greffe et les maladies auto-immunes. La raison pour laquelle ces structures se mettent en place n'est pas encore totalement établie et semble être dépendante des tissus affectés. Il existe deux hypothèses qui peuvent expliquer leur survenue dans un contexte d'inflammation chronique. La première vient du fait que, dans la majeure partie de ces affections, une disponibilité locale et persistante d'un Ag ou d'un auto-Ag, reconnu par le système immunitaire comme étant étranger à l'organisme, induirait la formation d'OLT (**Yin et al., 2017**). Toutefois, dans de nombreuses situations pathologiques où des OLT ont été observés, la présence de cet Ag déclenchant l'inflammation n'a pas pu être démontrée (**Mohanta et al., 2014**). C'est pourquoi une deuxième hypothèse suggère que les OLT surviennent suite à une inflammation chronique induite par une lésion tissulaire non spécifique et indépendante d'un Ag. Cette réaction tissulaire inflammatoire prolongée conduirait à révéler des épitopes auparavant masqués du système immunitaire, ce qui déclencherait une réponse dirigée contre ces Ag de tissus périphériques (**Yin et al., 2017**).

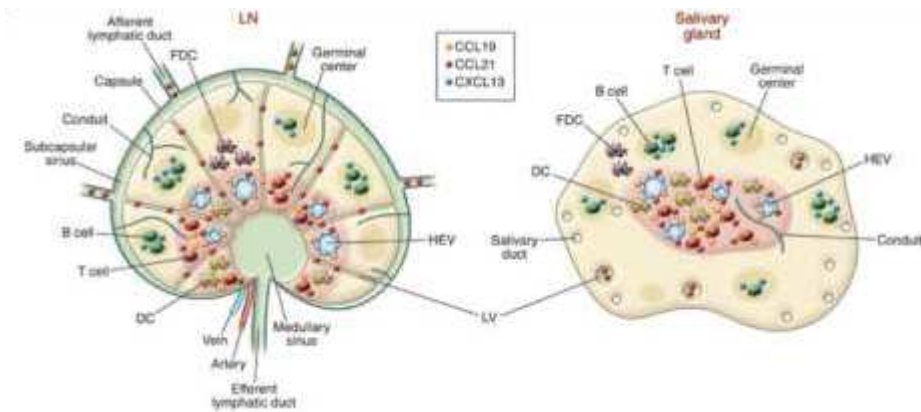


Figure 16 Comparaison de la structure des ganglions et des OLT

Les OLT partagent de nombreuses similarités avec les ganglions lymphatiques, telle qu'une ségrégation entre les LT et LB en zones distinctes. Les cellules stromales sont aussi présentes, les FRC forment des conduits dans la zone T et les FDC sont localisées au niveau des agrégats de LB. Des vaisseaux de type HEV et des vaisseaux lymphatiques vascularisent ces structures. Certains OLT contiennent également des plasmocytes sécrétant des Ac. Cependant, les OLT présentent certaines différences avec les ganglions telles que l'absence de capsule et donc de sinus sous-capsulaire, ainsi que de MRC. Le schéma est un exemple d'OLT formé dans les glandes salivaires mais l'organisation est semblable aux OLT que l'on peut observer au sein d'autres sites non lymphoïdes. Reproduit d'après (Ruddle, 2014) avec autorisation.

2. Mécanismes de formation des organes lymphoïdes tertiaires

Outre le fait de présenter des ressemblances de structures avec les OLS, certains mécanismes nécessaires au développement et à l'organisation des OLS sont également retrouvés dans les processus d'initiation et de maintien des OLT. Plusieurs études ont émis l'hypothèse que les cellules immunitaires recrutées sur le site de l'inflammation, tels que les LB, les LTh17 ou les LTgd selon les situations inflammatoires, pouvaient agir comme des LTi et initier le développement des OLT. (**Figure 17**). Des expériences d'allogreffes cardiaques chez la souris ont montré que les OLT formés sont majoritairement constitués de LB formant des centres germinatifs et que l'inhibition de la lymphotoxine (sécrétée par les LB) empêche le développement de ces OLT (**Motallebzadeh et al., 2012**). Les LB pourraient, dans ce cas, jouer le rôle de LTi en sécrétant la lymphotoxine et activer l'environnement stromal.

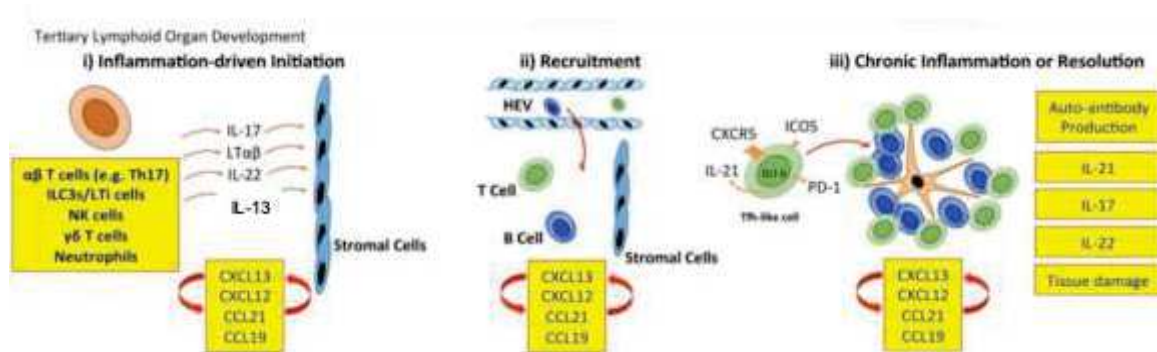


Figure 17 Mécanismes potentiels de formation des OLT

Au cours du développement des OLT, les cellules immunitaires peuvent se substituer aux cellules LTI impliquées dans l'organogenèse lymphoïde. i) L'accumulation de cellules immunitaires initiatrices aux sites d'inflammation et leur interaction avec les cellules stromales résidentes des tissus initie la libération de chimiokines homéostatiques (CXCL13, CXCL12, CCL21 et CCL19). ii) Ces chimiokines vont permettre le recrutement de cellules immunitaires et l'organisation spatiale des cellules en OLT. iii) La plasticité des LT peut contribuer au développement des OLT par l'acquisition de caractéristiques effectrices de type LTFH qui favorisent la maturation des lymphocytes B et la production d'Ac. Adapté d'après (Jones et al., 2016) avec autorisation.

Par ailleurs, lors d'une inflammation pulmonaire, les cellules Th17 peuvent être responsables du développement d'organes lymphoïdes ectopiques appelés « inducible bronchus-associated lymphoid tissue » (iBALT). En effet, il a été décrit que la production d'IL-17 déclenche l'expression des chimiokines CXCL13 et CCL19 par les fibroblastes, qui permettent alors le recrutement et l'organisation des lymphocytes dans les iBALT (**Rangel-Moreno et al., 2011**). De même, la production d'IL-17, mais aussi l'expression de la PDPN par les LTh17, contribuent à la formation d'OLT dans un modèle murin de sclérose en plaques (« Experimental Autoimmune Encephalomyelitis » EAE). Chez ces souris, un traitement avec un Ac bloquant de la PDPN diminue le nombre d'OLT formés après le transfert de LTh17. Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'expression de la PDPN par les LT permettrait leur ancrage dans les méninges (**Peters et al., 2011**). Dans ce modèle, l'interaction entre la lymphotoxine produite par les LTh17 et le récepteur LTβR des cellules stromales des méninges induit leur maturation permettant la sécrétion de CXCL13, le recrutement de cellules B et le dépôt de complément dans le système nerveux central (**Pikor et al., 2015**). Les LTh17 exprimant la PDPN ont également été observés dans les OLT de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et dans un modèle murin d'arthrite inflammatoire (« antigen-induced arthritis » AIA). Chez ces souris, l'IL-27 permet d'inhiber la différenciation de ces LTh17 PDPN⁺ et une augmentation du nombre de ces cellules est observé en absence d'IL-27, suggérant que cette cytokine régulerait négativement le développement des OLT dans la polyarthrite par le contrôle des cellules T effectrices (**Jones et al., 2015**). Une autre étude a mis en évidence le rôle de l'IL-22 dans le développement des OLT formés transitoirement dans les glandes salivaires de souris suite à une

infection par adénovirus. L'expression d'IL-22 par les LT induit la production des chimiokines CXCL12 et CXCL13 par les cellules stromales fibroblastiques et épithéliales. Ces cytokines sont essentielles dans le recrutement, l'organisation et la différenciation des LB qui produisent des auto-Ac au sein de ces OLT (**Barone et al. 2015**). Les cellules immunitaires pourraient donc se substituer aux cellules LTi dans les processus de néogenèse lymphoïde.

D'autre part, différentes expériences d'expression, dans des tissus périphériques, des chimiokines classiquement produites par le compartiment stromal des OLS laisse penser que les cellules stromales du tissu pourraient jouer un rôle de LTo dans l'induction des OLT. Par exemple, la surexpression des isoformes de la chimiokine CCL21 dans le pancréas induit la formation d'organes lymphoïdes ectopiques composés de LT, LB et de cellules dendritiques alors que la surexpression dans la peau n'induit pas le développement d'OLT (**Chen et al., 2002**). Cette étude suggère que certains tissus ou organes seraient plus permissifs que d'autres. De façon similaire, Luther et collaborateurs ont montré que l'expression ectopique de CXCL13 dans les îlots pancréatiques induit le recrutement et l'organisation des LT et LB en zones définies ainsi que le développement de structures lymphoïdes contenant des HEV et des cellules stromales sécrétant CCL21 (**Luther et al. 2000**). Ce groupe a aussi mis en évidence que l'expression d'une des trois chimiokines homéostatiques, CXCL12, CCL19 ou CCL21, dans le pancréas permet d'induire la formation d'OLT. Toutefois, la composition relative des OLT au niveau du site inflammatoire est variable selon les chimiokines. L'expression ectopique de CXCL12 favorise la formation d'OLT contenant peu de LT mais majoritairement des FDC, des LB et des plasmocytes. Contrairement à CXCL12, l'expression ectopique des chimiokines CCL19 et CCL21 conduit au recrutement des LT CD4⁺ naïfs et induit l'expression de LT α 1 β 2 par ces derniers, permettant de générer une boucle d'amplification, pour le recrutement de nouvelles cellules immunitaires, tel qu'observé dans les OLS (**Luther et al. 2002**). Enfin, une étude récente a permis de mettre en évidence le rôle essentiel des fibroblastes dans l'initiation des OLT, présents dans les glandes salivaires d'un modèle murin suite à une infection virale transitoire (**Nayar et al., 2019**). Les auteurs ont montré que les lymphocytes ne sont pas nécessaires pour l'activation précoce des progéniteurs de fibroblastes de type immunitaire sur le site d'implantation de l'OLT. Le développement de ces fibroblastes est initié par l'IL-13 produite par les cellules lymphoïdes innées (ILC) suite à l'infection virale des glandes salivaires. Toutefois, la maturation de ces fibroblastes et leur expansion en réseau pour former l'OLT sont dépendantes de l'expression par les lymphocytes de l'IL-22 et de la LT α 1 β 2.

L'ensemble de ces résultats suggère que les cellules stromales opèrent des changements de phénotype et de fonction au niveau du site enflammé pour adopter des caractéristiques semblables aux cellules stromales de OLS. Bien que les mécanismes de formation des OLT puissent énormément varier en fonction des situations pathologiques, celle-ci semble nécessiter une interaction entre l'environnement stromal du tissu et les cellules immunitaires et fait intervenir certains signaux moléculaires retrouvés lors de l'ontogénèse lymphoïde embryonnaire.

3. Les cellules stromales dans les organes lymphoïdes tertiaires

Suite à leur formation, les OLT matures semblent contenir un compartiment stromal fonctionnel et similaire à celui des ganglions lymphatiques. En effet, une expression élevée de chimiokines stromales (CCL19, CCL21), de la lymphotoxine et des gènes liés à la signalisation de l'IL-7 a été retrouvée dans les infiltrats cellulaires organisés présents dans les tissus synoviaux chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (**Timmer et al., 2007**). Les fibroblastes de ces OLT articulaires sont aussi capables de produire le facteur BAFF soutenant ainsi l'activité des LB (**Bombardieri et al., 2011**). De plus, les cellules de type fibroblastique s'organisent comme dans les ganglions lymphatiques, préférentiellement dans la zone occupée par les LT dans l'OLT et expriment la PDPN et CCL21 (**Manzo et al., 2007**). A l'opposé, un réseau de FDC est formé au sein des follicules B des OLT et contribuerait aux processus des centres germinatifs (**Bombardieri et al., 2007**). Krautler et collaborateurs ont montré que des cellules stromales périvasculaires exprimant le récepteur « platelet-derived growth factor receptor β » (PDGFR) ont la capacité de se différencier en FDC suite à une stimulation par la lymphotoxine et le TNF. Ces cellules pourraient être les précurseurs des FDC au sein des OLT (**Krautler et al., 2012**).

Concernant les cellules endothéliales, les OLT comportent également des BEC dont certaines présentent un phénotype de type HEV. Ces cellules sont localisées au niveau de la zone T des OLT et elles expriment les marqueurs spécifiques de ces vaisseaux, la chimiokine CCL21 et PNAd, suggérant que ces vaisseaux sanguins de type HEV participent à l'infiltration des cellules naïves au sein de ces structures (**Barone et al. 2005**). Bien que les OLT ne présentent ni capsule ni sinus sous-capsulaire, des vaisseaux lymphatiques sont aussi observés dans ces structures formées au cours de maladies auto-immunes ou de rejets de greffe. Bien qu'il n'y ait pas de preuve d'un réseau fonctionnel de vaisseaux lymphatiques au sein des OLT, certaines études suggèrent que ces derniers pourraient avoir un rôle similaire aux vaisseaux lymphatiques

afférents et efférents des ganglions lymphatiques. En effet, la présence d'un grand nombre de leucocytes au sein de vaisseaux lymphatiques observés sur des coupes histologiques et l'expression de CCL21 par les LEC laissent penser qu'ils joueraient un rôle dans la migration des cellules immunitaires dans les OLT (**Berrih-Aknin et al., 2009; Ruddle, 2014**). De plus, une étude a mis en évidence le processus d'expansion des vaisseaux lymphatiques dans les OLT formés dans les glandes salivaires chez un modèle murin du syndrome de Sjögren. Dans ce modèle murin, les OLT sont induits par l'injection d'un adénovirus dans les glandes salivaires et se résolvent après 30 jours post-injection. Dans un premier temps, l'augmentation du nombre de vaisseaux lymphatiques coïncide avec l'infiltration des lymphocytes au niveau de l'OLT et est dépendante de l'IL-7. Puis lors d'une deuxième phase, qui est associée avec la sortie des lymphocytes de l'OLT, c'est la lymphotoxine $\alpha 1\beta 2$ qui est indispensable à la prolifération des LEC de l'OLT. Cette étude suggère que la formation des vaisseaux lymphatiques dans les OLT est nécessaire pour permettre la sortie des lymphocytes pendant la phase de résolution de l'inflammation (**Nayar et al., 2016**). Cependant, une potentielle connexion des vaisseaux lymphatiques présents dans les OLT avec le réseau lymphatique préexistant reste encore à démontrer.

4. Le rôle des organes lymphoïdes tertiaires dans diverses pathologies

a. Les OLT lors d'infections

Dans le contexte d'infections bactériennes et virales, les réponses immunitaires qui se mettent en place ont pour but d'éliminer le plus rapidement le pathogène ou à défaut de limiter sa dissémination. Les OLT sont retrouvés dans plusieurs cas d'infections par des bactéries telles que *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, ou des virus comme celui de la grippe et de l'hépatite C (**Pitzalis et al., 2014**). Dans la majorité des cas, la formation d'OLT permet une meilleure élimination du pathogène. En effet, après une infection par le virus de la grippe, les souris développent des iBALT contenant des LB, des LT et des cellules dendritiques qui produisent les chimiokines CXCL12/13, CCL19/21 et la lymphotoxine assurant le maintien et l'organisation des OLT. Ces OLT présentent aussi des centres germinatifs contenant des LB des centres germinatifs spécifique des nucléoprotéines virales, suggérant une production locale d'Ac dirigés contre le virus. L'élimination des cellules dendritiques provoque la désintégration de l'OLT, une diminution des plasmocytes et un affaiblissement de la réponse antivirale (**GeurtsvanKessel et al., 2009**). Par ailleurs, il a récemment été montré que les IFN de type I produits en réponse à l'infection par le virus de la grippe induit l'expression de CXCL13 par

les fibroblastes des poumons, contribuant ainsi au recrutement des LB CXCR5⁺ et à la génération des centres germinatifs (**Denton et al., 2019b**). Les OLT jouent également un rôle favorable lors d'une infection par *Mycobacterium tuberculosis*. L'infection par cette bactérie provoque la formation d'un granulome qui s'organise en OLT. La production des chimiokines homéostatiques est essentielle pour la formation du granulome et l'organisation des lymphocytes en OLT. L'expression de CXCL13 assure le recrutement des LT CXCR5⁺ ce qui permet l'activation des macrophages et ainsi le contrôle de la prolifération des bactéries qui sont maintenues confinées dans les poumons (**Khader et al., 2009; Slight et al., 2013**).

b. Les OLT dans les cancers

Les OLT ont aussi été décrits dans plusieurs types de cancers tels que les tumeurs du poumon, du sein, du colon et de la peau. Cependant, tous les patients ne développent pas ces OLT et lorsqu'ils sont présents leur contribution au développement de la tumeur varie selon leur composition et le type de tumeur. L'une des premières descriptions d'OLT a été réalisée dans une étude incluant des patients ayant un cancer du poumon. Les OLT observés sont constitués de follicules B et de zones T contenant des cellules dendritiques. La densité de cellules dendritiques matures dans les OLT a été corrélée avec un pronostic favorable et une augmentation de la survie, suggérant que ces OLT contribueraient aux réponses anti-tumorales (**Dieu-Nosjean et al., 2008**). Il a été montré plus tard que la présence d'OLT, composés de ces cellules dendritiques matures, est associée à une forte infiltration de LT CD8⁺ dans la tumeur et une amélioration significative de la survie des patients par rapport à ceux présentant uniquement des LT CD8⁺ dans la tumeur mais pas d'OLT (**Goc et al., 2014**). Il a été suggéré que les LT naïfs arrivent au niveau de la tumeur et des OLT via des vaisseaux similaires aux HEV. Peske et collaborateurs ont montré dans des modèles murins de mélanome et de carcinome pulmonaire que les cellules T CD8 effectrices et les cellules « natural killer » (NK) infiltrant la tumeur permettent le développement d'un système vasculaire de type HEV, semblables à ceux observés dans les ganglions lymphatiques, via la sécrétion de la lymphotoxine et l'IFN γ . Ces vaisseaux assurent l'infiltration des LT naïfs, qui sont activés au sein de la tumeur par les cellules tumorales et les cellules présentatrices d'Ag, et induisent une diminution significative de la croissance de la tumeur (**Peske et al., 2015**).

Par ailleurs, chez les patientes atteintes de cancers ovariens, l'augmentation de l'infiltration de la tumeur par les LT CD8⁺ est associée à une forte proportion de plasmocytes produisant des IgG dans l'OLT, favorisant une réponse humorale locale (**Kroeger et al., 2016**). Ces

plasmocytes semblent être générés localement au niveau des OLT tumoraux. En effet, dans les cas de cancers du poumon, la présence de centres germinatifs ainsi que des processus d'hypermutation somatique et de commutation de classe ont été mis en évidence au sein des OLT et le nombre élevé de follicules B a pu être associé avec la production d'Ac dirigés contre la tumeur et est corrélé à un taux de survie plus important **(Germain et al., 2014)**. Dans les cas de cancer du poumon ou de l'ovaire, les OLT favoriseraient donc une réponse locale, cytotoxique et humorale, anti-tumorale.

Toutefois, la composition cellulaire des OLT associés aux tumeurs semble déterminer si ces structures sont favorables ou délétères pour la progression de la maladie. En effet, dans un modèle murin de mélanome, la sécrétion de la chimiokine CCL21 induit la formation d'un réseau réticulaire et le recrutement de LTreg. La création de cet environnement tumoral tolérogène conduit à la progression de la tumeur chez les souris **(Shields et al., 2010)**. Chez l'Homme aussi, la présence de ces cellules n'est pas favorable aux réponses immunitaires anti-tumorales. Dans les cas de tumeurs primaires du sein, un risque accru de rechute et de décès est associé à un nombre élevé de LTreg Foxp3⁺ au sein des agrégats lymphoïdes entourant la tumeur. En effet, ces derniers sont recrutés au sein des OLT puis activés par les cellules dendritiques matures ce qui empêche l'activation de LT effecteurs et favorisent l'évasion et la progression tumorale **(Gobert et al., 2009)**. Ces études démontrent que les OLT associés aux tumeurs facilitent parfois une immunosuppression plutôt qu'une activation immunitaire.

La contribution des OLT associés aux tumeurs dépend aussi du type et du stade du cancer. Dans les cas de cancers du foie, une plus forte proportion d'agrégats lymphoïdes est observée dans les biopsies de cancer hépatique de stade avancé dont la survie des patients était inférieure à 5 ans par rapport aux résections de tumeurs de stade précoce. Ces OLT sont localisés à l'extérieur de la tumeur ce qui suggère qu'ils se forment suite à l'invasion tumorale **(Bento et al., 2015)**. Une autre étude a corrélé le nombre élevé d'OLT présents dans les cas de carcinome hépatocellulaire avec un risque élevé de récurrence et une diminution de la survie après l'ablation de la tumeur. De plus, dans un modèle murin de ce type de cancer, les OLT constitueraient un environnement propice au développement de progéniteurs hépatiques cancérogènes en produisant des cytokines de croissance telles que la lymphotoxine. Ainsi le blocage du récepteur de la lymphotoxine diminue le nombre de progéniteurs cancérogènes, empêche leur sortie de l'OLT et limite la croissance de la tumeur **(Finkin et al., 2015)**. Par ailleurs, la présence d'OLT dans les tumeurs du sein a aussi été associée à un grade tumoral plus élevé, une forte infiltration de cellules immunitaires au sein de la tumeur et à une fréquence élevée de métastases **(Figenschau et al., 2015)**.

En résumé, les OLT dans le cancer sont des structures fonctionnelles qui peuvent dans certaines situations, telles que les cancers du poumon, favoriser une réponse immunitaire anti-tumorale locale. Cependant dans certains contextes, comme le cancer du sein, ces OLT participent directement à la survie des cellules tumorales. La composition cellulaire et moléculaire des OLT ainsi que le moment de formation de ces structures semblent déterminer le devenir favorable ou non du développement de la tumeur.

c. Les OLT et les maladies auto-immunes

Dans le contexte des maladies auto-immunes, des OLT ont été décrits dans les organes cibles de la maladie, tels que les glandes salivaires dans la maladie du syndrome de Sjögren, le tissu synovial dans le contexte de la polyarthrite rhumatoïde, les reins lors de la pathologie lupique, les méninges dans la sclérose en plaque, ou la thyroïde dans la maladie d'Hashimoto. Toutefois, la présence des OLT est fortement variable selon la pathologie considérée, ils sont retrouvés chez quasiment la totalité des patients atteints de thyroïdites auto-immunes **(Armengol et al., 2001)** alors qu'ils sont présents chez une faible proportion de patients souffrant de myosites **(Salajegheh et al., 2010)**. Contrairement à leur rôle généralement bénéfique dans les infections et les cancers, les OLT dans les maladies inflammatoires chroniques sont principalement associés à une exacerbation de la maladie.

La première pathologie dans laquelle des structures lymphoïdes organisées ont été décrites est la polyarthrite rhumatoïde (Schröder et al., 1996). Chez les patients, ces OLT se forment principalement au niveau du tissu synovial et participent directement à la destruction du cartilage ainsi que de l'os en favorisant l'ostéoclastogénèse, mais ils sont aussi observables dans les poumons et la moelle osseuse **(Bugatti et al., 2005; Rangel-Moreno et al., 2006)**. Ces OLT sont caractérisés par la formation de clusters de LT et de LB autour des vaisseaux sanguins et en fonction du nombre de « couches » cellulaires autour du vaisseau central, un score allant du grade 1 à 3 peut être déterminé. Ces OLT sont retrouvés chez environ 40 % des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde mais leur implication dans la sévérité de la maladie reste controversée **(Takemura et al., 2001)**. Certaines études ont montré une association entre les OLT et une augmentation des taux de cytokines inflammatoires, de chimiokines homéostatiques (CXCL13) et d'auto-Ac (anti-peptides citrullinés) avec une plus forte érosion **(Bugatti et al., 2014; Xu et al., 2009)**. Cependant d'autres études n'ont pas mis en évidence de corrélation directe entre la présence d'OLT et le score d'activité de la maladie ou le niveau d'auto-Ac **(Thurlings et al., 2008)**. Ces résultats divergents pourraient résulter d'une différence

de définition des OLT, de la taille des cohortes, de la durée de la maladie ou des traitements des patients.

Une autre pathologie auto-immune dans laquelle les OLT ont été mis en évidence est le syndrome de Sjögren. Ces OLT se forment autour des canaux excréteurs des glandes salivaires et sont composés de LT et LB séparés en deux zones, de réseaux de FDC, de centres germinatifs et de plasmocytes (**Barone et al. 2005**). Ils sont associés à un taux élevé d'auto-Ac circulants caractéristiques de la maladie (tels que les Ac anti-SSA) et diverses manifestations systémiques comme la lymphadénopathie (**Risselada et al., 2013**). De plus, la présence d'OLT dans les glandes salivaires des patients atteints d'un syndrome de Sjögren primaire est associée à un risque 16 fois plus élevé de développer un lymphome (**Theander et al., 2011**).

Dans les cas de myosites, les OLT ont été observés chez 20 % des jeunes patients alors qu'une minorité est retrouvée chez les patients adultes. Bien que ces OLT ne contiennent pas de centres germinatifs ni de FDC, ils présentent des signes d'une réponse humorale locale au sein de ces OLT, tels que la présence de divers clones de LB (**Salajegheh et al., 2010**). Plusieurs études ont montré que les OLT favorisent la différenciation des LB en plasmocytes et la génération d'auto-Ac de forte affinité à proximité de leur cible. Les cellules B isolées des OLT des glandes salivaires ou du tissu synovial ont permis de mettre en évidence l'existence de mécanismes d'hypermutation somatique indiquant que les processus de maturation d'affinité ont pu se mettre en place localement (**Scheel et al., 2011; Stott et al., 1998**). De plus, Humby et collaborateurs ont mis en évidence l'expression locale de l'enzyme AID et la production d'auto-Ac reconnaissant des peptides citrullinés au sein des OLT dans le contexte de la polyarthrite rhumatoïde. Les plasmocytes présents dans les OLT greffés chez des souris humanisées continuent à produire, indépendamment de l'entrée de LB dans l'OLT, des auto-Ac anti-peptides citrullinés qui seront retrouvés dans la circulation sanguine des souris et (**Humby et al., 2009**). Chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, l'analyse du liquide synovial a montré que plus de 30 % des Ac produits par les clones de LB issus des OLT sont dirigés contre des peptides citrullinés (**Corsiero et al., 2016**). Des résultats similaires ont été observés dans les OLT se développant dans les glandes salivaires de patients atteints du syndrome de Sjögren. L'expression de l'enzyme AID ainsi que les cellules FDC ont été mises en évidence dans les tissus salivaires présentant des OLT, suggérant que ces structures supportent la maturation des LB et la production locale d'auto-Ac (**Bombardieri et al., 2007**). De plus, on retrouve, dans les OLT formés dans les glandes salivaires d'un modèle murin inductible de Sjögren, des centres germinatifs, l'expression de AID, des chimiokines nécessaires à l'organisation

lymphoïde et la production d'Ac. En conséquence, cette inflammation locale contribue à une réduction du flux salivaire et à un dysfonctionnement de l'organe (**Bombardieri et al., 2012**).

d. Les OLT dans le contexte de la pathologie du lupus

Dans le LED, le dépôt d'auto-Ac ou de complexes immuns et l'infiltration de cellules immunitaires conduit au développement d'une néphrite. De façon similaire aux autres maladies auto-immunes, l'inflammation chronique au cours du LED peut induire la formation d'infiltrats immunitaires organisés dans les reins. L'infiltration de leucocytes n'est pas seulement observée dans le compartiment glomérulaire du rein mais aussi au niveau de la zone tubulo-interstitielle (**Yu et al., 2017**). Chez l'Homme, ces OLT rénaux ont été mis en évidence par une première étude en 2011 (**Chang et al., 2011**). Des agrégats de LT et LB organisés ont été observés chez plus de la moitié des patients atteints de néphrite lupique alors que la présence de centres germinatifs avec un réseau de FDC n'a été observé que chez une petite proportion des patients. Toutefois, ces deux formes d'organisation lymphocytaire étaient associées à une expansion clonale des cellules B et à une hypermutation somatique, suggérant la présence de centres germinatifs fonctionnels. Plus tard, ce même groupe a révélé grâce à des techniques d'imagerie avancées, la présence de LTFH qui interagissent directement avec des LB dans les OLT rénaux des patients atteints de lupus (**Liarski et al., 2014**). De plus, le facteur de survie et de différenciation des LB, BAFF, est également exprimé dans ces infiltrats leucocytaires chez les patients lupiques présentant une atteinte rénale (**Neusser et al., 2011**).

Dans le cadre du lupus chez la souris, la présence d'OLT a été initialement décrite chez un modèle murin induit par l'injection intrapéritonéale de pristane (**Nacionales et al., 2009**). Ces OLT formés dans le péritoine des souris sont aussi appelés lipogranulomes et ils présentent plusieurs caractéristiques fonctionnelles des OLS telles que l'expression de l'enzyme AID, des signes de commutation de classe et la production d'auto-Ac anti-Sm/RNP. Dans un autre modèle murin du lupus, les souris NZB/W développant spontanément des signes de la pathologie lupique, notre laboratoire a montré, pour la première fois en 2010, la présence de plasmocytes sécrétant des auto-Ac dans les reins (**Lacotte et al., 2010**). Ceci a été confirmé chez la souris et chez l'Homme où l'augmentation du nombre de plasmocytes dans les reins des patients lupiques est corrélée avec une atteinte rénale sévère (Espeli et al., 2011; Starke et al., 2011). La présence de ces plasmocytes peut résulter d'une migration dans les reins en réponse à l'inflammation et/ou par une différenciation au sein d'OLT. Au laboratoire, il a été montré que la présence d'une partie des plasmocytes, au niveau des reins des souris NZB/W, résulte de

l'expression à leur surface du récepteur CXCR3 et des ligands correspondants CXCL9, 10 et 11 dans les reins des souris malades (**Lacotte et al., 2013**). Toutefois, la migration possible de ces cellules dans les reins n'exclut pas une différenciation locale des LB en plasmocytes au sein de centres germinatifs. En effet, l'équipe a récemment mis en évidence, dans les reins des souris NZB/W, des OLT avec des centres germinatifs fonctionnels comprenant des LTFH, l'expression de l'enzyme AID et des LB capables de se différencier en cellules B produisant des auto-Ac anti-chromatine (**Publication N°1**).

L'ensemble de ces études suggèrent donc que les OLT qui se forment dans les reins au cours du lupus, sont impliqués dans l'altération des fonctions rénales et dans la production locale d'(auto)-Ac chez le modèle murin spontané NZB/W et chez l'Homme.

D. Hypothèses et objectifs de l'étude

Tel que précédemment décrit (cf. *Introduction A. Le Lupus Erythémateux Disséminé*), le LED est une maladie auto-immune caractérisée par une activation anormale du système immunitaire conduisant à la production d'auto-Ac et à des lésions tissulaires, dont la glomérulonéphrite lupique. Cette atteinte rénale est causée par le dépôt d'auto-Ac ou de complexes immuns, et l'infiltration de cellules immunitaires. Dans ce contexte, un défaut de la régulation des réponses immunitaires adaptatives peut contribuer à la survenue et au développement de la maladie. Celles-ci s'opèrent dans les OLS constitués majoritairement de leucocytes et d'un réseau de cellules stromales non-hématopoïétiques ayant un rôle essentiel dans la régulation des cellules immunitaires (cf. *Introduction B. Le compartiment stromal des ganglions lymphatiques*). De récentes études basées sur des analyses transcriptomiques ont identifié des signatures moléculaires spécifiques pour chaque sous-population de cellules stromales dans les ganglions lymphatiques, dans des conditions basales et inflammatoires, mettant en évidence le rôle dynamique de ce compartiment en réponse aux changements de l'environnement immunitaire (**Gregory et al., 2017; Malhotra et al., 2012; Berendam et al., 2019**). Cependant, l'implication de ces cellules non hématopoïétiques des ganglions lymphatiques dans le développement des maladies auto-immunes, et plus particulièrement dans le LED, est encore peu étudiée.

Par ailleurs, au cours d'inflammations chroniques, la persistance locale d'Ag ainsi que l'infiltration de cellules immunitaires au sein d'organes non lymphoïdes, tels que le rein, peuvent entraîner la formation de structures lymphoïdes ectopiques ressemblant aux OLS qui ont été appelées : organes lymphoïdes tertiaires (OLT). Ces OLT, décrit dans le chapitre précédent, présentent plusieurs similitudes avec les OLS, dont certains éléments du compartiment stromal. Ils ont été observés dans des cas d'infections, de rejet de greffe, de cancer et de maladies auto-immunes. Selon les pathologies considérées, la présence de ces OLT amplifiant la réponse immunitaire locale peut avoir un effet bénéfique, par exemple en éliminant plus rapidement le pathogène (**Khader et al. 2009; Slight et al. 2013**) ou au contraire un effet délétère en exacerbant les réponses pathologiques locales, comme dans la polyarthrite rhumatoïde (**Bugatti et al., 2005**). Dans le lupus, la présence d'infiltrats leucocytaires dans les reins de patients lupiques, dont certains sont organisés en zones de LT et de LB avec des centres germinatifs comportant des LTFH et des FDC, ont été décrits pour la première fois en 2011 (**Chang et al., 2011**). Au laboratoire, avant mon arrivée, l'équipe avait mis en évidence la présence de plasmocytes sécrétant des auto-Ac dans les reins du modèle murin spontané de

lupus : les souris NZB/W (**Lacotte et al., 2010, 2013**). Par la suite, dans la **Publication N°1**, à laquelle j'ai contribué, l'équipe a décrit et démontré la présence d'OLT comprenant des centres germinatifs fonctionnels dans les reins de souris lupiques NZB/W présentant une atteinte rénale. Ainsi, en nous basant sur la littérature et nos résultats, nous avons émis l'hypothèse que le stroma pourrait être un facteur clé dans la régulation de la réponse auto-immune tant au niveau des ganglions lymphatiques que dans les OLT. Une meilleure compréhension du microenvironnement régulant les leucocytes lors d'une réponse auto-immune pourrait nous permettre d'envisager des perspectives intéressantes d'immuno-régulation au cours du lupus, et c'est dans cet objectif que se situe mon projet de thèse.

Les objectifs de mon travail de thèse ont été les suivants :

- 1) Déterminer le profil phénotypique et fonctionnel des cellules stromales des ganglions lymphatiques dans la pathologie lupique

Chapitre 1 : Plasticité du compartiment stromal des ganglions lymphatiques chez la souris lupique NZB/W

- 2) Caractériser le compartiment stromal au sein d'organes lymphoïdes tertiaires dans les modèles murins de lupus spontané (NZB/W) et induit au pristane

Chapitre 2 : Étude du compartiment stromal au sein des organes lymphoïdes tertiaires

Matériels et méthodes

A. Les modèles murins

Les souris femelles de lignée BALB-c/Byj (BALB/c), C57BL6/J (Charles River Laboratoire, France), NZB x NZW F1 (NZB/W) et les souris mâles de lignée NZW (Jackson Laboratory, Bar Harbor, États-Unis) ont été hébergées dans les animaleries de l'IBMC (#G67-482-2) et transitoirement au Centre de Neurochimie à Strasbourg (#A67-2018-38). Les souris BALB/c x NZW (BALB/W) F1 femelles ont été générées par croisement et hébergées dans ces deux animaleries. Les souris NZB/W et BALB/W utilisées pour les expériences de séquençage ARN ont été hébergées en portoirs ventilés au Centre de Neurochimie. Les souris NZB/W et BALB/W âgées de 11 à 13 semaines constituent le groupe de souris jeunes et le groupe des souris âgées est constitué de souris de 27 à 48 semaines. L'étude du modèle murin de lupus induit au pristane a été menée chez des souris femelles de lignée BALB/c (abrégées BALB/c pristane), âgées de 10 à 21 semaines, ayant reçu une injection intra-péritonéale de 0,5 mL de pristane (2,6,10,14-Tetraméthylpentadécane) (Sigma-Aldrich, St. Louis, États-Unis). Les souris femelles BALB/c contrôles d'âge correspondant n'ont pas été injectées. L'épaisseur des chevilles postérieures droite et gauche des souris a été mesurée de 3 à 5 mois post-injection à l'aide d'un pied à coulisse Absolute Digimatic Caliper (Mitutoyo, Kawasaki, Japon). L'atteinte rénale des souris NZB/W et BALB/c pristane a été évaluée par une mesure semi-quantitative de la protéinurie sur un prélèvement d'urine fraîche à l'aide de bandelettes réactives Albustix (Bayer Diagnostics, Basingstoke, Angleterre). Les souris NZB/W âgées ont été considérées malades à partir d'un score de protéinurie égale ou supérieur à 3. Toutes les expériences ont été réalisées en conformité avec la législation européenne de bioéthique animale 2010/63/UE (décret français #2013-118 - 1er février 2013) et ont été approuvées par le Comité Régional d'Éthique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg (CREMEAS) et validées par le Ministère français de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (APAFIS#20653-2019051418226131 et APAFIS#18474-2019010916454316).

B. Digestion enzymatique et isolement des cellules stromales

Le protocole de digestion enzymatique des ganglions lymphatiques murins a été adapté à partir d'un protocole décrit par (Fletcher et al., 2011) pour un isolement optimal des cellules stromales de ganglions lymphatiques. Les ganglions lymphatiques rénaux, mésentériques (l'ensemble de la chaîne ganglionnaire) et cutanés (axillaires, brachiaux et inguinaux) ont été prélevés chez 2 à 6 souris, regroupés par type ganglion et par lignée de souris de même âge puis dilacérés à sec à l'aide d'une lame de scalpel. Les fragments obtenus ont été digérés dans 1 mL

de milieu de digestion fraîchement préparé (milieu de culture RPMI 1640 (Corning, Manassas, États-Unis) 2 % sérum de veau fœtal (SVF) (Dutscher, Brumath, France) additionné de collagénase D (1 mg/mL, Roche, Mannheim, Allemagne) ; DNase I (1 mg/mL, Roche) ; Dispase II (0,1 mg/mL, Roche) pendant 20 min, à 37 °C en effectuant des inversions manuelles à 5 min d'intervalle. Après 20 min, la suspension de ganglion lymphatique a été mélangée par un pipetage doux, afin de dissocier la capsule et libérer les leucocytes et les cellules stromales. Après 30 secondes lorsque les fragments de ganglions non digérés se sont déposés dans le fond du tube, le surnageant a été récupéré, additionné de tampon FACS (« Phosphate Buffered Saline ») (PBS) (Corning), 2 % SVF, 5 mM Ethylène Diamine Tétracétique (EDTA)) et centrifugé pendant 4 min à 300 G. Puis, 1 mL de milieu de digestion frais a été ajouté aux fragments restants dans le tube et la suspension a été incubée à 37 °C pendant 10 min sans agitation et mélangée doucement à la pipette après 5 min d'incubation. A l'issue des 10 min, les cellules ont été vigoureusement mélangées à la pipette, puis à nouveau après dépôt des fragments non digérés au fond du tube, le surnageant a été prélevé, ajouté au culot cellulaire précédemment obtenu, additionné de tampon FACS et centrifugé 4 min à 300 G. Une dernière étape de digestion a été effectuée pendant 10 min à 37 °C après ajout d'1 mL de milieu de digestion frais. A l'issue de la digestion enzymatique, tous les ganglions lymphatiques ont été complètement digérés et les cellules ont été filtrées sur un tamis de maillage 100 µm puis comptées. A ce stade une petite proportion des suspensions cellulaires obtenues a été gardée sur la glace et dans du tampon FACS afin de déterminer, par la suite, le nombre absolu de cellules stromales par cytométrie en flux.

Le protocole d'isolement des cellules stromales des OLT rénaux a été adapté à partir d'un protocole de digestion des glandes salivaires décrit dans les études du Dr Francesca BARONE (**Barone et al., 2015**). Les reins ont été finement coupés puis digérés dans du milieu de digestion RPMI 1640 (Corning) 2 % SVF (Dutscher) additionné de collagénase D (3,7 mg/mL, Roche) et de DNase I (30 µg/mL, Roche) pendant 45 min à 37 °C sous agitation douce et pipetage toutes les 15 min. Puis les fragments restants ont ensuite été digérés dans du milieu de digestion additionné de collagénase D (3,7 mg/mL, Roche), de DNase I (30 µg/mL, Roche) et Dispase II (3,7 mg/mL, Roche) pendant 15 min sous agitation douce à 37 °C. Pour stopper la digestion, l'EDTA a été ajouté à une concentration finale de 5 mM, puis les cellules ont été passées à travers un tamis de maillage de 70 µm.

Les suspensions cellulaires obtenues à partir des ganglions lymphatiques et des reins ont été enrichies en cellules stromales par un tri magnétique négatif éliminant les cellules hématopoïétiques et des érythrocytes. Le tri a été réalisé avec des microbilles anti-CD45 et anti-

Ter-119 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne) dans du tampon MACS (PBS 0,5 % SVF, 2 mM EDTA) sur des colonnes MACS LD (Miltenyi Biotec) selon les instructions recommandées par le fabricant.

Les lipogranulomes prélevés chez chaque souris BALB/c pristane ont été digérés selon le protocole de digestion enzymatique utilisé pour les ganglions lymphatiques. Les débris pouvant rester suite à la digestion ont été retenus sur le tamis de maillage 100 µm. Les suspensions cellulaires n'ont pas été enrichies par un tri magnétique avant leur analyse par cytométrie en flux.

C. Cytométrie en flux

Les cellules isolées des divers tissus (ganglions lymphatiques, reins et lipogranulomes) ont été marquées en surface avec des Ac monoclonaux fluorescents, tel que résumé dans le **Tableau 1**. Les données ont été acquises par cytométrie en flux (Gallios, Beckman Coulter, Fullerton, États-Unis) et ont été analysées à l'aide du logiciel FlowJo V7.6.5 (Tree Star, Ashland, États-Unis). Le nombre absolu de cellules hématopoïétiques et de cellules stromales des ganglions lymphatiques a été calculé à l'aide de billes de numération (BioLegend, San Diego, États-Unis) selon les recommandations du fabricant. Pour les analyses de séquençage ARN et de qPCR, les cellules stromales isolées ont été marquées par les Ac suivants : anti-CD45, anti-Ter-119, anti-CD31 et anti-PDPN (**Tableau 1**) puis triées par cytométrie en flux (FACSaria™ Fusion, BD Biosciences, San Jose, États-Unis) à la plateforme de cytométrie de l'Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) à Illkirch.

D. Expériences allogéniques

Les ganglions lymphatiques d'une souris femelle C57BL/6 ont été dilacérés, broyés sur un tamis de maillage 100 µm. La suspension cellulaire obtenue a été enrichie en LT CD4⁺ avec le kit d'isolation des cellules T CD4 (Biolegend) selon les recommandations du fabricant, puis les LT CD4⁺ ont été marqués par un marqueur de prolifération (« Cell Trace Violet », Fisher Scientific, Waltham, États-Unis). Les cellules stromales isolées des ganglions lymphatiques rénaux de 2 à 3 souris NZB/W âgées et malades ou de 6 souris BALB/W âgées ont été déposées dans une plaque 96 puits à fond rond à 15000 cellules/puits avec 75000 LT CD4⁺ (soit un ratio de 1 pour 5). Les cellules ont été mises en culture à 37 °C dans du milieu complet RPMI 1640 contenant 10 % (v/v) de SVF, 10 µg/mL de gentamycine (Pan-Biotech, Aidenbach, Allemagne),

10 mM d'HEPES (Lonza biowhittaker, Bâle, Suisse), 0,05 mM de β -mercaptoéthanol (Gibco), de l'IL-2 recombinante de souris (50 U/ml) (R&D Systems, Minneapolis, Etats-Unis) et 5 μ g/ml d'Ac anti-CD28 (clone 37.51, BD PharMingen). La prolifération des LT CD4⁺ a été évaluée après 5 jours par cytométrie en flux.

E. Séquençage ARN

Les étapes d'extraction d'ARN, de préparation de la librairie, de séquençage et d'analyses statistiques ont été effectuées par la plateforme GenomEast - IGBMC (Illkirch, France).

Extraction d'ARN, construction de la librairie et séquençage :

Les ADNc ont été générés directement à partir de 800 LEC, 1000 FRC et 1500 BEC triées et congelées (dans du tampon PBS contenant un inhibiteur de RNAses 1 U/ μ l ; Ribolock, Thermo Fisher Scientific) pour les 66 échantillons en utilisant le kit pour séquençage Clontech SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA (Takara Bio Europe, Saint Germain en Laye, France), selon les instructions du fabricant, avec 13 cycles de PCR pour l'amplification de l'ADNc par la polymérase Seq-Amp. La tagmentation a été réalisée à partir de 600pg d'ADNc pré-amplifié à l'aide de la transposase Tn5 et du kit de préparation de librairie d'ADN Nextera XT (96 échantillons) (Illumina, San Diego, États-Unis), selon les instructions du fabricant, puis la librairie a été amplifiée par 12 cycles de PCR. Après purification avec des billes AMPure XP d'Agencourt (Beckman-Coulter, Villepinte, France), la taille et la concentration des banques ont été évaluées par électrophorèse capillaire. Les librairies ont été séquencées à l'aide de la technologie Hiseq 4000 d'Illumina en lectures simples (single read) de 50 paires de bases.

Prétraitement, cartographie, quantification et analyse de l'expression différentielle des gènes :

Les fragments séquencés ont été prétraités afin de supprimer les séquences de faible qualité (score de qualité Phred inférieur à 20), les séquences d'adaptateurs et les séquences polyA puis les fragments inférieurs à 40 bases ont été rejetés. Ces étapes de prétraitement ont été effectuées à l'aide de cutadapt (V.1.10). Les fragments qui ont été mis en correspondance avec des séquences d'ARNr en utilisant bowtie (V.2.2.8) ont été supprimés des analyses suivantes. Les fragments séquencés et prétraités ont été cartographiés sur l'assemblage mm10 du génome de *Mus musculus* en utilisant STAR (V.2.5.3a) et le nombre de fragments a été normalisé en utilisant la méthode décrite par Anders *et al.*, (**Anders and Huber, 2010**). La quantification de l'expression génétique a été réalisée à partir de fragments alignés de manière unique en utilisant HTSeq-count (0.6.1p1) avec des annotations de la version 98 d'Ensembl et du mode "union". Seuls les fragments attribués sans ambiguïté ont été retenus dans les analyses. Les comparaisons

d'intérêt ont été effectués à l'aide du test d'expression différentielle Wald, proposé par Love *et al.*, (Love et al., 2014) et implémenté dans Bioconductor package DESeq2 (V.1.16.1). Les valeurs P ont été ajustées pour les tests multiples en utilisant la méthode de Benjamini et Hochberg (Benjamini and Hochberg, 1995). Les analyses ont été limitées aux gènes présentant une valeur p ajustée < 0,05 et une valeur absolue du facteur d'induction en log2 supérieure à 1.

Analyse des gènes différentiellement exprimés :

Les cartes de fréquentation ont été réalisées pour les gènes statistiquement différentiellement exprimés à l'aide du logiciel Morpheus. L'analyse de l'ontologie génétique (« Gene Ontology » GO) a été réalisée avec le logiciel Metascape à partir des listes de gènes retrouvés différentiellement exprimés dans les FRC, BEC et LEC de souris NZB/W malades et âgées par rapport à leurs homologues chez les souris NZB/W jeunes (Figure 26E). Tous les gènes du génome de la souris (*Mus musculus*) ont été utilisés comme base. Les seuils pour l'enrichissement des termes GO ont été fixés pour une valeur de p inférieure à 0,01, un nombre minimum de 3 et un facteur d'enrichissement supérieur à 1,5. Les analyses ont été effectuées par rapport aux termes GO des processus biologiques.

F. Extraction d'ARN et transcription inverse

L'ARN total a été extrait à partir des cellules stromales triées de ganglions lymphatiques en utilisant le kit RNeasy micro (Qiagen Germantown, Etats-Unis) selon les instructions du fabricant. L'ADNc a été synthétisé par extension de l'oligo (dT) avec la transcriptase inverse Maxima First Strand cDNA synthesis kit (Thermo Fischer Scientific).

G. qPCR

L'ADNc a été pré-amplifié avec le kit SsoAdvanced PreAmp supermix (Bio-Rad, Hercules, États-Unis) selon les recommandations du fabricant et avec les amorces suivantes (Eurogentec, Liège, Belgique) en utilisant le Thermocycleur T100 (Bio-Rad): pour l'« Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1 » (HPRT) sens 5'- AGTCCCAGCGTCGTGATTAG-3' et anti-sens 5'- TGATGGCCTCCCATCTCCTT-3' ; pour l'actine-β sens 5'- CACTGTCGAGTCGCGTCCA-3' et anti-sens 5'-CATCCATGGCGAACTGGGTGG-3' ; pour l'IL-7 sens 5'- CGATGAATTGGACAAAATGACAGG-3' et anti-sens 5'- AACTTGCGAGCAGCACGATTTAG-3' ; puis pour CD86 sens 5'- GCACGGACTTGAACAACCAG-3' et anti-sens 5'-CTCCACGGAAACAGCATCTGA-3'.

Les réactions de qPCR ont été réalisées à partir de l'ADNc pré-amplifié dans un volume total de 10µl en présence de RT² SYBR Green ROX qPCR Mastermix (Qiagen) en utilisant un thermocycleur StepOnePlus (Applied Biosystems, Carlsbad, Etats-Unis). La quantité relative de chaque transcrit a été normalisée par rapport à la moyenne d'expression de deux gènes de ménage : HPRT et β-actine. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel StepOnePlus™ Software et la méthode $\Delta\Delta CT$ a été utilisée pour calculer les ratios d'expression.

H. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) : dosage des auto-anticorps dans les sérums du modèle murin de lupus induit

Les sérums ont été obtenus à partir d'un prélèvement sanguin sous-mandibulaire de 150-200 µL effectué chaque mois à partir de 3 mois post-injection. L'ADNdb (Sigma-Aldrich, 100 ng/ml dans 25 mM de tampon citrate, pH 5.4) ou de la chromatine murine (en concentration d'ADN à 1 µg/mL dans du tampon PBS préparée au laboratoire telle que décrit (Lacotte et al., 2010)) ont été adsorbés, une nuit à 37 °C, dans des plaques en polystyrene à fond plat (MaxiSorb NUNC-IMMUNO, Thermo Fisher Scientific). Les sérums dilués au 1/500 dans du PBS-Tween à 1 % « Bovine Serum Albumin » (BSA) ont été déposés dans les puits pendant 2h. Les Ac secondaires de chèvre anti-IgM (1:20 000 ; PBS-0.05 % Tween-0.5 % BSA) ou les Ac anti-IgG (Fcγ spécifique) supplémentés d'Ac anti-IgG₃ de souris (1:20 000 et 1:10 000) (Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, Royaume-Uni) couplés à la HorseRadish Peroxydase (HRP) ont été ajoutés dans les puits pendant 30 min. La détection des auto-Ac anti-ADNdb ou chromatine a été réalisée par mesure de l'absorbance du substrat (3,3',5,5'-tetramethyl benzidine, Sigma-Aldrich) à 450 nm grâce à un lecteur de plaques (Varioskan LUX, Thermo Fischer Scientific) et les données ont été recueillies par le logiciel Skanlt Software for microplate (V.6.0.2.3).

I. Expériences d'endocytose d'auto-Ag

Les cellules stromales ont été isolées, tel que décrit, à partir ganglions lymphatiques rénaux, mésentériques et cutanés de souris NZB/W et de souris BALB/c âgées de 27 à 48 semaines. Pour l'observation des cellules par microscopie confocale, les cellules stromales ont été déposées dans une chambre de culture sur lame Lab-Tek (Sigma) et incubées, pendant 6h à 37 °C, 5 % CO₂ et 80 % d'humidité, en milieu RPMI complet en présence de nucléosomes marqués par un fluorochrome (Alexafluor-488) (2 µg/ml) produit au laboratoire (Gies et al.,

2017). Les cellules ont été marquées avec les Ac suivants : anti-CD31 et anti-PDPN puis fixées avec du paraformaldéhyde à 4 % et colorées avec du 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (100 ng/ml, Sigma) et montées avec un milieu de montage fluorescent (DAKO, Glostrup, Danemark). Pour les analyses au cours du temps par microscopie confocale les cellules ont été déposées sur une lamelle compartimentée Lab-Tek (Thermo Fischer Scientific) en présence de nucléosomes-AF488 (2 µg/ml) et une image a été acquise toutes les 5 min pendant 18 h en condition optimale de culture. Puis les cellules ont été récupérées, marquées avec les Ac anti-CD31, anti-PDPN, anti-CD45, puis analysées par cytométrie en flux.

J. Histologie et quantification de l'aire des ganglions lymphatiques

Les reins, les ganglions lymphatiques et les lipogranulomes ont été congelés dans du Tissue-Tek® O.C.T (Sakura, Alphen aan den Rijn, Pays-Bas) et des coupes 7 µm ont été effectuées. Les coupes ont été montées sur des lames de verre SuperFrost™ Plus (Thermo Scientific, Waltham, USA), fixées dans de l'acétone froide pendant 20 min, séchées à l'air et lavées dans du tampon PBS. Pour les coupes de reins, la liaison des Ac non spécifiques a été évitée à l'aide du Blocking Reagent™ (Perkin Elmer, Waltham, USA). La saturation des coupes de ganglions lymphatiques et des lipogranulomes a été réalisée dans une solution de PBS 2 % BSA à température ambiante pendant 30 min. Les coupes ont ensuite été incubées pendant une nuit à 4 °C avec les Ac spécifiques et, si nécessaire, avec des Ac secondaires pendant 2 heures à température ambiante (**Tableau 1**). Après fixation avec du paraformaldéhyde à 4 % pendant 20 min, les lames ont ensuite été colorées avec du DAPI (100 ng/ml, Sigma) pendant 10 min à température ambiante et montées avec un milieu de montage fluorescent (DAKO, Glostrup, Danemark). La quantification de l'aire des ganglions lymphatiques et des vaisseaux a été réalisée à partir de 3 coupes non consécutives chez 2 à 4 souris NZB/W âgées, jeunes et BALB/W âgées. L'aire des ganglions lymphatiques ainsi que des vaisseaux a été calculée à l'aide du logiciel Fiji (ImageJ) et est exprimée en pixels. Les régions d'intérêts, c'est-à-dire les vaisseaux sanguins (BEC : CD31⁺ Lyve1⁻) et lymphatiques (LEC : Lyve1⁺) ont été identifiées et délimitées à l'aide d'une segmentation par seuillage. Les images ont toutes été réalisées au même grossissement (200 x) et avec les mêmes réglages d'intensité.

K. Microscopie

Les images ont été observées en microscopie à épifluorescence (Axio Observer Z1, Carl Zeiss) ou en microscopie confocale (LSM 780, Carl Zeiss), et l'acquisition a été réalisée grâce aux logiciels Metamorph et Zen (Carl Zeiss). La reconstitution de coupes entières de ganglions lymphatiques rénaux a été réalisée grâce au logiciel Metamorph. Le traitement des images des coupes de ganglions lymphatiques a été réalisée à l'aide du logiciel Fiji (ImageJ). La représentation en 3 dimensions des images des cellules stromales a été réalisée à l'aide du logiciel Imaris.

L. Analyses statistiques

Les données sont indiquées en moyenne \pm SEM et l'analyse statistique a été effectuée à l'aide d'un test U de Mann-Whitney ou d'un test t multiple corrigé selon la méthode de Sidak-Bonferroni (Prism version 6.0 ; logiciel GraphPad). L'analyse statistique pour l'analyse de l'expression génique différentielle a été réalisée à l'aide du test d'expression différentielle Wald. La significativité est indiquée comme suit dans les figures : ****p < 0,0001 ; ***p < 0,001 ; **p < 0,01 ; *p < 0,05 ; et ns, non significatif (p > 0,05).

Tableau 1 Liste des anticorps utilisés

Anticorps (clone)	Fabricant	Utilisation
Rat anti souris-CD31 AF488 (IgG2a ; 390)	Biolegend	Cytométrie
Rat anti-souris CD31 PE (IgG2a ; 390)	Biolegend	Cytométrie
Hamster syrien anti-souris PDPN PE-cy7 (IgG ; 8.1.1)	Biolegend	Cytométrie
Rat anti-souris CD45 APC-Cy7 (IgG2bk ; 30F11)	Biolegend	Cytométrie
Rat anti-souris Ter119 APC-eFluor780 (IgG2b ; TER-119)	eBiosciences	Cytométrie
Rat anti-souris I-A/I-E APC (IgG2b ; M5/114.15.2)	Biolegend	Cytométrie
Rat anti-souris CD86 PE (IgG2a ; GL1)	Biolegend	Cytométrie
Rat anti-souris CD274 (PD-L1) PE (IgG2a ; MIH5)	BD	Cytométrie
Rat anti-souris CD4 APC (IgG2a ; RM4-5)	BD	Cytométrie
Rat anti-souris CD25 FITC (IgM ; 7D4)	BD	Cytométrie

Rat anti-souris EpCAM APC (IgG2a ; G8.8)	BD	Cytométrie
Hamster anti-souris CD3 FITC (IgG1 ; 145-2C11)	BD	Cytométrie
Rat anti-souris CD19 APC et PerCP- Cy5.5(IgG2a ; 1D3)	BD	Cytométrie
Hamster anti-souris CD11c PE (IgG; HL3)	BD	Cytométrie
Rat anti-souris CD11b APC (IgG2b ; M1/70)	BD	Cytométrie
Rat anti-souris GL7 biotine (IgM ; GL7)	Invitrogen	Cytométrie
Hamster anti-souris CD95 PE-Cy7 (Jo2)	BD	Cytométrie
Rat anti-souris CD138 PE (IgG2a ; 281.2)	BD	Cytométrie
Streptavidine PerCP- Cy5.5	BD	Cytométrie
Dapi 100ng/ml	Sigma	Cytométrie
Propidium iodide (IP) 2.5 mg/mL	Sigma	Cytométrie
Rat anti-souris CD45 APC (Rat, IgG2b ; 30F11)	BD	Microscopie
Hamster syrien anti-souris PDPN (IgG ; 8.1.1)	Biolegend	Microscopie
Chèvre anti-souris C3 (Polyclonal)	MP Biomedicals	Microscopie
Chèvre anti-IgG souris Cy3 (Polyclonal)	Jackson ImmunoResearch	Microscopie
Rat anti-souris Lyve-1 Biotine (IgG1 ; ALY7)	eBiosciences	Microscopie
Âne anti-IgG chèvre Cy3 (Polyclonal)	Jackson ImmunoResearch	Microscopie
Chèvre anti-IgG hamster AF546 (Polyclonal)	Invitrogen	Microscopie
Streptavidine AF647	Molecular Probes	Microscopie
Chèvre anti-IgG rat AF647	Life Technologies	Microscopie

Résultats

A. Chapitre 1 : Plasticité du compartiment stromal des ganglions lymphatiques chez la souris lupique NZB/W

I. Avant-propos

Les organes lymphoïdes secondaires, dont font partie les ganglions lymphatiques, sont des sites immunologiques où l'homéostasie des cellules immunitaires est maintenue en conditions physiologiques et dans lesquels se développe la réponse immunitaire adaptative lors d'une situation pathologique. Pour assurer ces fonctions essentielles, les cellules immunitaires présentes dans les ganglions lymphatiques sont organisées en différents compartiments grâce aux cellules stromales. Ces cellules, d'origine mésenchymateuse et endothéliale, représentent moins de 2 % de la totalité des cellules du ganglion mais assurent un rôle essentiel dans la régulation des fonctions des cellules immunitaires. D'un point de vue architectural, les LEC forment les vaisseaux lymphatiques, et les BEC, les vaisseaux sanguins classiques et les HEV, qui eux, assurent l'entrée des lymphocytes naïfs dans le ganglion lymphatique. Les cellules fibroblastiques, dont les FRC, constituent un réseau de conduits dans la zone T du ganglion permettant la circulation des cellules immunitaires et la diffusion des Ag. Ces cellules stromales sécrètent des signaux moléculaires assurant le recrutement et l'adressage des LT et des LB dans leurs zones respectives (CCL19, CCL21, CXCL13) ainsi que des cytokines et des chimiokines nécessaires à leur survie (IL-7, CXCL13, BAFF) (**Malhotra et al., 2013**). Outre ces fonctions architecturales, les FRC, BEC et LEC ont un rôle important dans le maintien de la tolérance périphérique. En effet, ces dernières sont capables d'exprimer de façon endogène des Ag de tissus périphériques et de les présenter directement dans le contexte du CMH-I aux LT CD8⁺ afin d'induire leur anergie ou leur délétion, dans une situation non inflammatoire. L'induction de tolérance des LT CD4⁺ via le CMH-II des cellules stromales est un processus moins bien compris qui ferait intervenir différents mécanismes. Il a été mis en évidence que des échanges du complexe CMH-II-peptide ou d'Ag entre les cellules stromales et les cellules dendritiques permettent d'induire l'anergie des LT CD4⁺ (**Dubrot et al., 2014; Rouhani et al., 2015**) ou encore que la présentation directe d'Ag de tissus périphériques dans le contexte du CMH-II par les LEC contribuent au maintien des LTreg (**Baptista et al., 2014**). Le rôle de « cellules présentatrices d'Ag » de ces cellules stromales a récemment été mis en évidence par l'équipe du Dr. Stephanie Hugues dans un modèle murin KO inductible où l'absence des molécules du CMH-II uniquement dans les cellules stromales conduit à une rupture de tolérance et au développement d'une réponse auto-immune chez des souris âgées de plus d'un an (**Dubrot et**

al., 2018). Cette capacité des cellules stromales à exprimer le CMH-II et à présenter directement ou indirectement des Ag aux cellules immunitaires apparaît donc être nécessaire dans le maintien de la tolérance périphérique des LT et en fait un aspect particulièrement intéressant à étudier dans un contexte pathologique de rupture de tolérance telles que les maladies auto-immunes.

Plus généralement, à l'heure actuelle, peu d'études se sont intéressées à la caractérisation du microenvironnement stromal des ganglions lymphatiques dans des maladies auto-immunes. Chez l'Homme, des analyses transcriptomiques comparatives ont révélé une signature moléculaire spécifique des cellules stromales isolées des ganglions lymphatiques drainant les sites inflammatoires chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ou de diabète de type I (**Karouzakis et al., 2019; Postigo-Fernandez et al., 2019**). Les cellules stromales dans ces deux situations inflammatoires, présentent, entre autres, un niveau d'expression élevé pour les gènes associés aux réponses immunitaires et à la présentation d'Ag par le CMH-II. Dans le contexte de la pathologie lupique, il a été montré dans un modèle murin de lupus (MRL^{lpr/lpr}), que l'augmentation du volume des ganglions lymphatiques cutanés provoquée par l'hyperprolifération des LT et LB (résultant de la mutation du gène Fas), est associée à une expansion des cellules endothéliales formant entre autres les HEV (**Chyou et al., 2012**), ainsi qu'à une production élevée d'IL-7 et une expansion des FRC qui la produisent (**Gonzalez-Quintial et al., 2011**), ce qui favorise d'une part la migration des cellules immunitaires et d'autre part la survie des LT auto-réactifs dans le ganglion. Au cours du lupus, le rein est l'un des organes cibles de la pathologie et une atteinte rénale sévère peut mener à la nécessité d'une greffe chez les patients. La glomérulonéphrite lupique, chez l'Homme comme chez le modèle murin NZB/W, est caractérisée par un dépôt d'auto-Ac et une infiltration de cellules immunitaires. Toutefois, à ce jour, une seule étude s'est intéressée aux cellules stromales qui sont les régulatrices des cellules immunitaires, dans les ganglions lymphatiques drainant les reins au cours d'une glomérulonéphrite non auto-immune (**Kasinath et al., 2019**). Ainsi, dans le but d'apporter un nouvel élément dans la compréhension des acteurs intervenant dans le développement du LED et de l'atteinte rénale, nous avons entrepris la caractérisation phénotypique et fonctionnelle des principales populations de cellules stromales des ganglions lymphatiques rénaux chez les souris lupiques NZB/W.

II. Caractérisation quantitative du compartiment stromal des ganglions lymphatiques

Avant mon arrivée au laboratoire, l'équipe a choisi d'étudier les facteurs régulant la réponse immunitaire dans le contexte du LED chez le modèle murin de lupus NZB/W. C'est un modèle

de choix par rapport aux nombreuses similitudes qu'il présente avec la physiopathologie humaine, notamment le développement spontané d'une glomérulonéphrite causée par le dépôt d'auto-Ac (caractéristiques du LED chez l'Homme) et à une infiltration de cellules immunitaires. Ainsi c'est dans la continuité de ce travail et dans l'objectif d'identifier de potentiels acteurs de la réponse auto-immune au plus proche du LED chez l'homme, que nous avons entrepris la caractérisation du compartiment stromal des ganglions lymphatiques.

Pour ce faire, l'étude a été réalisée chez des souris NZB/W malades (ayant une défaillance rénale) et âgées (> 28 semaines) et des souris NZB/W jeunes (11-13 semaines), n'ayant pas encore développé d'atteinte rénale. Les souris NZB/W malades présentent une atteinte rénale sévère lorsque la mesure semi-quantitative de la protéinurie est supérieure à un score de 3 (Lacotte et al., 2010). Des souris contrôles BALB/W âgées et jeunes ont été incluses dans l'études pour mettre en évidence des modifications qui seraient liées au vieillissement des souris et non à la pathologie. Nous avons choisi d'inclure également les ganglions lymphatiques mésentériques et cutanés situés à distance du rein afin d'observer de potentielles différences phénotypiques spécifiques à l'inflammation locale. Par ailleurs, l'étude par cytométrie en flux des cellules stromales, peu représentées dans les ganglions lymphatiques, a nécessité un protocole d'enrichissement particulier, qui a été adapté à partir de la méthode publiée par le groupe du Dr. S.J Turley (Fletcher et al., 2011). Afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules pour une même analyse, nous avons regroupé plusieurs ganglions, de chaque type, pour chaque groupe de souris. Ainsi, dans notre étude, pour la plupart des résultats obtenus, un point représente une expérience individuelle avec un minimum de 2 souris NZB/W malades et jusqu'à 6 souris contrôles (C-à-d : NZB/W jeunes, BALB/W âgées ou jeunes).

Nous nous sommes donc tout d'abord intéressés à la quantification du compartiment stromal des ganglions lymphatiques, en particulier ceux drainant le rein. La digestion enzymatique des ganglions lymphatiques rénaux (kLN), mésentériques (mLN) et cutanés (sLN) est suivie d'un tri magnétique permettant d'enrichir la fraction stromale. Puis, l'identification des cellules stromales par cytométrie en flux se fait parmi les cellules n'exprimant ni le marqueur CD45 (caractérisant les leucocytes), ni le marqueur Ter119 (exprimé par les érythrocytes). Parmi les cellules CD45⁻Ter119⁻, nous avons choisi d'étudier les principales sous-populations de cellules stromales, les FRC, BEC et LEC qui sont identifiées par l'expression différentielle de la PDPN et de CD31 (FRC : PDPN⁺ CD31⁻ ; BEC : PDPN⁻CD31⁺ ; LEC : PDPN⁺CD31⁺) (Figure 18A). Le nombre absolu des différentes populations de cellules stromales par ganglion a été déterminé grâce à des billes de comptage pour cytométrie en flux.

En effet, la proportion moyenne des cellules stromales totales (CD45⁻Ter119⁻), sans enrichissement préalable, est comprise entre 0,25 et 0,6 % dans les ganglions lymphatiques rénaux selon les groupes d'animaux étudiés, ce qui ne permet pas leur comptage par une méthode classique (**Figure 18B**).

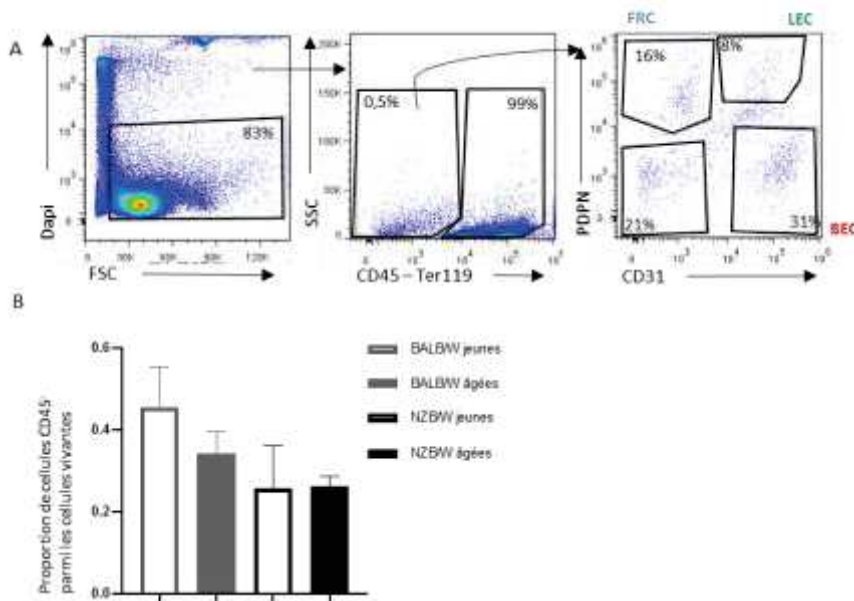


Figure 18 Processus d'identification des populations de cellules stromales dans les ganglions lymphatiques.

A) Stratégie d'identification des cellules stromales issues des ganglions lymphatiques rénaux. Les cellules stromales sont identifiées parmi les cellules vivantes (DAPI⁺) et selon l'expression de la PDPN et de CD31 parmi les cellules CD45⁻ Ter119⁻. B) Proportion moyenne de cellules non hématopoïétiques (CD45⁻) et non érythrocytaires (Ter119⁻) avant l'enrichissement des ganglions lymphatiques rénaux chez les souris BALB/W et NZB/W. n = 3 à 14 expériences indépendantes avec des ganglions provenant de 2 à 5 souris d'une même lignée et de même âge ont été regroupés lors de la digestion. Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne ± SEM.

Dans un premier temps, nous avons observé un nombre élevé de cellules immunitaires CD45⁺, avec environ 8,9 millions de cellules/ganglion lymphatique rénal de souris NZB/W âgées et malades par rapport aux ganglions rénaux de souris NZB/W jeunes et de souris contrôles BALB/W jeunes et âgées contenant environ 1,2 million de cellules (**Figure 19A**). De plus, le nombre absolu de cellules stromales est aussi plus élevé dans les ganglions rénaux de souris NZB/W âgées par rapport aux souris jeunes et aux souris contrôles. Ceci correspond principalement à un accroissement du nombre de FRC et de BEC lié au développement de la maladie chez les souris lupiques, cette augmentation n'est pas retrouvée chez les souris contrôles BALB/W avec l'âge (**Figure 19B**). De plus, le nombre de FRC (en moyenne 1500 cellules/ganglion) et de BEC (en moyenne 1100 cellules/ganglion) chez les souris BALB/W âgées est plus faible que chez les souris malades (en moyenne 4100 FRC/ganglion et 9000

BEC/ganglion). Cette observation a été confirmée grâce à des marquages immunohistologiques sur coupes de ganglions lymphatiques rénaux. L'aire totale des ganglions rénaux des souris malades est en moyenne 7,5 fois supérieure à celle des ganglions de souris jeunes. Ce facteur d'augmentation est similaire à celui observé entre le nombre absolu de cellules CD45⁺, constituant environ 99 % des cellules des ganglions, des souris NZB/W malades et des souris NZB/W jeunes. Afin de quantifier le compartiment stromal nous avons alors mesuré l'aire occupée par les vaisseaux sanguins et lymphatiques sur les coupes de ganglions marquées, tel que le montre la **Figure 19C**. Le marqueur CD31 n'étant pas spécifique aux vaisseaux sanguins nous avons utilisé le marqueur Lyve1 afin de discriminer les deux types de vaisseaux puis une segmentation par seuillage a été effectuée pour déterminer la surface occupée par les vaisseaux sur la coupe (Cf *Matériels et méthodes. Paragraphe J.*). Nous pouvons noter que l'aire occupée par ces vaisseaux dans les ganglions lymphatiques rénaux est plus importante chez les souris NZB/W malades par rapport aux souris pré-lupiques et aux souris BALB/W contrôles ce qui reflète une vascularisation sanguine et lymphatique plus développée dans les ganglions de souris malades qui permettrait d'assurer la circulation des nombreuses cellules immunitaires au sein du ganglion (**Figure 19C**). Malheureusement, nous n'avons pas pu appliquer cette approche à la quantification des FRC en raison du réseau de conduits formé par les FRC et d'un marquage de la PDPN diffus qui ne nous a pas permis de fixer le seuil d'intensité de façon optimale pour l'analyse.

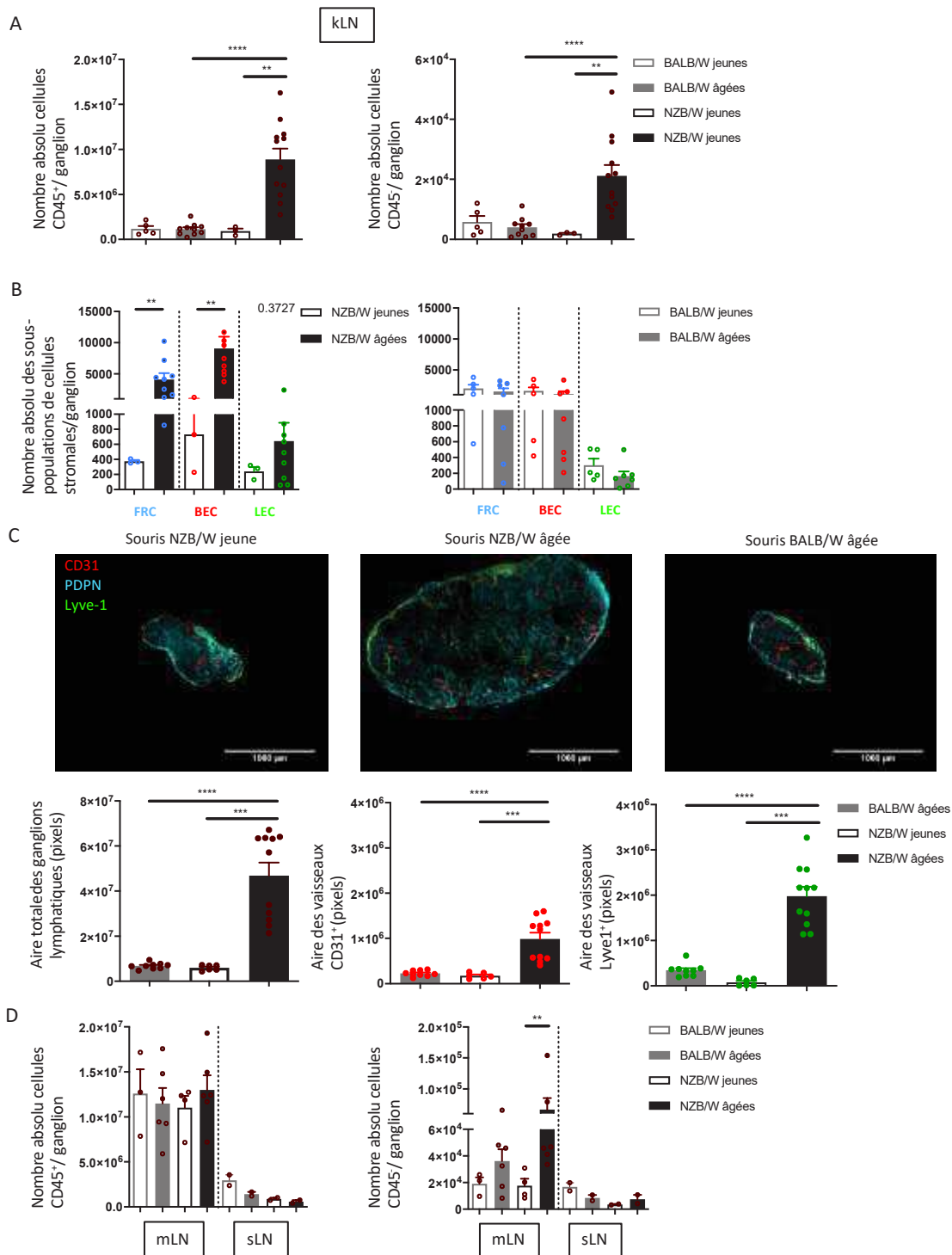


Figure 19 Le compartiment stromal des ganglions lymphatiques rénaux évolue avec l'inflammation locale

A,D) Le nombre absolu de cellules CD45⁺ et CD45⁻ par ganglion lymphatique rénal (kLN) (A), cutané (sLN) (axial, brachial ou inguinal) ou pour la chaîne ganglionnaire mésentérique (mLN)(D) a été déterminé par cytométrie en flux selon la stratégie d'identification présentée dans la **Figure 18**. **B)** Nombre absolu de chaque sous-population de cellules stromales (FRC, LEC, BEC) par ganglion lymphatique rénal. Chaque point correspond à une expérience indépendante dans laquelle les ganglions de 2 à 6 souris d'une même lignée et de même âge ont été regroupés lors de la digestion. C) Les images de coupes entières de ganglions lymphatiques rénaux de souris NZB/W et BALB/W ont été recomposées à partir de plusieurs images obtenues en microscopie confocale. Les coupes de ganglions lymphatiques rénaux ont été marquées avec des Ac anti-PDPN, anti-CD31 et anti-Lyve1. La barre d'échelle représente 1000 μm et le grossissement était de 200 x. L'aire totale, l'aire des vaisseaux sanguins CD31⁺ et des vaisseaux lymphatiques Lyve1⁺ et ont été quantifiées (pixels) et comparées entre les souris lupiques

malades et les souris pré-lupiques ou les souris contrôles âgées. Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne (histogramme) \pm SEM. Certains histogrammes ne représentent que 2 expériences indépendantes (sLN), ne permettant pas de réaliser un test statistique **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001 (Mann-Whitney).

Par ailleurs, comme mentionné précédemment, nous nous sommes intéressés à des ganglions situés à distance du rein. Ainsi, le nombre de leucocytes pour la chaîne ganglionnaire mésentérique apparaît similaire entre les différents groupes de souris, avec en moyenne 11 millions de cellules CD45⁺, alors que le nombre de leucocytes par ganglion cutané (axial, brachial ou inguinal) chez les souris lupiques tend même à être plus bas que pour les souris BALB/W contrôles (0,5 à 0,9 millions de cellules/ganglion (NZB/W) *versus* 1,5 à 2,9 millions de cellules/ganglion (BALB/W)) (**Figure 19D**). En ce qui concerne les cellules stromales, la seule différence significative est observée chez les souris NZB/W malades par rapport aux souris jeunes NZB/W (**Figure 19D**), ce qui correspond, comme dans les ganglions rénaux à une augmentation des FRC et des BEC (résultats non montrés). Une tendance similaire, bien que non significative, est également observée entre les souris contrôles BALB/W jeunes et âgées, suggérant également une certaine évolution du compartiment stromal des ganglions mésentériques au cours du vieillissement.

Dans les ganglions cutanés, le nombre absolu de cellules stromales semble suivre la même tendance que le nombre absolu de cellules CD45⁺ pour les différents groupes de souris (**Figure 19D gauche**), mais ces données restent à confirmer sur un plus grand nombre d'échantillons.

Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressés à la fréquence de chaque population cellulaire au sein du compartiment stromal dans les ganglions lymphatiques rénaux, afin d'identifier un éventuel remaniement. Lors du développement de la maladie chez les souris lupiques, la proportion de FRC est augmentée (en moyenne 13 % chez les NZB/W jeunes *versus* 31 % chez les NZB/W âgées) (**Figure 20A**). A l'inverse de l'augmentation de la fréquence des FRC, nous observons une diminution de la proportion de BEC dans les ganglions rénaux chez les souris malades (45 %) par rapport aux souris jeunes (60 %). Le pourcentage des LEC reste, quant à lui, globalement stable entre les deux groupes de souris lupiques. Par ailleurs, de manière très intéressante, les ganglions mésentériques et cutanés des souris NZB/W ne présentent pas de modifications de la proportion des sous-populations stromales lors du développement de la maladie (**Figure 20B**), suggérant une réorganisation spécifique aux ganglions drainant les reins enflammés. Enfin, contrairement aux observations faites chez les souris lupiques, nous avons constaté que le pourcentage de FRC est légèrement plus faible dans les ganglions rénaux des souris BALB/W âgées (25 %) que chez les souris BALB/W

jeunes (32 %) (**Figure 20A**). Cependant cette variation ne semble pas être associée à une diminution du nombre lors du vieillissement des souris BALB/W (**Figure 19A Figure 20A**).

En résumé, parmi les modifications qui se produisent au cours du développement de la maladie, le nombre et la proportion de FRC sont augmentés, suggérant une expansion du réseau de conduit permettant d'accroître la circulation des Ag et des cellules immunitaires. Ce processus a également été démontré par Gregory *et al.*, au cours d'une infection virale où les FRC prolifèrent et le réseau s'élargit pour accompagner l'augmentation de la zone T du ganglion (**Gregory et al., 2017**). Dans le contexte d'une atteinte rénale provoquée par l'injection d'un sérum néphrotoxique, le développement du réseaux de FRC est aussi observé par une augmentation du nombre et de la fréquence des FRC dans les ganglions rénaux (**Kasinath et al., 2019**). Parallèlement à l'expansion des FRC en réponse à l'inflammation locale, la quantité des BEC et des LEC augmente (730 à 9000 BEC et 240 à 640 LEC/ganglions lymphatiques rénaux) mais leurs proportions parmi l'ensemble des cellules stromales, ne varie pas pour les LEC ou diminue pour les BEC (60 % à 45 %), suggérant une prolifération mais une évolution moins importante par rapport aux FRC. Nous avons réalisé des essais de mesure de prolifération à l'aide du marqueur de prolifération Ki67 sur des coupes de ganglions rénaux de souris NZB/W et BALB/W âgées (résultats non montrés). Cependant, les premiers résultats obtenus à ce stade de la maladie ne nous pas permis de visualiser une prolifération des cellules endothéliales, ce qui laisse penser que ce processus pourrait s'opérer à un stade plus précoce. En effet, différentes études ont mis en évidence une prolifération des cellules endothéliales des ganglions lymphatiques au cours des premiers jours d'une infection virale, d'une injection de cellules cancéreuses, d'un processus de vaccination ou encore dans les premiers mois de vie du modèle murin du lupus MRL lpr/lpr (**Chyou et al., 2012; Dasoveanu et al., 2016; Gregory et al., 2017; Riedel et al., 2016**).

Par conséquent, le compartiment stromal des ganglions lymphatiques drainant les reins semble se développer et se réorganiser pour soutenir la prolifération des cellules immunitaires au cours du développement de la maladie chez les souris lupiques. L'ensemble de ces données mettent en valeur le rôle architectural dynamique des cellules stromales dans un contexte inflammatoire locale.

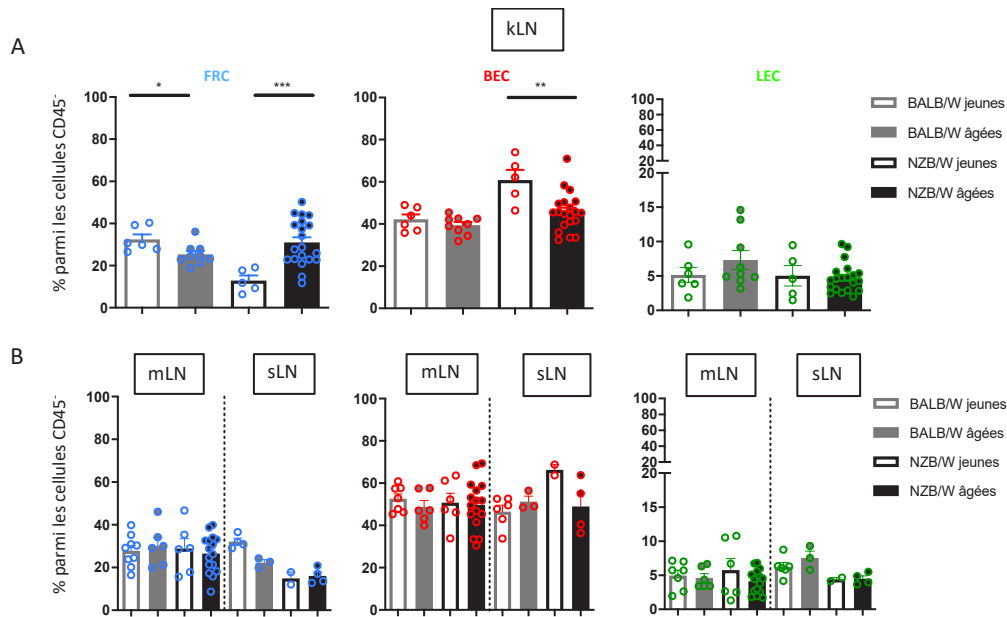


Figure 20 Réorganisation spécifique du compartiment stromal des ganglions lymphatiques rénaux au cours de la pathologie lupique.

La proportion des FRC (bleu), des BEC (rouge) et des LEC (vert) des ganglions lymphatiques rénaux (kLN) (A), mésentériques (mLN) et cutanés (sLN) (B) a été déterminée par cytométrie en flux selon la stratégie d'identification présentée sur la Figure 18. Chaque point représente une expérience indépendante dans laquelle les ganglions de 2 à 6 souris d'une même lignée et de même âge ont été regroupés lors de la digestion. Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne (histogramme) \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Mann-Whitney).

III. Étude du profil phénotypique et fonctionnel des cellules stromales des ganglions lymphatiques

En parallèle de ces variations quantitatives du compartiment stromal chez les souris malades, nous nous sommes intéressés au phénotype de ces cellules afin de savoir si ces dernières présentaient également des modifications fonctionnelles pouvant contribuer au développement de la maladie.

1. Les cellules stromales présentent des molécules du CMH-II à leur surface

Tel que détaillé dans l'introduction, plusieurs études ont mis en évidence l'expression des molécules de CMH-II par les cellules stromales et le rôle de celles-ci dans l'induction et le maintien de la tolérance périphérique. Il est donc particulièrement intéressant d'étudier la potentielle dérégulation de ces processus qui pourraient alors participer au développement de maladies auto-immunes telles que le lupus. Dans un premier temps, nous avons analysé l'expression des molécules CMH-II par les cellules stromales chez les souris lupiques et contrôles par cytométrie en flux. Les trois sous-populations de cellules stromales (FRC, BEC et LEC) provenant des ganglions rénaux, mésentériques et cutanés, des deux lignées de souris

NZB/W et BALB/W expriment à leur surface des molécules du CMH-II détectées par un Ac anti-IA/IE (**Figure 21**). La **Figure 21A** représente, sous forme d'histogramme, l'intensité d'expression du CMH-II pour chaque sous-population de cellules stromales dans les ganglions lymphatiques rénaux des souris NZB/W et BALB/W âgées. De manière très intéressante nous notons une augmentation très claire des niveaux d'expression des molécules du CMH-II à la surface des FRC et BEC isolées des ganglions rénaux de souris NZB/W âgées malades comparativement aux souris contrôles BALB/W de même âge. Ceci se reflète dans le ratio des intensités moyennes de fluorescence du CMH-II. En effet, nous pouvons observer des intensités moyennes de fluorescence largement supérieures pour les FRC et les BEC des ganglions rénaux de souris NZB/W âgées malades (ratio moyen = 56 (FRC) et 126 (BEC)) à celles mesurées chez les souris NZB/W jeunes (ratio moyen = 6 (FRC) et 9 (BEC)) et des souris BALB/W âgées (intensité moyenne de fluorescence = à 22 pour les FRC et BEC) (**Figure 21B**). Nous avons toutefois remarqué que les FRC et les BEC présentes dans les ganglions rénaux de souris NZB/W jeunes (ratio moyen = 6 (FRC) et 9 (BEC)) expriment plus faiblement à leur surface les molécules du CMH-II que ces mêmes cellules chez les souris contrôles de même âge (ratio moyen = 14 (FRC) et 15 (BEC)) (**Figure 21B**). De plus, nous pouvons noter que chez les souris NZB/W âgées malades, deux populations de FRC se distinguent selon l'intensité d'expression des molécules du CMH-II (CMH-II^{low} et CMH-II^{high}), à l'inverse des BEC dont l'expression semble être uniformément augmentée par rapport à ces mêmes cellules chez les souris NZB/W jeunes et BALB/W âgées.

Par ailleurs, globalement cette forte augmentation de l'expression des molécules du CMH-II à la surface des FRC et des BEC des souris NZB/W malades par rapport aux souris NZB/W jeunes et aux souris contrôles âgées ne se retrouve pas dans les autres ganglions. L'expression des molécules du CMH-II à la surface des BEC des souris malades tend à augmenter légèrement par rapport aux souris pré-lupiques dans les ganglions mésentériques (ratio moyen = 6 à 15) et cutanés (ratio moyen = 14 à 21) (**Figure 21C**). De plus, mis à part une faible augmentation de l'expression de CMH-II par les FRC présentes dans les ganglions mésentériques de souris BALB/W âgées par rapport aux souris jeunes, nous n'avons pas observé de variation de l'expression de surface du CMH-II par les FRC et des BEC des ganglions lymphatiques rénaux, mésentériques et cutanés entre les deux groupes d'âges des souris contrôles BALB/W (**Figure 21B,C**). L'ensemble de ces données suggèrent donc que dans un contexte d'inflammation chronique, l'expression du CMH-II est augmentée à la surface des FRC et BEC et d'une façon plus importante dans les ganglions drainant l'organe cible, le rein.

Concernant les LEC, l'expression des molécules du CMH-II à leur surface semble évoluer différemment entre les groupes de souris par rapport à ce que nous observons pour les FRC et BEC. En effet, l'intensité moyenne de fluorescence est significativement plus forte entre les LEC de souris âgées (ratio moyen = 15 chez les souris NZB/W âgées et ratio moyen = 32 chez les souris BALB/W âgées) respectivement par rapport aux souris jeunes de même lignée (ratio moyen = 7 chez les souris NZB/W jeunes et = 15 chez les souris BALB/W jeunes) (**Figure 21B**). Une tendance similaire lors du vieillissement des souris NZB/W et BALB/W est aussi observée à la surface des LEC présentes dans les ganglions mésentériques et les ganglions cutanés (**Figure 21C**). De plus, d'une façon surprenante l'expression de surface des molécules du CMH-II par les LEC des ganglions rénaux (et mésentériques) de souris lupiques âgées malades est plus faible que celle des LEC de souris BALB/W contrôles de même âge (ratio moyen = 15 (NZB/W) et 32 (BALB/W)). Cette différence d'expression est déjà observée entre des LEC des ganglions rénaux et mésentériques de souris BALB/W jeunes et NZB/W jeunes (**Figure 21B, C**).

Il a été démontré par plusieurs études que l'expression de CMH-II par les cellules stromales, dont les LEC, est augmentée dans des conditions inflammatoires (**Gregory et al., 2017; Malhotra et al., 2012**). Toutefois dans notre situation, nous avons aussi observé une augmentation de l'expression des molécules du CMH-II entre les LEC de souris BALB/W contrôles jeunes et les souris contrôles âgées ce qui suggère que cette augmentation pourrait aussi résulter d'une modification du phénotype des LEC lors du vieillissement des souris (**Figure 21B, C**). En effet, Dubrot et collaborateurs ont montré que les LEC, de ganglions lymphatiques chez des souris âgées de plus d'un an, présentent un niveau d'expression du CMH-II plus important à que par rapport à ces mêmes cellules chez des souris jeunes, ce qui serait potentiellement lié à une augmentation de l'expression du récepteur à l'IFN γ par ces dernières (**Dubrot et al., 2018**).

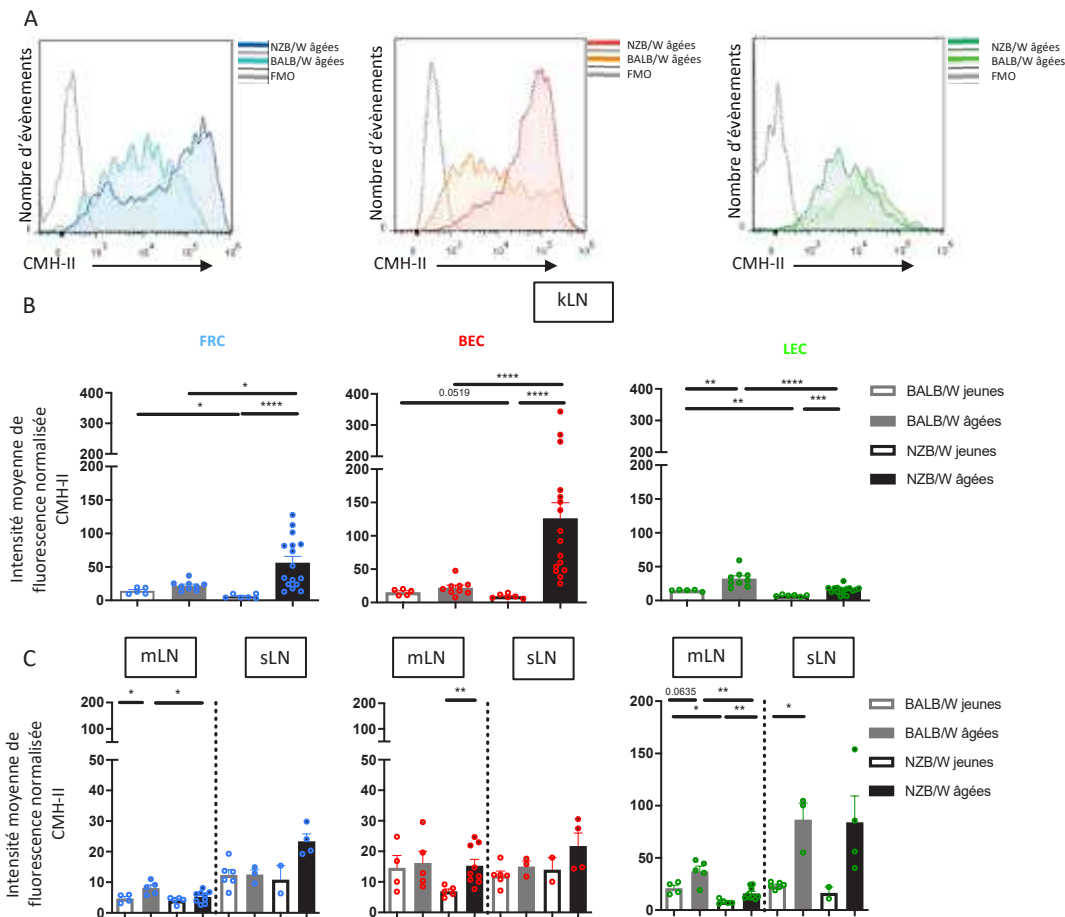


Figure 21 Mise en évidence de l'expression de surface des molécules du CMH-II par les cellules stromales des ganglions lymphatiques

L'expression de surface des molécules du CMH-II par les cellules stromales isolées des ganglions lymphatiques rénaux pour chaque groupe de souris a été déterminée par cytométrie en flux avec un Ac anti-IA/IE. **A**) Histogrammes représentatifs de l'expression de CMH-II à la surface des FRC, BEC et LEC de souris NZB/W et BALB/W âgées. **B-C**) L'expression de surface du CMH-II est exprimée sous la forme d'un ratio d'intensité moyenne de fluorescence du CMH-II par rapport aux cellules stromales non marquées, pour les FRC (bleu), BEC (rouge) et LEC (vert) des ganglions lymphatiques rénaux (kLN) (B), mésentériques (mLN) et cutanés (sLN) (C). Chaque point représente une expérience indépendante dans laquelle les ganglions de 2 à 6 souris d'une même lignée et de même âge ont été regroupés lors de la digestion. Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne (histogramme) \pm SEM. Certains histogrammes ne représentent que 2 expériences indépendantes, ne permettant pas de réaliser un test statistique * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (Mann-Whitney).

Par ailleurs, nos premières données ont mis en évidence une expression du CMH-II à la surface des FRC, BEC et LEC des ganglions rénaux de souris NZB/W jeunes plus faible que chez les souris contrôles jeunes (**Figure 21B**). Ce résultat est particulièrement intéressant à un stade précoce d'une situation auto-immune. En effet, dans un contexte sain l'expression du CMH-II par les cellules stromales participe au maintien des LTreg (**Baptista et al., 2014**) et l'acquisition des complexes CMH-II-peptides des cellules dendritiques contribue à l'induction de la tolérance périphérique des LT (**Dubrot et al., 2014**). Ainsi un défaut de l'expression de surface

du CMH-II par les cellules stromales, à un stade précoce, pourrait être un élément important de la rupture de tolérance périphérique conduisant au développement de la maladie.

2. L'expression des molécules du CMH-II par les cellules stromales est fonctionnelle

Ci-dessus, nous avons mis en évidence précédemment par cytométrie en flux l'expression du CMH-II à la surface des cellules stromales des ganglions lymphatiques rénaux et de façon très intéressante plus fortement à la surface des FRC et des BEC des souris NZB/W malades par rapport à ces cellules chez de souris contrôles BALB/W âgées. Nous avons mis au point une expérience de réaction allogénique, dans le but, d'une part de confirmer de manière fonctionnelle l'expression des molécules de CMH-II par les cellules stromales et d'autre part pour essayer de mettre en évidence cette différence quantitative entre des souris lupiques malades et des souris saines de même âge. Cette expérience est basée sur le principe de la réaction mixte lymphocytaire qui repose sur la reconnaissance directe par les lymphocytes T de molécules de CMH étranger présentant un peptide. Pour ce faire, j'ai réalisé une co-culture *in vitro* des LT CD4⁺ de souris C57BL/6 d'haplotype b avec des cellules stromales de ganglions lymphatiques rénaux de souris lupiques (d'haplotype du CMH (d/z)) ou avec des cellules stromales de souris BALB/W ayant le même haplotype. Plusieurs essais ont été nécessaires en raison du faible nombre de cellules stromales totales isolées des ganglions lymphatiques rénaux de souris contrôles qui était le principal facteur limitant pour cette réaction. Différents paramètres ont été testés dont, la durée d'incubation, le ratio de cellules T/cellules stromales et la présence ou non de signaux stimulants. Finalement, les conditions nous permettant d'observer une prolifération optimale des LT CD4⁺ ont été définies comme suit : un ratio d'une cellule stromale stimulatrice pour cinq cellules T CD4⁺, en présence d'IL-2 et d'Ac anti-CD28 afin de fournir des signaux de croissance et de co-stimulation pour les cellules T. La prolifération de ces dernières a été évaluée cinq jours après la mise en culture, grâce à un marqueur de prolifération intracellulaire (« Cell Trace Violet » CTV) (**Figure 22A**). La dilution de ce marquage permet d'identifier, par cytométrie en flux, les cellules ayant réalisé un ou plusieurs cycles de division (**Figure 22B**). Après 5 jours de culture le taux de mortalité cellulaire est important ; en moyenne 5 % de cellules CD45⁻ et 23 % de cellules CD45⁺ sont encore vivantes. Toutefois, parmi les cellules T vivantes, nous avons pu observer une prolifération des LT CD4⁺ au contact de cellules stromales de souris BALB/W ou de NZB/W âgées, visualisée par la dilution du marquage CTV parmi les LT CD4⁺ (**Figure 22B**). L'activation des LT CD4 est confirmée par l'expression du marqueur CD25 dont le niveau d'expression tend à diminuer

avec les cycles de division après cinq jours de stimulation. Nous n'avons pas observé de prolifération des LT CD4⁺ en absence de cellules stromales après 5 jours dans ces mêmes conditions de stimulation (résultats non montrés). L'activation et la prolifération des LT CD4⁺ suggère fortement la reconnaissance via le TCR du CMH-II à la surface des cellules stromales allogéniques. De plus, parmi les 4 expériences indépendantes réalisées sur 5, les cellules stromales de souris NZB/W âgées semblent induire une plus forte prolifération des LT CD4⁺ par rapport aux cellules stromales de souris BALB/W âgées (proportion moyenne de LT CD4⁺ en prolifération = 31,6 % *versus* 25,2 %) (**Figure 22B, C**). Cette tendance serait cohérente avec l'intensité d'expression plus importante des molécules du CMH-II à la surface des FRC et BEC de souris NZB/W malades par rapport aux souris contrôles BALB/W (**Figure 21B**). Cependant, malgré une certaine variabilité des proportions de LT CD4⁺ proliférant lors des 5 expériences réalisées (entre 15 et 60 %) et une expérience avec une tendance inverse des 4 autres, ces résultats sont encourageants (**Figure 22C**). L'hétérogénéité des données pourraient être liées à la variabilité de l'intensité de l'expression du CMH-II à la surface des cellules stromales des souris NZB/W malades telle que l'on peut l'observer sur la **Figure 21B**.

L'ensemble de ces résultats permettent néanmoins de confirmer l'expression fonctionnelle des molécules du CMH-II à la surface des cellules stromales. Des expériences supplémentaires seront réalisées afin de valider la tendance observée entre des cellules stromales de souris NZB/W malades et des souris BALB/W contrôles.

3. Les cellules stromales expriment des molécules de co-stimulation et de co-inhibition
 - a. La molécule de co-stimulation CD86

Les résultats obtenus précédemment ayant mis en évidence l'expression de molécules du CMH-II à la surface des cellules stromales des souris NZB/W et BALB/W, nous nous sommes demandé si ces cellules pouvaient jouer un rôle de cellules présentatrices d'(auto)-Ag et ainsi potentiellement participer à la rupture de tolérance. L'activation efficace des LT nécessite la présentation des complexes CMH-II-peptides ainsi qu'un signal fourni par des molécules de co-stimulation, dont CD86 est l'une des principales. Nous avons donc étudié l'expression de cette molécule de co-stimulation par les cellules stromales, des ganglions rénaux, par cytométrie en flux et qPCR.

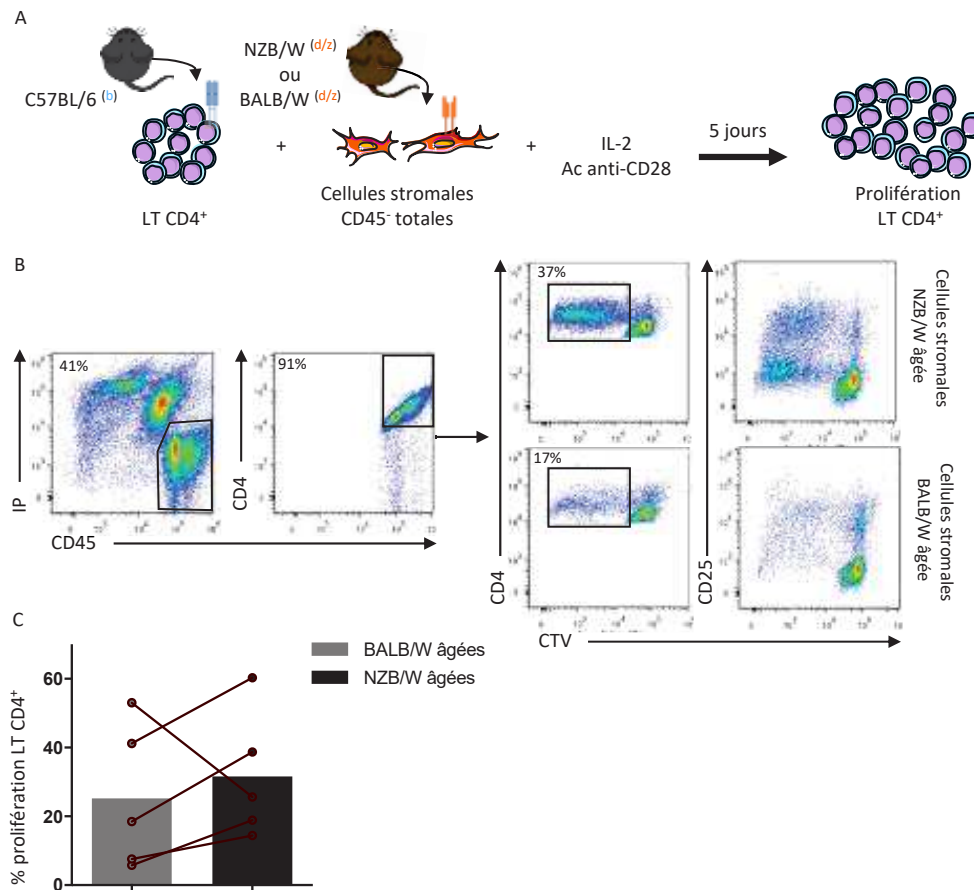


Figure 22 Les cellules stromales présentent une expression fonctionnelle des molécules du CMH-II

A) Protocole de la réaction allogénique entre des cellules stromales (cellules stimulantes), isolées de ganglions lymphatiques rénaux de souris NZB/W ou BALB/W âgées, et des LT CD4⁺ de souris C57Bl/6. La prolifération des LTCD4⁺ a été mesurée par la dilution du marqueur Cell Trace Violet » CTV après 5 jours. **B)** Les LTCD4⁺ ont été identifiés parmi les cellules CD45⁺ vivantes (IP⁻). La dilution du marqueur CTV est représentée en fonction des marqueurs CD4 et CD25 pour une expérience représentative d'une co-culture entre des cellules allogéniques stimulantes (cellules stromales) de souris NZB/W âgées malades (haut) ou de souris contrôles BALB/W de même âge (bas). **C)** Pourcentage de prolifération des LT CD4⁺ CTV^{low} déterminé par cytométrie en flux après 5 jours au contact de cellules stromales CD45⁻ isolées de ganglions rénaux de souris NZB/W ou BALB/W. Chaque point représente une expérience indépendante dans laquelle les ganglions de 2 à 6 souris d'une même lignée et de même âge ont été regroupés lors de la digestion.

L'expression de la molécule CD86 a été évaluée par cytométrie en flux, parmi les cellules stromales exprimant fortement le CMH-II (CMH-II^{hi}), suggérant un état activé de ces dernières et car une forte expression de ces molécules est plus favorable à la reconnaissance par le TCR et l'activation des LT CD4⁺ (**Figure 23A**).

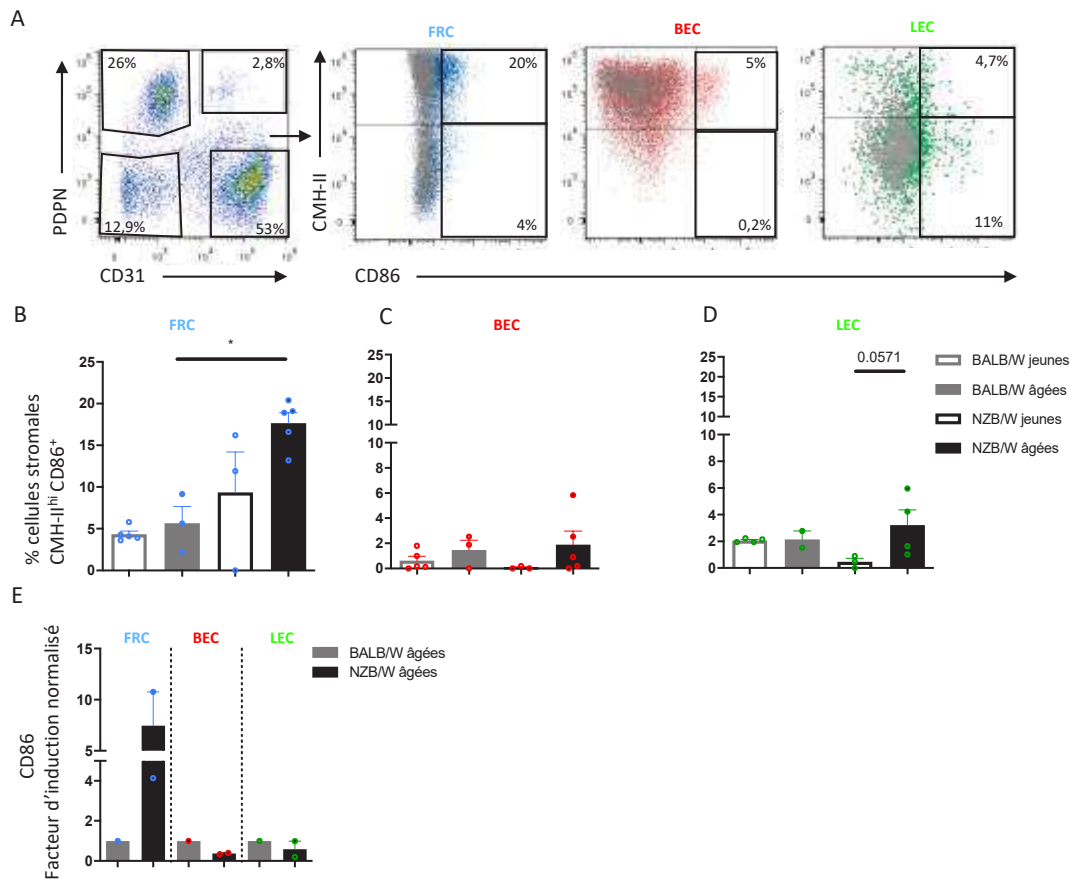


Figure 23 Expression de la molécule de co-stimulation CD86 par les cellules stromales

A) Stratégie d'identification des cellules stromales exprimant CMH-II et CD86 dans les ganglions rénaux des souris lupiques et BALB/W par cytométrie en flux, images représentatives d'une expérience réalisée à partir des ganglions de souris NZB/W malades âgées. **B-C-D)** Proportion de FRC(B), BEC(C), LEC(D) CMH-II^{hi} CD86⁺ parmi les FRC, BEC et LEC des ganglions lymphatiques rénaux des 4 groupes de souris. **E)** L'expression génique de CD86 a été déterminée par qPCR à partir de FRC, BEC et LEC triées des ganglions rénaux de souris âgées NZB/W et BALB/W. Les résultats sont exprimés sous forme de facteur d'induction par rapport aux résultats obtenus pour les cellules isolées à partir des ganglions de souris BALB/W. Chaque point représente une expérience indépendante dans laquelle les ganglions de 2 à 6 souris d'une même lignée et de même âge ont été regroupés lors de la digestion. Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne (histogramme) ± SEM. *p < 0,05 (Mann-Whitney).

De façon intéressante, la proportion de FRC CMH-II^{hi} CD86⁺ est plus importante chez les souris NZB/W malades par rapport aux souris BALB/W contrôles de même âge (pourcentage moyen FRC CMH-II^{hi} CD86⁺ = 17 % *versus* 5 %). De plus, malgré la variabilité entre les expériences réalisées chez des souris lupiques jeunes, le pourcentage de FRC CMH-II^{hi} CD86⁺ tend aussi à être plus élevé chez les souris NZB/W malades par rapport aux souris NZB/W jeunes (pourcentage moyen FRC CMH-II^{hi} CD86⁺ = 17 % *versus* 9 %). Nous n'avons par contre pas observé de différences d'expression de la molécule CD86 entre les FRC de souris BALB/W contrôles jeunes et âgées (**Figure 23B**). Par ailleurs, contrairement aux FRC, l'expression de CD86 à la surface des BEC paraît faible pour tous les groupes de souris. En effet, la proportion moyenne de BEC CMH-II^{hi} CD86⁺ est inférieure à 5 % (**Figure 23C**), suggérant une faible

expression génique de cette molécule par ces cellules. De plus, bien que la proportion de LEC CMH-II^{hi} CD86⁺ soit faible (moins de 10 %), celle-ci semble légèrement plus élevée chez les souris malades par rapport aux souris NZB/W jeunes (pourcentage moyen LEC CMH-II^{hi} CD86⁺ = 3 % *versus* 0,5 %). Cette différence n'est, ici encore, pas observée entre les deux groupes de souris contrôles, ce qui suggère que l'évolution chez les souris lupiques ne serait pas liée au vieillissement mais plutôt au développement de la maladie (**Figure 23D**).

D'autre part, afin de valider ces résultats, nous avons débuté l'analyse de l'expression génique de la molécule de co-stimulation CD86 par qPCR (**Figure 23E**). Les résultats obtenus à partir des FRC triées des ganglions rénaux de souris BALB/W et NZB/W âgées semblent être concordants avec la proportion plus élevée de FRC CMH-II^{hi} CD86⁺ chez les souris NZB/W malades âgées que nous observions par cytométrie en flux (facteur d'induction moyen par rapport aux souris BALB/W = 7,5). De plus, le gène codant pour CD86 ne paraît pas différentiellement exprimé par les BEC et LEC de souris NZB/W malades par rapport aux souris BALB/W de même âge. En lien avec ces premières données, nous n'avons pas non plus relevé de différence de fréquence de BEC et LEC CMH-II^{hi} CD86⁺ entre des souris NZB/W malades et des souris BALB/W contrôles de même âge par cytométrie en flux (**Figure 23C, D**). L'expression génique de CD86 par les cellules stromales des quatre groupes de souris sera discutée en détails dans le paragraphe V d. *Les FRC et LEC des souris lupiques expriment différemment les gènes codant pour les molécules de co-stimulation CD86 et de co-inhibition PD-L1* qui concerne les résultats de l'analyse transcriptomique que nous avons réalisée.

En résumé, l'ensemble de ces résultats laissent penser que dans les ganglions rénaux de souris lupiques malades, les FRC qui expriment fortement les molécules du CMH-II à leur surface expriment également de façon plus importante la molécule de co-stimulation CD86 comparativement aux FRC de souris contrôles, réunissant ainsi des caractéristiques de cellules présentatrices d'Ag. De plus, les proportions de FRC et de LEC exprimant fortement les molécules du CMH-II et la molécule CD86 semblent augmenter au cours du développement de la pathologie.

b. La molécule co- inhibitrice PD-L1

Comme évoqué précédemment, nous avons émis l'hypothèse que, dans un contexte lupique, les cellules stromales pourraient avoir un rôle de cellules présentatrices d'(auto)-Ag et contribuer directement à l'activation de cellules T auto-réactives et/ou indirectement par un

défaut de leur capacité tolérogène. En effet, plusieurs études ont mis en évidence le rôle des LEC et FRC dans l'induction et le maintien de la tolérance périphérique des LT CD8⁺ par la présentation d'Ag par le CMH-I et l'expression de la molécule co-inhibitrice PD-L1 (**Cohen et al., 2014; Fletcher et al., 2010; Hirosue et al., 2014; Mueller et al., 2007a; Tewalt et al., 2012**) (Cf *Introduction. B. II. Les cellules stromales : les régulateurs des réponses immunitaires*). De plus, l'induction de l'apoptose des LT CD4 par les LEC suite à l'acquisition des complexes CMH-II-peptide par les cellules dendritiques, semble être liée à l'expression de PD-L1 (**Dubrot et al., 2014**). Nous nous sommes donc intéressés à l'expression de surface de la molécule inhibitrice PD-L1 par les cellules stromales des ganglions lymphatiques rénaux de souris lupiques NZB/W. De façon similaire à l'analyse de l'expression de la molécule de co-stimulation CD86, nous avons évalué la proportion de cellules stromales CMH-II^{hi} PD-L1⁺ par cytométrie en flux (**Figure 24A**). Bien que les résultats aient été obtenus à ce jour à partir de 1 à 3 échantillons, il est toutefois possible d'en dégager des tendances intéressantes. Les proportions de FRC, BEC et LEC CMH-II^{hi} des souris NZB/W malades qui expriment PD-L1 semblent être plus élevées par rapport aux souris NZB/W pré-lupiques (13,7 % *versus* 7 % FRC, 54 % *versus* 24 % BEC, 24 % *versus* 12,8 % LEC CMH-II^{hi} PD-L1⁺) (**Figure 24B, C, D**). Cette tendance ne semble pas être détectée entre les BEC des souris contrôles BALB/W jeunes et âgées, suggérant que la différence observée entre les BEC de souris lupiques pourrait être associée à la maladie (**Figure 24C**). A l'inverse, la proportion de LEC CMH-II^{hi} PD-L1⁺ semble augmenter avec l'âge chez les deux types de souris (**Figure 24D**). Toutefois de manière intéressante, la proportion de LEC exprimant fortement à leur surface les molécules de CMH-II et PD-L1 tend à être plus importante dans les échantillons de souris BALB/W âgées et jeunes par rapport respectivement aux échantillons de souris NZB/W malades et jeunes (44 % BALB/W âgées *versus* 24 % NZB/W âgées) et 23,8 % BALB/W jeunes *versus* 12 % NZB/W jeunes). Ces premiers résultats sont encourageants et nécessitent d'être approfondis car une faible proportion de LEC tolérogènes pourrait potentiellement être insuffisante dans l'induction et/ou le maintien de la tolérance périphérique et participer à la rupture de la tolérance dans un contexte lupique. Par ailleurs, un accroissement de la proportion de FRC, BEC, et LEC exprimant fortement les molécules du CMH-II et PD-L1 chez les souris malades par rapport aux souris NZB/W jeunes pourrait être une réponse au contexte inflammatoire lupique dans le but de limiter l'activation des LT, tel que cela a été proposé pour les vaisseaux lymphatiques des tumeurs (**Dieterich et al., 2017**). Enfin, l'ensemble de ces résultats seront à confirmer par cytométrie en flux sur davantage d'échantillons et l'expression génique de cette molécule par

les trois types de cellules stromales sera analysée par RNAseq (paragraphe V d. *Les FRC et LEC des souris lupiques expriment différemment les gènes codant pour les molécules de co-stimulation CD86 et de co-inhibition PD-L1*).

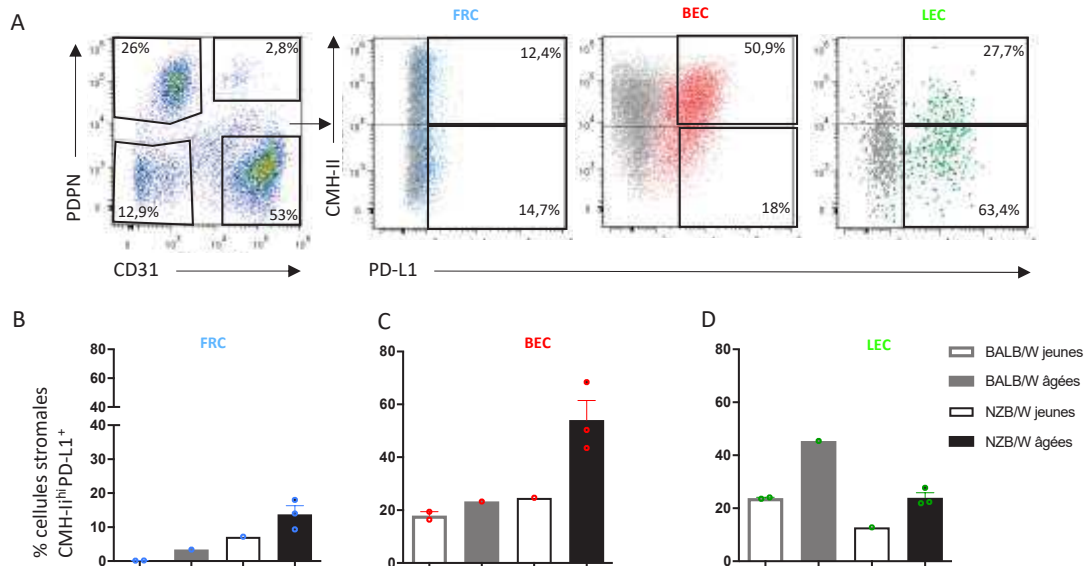


Figure 24 Expression de la molécule inhibitrice PD-L1 par les cellules stromales

A) Stratégie d'identification des cellules stromales exprimant CMH-II et PD-L1 dans les ganglions rénaux des souris lupiques NZB/W et contrôles BALB/W par cytométrie en flux, images représentatives d'une expérience réalisée à partir des ganglions de souris NZB/W malades âgées. **B-C-D)** Proportion de FRC(B), BEC(C), LEC(D) CMH-II^{hi} PD-L1⁺ parmi les FRC, BEC et LEC des ganglions lymphatiques rénaux des 4 groupes de souris. Chaque point représente une expérience indépendante dans laquelle les ganglions de 2 à 6 souris d'une même lignée et de même âge ont été regroupés lors de la digestion. Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne (Histogramme) ± SEM.

IV. Les cellules stromales sont-elles capables de présenter des auto-Ag lupiques ?

Nos résultats précédents ont mis en évidence une expression élevée des molécules du CMH-II par toutes les cellules stromales et une augmentation de la proportion de FRC exprimant fortement la molécule de co-stimulation CD86 dans les ganglions rénaux des souris NZB/W malades (17 %), suggérant qu'elles pourraient être des cellules présentatrices d'Ag efficaces. Nous nous sommes donc demandé si les cellules stromales étaient capables d'endocytter des (auto-) Ag et de les présenter dans le contexte du CMH-II. Plusieurs études, dans une situation basale, ont montré que les LEC peuvent capturer un Ag tel que l'ovalbumine par phagocytose et le présenter par réaction croisée dans le contexte du CMH-I aux LT CD8⁺, afin d'induire leur tolérance (Hirosue et al., 2014; Lund et al., 2012). Dans le but de tester notre hypothèse et d'être au plus proche de la physiopathologie, nous avons réalisé nos expériences avec des cellules stromales isolées des ganglions rénaux de souris lupiques et des nucléosomes comme auto-Ag « modèle ». En effet, dans le LED, un défaut de la clairance des

cellules apoptotiques conduit à la production d'auto-Ac dirigés contre divers antigènes nucléaires, dont les nucléosomes qui constituent la chromatine. Nous avons utilisé des nucléosomes marqués par un fluorochrome (Alexafluor-488) qui ont été produits au laboratoire, dans le cadre d'une étude visant à caractériser les LB auto-réactifs dans le contexte de la pathologie lupique (Gies et al., 2017). Par ailleurs, nous avons choisi de débiter cette étude en analysant la totalité des cellules stromales (CD45⁻) car la quantité de FRC, BEC ou LEC isolées est faible ce qui est un facteur limitant pour leur visualisation par microscopie confocale.

Lors d'un premier essai, nous avons mis en culture *in vitro* les cellules stromales CD45⁻ isolées de ganglions rénaux de souris NZB/W malades, en présence de nucléosomes fluorescents pendant 6 h à 37 °C. Puis, ces cellules ont été marquées avec des Ac anti-CD31 et anti-PDPN afin de discriminer les différentes sous-populations, puis fixées et observées par microscopie confocale. De façon intéressante, parmi deux images acquises sur sept, deux cellules CD31⁺ PDPN⁺ semblent présenter des nucléosomes fluorescents localisés au niveau de la membrane. Toutefois, malgré une représentation en 3D, nous ne pouvons savoir si ces nucléosomes sont localisés dans la membrane ou fixés à la surface cellulaire (Figure 25A). Ces résultats préliminaires étaient encourageants, cependant, les cellules stromales fixées étant très étalées, il était difficile de conclure sur une potentielle endocytose, une simple liaison à la surface ou un enchevêtrement dans la membrane cellulaire. Nous avons donc réalisé un deuxième essai de mise en culture des cellules stromales, en présence de nucléosomes, en observant et en enregistrant leur comportement au cours du temps sur une nuit grâce à un microscope confocal dans des conditions de culture optimales (37 °C, 5 % CO₂) (Figure 25B). Parmi les différentes images obtenues, nous avons pu noter que la plupart des cellules stromales n'adhèrent pas au support car elles présentent une morphologie arrondie. De plus, la majorité des cellules s'agrègent entre elles au cours du temps et les nucléosomes semblent se fixer aux cellules stromales lors de cette agrégation, ce qui suggère une forte mortalité cellulaire et une fixation aspécifique des nucléosomes. Dans le but d'identifier les sous-populations de cellules stromales pouvant retenir/présenter des nucléosomes j'ai récupéré et marqué ces cellules pour les analyser par cytométrie en flux. Le pourcentage de viabilité des cellules stromales après 18H de culture, en présence ou en absence de nucléosomes, était de 30 % en moyenne, ce qui confirme ce que nous observions sur les images acquises par microscopie (Figure 25C). Toutefois, les résultats préliminaires obtenus dans cette expérience montrent qu'une partie des cellules stromales CD45⁻ vivantes est associée aux nucléosomes fluorescents (43 - 45 %). Les FRC, BEC et LEC isolées des souris NZB/W et BALB/c tendent à retenir toutes les trois de manière similaire des

nucléosomes fluorescents après 18 h. La forte proportion de mortalité cellulaire observée au bout de quelques heures est un facteur limitant pour observer une potentielle endocytose d'auto-Ag et pourrait résulter d'une part, d'une trop faible quantité de cellules au départ ou d'autre part, de l'intensité des lasers utilisée pour l'acquisition des images en microscopie. Nous avons donc réitéré une expérience de mise en culture de cellules stromales en présence de nucléosomes mais cette fois uniquement par une analyse au cours du temps par cytométrie en flux. Cependant, nous n'avons malheureusement pas pu confirmer les résultats obtenus lors de la première expérience car nous n'avons pas observé de réel marquage des cellules stromales en présence des nucléosomes fluorescents (résultats non montrés). L'ensemble des données obtenues lors de ces trois essais laissent penser que les nucléosomes pourraient être présents à la surface des cellules stromales de manière spécifique ou aspécifique.

Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour répondre à notre question à savoir si des auto-Ag peuvent être activement endocytés, apprêtés et présentés (aux LT) par les cellules stromales dans un contexte lupique ; comme une mise au point de la culture de cellules stromales sur 24 h et l'identification de différents composants cellulaires.

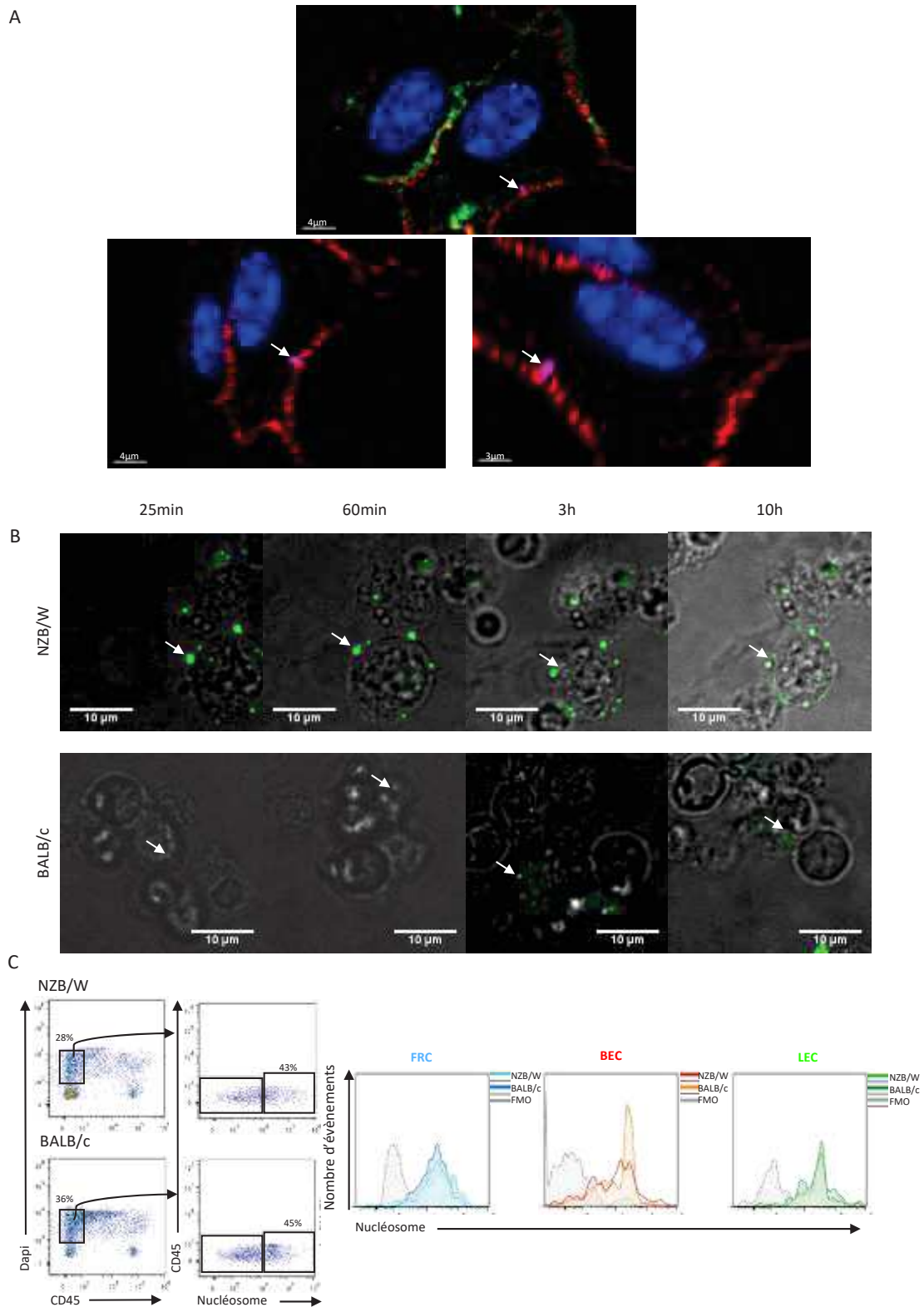


Figure 25 Étude de la capacité d'endocytose de nucléosomes par les cellules stromales

A) Images, obtenues par microscopie confocale, représentant une cellule stromale CD45⁺ de ganglions rénaux de souris NZB/W malades incubée avec des nucléosomes fluorescents (magenta) puis marquée avec des Ac anti-PDPN (rouge), anti-CD31 (vert) et du DAPI (bleu) identifiant le noyau. Grossissement 630 x **B)** Mise en culture, sur une nuit, des cellules stromales totales isolées de ganglions lymphatiques rénaux de souris NZB/W ou des ganglions lymphatiques cutanés et mésentériques de BALB/c, en présence de nucléosomes-AF488 (vert). Une image a été acquise toutes les 5min et les flèches pointent la même cellule à 25 min, 60 min, 3 h ou 10 h, grossissement 630 x. **C)** Analyse par cytométrie en flux des cellules stromales vivantes (DAPI⁻) identifiées parmi

les cellules CD45⁺ suite à l'imagerie réalisée sur une nuit (18 h). Les histogrammes représentent l'association des nucléosomes fluorescents (AF488) pour chaque sous populations de cellules stromales provenant de souris NZB/W malades ou de souris BALB/c contrôles.

V. Analyse transcriptomique comparative des cellules stromales des ganglions lymphatiques rénaux au cours de la pathologie lupique

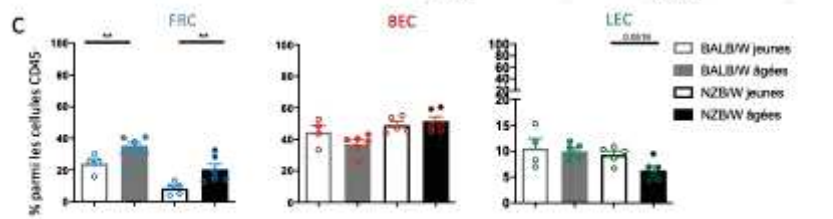
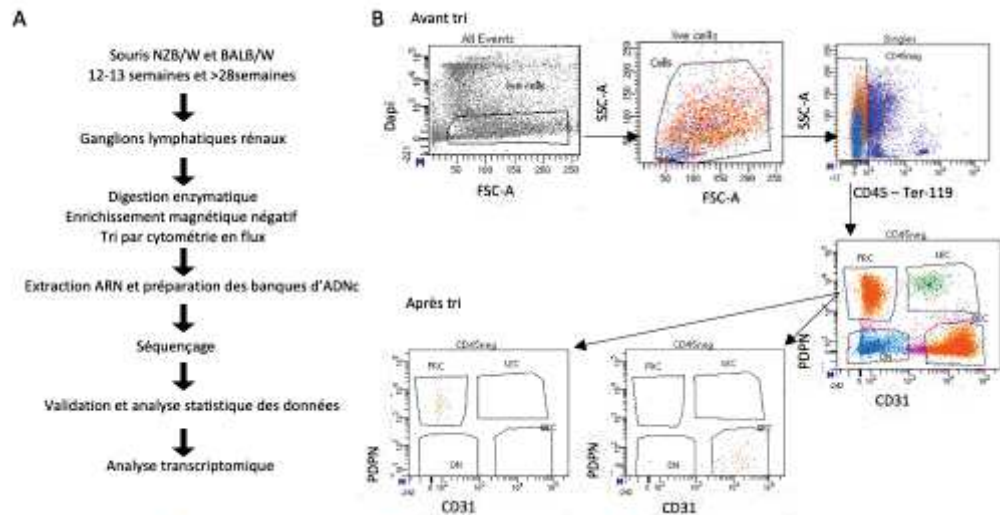
Dans les paragraphes précédents nous avons pu mettre en évidence par cytométrie en flux et par microscopie des modifications spécifiques quantitatives et phénotypiques du compartiment stromal au cours du développement de la maladie chez les souris lupiques NZB/W. Dans le but d'approfondir ces données et d'obtenir une vision étendue de la signature transcriptomique du compartiment stromal dans un contexte auto-immun, nous avons réalisé, en collaboration avec la plateforme Genomeast de l'IGBMC, une analyse par séquençage ARN des cellules stromales dans un contexte lupique avéré (souris NZB/W malades âgées de 28 à 43 semaines), un contexte pré-lupique (souris NZB/W jeunes de 12 à 13 semaines) et un contexte sain non lupique (souris BALB/W de mêmes âges que les souris NZB/W). Les deux groupes d'âges pour chaque lignée permettront d'une part de différencier les variations dues au développement de la pathologie de celles liées au vieillissement et d'autre part d'identifier des différences moléculaires pathologiques potentielles à un stade précoce et un stade avancé de la maladie par rapport à un contexte sain.

Cette analyse a été effectuée sur les FRC, BEC et LEC isolées et triées par cytométrie en flux à partir des ganglions lymphatiques rénaux prélevés chez 3 à 4 souris NZB/W ou BALB/W pour chaque réplicats (**Figure 26A, B**). La proportion des FRC, LEC et BEC parmi les cellules CD45⁺ a été déterminée avant le tri et est représentée sur la **Figure 26C**. Nous retrouvons l'augmentation de la proportion de FRC chez les souris lupiques malades par rapport aux souris pré-lupiques, que nous avons mis en évidence précédemment dans les ganglions lymphatiques rénaux (**Figure 20A**). Cependant, il semble que les résultats obtenus à partir du cytomètre en flux de la plateforme de tri ne révèlent pas les mêmes différences de proportion que nous avons observé entre les BEC de souris malades et les souris pré-lupiques ainsi qu'entre les FRC de souris BALB/W jeunes et âgées (**Figure 20A, Figure 26C**). Plusieurs facteurs techniques pourraient expliquer les différences entre ces deux résultats. D'une part, les analyses ont été réalisées à partir de deux cytomètres en flux différents, dont les sensibilités peuvent varier d'un appareil à l'autre, ce qui peut influencer légèrement l'analyse des populations cellulaires. D'autre part, l'objectif de cette expérience n'était pas d'étudier les proportions cellulaires mais d'obtenir des populations cellulaires pures pour le séquençage d'ARN, de ce fait, nous avons

effectué une stratégie d'identification très stricte, particulièrement pour les cellules CD45⁻ Ter-119⁻ (**Figure 26B**). La sélection des cellules n'exprimant pas les marqueurs CD45 et TER119 influence, par conséquent, les proportions des FRC, LEC et BEC. Cette différence de sélection des cellules CD45⁻ est un des paramètres qui pourrait expliquer les variations entre les résultats obtenus à partir des deux cytomètres en flux. Par ailleurs, il est à noter que le tri des cellules stromales ne peut être effectué que plus d'une heure après leur marquage. De par notre expérience, ces cellules sont particulièrement sensibles et bien qu'elles aient été maintenues dans la glace durant ce temps et qu'un marqueur de viabilité ait été utilisé, ce troisième élément physiologique pourrait également rentrer en compte dans les variations que nous observons entre nos résultats. En raison de ces divers facteurs pouvant influencer l'analyse des proportions des sous-populations de cellules stromales, nous avons choisi de privilégier, pour nos interprétations, les résultats qui ont été obtenus à partir cytomètre en flux de notre laboratoire à partir d'un nombre plus important d'échantillons.

Suite au tri des cellules stromales issues des ganglions rénaux des souris NZB/W et BALB/W, ce sont, au total, 66 échantillons correspondant à 4 à 6 réplicats pour chaque condition qui ont été fournis et traités par la plateforme de séquençage. Avant la préparation des bibliothèques d'ADNc, une étape intermédiaire a été réalisée pour contrôler par électrophorèse la présence d'ADNc dans chaque échantillon. Cependant, certains échantillons ne contenaient pas d'ADNc, les rendant inutilisable pour la préparation de la bibliothèque, ils ont donc été éliminés à cette étape. La préparation des bibliothèques ainsi que le séquençage ont donc été finalement réalisés sur 48 échantillons (4 réplicats par condition) (**Figure 26D**).

Enfin, le traitement des données obtenues et l'analyse statistique du nombre de gènes différentiellement exprimés pour chaque comparaison ont été effectués par une bio-informaticienne de la plateforme Genomeast (**Figure 26D, E**). Les gènes différentiellement exprimés ont été sélectionnés selon les seuils suivants : un niveau d'expression des gènes au moins deux fois supérieur ou inférieur par rapport à la condition choisie comme référence (valeur absolue en log₂ du facteur d'induction > 1) et dont la différence est statistiquement significative (valeur de p ajustée < 0,05) (**Figure 26E**).



D

Souris	NZB/W jeunes			NZB/W âgées et malades			BALB/W jeunes			BALB/W âgées		
Cellules stromales	FRC	BEC	LEC	FRC	BEC	LEC	FRC	BEC	LEC	FRC	BEC	LEC
Nombre de réplicats fournis	6	6	6	4	4	4	5	5	5	5	5	5
Nombre de réplicats séquencés	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Nombre de réplicats analysés	1	3	3	4	2	3	2	1	4	4	3	2

E

Nom de la comparaison A versus B	Nombre de gènes sur-exprimés A>B	Nombre de gènes sous-exprimés A<B	Nombre de gènes exprimés de manière significativement différente
BW.O.FRC vs BW.Y.FRC	40	25	65
BW.O.BEC vs BW.Y.BEC	21	10	31
BW.O.LEC vs BW.Y.LEC	171	6	177
BW.O.FRC vs BCW.O.FRC	1053	637	1690
BW.O.BEC vs BCW.O.BEC	200	151	351
BW.O.LEC vs BCW.O.LEC	307	68	375
BW.Y.FRC vs BCW.Y.FRC	101	34	135
BW.Y.BEC vs BCW.Y.BEC	695	85	780
BW.Y.LEC vs BCW.Y.LEC	123	61	184
BCW.O.FRC vs BCW.Y.FRC	416	277	693
BCW.O.BEC vs BCW.Y.BEC	534	73	607
BCW.O.LEC vs BCW.Y.LEC	109	37	146

Figure 26 Préparation des échantillons pour le séquençage ARN et analyses différentielles effectuées à partir de ces échantillons.

A) Représentation schématique du processus de traitement des échantillons de cellules stromales des ganglions lymphatiques rénaux pour le séquençage d'ARN. **B)** Stratégie d'identification et de tri des FRC, LEC et BEC par cytométrie en flux. Après tri, validation de la pureté des populations de FRC et BEC triées. En raison d'une faible quantité de LEC, la pureté de cette population n'a pas été vérifiée. **C)** La proportion des FRC (bleu), des BEC (rouge) et des LEC (vert) des ganglions lymphatiques rénaux a été déterminée avant le tri par cytométrie en flux (FACS Aria) selon la stratégie d'identification présentée sur la figure B. Chaque point représente une expérience indépendante dans laquelle les ganglions de 3 à 4 souris d'une même lignée et de même âge ont été regroupés lors de la digestion. Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne (histogramme) ± SEM. **p < 0,01 ;

(Mann-Whitney). **D)** Nombre de gènes significativement différentiellement exprimés dans chaque comparaison effectuée : BW_O : NZB/W âgées, BW_Y : NZB/W jeunes, BCW_O : BALB/W âgées, BCW_Y : BALB/W jeunes. Les gènes ont été sélectionnés selon une valeur de p ajustée < 0,05 et une valeur absolue en log2 du facteur d'induction > 1. **E)** Tableau récapitulatif du nombre d'échantillons préparés pour le séquençage ARN et finalement analysés après validation de la qualité des séquences.

Le nombre de séquençages, avant normalisation, pour chaque échantillon est représenté dans la **Figure 27**. Celle-ci montre une hétérogénéité (attendue) entre les différentes conditions, mais également entre les réplicats d'une même condition, hétérogénéité qui peut résulter d'une altération des séquences d'ARN. Une analyse statistique a été réalisée par la plateforme de séquençage afin de vérifier l'intégrité des séquences d'ARN, l'absence de biais expérimentaux et la validité de nos réplicats, en amont de l'analyse de l'expression génique différentielle.

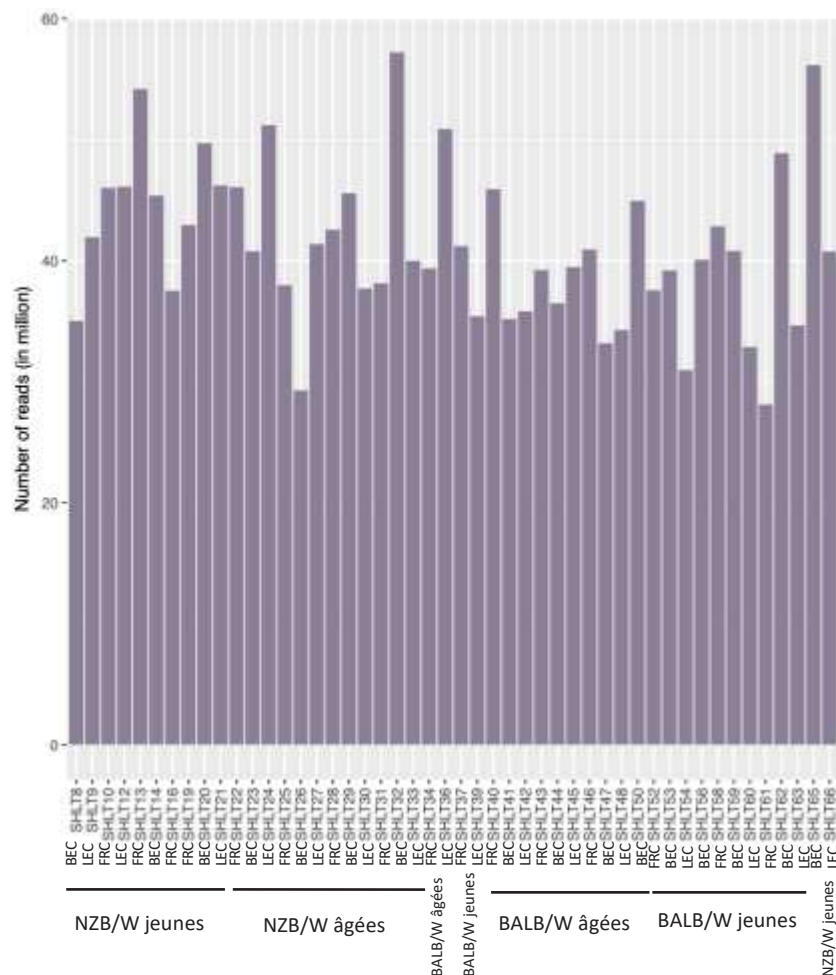


Figure 27 Nombre total de fragments séquencés (exprimé en millions) pour chaque échantillon

1. Contrôle qualité et validation des échantillons séquencés

Dans un premier temps, suite à l'alignement des fragments séquencés sur le génome, la qualité des transcriptomes a été contrôlée avec, entre autres, la médiane du score « Transcript Integrity Numbers » (TIN) qui reflète l'intégrité de l'ARN. Le score TIN est le pourcentage de transcrit ayant une couverture uniforme par les fragments séquencés, allant de 0 (ARN dégradé) à 100 (ARN non dégradé).

Pour certains échantillons (n° 8, 10, 12, 16, 19, 23, 26, 30, 41, 45, 48, 53, 56, 58, 61, 62) la médiane des scores TIN était très faible (inférieure à 40), ce qui suggère une altération des transcrits séquencés (**Figure 28A**).

Ces mêmes échantillons présentaient aussi un pourcentage élevé de fragments associés de façon unique aux régions génomiques intergéniques et introniques (**Figure 28B**). Par conséquent, nous avons exclu de l'analyse de l'expression génique différentielle les échantillons dont le score TIN était inférieur à 40, dont l'ARN était dégradé avant le séquençage, que sont les échantillons : n° 8 (BEC NZB/W jeunes), 10 (FRC NZB/W jeunes), 12 (LEC NZB/W jeunes), 16 (FRC NZB/W jeunes), 19 (FRC NZB/W jeunes), 23 (BEC NZB/W âgées), 26 (BEC NZB/W âgées), 30 (LEC NZB/W âgées), 41 (BEC BALB/W), 45 (LEC BALB/W âgées), 48 (LEC BALB/W âgées), 53 (BEC BALB/W jeunes), 56 (BEC BALB/W jeunes), 58 (FRC BALB/W jeunes), 61 (FRC BALB/W jeunes), 62 (BEC BALB/W jeunes).

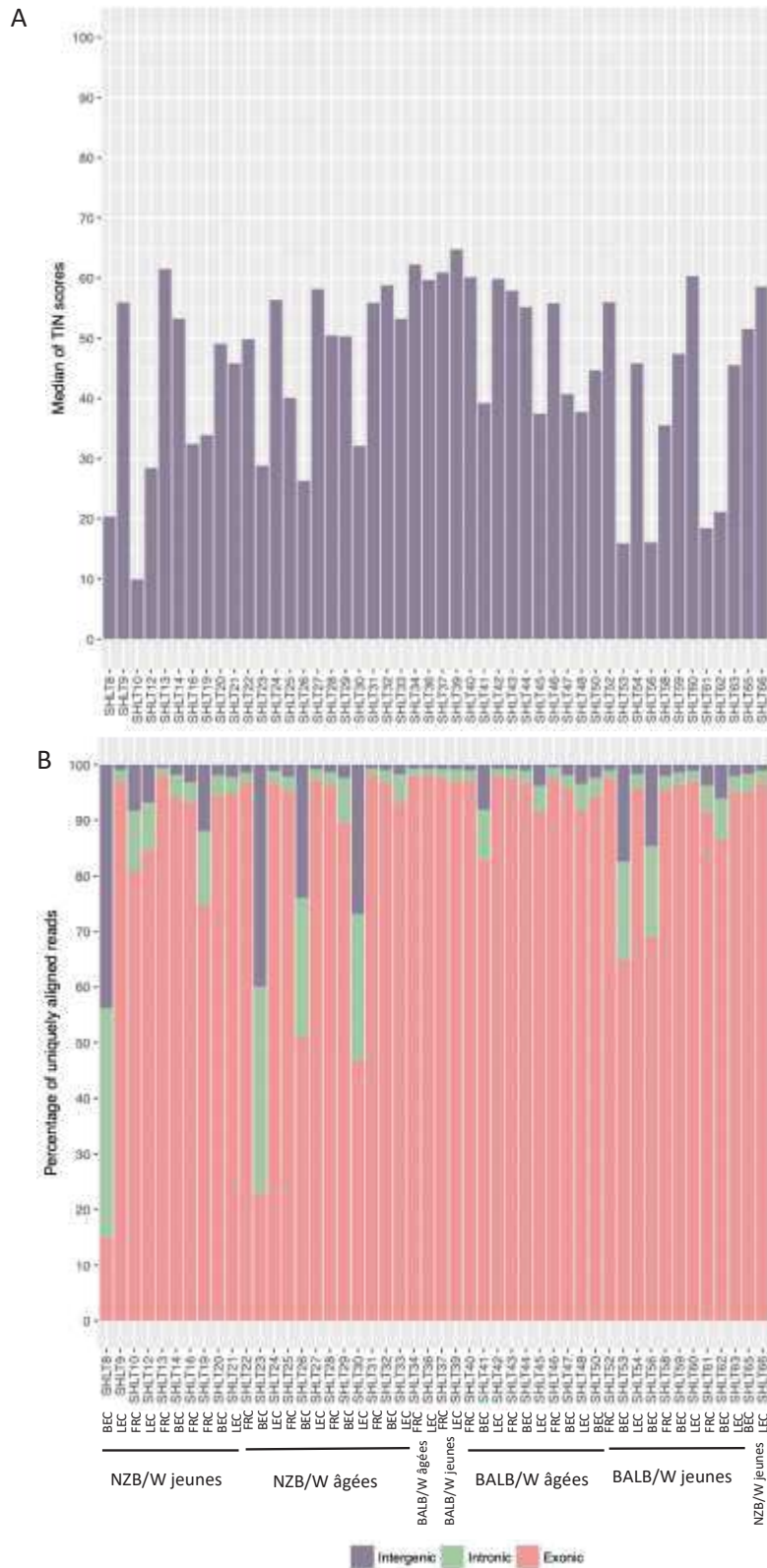


Figure 28 Alignement des fragments séquencés sur le génome de *Mus musculus*

A) Les histogrammes représentent la médiane des scores TIN « Transcript Integrity Numbers » pour chaque échantillon. Le score TIN est le pourcentage de transcrit ayant une couverture uniforme par les fragments séquencés, allant de 0 (ARN dégradé) à 100 (ARN non dégradé). **B)** Les histogrammes représentent la proportion de fragments qui ont été alignés sur le génome de référence au niveau d'exons (rouges), d'introns (vert), ou de régions intergéniques (violet), parmi tous les fragments alignés de façon unique.

Sur les échantillons sélectionnés d'après leur score TIN (**Figure 26C**), une analyse en composantes principales (PCA « Principal Component Analysis »), une méthode statistique permettant de visualiser la variabilité entre les échantillons, a été réalisée. Elle a permis de mettre en évidence une variabilité biologique entre les transcriptomes des différentes populations de cellules stromales ainsi qu'un regroupement entre les réplicats pour une même condition, qui sont attendus suite à cette analyse (

Figure 29).

En effet, lors d'une la première analyse en composantes principales comprenant la totalité des échantillons nous observons un pourcentage de variabilité élevé entre les réplicats et les échantillons, ce qui nous conforte donc dans la nécessité d'écarter des échantillons de mauvaise qualité pour l'interprétation des résultats. Toutefois, il est à noter que suite aux contrôles qualité de ces échantillons, certaines conditions ne contiennent plus qu'un réplicat, telles que les FRC de souris NZB/W jeunes et les BEC de BALB/W jeunes (**Figure 26C**). Nous avons tout de même choisi de réaliser les comparaisons avec ces conditions et les résultats que nous avons pu obtenir seront interprétés avec précaution.

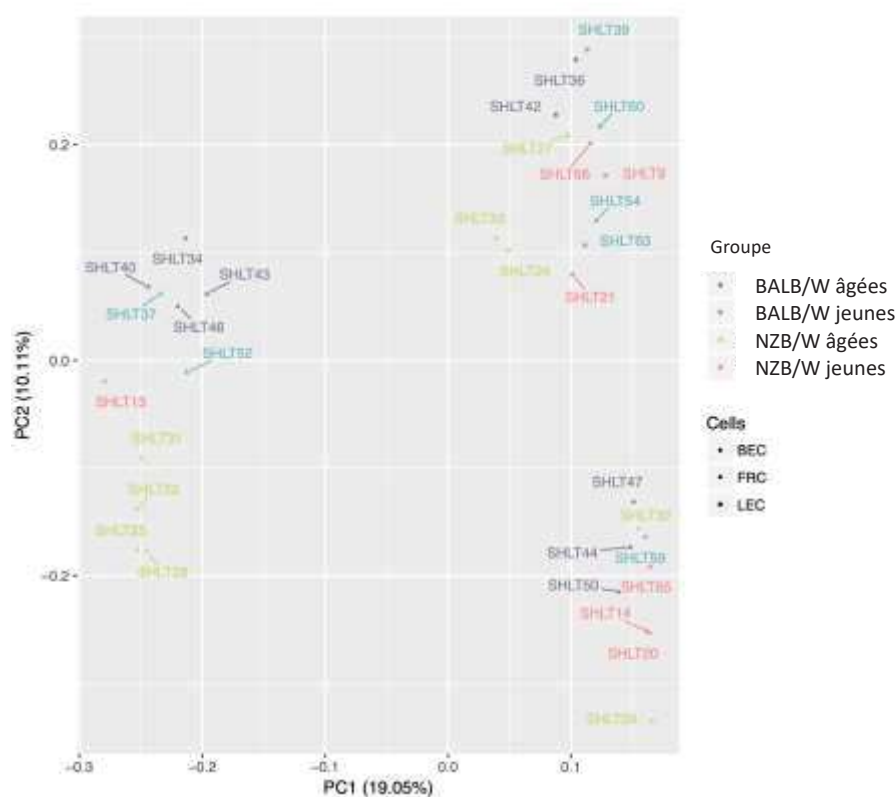


Figure 29 Analyse des composantes principales des gènes exprimés pour chaque échantillon

L'analyse PCA a été réalisée à partir des échantillons sélectionnés en amont avec un score TIN supérieur à 40. L'axe PC_i représente la composante principale *i* et le nombre entre parenthèses indique le pourcentage de la variance associée à cet axe.

Dans un deuxième temps, afin de valider l'identité de chaque sous-population de cellules stromales caractérisées, nous avons recherché l'expression des marqueurs spécifiques des cellules stromales, ainsi que l'absence d'expression des marqueurs de cellules lymphoïdes dans chaque échantillon gardé suite à l'analyse qualité (**Figure 30**). Le marqueur endothélial CD31 (PECAM1) est effectivement plus fortement exprimé par les LEC et les BEC. Les LEC expriment également plus fortement les marqueurs endothéliaux lymphatiques connus, tels que Prox1, Lyve1 et PDPN, dont l'expression de ces gènes n'est pas retrouvée dans les BEC (0,4 à 1,3 %). Le gène codant pour le récepteur 1 de VEGF (*Flt1*) exprimé principalement par les BEC est retrouvé très peu exprimé par les FRC (0,03 %) et par les LEC (1,92 %) (**Figure 30B, C**). Par ailleurs, les gènes connus comme étant exprimés par les FRC comme la desmine et les récepteurs A et B de PDGF (*Pdgfr*) sont fortement exprimés par cette population et peu exprimés par les BEC (0,7 %) et les LEC (2,9 %). Par conséquent, ces données attestent d'une étape de tri cellulaire efficace et peu de contamination entre les différentes populations cellulaires d'intérêt. Enfin, le faible niveau d'expression des gènes caractéristiques des cellules immunitaires (*Cd45*, *Cd3d*, *e*, *g* et *Cd4* pour les LT ; *Cd20* et *Cd19* pour les lymphocytes B ; *Cd11c* pour les cellules dendritiques et *Cd11b* pour les monocytes/macrophages) témoigne d'une absence de contamination par ces cellules (**Figure 30A, B, C**).

A	Lignage cellulaire	Gènes	FRC			
			BW O (n=4)	BW Y (n=1)	BCW O (n=4)	BCW Y (n=2)
marqueurs stromales	endothéliale	<i>Pecam1/Cd31</i>	8	59	4	8
	endothéliale	<i>Prox1</i>	5	8	14	24
	lymphatique	<i>Lyve1</i>	4	298	311	796
		<i>pdpn</i>	2083	598	1181	2600
		<i>Vwf</i>	6	13	11	29
	endothéliale sanguine	<i>Notch4</i>	55	66	48	8
		<i>Flt1/vegfr1</i>	4	0	1	0
	fibroblastique réticulaire	<i>Pdgfra</i>	6282	5769	3830	5555
		<i>Pdgfrb</i>	218	419	451	327
		<i>Desmine</i>	15660	25692	38729	18756
marqueurs non stromales	hématopoïétique	<i>Ptprc/Cd45</i>	44	50	16	116
	Lymphocyte T	<i>Cd3 (d, e, g)</i>	292	91	1	193
		<i>CD4</i>	6	7	0	36
	Lymphocyte B	<i>Ms4a1/Cd20</i>	52	0	146	16
		<i>Cd19</i>	5	0	41	0
	cellule dendritique	<i>Itgax/Cd11c</i>	17	0	0	1
macrophage	<i>Itgam/Cd11b</i>	1	0	2	0	
gène de ménage		<i>Hprt</i>	4309	2299	3252	2652
		<i>Actb</i>	25143	47320	107202	48719
B	Lignage cellulaire	Gènes	BEC			
			BW O (n=2)	BW Y (n=3)	BCW O (n=3)	BCW Y (n=1)
marqueurs stromales	endothéliale	<i>Pecam1/Cd31</i>	20120	14119	11050	8511
	endothéliale	<i>Prox1</i>	1	22	29	0
	lymphatique	<i>Lyve1</i>	130	1	263	1
		<i>pdpn</i>	0	1	106	0
		<i>Vwf</i>	207	328	106	464
	endothéliale sanguine	<i>Notch4</i>	1359	1334	1010	699
		<i>Flt1/vegfr1</i>	4476	6458	4340	2289
	fibroblastique réticulaire	<i>Pdgfra</i>	3	4	20	110
		<i>Pdgfrb</i>	5	1	14	1
		<i>Desmine</i>	1	72	288	287
marqueurs non stromales	hématopoïétique	<i>Ptprc/Cd45</i>	30	18	9	0
	Lymphocyte T	<i>Cd3 (d, e, g)</i>	59	168	145	0
		<i>CD4</i>	0	4	17	0
	Lymphocyte B	<i>Ms4a1/Cd20</i>	51	0	13	2
		<i>Cd19</i>	8	0	27	0
	cellule dendritique	<i>Itgax/Cd11c</i>	2	3	2	0
macrophage	<i>Itgam/Cd11b</i>	0	0	0	0	
gène de ménage		<i>Hprt</i>	7972	10007	10883	14977
		<i>Actb</i>	69248	48472	76255	45470
C	Lignage cellulaire	Gènes	LEC			
			BW O (n=3)	BW Y (n=3)	BCW O (n=2)	BCW Y (n=4)
marqueurs stromales	endothéliale	<i>Pecam1/Cd31</i>	3157	3619	4100	5526
	endothéliale	<i>Prox1</i>	1402	1250	1635	1515
	lymphatique	<i>Lyve1</i>	35334	23200	25550	18218
		<i>pdpn</i>	2032	2470	1220	2617
		<i>Vwf</i>	28	74	144	75
	endothéliale sanguine	<i>Notch4</i>	156	149	182	50
		<i>Flt1/vegfr1</i>	177	98	23	40
	fibroblastique réticulaire	<i>Pdgfra</i>	782	2	14	2
		<i>Pdgfrb</i>	11	4	0	0
		<i>Desmine</i>	1506	280	864	47
marqueurs non stromales	hématopoïétique	<i>Ptprc/Cd45</i>	11	6	10	6
	Lymphocyte T	<i>Cd3 (d, e, g)</i>	16	12	10	79
		<i>CD4</i>	1	3	0	0
	Lymphocyte B	<i>Ms4a1/Cd20</i>	8	9	59	1
		<i>Cd19</i>	0	0	20	0
	cellule dendritique	<i>Itgax/Cd11c</i>	17	1	0	0
macrophage	<i>Itgam/Cd11b</i>	2	0	0	0	
gène de ménage		<i>Hprt</i>	4876	7207	4376	6788
		<i>Actb</i>	67117	25902	176532	57581

Figure 30 Validation des populations de cellules stromales par séquençage ARN

L'expression des marqueurs spécifiques des FRC (A), des BEC (B) et des LEC (C) et des cellules hématopoïétiques est représentée par le nombre moyen de fragments normalisé (selon Anders and Huber 2010) et divisé par la médiane de la longueur des transcrits en kb pour ce gène. BWO : NZB/W âgées et malades ; BWY : NZB/W jeunes ; BCWO : BALB/W âgées ; BCWY : BALB/W jeunes. (n = nombre de réplicat pour cette condition)

L'ensemble de ces résultats, obtenus grâce à la vérification d'une part de l'intégrité des ARN et d'autre part de l'expression génique de marqueurs propres aux cellules stromales, permettent d'être confiants quant à la qualité et à l'identité cellulaire des échantillons utilisés pour l'analyse de l'expression différentielle des gènes. Toutefois, comme évoqué ci-dessus, le nombre d'échantillon est limité pour certaines conditions. Par conséquent, les résultats obtenus pour ces conditions reflètent des tendances qui seront à confirmer par de prochaines expériences de qPCR. Dans les paragraphes suivants, dans un premier temps je présenterai l'analyse de l'expression par les cellules stromales de gènes codant pour des molécules d'intérêt dont nous

avons précédemment évoqué le rôle dans la réponse immunitaire. Dans un deuxième temps, j'ai réalisé une analyse globale de la comparaison des profils transcriptomiques des trois sous-populations de cellules stromales entre des souris NZB/W âgées et malades et des souris de la même lignée jeunes ainsi qu'entre des souris NZB/W jeunes et aux souris contrôles de même âge, afin de mettre en évidence de nouveaux facteurs potentiellement associés à la progression de la pathologie lupique.

2. Les cellules stromales des souris lupiques présentent des variations d'expression des gènes associés à la régulation des cellules immunitaires

Tel que décrit dans le *paragraphe II Caractérisation quantitative du compartiment stromal des ganglions lymphatiques*, nous avons mis en évidence que le compartiment stromal des ganglions lymphatiques drainant les reins se développe et se réorganise pour soutenir la prolifération des cellules immunitaires chez les souris lupiques. Afin de savoir si cette modification pouvait se refléter au niveau des signaux de survie et d'attraction des lymphocytes produits par les cellules stromales, nous avons analysé l'expression normalisée de différents gènes d'intérêt (*Ccl19*, *Ccl21*, *Il-7*, *Cxcl12*, *Cxcl13*, et *Tnfsf13b*) chez les quatre groupes de souris (**Figure 31**, **Figure 32**). L'expression des gènes est représentée par le nombre moyen de fragments normalisé (selon la méthode proposée par Anders et Huber) et divisé par la médiane de la longueur des transcrits en kb pour ce gène, permettant de comparer les estimations d'expression entre les différents gènes et les échantillons (**Anders and Huber 2010**).

a. Les chimiokines CCL19 et CCL21 et la cytokine IL-7

Les chimiokines CCL19 et CCL21 sont nécessaires au recrutement dans les ganglions lymphatiques des LT et des cellules dendritiques qui expriment le récepteur CCR7 (**Gunn et al. 1999**). Comme ce qui est décrit dans la littérature pour l'expression de ces chimiokines par les cellules stromales, les gènes de ces deux chimiokines sont aussi retrouvés exprimés par les cellules stromales des souris lupiques NZB/W et des souris contrôles BALB/W (**Figure 31A, B**). De manière intéressante, les FRC de souris NZB/W malades semblent avoir un niveau d'expression de ces gènes plus élevé par rapport aux souris NZB/W jeunes. De plus, nous pouvons remarquer que le niveau d'expression du gène *Ccl21* dans les FRC est plus faible chez les souris lupiques NZB/W, qu'elles soient âgées ou jeunes par rapport à ces mêmes cellules chez des souris contrôles (nombre moyen de fragments normalisé = 170000 (NZB/W âgées) *versus* 510000 (BALB/W âgées) ou 53000 (NZB/W jeunes) *versus* 350000 (BALB/W jeunes)

(Figure 31A). Ceci pourrait être le reflet d'une différence associée au fond génétique auto-immun des souris NZB/W par rapport aux souris non malades.

D'autre part, des tendances intéressantes sont aussi observées entre les niveaux d'expression des gènes *Ccl19* et *Ccl21* dans les LEC de souris NZB/W malades par rapport aux souris NZB/W jeunes et aux souris BALB/W contrôles de même âge. En effet, les LEC de souris NZB/W âgées expriment plus fortement le gène de la chimiokine CCL21 par rapport aux souris contrôles BALB/W âgées (nombre moyen de fragments normalisé = 24000 *versus* 1300), ce qui semble aussi s'observer par rapport aux souris lupiques jeunes (nombre moyen de fragments normalisé = 6000) **(Figure 31A)**. En ce qui concerne la chimiokine CCL19, bien que sa production par les LEC ne soit pas classiquement reconnue, deux analyses transcriptomiques récentes ont révélé l'expression de ce gène par les LEC des ganglions lymphatiques de souris saines **(Berendam et al., 2019; Gregory et al., 2017)**. Ces données seraient cohérentes avec notre analyse montrant une expression du gène *Ccl19* dans les LEC des ganglions rénaux, toutefois le niveau d'expression reste plus faible comparativement aux FRC (nombre moyen de fragments normalisé = 2600 (LEC NZB/W âgées) *versus* 150000 (FRC NZB/W âgées)). Nous pouvons tout de même noter que l'expression de ce gène par les LEC paraît plus élevée chez les souris NZB/W malades par rapport aux autres souris NZB/W jeunes et aux souris contrôles BALB/W de même âge **(Figure 31B)**. Bien que la sécrétion de la chimiokine CCL19 par les LEC dans notre contexte soit à confirmer lors de futures expériences, ces données laissent penser qu'une forte expression de ces gènes (*Ccl19* et *Ccl21*) par les LEC de souris malades pourrait être associée au contexte inflammatoire et soutenir le recrutement des LT et des cellules dendritiques.

La migration des LT naïfs dans les ganglions lymphatiques est permise grâce au gradient de ces chimiokines mais leur survie dans les ganglions dépend en partie de la cytokine IL-7, sécrétée par les FRC et les LEC. Nous nous sommes donc également intéressés à l'expression du gène de l'IL-7 par les FRC et les LEC chez les 4 groupes de souris **(Figure 31C)**. Les FRC de souris malades présentent un niveau d'expression plus faible pour ce gène par rapport aux souris BALB/W contrôles de même âge (nombre moyen de fragments normalisé = 1400 *versus* 4400). Les premiers résultats que nous avons obtenus par qPCR confirmeraient ces données **(Figure 31D)**. De manière intéressante, nous pouvons observer que le niveau d'expression du gène de l'IL-7 (tout comme CCL21 et CCL19) semble être aussi plus bas chez les FRC de souris lupiques jeunes par rapport aux souris BALB/W contrôles de même âge **(Figure 31C)**, suggérant à nouveau une variation résultant d'une différence intrinsèque liée au fond génétique.

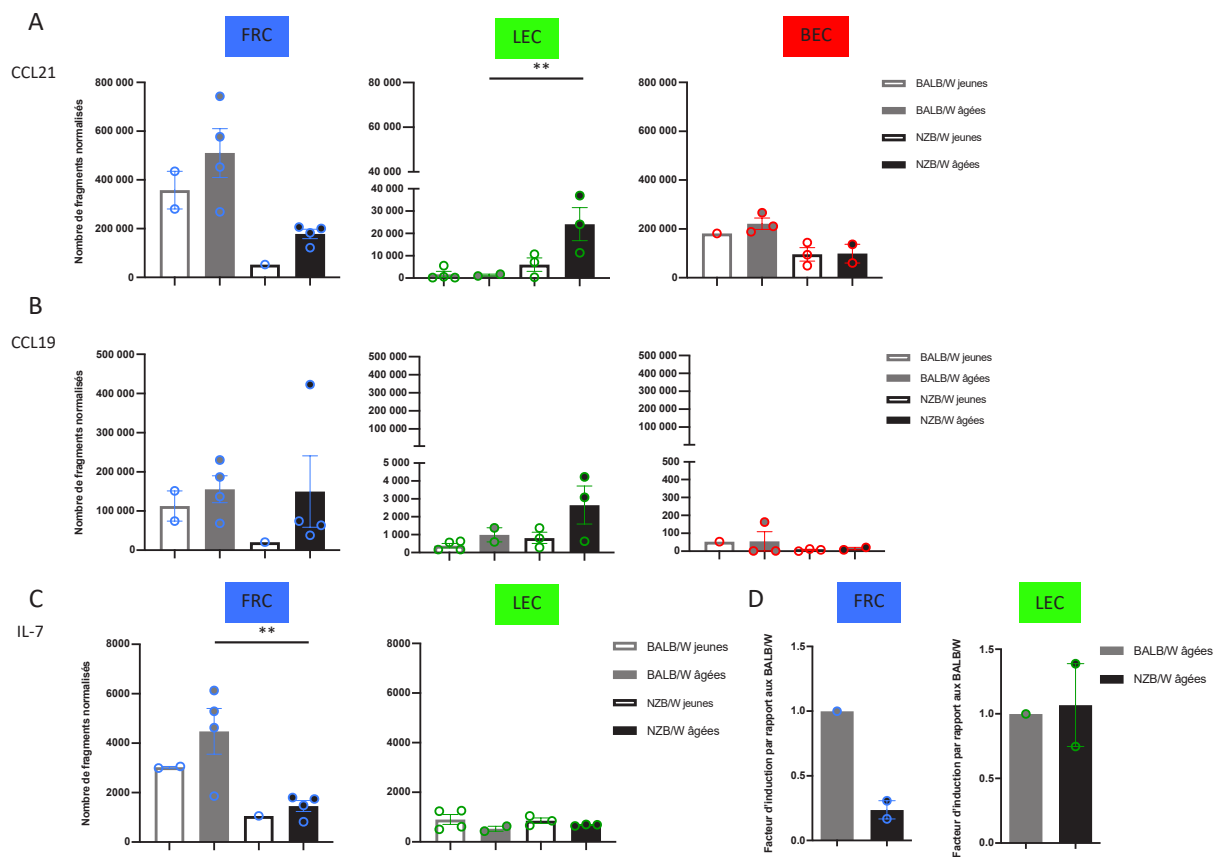


Figure 31 Les cellules stromales expriment des gènes associés à la régulation de la migration et de la survie des LT

A-B-C L'expression des gènes codant pour CCL21 (A), CCL19 (B) et IL-7 (C) a été déterminée par séquençage ARN pour chaque réplicat et est représentée par le nombre de fragments normalisé et divisé par la médiane de la longueur des transcrits en kb pour ce gène. ** p ajustée < 0,01 pour une valeur absolue du log2 du facteur d'induction > 1, test statistique de Wald. **D**) L'expression du gène codant pour l'IL-7 a été déterminée par qPCR dans les FRC et LEC triées à partir des ganglions rénaux de souris BALB/W et NZB/W âgées. Les résultats sont exprimés sous forme de facteur d'induction par rapport aux résultats obtenus pour les cellules isolées à partir des ganglions de souris BALB/W. A-B-C-D) Chaque point correspond à un réplicat composé des cellules issues des ganglions rénaux de 3 à 4 souris de même lignée et de même âge. Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne (histogramme) ± SEM.

Par ailleurs, nous pouvons noter qu'il n'y a pas de différence d'expression du gène codant pour l'IL-7 entre les LEC de souris NZB/W malades et ces mêmes cellules chez les souris BALB/W contrôles âgées, tel que nous l'avions observé par qPCR, avant le début du projet de séquençage ARN (**Figure 31C, D**).

b. Les chimiokines CXCL13 et CXCL12 et le facteur BAFF

Mis à part l'expression des chimiokines CCL21, CCL19 et de l'IL-7, les cellules stromales sont aussi responsables de la production de facteurs nécessaires à la régulation de la survie et du développement des LB tels que, les principaux facteurs CXCL13, CXCL12, et

BAFF. Dans le contexte de la pathologie lupique où il existe une réponse anormale des LB associée à la production d'auto-Ac, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'expression de ces facteurs par les cellules stromales (**Figure 32**).

A nouveau ici, nous pouvons observer des tendances intéressantes concernant les niveaux d'expression génique de la chimiokine CXCL13. Ce gène semble être exprimé plus fortement par les FRC de souris NZB/W malades par rapport aux souris NZB/W jeunes et BALB/W âgées (nombre moyen de fragments normalisé = 227000 *versus* 43000 (NZB/W jeunes) ou *versus* 28000 (BALB/W âgées)) (**Figure 32A**). Bien que cette chimiokine soit habituellement produite par les FDC, il a été montré qu'une inflammation peut induire son expression dans une sous-population de FRC localisée à proximité des follicules primaires, facilitant ainsi l'expansion du follicule B (**Mionnet et al., 2013**), ce qui suggère que la tendance observée pourrait être associée au contexte inflammatoire auto-immun. L'expression du gène *Cxcl13* tend également à être augmentée chez les LEC de souris NZB/W malades par rapport aux souris jeunes de la même lignée, mais cette tendance semble aussi s'observer entre les deux âges de souris contrôles BALB/W et sera donc à confirmer par qPCR (**Figure 32A**). Un niveau d'expression élevé pour ce gène dans les LEC et les BEC a aussi été constaté chez la souris dès le 3^e jour d'une infection virale par le virus de l'herpès (**Gregory et al., 2017**). Cependant, nous n'avons pas observé d'expression pour ce gène parmi les BEC des différentes conditions (nombre moyen de fragments normalisé » 17).

Par ailleurs, tel que décrit par différentes études en conditions saines et inflammatoires (**Cremasco et al., 2014; Huang et al., 2018; Malhotra et al., 2012; Rodda et al., 2018**), nous observons une expression des gènes codant pour la chimiokine CXCL12 et le facteur BAFF (*Tnfrsf13b*) par les FRC des quatre groupes de souris (**Figure 32B, C**). De manière intéressante, chez les FRC de souris NZB/W âgées malades, il semble y avoir une augmentation de l'expression du facteur BAFF, mais une diminution de l'expression de CXCL12 par rapport à l'échantillon de souris NZB/W jeunes et les souris contrôles BALB/W du même âge. Le niveau d'expression de ces gènes chez les souris BALB/W contrôles ne paraît pas fluctuer au cours du vieillissement, ce qui laisse penser que les variations observées pourraient être liées à la pathologie chez les souris lupiques. De plus, nous avons observé une augmentation significative de l'expression des gènes codant pour CXCL12 et BAFF par les LEC de souris NZB/W malades par rapport aux souris jeunes de même lignée et aux souris contrôles BALB/W âgées (**Figure 32B, C**).

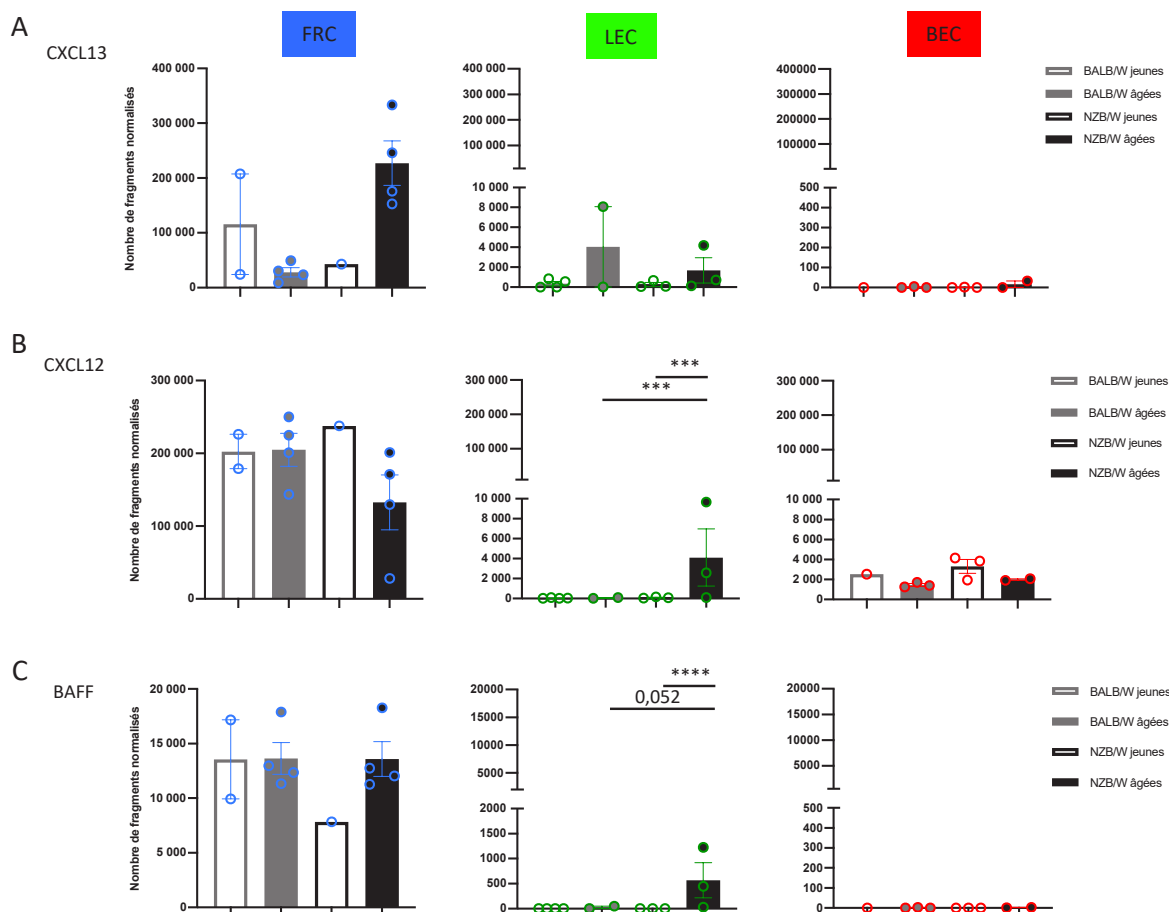


Figure 32 Les cellules stromales expriment des gènes associés à la régulation de la migration et du développement des LB

A-B-C) L'expression des gènes codant pour CXCL13 (A), CXCL12 (B) et BAFF (C) a été déterminée par séquençage ARN pour chaque réplicat et est représentée par le nombre de fragments normalisés et divisé par la médiane de la longueur des transcrits en kb pour ce gène. ***p ajustée < 0,001, **** p ajustée < 0,0001 pour une valeur absolue en log2 du facteur d'induction > 1, test statistique de Wald. Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne (histogramme) □ SEM. Chaque point correspond à un réplicat composé des cellules issues des ganglions rénaux de 3 à 4 souris de même lignée et de même âge.

En raison de l'expression du gène codant pour CXCL12 qui tend à diminuer dans les FRC des souris NZB/W malades il serait intéressant de quantifier l'expression du gène codant pour CXCL12 dans la totalité des ganglions lymphatiques rénaux par rapport aux souris de même lignée et aux souris contrôles BALB/W, afin de s'assurer d'une réelle dérégulation dans la situation lupique.

Cependant, concernant l'expression de CXCL12 par les LEC, nos résultats semblent contraires à ce qui a été précédemment observé ; c'est-à-dire l'absence d'expression de CXCL12 par les LEC des ganglions lymphatiques dans un contexte sain (Malhotra et al. 2012; Berendam et al. 2019). Toutefois, l'expression de cette chimiokine a été observée par les LEC en dehors des ganglions lymphatiques, tel que dans les tissus synoviaux chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Burman et al. 2005). Nous pouvons émettre l'hypothèse que dans un

contexte d'inflammation chronique les LEC de ganglions lymphatiques pourraient être reprogrammées et exprimer CXCL12 et BAFF. Quant à l'expression du gène *Cxcl12* et *Tnfsf13b* par les BEC, nous n'avons pas observé de différence du niveau d'expression entre les BEC des souris lupiques et contrôles pour ces gènes (**Figure 32B, C**).

En résumé, l'ensemble de ces données mettent en évidence chez les LEC une modification de l'expression de gènes associés à la régulation des LT et des LB au cours du développement de la maladie. Une augmentation de ces molécules pourrait contribuer à la migration des leucocytes, dont des LT et LB auto-réactifs, exprimant les récepteurs des chimiokines CCL19, CCL21 et CXCL12 (CCR7 et CXCR4) ainsi qu'au développement des LB, via l'expression des chimiokines CXCL12 et BAFF. Les tendances observées pour l'expression de ces gènes entre les LEC des souris NZB/W âgées et jeunes ne sont pas retrouvées au cours du vieillissement des souris BALB/W contrôles ce qui renforce l'hypothèse que l'expression génique de ces facteurs soit associée à l'inflammation et non à l'âge. Il est difficile de réaliser une conclusion préliminaire similaire pour le profil transcriptomique des FRC de souris NZB/W malades par rapport au seul réplicat de souris jeunes. Toutefois, l'expression génétique plus faible pour les chimiokines CCL21 et IL-7 dans les FRC des souris lupiques NZB/W par rapport aux FRC des souris contrôles BALB/W, bien que surprenante, crée une piste intéressante à approfondir. En effet, à l'inverse de ce que nous observons pour l'expression de la cytokine IL-7, Gonzalez-Quintial et collaborateurs ont mis en évidence une augmentation de la production d'IL-7 par les FRC des ganglions cutanés chez les souris lupiques MRL lpr/lpr (**Gonzalez-Quintial et al., 2011**). Chez les souris lupiques NZB/W, nous pourrions donc envisager l'hypothèse d'une défaillance potentielle du réseau de FRC dès le stade précoce de la maladie.

3. Le compartiment stromal des souris lupiques présente des modifications de l'expression des gènes associés à la présentation antigénique

Dans le *paragraphe III Étude du profil phénotypique et fonctionnel des cellules stromales des ganglions lymphatiques*, nous avons mis en évidence l'expression des molécules de CMH-II et des molécules de co-stimulation CD86 et de co-inhibition PD-L1 par les cellules stromales des ganglions lymphatiques rénaux. De plus, le compartiment stromal des souris lupiques montrent des variations de l'expression de surface de ces molécules par rapport au compartiment stromal des souris contrôles non malades (**Figure 21 Figure 23 Figure 24**).

Les données obtenues par séquençage ARN montrent une expression des gènes codant pour les chaînes α (a) et β (b) des molécules IA et IE (*H2-aa*, *H2-ab1*, *H2-eb1*, *H2-ea-ps*) par les FRC, BEC et LEC des souris NZB/W et BALB/W aux deux âges, ce qui confirme les résultats que nous avons obtenus par cytométrie en flux (**Figure 33**). Concernant les FRC, l'expression des gènes *H2-aa*, *H2-ab1*, *H2-eb1*, *H2-ea-ps*, est significativement plus élevée chez les FRC de souris malades par rapport aux souris NZB/W jeunes et aux souris contrôles BALB/W âgées (**Figure 33A**), ce qui est cohérent avec les résultats obtenus par cytométrie en flux pour ces cellules, dans ces conditions (**Figure 21**). Par ailleurs, par cytométrie en flux, les FRC de souris NZB/W jeunes présentaient moins de molécules de CMH-II à leur surface par rapport aux souris contrôles de même âge. Il semblerait également que ces 4 gènes soient deux fois moins exprimés (valeur absolue en log2 du facteur d'induction > 1) chez les souris pré-lupiques par comparaison aux souris BALB/W de même âge. Cependant, ces données ne sont pas significatives avec un échantillon de FRC NZB/W jeunes (valeur p ajustée > 0,3 (*H2-ab1*) ou > 0,9 (*H2-aa*, *H2-eb1*, *H2-ea-ps*)) et devront être confirmées par qPCR avec un plus grand nombre d'échantillons.

De plus, les FRC de souris malades ont un niveau d'expression augmenté pour le gène codant pour la chaîne invariante CD74 et tendent à exprimer plus fortement les gènes codant pour les chaînes α et β de H2-DM (*H2-dmb1*, *H2-dmb2*, *H2-dma*) par rapport aux souris jeunes NZB/W (nombre moyen de fragments normalisé *H2-dma* = 17500 *versus* 1300 (NZB/W jeunes) ou *versus* 2100 (BALB/W âgées)) (**Figure 33B, C**).

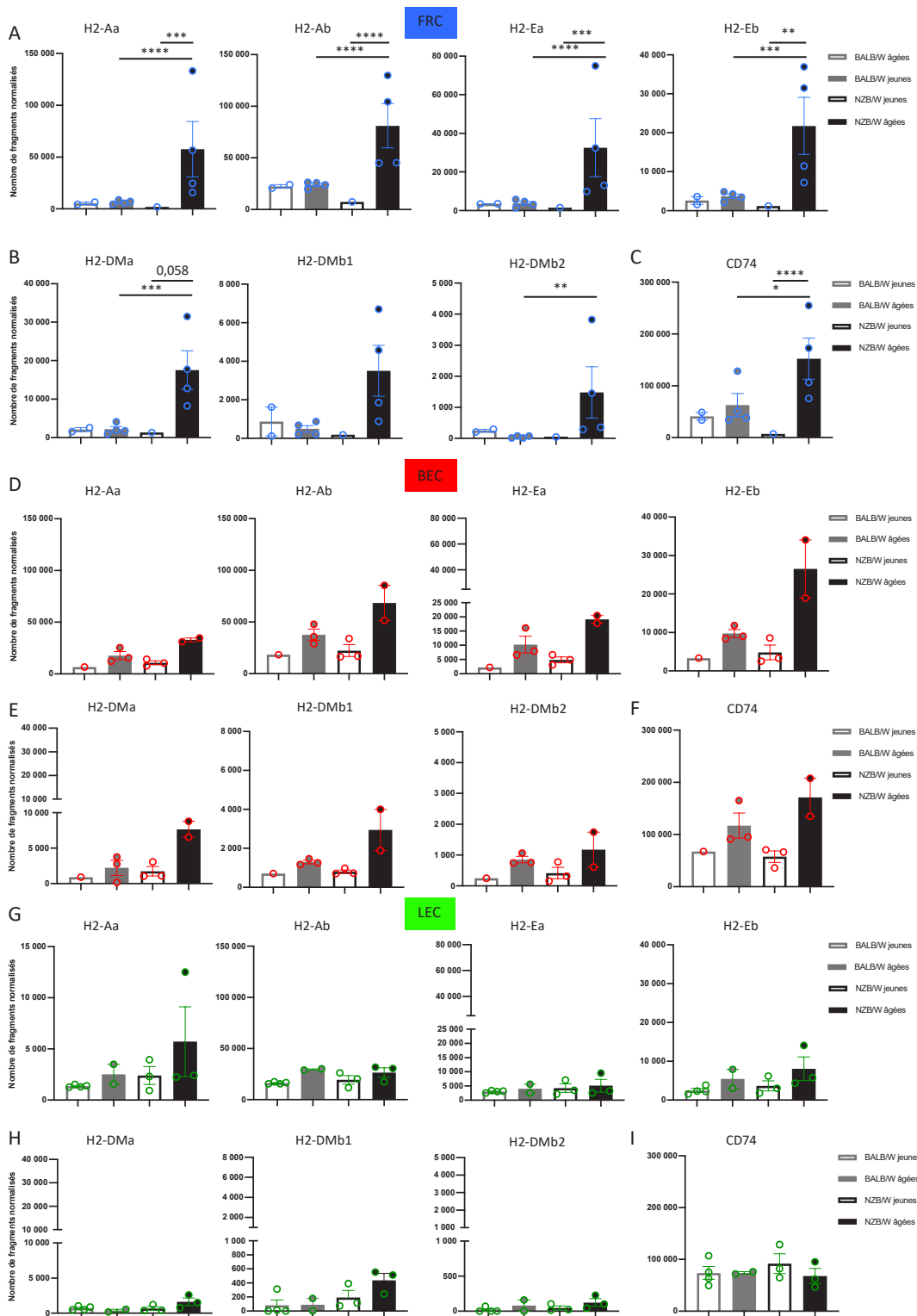


Figure 33 Les cellules stromales expriment les gènes codant pour les molécules du CMH-II

L'expression des gènes codant pour H2-A et H2-E (A-D-G), H2-DM (B-E-H) et CD74 (chaîne invariante) (C-F-I) a été déterminée par séquençage ARN pour chaque réplicat et est représentée par le nombre de fragments normalisés et divisé par la médiane de la longueur des transcrits en kb pour ce gène. *p ajustée < 0,05 ; **p ajustée < 0,01 ; ***p ajustée < 0,001 ; **** p ajustée < 0,0001 pour une valeur absolue en log2 du facteur d'induction > 1, test statistique de Wald. Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne (histogramme) □ SEM. Chaque point correspond à un réplicat composé des cellules issues des ganglions rénaux de 3 à 4 souris de même lignée et de même âge.

La chaîne invariante est liée au CMH-II, lors du transport de celui-ci du réticulum endoplasmique aux endosomes, et bloque le chargement de peptides endogènes sur le CMH-II. Par la suite, H2-DM catalyse l'élimination du peptide CLIP, formé précédemment lors de la dégradation de la chaîne invariante par les cathepsines, ce qui favorise le chargement des peptides exogènes sur le CMH-II. Par conséquent, les FRC seraient capables de présenter des Ag exogènes, ou endogènes, via le CMH-II aux LT CD4⁺ au cours de la pathologie lupique.

De la même façon que pour les FRC, nous avons mis en évidence par cytométrie en flux une expression élevée du CMH-II par les BEC, chez les souris malades par rapport aux souris NZB/W jeunes et BALB/W âgées. Le niveau d'expression de ces 4 gènes paraît, lui aussi et de manière cohérente, être plus élevé chez les BEC des souris malades par rapport aux souris jeunes et aux souris contrôles, mais, probablement en raison d'un nombre insuffisant de réplicats, les différences observées ne sont pas significatives (valeur de *p* ajustée pour H2-eb = 0,14 (BEC NZB/W jeunes) ou 0,39 (BEC BALB/W âgées)) (**Figure 33D**). De plus, le niveau d'expression des gènes codant pour les chaînes H2-DM tend également à être augmenté chez les BEC des souris malades par rapport aux souris pré-lupiques (nombre moyen de fragments normalisé *H2-dma* = 7600 *versus* 1700) (**Figure 33E**). L'expression du gène codant pour la chaîne invariante CD74 semble aussi être plus importante avec l'âge chez les BEC des souris NZB/W et BALB/W (**Figure 33F**).

Enfin, d'une façon inattendue, alors que nous avons observé des différences significatives d'expression du CMH-II à la surface des LEC entre les 4 groupes de souris, par cytométrie en flux, l'expression génique de CMH-II par les LEC paraît être globalement homogène entre toutes les conditions (**Figure 33G**). De plus, les gènes codant pour les chaînes H2-DM ne sont que très peu exprimés par les LEC des souris BALB/W ou NZB/W (nombre moyen de fragments normalisé = 1500 (*H2-dma*)), comparativement à l'expression observée par les FRC de souris malades (nombre moyen de fragments normalisé *H2-dma* = 17500) (**Figure 33H**). Ce résultat serait cohérent avec de précédentes études réalisées dans un contexte sain, suggérant que les LEC n'ont pas la capacité de charger des peptides dans le complexe du CMH-II en raison d'une absence d'expression de H2-DM (**Berendam et al., 2019; Rouhani et al., 2015; Santambrogio et al., 2019**). Nous n'observons pas de différence du niveau d'expression de la chaîne invariante par les LEC entre les quatre groupes de souris (**Figure 33I**). Ces données laissent donc penser que les variations de l'expression du CMH-II à la surface des LEC seraient probablement dû au transfert direct de complexe CMH-II-peptides par les cellules dendritiques,

tel que décrit par Dubrot et collaborateurs (**Dubrot et al., 2014**) et discuté dans le paragraphe *VI. Conclusion/discussion*.

Ces résultats transcriptomiques mettent en évidence une augmentation de l'expression génique du CMH-II et des molécules de la voie d'apprêtement de l'Ag par les FRC et les BEC des souris NZB/W malades, qui serait associée au contexte d'inflammation chronique. En effet, l'expression génique de ces derniers ne semble pas varier au cours de l'âge chez les souris contrôles et il a également été montré qu'un contexte inflammatoire, induit par le LPS ou par une infection virale, induit une augmentation de l'expression des gènes codant pour les molécules du CMH-II par les FRC, LEC et BEC ainsi que des chaînes H2-DM chez les FRC et BEC (**Gregory et al., 2017; Malhotra et al., 2012**).

Par ailleurs, nous n'avons pas remarquer de différence significative d'expression des gènes codant pour les molécules du CMH-I (H2-D, H2-K, b2m) par les FRC, BEC et LEC des souris NZB/W malades par rapport aux souris de la même lignée et aux souris contrôles BALB/W de même âge (résultats non montrés).

En ce qui concerne leur transcription, l'expression des molécules du CMH-II est régulée par CIITA, un transactivateur se liant à l'enhanceosome du CMH-II. L'expression de CIITA est sous le contrôle de 4 promoteurs différents (I, II, III, IV) et dans les cellules présentatrices d'Ag non professionnelles (hors cellules dendritiques, LB et macrophages), l'expression des molécules du CMH II est principalement régulée par *Ciita* IV. Ce promoteur est sensible à l'FN γ , ce qui induit l'expression des molécules du CMH-II par les fibroblastes et les cellules endothéliales sanguines (**LeibundGut-Landmann et al., 2004**). De même, il a été démontré que l'expression endogène des molécules du CMH-II est contrôlée par *Ciita* IV dans les cellules stromales des ganglions lymphatiques (**Dubrot et al., 2014**). Cependant, de manière inattendue, bien que les cellules stromales expriment les gènes codant pour des molécules du CMH-II et les présentent à leur surface, l'expression du gène *Ciita* est très faible (nombre moyen de fragments normalisé < 50) et pour certains échantillons non détectable (**Figure 34**). Il semble néanmoins que les FRC de souris malades présentent un niveau d'expression du gène *Ciita* légèrement plus élevé par rapport aux souris NZB/W jeunes et aux souris contrôles, ce qui pourrait correspondre avec l'expression génique et de surface des molécules du CMH-II dans ces cellules chez les souris malades.

Ces données pourraient être cohérentes avec le fait que nous n'avons pas pu détecter l'expression du gène codant pour CIITA par qPCR lors de nos premiers essais ainsi qu'avec les résultats obtenus dans un contexte sain par l'équipe du Dr. V. Engelhard lors d'un séquençage

ARN des LEC et BEC de ganglions lymphatiques. En effet, les auteurs ont également relevé un faible niveau d'expression basale de *Ciita* (« Fragments Per Kilobase Million » (FPKM) < 100) comparativement à l'expression des gènes du CMH-II par ces cellules (Santambrogio et al., 2019).

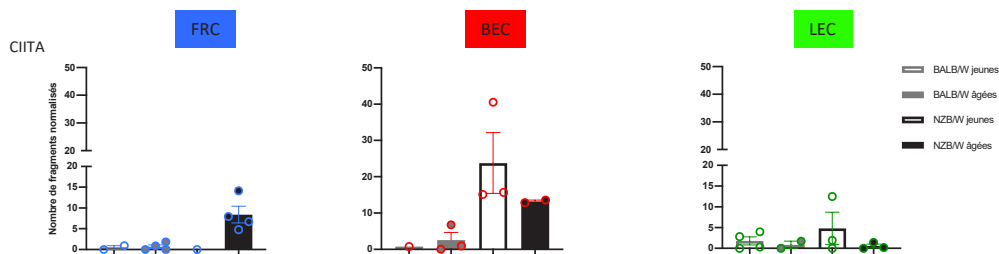


Figure 34 Le gène CIITA est faiblement exprimé par les cellules stromales

L'expression du gène codant pour CIITA a été déterminée par séquençage d'ARN pour chaque réplicat et est représentée par le nombre de fragments normalisé et divisé par la médiane de la longueur des transcrits en kb pour ce gène. Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne (histogramme) □ SEM. Chaque point correspond à un réplicat composé des cellules issues des ganglions rénaux de 3 à 4 souris de même lignée et de même âge.

4. Les FRC et LEC des souris lupiques expriment différemment les gènes codant pour les molécules de co-stimulation CD86 et de co-inhibition PD-L1

Dans le *chapitre 1 III Étude du profil phénotypique et fonctionnel des cellules stromales des ganglions lymphatiques*, nous avons mis en évidence par cytométrie en flux une proportion plus élevée de FRC exprimant à la fois fortement les molécules du CMH-II et la molécule CD86 chez les souris NZB/W malades par rapport aux souris contrôles BALB/W de même âge (pourcentage moyen = 17 % *versus* 5 % parmi les FRC totales). Les résultats obtenus pour ce gène grâce à l'analyse transcriptomique de ces cellules semble être cohérent avec ces observations. En effet, bien que l'expression basale du gène codant pour la molécule CD86 est faible dans les cellules stromales, nous pouvons noter une expression plus élevée de celui-ci chez les FRC de souris NZB/W malades, comparativement à celle observée chez les souris contrôles BALB/W âgées (nombre moyen de fragments normalisé = 39 *versus* 0) (Figure 35A). Ceci confirme également les résultats préliminaires que nous avons obtenus par qPCR pour l'expression de ce gène entre des souris NZB/W malades et des souris BALB/W âgées (Figure 23E). D'autre part, nous pouvons remarquer que l'expression de CD86 tend à être plus élevée dans un échantillon de BEC et de LEC des souris malades par rapport aux autres groupes de souris. De même, par cytométrie en flux sur un plus grand nombre d'échantillons, nous avons pu observer une légère augmentation ($P = 0,0571$) de la fréquence de LEC CMH-II^{hi} CD86⁺ chez les souris malades par rapport aux souris NZB/W jeunes (Figure 23B).

Par ailleurs, nous avons relevé des variations de la proportion de cellules stromales exprimant à la fois fortement les molécules du CMH-II et la molécule PD-L1 chez les souris NZB/W malades par rapport aux souris jeunes de la même lignée, suggérant des différences d'expression du gène codant pour PD-L1. De plus, il a été montré que dans un contexte inflammatoire les FRC et BEC présentent une augmentation de l'expression de la molécule inhibitrice PD-L1 (**Fletcher et al., 2010**). Cependant, nous n'observons pas de différences d'expression génique chez les FRC et BEC de souris NZB/W malades par rapport aux souris NZB/W jeunes et aux souris contrôles de même âge (**Figure 35B**) malgré une proportion de ces cellules CMH-II^{hi} PD-L1⁺ chez les souris NZB/W malades qui tendait à être plus élevée par rapport aux souris contrôles BALB/W en cytométrie en flux (**Figure 24B**). Quant aux LEC de souris NZB/W et BALB/W, elles expriment le gène codant pour la molécule PD-L1 et le niveau d'expression de ce gène est plus élevé que celui des FRC et des BEC (nombre moyen de fragments normalisé ~ 700 (LEC) *versus* 75 (FRC) ou *versus* 300 (BEC)), ce qui est cohérent avec d'autres études ayant mis en évidence l'expression de cette molécule par les LEC (**Cohen et al., 2014; Fletcher et al., 2010; Hirose et al., 2014; Tewalt et al., 2012**). De manière intéressante, nous avons observé par cytométrie en flux que la fréquence de LEC CMH-II^{hi} PD-L1⁺ chez les souris NZB/W malades semblait plus faible par rapport aux souris contrôles âgées (**Figure 24B**) et cette tendance semble cohérente avec une plus faible expression de ce gène chez les LEC de souris NZB/W âgées par rapport aux souris contrôles de même âge (**Figure 35B**). Bien que ces tendances soient à confirmer avec un plus grand nombre d'échantillons, une plus faible proportion de LEC exprimant fortement les molécules du CMH-II et la molécule co-inhibitrice PD-L1 chez les souris NZB/W malades par rapport aux souris saines de même âge pourrait être associée à un défaut de leur capacité tolérogène décrite dans la littérature (**Dubrot et al., 2014; Rouhani et al., 2015**).

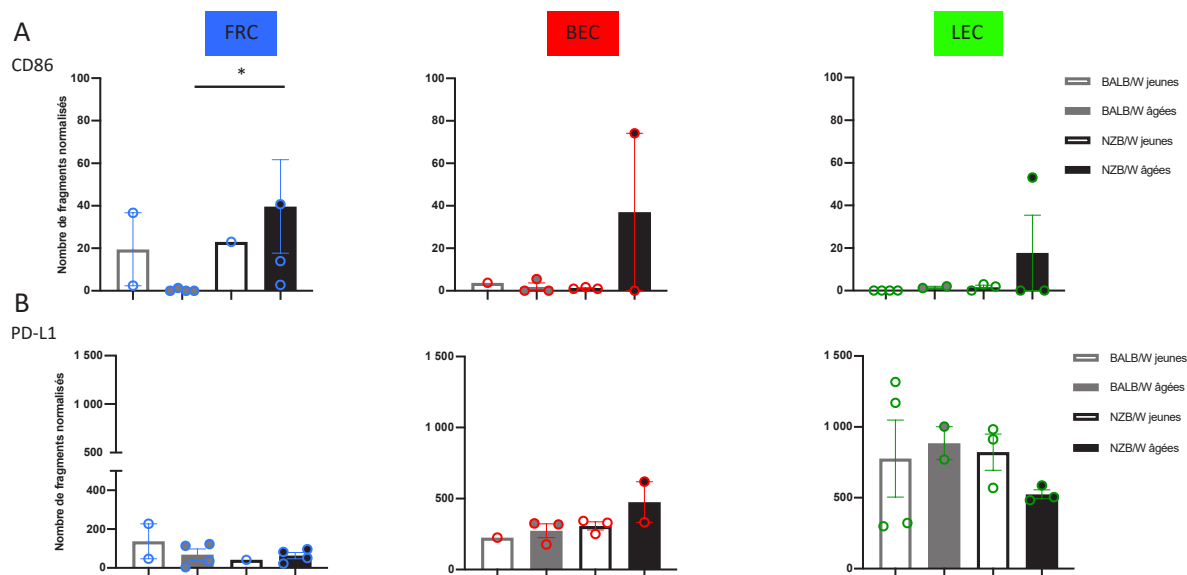


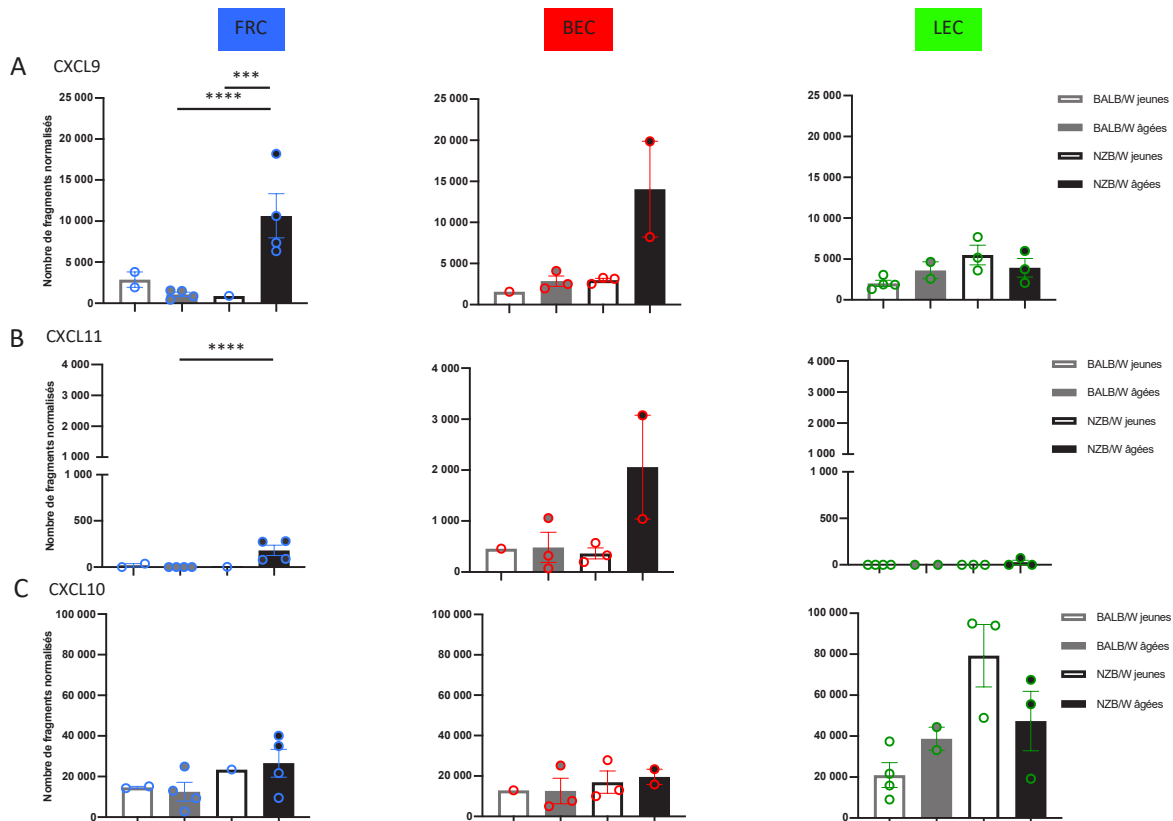
Figure 35 Les cellules stromales expriment les gènes codant pour les molécules CD86 et PD-L1

L'expression des gènes codant pour CD86 (A) et PD-L1 (CD274) (B) a été déterminée par séquençage ARN pour chaque réplicat et est représentée par le nombre de fragments normalisé et divisé par la médiane de la longueur des transcrits en kb pour ce gène. Chaque point correspond à un réplicat composé des cellules issues des ganglions rénaux de 3 à 4 souris de même lignée et de même âge. Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne (histogramme) □ SEM. *p ajustée < 0,05 pour une valeur absolue en log2 du facteur d'induction > 1, test statistique de Wald.

5. L'expression des gènes codant pour des chimiokines inflammatoires par les cellules stromales des souris lupiques suggère leur participation au contexte inflammatoire

Les chimiokines inflammatoires CXCL9/10/11 sont connues pour être principalement sécrétées par les monocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules cancéreuses en réponse à l'IFN γ . Celles-ci régulent majoritairement la migration, la différenciation et l'activation des cellules immunitaires, telles que les LT et les cellules dendritiques, via le récepteur CXCR3 (Tokunaga et al., 2018). Dans le lupus, différentes études ont mis en évidence dans les reins des modèles murins spontanés de lupus (NZB/W et MRL lpr/lpr) la présence de ces chimiokines inflammatoires et des cellules immunitaires exprimant le récepteur CXCR3, suggérant leur migration dans les reins et leur rôle dans le développement de la néphrite lupique (Lacotte et al., 2013; Menke et al., 2008; Steinmetz et al., 2009). De plus, notre équipe a précédemment mis en évidence que les chimiokines inflammatoires CXCL9, CXCL10, et CXCL11 sont surexprimées dans les reins de souris NZB/W malades et nous avons proposé que des plasmocytes CD138^{high} CMH-II⁺ CXCR3⁺ et les LT activés CXCR3⁺ migraient des OLS vers les reins enflammés en réponse à ces chimiokines (Lacotte et al., 2013) (Veber et al, données non publiées). Ainsi, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'expression de ces chimiokines par les cellules stromales

des ganglions lymphatiques drainant les reins. Les premières données obtenues grâce au séquençage ARN révèlent que les trois chimiokines sont exprimées par le stroma des ganglions rénaux des souris BALB/W et NZB/W. De façon intéressante, le gène codant pour la chimiokine CXCL9 est plus fortement exprimé par les FRC et par les BEC de souris NZB/W malades en comparaison aux souris contrôles de même âge et aux souris NZB/W jeunes (**Figure 36A**).



L'expression des gènes codant pour CXCL9 (A), CXCL11 (B) et CXCL10 (C) a été déterminée par séquençage ARN pour chaque réplicat et est représentée par le nombre de fragments normalisés et divisé par la médiane de la longueur des transcrits en kb pour ce gène. Chaque point correspond à un réplicat composé de cellules issues des ganglions rénaux de 3 à 4 souris de même lignée et de même âge. Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne (histogramme) □ SEM. ***p ajustée < 0,001 ; **** p ajustée < 0,0001 pour une valeur absolue en log2 du facteur d'induction > 1, test statistique de Wald.

De manière similaire, ces tendances sont retrouvées parmi les FRC et BEC de souris malades pour l'expression du gène *Cxcl11* (pour les BEC de souris NZB/W âgées le nombre moyen de fragments normalisé = 2000 *versus* 480 (BALB/W âgées) ou *versus* 360 (NZB/W jeunes)) (**Figure 36B**). L'expression de ces chimiokines dans les ganglions lymphatiques rénaux des souris malades pourrait être associé au contexte inflammatoire local et en réponse à la production d'IFN γ , entre autres, par les LT dans ce modèle (Enghard et al., 2006). En effet,

l'augmentation du niveau d'expression de ces chimiokines par les cellules stromales a aussi été observée dans les jours suivants l'induction d'une réponse immunitaire par des virus ou du LPS (**Gregory et al., 2017; Groom et al., 2012; Malhotra et al., 2012**). Nous pouvons également relever que le niveau d'expression de la chimiokine CXCL10 chez les LEC de souris NZB/W jeunes semble plus fort que celui observé chez les souris contrôles BALB/W de même âge (nombre moyen de fragments normalisé = 79000 *versus* 20000) (**Figure 36C**). Cette tendance est particulièrement intéressante car nous avons précédemment mis en évidence la production de CXCL10 par les podocytes dans les glomérules des souris NZB/W jeunes (**Veber et al, données non publiées**). Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une dérégulation intrinsèque, dans les ganglions rénaux et les reins, de cette chimiokine très tôt au cours du développement de la maladie pourrait participer ainsi à la mise en place de l'inflammation.

6. Le compartiment stromal des souris lupiques malades présente une signature transcriptomique activée en lien avec l'inflammation

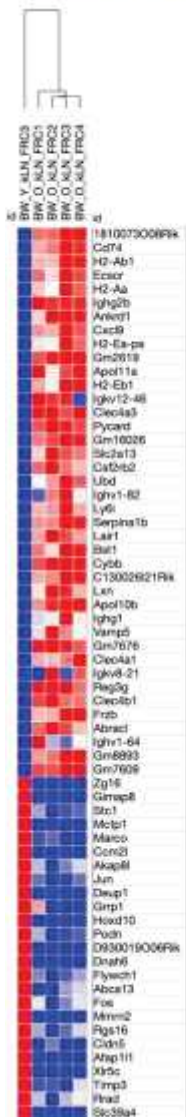
Comme présenté ci-dessus, le séquençage du transcriptome du compartiment stromal, chez des souris lupiques et des souris saines, nous a permis de réaliser tout d'abord une analyse ciblée sur des gènes connus pour être exprimés par le compartiment stromal, confirmant et précisant ainsi une partie de nos résultats obtenus par cytométrie en flux. La comparaison des signatures transcriptomiques complètes obtenues pour chaque sous-population de cellules stromales présente également le grand avantage de pouvoir obtenir une vision globale des processus modulés et de révéler de potentiels nouveaux acteurs moléculaires dans l'initiation et le développement de la maladie lupique. Dans cet objectif, j'ai ainsi analysé l'ensemble des gènes différentiellement exprimés par les FRC, BEC et LEC de souris NZB/W malades par rapport à leurs homologues chez des souris pré-lupiques. Ces gènes ont été sélectionnés d'après les mêmes seuils que précédemment : la valeur absolue en log₂ du facteur d'induction supérieure à 1 et une valeur de p ajustée inférieure à 0,05. Au total 65 gènes chez les FRC, 31 chez les BEC et 177 chez les LEC montrent un changement du niveau d'expression chez des souris NZB/W malades par rapport aux souris NZB/W jeunes (**Figure 26C**). Le fond génétique des animaux étant identique, ces résultats suggèrent donc que la différence d'expression observée est due à une réponse stromale dans le contexte auto-immun et/ou au vieillissement. L'expression normalisée de ces gènes, différentiellement exprimés par les cellules stromales des souris malades par rapport aux souris pré-lupiques, est représentée par une carte de fréquentation avec chacun des réplicats utilisés dans l'analyse statistique (**Figure 37**). Le

regroupement hiérarchique entre les échantillons de FRC ou de BEC reflète la similitude des profils transcriptomiques des réplicats d'une même condition (NZB/W malades ou NZB/W pré-lupiques) (**Figure 37A, B**). Toutefois, le regroupement hiérarchique entre les échantillons de LEC met en évidence une légère différence du profil transcriptomique d'un réplicat de souris malades (BW_O_kLN_LEC2) par rapport aux deux autres (**Figure 37C**). Cependant, il est à noter qu'un réplicat biologique est un regroupement d'un type de cellules stromales, isolé à partir de plusieurs souris, ce qui peut contribuer à la variabilité que nous observons entre les réplicats.

Afin de déterminer les processus biologiques correspondant aux gènes différentiellement exprimés par le stroma de souris NZB/W malades, nous avons utilisé le logiciel « Metascape ». Metascape permet d'identifier les termes d'ontologie génétique (« Gene Ontology (GO) term ») associés à chacun des gènes puis génère un regroupement des termes GO statistiquement les plus représentés. Par conséquent, ceci a permis d'identifier les principaux processus biologiques, donc un ensemble de gènes, variant dans un contexte lupique avéré par rapport à un contexte lupique précoce. Nous avons ainsi classé ces gènes en fonction de leurs rôles principaux dans différentes catégories : les gènes associés aux processus de formation des vaisseaux et de la matrice extracellulaire, à la réponse inflammatoire, à la régulation des cellules immunitaires, et à l'organogénèse du rein.

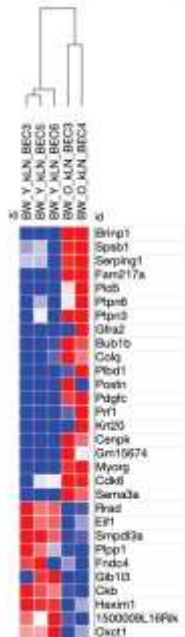
A FRC NZB/W malades
versus
FRC NZB/W pré-lupiques

Log2 du nombre de fragments normalisés
0 19



B BEC NZB/W malades
versus
BEC NZB/W pré-lupiques

Log2 du nombre de fragments normalisés
0 11



C LEC NZB/W malades
versus
LEC NZB/W pré-lupiques

Log2 du nombre de fragments normalisés
0 18



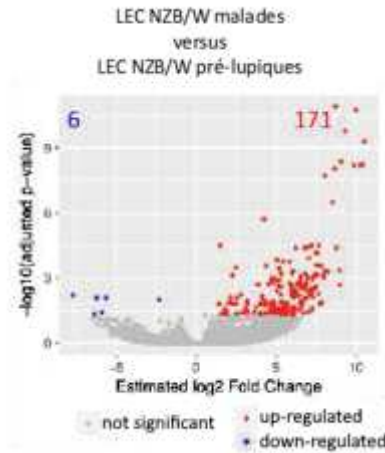
Figure 37 Carte de fréquentation de l'expression des gènes différemment exprimés entre des souris NZB/W âgées malades et des souris NZB/W jeunes pré-lupiques

A-B-C) Regroupement hiérarchique des gènes différentiellement exprimés pour chaque réplicat de FRC, BEC et LEC de souris NZB/W âgées malades (BWO) et de souris NZB/W jeunes pré-lupiques (BWY). L'expression des gènes est représentée en \log_2 du nombre de fragments normalisé entre les échantillons et divisé par la médiane de la longueur du transcrit de chaque gène en kb. Ces gènes ont été sélectionnés selon les seuils suivants : une valeur de p ajustée $< 0,05$ et une valeur absolue en \log_2 du facteur d'induction > 1 . La carte de fréquentation a été réalisée à l'aide du logiciel Morpheus.

- a. Les variations d'expression des gènes du développement des vaisseaux et de la matrice extracellulaire suggèrent un remodelage du microenvironnement stromal des ganglions lymphatiques rénaux au cours de la réponse auto-immune

Parmi les 171 gènes sur-exprimés par les LEC issues des ganglions rénaux de souris NZB/W malades par rapport aux souris pré-lupiques, un grand nombre d'entre eux a été associé aux processus biologiques de développement des vaisseaux sanguins et lymphatiques, à l'organisation de la matrice extracellulaire, à la réponse aux blessures ainsi qu'à la migration cellulaire, suggérant une expansion des vaisseaux lymphatiques et/ou sanguins au cours de la réponse auto-immune (**Figure 38**). De plus, dans le chapitre *II Caractérisation quantitative du compartiment stromal des ganglions lymphatiques*, nous avons mis en évidence une augmentation de l'aire des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que du nombre absolu des cellules endothéliales plus élevé dans les ganglions rénaux des souris NZB/W malades par rapport aux souris pré-lupiques (**Figure 19**). En effet, parmi ces gènes on retrouve, entre autres les gènes codant pour le facteur de croissance VEGF (*Vegfd*), le récepteur au facteur de croissance PDGF (*Pdgfra*) qui sont des facteurs impliqués dans la formation des vaisseaux lymphatiques (**Jitariu et al., 2015**) ainsi que la protéine SRPX2 (« sushi-repeat-containing protein, X-linked 2 »), qui joue un rôle dans l'angiogenèse en induisant la migration des cellules endothéliales et la formation de cordons vasculaires (**Liu et al., 2017**).

A



B

Gene Ontology term (processus biologique)
Développement des vaisseaux sanguins Chil1,Col3a1,Col4a1,Col4a2,Col1a2,Dcn,Ecm1,Vegfd,Ccn2,Foxs1,Gpc3,Hpgd,Jun,Lif,Lrp1,Mmp2,Ntrk1,Pdgfra,Plau,Prx1,Ccl11,Cxcl12,Tcf21,Grem1,Srpx2,Sash1,Arhgap24,Wasf2,Egfr,Spry1,Slc11a1,Ash1,Ccnd2,Lhx8,Gpr88
Organisation de la matrice extracellulaire Adam19,Col3a1,Col4a1,Col4a2,Col6a1,Col1a2,Dcn,Loxl1,Lum,Mmp2,Mmp3,Pcolce,Vtn,Htra1,Mfap4,Adams2,Ccn2,Pdgfra,Grem1,Adams14,Olfml2b,Ccnd2,Egfr,Vegfd,Jun,My19,Cxcl12,Dpysl3,Tuba8,Gna14,Rab7b,Fgf7,Cdh4,Dsc3,Pcsk6,Ntrk1,Adh1,Ccl11,Cald1,Syno2,Wasf2
Ossification Col1a2,Ecm1,Gpc3,Mgp,Clec3b,Grem1,Omd,Cd276,Os2,Isg15,Fhl2,Ccn2,Mmp2,Ifftm1,Lrrc17
Réponse au facteur de croissance Col3a1,Col4a2,Col1a2,Dcn,Egfr,Fgf7,Vegfd,Ccn2,Gpc3,Hpgd,Jun,Ntrk1,Pdgfra,Grem1,Spry1,Htra1,Htra3,Cald1,Cilp,Col4a1,Col6a1,Pcsk6,Wasf2,Apod,Lrp1
Réponse aux blessures Serpin1,Col3a1,Egfr,F5,Fgf7,Jun,Lrp1,Mmp2,Slc11a1,Pdgfra,Plau,Dpysl3,Wfcd1,Eldr,Serpina10,Syt11,Arhgap24
Compléments et cascades de coagulation Serpin1,C1qb,C4b,Cfi,F5,Plau,Vtn,C1s2,Fcgr3,Jun,Iff203,Ighg1,Mmp2,Slc11a1,Tnfsf13b,Cd276,Rab7b,Iff205
Régulation positive de la prolifération des cellules épithéliales Ccn2,Ecm1,Egfr,Fgf7,Vegfd,Jun,Ccl11,Cxcl12,Htra1,Os2,Gpc3,Plau,Wfcd1,Mmp3,Tnfsf13b,Lif,Pdgfra,Apod
Développement du système respiratoire / Développement du rein / morphogénèse tissulaire Chil1,Fgf7,Ccn2,Gpc3,Lif,Mgp,Pdgfra,Tcf21,Spry1,Ano1,Adams2,Grem1,Os2,Col4a1,Ccl11,Cxcl12,Col3a1,Col6a1,Egfr,Mmp2,Arhgap24,Klf15,Plau,Ntrk1,Vtn,Sh3bp5
Protéine d'adhésion à la matrice des cellules musculaires lisses Apod,Plau,Vtn,Col1a2,Dcn,Egfr,Gpc3,Lum,Mmp2
Développement du système squelettique Col6a1,Col1a2,Ecm1,Ccn2,Hoxc4,Mgp,Mmp2,Pdgfra,Prx1,Clec3b,Grem1,Lrrc17,Os2,Ash1,Wasf2,Tcf21
Régénération Jun,Lif,Lrp1,Mmp2,Plau,Prx1,Cxcl12,Vtn,Dpysl3,Hpgd,Apod,Egfr
Régulation négative de l'activité des peptidases Serpin1,Dpep1,Ecm1,Gpc3,Hspa1b,Serpina3c,Vtn,Wfcd1,Itih5,Serpina10,Spry1,Ccn2,Clec3b,Hspa1a,Sh3bp5
Régulation positive de la migration cellulaire Egfr,Fgf7,Vegfd,Jun,Lrp1,Mmp2,Mmp3,Pdgfra,Plau,Ccl11,Cxcl12,Vtn,Srpx2,Sash1,Syno2,Tcf21,Ash1
Processus métabolique du collagène Col1a2,Ccn2,Mmp2,Mmp3,Mfap4,Cygb,Adams2
Maturation des phagosomes Srpx,Slamf8,Rab7b,Syt11
Réponse inflammatoire Apod,Serpin1,Chil1,Ecm1,Egfr,Fcgr3,Ighg1,Jun,Lrp1,Slc11a1,Saa3,Ccl11,Wfcd1,Slamf8,Ill34,Cd276,Ash1,Vegfd,Pdgfra,Plau,Cxcl12,Grem1,Htra1,Sash1,Syt11,Iff203,Mmp2,Rab7b,Iff205
Réponse au TGFb Col3a1,Col4a2,Col1a2,Hpgd,Jun,Htra1,Htra3,Cald1,Cilp,Gpc3,Grem1,Dcn,Spry1,Vegfd
Régulation négative de la migration cellulaire Apod,Col3a1,Dcn,Dpep1,Lrp1,Cxcl12,Dpysl3,Grem1,Slamf8,Cygb,Ccl11,Ccn2,Plau,Vtn,Fcgr3,Vegfd,Pdgfra,Saa3,Cdh4,Fgf7,Ntrk1,Serpin1,Htra1,Lrrc17,Cd276,Rab7b,Ecm1
Dégradation du Kérotan sulfate Lum,Ogn,Omd,Dcn,Gpc3,Pygl
Voie de signalisation MAPK Egfr,Fgf7,Hspa1b,Jun,Ntrk1,Pdgfra,Hspa1a

Figure 38 Analyse des gènes différentiellement exprimés par les LEC de souris lupiques malades par rapport aux souris pré-lupiques

A) Comparaison des profils transcriptomiques des LEC de souris NZB/W malades par rapport aux souris pré-lupiques jeunes sous forme d'un volcano-plot représentant le log10 de la valeur de p ajustée en fonction du log2 du facteur d'induction estimé. B) Les termes d'ontologie génique (Gene Ontology (GO) term) des processus biologiques ont été déterminé pour les gènes différentiellement sur-exprimés par les LEC de souris NZB/W malades par rapport aux souris NZB/W jeunes à l'aide du logiciel « Metascape ». Les gènes significatifs ont été sélectionnés avec les seuils suivants : valeur de p ajustée < 0,05 et valeur absolue du log2 du facteur d'induction > 1

Par ailleurs, les FRC de souris malades présentent une diminution de l'expression du gène codant pour la protéine multimerin 2 (*Mmrn2*), un antagoniste de VEGFR, suggérant une contribution au développement des vaisseaux (**Figure 39**). Cependant, bien que les BEC de souris malades présentent une augmentation du gène *Pdgfc* codant pour un facteur de croissance PDGF favorisant l'angiogenèse (**Lee et al., 2013**), une partie des gènes sur-exprimés est aussi associée à la régulation négative du cycle cellulaire. Ce sont les protéines : BUB1 (une kinase d'un point de contrôle mitotique), CDK6 (« Cyclin dépendant kinase 6 »), PTPN3, PTPN6 (« Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 3 ou 6 ») et BRINP1 (« BMP/retinoic acid-inducible neural-specific protein 1 ») (**Figure 40**). En revanche, le nombre de BEC est significativement plus élevé dans les ganglions rénaux de souris malades par rapport aux souris jeunes (**Figure 19B**), par conséquent, il serait intéressant d'étudier, grâce à des marqueurs de la prolifération cellulaire, si les BEC prolifèrent à un stade intermédiaire du développement de la maladie. En effet, tel que décrit dans le paragraphe *II Caractérisation quantitative du compartiment stromal des ganglions lymphatiques* nous n'avons pas pu observer de cellules endothéliales en prolifération (marquage ki-67) sur des coupes de ganglions rénaux de souris NZB/W malades. Nous pourrions émettre l'hypothèse qu'à un stade avancé d'inflammation chronique, la prolifération des BEC ralentirait après avoir atteint un seuil alors que les FRC et LEC continueraient de proliférer, ce qui pourrait expliquer une baisse de la proportion des BEC au sein de la totalité des cellules stromales des souris NZB/W malades par rapport aux souris jeunes (**Figure 20A**). En effet, Chyou et collaborateurs ont observé un taux de prolifération moindre entre 2 et 4 mois dans les ganglions lymphatiques cutanés chez le modèle murin lupique MRL *lpr/lpr* et ont émis l'hypothèse que les BEC constituant les HEV seraient dans une phase de quiescence vasculaire à ce stade de la maladie (**Chyou et al., 2012**). Contrairement aux souris NZB/W, le modèle murin de lupus (MRL *lpr/lpr*) présente des manifestations cutanées et un développement plus rapide de la pathologie (le taux de survie est de 50 % à 5 mois).

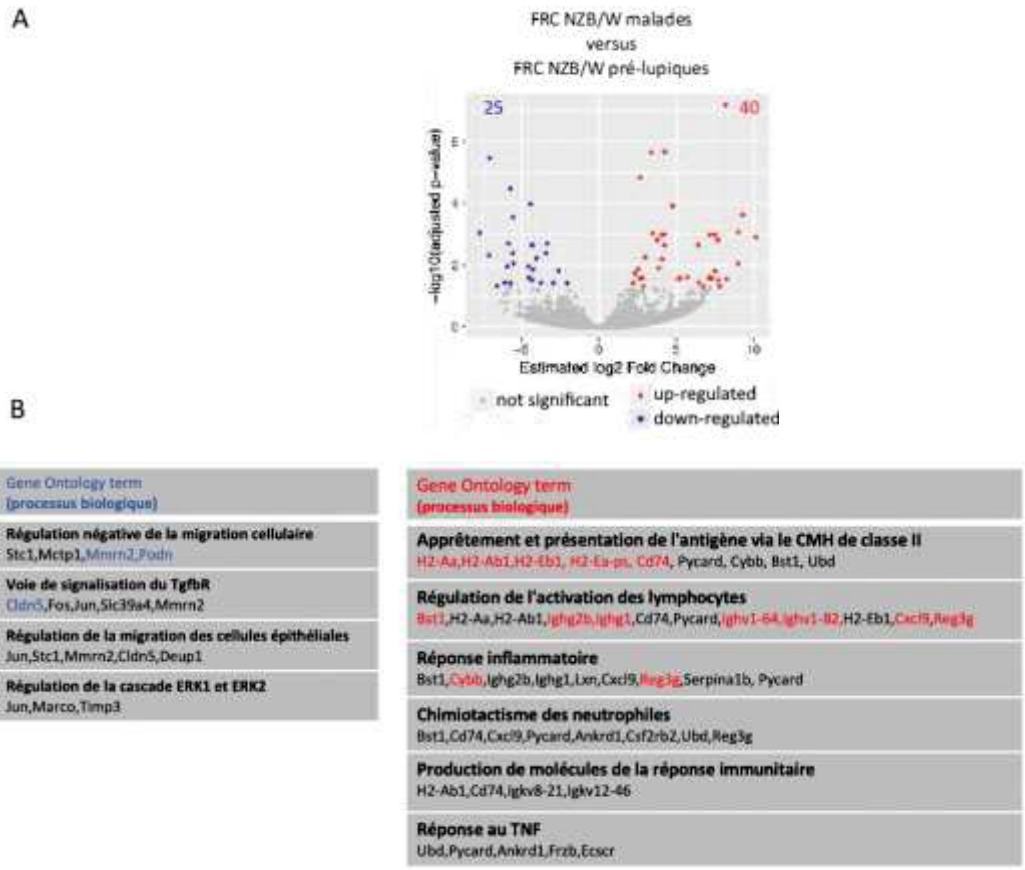


Figure 39 Analyse des gènes différentiellement exprimés par les FRC de souris lupiques malades par rapport aux souris pré-lupiques

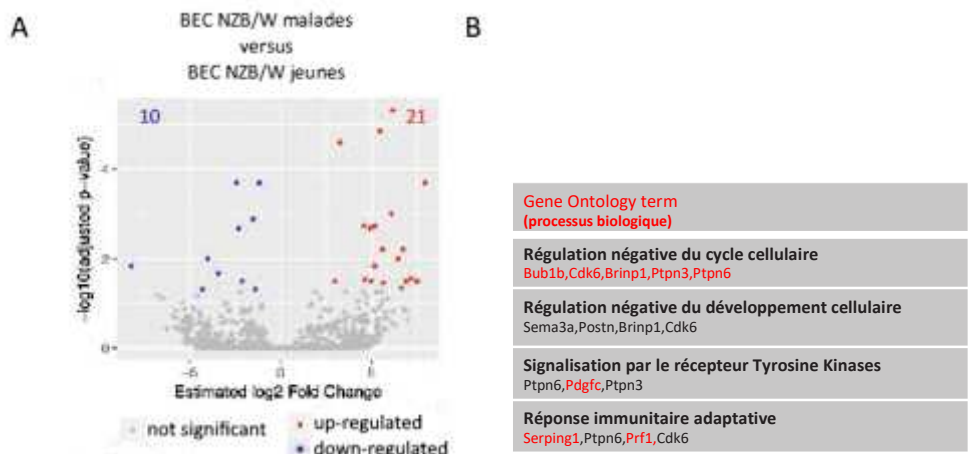


Figure 40 Analyse des gènes différentiellement exprimés par les BEC de souris lupiques malades par rapport aux souris pré-lupiques

Figure 39-40 A) Comparaison des profils transcriptomiques des FRC (**Figure 39**) et des BEC (**Figure 40**) de souris NZB/W malades par rapport aux souris pré-lupiques jeunes sous forme d'un volcano-plot représentant le log10 de la valeur de p ajustée en fonction du log2 du facteur d'induction estimé. **B**) Les termes d'ontologie génique (Gene Ontology (GO) term) des processus biologiques ont été déterminé pour les gènes différentiellement sur-exprimés (rouge) ou sous-exprimés (bleu) par les FRC (**Figure 39**) et les BEC (**Figure 40**) de souris NZB/W malades par rapport aux souris NZB/W jeunes à l'aide du logiciel « Metascape ». Les gènes significatifs ont été sélectionnés avec les seuils suivants : valeur de p ajustée < 0,05 et valeur absolue du log2 du facteur d'induction > 1

Par ailleurs, nous avons également observé une expression élevée des gènes associés à l'organisation de la matrice extracellulaire par les LEC de souris malades par rapport aux souris jeunes (**Figure 38**). Ce sont des gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire (collagène, lumican, décorine), des métallopeptidases (MMP2, MMP3, ADAMTS2), ainsi que des molécules d'adhésion cellulaire (cadhérine4, vitronectine). Certains des gènes sur-exprimés par les LEC ont été fortement associés aux termes GO de l'ossification. Cependant, ces molécules sont aussi impliquées dans l'organisation des matrices extracellulaires, telles que l'ostéomoduline (*Omd*) de la famille des SRLP « Small leucine-rich proteoglycans » ou l'ECM1 « extracellular matrix protein 1 ». Un autre gène associé au terme GO de l'ossification code pour la protéine MGP « matrix Gla protein » inhibant la calcification vaisseaux. L'expression de cette protéine, classiquement sécrétée par les cellules musculaires lisses des parois vasculaires, suggère donc à nouveau l'activation des processus physiologiques des vaisseaux sanguins et/ou lymphatiques dans les ganglions rénaux les souris malades (**Luo et al., 1997**).

D'autre part, bien que nous n'ayons pas observé d'expression significativement différente de gènes de la matrice extracellulaire par les FRC de souris malades, l'expression des gènes codant pour une protéine d'adhésion podocan (*Podn*) et une protéine des jonctions cellulaires claudine-5 (*Cldn5*) est plus faible par les FRC de souris NZB/W malades par rapport aux souris jeunes (**Figure 39**). La protéine claudine-5 est une molécule de la famille des claudines intervenant dans les jonctions inter-cellulaires, et la protéine podocan inhibe la prolifération et la migration cellulaire (**Shimizu-Hirota et al., 2004**). Une diminution de l'expression de ces molécules pourrait être le reflet d'un relâchement des contacts pour favoriser l'expansion des FRC formant le maillage, au cours de l'inflammation.

L'ensemble de ces données mettent en évidence une modification de l'expression de nombreux gènes jouant un rôle dans le développement des vaisseaux et le remodelage de la matrice extracellulaire au sein des ganglions lymphatiques. De plus, ces gènes différentiellement exprimés par le compartiment stromal des ganglions rénaux au cours de la pathologie ne sont pas ceux retrouvés au cours du vieillissement chez des souris contrôles BALB/W. Ainsi, l'augmentation de l'expression de ces gènes dans le contexte du lupus confirme l'expansion des cellules stromales observée précédemment et met en évidence une adaptation moléculaire du compartiment stromal afin d'accompagner, d'un point de vue mécanique, la prolifération des cellules immunitaires.

- b. Les cellules stromales lupiques pourraient participer au maintien de l'inflammation chronique via l'expression de gènes de la réponse inflammatoire

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'augmentation de l'expression des gènes associés aux voies de signalisation de la réponse inflammatoire dans les cellules stromales isolées à partir des ganglions rénaux de souris NZB/W malades par rapport aux souris pré-lupiques. Les FRC de souris malades expriment fortement, entre autres, le gène codant pour l'enzyme NADPH Oxidase 2 (*Cybb*) habituellement exprimé par les phagocytes, le gène codant la molécule REG3G se liant aux glucides des bactéries gram positives et produite suite à l'activation de la voie des TLR (**Price et al., 2018**) et le gène codant pour l'α1-antitrypsine (*Serpina1*), un inhibiteur des sérines protéases de la phase aiguë ayant un rôle immuno-modulateur (**Janciauskiene et al., 2011**). Cependant, il est à noter que les gènes *Cybb* et *Reg3g* apparaissent également surexprimés au cours du vieillissement chez les souris contrôles BALB/W (résultats non montrés).

Toutefois, chez les souris lupiques, nous avons également observé une augmentation de l'expression des récepteurs de la lectine de type C (Clec4a3 ; Clec4a1 ; Clec4b1) par les FRC des souris malades par rapport aux souris jeunes (**Figure 39**). Ces récepteurs, de la famille des DECTIN-2 contiennent un domaine ITIM (« Immune-receptor Tyrosine-based Inhibition Motif ») et sont habituellement exprimés par les cellules dendritiques. Ces récepteurs auraient un rôle régulateur de l'activation des cellules dendritiques, afin de prévenir d'une inflammation dommageable. Il a ainsi été décrit que l'absence d'expression du gène *Clec4a*, dans un modèle murin d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, aggrave le développement de la maladie et favorise l'infiltration des cellules T CD4⁺ et des cellules dendritiques dans la moelle épinière (**SENO et al., 2015**). Toutefois, l'expression de surface de ces récepteurs et leur fonction dans les cellules stromales des ganglions restent encore à déterminer.

Par ailleurs, les BEC issues des ganglions rénaux des souris NZB/W malades expriment plus fortement le gène codant pour la perforine1 (*Prfl*) par rapport à ces mêmes cellules issues des ganglions de souris pré-lupiques. Cette protéine est habituellement produite par les cellules NK et les LT cytotoxiques et joue un rôle dans l'induction de l'apoptose en créant des pores membranaires de façon similaire au complément C9 (**Figure 40**). De façon intéressante, une expression élevée de l'ARNm de la perforine a aussi été observée dans les reins des souris NZB/W âgées, suggérant qu'une activité cytolytique pourrait contribuer aux dommages tissulaires (**Nakamura et al., 1991**). L'augmentation de l'expression du gène de cette protéine dans les reins et les ganglions rénaux laisse penser que si cette enzyme est produite par le

stroma, elle pourrait jouer un rôle dans le développement de la pathologie chez les souris lupiques NZB/W. En effet, dans un contexte auto-immun où il existe un défaut de clairance apoptotique, l'activité de la perforine pourrait participer à la libération de matériel nucléaire, donc d'auto-Ag et favoriser le développement de la réponse auto-immune.

En ce qui concerne les LEC, une partie des gènes plus fortement exprimés par les cellules de souris malades est liée au système du complément tels que les gènes codant pour les fragments du complément C1 et C4 (FDC-M2) (*C1qb* « complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide », *C1s2* « complement component 1, s subcomponent 2 », *C4b* « complement component 4B ») (**Figure 38**). L'activation du complément C1 fractionne à la fois les compléments C4 et C2 pour générer C4a/C4b et C2a/C2b, puis C4b2a agit comme une convertase C3 qui clive et active C3. Par conséquent, l'augmentation de l'expression de ces gènes pourrait ainsi conduire à une augmentation du fragment C3 et donc potentiellement contribuer à son dépôt glomérulaire dans la situation lupique. Cependant, les LEC et les BEC des souris malades présentent également un niveau d'expression plus élevé pour un facteur inhibant l'activation du complément C1 (*serping1*) (**Figure 38 Figure 40**) et les LEC expriment fortement le gène codant pour l'inhibiteur C3b/C4b (*Cfi* « complement factor i ») (**Figure 38**) qui inactive les compléments C4b et C3b (**Nilsson et al., 2010**). Il semble donc y avoir un équilibre complexe du système du complément dans lequel les cellules stromales jouent un rôle via l'expression de ces facteurs.

Enfin, mis à part l'augmentation de l'expression de deux gènes (*Cybb* et *Reg3g*) qui semble être associée au vieillissement des FRC, l'expression des autres gènes n'est pas retrouvée différemment exprimée entre les souris contrôles BALB/W âgées et jeunes, ce qui renforce l'hypothèse que la signature transcriptomique des cellules stromales lupiques reflète un état activé spécifique au contexte inflammatoire.

- c. Les cellules stromales des souris lupiques malades expriment fortement des gènes codant pour des molécules favorisant les réponses cellulaires auto-immunes

De manière intéressante, nous avons également pu mettre en évidence chez les FRC et les LEC des souris malades par rapport aux cellules de souris jeunes pré-lupiques, l'expression de certains gènes pouvant contribuer au maintien des réponses auto-immunes. En effet, tel que décrit ci-dessus, les LEC présentent un niveau d'expression élevé pour les gènes *Tnfsf13b* (le

facteur BAFF) et *Cxcl12* chez les souris malades par rapport aux souris jeunes (**Figure 38**). Nous avons également observé une augmentation de l'expression des gènes codants pour CXCL9 (**Figure 36**) et pour le facteur « bone marrow stromal cell antigen 1 » (BST-1) par les FRC (**Figure 39**). La molécule BST-1 ou CD157 a été identifiée et caractérisée pour la première fois à partir des lignées de cellules stromales de la moelle osseuse provenant de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et favorisait d'avantage le développement des cellules pré-B par rapport aux cellules stromales de patients sains (**Kaisho et al., 1994**).

L'ensemble de ces données suggère donc que les FRC et les LEC pourraient contribuer au développement de LB auto-réactifs au cours du lupus.

De plus, nous avons relevé une augmentation de l'expression du récepteur III du fragment constant des immunoglobulines de type IgG (*FcgrIII* ou *Cd16*) par les LEC de souris NZB/W malades par rapport aux souris jeunes (**Figure 38**). Les LEC expriment également le gène codant pour le récepteur IIb du fragment constant, *FcgrIIb* ou *Cd32* bien que son expression ne soit significativement pas plus élevée par rapport aux souris NZB/W jeunes (résultats non montrés). L'expression du gène codant pour CD32 par les LEC a également été observée au cours d'une analyse transcriptomique comparative des cellules endothéliales des ganglions lymphatiques en condition saine (**Berendam et al., 2019**). Si ces récepteurs sont exprimés à la surface des LEC, ils pourraient contribuer à la rétention de complexes immuns et à la présentation d'auto-Ag dans la pathologie lupique.

De façon inattendue et intéressante, les FRC de souris malades présentent un niveau d'expression élevé pour les gènes codant pour les chaînes légères et lourdes (parties constantes et variables) des immunoglobulines (*Ighg2b*, *Ighg1*, *Ighv1-64*, *Ighv1-82*, *Igkv8-21*, *Igkv12-46*) en comparaison aux souris jeunes (**Figure 39**). Ni l'expression des marqueurs spécifiques aux LB (CD19, CD20), ni celle du gène AID n'ont été détectées dans ces échantillons, confirmant que ces données ne résultent pas d'une contamination par un autre type cellulaire. Il a été mis en évidence dans diverses lignées cellulaires cancéreuses la production d'immunoglobulines de chaînes légères et lourdes ainsi que l'expression des gènes nécessaires à la recombinaison VDJ (**Chen et al., 2009**). Cependant, dans notre situation, nous n'avons pas observé l'expression des gènes nécessaires à la recombinaison VDJ et à la formation des immunoglobulines (RAG1, RAG2), qui expliquerait la présence de ces transcrits d'immunoglobulines chez les FRC de souris NZB/W jeunes et âgées. Toutefois, les gènes codant pour CD79a (*Igα*) et CD79b (*Igβ*) reconnus pour s'associer avec l'Ig de surface pour former le complexe du BCR à la surface des LB, semblent être légèrement exprimés (nombre moyen de fragments normalisé = 190 (*Cd79a*))

et 470 (*Cd79b*) chez les FRC de souris malades (résultats non montrés). La sécrétion et l'expression de surface d'Ig par les FRC reste donc à évaluer par de futures expériences.

- d. Les LEC de souris lupiques malades expriment fortement des gènes codant pour des Ag des reins

Enfin, d'une façon surprenante, plusieurs gènes exprimés fortement par les LEC issues des ganglions rénaux de souris malades, par rapport aux souris jeunes, semblent avoir des rôles dans le développement du rein. Nous avons pu relever, parmi d'autres, l'expression des gènes, *Grem1* (« gremlin 1 »), *Lif* (« leukemia inhibitory factor »), *Tcf21* (« transcription factor 21 ») qui codent pour une protéine ou des facteurs de transcription intervenant au cours du développement du rein, ainsi que le gène *Klf15* (« Kruppel-like factor 15 ») qui serait impliqué dans la différenciation des podocytes et le gène *Plau* (« plasminogen activator, urokinase ») codant pour l'urokinase activateur du plasminogène, classiquement produite par les cellules épithéliales tubulaires (**Figure 38**). Nous avons identifié ces quelques gènes car leur fonction connue est reliée au développement du rein, cependant il est possible aussi que ces gènes interviennent dans d'autres voies de signalisation non caractérisées pour le moment et pouvant être associées aux vaisseaux lymphatiques ou au ganglion lymphatique. De plus, à nouveau, l'augmentation de l'expression de ces gènes n'est pas observée au cours du vieillissement des souris contrôles, ce qui suggère donc une signature transcriptomique des LEC spécifique au contexte auto-immun. Nous pouvons aussi émettre l'hypothèse que ces gènes codant pour des Ag des reins correspondent aux Ag de tissus périphériques que ces cellules peuvent exprimer de façon endogène et présenter pour induire une tolérance des LT CD8⁺ (**Cohen et al., 2010, 2014; Fletcher et al., 2010; Nichols et al., 2007**). En effet, divers Ag des tissus périphériques ont été retrouvés exprimés par les LEC tels que des gènes codant pour des Ag normalement exprimés par les mélanocytes (*Tyr, Mlana, RetS*), les cellules des îlots pancréatiques (*Ppy*), les neurones (*Prkar1b, Ndn*), et les cellules des glandes salivaires et lacrymales (*Amy1*). Toutefois, l'expression par les cellules stromales n'est pas spécifique au tissu drainé par les ganglions lymphatiques (**Cohen et al., 2014**). Il a été montré que dans un contexte inflammatoire, la stimulation de TLR3 induit une diminution de l'expression de l'antigène OVA exprimé de façon transgénique par les cellules stromales, mais ne diminue pas l'expression des gènes d'Ag de tissus périphériques tel que *Mlana* par les cellules stromales (**Fletcher et al., 2010**). Par ailleurs, chez les patients diabétiques de type I, il a récemment été montré que l'expression du gène codant pour l'Ag de tissus périphériques, *Ical* (Islet Cell Autoantigen 1), est augmentée

dans les LEC des ganglions lymphatiques inguinaux par rapport aux individus sains (**Postigo-Fernandez et al., 2019**). En revanche, dans le modèle murin du diabète de type I (NOD), l'auto-immunité a été associée à une diminution de l'expression des gènes codant pour des Ag de tissus périphériques, résultant d'un épissage du facteur de transcription DEAF1 dans les cellules stromales des ganglions pancréatiques (**Yip et al., 2009, 2013**). Chez les souris NZB/W, nous n'avons pas observé de différence d'expression du gène *Deaf1* entre les LEC issues de souris malades par rapport aux cellules de souris pré-lupiques (résultats non montrés).

Par conséquent, bien que l'induction de la tolérance périphérique par les cellules stromales soit bien caractérisée dans un contexte sain, la régulation de l'expression d'Ag de tissus périphériques par les cellules stromales ainsi que les conséquences de leur potentielle présentation aux cellules immunitaires dans un contexte inflammatoire et auto-immun restent encore à déterminer.

7. Le profil transcriptomique du compartiment stromal des souris pré-lupiques met en évidence des caractéristiques intrinsèques au fond génétique

La comparaison des profils transcriptomiques du stroma dans un contexte lupique avéré par rapport à un contexte pré-lupique a mis en lumière des variations de l'expression de nombreux gènes ayant un rôle dans la réponse inflammatoire. Nous nous sommes demandé si les cellules stromales de souris pré-lupiques présentaient, elles aussi déjà, des modifications géniques par rapport à un contexte sain et qui pourraient participer à la survenue de la maladie. Au total, ce sont 135 gènes chez les FRC, 780 chez les BEC et 184 chez les LEC des souris NZB/W jeunes qui montrent un changement du niveau d'expression par rapport aux souris contrôles BALB/W de même âge (**Figure 26D**). D'une manière intéressante, une grande partie des gènes différentiellement exprimés par les cellules stromales de souris pré-lupiques a été associée aux termes GO des processus biologiques du cycle cellulaire, à la régulation de l'adhérence des cellules au substrat, à la prolifération endothéliale et au métabolisme cellulaire, ce qui laisse suggérer une réponse à des changements structuraux dans le ganglion lymphatique dès le stade précoce de la maladie. En effet, les gènes présentant une variation significative de leur niveau d'expression chez les BEC et LEC de souris NZB/W jeunes, par rapport aux souris contrôles, jouent un rôle dans les processus du cycle cellulaire et de la réponse aux dommages de l'ADN, tels que par exemple, *Parp1*, *Parp3*, *Apobec1*, *Vegfa*, *Cnmd*, *Sox17* ou encore dans les processus des microtubules (*Tubgcp2*, *Tubgcp4*, *Tubg2*)(**Figure 41**). Par ailleurs, les BEC de souris NZB/W jeunes expriment plus faiblement le gène *Serping1* et plus fortement le gène

Cd46 codant respectivement pour le facteur inhibiteur du complément C1 et un co-facteur inactivant les compléments C3b et C4b, suggérant à nouveau un rôle potentiel du compartiment stromal dans la dérégulation de l'équilibre du système du complément (**Figure 41**).

En ce qui concerne les FRC de souris NZB/W jeunes, elles présentent un niveau d'expression élevé par rapport aux souris saines de même âge des gènes *Mmrn1*, *Mmrn2* codant pour des protéines de la matrice extracellulaire (multimériques 1 et 2), dont MMRN2 qui est un antagoniste de la voie de signalisation de VEGFR (**Colladel et al., 2016**), ainsi que le gène *Cd36* codant pour une glycoprotéine de surface se liant entre autres au collagène (**Glezer et al., 2015**) (**Figure 41**). De façon intéressante, il a été mis en évidence récemment que CD36 est aussi un récepteur « scavenger » exprimé à la surface des cellules dendritiques CD8⁺ thymiques jouant un rôle important dans le transfert d'antigène de surface des cellules épithéliales thymiques aux cellules dendritiques CD8⁺ afin de promouvoir la tolérance des LT durant leur développement dans le thymus (**Perry et al., 2018**). De plus, le gène *Marco*, codant pour le récepteur « scavenger » «MACrophage Receptor with COLlagenous structure» (MARCO), est également exprimé plus fortement par les FRC de souris NZB/W jeunes comparativement aux souris contrôles BALB/W (**Figure 41**).

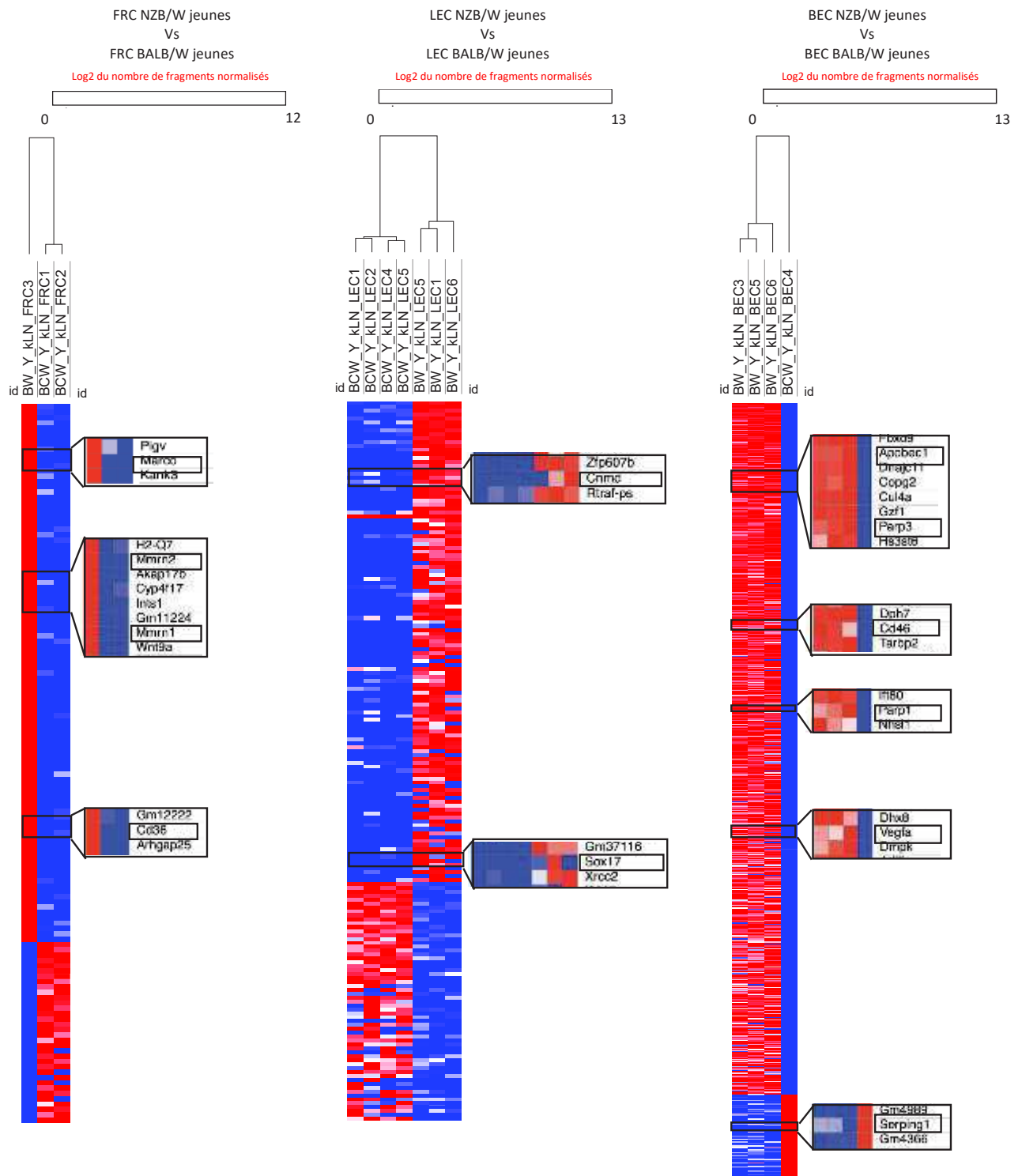


Figure 41 Carte de fréquentation de l'expression des gènes différemment exprimés entre des souris pré-lupiques NZB/W jeunes et des souris contrôles BALB/W jeunes

Regroupement hiérarchique des gènes différemment exprimés pour chaque réplicat de FRC, BEC et LEC de souris NZB/W jeunes (BWY) par rapport aux souris BALB/W jeunes (BCWY). L'expression des gènes est représentée en log2 du nombre de fragments normalisé entre les échantillons et divisé par la médiane de la longueur du transcrite de chaque gène en kb. Ces gènes ont été sélectionnés selon les seuils suivants : une valeur de p ajustée $< 0,05$ et une valeur absolue en log2 du facteur d'induction > 1 . La carte de fréquentation a été réalisée à l'aide du logiciel Morpheus. Les gènes encadrés correspondent aux gènes évoqués dans le texte.

Le récepteur MARCO, classiquement exprimé par les macrophages, reconnaît des ligands de nature polyanionique, tels que les lipopolysaccharides bactériens, les lipoprotéines oxydées, les oligodesoxynucléotides CpG et pourrait se lier aux cellules apoptotiques et contribuer à leur clairance (**Wermeling et al., 2007**). Il est intéressant de noter que, chez la souris NZB/W, des auto-Ac anti-MARCO ont été détectés à partir de 8 semaines (**Wermeling et al., 2007**). Ils provoquent un blocage du récepteur MARCO ce qui conduit à une défaillance de la clairance apoptotique par les macrophages (**Chen et al., 2011**). Bien que les FRC ne soient pas considérées comme des cellules phagocytaires, l'ensemble de ces données suggère que l'augmentation de l'expression de ces gènes par ces dernières dans un contexte pré-lupique pourrait intervenir dans les voies d'apprêtement et de présentation de matériel exogène dans le contexte du CMH et jouer un rôle via ce processus dans la (rupture de) tolérance périphérique. Pour conclure, cette première analyse des transcriptomes des cellules stromales des souris pré-lupiques par rapport aux souris saines de même âge a permis de révéler des variations de l'expression d'une majorité de gènes impliqués dans les processus du cycle cellulaire et du métabolisme cellulaire, ce qui laisse penser que de potentielles réorganisations architecturales pourraient se produire déjà à un stade précoce de la maladie. De plus, cette signature transcriptomique du compartiment stromal reflète des caractéristiques intrinsèques au fond génétique qui pourraient jouer un rôle dans l'initiation de la pathologie chez les souris NZB/W.

VI. Conclusion/discussion

Les OLS, dont font partie les ganglions lymphatiques, sont des lieux de rencontre pour l'initiation des réponses immunitaires. Ils sont composés principalement par des lymphocytes qui lors de leur passage dans les OLS vont interagir avec un maillage de cellules stromales. Bien que ces dernières ne représentent qu'une faible proportion des cellules des ganglions lymphatiques, elles jouent un rôle essentiel dans leur bon fonctionnement. Tel que décrit en introduction (cf *paragraphe B.II. Les cellules stromales : les régulateurs des réponses immunitaires*), les cellules stromales constituent l'architecture des OLS : elles créent un réseau tridimensionnel ainsi que des vaisseaux sanguins et lymphatiques qui ensemble facilitent le transport de la lymphe, des Ag, et des cellules immunitaires. Au cours d'une inflammation, le support structurel fourni par ce compartiment stromal s'adapte pour accompagner la prolifération des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques enflammés (**Thierry et al., 2019**). Alors que des études commencent à découvrir les mécanismes cellulaires et moléculaires à la base de ces remodelages répétitifs, encore peu se sont intéressées à l'évolution structurale

des ganglions lymphatiques dans la pathologie lupique (**Chyou et al., 2012; Gonzalez-Quintial et al., 2011**). Au-delà du soutien structurel, le stroma des ganglions lymphatiques produit également des signaux moléculaires nécessaires à la survie, au chimiotactisme des lymphocytes ainsi qu'au maintien de l'homéostasie des cellules immunitaires dans une situation saine. Ces dernières années, quelques études ont mis en évidence les profils transcriptomiques du compartiment stromal des ganglions lymphatiques lors de la progression d'une infection (**Gregory et al., 2017**), dans le développement d'une tumeur (**Riedel et al., 2016**) ou dans les maladies auto-immunes telles que le diabète de type I (**Postigo-Fernandez et al., 2019**) et la polyarthrite rhumatoïde (**Karouzakis et al., 2019**). Il a été montré que les cellules stromales présentent des signatures transcriptomiques propres à chacune de ces situations pathologiques, renforçant ainsi le rôle adaptatif du compartiment stromal et sa spécificité. Notre étude quantitative et phénotypique du compartiment stromal, complétée d'une analyse transcriptomique comparative, dans un contexte pré-lupique et lupique avéré, a ainsi permis de révéler un certain nombre de données intéressantes.

Dans un premier temps nous avons pu apporter des nouveaux éléments pour aborder les changements architecturaux qui s'opèrent au sein des ganglions lymphatiques, notamment ceux drainant les reins, dans le contexte d'une glomérulonéphrite lupique.

En effet, dès le stade précoce les LEC et BEC de souris NZB/W jeunes présentent des modifications de l'expression de divers gènes associés à la prolifération cellulaire, par rapport à des souris contrôles de même âge. En dépit du fait qu'à ce stade, nous n'ayons pas observé, chez les souris pré-lupiques d'augmentation du nombre des cellules endothéliales ni des cellules immunitaires par rapport aux souris contrôles de même âge, ces données préliminaires laissent tout de même penser que des réarrangements structuraux pourraient s'opérer dans les ganglions lymphatiques rénaux dès le début de la maladie.

C'est au cours du développement de l'atteinte rénale des souris NZB/W que l'on observe davantage de modifications associées à la fonction architecturale du compartiment stromal des ganglions rénaux. Nous avons pu mettre en évidence une augmentation du nombre absolu des trois sous-populations principales de cellules stromales qui s'accompagne d'une extension de l'aire des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que d'une modification de la proportion des FRC et des BEC. En parallèle de ces modifications, il y a accroissement important du nombre de cellules immunitaires dans les ganglions rénaux des souris malades par rapport aux souris pré-lupiques.

Nos données sont cohérentes avec différentes études ayant démontré que la croissance des ganglions lymphatiques est associée à une expansion proliférative et à un remodelage du compartiment stromal vasculaire, au cours d'une infection virale par le virus de l'herpès (Gregory et al., 2017), d'une immunisation avec de l'ovalbumine et un adjuvant (Dasoveanu et al., 2016), suite à l'injection sous-cutanée de cellules de mélanome (Riedel et al., 2016), ou dans la pathologie lupique dans les ganglions cutanés du modèle murin MRL lpr/lpr (Chyou et al., 2012). De plus, il a été mis en évidence que de nouveaux vaisseaux lymphatiques et sanguins se mettent en place à partir de vaisseaux préexistants au cours de l'expansion des ganglions lymphatiques (Dubey et al., 2017; Mondor et al., 2016). Nous pouvons donc supposer que des processus similaires s'opèrent dans les ganglions rénaux au cours de la pathologie chez les souris NZB/W lupiques afin d'accroître les vaisseaux sanguins et lymphatiques pour soutenir l'augmentation des cellules immunitaires dans le ganglion. En effet, la comparaison des profils transcriptomiques des LEC et BEC des souris NZB/W malades par rapport aux souris pré-lupiques, révèle une expression plus importante des gènes associés au développement des vaisseaux tels que *vegfd* (facteur de croissance VEGF-D), *pdgfra* (le récepteur a au facteur de croissance PDGF) par les LEC et *pdgfc* (le facteur de croissance PDGF-C) par les BEC. Ces molécules contribuent toutes à l'angiogenèse et à la lymphangiogenèse. D'une manière intéressante, le récepteur PDGFRa, dont le gène est fortement exprimé par les LEC, possède une affinité pour le ligand PDGF-C, sur-exprimé par les BEC, ce qui suggère une potentielle régulation croisée entre les deux types de cellules endothéliales. De la même façon, les FRC de souris malades présentent une plus faible expression, par rapport aux souris jeunes, du gène *mmrn2* codant pour une protéine (multimerin-2) qui bloque l'activation de l'axe VEGF-A/VEGFR-D et limite, par conséquent le développement des vaisseaux (Colladel et al., 2016). On sait que l'expansion des vaisseaux des ganglions au cours des réponses immunitaires est médiée par le facteur de croissance VEGF, sécrété principalement par les FRC en réponse à la signalisation par le récepteur de LTβ (Chyou et al., 2008). La distribution spatio-temporelle du facteur de croissance VEGF est aussi favorisé par le flux interstitiel et le réseau de conduits formé par les FRC (Tan et al., 2012). Bien que les variations de l'expression de surface des récepteurs et de la sécrétion de ces facteurs angiogéniques restent à confirmer dans les conditions lupiques, ces données transcriptomiques nous laissent supposer qu'il existe une collaboration étroite entre les différents types de cellules stromales qui contribue à l'expansion du compartiment stromal. En ce qui concerne les FRC, nous avons également constaté une augmentation de leur nombre ainsi que de leur proportion dans les ganglions lymphatiques rénaux chez les souris NZB/W au

cours du développement de la maladie. L'augmentation du nombre de FRC a aussi été observée dans les ganglions lymphatiques de modèles murins de diverses pathologies dans lesquelles la réponse immunitaire joue un rôle important telles qu'une infection virale avec le virus de l'herpès (Gregory et al., 2017), le développement de mélanomes (Riedel et al., 2016), une glomérulonéphrite à croissants non auto-immune (Kasinath et al., 2019) et dans les ganglions cutanés du modèle murin de lupus MRL lpr/lpr (Gonzalez-Quintial et al., 2011). Dans le cas d'une l'infection virale Gregory et collaborateurs ont pu mettre en évidence que l'expansion des cellules stromales dans le ganglion lymphatique était induite par l'entrée des lymphocytes et que le maintien de cette réponse des cellules stromales requière plus particulièrement les LB (Gregory et al., 2017). Les auteurs ont proposé que la production de $LT\beta$ par les cellules B pourrait être le signal moléculaire impliqué dans la prolifération des FRC, tel que cela a été montré pour les FRC médullaires dans les ganglions lymphatiques cutanés lors d'une infection par le virus de la vaccine (Abe et al., 2014). De plus, de façon similaire, au cours d'une immunisation avec de l'ovalbumine et un adjuvant, la prolifération des FRC est aussi provoquée par la signalisation de la $LT\beta$ grâce à la migration des LT et LB dans les ganglions enflammés (Yang et al., 2014). Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un processus similaire puisse s'opérer dans les ganglions rénaux des souris NZB/W.

Par ailleurs, il est connu que les FRC sécrètent diverses fibres de la matrice extracellulaire, dont le collagène, pour former des conduits qui assurent la migration des cellules dendritiques et la diffusion des Ag et des facteurs chimiotactiques. (Malhotra et al., 2013). Toutefois, nous n'avons pas observé de différence significative concernant l'expression des gènes de protéines de la matrice extracellulaire par les FRC de souris malades par rapport aux souris pré-lupiques. Bien que ces résultats soient à confirmer, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'augmentation du nombre absolu de FRC dans les ganglions de souris malades conduis *in fine* à une extension de la matrice extracellulaire dans le ganglion. De plus, nous avons également relevé une diminution du niveau d'expression de gènes codant pour des protéines d'ancrage (podocan, claudine5) chez les FRC de souris malades par rapport aux souris pré-lupiques, ce qui laisse penser que des processus de réarrangement du réseau de conduits se produisent au cours du développement de la maladie.

A l'inverse, de façon intéressante, les LEC de souris malades présentent une augmentation significative de l'expression des gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire dont le collagène, des métallopeptidases et des molécules de la famille des protéoglycanes au cours du développement de l'atteinte rénale. L'expression de ces familles de protéines de la matrice extracellulaire par les LEC n'est pas surprenante, car sa régulation au cours d'une

immunisation est provoquée par la liaison de CLEC2 (exprimée à la surface des cellules dendritiques) à la podoplanine (qui est exprimée non seulement par les FRC mais également par les LEC) (Martinez et al., 2019). Une analyse transcriptomique récente a également mis en évidence l'expression des composants de la matrice extracellulaire par les LEC des ganglions lymphatiques dans un contexte sain (Berendam et al., 2019). L'expression de ces gènes associés à la matrice extracellulaire par les LEC suggère que ces cellules pourraient participer au développement de la matrice extracellulaire et donc au réseau de conduits que les FRC développent autour de ces molécules.

Il est intéressant de noter que ces changements structuraux sont spécifiques à la croissance des ganglions lymphatiques liée à l'inflammation rénale chez les souris lupiques et ne résultent pas du vieillissement. En effet, nous n'avons pas constaté d'évolution du nombre de FRC, BEC et LEC au cours du vieillissement des souris contrôles BALB/W, tel que cela a été démontré précédemment dans les ganglions cutanés de souris saines C57BL/6 (Turner and Mabbott, 2017). Seule la proportion de FRC dans les ganglions rénaux de souris BALB/W âgées semble diminuer par rapport aux souris BALB/W jeunes à l'inverse de ce que l'on observe entre des souris NZB/W jeunes et âgées (Figure 20). De plus, les gènes différentiellement exprimés par le compartiment stromal des ganglions rénaux au cours de la pathologie ne sont pas ceux retrouvés au cours du vieillissement chez les souris contrôles BALB/W.

En résumé, une expansion des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que du réseau de conduits dans les ganglions lymphatiques rénaux pourrait contribuer à la migration des lymphocytes ainsi qu'à la diffusion des Ag et des molécules de faible poids moléculaires au cours du développement de la maladie chez les souris NZB/W.

Outre ces modifications structurelles du compartiment stromal qui participeraient au développement des réponses immunitaires et auto-immunes, nous avons pu mettre en évidence une signature transcriptomique de type inflammatoire chez des souris NZB/W malades par rapport aux souris pré-lupiques. Nous avons observé que les FRC, BEC et LEC de souris NZB/W malades présentent une augmentation de l'expression de gènes codant pour les molécules de la phase aigüe et de la réponse inflammatoire par rapport aux souris pré-lupiques. Les FRC des ganglions rénaux de souris malades exprimeraient plus fortement des protéines telles que, Reg3g, Serpina1 et des récepteurs de la lectine de type C. D'autres gènes codant pour des protéines de la phase aigüe ont été retrouvés plus fortement exprimés par les LEC et BEC, tels que les gènes codant pour des molécules associées au système du complément (C1q, C1s et C4b) et des inhibiteurs du complément C1 et C4b (CFI et serpin1). L'augmentation de

l'expression de ces gènes (*Reg3g*, *Serpina1*, *C3* ou *Serping1*) a également été constatée suite à une infection par le virus de l'herpès (**Gregory et al., 2017**) ou d'une inflammation induite par le LPS (**Malhotra et al., 2012**). Il est intéressant de noter que la molécule C4b, aussi appelée FDC-M2, est habituellement exprimée par les FDC (**Taylor et al., 2002**). La protéine « C4b Binding Protein » se lie au fragment C4b et co-localise avec les complexes immuns à la surface des FDC. Il a été montré que la protéine C4BP associée aux complexes immuns piégés à la surface des FDC, est un signal de co-stimulation (indépendant des LT) aux LB des centres germinatifs exprimant CD40 (**Gaspal et al., 2006**). Cependant, la sur-expression par les LEC du gène codant pour le facteur inhibiteur Cfi qui inhibe l'activation de C3b et C4b, suggère le maintien d'un équilibre du système du complément plutôt qu'une contribution à l'activation des LB.

Bien que l'expression de ces gènes par les cellules stromales ne semble pas spécifique à une situation auto-immune, dans le lupus le système du complément est un élément à double tranchant. D'une part, plus de 80 % des patients atteints d'une déficience monogénique de C1q ou C4 développent un LED ou une maladie de type lupique (**Atkinson and Yu, 2016**). De plus, l'absence d'expression du complément C1 ou C4 chez des souris ayant un fond génétique auto-immun conduit au développement d'un taux élevé d'auto-Ac anti-nucléaires (**Mitchell et al., 2002; Paul et al., 2002**). D'autre part, C1 et C4 dans la voie classique du complément interagissent pour former l'enzyme C3 convertase qui active le complément C3. Le dépôt de complément C3 dans le rein, et la réduction des concentrations sériques de C4 et C3 sont associés à l'activité de la maladie et à la néphrite lupique (**Birmingham et al., 2010**). Toutefois, l'expression de ces gènes par les cellules endothéliales des ganglions lymphatiques et leur rôle dans la balance du système du complément reste encore à déterminer dans une situation pathologique.

De façon cohérente avec le milieu inflammatoire, les analyses transcriptomiques du compartiment stromal des ganglions rénaux de souris malades ont également révélé des différences d'expression des gènes codant pour des cytokines inflammatoires. Les FRC et BEC de souris malades tendent à exprimer plus fortement les gènes codant pour les chimiokines CXCL9 et CXCL11 par rapport aux souris pré-lupiques et aux souris contrôles de même âge. Ces cytokines sont exprimées de façon constitutive par les cellules stromales des ganglions lymphatiques (**Berendam et al., 2019; Groom et al., 2012**). CXCR3, le récepteur correspondant, est présent à la surface des LT et permet leur adressage dans les zones inter-folliculaires et médullaires, ce qui renforce leurs interactions avec les cellules dendritiques

(Groom et al., 2012). L'expression, par les cellules stromales, des gènes codant pour les chimiokines CXCL9/10/11 est retrouvée augmentée lors de situations inflammatoires, induite entre autres par l'IFN γ (Gregory et al., 2017; Groom et al., 2012; Malhotra et al., 2012), ce qui suggère dans notre situation, que cette modification serait une réponse à l'inflammation chronique. De plus, nous avons remarqué une tendance intéressante concernant la chimiokine CXCL10 chez les souris pré-lupiques : en effet, nous avons relevé que l'expression du gène codant pour cette chimiokine tend à être plus élevée chez les LEC des ganglions rénaux des souris jeunes pré-lupiques par rapport à celles des souris contrôles de même âge. De manière similaire, nous avons précédemment mis en évidence une expression très précoce de cette chimiokine par les podocytes dans les reins de souris NZB/W jeunes et avons proposé que ce phénomène participe à l'infiltration de LT CXCR3⁺ et à la néogénèse lymphoïde tertiaire (Veber et al, données non publiées). Il serait intéressant d'étudier également l'expression de CXCL10 à un stade précoce dans d'autres ganglions lymphatiques afin de savoir si cette variation correspond à une dérégulation intrinsèque générale pouvant contribuer à la mise en place de l'inflammation.

En résumé, bien que chacune de ces données reste encore à confirmer, les FRC, BEC et LEC des ganglions rénaux des souris malades présentent des profils transcriptomiques associés à une réponse inflammatoire, ce qui renforce l'idée que le compartiment stromal est dynamique et est un acteur du développement de la réponse auto-immune au cours du lupus.

Outre l'augmentation de l'expression de molécules inflammatoires par les cellules stromales des souris NZB/W malades, nous avons également observé des différences d'expression génique de cytokines/chimiokines nécessaires à la régulation des LT de des LB, acteurs essentiels du développement et du maintien de la pathologie lupique (*cf Introduction B II Les cellules stromales : les régulateurs des réponses immunitaires*).

La rencontre des LT naïfs avec les cellules présentatrices d'Ag dans le ganglion lymphatique est permise grâce à la production de facteurs chimiotactiques. La liaison des chimiokines CCL21 et CCL19 au récepteur CCR7, exprimé par les cellules immunitaires dont les LT naïfs et les cellules dendritiques, permet leur migration et leur entrée dans les ganglions. Dans les ganglions rénaux, les cellules stromales (FRC, LEC et BEC) expriment toutes les trois la chimiokine CCL21, tandis que la chimiokine CCL19 semble être préférentiellement exprimée par les FRC et LEC. De plus, nous avons observé des tendances intéressantes qui seraient en lien avec les réponses immunitaires exacerbées. Ainsi, les LEC de souris NZB/W malades semblent exprimer plus fortement ces deux chimiokines par rapport à leurs homologues issues

de souris pré-lupiques et des souris contrôles âgées. Une tendance similaire semble aussi se dégager entre les FRC de souris malades par rapport aux souris NZB/W jeunes. Toutefois, le niveau d'expression de CCL21 et de la cytokine IL-7 (le facteur nécessaire à la survie des LT naïfs) chez les souris lupiques (âgées et jeunes) a tendance à être plus faible par rapport aux souris contrôles BALB/W de même âge. Il a été montré que dans le contexte de diverses infections virales, l'expression de la chimiokine CCL21 par les FRC est transitoirement diminuée par rapport au contexte sain (**Gregory et al., 2017; Mueller et al., 2007b; Rodda et al., 2018**). Dans ces études, il a été proposé que cette modulation transitoire limiterait la quantité de lymphocytes ce qui réduirait la compétition pour l'espace et ces facteurs dans les ganglions lymphatiques enflammés. En conditions lupiques, la perturbation de ces signaux essentiels pourrait contribuer à des anomalies de migration, de localisation et de survie des LT, et potentiellement favoriser l'infiltration des LT dans les reins des souris NZB/W, dès le stade précoce de la maladie tel que nous l'avons observé. En effet, il a été mis en évidence dans les ganglions drainant une tumeur que la diminution de CCL21 et IL-7 entraîne une désorganisation des zones T et B, pouvant contribuer au maintien d'un environnement pro-tumoral (**Riedel et al., 2016**). Afin de tester cette hypothèse, de futurs marquages immunohistologiques permettront d'analyser de façon plus approfondie l'organisation des cellules T et B dans les ganglions rénaux.

L'analyse de l'expression des chimiokines CXCL13, CXCL12 et du facteur BAFF par les cellules stromales des ganglions rénaux des souris NZB/W malades a également révélé des tendances intéressantes. Nous avons observé, entre autres, un niveau d'expression significativement élevé des gènes codant pour CXCL12 et BAFF dans les LEC de souris malades par rapport aux souris pré-lupiques et aux souris contrôles. Différentes études ont pu mettre en évidence l'expression constitutive ou inductible des chimiokines CXCL13, CXCL12 et du facteur BAFF par les FRC et les LEC des ganglions lymphatiques dans des contextes inflammatoires (**Gregory et al. 2017; Malhotra et al. 2012; Rodda et al. 2018; Huang et al. 2018**) et sain (**Berendam et al. 2019**). Les chimiokines CXCL13 et CXCL12 permettent, entre autres, la migration des LB naïfs CXCR5⁺ dans les follicules B et des LB CXCR4⁺ dans les centres germinatifs, respectivement. Quant au facteur BAFF, il est nécessaire à la survie et la différenciation des LB. Ceci suggère donc une potentielle contribution des LEC via ces facteurs à la réponse auto-immune B chez les souris NZB/W. La sécrétion de ces facteurs ainsi que l'étude de leur distribution parmi les différentes sous-populations des LEC (corticales, médullaires, sous-capsulaires) restent à déterminer. En effet, il se pourrait qu'ils ne soient

induits par l'inflammation que dans une certaine sous-population de LEC, par exemple à proximité des follicules B.

Par ailleurs, le niveau d'expression des gènes codant pour CXCL13, BAFF et BST-1 (ou CD157) semble également plus élevé dans les FRC de souris NZB/W malades par rapport aux cellules de souris jeunes. La molécule BST-1 a été initialement identifiée à partir des lignées de cellules stromales de moelle osseuse, comme favorisant le développement des lymphocytes pré-B en culture (**Kaisho et al., 1994**). De plus, récemment, il a été mis en évidence l'interface entre la zone T et les centres germinatifs une nouvelle population de cellules stromales de type fibroblastique exprimant la PDPN qui exprime BST-1, CXCL12, BAFF et fortement « A Proliferation-Inducing Ligand » (APRIL). Du fait de leur localisation spécifique, de la production de ces facteurs ainsi que de la cytokine IL-6, ces cellules stromales fibroblastiques participent activement à l'attraction et à la différenciation des plasmablastes dans les centres germinatifs (**Zhang et al., 2018**). Le niveau d'expression du gène codant pour le facteur APRIL (*Tnfsf13*) est faible dans les FRC des ganglions rénaux des souris NZB/W (résultats non montrés). Cependant, en raison de l'expression des gènes codant pour BST-1 et BAFF qui tend à augmenter dans les FRC des souris malades, nous pouvons émettre l'hypothèse que cette sous-population de FRC est potentiellement présente parmi les FRC triées par cytométrie en flux et analysées lors du séquençage d'ARN. Il serait très intéressant d'identifier cette sous-population de FRC (PDPN⁺ CD157^{High}) à la jonction avec les centres germinatifs sur des coupes de ganglions rénaux des souris lupiques et de les isoler afin de déterminer leur rôle au cours de la réponse auto-immune lupique au cours de laquelle les centres germinatifs sont particulièrement développés et jouent un rôle essentiel.

Contrairement à ces facteurs (CXCL13, BST-1, BAFF), nous avons observé que l'expression de CXCL12 par les FRC de souris NZB/W malades tend à être légèrement plus faible par rapport aux souris NZB/W jeunes et BALB/W âgées. De façon intéressante, Abe et collaborateurs ont observé une diminution de l'expression des gènes codant pour CXCL12, CCL19 et CCL21 ainsi qu'une augmentation de CXCL9 dans les ganglions lymphatiques de souris NZB/W âgées par rapport à des souris contrôles de même âge (**Abe et al., 2008**). Les tendances observées entre les FRC de souris NZB/W malades par rapport aux souris jeunes pour l'expression des gènes codant pour CCL21, CXCL12 et CXCL9 semblent cohérentes avec leurs résultats. Les auteurs ont proposé que ces différences seraient responsables d'une mauvaise localisation des LTreg dans les ganglions rénaux, ce qui conduit à une altération de leur fonction régulatrice et donc à la rupture de tolérance (**Abe et al., 2008**).

Tel qu'évoqué ci-dessus, de futurs travaux se porteront donc sur l'organisation des cellules immunitaires ainsi que l'identification des différentes sous-populations de FRC responsables de l'expression de ces chimiokines dans les ganglions lymphatiques rénaux dans des contextes auto-immuns précoce et établi. En effet, l'étude des profils transcriptomiques des FRC laisse penser que la population cellulaire CD31⁻ PDPN⁺ triée comprend très probablement les différentes sous-populations de FRC précédemment caractérisées telles que les CRC (CXCL12⁺), les BRC (CXCL13⁺ BAFF⁺) et les cellules réticulaires à l'interface de la zone T et des centres germinatifs (CXCL12⁺ BAFF⁺ BST-1⁺).

Toutefois, l'ensemble des modifications de l'expression des gènes codant pour les facteurs associés à la régulation de la migration et du développement des leucocytes, lors de la progression de l'atteinte rénale, nous permet d'ores et déjà d'affirmer que le compartiment stromal des ganglions rénaux participe au développement de la réponse cellulaire auto-immune dans la pathologie lupique.

Dans un troisième temps, outre leur contribution aux réponses immunitaires innées et adaptatives, via la production de signaux inflammatoires et chimiotactiques, les cellules stromales jouent aussi un rôle important dans l'induction de la tolérance périphérique des LT. Ces dernières années, plusieurs études ont mis en lumière la capacité des cellules stromales à induire la tolérance des LT CD4⁺ et CD8⁺ grâce à l'expression de molécules du CMH et à la capacité à présenter des Ag de tissus périphériques (**Hirosue and Dubrot, 2015; Saxena et al., 2019**). Dans le contexte de maladies auto-immunes, dans lesquelles ces processus sont dérégulés, cette fonction des cellules stromales reste encore peu caractérisée (**Postigo-Fernandez et al., 2019; Yip et al., 2009**). Notre étude a donc aussi permis d'apporter des pistes pour aborder la compréhension de ces mécanismes de tolérance dans le contexte de la pathologie lupique.

Nous avons pu observer une augmentation de l'expression des molécules du CMH-II à la surface des FRC et des BEC des ganglions rénaux de souris malades par rapport aux souris pré-lupiques et aux souris contrôles âgées. Cette observation semble se confirmer au niveau de l'expression des gènes du CMH-II (*H2-a, H2-e*) par ces cellules. Cette évolution au cours du développement de l'atteinte rénale est très probablement une conséquence de l'inflammation locale. En effet, il a été précédemment montré que dans les cellules stromales le niveau d'expression des gènes associés à la voie de signalisation du CMH-II, tels que *H2-a, H2-e, H2-dm, Cd74*, est plus élevé au cours d'une inflammation induite par le LPS (**Malhotra et al., 2012**), d'une infection par le virus de l'herpès (**Gregory et al., 2017**) et dans le diabète de type

I chez l'homme (**Postigo-Fernandez et al., 2019**). L'expression du CMH-II à la surface des LEC des ganglions rénaux des souris malades est aussi augmentée au cours du développement de la pathologie. Cependant, contrairement aux FRC et BEC, les LEC des ganglions rénaux des souris contrôles présentent elles aussi une augmentation de l'expression du CMH-II à leur surface au cours du vieillissement. De plus, cette différence d'expression à la surface des LEC est aussi observée dans les ganglions mésentériques et cutanés entre les deux âges chez les souris NZB/W et chez les souris contrôles. Il est donc difficile de savoir si la différence d'expression à la surface des LEC des ganglions rénaux de souris malades est liée à l'état inflammatoire et/ou au vieillissement des souris. En effet, il a été constaté que les LEC des ganglions lymphatiques cutanés de souris saines C57BL/6 âgées de plus d'un an présentent davantage de molécules de CMH-II à leur surface à l'état basal, ce qui serait lié à une augmentation de l'expression du récepteur à l'IFN γ (**Dubrot et al., 2018**). De plus, contrairement aux FRC et aux BEC, ces différences d'expression du CMH-II à la surface des LEC de souris NZB/W malades ne semblent pas être associées à des différences d'expression génique. Nous n'avons pas constaté d'augmentation de l'expression des gènes associés à la voie de signalisation du CMH-II (*H2-a*, *H2-e*, *H2-dm*, *Cd74*) chez les LEC de souris malades par rapport aux souris pré-lupiques et aux souris contrôles âgées.

Il a été montré que l'expression des gènes codant pour les molécules du CMH-II et des molécules associées (*H2-DM*, *CD74*) est principalement régulée par le cofacteur *CIITA*, dont l'expression dans les cellules stromales, est quant à elle sous le contrôle du promoteur IV sensible à la signalisation par l'IFN γ (**Dubrot et al., 2014**). Chez les souris NZB/W l'importance de la production exacerbée de l'IFN γ dans le développement de la pathologie lupique a été mise en évidence par diverses études. En effet, Enghard et collaborateurs ont montré que la proportion de LT exprimant l'IFN γ augmente avec l'âge et est corrélée à l'atteinte rénale (protéinurie) chez les souris NZB/W (**Enghard et al., 2006**). L'administration d'un Ac anti-IFN γ ou du récepteur soluble de l'IFN γ chez les souris NZB/W permet d'augmenter leur durée de vie et d'améliorer les symptômes de la néphrite lupique tels que l'infiltration rénale de LT et des macrophages (**Ozmen et al., 1995; Schmidt et al., 2015**). De plus, nous avons retrouvé une forte proportion de LT produisant de l'IFN γ dans les reins de souris NZB/W malades (**Veber et al., données non publiées**). Toutefois de manière surprenante, malgré une expression des gènes *H2-a*, *H2-e*, *H2-dm*, *Cd74* par les FRC, BEC et LEC des souris NZB/W âgées nous n'avons observé qu'un très faible niveau d'expression du gène *Ciita*.

Cependant, dans un contexte sain, l'expression basale de ce gène semble peu élevée dans les LEC et les BEC des ganglions cutanés de souris C57BL/6 (**Santambrogio et al., 2019**). Par

ailleurs, différentes études ont également montré que les gènes du CMH-II peuvent être exprimés indépendamment du transactivateur CIITA. En effet, l'expression constitutive du CMH-II à la surface de cellules dendritiques au niveau du paracortex des ganglions lymphatiques semble être indépendante de l'expression du gène codant pour CIITA. Ceci a été mis en évidence par deux études indépendantes avec deux lignées de cellules dendritiques différentes provenant de souris déficientes pour le gène *Ciita* (**Chang et al., 1996; Williams et al., 1998**). Il a également été montré que l'expression résiduelle du CMH-II à la surface de cellules dendritiques, dans un modèle murin déficient pour les gènes *Ciita* et *Rfx5* (un cofacteur de l'enhanceosome), est suffisante pour soutenir l'activation de LT transférés de façon adoptive. De plus, la reconstitution avec ces LT induit une augmentation de l'expression du CMH-II par les cellules présentatrices d'Ag, de façon indépendante de CIITA (**Buch et al., 2006**).

Enfin, outre la régulation de l'expression des molécules de CMH-II à la surface des cellules stromales via l'expression des gènes associés, un autre mécanisme non exclusif pourrait également être responsable de cette augmentation à la surface des cellules stromales. En effet, Dubrot et collaborateurs, ont montré dans un contexte sain que les cellules stromales des ganglions lymphatiques peuvent acquérir des complexes CMH-II – peptides par transfert d'exosomes ou par contact direct avec des cellules dendritiques (**Dubrot et al., 2014**). De plus, *in vitro*, la capacité des cellules stromales à capturer ces complexes est plus élevée lorsqu'elles sont en contact avec des cellules dendritiques matures (activées).

Ainsi nous pourrions envisager que l'expression du CMH-II à la surface des cellules stromales de souris NZB/W et BALB/W pourrait être régulée via l'expression génique de façon indépendante à l'expression du gène *Ciita*, tel qu'évoqué ci-dessus, et/ou via le transfert de complexes CMH-II-peptides par les cellules dendritiques. Ces hypothèses seraient intéressantes à approfondir chez les souris NZB/W et en particulier au début de la pathologie auto-immune chez des souris NZB/W jeunes, sans atteinte rénale. En effet, nous avons observé une expression de CMH-II à la surface des FRC, BEC et LEC plus faible que pour leurs homologues chez les souris contrôles de même âge, et sans différence apparente d'expression des gènes codant pour les molécules du CMH-II.

Par ailleurs, Dubrot et collaborateurs ont également mis en évidence que l'acquisition par les cellules stromales de complexes CMH-II – peptides par les cellules dendritiques permet d'induire l'apoptose des LT CD4⁺. L'induction de la tolérance périphérique des LT CD4⁺ serait associée à l'expression de la molécule inhibitrice PD-L1 par les cellules stromales, plus particulièrement par les LEC (**Dubrot et al., 2014**). De plus, l'absence d'expression ou de signalisation par PD-L1 uniquement dans les cellules stromales de souris transgéniques (dont

le récepteur TCR des LT CD8⁺ reconnaît un épitope de tyrosinase restreint au CMH-I), conduit à une accumulation de LT CD8⁺ auto-réactifs et au développement d'une réponse auto-immune (**Tewalt et al., 2012**). Il a également été proposé que l'absence d'expression de molécules co-stimulatrices telles que les CD80/86, et les niveaux élevés d'expression de PD-L1 à la surface des LEC sont les principaux mécanismes par lesquels ces dernières induisent la tolérance, via les molécules du CMH-I, des cellules T CD8⁺ par délétion (**Fletcher et al., 2010; Rouhani et al., 2015; Tewalt et al., 2012**).

De façon intéressante dans notre étude, nous avons pu remarquer certaines tendances quant à l'expression de PD-L1 par les LEC de souris NZB/W malades. L'expression génique de PD-L1 semble plus faible chez les LEC de souris NZB/W âgées par rapport aux souris contrôles de même âge et aux souris pré-lupiques jeunes. De plus, la proportion de LEC CMH-II^{hi} PD-L1⁺ paraît être diminuée chez les souris NZB/W malades par rapport aux souris contrôles de même âge. A l'inverse de précédentes études ont mis en évidence des niveaux d'expression élevés de PD-L1 dans une situation inflammatoire induite par la stimulation de la voie de signalisation du TLR3 (Fletcher et al., 2010) ou dans deux modèles murins de tumeurs (Dieterich et al., 2017). Dans leur modèle murin transgénique, Fletcher et collaborateurs ont proposé que ce processus pourrait limiter le risque d'amorcer les cellules T OT-I au cours d'un processus inflammatoire non lié. Dans la seconde étude, Dieterich et collaborateurs ont, quant à eux, montré que l'augmentation de l'expression de PD-L1 à la surface des LEC des vaisseaux lymphatiques associés aux tumeurs contribue à l'inhibition des cellules T spécifiques aux tumeurs et crée un environnement tolérogène. Ainsi sachant que l'expression de PD-L1 par les LEC joue un rôle important dans l'induction de la tolérance des LT, nous pouvons émettre l'hypothèse que les LEC des ganglions rénaux des souris NZB/W pourraient participer à la rupture de tolérance via une insuffisance de signaux tolérogènes.

De plus, nous avons aussi pu observer des niveaux d'expression plus élevés par les FRC de souris malades, du gène codant pour la molécule de co-stimulation CD86 ainsi qu'une plus forte proportion de FRC CMH-II^{hi} CD86⁺ par rapport aux souris contrôles de même âge. A nouveau et à l'inverse de nos résultats, Fletcher et collaborateurs n'ont pas observé de différence d'expression de CD86 par les cellules stromales des ganglions lymphatiques cutanés lors d'une inflammation induite par la stimulation de la voie de signalisation du TLR3 (**Fletcher et al., 2010**). L'activation efficace des LT CD4⁺ nécessitant plusieurs signaux dont la présentation d'Ag par le CMH-II et la stimulation de CD28 par les molécules CD86/80, ces données laissent penser que les FRC des souris malades pourraient jouer le rôle de cellules présentatrices d'Ag. Nos premières expériences réalisées avec des cellules stromales lupiques et des Ag exogènes

(des nucléosomes pour être au plus proche de la physiopathologie lupique), nécessitent encore des mises au point technique pour nous permettre de savoir si ces cellules sont capables de présenter *in vivo* des (auto-) Ag aux LT CD4⁺ dans le contexte du lupus.

Cependant, l'analyse transcriptomique réalisée a permis de révéler différentes pistes pour étudier une potentielle dérégulation de la présentation antigénique par les cellules stromales lupiques. D'une part les profils transcriptomiques des LEC de souris NZB/W malades montrent, par rapport aux souris pré-lupiques, une augmentation de l'expression des gènes associés au développement du rein qui pourraient donc correspondre à des gènes d'auto-Ag de tissus périphériques. De plus, les FRC de souris pré-lupiques semblent exprimer plus fortement des gènes codant pour des récepteurs « scavenger » (CD36, MARCO) par rapport aux souris contrôles jeunes, suggérant une capacité accrue de l'internalisation de matériel exogène. Ces premières données laissent penser que les cellules stromales pourraient être capables de présenter des Ag exogènes ou endogènes tels que les Ag de tissus périphériques via le CMH-II aux LT CD4⁺ et que ce processus soit favorisé au cours de la pathologie lupique. En effet, de tels processus ont été mis en évidence dans les cellules stromales de ganglions lymphatiques grâce à des modèles murins transgéniques. Baptista et collaborateurs ont montré que les cellules stromales sont capables de présenter, à des LT CD4⁺, l'ovalbumine, exprimée de façon transgénique, dans le contexte du CMH-II, ce qui contribue au maintien des LTreg (**Baptista et al., 2014**). D'autres études ont aussi démontré que les LEC peuvent présenter par réaction croisée dans le contexte du CMH-I l'ovalbumine acquise par phagocytose (**Hirosue et al., 2014; Lund et al., 2012**).

D'autre part, en lien avec l'augmentation de l'expression du CMH-II par les FRC et BEC des souris malades, nous avons aussi observé un niveau d'expression plus élevé pour les FRC (et une tendance pour les BEC) des gènes codant des molécules intervenant lors des processus de chargement des peptides exogènes dans la poche des molécules du CMH-II (la chaîne invariante CD74 et H2-DM). De plus, l'importance de l'expression de ces molécules dans l'inhibition de l'activation des LT a été récemment mise en évidence (**Maruhashi et al., 2018**). Les auteurs ont démontré, à partir de lignées cellulaires de LT et de cellules présentatrices d'Ag, que la molécule H2-DM est nécessaire à la formation de complexes CMH-II-peptide stables. Seuls les complexes stables seront correctement reconnus par le co-récepteur inhibiteur « Lymphocyte-activation gene 3 » (LAG-3), exprimé à la surface des LT, lors de la liaison du complexe CMH-II-peptide avec le TCR. La reconnaissance des complexes CMH-II-peptides stables par la molécule LAG-3 à la surface des LT CD4⁺ se ferait à l'opposé du site de liaison des molécules CD4 et induirait un signal cytoplasmique inhibiteur de l'activation aux lymphocytes. De plus,

Rouhani et collaborateurs ont proposé que les mécanismes d'induction de tolérance périphérique des LT CD8⁺ par les cellules stromales des ganglions, via la présentation d'Ag dans le contexte du CMH-I, seraient aussi liés à l'activation de la voie de signalisation CMH-II – LAG3 (Rouhani et al., 2015). Par conséquent chez les souris lupiques NZB/W, il serait particulièrement intéressant d'étudier également la stabilité des complexes CMH-II-peptide ainsi que l'activation de la voie de signalisation LAG-3 des LT CD4⁺ par les cellules stromales lupiques.

En résumé, notre étude met en lumière, pour la première fois, des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles spécifiques ainsi qu'une signature transcriptomique inflammatoire du compartiment stromal des ganglions lymphatiques drainant le rein chez les souris lupiques NZB/W. Au cours du développement de la maladie, le stroma participerait d'un point de vue mécanique à l'expansion du ganglion provoquée par la prolifération des cellules immunitaires. Nos données révèlent également des variations de l'expression de diverses molécules contribuant certainement au maintien de la réponse auto-immune chez les souris NZB/W malades et chez les souris pré-lupiques.

B. Chapitre 2 : Étude du compartiment stromal au sein des organes lymphoïdes tertiaires

I. Avant-propos

Le lupus est une maladie auto-immune affectant de nombreux organes dont les reins. La néphrite lupique représente l'atteinte la plus grave pouvant mener à la nécessité d'une greffe rénale, voire au décès des patients en cas d'échec thérapeutique. Elle se caractérise par un dépôt d'auto-Ac/de complexes immuns et une infiltration leucocytaire causant des dommages au niveau des compartiments glomérulaires et tubulo-interstitiels du rein. Différentes études ont montré que le dépôt d'auto-Ac dans les reins peut résulter d'une reconnaissance croisée de certains composants de la membrane glomérulaire tels que l' α -actinine, la laminine, le collagène ou de leur liaison directe à leur auto-Ag, tel que de la chromatine provenant de matériel apoptotique relargué (**Deocharan et al., 2002; Yung and Chan, 2012; Yung et al., 2010**). Les cellules productrices de ces auto-Ac sont les plasmocytes, principalement retrouvées au niveau des OLS et de la moelle osseuse. Toutefois, notre équipe a mis en évidence la présence de plasmocytes CMH-II⁺CD138^{high} sécrétant des auto-Ac de type IgG dans les reins du modèle murin spontané de lupus que nous étudions, la souris NZB/W (**Lacotte et al., 2010**). La présence de ces cellules peut s'expliquer par leur migration des OLS vers les reins. En effet, une partie des plasmocytes exprime 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, certains plasmocytes présents dans les reins n'expriment pas le récepteur CXCR3, suggérant qu'ils migreraient via d'autres mécanismes et/ou qu'ils peuvent être générés localement au sein d'OLT.

Tels que décrits en introduction (cf paragraphe *C. II. Les organes lymphoïdes tertiaires*) les OLT sont définis par une infiltration organisée de cellules immunitaires, au sein d'organes non lymphoïdes, au cours d'une inflammation chronique. Ces OLT ont été observés dans le contexte de différentes maladies auto-immunes, au sein des organes cibles. Dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde, par exemple, il a été montré que ces structures ectopiques sont capables de participer à la génération locale d'auto-Ac et à la mise en place de réponses délétères pour le tissu synovial (**Bugatti et al., 2005; Humby et al., 2009**).

Dans le contexte du LED, l'équipe du Dr. Marcus R. Clark a décrit la présence d'infiltrats leucocytaires dans les reins de patients lupiques, dont certains étaient organisés en zones de LT et de LB avec des centres germinatifs comportant des LTFH et des FDC (**Chang et al., 2011**;

Liarski et al., 2014). Chez les modèles murins de lupus, la présence d'OLT comprenant des centres germinatifs fonctionnels a été décrite pour la première fois dans un modèle de lupus induit par l'injection intrapéritonéale de pristane (**Nacionales et al., 2006, 2009**). Récemment, deux études ont mis en évidence le rôle des cellules mésenchymateuses et de la cytokine BAFF dans le développement d'OLT, dans les reins du modèle murin NZB/W et dans un modèle de néphrite induite par l'injection d'Ac anti-nucléosome, respectivement (**Dorraji et al., 2018; Kang et al., 2017**).

Bien que l'existence d'OLT dans les reins enflammés dans le contexte du LED soit désormais admise, notre équipe a réalisé une caractérisation approfondie de ces structures ectopiques, présentée dans l'étude ci-dessous (**Publication N°1**). La mise en évidence du compartiment stromal au sein de ces OLT rénaux, à laquelle j'ai participé durant ma thèse, sera détaillée dans la partie 1 de ce 2^e chapitre (*III. Mise en évidence de la présence d'un compartiment stromal dans les OLT des reins de souris lupiques NZB/W*).

Dans la 2^{ème} partie, nous évoquerons la caractérisation d'un autre modèle murin pour l'étude des OLT dans le contexte de la pathologie lupique : le modèle murin de lupus induit au pristane. L'injection intrapéritonéale de cette huile à des souris saines de lignée BALB/c induit le développement d'une pathologie auto-immune avec des manifestations cliniques caractéristiques du LED. Ce modèle murin bien caractérisé dans la littérature présente des avantages intéressants pour l'objectif de notre étude, à savoir la caractérisation du compartiment stromal au sein d'OLT. En effet, l'injection de pristane provoque la formation de nombreuses structures lymphoïdes ectopiques dans la cavité péritonéale appelées lipogranulomes (**Leiss et al., 2013; Nacionales et al., 2006; Satoh et al., 1995**). Il a été décrit que ces lipogranulomes présentent des similitudes structurelles et fonctionnelles avec les OLT rénaux que nous avons caractérisés chez la souris NZB/W. Ces nombreuses structures lymphoïdes ectopiques pourraient donc être une bonne alternative pour l'étude du compartiment stromal des OLT dans un contexte auto-immun par rapport aux OLT rénaux dans lesquels la quantité de cellules stromales est le facteur limitant. D'autre part, ce modèle murin de lupus induit a été initialement décrit sur des souris de lignée commune (BALB/c et C57BL/6) ce qui donne la possibilité d'utiliser des modèles murins « knock-out » pour étudier le rôle précis de facteurs cellulaires et moléculaires dans la mise en place des OLT lupiques, contrairement aux souris F1 de lignée NZB/W.

Je décrirais dans le paragraphe *IV. Caractérisation du compartiment stromal des organes lymphoïdes dans le modèle murin de lupus induit au pristane*, les structures lymphoïdes

ectopiques chez ce modèle de lupus induit et je discuterai de la possibilité de poursuivre la caractérisation des cellules stromales dans les organes lymphoïdes dans ce modèle.

II. Publication N°1

Extensive 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.

En cours de soumission.

Extensive 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 Th rapeutique, Strasbourg, France.

Correspondence:

Dr Hélène 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 (Silva-Sanchez *et al.*, 2019). During infection, they usually 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 (GeurtsvanKessel *et al.*, 2009; Khader *et al.*, 2009; Moyron-Quinoz *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2019; Ulrichs *et al.*, 2004). Their contribution to cancer disease has been shown to vary considerably depending on the tumor type and on the TLS localization (within or around the tumor). In hepatocellular carcinoma, TLS have been described as microniches for tumor progenitor cells, thereby favoring tumor initiation and growth (Finkin *et al.*, 2015). However,

they have also been described in many tumors such as colon and breast cancers, where they contribute to anti-tumor immune responses and their presence correlates with a better prognosis (Coppola *et al.*, 2011; Dieu-Nosjean *et al.*, 2016; Gu-Trantien *et al.*, 2013; Siliņa *et al.*, 2018; Weinstein *et al.*, 2017). In contrast, 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 (Cañete *et al.*, 2009; Papi *et al.*, 2018). 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 (Dorrajai *et al.*, 2018; Kang *et al.*, 2017). It is now clear that there is not one type of TLS but rather multiple sorts, depending on the initiating stimulus and the environment in which they form, leading to different immune outcomes. In order to better understand their pathophysiological involvement, it is therefore essential to dissect their composition and organization, as well as the mechanisms underlying

their neogenesis and maintenance. Although the existence of TLS in inflamed lupus kidneys is classically admitted, till now no thorough extensive 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 required 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 Envigo (Gannat, France) and The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Main, USA) and maintained in our animal facilities (approved by French Veterinary Services, #I67-482-2). 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. For the staining of nucleosome positive B cells, we used Alexa Fluor 647 labelled

nucleosomes as previously described (Gies *et al.*, 2017). 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 10x 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 infiltrates 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 α -actin. Primer sequences (forward/reverse) for β -actin, GAPDH, CCL19, CXCL13 and AID 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'-TCATTAGCACCCCCAGAGT-3' for CCL19; forward 5'-GTATTCTGGAAGCCCATTACAC-3' and reverse 5'-CATTTGGCACGAGGATTCACAC-3' for CXCL13; forward 5'-CACCTTCGCAACAAGTCTGG-3' and reverse 5'-CAGGAGGTGAACCAGGTGAC-3' for AID. 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 two 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 young 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) (Figure 5A). 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 compartment. Analysis of B cell proliferation using the Ki67 nuclear proliferation marker, both in situ and by FACS, indicates that B220⁺ cells, mainly GC B cells, actively proliferate within renal inflammatory infiltrates in diseased lupus mice (Figure 5D and 5E, % of Ki67⁺ cells = 21.1 of total B cells and 78.4 of GC B cells in the kidneys vs 12.2 and 74.4% respectively in the spleen). 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 ICOS and co-inhibitory BTLA molecules (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 very small percentage of these cells are IL-17 and IL4 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 (Lacotte *et al.*, 2010, 2013). 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). Interestingly, we identify nucleosome positive cells among total and germinal center B cells in the spleen and the kidneys of diseased NZB/W mice (Figure 7C), suggesting that locally in the kidney TLOs, autoreactive B cells can access to germinal center and may differentiate into plasma cell secreting autoantibodies. Finally, we sorted CD19⁺ B cells from

the perfused kidneys of diseased animals and stimulated them with anti-CD40 antibodies and IL-21 in order to induce their differentiation into plasma cells. Figure 7D shows that anti-CD40/IL-21-activated B cells differentiate in CD138⁺B220^{low} cells *in vitro* and more importantly, they produce anti-chromatin IgG, which demonstrates that the autoreactive B cells present in the kidney lymphoid infiltrates 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. PDGFR α ⁺ 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, Delphine Lamon and Fabien Lhericel (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 Wysocki, 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., Kanapathippillai, 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). ns: not significant, * 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 **(E)** in immune cell infiltrates in the kidneys 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, >37wk, n=4) 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 <20wk 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 < 0.05, ** 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 (white arrows) 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 total and GL7⁺ GC B cells was evidenced in the kidneys of diseased (≥ 30 wk-old, proteinuria-positive) NZB/W mice by FACS **(D)** (compared to spleen from NZB/W mice; results from one representative mouse out of 4 are shown), and by section immunostainings **(E)**, using the Ki67 and GL7 markers (white arrows = proliferating GC B cells and yellow arrows = non proliferating GC B cells). **(F)** CCL19 and CXCL13 expression was analyzed by RT-qPCR in the kidneys of BALB/c (<20wk, n=3, >37wk, n=4) and NZB/W mice (<20wk, n = 14, 24-27wk, n=6 and ≥ 30 wk-old, n = 7). Expression levels were normalized against the expression level of $\square\square$ actin and GAPDH. Each dot represents one mouse and bars correspond to the mean fold change value \pm SEM in each group normalized to <20wk BALB/c mice. 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 (white arrows) 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. Representative percentages are indicated in the plots (gated on CXCR5⁺PD1^{high} cells, representative of data obtained in 5 mice). 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)** 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). **(B)** 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). **(C)** Identification of Nucleosome positive cells among total and germinal center B cells in the spleen and kidneys of diseased NZB/W mice. Representative percentages are indicated in the plots (gated on B220⁺ and B220⁺CD95⁺GL7⁺ cells, representative of data obtained in 7 mice). **(D)** CD45⁺CD19⁺ B cells were isolated by FACS from the kidneys of diseased NZB/W 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 (3 experiments, 9 mice) 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 (IHC)

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	BD Biosciences
TEC-3	Ki67	rat	IF	DAKO
Polyclonal	C3	goat	IF	Cappel

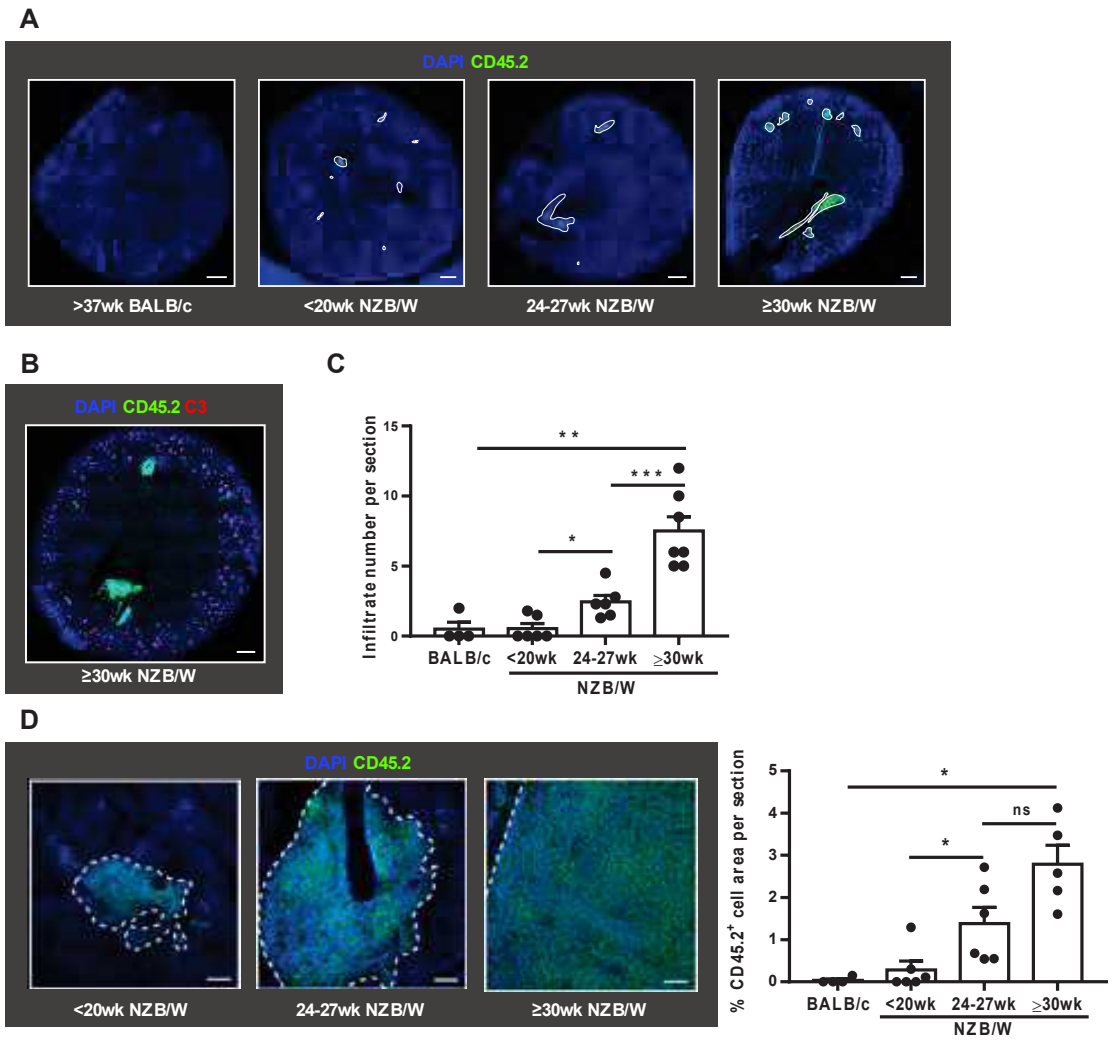


Figure 1

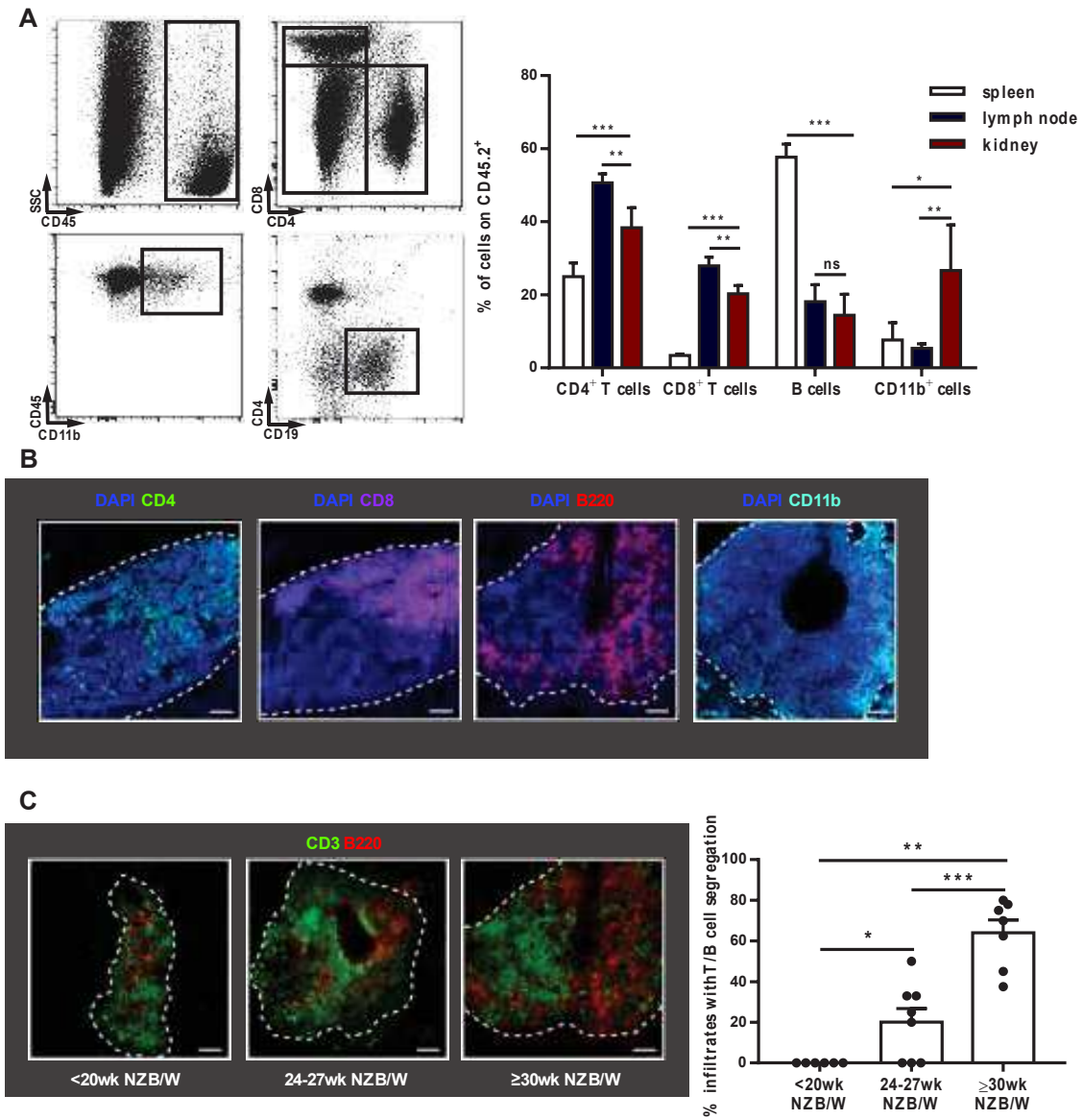


Figure 2

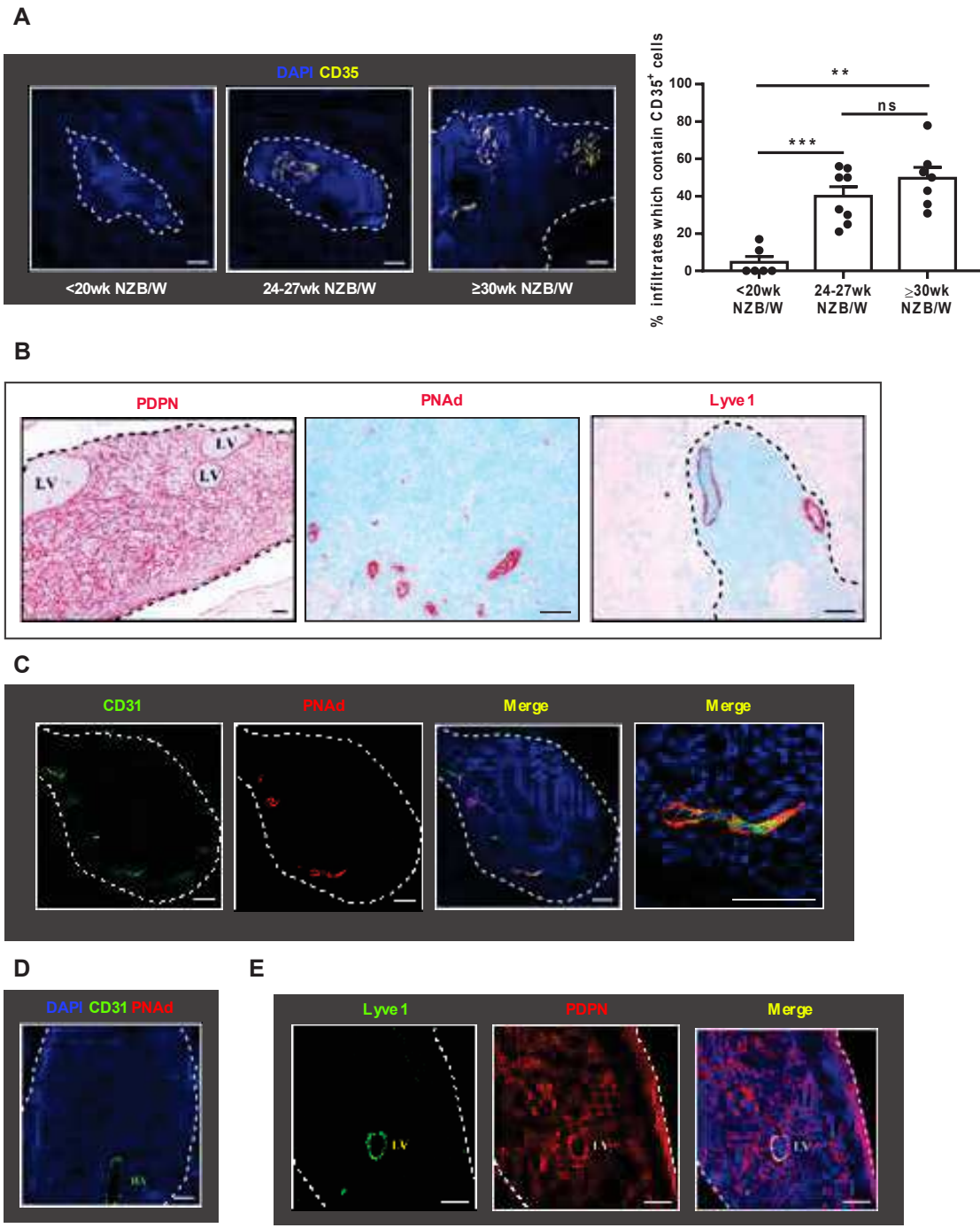


Figure 3

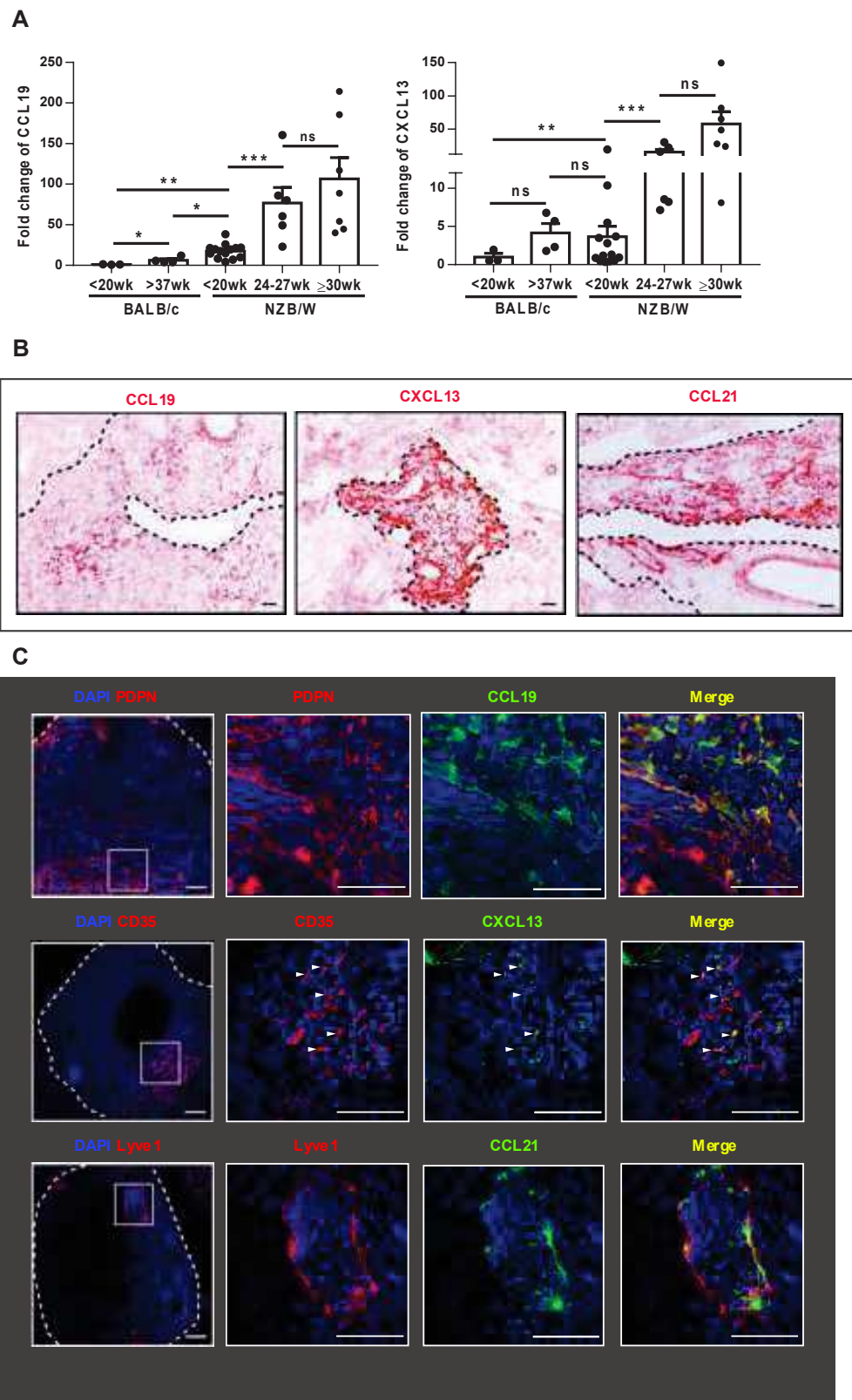


Figure 4

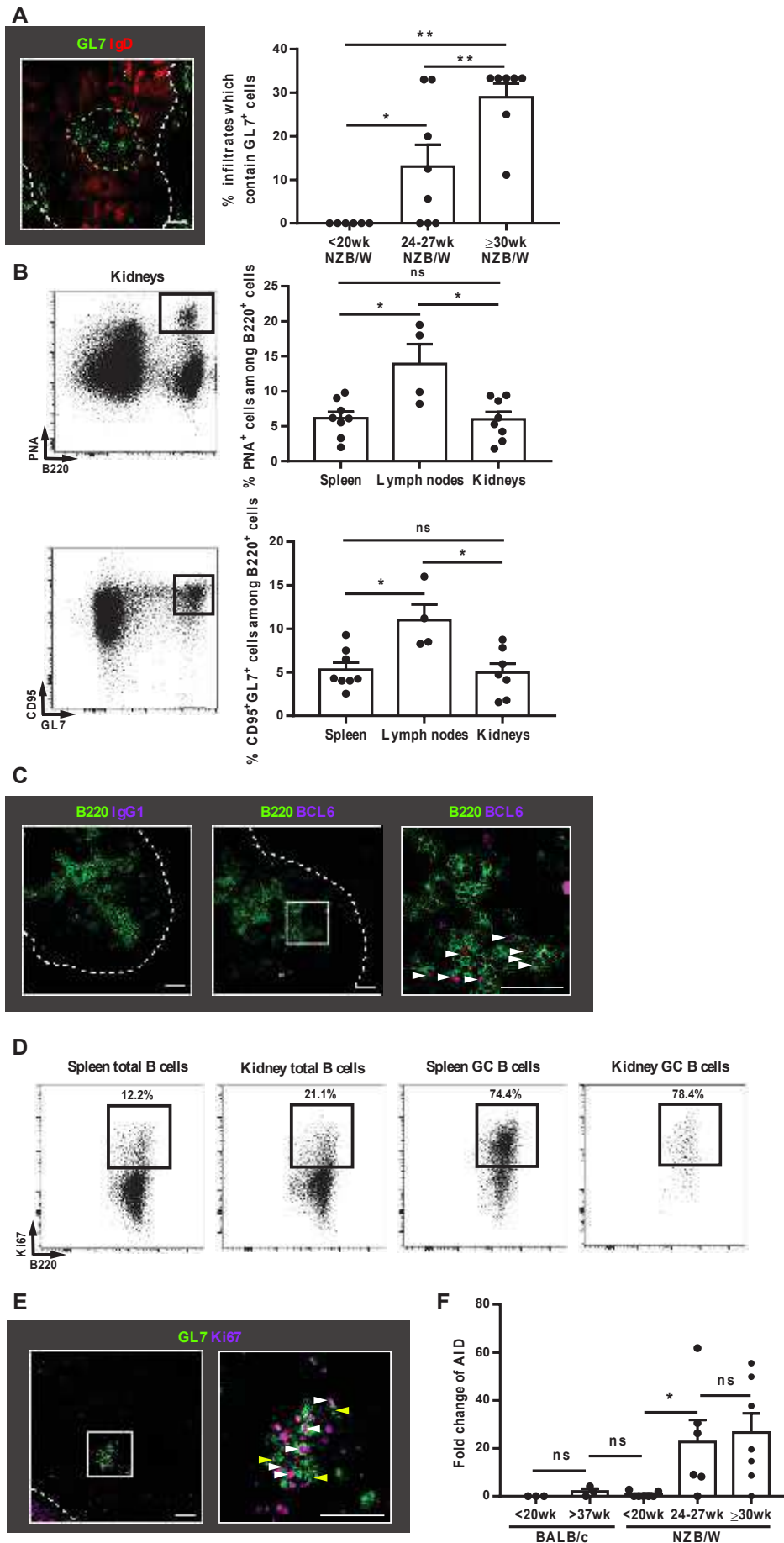


Figure 5

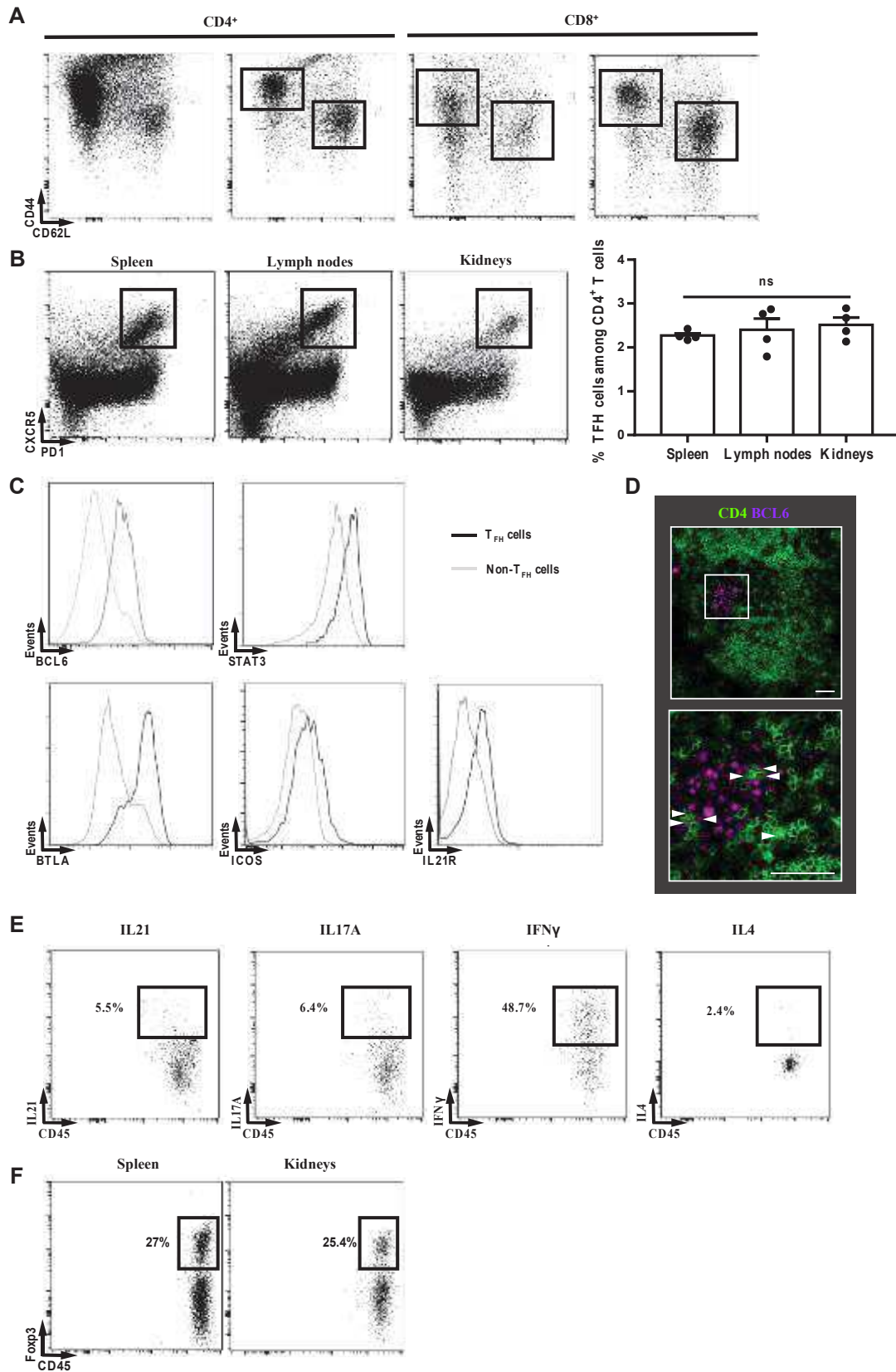


Figure 6

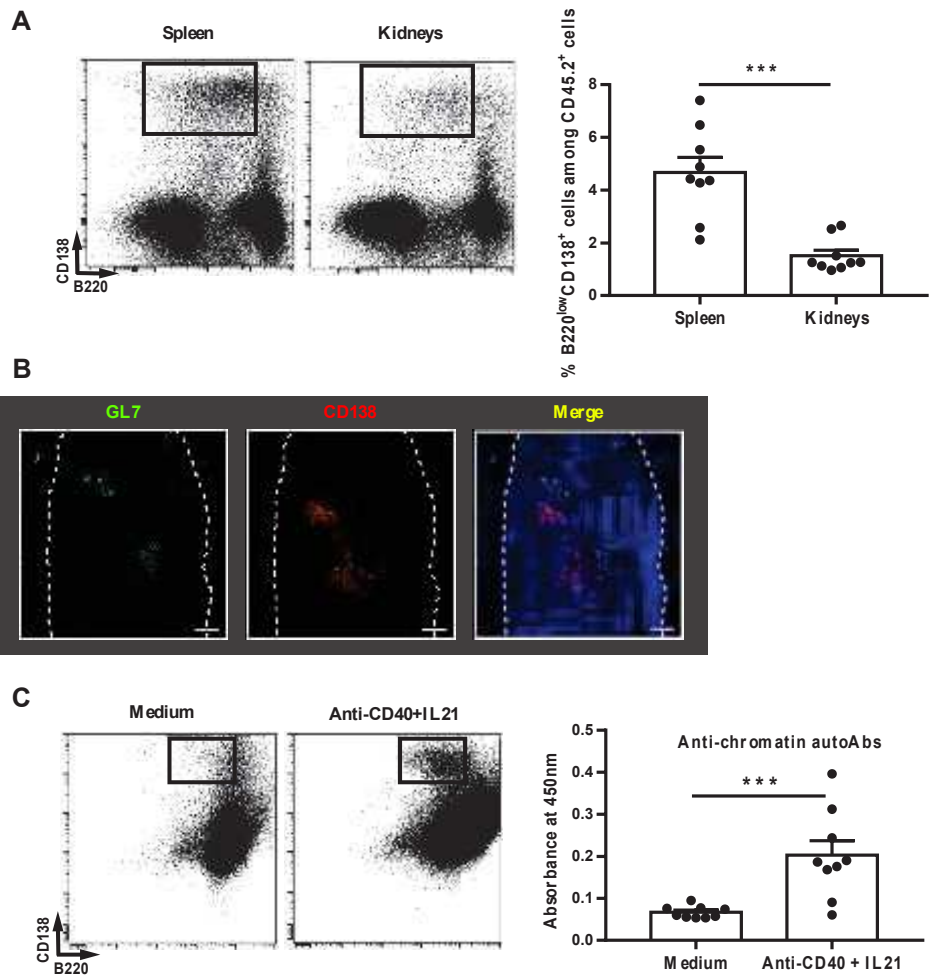


Figure 7

III. Mise en évidence de la présence d'un compartiment stromal dans les OLT des reins de souris lupiques NZB/W

Durant ma thèse, j'ai pu contribuer à la caractérisation des OLT rénaux et plus particulièrement à la mise en évidence du compartiment stromal dans ces OLT. Les OLT se forment dans la région glomérulaire et tubulo-interstitielle des reins des souris NZB/W. Nous avons pu observer une première infiltration de cellules (LT CXCR3⁺) très tôt dans les reins des souris NZB/W âgées de 11-13 semaines, puis les premiers signes d'une organisation caractéristique d'OLT se mettent en place et apparaissent vers l'âge de 20 semaines. Au cours du développement de la maladie ces OLT continueront à augmenter en taille et en nombre. Ils sont constitués par des cellules myéloïdes, des LB et LT CD4⁺ et CD8⁺ qui s'organiseront en zones distinctes au cours du temps. De façon similaire aux ganglions lymphatiques, des centres germinatifs, comprenant des LTFH et des LB capables de se différencier en plasmocytes produisant des auto-Ac, ont également été observés au sein de ces OLT. De plus, nous avons mis en évidence la présence d'un compartiment stromal fonctionnel dans ces OLT grâce à des marquages par immunofluorescence et immunoenzymatiques effectués sur des coupes de reins de souris NZB/W malades (**Publication N°1, Figure 3**). J'ai contribué à identifier et à caractériser les principales populations de cellules stromales habituellement présentes dans les ganglions lymphatiques à savoir les FRC, les BEC et les LEC. Nous avons ainsi pu observer au sein de l'OLT dans les reins de souris NZB/W malades, des FRC (PDPN⁺) qui forment un réseau étendu au sein de l'infiltrat ainsi que des vaisseaux lymphatiques (PDPN⁺Lyve1⁺) (**Publication N°1, Figure 3C**). De façon intéressante, nous avons pu noter que les infiltrats tubulo-interstitiels s'organisent autour d'un vaisseau sanguin CD31⁺ (**Publication N°1, Figure 3D**) alors que les HEV (CD31⁺PNA^{d+}), spécialisés dans l'entrée des lymphocytes, sont observées presque exclusivement dans l'infiltrat central souvent au niveau de la frontière de l'infiltrat (**Publication N°1, Figure 3D**). Ceci suggère que les mécanismes de néogenèse des infiltrats médullaires seraient différents de ceux des infiltrats tubulo-interstitiels au niveau cortical.

De plus, une augmentation des niveaux d'expression des chimiokines CCL19 et CXCL13, produites habituellement respectivement par les FRC et FDC des ganglions lymphatiques, ont été détectée dans les reins des souris NZB/W âgées (moyenne du facteur d'induction CCL19 = 106,4 *versus* 17,5 chez des souris BALB/c contrôles ; moyenne du facteur d'induction CXCL13 = 57,8 *versus* 3,6) (**Publication N°1, Figure 4**). La production des chimiokines CCL19 par les FRC et CXCL13 par les FDC a été confirmée à l'aide de la microscopie confocale sur des

coupes de reins de souris NZB/W malades (**Publication N°1, Figure 4C**). De même, la co-localisation des LEC Lyve1⁺ avec le marquage de la chimiokine CCL21 a permis de mettre en évidence la présence de cette chimiokine habituellement produite par les LEC des ganglions lymphatiques et permettant l'attraction des cellules CCR7⁺, telles que les LT naïfs (**Publication N°1, Figure 4C**).

Ces résultats mettent en évidence la fonctionnalité du compartiment stromal et suggèrent fortement son implication dans le recrutement des lymphocytes, ainsi que dans l'organisation des infiltrats rénaux au cours de la pathologie lupique.

Parallèlement à l'identification des cellules stromales dans les OLT grâce à des marquages immunohistologiques, avec Romain Veber nous avons également mis au point un protocole nous permettant d'isoler les cellules stromales à partir des reins. L'isolement de ces cellules avait pour objectif de caractériser leur phénotype et leur fonction de façon plus approfondie afin de suivre leur évolution au cours du développement des OLT. En effet, suite à leur mise en évidence au sein des OLT, plusieurs questions restent encore en suspens : Ces cellules stromales peuvent-elles avoir un rôle de LTo comme dans les OLS ? A partir de quelles cellules se sont-elles différenciées pour présenter un phénotype similaire aux cellules stromales des OLS ? Sont-elles à l'origine de la formation des OLT ? Ont-elles, elles aussi, un rôle dans la présentation antigénique et le maintien ou la rupture de la tolérance périphérique locale ?

Après plusieurs essais, nous avons adapté le protocole utilisé par l'équipe du Dr. Francesca Barone pour l'isolement des cellules stromales présentes dans les glandes salivaires d'un modèle murin du syndrome de Sjögren (**Barone et al., 2015**). En résumé, la digestion des reins est réalisée par une première étape de digestion sous agitation douce, en présence de collagénase D et de DNase I, puis d'une deuxième étape de digestion des fragments restants en présence de collagénase D, DNase I et de dispase II ; enfin un enrichissement en cellules stromales est réalisé par un tri négatif pour éliminer les leucocytes et les érythrocytes. Suite à cette digestion, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux cellules stromales habituellement présentes dans les OLS et nous avons pu observer par cytométrie en flux, parmi les cellules CD45⁻ EpCAM⁻, des cellules stromales de type FRC, BEC et LEC (**Figure 42A**). La proportion de ces cellules semble être comparable à celle retrouvée dans les ganglions lymphatiques (**Figure 20**), avec une majorité de FRC et de BEC et un plus faible pourcentage de LEC (1,6 % ± SEM) (**Figure 42B**). Toutefois, une quantité importante de cellules doubles négatives (PDPN⁻ CD31⁻) est aussi observée, contrairement aux OLS, ce qui pourrait être lié à la composition cellulaire variée du rein. Par ailleurs, nous ne pouvons pas affirmer que la population de cellules CD45⁻ EpCAM⁻ PDPN⁺ correspond uniquement à des FRC, en effet la PDPN est aussi exprimée

par les podocytes dans le rein. Cependant, la fragilité des podocytes et le faible pourcentage de cellules exprimant la PDPN rendent peu probable une contamination par ces cellules parmi les cellules de type FRC.

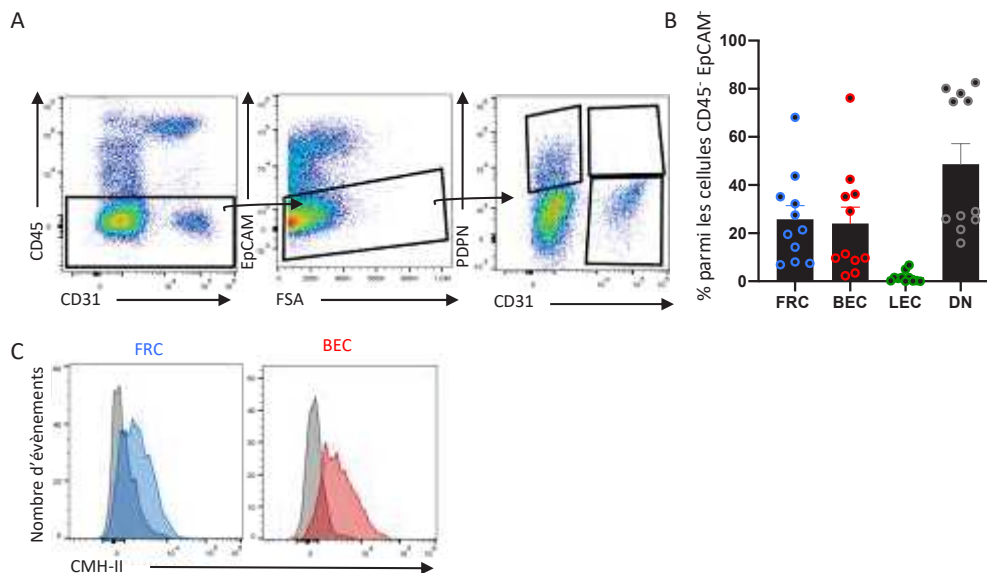


Figure 42 Mise en évidence par cytométrie en flux de la présence des cellules stromales dans les OLT rénaux chez les souris NZB/W malades.

A) Après digestion enzymatique des reins de souris NZB/W malades et âgées de plus de 30 semaines, les cellules ont été marquées avec des Ac anti-PDPN et anti-CD31 afin d'identifier les FRC (PDPN⁺CD31⁻), les LEC (PDPN⁺CD31⁺), les BEC (PDPN⁻CD31⁺) et les cellules doubles négatives (PDPN⁻CD31⁻) parmi les cellules non hématopoïétiques (CD45⁻) et non épithéliales (EpCAM⁻). **B)** Pourcentage de chaque sous-population de cellules stromales parmi les cellules CD45⁺ EpCAM⁻ isolées des reins de souris NZB/W malades (n = 11). Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne (histogramme) ± SEM. **C)** L'expression des molécules du CMH-II est visualisée à la surface des FRC et des BEC isolées des reins de souris malades grâce à des Ac anti-CMH-II (IA-IE). En gris, l'autofluorescence des cellules non marquées. Les résultats sont représentatifs des 3 souris NZB/W malades analysées individuellement.

De plus, les premières analyses laissent penser que ces cellules exprimeraient également des molécules du CMH-II (**Figure 42C**), bien que l'intensité d'expression semble plus faible que ce que l'on observe à la surface des cellules stromales des OLS (**Figure 21A**). L'ensemble de ces résultats, obtenus grâce à ce protocole d'isolement des cellules stromales, est prometteur et pourrait nous permettre de caractériser finement l'environnement stromal dans les OLT pour apporter des réponses aux points évoqués ci-dessus. Toutefois, la faible quantité de cellules stromales obtenues suite à la digestion des reins de souris malades reste un facteur limitant pour une étude approfondie de ce compartiment, particulièrement chez les souris plus jeunes présentant des OLT moins développés. C'est pourquoi, dans la continuité de ce projet, nous avons débuté la caractérisation d'un modèle murin de lupus induit développant des OLT.

IV. Caractérisation du compartiment stromal des organes lymphoïdes dans le modèle murin de lupus induit au pristane

Le modèle murin de lupus induit au pristane récapitule de nombreuses caractéristiques de la pathologie humaine (cf. *Introduction. VI Les modèles murins classiques pour l'étude du LED*) et présente plusieurs avantages par rapport au modèle de lupus des souris NZB/W. En effet, ce modèle offre une plus grande flexibilité de par leur fond génétique commun et la possibilité de choisir le moment d'injection permettant de maîtriser le stade de l'étude, par rapport aux souris F1 NZB/W qui développent spontanément la pathologie à partir de l'âge de 30 semaines en moyenne. De plus, la formation de nombreuses structures ectopiques de type lipogranulomes chez ce modèle offrirait une alternative pour l'étude des OLT et nous permettrait de caractériser le compartiment stromal au cours du processus d'organogénèse lymphoïde, dans une condition auto-immune. En effet, bien que nous ayons réussi à isoler les cellules stromales des OLT rénaux de souris lupiques malades, la rareté de ces dernières est l'un des points limitants pour leur caractérisation approfondie. Ainsi dans le but d'évaluer la pertinence de ce modèle murin de lupus induit comme une alternative pour l'étude du stroma lupique, nous avons réalisé une première fois en décembre 2018 l'injection de pristane chez des souris BALB/c hébergées au sein d'une animalerie conventionnelle, puis une seconde fois en juillet 2019 chez des souris BALB/c hébergées dans la nouvelle animalerie de l'IBMC, exempte d'organisme pathogène spécifique (EOPS) (actuellement encore en étude).

1. Manifestations cliniques et biologiques générales du modèle murin de lupus induit

Dans un premier temps, afin de suivre l'état général des souris suite à l'injection de pristane, différents signes cliniques ont été mesurés au cours du développement de la maladie tels que la variation de poids, le gonflement des chevilles, la protéinurie et les auto-Ac présents dans le sérum, chez les souris BALB/c traitées (BALB/c pristane) et contrôles. De 12 semaines jusqu'à 6 mois post-injection, dans le contexte d'une animalerie EOPS, la variation du poids des souris « BALB/c pristane » est stable (% moyen de variation par rapport au poids initial = 27,6 % à 11 semaines et 27,9 % à 27 semaines) alors que le groupe de souris contrôles tend à prendre du poids au cours du temps (% moyen de variation par rapport au poids initial = 32,8 % à 11 semaines et 38,1 % à 27 semaines) (**Figure 43A**). A l'inverse, dans une animalerie conventionnelle, la prise de poids des souris « BALB/c pristane » est plus importante dès les premières semaines post-injection par rapport aux souris contrôles (% moyen de variation par rapport au poids initial = 13,3 % *versus* 5,7 % à 11 semaines) (**Figure 43B**).

Par ailleurs, afin d'évaluer l'inflammation articulaire, nous avons mesuré l'épaisseur des chevilles droites et gauches des souris à partir de 20 semaines après l'injection de pristane. En effet, il a été décrit que les souris BALB/c ayant reçu une injection de pristane développent des signes d'arthrite à partir du 4^e mois (»20 semaines) (Leiss et al., 2013). Nos résultats montrent qu'en condition EOPS, les souris « BALB/c pristane » semblent présenter, en moyenne, une épaisseur articulaire plus élevée que celle des souris contrôles, bien que cette différence soit non significative à 6 mois post-injection (épaisseur moyenne = 2,9 mm *versus* 2,6 mm) (Figure 43C). A ce stade de l'étude, nous pouvons noter que quatre souris « BALB/c pristane » sur neuf, soit 44 %, présentent certains signes inflammatoires tel qu'un gonflement et une rougeur au niveau d'au moins une cheville. Cependant, lors de notre première expérience dans l'animalerie conventionnelle, les souris « BALB/c pristane » développaient plus rapidement (5 mois post-injection) des signes d'inflammation articulaire (gonflement et rougeur des pattes arrières) et l'épaisseur des chevilles était significativement plus élevée par rapport aux souris contrôles (épaisseur moyenne= 3,5 mm *versus* 2,6 mm) (Figure 43D).

De façon intéressante, le développement d'arthrite semble correspondre avec la production d'auto-Ac de type IgM anti-ADNdb. En effet, ce type d'auto-Ac a été détecté, à partir de 3 mois après l'injection, dans le sérum de toutes les souris « BALB/c pristane » hébergées dans une animalerie en statut conventionnel, par rapport aux souris contrôles (moyenne de DO à 3 mois après injection = 0,57 *versus* 0,12) (Figure 43E). Parmi les souris « BALB/c pristane » élevées en statut EOPS, seules trois souris présentent des auto-Ac de type IgM anti-ADNdb dans leur sérum à partir de 3 mois post-injection (Pour ces 3 souris : DO à 3 mois après injection supérieure à 1,4), par rapport aux souris contrôles (moyenne de DO à 3 mois après injection = 0,64). De façon intéressante, parmi ces souris « BALB/c pristane », deux ont également développé des signes d'arthrite à 6 mois post-injection sur une des pattes (épaisseur de la cheville > 3,2 mm) (Figure 43C).

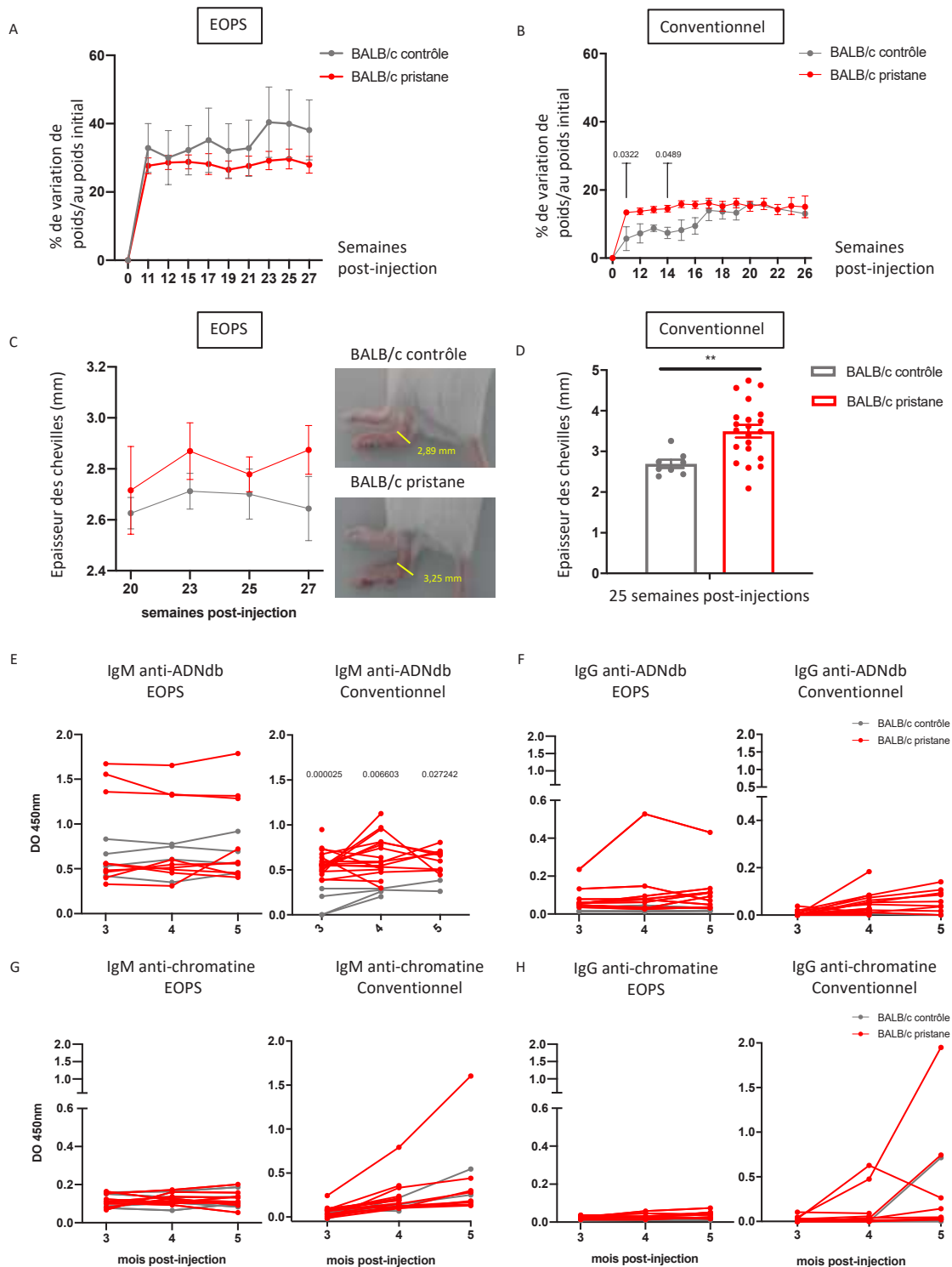


Figure 43 Suivi clinique et biologique du développement de la pathologie lupique chez le modèle murin de lupus induit au pristane

(A-B) Évolution de la variation du poids des souris par rapport au poids initial suite à l'injection de pristane (BALB/c pristane) ou non (BALB/c contrôle) chez des souris hébergées dans une animalerie EOPS (A) ou conventionnelle (B). (C) Mesure de l'épaisseur des chevilles postérieures droite et gauche de souris BALB/c pristane et contrôle dans des conditions EOPS. Photographies comparatives d'une patte de souris BALB/c contrôle (haut) et d'une souris BALB/c pristane développant des signes d'une arthrite (bas), à 27 semaines post-injection (D) Mesure de l'épaisseur des chevilles postérieures droite et gauche de BALB/c pristane et contrôle hébergées dans une animalerie conventionnelle, à 25 semaines après l'injection. ** $p < 0,01$ (Mann-Whitney). Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM. (E-F-G-H) Dosage des auto-Ac présents dans le sérum

(dilution identique) IgM-anti-ADNdb (E); IgG-anti-ADNdb (F) ; IgM anti-chromatine (G); IgG-anti-chromatine (H) par test ELISA, représenté en densité optique à 450 nm par la moyenne de 3 expériences indépendantes. n = 9 BALB/c pristane et n = 4 BALB/c contrôle dans des conditions EOPS ; n = 11 BALB/c pristane et n = 4 BALB/c contrôle dans des conditions conventionnelles. Valeur de p ajustée significative < 0,05 (test t multiple corrigé selon la méthode de Sidak-Bonferroni). Chaque point correspond à une souris.

Nous n'avons pas observé de différences significatives du taux d'auto-Ac de type IgG anti-ADNdb entre les souris « BALB/c pristane » et les souris contrôles en statut conventionnel et EOPS (**Figure 43F**).

Toutefois, contrairement à ce qui a été montré dans la littérature, nous n'avons pas détecté la production d'auto-Ac de type IgG et IgM anti-chromatine suite à l'injection de pristane chez des souris BALB/c, dans les deux animaleries, à 3 et 4 mois post-injection (**Figure 43G, H**) (**Kuroda et al., 2004; Leiss et al., 2013**). A 5 mois post-injection, aucune souris « BALB/c pristane » élevée en condition EOPS ne produit des auto-Ac anti-chromatine, alors qu'en condition conventionnelle, une souris présente un taux d'auto-Ac anti-chromatine élevé par rapport aux souris contrôles (DO IgM anti-chromatine = 1,6 *versus* 0,5 et DO IgG anti-chromatine = 1,9 *versus* 0,7) (**Figure 43G, H**). Cependant, il est à noter que la chromatine utilisée pour détecter des auto-Ac anti-chromatine est différente entre les études et avec celle que nous avons utilisée. De plus, cette variabilité dans les résultats peut aussi s'expliquer, d'une part par le fait que dans la littérature seule une certaine proportion des souris BALB/c produisent des auto-Ac anti-ADN (40 %) ou anti-chromatine (60 %) suivant l'injection de pristane (**Kuroda et al., 2004; Leiss et al., 2013; Reeves et al., 2009**) et d'autre part par le fait que les conditions sanitaires dans lesquels les animaux sont hébergés (conventionnelles ou EOPS) peut impacter le système immunitaire et influencer l'évolution de l'auto-immunité selon les modèles murins (**Hamilton et al., 1998; Pásztoi et al., 2011**). Dans le modèle murin de lupus induit au pristane, Hamilton et collaborateurs ont notamment mis en évidence que l'intensité et la diversité des auto-Ac produits sont influencés par l'environnement microbien (**Hamilton et al., 1998**).

Les souris hébergées dans l'animalerie EOPS étant encore actuellement en étude, je présenterai, pour la suite de la caractérisation de ce modèle, uniquement les résultats obtenus à 6 mois post-injection chez des souris hébergées au sein de l'animalerie conventionnelle. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'atteinte rénale que peuvent développer ces souris suite à l'injection de pristane (**Odobasic et al., 2015; Richards et al., 2001; Satoh et al., 1995; Summers et al., 2010**). Les analyses immunohistologiques réalisées à partir des coupes de reins des souris traitées révèlent des dépôts d'IgG et de complément (C3) au niveau des glomérules,

d'une façon similaire à ce qui est observé dans les reins de souris NZB/W malades, suggérant un dépôt de complexes immuns (**Figure 44A**).

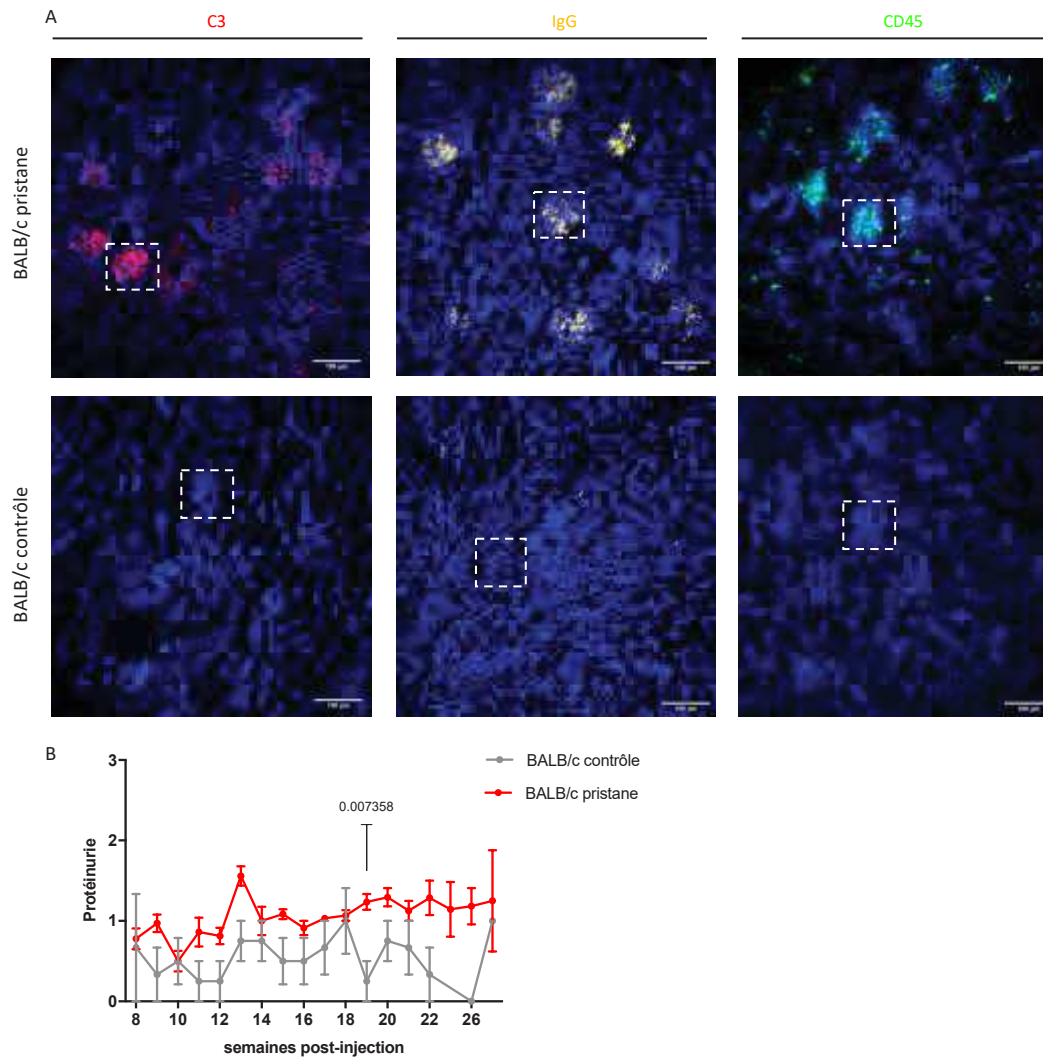


Figure 44 Évaluation de l'atteinte rénale chez le modèle murin de lupus induit au pristane

(A) Images représentatives de coupes de reins congelés de souris BALB/c pristane (n = 7) (haut) et contrôles (n = 2) (bas) à 6 mois post-injection (animalerie conventionnelle) et marquées avec des Ac spécifiques anti-C3 (rouge), anti-IgG (jaune) et anti-CD45 (vert) révélant les dépôts de complément, d'auto-Ac et l'infiltration de leucocytes dans la zone glomérulaire. Les noyaux ont été colorés avec du DAPI (bleu). Grossissement 200 x. Les glomérules sont définis par les pointillés (B) Score semi-quantitatif de la protéinurie chez les souris BALB/c pristane (n = 4-18) et contrôle (n = 2-4) à partir de huit semaines post-injection représenté sous la forme d'une courbe moyenne \pm SEM. Dosage de la protéinurie déterminée à l'aide de bandelettes Albustix (Bayer Diagnostics, Basingstoke, Angleterre). Valeur significative pour p ajustée < 0,05 (test t multiple corrigé selon la méthode de Sidak-Bonferroni). Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM.

Ces dépôts n'ont pas été observés dans les reins des souris BALB/c contrôles non injectées et ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par le groupe du Dr. W.H Reeves, qui avait initialement caractérisé ce modèle induit de lupus (Sato et al., 1995). De plus, une infiltration de leucocytes (CD45⁺) dans les glomérules a également été observée à 6 mois post injection

chez des souris BALB/c pristane qui ne semble pas se retrouver dans les reins de souris contrôles de même âge (**Figure 44A**). Nous avons également estimé la quantité de protéine dans les urines par une mesure semi-quantitative ce qui reflète une défaillance de la fonction de filtration du rein (**Figure 44B**).

La protéinurie des souris « BALB/c pristane » n'est pas significativement plus élevée à 6 mois après l'injection de pristane par rapport aux souris contrôles, toutefois, il semble se dégager une légère tendance à la hausse à partir de 19 semaines après l'injection entre les souris « BALB/c pristane » et les souris contrôles. Cette mesure pourrait ne pas être assez sensible pour observer une différence à ce stade de l'étude. En effet, une étude utilisant le même système de mesure de la protéinurie que nous a montré que seules 30 % des souris BALB/c traitées présentent un taux élevé de protéine dans les urines (≥ 3 ou 300 mg/dL ; Albustix), alors que le dépôt de complément C3 était observé chez 70 % des souris 10 mois après l'injection de pristane (**Calvani et al., 2003**). Malheureusement, ces infiltrations cellulaires paraissent beaucoup plus légères que les infiltrats leucocytaires observés chez des souris NZB/W âgées de 24 semaines ce qui serait équivalent à 6 mois après l'injection de pristane chez les souris BALB/c (**Publication N°1**) (**Figure 44A**).

2. Étude du compartiment stromal des ganglions lymphatiques

Tel que décrit ci-dessus, les reins de souris « BALB/c pristane » présentent des dépôts d'IgG et de complément C3, nous nous sommes donc demandé si le compartiment stromal qui supporte les réponses immunitaires dans les ganglions lymphatiques drainant le rein pouvait être altéré tel que nous l'avions montré chez des souris lupiques NZB/W ayant une atteinte rénale. Nous avons initié l'étude des cellules stromales par cytométrie en flux, à 6 mois post-injection, dans les ganglions lymphatiques rénaux, et les ganglions mésentériques en raison de l'inflammation localisée dans la cavité péritonéale.

De façon surprenante, nous n'avons pas observé de variation du nombre absolu de cellules lymphoïdes (CD45⁺) bien que le nombre de cellules stromales (CD45⁻) semble légèrement plus élevé dans les ganglions mésentériques des souris « BALB/c pristane » par rapport aux souris saines (nombre moyen = 105000 *versus* 57000 cellules/chaine ganglionnaire) (**Figure 45A**). En revanche dans les ganglions rénaux, le nombre absolu de cellules lymphoïdes (CD45⁺) est significativement plus élevé chez les souris BALB/c traitées (nombre moyen = 2 millions *versus* 0,6 millions cellules/ganglion) tout comme le nombre de cellules stromales (nombre moyen = 7800 *versus* 3800 cellules/ganglion) (**Figure 45C**). Il est à noter que cette expansion des

compartiments hématopoïétique et stromal est tout de même inférieure à ce que l'on peut observer dans les ganglions rénaux de souris NZB/W malades, avec en moyenne 9 millions de cellules CD45⁺ et 20000 cellules CD45⁻ par ganglion rénal (**Figure 19A**). Toutefois, il n'y a pas de variation de la fréquence des différentes sous-populations de cellules stromales chez les souris traitées par rapport aux souris saines dans les ganglions lymphatiques rénaux ni mésentériques (**Figure 45B, D**), contrairement à ce que nous observons dans les ganglions rénaux entre des souris NZB/W jeunes et âgées. Il ne semble donc pas y avoir de réorganisation du compartiment stromal des ganglions mésentériques et rénaux suite à l'inflammation induite par l'injection de pristane.

Par ailleurs, nous nous sommes aussi intéressés à l'expression des molécules du CMH-II par les cellules stromales, dont l'augmentation de l'expression par ces dernières reflète un état activé en lien avec l'inflammation. Dans les ganglions mésentériques, l'expression du CMH-II à la surface des FRC, BEC et LEC est similaire entre des souris BALB/c traitées et des souris saines (**Figure 45F**). En ce qui concerne les ganglions rénaux, l'expression du CMH-II à la surface des FRC et des BEC dans les ganglions rénaux n'est pas augmentée chez des souris BALB/c traitées par rapport aux souris saines, contrairement à ce que nous avons montré chez les souris lupiques NZB/W malades. À l'inverse, les LEC des ganglions rénaux des souris « BALB/c pristane » semblent présenter plus faiblement les molécules du CMH-II à leur surface par rapport aux LEC de souris BALB/c contrôle (ratio moyen d'intensité de fluorescence = 16 *versus* 32) (**Figure 45E, G**). D'une façon intéressante, nous avons observé une variation similaire entre l'intensité d'expression du CMH-II à la surface des LEC des ganglions rénaux des souris NZB/W malades et celle des souris contrôles de même âge (ratio moyen d'intensité de fluorescence = 15 *versus* 32) (**Figure 21B**). Par conséquent, bien que cette tendance chez les souris « BALB/c pristane » reste à confirmer avec un plus grand nombre d'échantillons, cette variation pourrait être liée au développement de la pathologie lupique chez les souris BALB/c traitées au pristane.

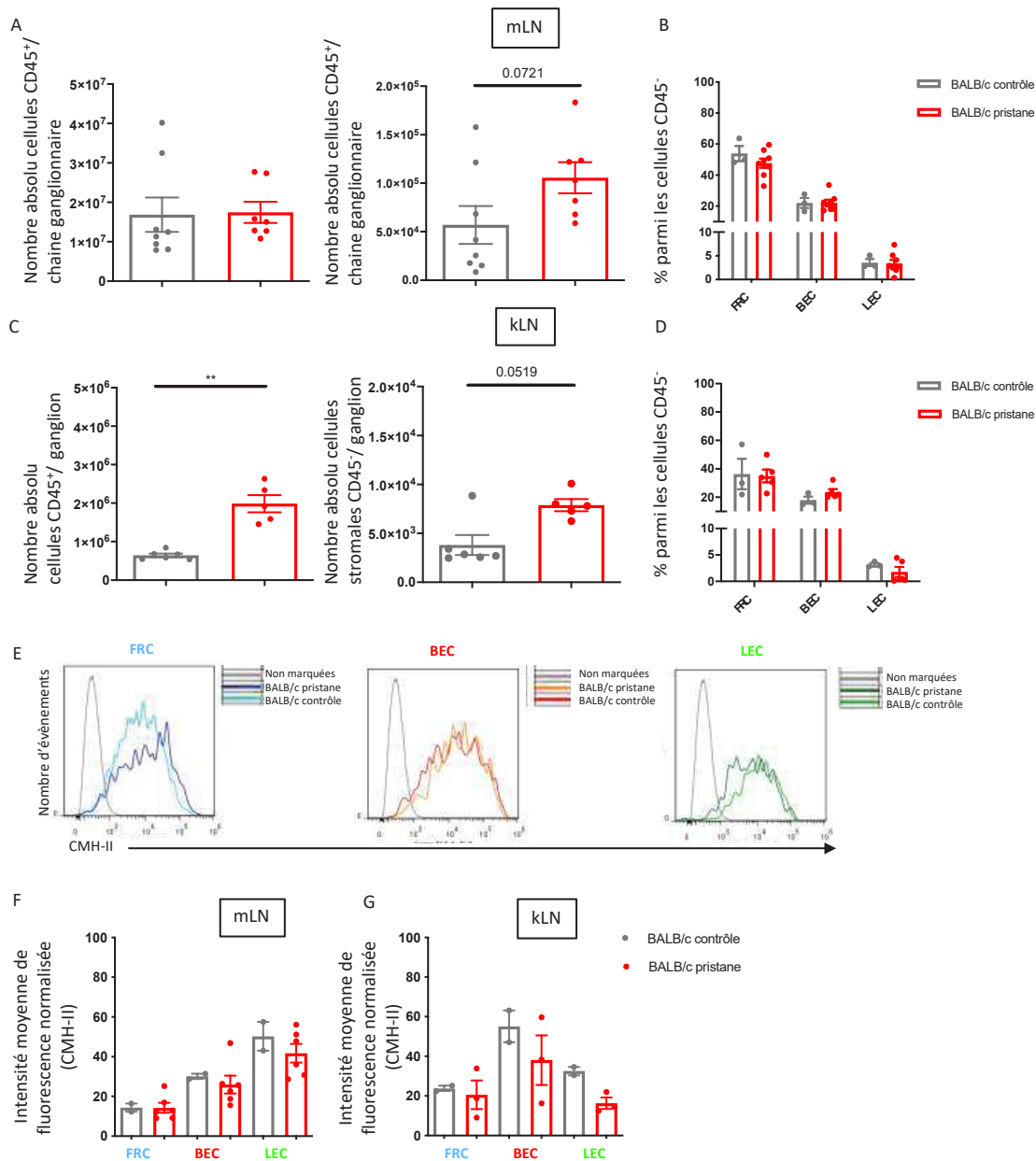


Figure 45 Caractérisation du compartiment stromal des ganglions lymphatiques en réponse à l'injection de pristane chez les souris BALB/c

(A-C) Le nombre absolu de cellules CD45⁺ et CD45⁻ par ganglion a été déterminé à partir des suspensions cellulaires obtenues par digestion enzymatique de la chaîne ganglionnaire mésentérique (mLN) (A) et des ganglions lymphatiques rénaux (kLN) (C) de souris BALB/c ayant reçu une injection de pristane (n = 6-8) et de souris BALB/c saines contrôles (n = 5-7) (B-D) Pourcentage des différentes sous-populations de cellules stromales parmi les cellules stromales vivantes (CD45⁻DAPI⁻) dans les ganglions lymphatiques mésentériques (B) et rénaux (D) de souris BALB/c pristane (n = 5-8) et de souris BALB/c contrôles (n = 3). (E) Histogrammes représentatifs de l'expression des molécules du CMH-II (Ac anti-IA/IE) par les FRC, BEC, LEC isolées de ganglions lymphatiques rénaux de souris BALB/c pristane et de souris BALB/c contrôles. (F) L'expression de surface des molécules du CMH-II est exprimée sous la forme d'un ratio d'intensité moyenne de fluorescence du CMH-II par rapport aux cellules stromales non marquées, pour les FRC (bleu), BEC (rouge), LEC (vert) des ganglions lymphatiques mésentériques et rénaux. N = 3 BALB/c pristane et n = 2 souris BALB/c contrôles (6 mois post-injections). Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne (histogramme) ± SEM et chaque point correspond à une souris. **p < 0,01 (Mann-Whitney).

En résumé, l'augmentation du nombre de leucocytes dans les ganglions rénaux des souris traitées semble être associée à la réponse inflammatoire locale des dépôts d'IgG et de complément dans les reins, et le compartiment stromal tend à accompagner cette prolifération de cellules immunitaires. Ces premiers résultats suggèrent donc une réponse, certes modérée, du compartiment stromal. Toutefois, ces analyses préliminaires n'ont pas permis de mettre en évidence d'autres variations quantitatives et qualitatives significatives des cellules stromales chez ce modèle murin de lupus induit en comparaison aux souris saines et aux souris NZB/W malades.

3. Caractérisation des organes lymphoïdes ectopiques de type lipogranulomes

Bien que, le modèle murin de lupus induit au pristane ne semble pas développer d'OLT rénaux et présente une faible atteinte rénale (dépôts d'IgG et de complément) à 6 mois post-injection, comme attendu, les souris ont développé des structures lymphoïdes ectopiques ou lipogranulomes dans la cavité péritonéale suite à l'injection de pristane. Ce processus de néogenèse lymphoïde se produit en réponse à l'inflammation chronique provoquée par la cytotoxicité de l'huile minérale. En effet, la phagocytose des gouttelettes d'huile par les macrophages de la cavité péritonéale provoquerait un excès d'apoptose et une inflammation locale entraînant l'infiltration de leucocytes (**Shaheen et al., 1999**). Ces structures précédemment décrites ressemblent fortement aux OLT avec une ségrégation en zone de LT et de LB, de cellules myéloïdes ainsi que de vaisseaux sanguins. Il a également été montré que ces lipogranulomes présentent des caractéristiques spécifiques aux centres germinatifs dont la production locale d'auto-Ac (**Nacionales et al., 2006, 2009**).

De façon similaire aux études précédentes, nous avons constaté que l'injection intrapéritonéale de pristane à des souris BALB/c induit la formation de lipogranulomes compacts, de couleur blanche et localisés au niveau du diaphragme, de la rate et des intestins, en amas ou isolés (**Figure 46A**). Grâce à des marquages en immunofluorescence réalisés sur des coupes de lipogranulomes congelés nous avons pu mettre en évidence la présence de cellules stromales exprimant la PDPN et de cellules endothéliales exprimant CD31 mais pas le marqueur Lyve-1, suggérant une vascularisation sanguine plutôt que lymphatique (**Figure 46B**). La dissociation de ces lipogranulomes puis l'analyse par cytométrie en flux des suspensions cellulaires obtenues pour chaque souris, a permis de confirmer la présence de cellules stromales de type FRC (PDPN⁺ CD31⁻) et BEC (PDPN⁻ CD31⁺), tel qu'observé sur les coupes de lipogranulomes,

mais également de détecter une faible proportion de cellules de type LEC exprimant les marqueurs de la PDPN et CD31 (1,5 %) (**Figure 46C**).

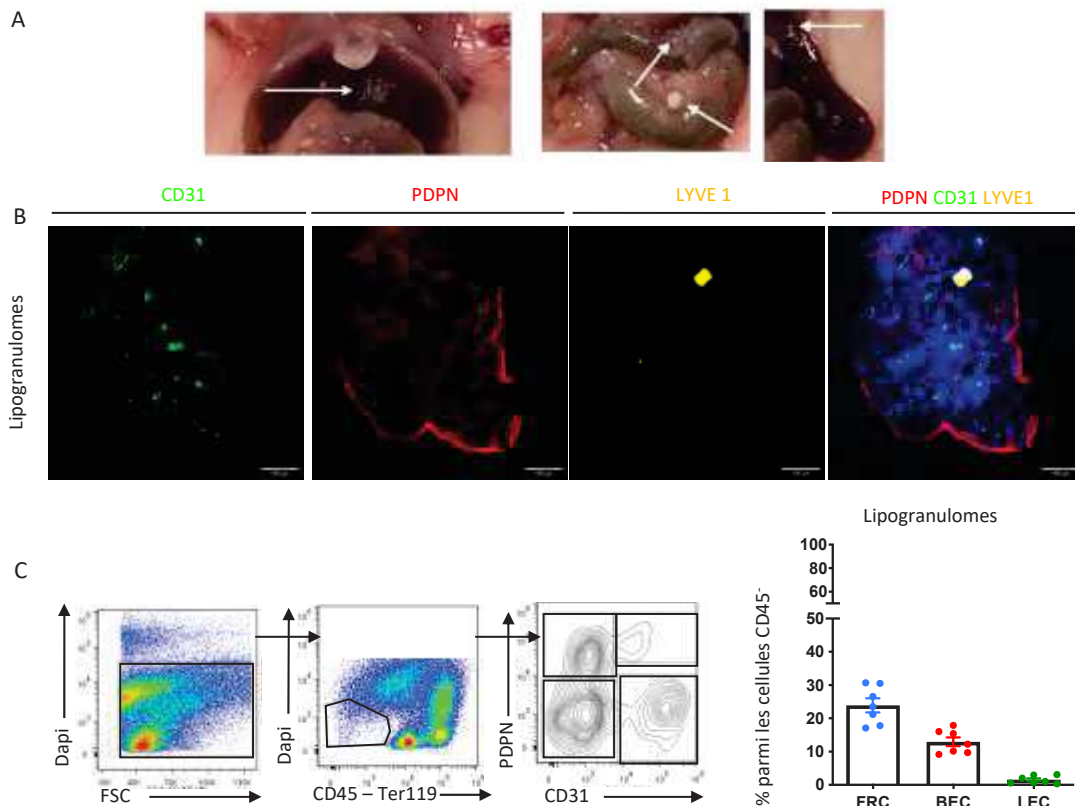


Figure 46 Mise en évidence de la présence de cellules stromales dans les lipogranulomes

(A) Photographies représentatives de la cavité péritonéale d'une souris BALB/c pristane avant prélèvement des organes et des lipogranulomes (flèches blanches) à 6 mois post-injection, n = 7. (B) Images représentatives de coupes de lipogranulomes congelés de souris BALB/c pristane (n = 3) marquées avec des Ac anti-CD31(vert), anti-PDPN (rouge), anti-LYVE1 (jaune) révélant les cellules endothéliales sanguines, les cellules de type FRC, et endothéliales lymphatiques. Les noyaux ont été colorés avec du DAPI (bleu). Microscopie à épifluorescence, grossissement 200 x. La barre d'échelle représente 100 μm (C) Identification des sous-populations de cellules stromales parmi les cellules CD45⁻ DAPI⁺ isolées à partir des lipogranulomes prélevés chez des souris BALB/c pristane à 6 mois post-injection (n = 5). Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne (histogramme) □ SEM et chaque point correspond à une souris.

Globalement, la proportion de cellules CD45⁻ est comprise entre 0,5 et 2,5 % pour l'ensemble des lipogranulomes prélevés chez chaque souris, ce qui est comparable à la proportion de cellules stromales des ganglions lymphatiques. Parmi les cellules CD45⁻, environ 20 % serait des cellules de types FRC (PDPN⁺ CD31⁻) et 12 % des cellules de type BEC (PDPN⁻CD31⁺) mais à l'inverse des ganglions lymphatiques, une forte proportion de cellules CD45⁻ n'exprime aucun des deux marqueurs CD31 et PDPN (CD31⁻PDPN⁻) (en moyenne 50 %). De futures analyses permettront de déterminer la nature de ces cellules.

Mis à part les cellules stromales, en moyenne 37 % de cellules CD45⁺ composent également ces lipogranulomes. Nous avons pu mettre en évidence, par cytométrie en flux, la

présence de LT (entre 5 et 20 %), de LB (2,6 % en moyenne), de cellules myéloïdes de type monocytes/macrophages CD11b⁺ CD11c⁻ (entre 2 à 15 %) et moins de 2,5 % de cellules dendritiques CD11c⁺ CD11b^{low} (**Figure 47A, B**). De plus, des cellules de type sécrétrices d'Ac (CD19^{low} CD138⁺) ont également été observées dans les suspensions cellulaires de lipogranulomes (en moyenne 2 %) (**Figure 47 C**). Un marquage avec des Ac anti-CD95 et anti-GL7 a permis de mettre en évidence des LB du centres germinatif (CD95⁺ GL7⁺) parmi les cellules B CD19⁺ (**Figure 47D**). Cependant, la proportion de ces LB CD95⁺ GL7⁺ dans les lipogranulomes est très hétérogène entre les différentes souris « BALB/c pristane » (entre 6 à 65 %) (**Figure 47D**), contrairement à ce que nous avons observé dans la rate de ces souris (résultats non montrés), suggérant une grande variabilité entre les lipogranulomes. Cependant, les résultats préliminaires de marquages de coupes de lipogranulomes réalisées à partir de 3 souris « BALB/c pristane » ne confirme que partiellement nos résultats obtenus par cytométrie en flux. En effet, nous avons observé que quelques cellules T (CD3⁺) dispersées dans l'ensemble des lipogranulomes marqués (**Figure 47E**), seul un lipogranulome d'une souris semble contenir quelques cellules myéloïdes CD11b⁺ et aucune cellule B (B220⁺) n'a été détectée parmi les différents lipogranulomes des trois souris (résultats non montrés).

En résumé, dans nos conditions expérimentales, les lipogranulomes, formés suite à l'injection de pristane chez des souris BALB/c hébergées dans une animalerie conventionnelle, présentent certaines caractéristiques de structures lymphoïdes ectopiques, telles que la présence de LT, de LB, dont pour certains des LB des centres germinatifs, et de potentielles cellules stromales de type FRC et BEC.

Cependant, contrairement aux travaux réalisés par le groupe du Dr. W.H Reeves et les résultats obtenus par cytométrie en flux, la présence de LB du centre germinatif n'a pas pu être confirmée à partir des coupes de différents lipogranulomes et nous n'avons pas observé de zones de LT et de LB (**Nacionales et al., 2006, 2009**). Les données obtenues par cytométrie en flux et par les marquages immunohistologiques apparaissent hétérogènes ce qui suggère une variabilité de la composition cellulaire de ces structures ectopiques entre chaque souris. Des futurs marquages des coupes de lipogranulomes en immunofluorescence et immunoenzymatiques à partir d'un plus grand nombre d'échantillon pourront permettre de tester cette hypothèse et de confirmer nos premiers résultats.

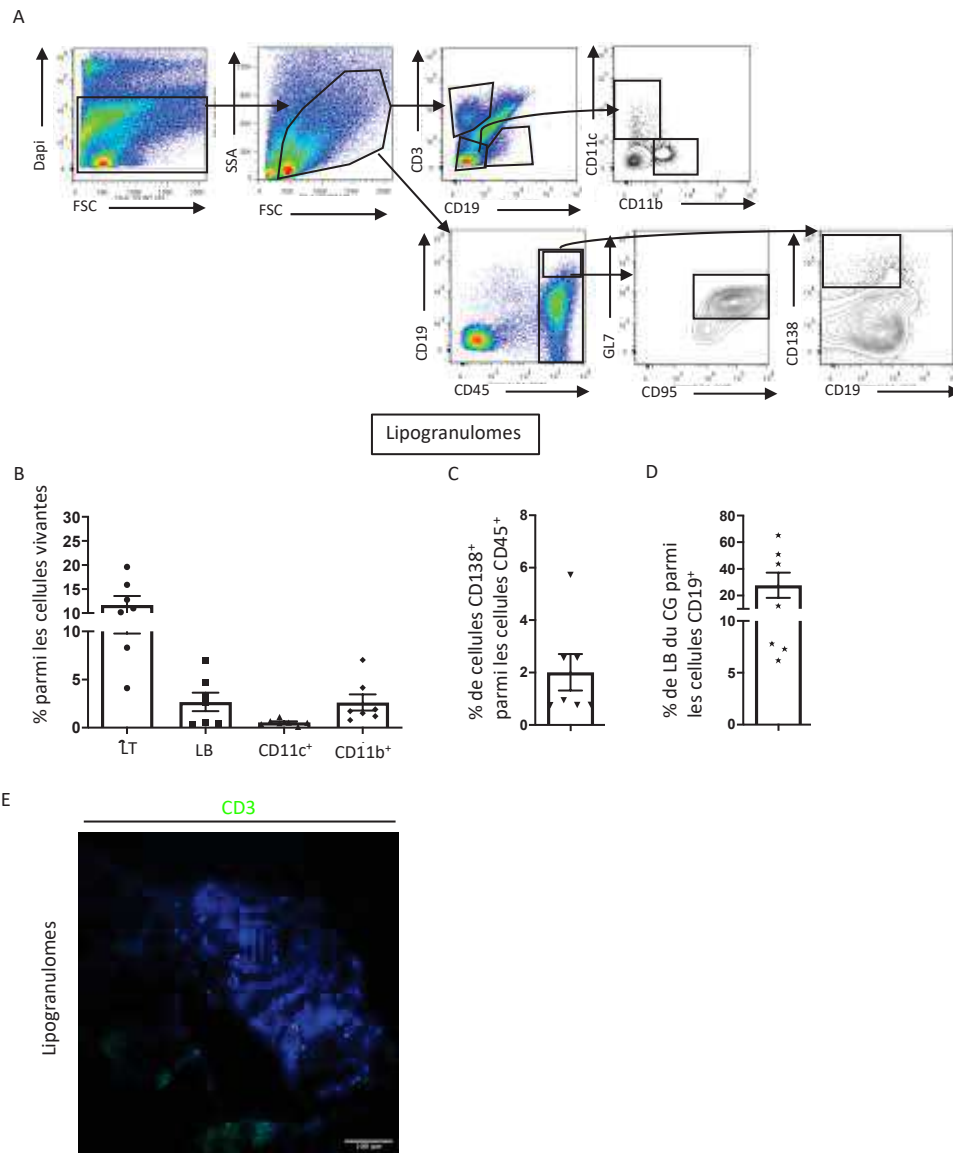


Figure 47 Les cellules immunitaires sont présentes au sein des lipogranulomes

A) Stratégie d'identification des sous-populations leucocytaires dans les lipogranulomes par cytométrie en flux. Les LT ont été identifiés par l'expression du marqueur CD3, les LB par l'expression de CD19, les cellules dendritiques par le marqueur CD11c et les monocytes par l'expression de CD11b. Parmi les LB (CD19⁺), les LB des centres germinatifs sont identifiés par l'expression des marqueurs CD95 et Gl7. Les plasmocytes sont identifiés parmi les cellules CD45⁺ (CD19^{lo} CD138^{hi}). **(B-C-D)** Proportions des différentes populations cellulaires dans les lipogranulomes. Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne (histogramme) ± SEM et chaque point correspond à une souris hébergée dans une animalerie conventionnelle à 6 mois post-injection. **(E)** Image représentative de coupe de lipogranulome congelé de souris BALB/c pristane (n = 3) marquée avec des Ac anti-CD3 (vert) révélant la présence de cellules T. Les noyaux ont été colorés avec du DAPI (bleu). Microscopie à épifluorescence, grossissement 200 x. La barre d'échelle représente 100 μ m.

V. Conclusion/Discussion

Dans la **Publication N°1** nous avons démontré et décrit des infiltrats inflammatoires, dans les reins des souris NZB/W, qui présentent toutes les caractéristiques organisationnelles et fonctionnelles des OLT. Ces OLT contiennent des LB en prolifération, dont des LB des centres

germinatifs. L'expression de l'enzyme AID, ainsi que la présence de réseaux de FDC et de TFH produisant diverses cytokines (dont l'IL-21) dans l'OLT, suggèrent fortement la différenciation des LB et la production locale d'auto-anticorps. De plus, ces OLT contiennent un compartiment stromal (FRC, BEC, LEC, FDC) produisant diverses chimiokines (CCL19, CCL21 et CXCL13) qui permettent la structuration de l'OLT. Dans les ganglions lymphatiques, ces cellules participent aussi intimement aux réponses immunitaires, car elles facilitent l'entrée des cellules via la production de ces chimiokines, et la circulation d'Ag dans la structure lymphoïde grâce à la formation d'un réseau de conduits (FRC) et de vaisseaux lymphatiques et sanguins (**Malhotra et al., 2013**). De plus, des premiers résultats complémentaires obtenus au laboratoire ont mis en évidence la présence de molécules de la matrice extracellulaire, telles que le collagène, la fibronectine et la laminine, au niveau du réseau de cellules de type FRC et des vaisseaux lymphatiques dans les OLT rénaux (**Veber et al., données non publiées**). Ceci renforce la proximité phénotypique du compartiment stromal des OLT rénaux des souris NZB/W avec son homologue du ganglion lymphatique. Ainsi, au sein des infiltrats immunitaires, la présence de ces molécules suggère le développement de conduits, qui pourraient favoriser le positionnement et la migration des leucocytes et des Ag. Dans notre étude (**Publication N°1**) comme dans la grande majorité des études démontrant la présence de cellules stromales dans les OLT, la caractérisation de ces dernières est basée sur des marquages sur coupes de tissus. Cependant, l'isolement de cellules stromales des OLT permettrait de réaliser une analyse quantitative plus aisément ainsi que qu'une caractérisation phénotypique plus approfondie au cours de la formation des OLT lors du développement de la maladie. Dans cet objectif, nous avons mis au point un protocole qui nous a permis d'isoler les trois principales sous-populations de cellules stromales (FRC, BEC et LEC) dans les OLT rénaux de souris NZB/W malades présentant une forte protéinurie. Toutefois, la faible quantité de cellules obtenues, à partir d'un rein de souris NZB/W malade présentant des OLT développés, est un facteur limitant pour une étude chez des souris plus jeunes. En effet, même dans les ganglions lymphatiques la proportion de ces cellules est inférieure à 2 % de la totalité des cellules (**Fletcher et al., 2011**).

Dans l'objectif de poursuivre notre étude approfondie du compartiment stromal d'OLT dans le contexte du LED, nous avons introduit dans notre animalerie un nouveau modèle murin du lupus qui développe des structures lymphoïdes ectopiques : le modèle murin de lupus induit au pristane. Avant de pouvoir utiliser ce modèle pour l'étude du compartiment stromal dans ces structures, nous avons initié la caractérisation de ce dernier afin de nous assurer que les animaux développent une pathologie lupique telle qu'elle est décrite dans la littérature. Bien que cette étude ait été réalisée au cours d'un changement d'animalerie de notre laboratoire, les premiers

résultats obtenus dans l'animalerie conventionnelle et EOPS permettent de formuler des conclusions préliminaires quant à l'alternative que peut offrir ce modèle de lupus.

Dans une animalerie de statut conventionnel, l'injection intrapéritonéale de pristane à des souris BALB/c induit la production d'auto-Ac anti-ADNdb de type IgM à partir de 3 mois, le développement d'une arthrite à 5 mois post-injection et une légère atteinte rénale caractérisée par le dépôt d'IgG et de C3 et l'infiltration glomérulaire de cellules CD45⁺. Toutefois, contrairement à ce qui a été décrit chez ce modèle murin (**Kuroda et al., 2004; Leiss et al., 2013; Reeves et al., 2009; Satoh et al., 1995**), les taux d'auto-Ac de type IgG anti-ADNdb et anti-chromatine (IgG et IgM) est similaire pour la quasi-totalité des souris traitées à celui observé chez les souris contrôles. Cette variabilité par rapport aux différentes études réalisées avec ce modèle pourrait être liée aux différentes conditions sanitaires dans lesquels les animaux sont hébergés. En effet, il a été montré que les conditions sanitaires d'élevage ont un impact sur le système immunitaire et peuvent influencer, positivement ou négativement, le développement et l'intensité de l'auto-immunité selon les modèles murins (**Hamilton et al., 1998; Pásztoi et al., 2011**). Dans le modèle murin de lupus induit au pristane le type d'auto-Ac (IgG ou IgM) et la proportion de souris traitées développant des auto-Ac est variable en fonction de l'environnement microbien (**Hamilton et al., 1998**). Entre nos deux animaleries (conventionnelles ou EOPS) nous avons également pu observer de légères différences de signes cliniques, telles que la production d'auto-Ac anti-ADNdb de type IgM (30 % des souris en condition EOPS par rapport à 100 % en condition conventionnelle) ou d'arthrite (légère inflammation des pattes à 5 mois après injection en condition EOPS par rapport une arthrite déclarée chez toutes les souris en condition conventionnelle au même stade). De plus, Hamilton et collaborateurs ont aussi montré que les taux d'IgM totaux sont supérieurs chez les souris hébergées dans une animalerie EOPS à 6 mois post-injection par rapport à une animalerie conventionnelle (**Hamilton et al., 1998**), ce qui serait cohérent avec les résultats du dosage des IgM anti-ADNdb observés dans nos conditions d'élevage EOPS par rapport au contexte conventionnel (**Figure 43E**).

De façon intéressante, nous avons observé dans la rate de souris traitées une augmentation significative de la proportion de LB du centre germinatif (CD95⁺ GL7⁺) ainsi qu'un pourcentage légèrement plus élevé de cellules sécrétrices d'Ac (CD19^{low} CD138⁺) par rapport aux souris contrôles (résultats non montrés), suggérant de potentiels processus de commutation de classe. Bien que nous n'ayons pas détecté la présence d'auto-Ac anti-ADN ou anti-chromatine de type IgG, cela n'exclut pas la présence d'IgG anti-RNP/Sm et anti-Su,

habituellement produits chez ce modèle de lupus induit, mais que nous n'avons pas recherché pour le moment (**Hamilton et al., 1998; Satoh et al., 1995**).

Concernant l'atteinte rénale développée par ce modèle murin, nous avons pu observer une infiltration de cellules immunitaires (CD45⁺) ainsi qu'un dépôt d'IgG et de complément C3 dans les glomérules des souris BALB/c à 6 mois post-injection (environ 30 semaines). Le dépôt de complexes immuns dans les glomérules est connu pour jouer un rôle crucial dans le développement de la néphrite lupique (**Lindquist et al., 2017; Yung et al., 2015**). Cependant, la fonction rénale des souris BALB/c pristane évaluée par la mesure de protéinurie ne semble pas être impactée à ce stade (**Figure 44B**). A l'inverse, chez les souris NZB/W âgées de plus de 30 semaines, l'inflammation rénale est plus avancée, avec une protéinurie élevée, des dépôts de complexes immuns, une prolifération mésangiale, des lésions glomérulaires, ainsi qu'une infiltration de cellules immunitaires glomérulaires et tubulo-interstitielles (**Publication N°1 ; Veber et al, données non publiées ; Bender et al. 2014**). Contrairement aux souris NZB/W, l'atteinte rénale des souris BALB/c traitées au pristane n'est pas liée au pourcentage de survie (**Bender et al., 2014; Lacotte et al., 2010**), ce qui suggère que même si nous caractérisons cette dernière à un stade plus avancé (8 à 10 mois après l'injection selon diverses études), l'atteinte rénale du modèle murin de lupus induit au pristane apparaît être plus modérée que celle des souris NZB/W (**Odobasic et al., 2015; Richards et al., 2001; Zhou et al., 2020**).

Par ailleurs, en lien avec cette inflammation rénale modérée, nous avons pu observer, chez les souris BALB/c pristane, une augmentation du nombre absolu de leucocytes CD45⁺ et de cellules stromales CD45⁻, par rapport aux souris contrôles, dans les ganglions drainant les reins. Cependant, nos résultats préliminaires ne montrent pas d'autres modifications quantitatives des sous-populations de cellules stromales chez les souris traitées, tel que nous l'observons dans les ganglions rénaux de souris NZB/W lors du développement de la maladie. Néanmoins une tendance intéressante semble s'observer au niveau de l'expression du CMH-II à la surface des LEC des ganglions rénaux de souris BALB/c traitées. Celle-ci est légèrement plus faible par rapport aux LEC des ganglions rénaux de souris contrôles. Chez les souris NZB/W malades, une expression du CMH-II moins importante est aussi observée à la surface des LEC par rapport aux LEC de souris BALB/W contrôles de même âge. Une faible expression de surface du CMH-II pourrait être associée à une rupture de tolérance des LT CD4⁺. En effet, dans un contexte sain, les LEC ont des propriétés tolérogènes via l'expression du CMH. Tel qu'évoqué précédemment en *Introduction* et dans *Chapitre I. VI. Conclusion/discussion* les LEC sont capables d'acquérir des complexes CMH-II-peptides du soi par transfert des cellules dendritiques. Ces LEC présentent ensuite ces Ag du soi aux cellules T CD4⁺, permettant

d'induire l'anergie des LT spécifiques du peptides du soi (**Dubrot et al., 2014**). Toutefois, dans un contexte d'inflammation chronique ce processus pourrait être altéré, de futurs travaux permettront d'approfondir ces données, particulièrement à un stade précoce chez des souris traitées.

D'autre part, l'intérêt que nous avons pour ce modèle murin de lupus induit reposait notamment sur l'hypothèse que les lipogranulomes, ressemblant fortement aux OLT (**Nacionales et al., 2006, 2009**), pourraient être une alternative pour une étude approfondie des OLT et plus particulièrement des cellules stromales, dans le contexte de la pathologie lupique. Nos premiers résultats suggèrent la présence d'un compartiment stromal au sein des lipogranulomes, avec des cellules PDPN⁺ formant un réseau et des vaisseaux et/ou capillaires bordés par des cellules CD31⁺. Des marquages sur coupes de lipogranulomes seront réalisées pour étudier la production par ces cellules des chimiokines caractéristiques des cellules stromales des organes lymphoïdes. En effet, l'ARNm des chimiokines (CCL19, CCL21, CXCL13 et CXCL12) exprimées par les cellules stromales et nécessaire à l'organisation des leucocytes, a été détecté dans les lipogranulomes formés suite à l'injection de pristane ou d'huile minérale chez des souris saines BALB/c (**Nacionales et al., 2006**). De plus, nous avons également relevé, par cytométrie en flux, au sein des lipogranulomes à 6 mois post-injection, la présence majoritaire de LT, de cellules myéloïdes CD11b⁺ (moins de 10 %), des LB, dont des LB des centres germinatifs et des plasmocytes. Ces données pourraient être cohérentes avec deux études précédentes ayant caractérisé ces structures lymphoïdes (**Nacionales et al., 2006, 2009**). En effet, les auteurs ont montré que la proportion de LT et de LB tend à augmenter entre 2 et 4 mois post-injection (» 20 % pour les LT) alors que la proportion de cellules CD11b⁺ diminue (80 % à 20 %) au cours du temps. Dans une deuxième étude, les auteurs ont mis en évidence la présence de LB sécrétant des auto-Ac, ainsi que des processus d'hypermutation somatique et commutation de classe dans ces lipogranulomes, ce qui suggère que ces structures lymphoïdes contiennent des centres germinatifs (**Nacionales et al., 2009**). Cependant, bien que les marquages réalisés sur les coupes de ces lipogranulomes nous ont permis de visualiser quelques LT CD3⁺ dispersés dans ces structures, nous n'avons pour le moment pas confirmé la présence de LB des centres germinatifs et de cellules CD11b⁺ dans tous les lipogranulomes, contrairement à ce qui a été précédemment démontré (**Nacionales et al., 2006**). Une potentielle explication à cette différence pourrait être le fait que nous n'avons pas analysé un nombre suffisant d'échantillons. En effet, d'une part la proportion de LB totaux dans les lipogranulomes semble faible (environ 5 %) et d'autre part l'hétérogénéité de certains de nos résultats (entre 6 et 65 % de LB des centres germinatifs parmi les LB totaux) suggèrent une certaine variabilité

interindividuelle et/ou intra-individus dans la composition de ces lipogranulomes. Il serait donc intéressant d'étudier ces structures lymphoïdes ectopiques de façon isolée, pour la 2^e expérience, tel que cela a été réalisé pour mettre en évidence les processus de recombinaison VDJ des cellules B au sein des lipogranulomes (**Nacionales et al., 2009**).

Par ailleurs, nous avons pu remarquer la présence de cellules myéloïdes CD11b⁺ dans les lipogranulomes ainsi qu'une proportion significativement plus élevée dans la rate des souris BALB/c ayant reçu une injection de pristane par rapport aux souris contrôles (résultats non montrés). Ces cellules myéloïdes pourraient correspondre aux monocytes immatures CD11b⁺ Ly6c^{hi} produit en réponse à l'inflammation et infiltrant la cavité péritonéale enflammée. Il a été montré que ces cellules sont responsables de la production pathologique d'IFN de type I chez ce modèle murin (**Lee et al., 2008b**). De plus, l'inactivation du gène codant pour le récepteur aux IFN de type I (IFNAR) dans ce modèle de lupus induit, semble diminuer l'atteinte rénale (protéinurie) et limiter la production d'auto-Ac (**Nacionales et al., 2007**). Le rôle des IFN de type I dans la pathologie chez le modèle murin de lupus induit au pristane est un des avantages de ce modèle pour l'étude du LED par rapport au modèle murin de lupus spontané NZB/W pour lequel la signature IFN de type I est faible (**Zhuang et al., 2015**). En effet, chez l'Homme cette signature IFN de type I est présente chez 70 % des patients lupiques, bien que les principales cellules productrices des IFN α et β soient les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Lors de futurs travaux nous analyserons l'expression de gènes induite par les IFN de type I, tels que IP10, Mx1 ou ISG-15 à partir des lipogranulomes et des cellules présentes dans la cavité péritonéale après l'injection de pristane chez des souris BALB/c.

Pour conclure, les résultats obtenus à ce jour ne nous permettent pas de valider l'utilisation de ce modèle de lupus induit comme une bonne alternative pour l'étude du compartiment stromal des OLT. En effet, nous n'avons pas assez d'éléments pour nous assurer une certaine similitude entre la structure des lipogranulomes et des OLT rénaux de souris NZB/W. Les premiers résultats obtenus chez des souris BALB/c traitées et hébergées en conditions conventionnelles n'ont pas permis de confirmer des caractéristiques communes aux structures lymphoïdes ectopiques, telles que l'organisation de LB et de LT en zones distinctes, des vaisseaux de type HEV et la présence de centres germinatifs. Ces principales caractéristiques structurelles et fonctionnelles ont été décrites par le groupe du Dr. W.H Reeves dans les lipogranulomes de ce modèle de lupus induit et sont également présentes dans les OLT rénaux de souris NZB/W. Par conséquent, l'étude en cours chez des souris traitées et hébergées dans des conditions EOPS nous permettra de compléter nos données afin d'envisager ou non la poursuite de la

caractérisation du compartiment stromal dans les OLT dans un contexte lupique. Ainsi si les lipogranulomes qui se forment en grande quantité dans la cavité péritonéale des souris BALB/c après une injection de pristane, permettent de récapituler les principales caractéristiques des OLT, nous pourrions réaliser une caractérisation fonctionnelle poussée des cellules stromales des lipogranulomes avec, entre autres, une analyse transcriptomique pour étudier la réponse de ces dernières aux IFN de type I dans un contexte lupique et comparer avec celle réalisée dans les OLS. De plus, bien que l'infiltration de cellules immunitaires dans la cavité péritonéale résulterait de l'inflammation créée par la phagocytose des gouttelettes d'huile par les macrophages et l'excès d'apoptose de ces derniers dans la cavité péritonéale (**Calvani et al., 2005; Shaheen et al., 1999**), l'origine des cellules stromales présentes dans ces lipogranulomes reste, quant à elle, encore à déterminer. Dans les OLS, il a été montré que les cellules stromales mésenchymateuses pourraient dériver des précurseurs d'adipocytes via la signalisation par la lymphotoxine (**Bénézech et al., 2012**). Étant donné la localisation de ces structures lymphoïdes ectopiques, il serait particulièrement intéressant d'étudier l'hypothèse d'une origine adypocytaire des cellules stromales présentes dans ces lipogranulomes.

L'étude du microenvironnement des cellules immunitaires dans les structures lymphoïdes ectopiques représente un véritable enjeu pour comprendre la mise en place et le développement de ces structures afin d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour des pathologies dans lesquelles ces OLT sont un effet délétère, dont le LED.

Conclusion et Discussion

L'objectif de ma thèse était d'étudier le compartiment stromal des organes lymphoïdes secondaires et tertiaires dans le contexte d'une maladie auto-immune, le lupus.

Ce compartiment cellulaire a longtemps été considéré comme la simple architecture des OLS, cependant, depuis plusieurs années, différentes études ont pu mettre en évidence l'importance des cellules stromales dans la régulation des cellules immunitaires dans des conditions physiologiques et pathologiques. Les signaux fournis par les cellules stromales sont essentiels au bon fonctionnement et à l'organisation des cellules immunitaires dans les OLS. Les cellules stromales semblent également jouer un rôle clé dans l'induction et le maintien de la tolérance périphérique des LT. De plus, les OLS ne sont pas les seuls organes lymphoïdes au sein desquels les cellules stromales sont retrouvées. Le stroma est aussi présent dans les organes lymphoïdes tertiaires. Ces structures lymphoïdes ectopiques organisées ont été observées dans des cas d'infections bactériennes et virales, de rejet de greffe, de divers cancers et de maladies auto-immunes. Selon les pathologies considérées, l'amplification de la réponse immunitaire locale peut avoir un effet bénéfique en éliminant plus rapidement le pathogène par exemple ou en un effet délétère en créant un environnement tolérogène pour la tumeur ou encore en exacerbant les réponses locales dans les maladies auto-immunes. En dépit du fait que les mécanismes de formation des OLT semblent varier en fonction des situations pathologiques, différents signaux moléculaires communs au stroma des OLS ont été mis en évidence dans les OLT et interviennent également dans la communication avec les cellules immunitaires sur le site de l'inflammation.

Au laboratoire, notre équipe s'intéresse aux mécanismes impliqués dans le développement des maladies auto-immunes, principalement du lupus. Le LED est une pathologie caractérisée par une inflammation chronique provoquant des lésions dans de nombreux organes tels que les reins, les poumons ou la peau. Un des signes biologiques majeurs est la production d'auto-Ac dirigés contre des composants nucléaires, résultant d'une rupture de tolérance au soi et d'une activation excessive du système immunitaire. Ces auto-Ac peuvent aussi se déposer dans les reins sous la forme de complexes immuns, accompagnés d'une infiltration inflammatoire de cellules immunitaires et causer une néphropathie. Au cours du développement de la maladie, ces infiltrats de cellules immunitaires peuvent s'organiser et former des OLT structurés et fonctionnels.

Les cellules stromales étant des facteurs clés de la régulation des cellules immunitaires et le lupus une pathologie complexe dans laquelle divers acteurs cellulaires et moléculaires entrent en compte, nous nous sommes intéressés à la caractérisation du micro-environnement stromal

des organes lymphoïdes secondaires et tertiaires, chez le modèle murin spontané NZB/W et chez le modèle murin de lupus induit au pristane.

Dans une première partie de mon travail de thèse j'ai pu mettre en évidence la plasticité mécanique et fonctionnelle des cellules stromales présentes dans les ganglions lymphatiques drainant le rein, organe cible de la pathologie lupique. En effet, nous avons pu observer à l'aide de différentes techniques dont un séquençage du transcriptome, que les cellules stromales de souris NZB/W malades accompagnent la prolifération excessive des cellules immunitaires dans les ganglions lymphatiques rénaux des souris NZB/W, en apportant entre autres, un support architectural. Nous avons en effet pu observer une extension du réseau réticulaire et des vaisseaux sanguins et lymphatiques qui contribuerait ainsi à favoriser la circulation des cellules immunitaires (dont les cellules auto-réactives) et la diffusion de signaux solubles et d'(auto)-Ag dans les ganglions lymphatiques à proximité de l'organe enflammé.

Hormis ces changements architecturaux du ganglion lymphatique, nous avons aussi pu mettre en évidence des modifications phénotypiques des cellules stromales au cours du développement de la pathologie et de l'atteinte rénale. D'une part, la comparaison des profils transcriptomiques des cellules stromales de souris NZB/W malades par rapport à des souris pré-lupiques a permis de révéler pour la première fois, la signature inflammatoire du compartiment stromal dans la pathologie du lupus. Les sous-populations de cellules stromales de souris NZB/W présentent chacune un profil transcriptomique spécifique selon leur fonction. De plus, de façon générale, au cours du développement de l'atteinte rénale, nous retrouvons chez les trois sous-populations de cellules stromales une augmentation de l'expression de gènes codant pour des molécules de la phase aiguë, du système du complément et diverses cytokines inflammatoires. Par ailleurs, nos premières données semblent montrer des variations de l'expression génique de facteurs nécessaires au recrutement des LT (CCL19, CCL21) et à la survie des LB (CXCL12, BAFF). Ces variations n'ont pas été observées au cours du vieillissement des souris contrôles, ce qui renforce l'hypothèse que le compartiment stromal des souris lupiques est dans un état activé en association avec l'inflammation chronique.

Les signaux moléculaires et cellulaires entraînant ces modifications du compartiment stromal au cours du développement de l'auto-immunité restent encore à étudier. Toutefois, plusieurs travaux réalisés à partir de modèles murins d'infection ou d'immunisation nous permettent de proposer des hypothèses quant au potentiel mécanisme entraînant la restructuration du stroma des ganglions lymphatiques chez les souris lupiques. En effet, au cours d'une infection ou d'une immunisation, l'expansion des ganglions résulte principalement de l'afflux de lymphocytes et de leur prolifération afin d'engager une réponse immunitaire efficace et adéquate (cf *B.II.2.La*

dynamique du compartiment stromal lors des réponses immunitaires) (Thierry et al., 2019). Le remodelage des ganglions lymphatiques débute par une phase d'initiation durant laquelle il y a une augmentation du drainage lymphatique afférent et de la perméabilité des HEV, permettant d'accroître le transport des cytokines pro-inflammatoires et des cellules dendritiques et des lymphocytes naïfs. Ce processus semble être initié par les cellules de l'immunité innée, via la signalisation induite par l'IL-6 qui stimule l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 par les HEV, ce qui induit l'extravasation des lymphocytes (Chen et al., 2006). L'augmentation du flux peut, à son tour, entraîner l'expression accrue de CCL21 par les FRC ce qui favorise le recrutement des cellules dendritiques et des lymphocytes naïfs exprimant CCR7 (Tomei et al., 2009). De plus, ce sont les cellules dendritiques, grâce à l'interaction de CLEC-2 avec la PDPN, qui provoque l'extension du réseau de FRC (Astarita et al., 2015). Nous pouvons remarquer que chez les souris NZB/W l'expression du gène codant pour CCL21 tend à augmenter dans les FRC et LEC au cours du développement de la maladie. Le mécanisme de prolifération des FRC dépend, quant à lui, des ligands de LT α R produits par les cellules dendritiques et les lymphocytes naïfs (Kumar et al., 2015; Yang et al., 2014). Par ailleurs, l'expansion des vaisseaux sanguins et lymphatiques est médiée par le facteur de croissance VEGF, qui est sécrété principalement par les FRC en réponse à la signalisation par le récepteur de LT β (Chyou et al., 2008) et à l'IL-1 β produite par les cellules CD11c⁺ (Benahmed et al., 2014). L'ensemble de ces différentes données ainsi que les études du compartiment stromal des ganglions lymphatiques au cours du développement d'une tumeur suite à l'injection sous-cutanée de cellules de mélanome (Riedel et al., 2016) ou au cours d'une infection par le virus de l'herpès (Gregory et al., 2017) (cf Résultats. A.Chapitre I. Conclusion/discussion) suggèrent que les cellules immunitaires participent à l'induction des changements mécaniques du compartiment stromal lors du gonflement du ganglion. Enfin, une étude récente réalisée chez un modèle murin de sclérose en plaques (EAE) vient renforcer l'hypothèse que les cellules immunitaires pourraient induire les transformations du compartiment stromal des ganglions lymphatiques dans des conditions auto-immunes (Majumder et al., 2019). Dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence un nouveau rôle pour l'IL-17 produite par une sous-population de LT CD4⁺ (TH17) dans la prolifération et la survie des FRC des ganglions enflammés. La signalisation de l'IL-17, via le co-activateur transcriptionnel I κ B ζ , provoque des modifications métaboliques des FRC, telles que l'augmentation de l'absorption de glucose et du métabolisme mitochondrial, ce qui favorise leur prolifération. De plus, l'absence de signalisation via le récepteur de l'IL-17 induit un arrêt du cycle cellulaire des FRC activées et le défaut de prolifération de celles-ci perturbe la formation de centres germinatifs et la production d'auto-

Ac spécifiques de ce modèle. Les auteurs proposent que l'IL-17 agit davantage comme le "signal n°2" dans l'activation des FRC, alors que les signaux précédents tels que Clec2, l'étirement mécanique ou la lymphotoxine fournissent le "signal n°1" pour stimuler la prolifération. De façon très intéressante, la présence de la cytokine IL-17 est aussi retrouvée dans le LED et son implication a été suggérée par diverses études. L'IL-17 est augmentée dans le sérum de patients lupiques et semble être corrélée à l'activité de la maladie (**Chen et al., 2010**). Cependant d'autres études tendent à montrer que le niveau de cette cytokine ne varie pas entre les patients actifs et inactifs (**Vincent et al., 2013; Zhao et al., 2010**). En dépit de ces divergences quant aux niveaux d'IL-17 en fonction de l'activité de la maladie, cette cytokine serait potentiellement impliquée dans la néphrite lupique. En effet, l'expression de gènes liés aux cellules TH17 est augmentée chez les patients lupiques ayant une atteinte rénale par rapport aux personnes saines (**Kwan et al., 2009**). De plus, la production locale d'IL-17 a été retrouvée au niveau des reins de patients lupiques (**Crispín et al., 2008**) et de souris MRL lpr/lpr (**Zhang et al., 2009**). Enfin, nous avons détecté une fiable quantité d'IL-17 dans les reins de souris NZB/W malades (**Veber et al., données non publiées**). Cependant, Schmidt et collaborateurs ont montré qu'un traitement avec un Ac bloquant de l'IL-17 n'est pas suffisant pour protéger les souris NZB/W de la survenue de la néphrite (**Schmidt et al., 2015**). Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que l'IL-17 pourrait jouer un rôle (secondaire ?) dans la stimulation et l'activation du métabolisme des FRC.

Pour finir, il est à noter que contrairement aux modèles murins d'infection virale par le virus de l'herpès par exemple, d'immunisation avec de l'ovalbumine et un adjuvant et d'EAE, la pathologie lupique chez les souris NZB/W n'est pas transitoire. Elle se développe spontanément et s'amplifie au cours du temps, et résulte de la contribution d'un ensemble de facteurs génétiques. Par conséquent, il est également possible que le compartiment stromal présente lui aussi des défauts génétiques intrinsèques favorisant la rupture de tolérance et la prolifération de cellules auto-immunes.

Nous avons émis l'hypothèse que la capacité d'induction et de maintien de la tolérance périphérique des LT CD4⁺, via la présentation d'Ag par les molécules du CMH-II exprimées par les cellules stromales des ganglions lymphatiques rénaux des souris NZB/W, pouvait être altérée et par conséquent contribuer au développement de l'auto-immunité chez ces souris (**Baptista et al., 2014; Dubrot et al., 2014, 2018; Rouhani et al., 2015**). Tel que discuté dans le paragraphe *Conclusion/discussion* du chapitre I, l'ensemble de nos résultats obtenus par cytométrie en flux et séquençage d'ARN nous laisse penser que les FRC de souris NZB/W malades présentent un profil de cellules capables de présenter des Ag et d'activer des LT CD4⁺

(CMH-II^{high} CD86⁺) et que les LEC de souris NZB/W malades pourraient, quant à elles, posséder une plus faible capacité tolérogène (faible expression de CMH-II et de PD-L1) par rapport à des cellules issues de souris contrôles de même âge. En effet, il a été proposé que les principaux mécanismes par lesquels les LEC induisent la tolérance des cellules T CD8⁺ sont associés à la présentation d'Ag par les molécules du CMH-I, une forte expression de la molécule co-inhibitrice PD-L1 et à l'absence d'expression de molécules co-stimulatrices, telles que CD80/86 (Fletcher et al., 2010; Rouhani et al., 2015; Tewalt et al., 2012). Cependant, comme nous l'avons évoqué dans la *Conclusion/discussion* du chapitre I, la capacité des cellules stromales de souris lupiques à présenter des Ag endogènes (comme les Ag de tissus périphériques) ou exogènes dans le contexte du CMH-II reste encore à mettre en évidence chez les souris NZB/W et BALB/W.

Par ailleurs, en situation physiologique, le transfert aux cellules stromales de vésicules extracellulaires, provenant de cellules dendritiques et contenant des complexes CMH-II-peptides, favorise également l'absence de réponse et la délétion des cellules T CD4 apparentées (Dubrot et al., 2014). Les auteurs proposent que la tolérance induite par ce transfert soit associée à la forte expression de PD-L1 à la surface des cellules stromales et à l'absence de molécules de co-stimulation dans les exosomes transférés par les cellules dendritiques matures. En raison du profil phénotypique des FRC et des LEC que nous avons observé chez les souris NZB/W malades, nous pourrions envisager que la présentation antigénique suite au transfert de microvésicules aux cellules stromales pourrait être altérée et impliquée *in fine* dans la rupture de tolérance au cours du lupus. De plus, la différenciation des monocytes en cellules dendritiques matures compétentes pour la présentation antigénique est favorisée par les IFN de type I chez les patients lupiques (Blanco et al., 2001).

L'étude de Dubrot et collaborateurs suggère aussi, d'une façon plus générale, que les cellules stromales sont capables de capturer des vésicules extracellulaires. De façon intéressante, dans le LED il a été proposé qu'un défaut de clairance des corps apoptotiques, pouvant contenir du matériel nucléaire, pourrait être le point de départ de la rupture de tolérance (Cf *Introduction. a. Un défaut de clairance apoptotique*). Ces corps apoptotiques sont qualifiés de vésicules extracellulaires comme les exosomes et les microparticules, cependant ils diffèrent des deux autres de par leur mécanisme de libération, leur taille et l'expression des marqueurs de surface (Buzas et al., 2014). Chez les patients lupiques, outre les vésicules apoptotiques, il a aussi été retrouvé des microvésicules, de diamètre inférieur à 1 µm et contenant de l'ADN, qui sont reconnus par des auto-Ac anti-ADN pour former des complexes immuns (Ullal et al., 2011). De plus, il a été montré que des cellules épithéliales humaines de glandes salivaires non

néoplasiques sont capables de sécréter des exosomes (30–150 nm) qui contiennent des RNP (Ro/SSA, La/SSB et Sm) qui sont des auto-Ag caractéristiques du LED et du syndrome de Sjögren (**Kapsogeorgou et al., 2005**). Ainsi, ces différentes études nous laissent penser que le compartiment stromal des ganglions lymphatiques pourrait être capable de capturer des vésicules contenant des auto-Ag dans ce contexte auto-immun où de nombreuses vésicules apoptotiques sont présentes. Pour le moment, nous n'avons pas réussi à observer la capture par les cellules stromales de nucléosomes isolés (nucléosomes couplés à un fluorochrome AF448) lors de nos premières expériences. Cependant, une étude récente a mis en évidence l'expression par les LEC de nombreuses molécules impliquées dans l'acquisition de matériel exogène (**Berendam et al., 2019**) et nous avons également observé une forte expression des gènes codant pour des récepteurs « scavenger » chez les souris NZB/W jeunes pré-lupiques par rapport à des souris contrôles de même âge. Il est donc particulièrement intéressant de poursuivre l'étude des capacités d'endocytose d'Ag exogènes et de vésicules extracellulaires par les cellules stromales lupiques, bien que celles-ci ne soient à l'heure actuelle pas considérées comme des cellules phagocytaires professionnelles.

Par ailleurs, d'autres éléments nous permettent de proposer que le compartiment stromal pourrait présenter des défauts intrinsèques contribuant au développement de la pathologie. En effet, au stade précoce, les sous-populations de cellules stromales des ganglions rénaux des souris pré-lupiques présentent des profils transcriptomiques qui suggèrent un potentiel début de réorganisation architecturale dans les ganglions rénaux. Par ailleurs, la chimiokine inflammatoire CXCL10 tend également à être augmentée dans les LEC des ganglions rénaux des souris NZB/W jeunes pré-lupiques par rapport à des souris contrôles de même âge. De plus, nous avons précédemment détecté la présence de CXCL10 dans les glomérules des reins des souris pré-lupiques ainsi que des premiers signes d'une inflammation rénale (infiltration de LT activés CXCR3⁺) chez celles-ci (**Veber et al, données non publiées**). La production précoce de chimiokines inflammatoires, dont CXCL10, a également été décrite dans les reins des souris lupiques MRL lpr/lpr et précède l'infiltration par les leucocytes et le dépôt d'auto-anticorps (**Lema et al., 2001**). De plus, nous avons mis en place une expérience préliminaire de transfert de moelle osseuse entre des souris lupiques NZB/W et les souris contrôles de même haplotype BALB/W, avant le début de la maladie (11-12 semaines), afin de déterminer les implications respectives du stroma et des leucocytes lupiques dans le développement des OLT et de la néphrite (**Veber et al, données non publiées**). Les cellules stromales étant radiorésistantes, les souris NZB/W gardent un stroma « lupique » mais reçoivent de la moelle osseuse saine et inversement pour les souris BALB/W qui ont un stroma sain mais une moelle osseuse

« lupique ». De façon intéressante et surprenante, nous avons observé, dans les reins de ces deux groupes de souris, des infiltrats cellulaires de taille intermédiaire et exempt des signes caractéristiques des OLT, comme par exemple la ségrégation T/B. Les dommages rénaux sont également moins sévères dans les deux groupes de souris. De plus, nous avons détecté des auto-Ac anti-chromatine et anti-ADN dans le sérum des souris NZB/W avec un stroma lupique mais ayant reçu une moelle osseuse saine de souris BALB/W. Les résultats obtenus dans cette expérience préliminaire ne nous ont pas permis de conclure en raison du faible nombre d'animaux, néanmoins ces données renforcent l'hypothèse que des défauts d'ordre génétique intrinsèques aux cellules stromales des organes lymphoïdes et/ou des reins interviendraient dans le développement de la pathologie et des OLT rénaux.

C'est dans la deuxième partie de mon projet de thèse que je me suis intéressée à la caractérisation du compartiment stromal des OLT rénaux de souris NZB/W ainsi qu'aux structures lymphoïdes ectopiques, pouvant être un bon modèle d'étude d'OLT, qui se forment dans la cavité péritonéale du modèle murin de lupus induit au pristane.

Il est classiquement admis que la néphrite lupique est causée par le dépôt d'auto-Ac ou de complexes immuns, et l'infiltration de cellules immunitaires. Comme dans d'autres cas de maladies auto-immunes, cette inflammation peut engendrer l'organisation des infiltrats cellulaires et la formation d'OLT fonctionnels. Chez l'Homme, la présence d'OLT dans les reins de patients lupiques a été décrite pour la première fois par Chang et ses collaborateurs en 2011 (**Chang et al., 2011**). Ces OLT présentent une organisation similaire à ce que l'on peut observer dans les OLS, dont des signes de commutation de classe et d'hypermutation somatique ainsi qu'une interaction entre les LB avec des LTFH, suggérant la présence de centres germinatifs fonctionnels (**Liarski et al., 2014**). Dans les modèles murins de lupus, la présence d'OLT comprenant des centres germinatifs fonctionnels a été décrite pour la première fois dans la cavité péritonéale du modèle de lupus induit par l'injection intrapéritonéale de pristane (**Nacionales et al., 2006, 2009**). Dans la **publication n°1**, nous avons apporté une caractérisation approfondie des OLT qui se développent dans les reins du modèle murin de lupus spontané, les souris NZB/W. Nous avons démontré que les leucocytes s'infiltrent dans les reins au fur et à mesure de la progression de la maladie et que ces infiltrats deviennent des organes lymphoïdes entièrement organisés avec des centres germinatifs fonctionnels comprenant des LTFH, l'expression de l'enzyme AID et des LB capables de se différencier en cellules B produisant des auto-Ac anti-chromatine (**Le Coz, Veber et al., en cours de soumission**). De plus, les cellules stromales identifiées dans les OLT montrent plusieurs

similitudes par rapport à celles présentes dans les OLS, telles que la production des chimiokines nécessaires au recrutement et au positionnement des LT et LB, et l'expression de surface des molécules du CMH-II. Nous avons mis en évidence l'expression des chimiokines CCL19, CCL21 par des cellules de type FRC et LEC et de CXCL13 par des cellules de type FDC dans les OLT rénaux des souris lupiques NZB/W. Ces résultats confirment les données obtenues par Dorraji et collaborateurs montrant une augmentation de l'expression des gènes codant pour CXCL13 et CCL19 dans les reins des souris NZB/W au cours du développement de l'atteinte rénale **(Dorraji et al., 2018)**.

Le rôle des chimiokines stromales dans les OLT a été décrit dans différents modèles d'inflammation chronique et d'auto-immunité, tels que par exemple dans les iBALT chez la souris **(Rangel-Moreno et al., 2011)** ou encore dans les OLT des glandes salivaires d'un modèle murin du syndrome de Sjögren **(Bombardieri et al., 2012)**. Dans les iBALT, la production d'IL-17 déclenche l'expression des chimiokines CXCL13 et CCL19 par les fibroblastes, qui permettent alors le recrutement et l'organisation des lymphocytes. Dans les OLT des glandes salivaires chez la souris, la formation d'OLT est précédée par l'expression ectopique des chimiokines lymphoïdes CXCL13, CCL19, et de la LT α , et est associée au développement d'auto-Ac anti-nucléaires.

Plus particulièrement dans le lupus, la chimiokine CXCL13 induit également la prolifération *in vitro* des cellules rénales mésangiales humaines exprimant le récepteur CXCR5 **(Da et al., 2016)**. De plus, il a été montré que les taux sériques de CXCL13 sont augmentés et positivement corrélés à l'activité de la maladie et avec le degré d'infiltration des lymphocytes B dans le tissu rénal, mettant en évidence un lien entre la présence de cette chimiokine, la formation d'OLT et l'insuffisance rénale chez les patients lupiques **(He et al., 2016)**. Enfin, le blocage de CXCL13 avec un Ac neutralisant permet de diminuer la protéinurie, les dommages rénaux et le dépôt de complexes immuns chez la souris MRL lpr/lpr **(Wu et al., 2015)**.

Connaissant le rôle majeur du compartiment stromal pour les cellules immunitaires dans les OLS et l'hypothèse que les cellules stromales spécifiques aux tissus pourraient jouer le rôle de « Lymphoid tissue organizer » au cours de l'inflammation, l'étude de celles-ci dans les OLT est essentielle pour comprendre la formation et le maintien de ces structures et trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

Ainsi, afin de poursuivre la caractérisation du stroma au sein d'OLT lupiques, nous avons initié la mise en place du modèle murin de lupus induit au pristane au sein de notre animalerie. En effet, le modèle murin spontané NZB/W présente certaines limitations pour la poursuite de

l'étude du compartiment stromal dans ces structures ectopiques. D'une part, ce sont des souris F1 (issues de croisement de souris NZB et NZW) dont très peu de modèles génétiquement modifiés tels que « knock-out » sont disponibles (**Moser et al., 2012**) et d'autre part le faible nombre de cellules stromales dans les OLT rénaux est un point limitant à leur isolement en vue d'une analyse plus poussée. Le modèle murin de lupus induit au pristane présente certains avantages par rapport aux souris F1 NZB/W. En effet, ce modèle inductible offre la possibilité d'étudier le compartiment stromal des OLS et des OLT dans un contexte lupique grâce à des modèles transgéniques tels que CCL19-Cre x Rosa-26-diphtheria toxin receptor (DTR) ou les souris Dm2 dont DTR est sous le contrôle du promoteur FAP exprimé par les cellules de types fibroblastiques PDPN⁺ (**Kasinath et al., 2019; Nayar et al., 2019**). De plus, l'injection de pristane chez des souris BALB/c induit la formation de nombreux lipogranulomes dans la cavité péritonéale qui sont décrits comme des OLT fonctionnels. En effet, ils présentent des LT, des LB, organisés en zones distinctes, des centres germinatifs et des cellules sécrétrices d'Ac ainsi que des HEV. La présence des chimiokines lymphoïdes telles que CCL21, CCL19, CXCL13 et CXCL12 et l'expression des gènes associés aux IFN de type I ont aussi été observées (**Nacionales et al., 2006, 2009**). Toutefois, pour le moment, nos résultats préliminaires obtenus chez des souris BALB/c traitées au pristane n'ont pas permis de récapituler l'ensemble des critères décrits ci-dessus. En effet, plusieurs caractéristiques générales des OLT, tels que la composition et l'organisation cellulaire, n'ont pas été observées dans les lipogranulomes analysés. Nous avons émis l'hypothèse que l'environnement microbien dans lequel les souris sont hébergées pourrait influencer l'intensité de la réponse auto-immune, comme proposé par une étude sur ce modèle dans des animaleries de statuts sanitaires différents (**Hamilton et al., 1998**). Actuellement, une deuxième expérience est en cours sur des souris de souche BALB/c et C57BL/6 hébergées dans des conditions exemptes d'organismes pathogènes spécifiques. Cette expérience nous permettra de compléter nos données afin d'envisager ou non la poursuite de la caractérisation des mécanismes cellulaires et moléculaires intervenant dans la formation des OLT avec ce modèle de lupus induit au pristane. Si les lipogranulomes qui se forment en grande quantité dans la cavité péritonéale des souris traitées permettent de récapituler les principales caractéristiques des OLT et si nous arrivons à isoler suffisamment de cellules stromales (dont les trois sous-populations ont été identifiées dans ces structures lors de notre étude préliminaire), nous pourrions envisager de réaliser une analyse transcriptomique de ces dernières. En dépit du fait que ces cellules stromales des lipogranulomes ne soient probablement pas similaires à celles des OLS des souris lupiques NZB/W, cela pourrait nous permettre d'identifier des gènes différenciellement exprimés en commun dans ces deux situations et

potentiellement impliqués dans la pathologie lupique mais également des variations d'expression transcriptomiques qui pourraient être associées à la formation de structures ectopiques.

Enfin, il serait également très intéressant de comparer les profils transcriptomiques des cellules stromales de type FRC dans ces structures ectopiques avec ceux des fibroblastes associés au cancer (« Cancer-Associated Fibroblasts », CAF) présents dans les micro-environnements tumoraux. En effet, selon les différents types de tumeur, les CAF peuvent dériver de l'activation de fibroblastes résidents ou d'autres cellules précurseurs telles que les cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse, des cellules endothéliales, des péricytes, des cellules de muscles lisses ou des adipocytes. Les CAF sécrètent de nombreux facteurs pouvant promouvoir la croissance tumorale, c'est le cas par exemple avec la chimiokine CXCL12 dont la production favorise le recrutement de cellules endothéliales et le développement de la vascularisation dans les tumeurs solides (**Santi et al., 2018**). Dans les lymphomes folliculaires, une forte expression de CXCL12 par les CAF contribue à la migration, l'adhésion et l'activation des cellules B CXCR4⁺CXCR5⁺CCR7^{lo} (**Pandey et al., 2017**). Chez les souris NZB/W une forte expression de CXCL12 a été observée dans les glomérules rénaux et un anticorps bloquant de CXCL12 (**Balabanian et al., 2003**) ou un antagoniste de CXCR4 (**Cheng et al., 2018**) a permis de diminuer la production d'auto-Ac et de ralentir la néphrite lupique. Cette chimiokine a aussi été identifiée dans les lipogranulomes du modèle murin de lupus induit au pristane, cependant la nature des cellules sécrétrices n'a pas été mise en évidence (**Nacionales et al., 2006**). Il serait donc intéressant de poursuivre l'étude sur l'origine des cellules stromales dans ces structures ectopiques en élargissant nos recherches vers les ressources disponibles sur les CAF afin d'envisager de nouvelles pistes de reprogrammation du stroma des tissus en cellules stromales de type lymphoïde.

Même si le modèle de lupus induit au pristane présente certains avantages, il faut mentionner que d'autres alternatives peuvent aussi être envisagées pour étudier le rôle du compartiment stromal dans les organes lymphoïdes (secondaires et tertiaires) au cours du lupus chez les souris NZB/W. En effet, un traitement *in vivo* avec des Ac anti-PDPN qui ciblent les cellules exprimant cette molécule (dont les FRC et les LEC), a permis de mettre en évidence l'importance du compartiment stromal dans le cas d'une glomérulonéphrite à croissants chez la souris. Dans ce modèle murin (sans OLT), le traitement induit une désorganisation de la matrice extracellulaire, une réduction de l'expansion du système vasculaire lymphatique des ganglions drainant le rein et permet de protéger le rein des lésions induites par l'injection de sérum

néphrotoxique (**Kasinath et al., 2019**). Un autre composé qui pourrait être un bon candidat pour poursuivre l'étude du compartiment stromal des OLS et des OLT dans la pathologie lupique est un inhibiteur des tyrosines kinases (SU5416, Sigma) qui cible les récepteurs de VEGF tout en ayant une activité contre d'autres récepteurs tyrosines kinases tels que PDGFR (**Fong et al., 1999; Roskoski, 2007**). De façon intéressante, nous avons observé une augmentation de l'expression du gène codant pour PDGFR dans les LEC des souris malades par rapport aux souris pré-lupiques. De plus, il a été montré dans le modèle murin de lupus MRL lpr/lpr, que l'inhibition de ces récepteurs exprimés de façon constitutive par le compartiment vasculaire des ganglions lymphatiques, par le composé SU5416, permet de diminuer le taux d'auto-Ac anti-ADN et de rétablir une organisation normale du micro-environnement stromal dans les ganglions cutanés qui, lui-même, favorisait un regroupement de LT doubles négatifs intervenant dans la pathologie lupique dans ce modèle particulier (**Chyou et al., 2012**). Ces composés, testés *in vivo* chez la souris, permettraient d'envisager de nouvelles pistes thérapeutiques qui cibleraient également les OLT ayant un effet délétère dans les organes cibles de maladies auto-immunes chez l'Homme. En effet, si des preuves expérimentales indiquent que les processus d'angiogenèse dans les OLT peuvent être ciblés pour limiter les dommages tissulaires associés à leur formation, l'inhibiteur SU5416 étant le précurseur d'un médicament utilisé pour le traitement du cancer du rein (le Sunitinib), son utilisation pourrait donc être rapidement approuvée pour le traitement d'autres pathologies présentant des structures ectopiques telles que le LED.

La compréhension des mécanismes altérés dans les ganglions lymphatiques ainsi que ceux impliqués dans la formation des OLT rénaux au cours du lupus, permettrait d'ouvrir la voie vers le développement de nouvelles thérapies spécifiques du micro-environnement des cellules immunitaires. Dans ces mécanismes, la lymphotoxine représente une cible intéressante car elle est responsable de l'expression de diverses chimiokines stromales et elle interviendrait dans la mise en place des OLT. Dans le lupus, l'expression de la lymphotoxine ainsi que de son récepteur LT β R a été retrouvée dans les biopsies rénales des patients lupiques. De plus, le blocage de LT β R par une protéine de fusion (fusion du récepteur LT β R avec une immunoglobuline) permet de diminuer l'infiltration des LT et des macrophages ce qui améliore l'atteinte rénale chez les souris NZB/W dont la pathologie a été accélérée par l'injection d'un adénovirus codant pour l'IFN α (**Seleznik et al., 2016**). Il a également été montré que dans un modèle murin du syndrome de Sjögren (souris NOD), le traitement avec cette même protéine de fusion a permis de limiter la formation des OLT dans les glandes salivaires (**Gatumu et al.,**

2009). Toutefois, bien que les effets de ce traitement n'aient pas été reportés dans les ganglions lymphatiques dans l'étude de Seleznik *et al.*, Gatumu et collaborateurs ont, quant à eux, mis en évidence 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 traitement n'est donc pas sans impact sur le compartiment stromal des ganglions et par conséquent sur les réponses (auto-) immunitaires. Ainsi ces études nous amènent à nous questionner sur la spécificité que peut avoir un tel traitement sur les OLS et l'ensemble des réponses immunitaires. Cela révèle également l'importance d'étudier de façon conjointe les mécanismes impliqués dans la formation des OLT ainsi que ceux potentiellement dérégulés dans les OLS, afin d'identifier des molécules (communes ?) spécifiques et développer des biothérapies ciblées dans les maladies auto-immunes et les cancers.

Pour conclure, notre étude présente les cellules stromales des organes lymphoïdes secondaires et tertiaires comme des acteurs importants de la réponse auto-immune du lupus. La caractérisation de ce micro-environnement des cellules immunitaires apporte de nouvelles pistes d'études pour la compréhension de son rôle dans la pathologie lupique et ouvre par conséquent la voie vers de nouvelles cibles thérapeutiques.

Bibliographie

- Abe, J., Ueha, S., Suzuki, J., Tokano, Y., Matsushima, K., and Ishikawa, S. (2008). Increased Foxp3⁺ CD4⁺ Regulatory T Cells with Intact Suppressive Activity but Altered Cellular Localization in Murine Lupus. *Am. J. Pathol.* 173, 1682–1692.
- Abe, J., Shichino, S., Ueha, S., Hashimoto, S., Tomura, M., Inagaki, Y., Stein, J.V., and Matsushima, K. (2014). Lymph Node Stromal Cells Negatively Regulate Antigen-Specific CD4⁺ T Cell Responses. *J. Immunol.* 193, 1636–1644.
- 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.
- Allison, A.C. (2005). Mechanisms of action of mycophenolate mofetil. *Lupus* 14 Suppl 1, s2-8.
- An, J., Durcan, L., Karr, R.M., Briggs, T.A., Rice, G.I., Teal, T.H., Woodward, J.J., and Elkon, K.B. (2017). Expression of Cyclic GMP-AMP Synthase in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 69, 800–807.
- Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 11, R106.
- Andrews, B.S., Eisenberg, R.A., Theofilopoulos, A.N., Izui, S., Wilson, C.B., McConahey, P.J., Murphy, E.D., Roths, J.B., and Dixon, F.J. (1978). Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J. Exp. Med.* 148, 1198–1215.
- Aringer, M., Costenbader, K., Daikh, D., Brinks, R., Mosca, M., Ramsey-Goldman, R., Smolen, J.S., Wofsy, D., Boumpas, D.T., Kamen, D.L., et al. (2019). 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 71, 1400–1412.
- Armengol, M.P., Juan, M., Lucas-Martín, A., Fernández-Figueras, M.T., Jaraquemada, D., Gallart, T., and Pujol-Borrell, R. (2001). Thyroid Autoimmune Disease. *Am. J. Pathol.* 159, 861–873.
- Arnaud, L., Fagot, J.-P., Mathian, A., Paita, M., Fagot-Campagna, A., and Amoura, Z. (2014). Prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in France: a 2010 nation-wide population-based study. *Autoimmun. Rev.* 13, 1082–1089.
- Arnson, Y., Shoenfeld, Y., and Amital, H. (2010). Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *J. Autoimmun.* 34, J258-265.
- Arroyo-Ávila, M., Santiago-Casas, Y., McGwin, G., Jr, Cantor, R.S., Petri, M., Ramsey-Goldman, R., Reveille, J.D., Kimberly, R.P., Alarcón, G.S., et al. (2015). Clinical associations of anti-Smith antibodies in PROFILE: a multi-ethnic lupus cohort. *Clin. Rheumatol.* 34, 1217.
- Astarita, J.L., Cremasco, V., Fu, J., Darnell, M.C., Peck, J.R., Nieves-Bonilla, J.M., Song, K., Kondo, Y., Woodruff, M.C., Gogineni, A., et al. (2015). The CLEC-2-podoplanin axis controls the contractility of fibroblastic reticular cells and lymph node microarchitecture. *Nat. Immunol.* 16, 75–84.
- Atkinson, J.P., and Yu, C.Y. (2016). Chapter 12 - The Complement System in Systemic Lupus Erythematosus. In *Systemic Lupus Erythematosus*, G.C. Tsokos, ed. (Boston: Academic Press), pp. 81–112.
- Audiger, C., Rahman, M.J., Yun, T.J., Tarbell, K.V., and Lesage, S. (2017). The Importance of Dendritic Cells in Maintaining Immune Tolerance. *J. Immunol.* 198, 2223–2231.
- Baechler, E.C., Batliwalla, F.M., Karypis, G., Gaffney, P.M., Ortmann, W.A., Espe, K.J., Shark, K.B., Grande, W.J., Hughes, K.M., Kapur, V., et al. (2003). Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2610–2615.
- 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.
- Baker, K.P., Edwards, B.M., Main, S.H., Choi, G.H., Wager, R.E., Halpern, W.G., Lappin, P.B., Riccobene, T., Abramian, D., Sekut, L., et al. (2003). Generation and characterization of LymphoStat-B, a human monoclonal

antibody that antagonizes the bioactivities of B lymphocyte stimulator. *Arthritis Rheum.* 48, 3253–3265.

Balabanian, K., Couderc, J., Bouchet-Delbos, L., Amara, A., Berrebi, D., Foussat, A., Baleux, F., Portier, A., Durand-Gasselín, I., Coffman, R.L., et al. (2003). Role of the chemokine stromal cell-derived factor 1 in autoantibody production and nephritis in murine lupus. *J. Immunol.* 170, 3392–3400.

Balomenos, D., Rumold, R., and Theofilopoulos, A.N. (1997). The proliferative in vivo activities of lpr double-negative T cells and the primary role of p59fyn in their activation and expansion. *J. Immunol. Baltim. Md* 159, 2265–2273.

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

Barbhaiya, M., and Costenbader, K. (2014). Ultraviolet radiation and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 23, 588–595.

Barbhaiya, M., Tedeschi, S.K., Lu, B., Malspeis, S., Kreps, D., Sparks, J.A., Karlson, E.W., and Costenbader, K.H. (2018). Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus, overall and by anti-double stranded DNA antibody subtype, in the Nurses' Health Study cohorts. *Ann. Rheum. Dis.* 77, 196–202.

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 Rheum.* 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 11024–11029.

Barrat, F.J., Meeker, T., Gregorio, J., Chan, J.H., Uematsu, S., Akira, S., Chang, B., Duramad, O., and Coffman, R.L. (2005). Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* 202, 1131–1139.

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 Rheum.* 46, 191–201.

Benahmed, F., Chyou, S., Dasoveanu, D., Chen, J., Kumar, V., Iwakura, Y., and Lu, T.T. (2014). Multiple CD11c+ cells collaboratively express IL-1 β to modulate stromal vascular endothelial growth factor and lymph node vascular-stromal growth. *J. Immunol. Baltim. Md* 192, 4153–4163.

Bender, A.T., Wu, Y., Cao, Q., Ding, Y., Oestreicher, J., Genest, M., Akare, S., Ishizaka, S.T., and Mackey, M.F. (2014). Assessment of the translational value of mouse lupus models using clinically relevant biomarkers. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* 163, 515–532.

Bénézech, C., White, A., Mader, E., Serre, K., Parnell, S., Pfeffer, K., Ware, C.F., Anderson, G., and Caamaño, J.H. (2010). Ontogeny of stromal organizer cells during lymph node development. *J. Immunol. Baltim. Md* 184, 4521–4530.

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.

Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 57, 289–300.

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. *J. Exp. Med.* 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.

Berendam, S.J., Koepfel, A.F., Godfrey, N.R., Rouhani, S.J., Woods, A.N., Rodriguez, A.B., Peske, J.D., Cummings, K.L., Turner, S.D., and Engelhard, V.H. (2019). Comparative Transcriptomic Analysis Identifies a Range of Immunologically Related Functional Elaborations of Lymph Node Associated Lymphatic and Blood Endothelial Cells. *Front. Immunol.* 10.

Berrih-Aknin, S., Ruhlmann, N., Bismuth, J., Cizeron-Clairac, G., Zelman, E., Shachar, I., Darteville, P., de Rosbo, N.K., and Le Panse, R. (2009). CCL21 overexpressed on lymphatic vessels drives thymic hyperplasia in myasthenia. *Ann. Neurol.* 66, 521–531.

Birmingham, D., Irshaid, F., Nagaraja, H., Zou, X., Tsao, B., Wu, H., Yu, C., Hebert, L., and Rovin, B. (2010). The complex nature of serum C3 and C4 as biomarkers of lupus renal flare. *Lupus* 19, 1272–1280.

Blair, P.A., Noreña, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2010). CD19+CD24hiCD38hi 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 Sjögren's syndrome. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 4929–4938.

Bombardieri, M., Kam, N.-W., Brentano, F., Choi, K., Filer, A., Kyburz, D., McInnes, I.B., Gay, S., Buckley, C., and Pitzalis, C. (2011). A BAFF/APRIL-dependent TLR3-stimulated pathway enhances the capacity of rheumatoid synovial fibroblasts to induce AID expression and Ig class-switching in B cells. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 1857–1865.

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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 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). *Int. Immunol.* 20, 861–868.

Bouis, D., Kirstetter, P., Arbogast, F., Lamon, D., Delgado, V., Jung, S., Ebel, C., Jacobs, H., Knapp, A.-M., Jeremiah, N., et al. (2019). Severe combined immunodeficiency in stimulator of interferon genes (STING) V154M/wild-type mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 143, 712-725.e5.

Brandt, D., and Hedrich, C.M. (2018). TCR $\alpha\beta$ +CD3+CD4–CD8– (double negative) T cells in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 17, 422–430.

Brundula, V., Rivas, L.J., Blasini, A.M., Salazar, S., Stekman, I.L., and Rodríguez, M.A. (1999). Diminished levels of T cell receptor ζ chains in peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 42, 1908–1916.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 1518–1523.

Buch, T., Polic, B., Clausen, B.E., Weiss, S., Akilli-Ozturk, Ö., Chang, C.-H., Flavell, R., Schulz, A., Jonjic, S., Waisman, A., et al. (2006). MHC class II expression through a hitherto unknown pathway supports T helper cell-dependent immune responses: implications for MHC class II deficiency. *Blood* *107*, 1434–1444.

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.

Bugatti, S., Manzo, A., Vitolo, B., Benaglio, F., Binda, E., Scarabelli, M., Humby, F., Caporali, R., Pitzalis, C., and Montecucco, C. (2014). High expression levels of the B cell chemoattractant CXCL13 in rheumatoid synovium are a marker of severe disease. *Rheumatology* *53*, 1886–1895.

Burman, A., Haworth, O., Hardie, D.L., Amft, E.N., Siewert, C., Jackson, D.G., Salmon, M., and Buckley, C.D. (2005). A Chemokine-Dependent Stromal Induction Mechanism for Aberrant Lymphocyte Accumulation and Compromised Lymphatic Return in Rheumatoid Arthritis. *J. Immunol.* *174*, 1693–1700.

Buzas, E.I., György, B., Nagy, G., Falus, A., and Gay, S. (2014). Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* *10*, 356–364.

Calvani, N., Satoh, M., Croker, B.P., Reeves, W.H., and Richards, H.B. (2003). Nephritogenic autoantibodies but absence of nephritis in Il-12p35-deficient mice with pristane-induced lupus. *Kidney Int.* *64*, 897–905.

Calvani, N., Caricchio, R., Tucci, M., Sobel, E.S., Silvestris, F., Tartaglia, P., and Richards, H.B. (2005). Induction of Apoptosis by the Hydrocarbon Oil Pristane: Implications for Pristane-Induced Lupus. *J. Immunol.* *175*, 4777–4782.

Camara, A., Cordeiro, O.G., Alloush, F., Sponsel, J., Chypre, M., Onder, L., Asano, K., Tanaka, M., Yagita, H., Ludewig, B., et al. (2019). Lymph Node Mesenchymal and Endothelial Stromal Cells Cooperate via the RANK-RANKL Cytokine Axis to Shape the Sinusoidal Macrophage Niche. *Immunity* *50*, 1467-1481.e6.

Cappione, A., Anolik, J.H., Pugh-Bernard, A., Barnard, J., Dutcher, P., Silverman, G., and Sanz, I. (2005). Germinal center exclusion of autoreactive B cells is defective in human systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* *115*, 3205–3216.

Carrasco, Y.R., and Batista, F.D. (2007). B Cells Acquire Particulate Antigen in a Macrophage-Rich Area at the Boundary between the Follicle and the Subcapsular Sinus of the Lymph Node. *Immunity* *27*, 160–171.

Carter, E.E., Barr, S.G., and Clarke, A.E. (2016). The global burden of SLE: prevalence, health disparities and socioeconomic impact. *Nat. Rev. Rheumatol.* *12*, 605–620.

Carvalho-Pinto, C.E., García, M.I., Mellado, M., Rodríguez-Frade, J.M., Martín-Caballero, J., Flores, J., Martínez-A, C., and Balomenos, D. (2002). Autocrine Production of IFN- γ by Macrophages Controls Their Recruitment to Kidney and the Development of Glomerulonephritis in MRL/lpr Mice. *J. Immunol.* *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 Res. Ther.* *17*.

Cepellini, R., Polli, E., and Celada, F. (1957). A DNA-Reacting Factor in Serum of a Patient with Lupus Erythematosus Diffusus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* *96*, 572–574.

Cerny, A., Starobinski, M., Hügin, A.W., Sutter, S., Zinkernagel, R.M., and Izui, S. (1987). Treatment with high doses of anti-IgM prevents, but with lower doses accelerates autoimmune disease in (NZW x BXSB)F1 hybrid mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *138*, 4222–4228.

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.

- 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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 1849–1860.
- Chang, C.-H., Guerder, S., Hong, S.-C., Ewijk, W. van, and Flavell, R.A. (1996). Mice Lacking the MHC Class II Transactivator (CIITA) Show Tissue-Specific Impairment of MHC Class II Expression. *Immunity* *4*, 167–178.
- Chen, Q., Fisher, D.T., Clancy, K.A., Gauguier, J.-M.M., Wang, W.-C., Unger, E., Rose-John, S., von Andrian, U.H., Baumann, H., and Evans, S.S. (2006). Fever-range thermal stress promotes lymphocyte trafficking across high endothelial venules via an interleukin 6 trans -signaling mechanism. *Nat. Immunol.* *7*, 1299–1308.
- Chen, S., Pu, W., Guo, S., Jin, L., He, D., and Wang, J. (2019). Genome-Wide DNA Methylation Profiles Reveal Common Epigenetic Patterns of Interferon-Related Genes in Multiple Autoimmune Diseases. *Front. Genet.* *10*.
- 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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 1001–1008.
- Chen, X., Shen, Y., Sun, C., Wu, F., Chen, Y., and Yang, C. (2011). Anti-class a scavenger receptor autoantibodies from systemic lupus erythematosus patients impair phagocytic clearance of apoptotic cells by macrophages in vitro. *Arthritis Res. Ther.* *13*, R9.
- 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. *J. Clin. Immunol.* *30*, 221–225.
- Chen, Z., Qiu, X., and Gu, J. (2009). Immunoglobulin Expression in Non-Lymphoid Lineage and Neoplastic Cells. *Am. J. Pathol.* *174*, 1139–1148.
- Cheng, Q., Khodadadi, L., Taddeo, A., Klotsche, J., F Hoyer, B., Radbruch, A., and Hiepe, F. (2018). CXCR4-CXCL12 interaction is important for plasma cell homing and survival in NZB/W mice. *Eur. J. Immunol.* *48*, 1020–1029.
- 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. *Nat. Commun.* *9*, 1–13.
- Christou, E. a. A., Banos, A., Kosmara, D., Bertias, G.K., and Boumpas, D.T. (2019). Sexual dimorphism in SLE: above and beyond sex hormones. *Lupus* *28*, 3–10.
- Chyou, S., Ekland, E.H., Carpenter, A.C., Tzeng, T.-C., Tian, S., Michaud, M., Madri, J.A., and Lu, T.T. (2008). Fibroblast-type reticular stromal cells regulate the lymph node vasculature. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 3887–3896.
- Chyou, S., Tian, S., Ekland, E.H., and Lu, T.T. (2012). Normalization of the lymph node T cell stromal microenvironment in *lpr/lpr* mice is associated with SU5416-induced reduction in autoantibodies. *PloS One* *7*, e32828.
- 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, J.N., Tewalt, E.F., Rouhani, S.J., Buonomo, E.L., Bruce, A.N., Xu, X., Bekiranov, S., Fu, Y.-X., and Engelhard, V.H. (2014). Tolerogenic Properties of Lymphatic Endothelial Cells Are Controlled by the Lymph Node Microenvironment. *PLOS ONE* *9*, e87740.
- Colladel, R., Pellicani, R., Andreuzzi, E., Paulitti, A., Tarticchio, G., Todaro, F., Colombatti, A., and Mongiat, M. (2016). MULTIMERIN2 binds VEGF-A primarily via the carbohydrate chains exerting an angiostatic function and impairing tumor growth. *Oncotarget* *7*, 2022–2037.
- Conrad, K., Roggenbuck, D., Reinhold, D., and Sack, U. (2012). Autoantibody diagnostics in clinical practice. *Autoimmun. Rev.* *11*, 207–211.

- Cornacchia, E., Golbus, J., Maybaum, J., Strahler, J., Hanash, S., and Richardson, B. (1988). Hydralazine and procainamide inhibit T cell DNA methylation and induce autoreactivity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *140*, 2197–2200.
- Corsiero, E., Bombardieri, M., Carlotti, E., Pratesi, F., Robinson, W., Migliorini, P., and Pitzalis, C. (2016). Single cell cloning and recombinant monoclonal antibodies generation from RA synovial B cells reveal frequent targeting of citrullinated histones of NETs. *Ann. Rheum. Dis.* *75*, 1866–1875.
- Costenbader, K.H., Kim, D.J., Peerzada, J., Lockman, S., Nobles-Knight, D., Petri, M., and Karlson, E.W. (2004). Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Arthritis Rheum.* *50*, 849–857.
- Costenbader, K.H., Feskanich, D., Stampfer, M.J., and Karlson, E.W. (2007). Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. *Arthritis Rheum.* *56*, 1251–1262.
- Courtney, P.A., Crockard, A.D., Williamson, K., Irvine, A.E., Kennedy, R.J., and Bell, A.L. (1999). Increased apoptotic peripheral blood neutrophils in systemic lupus erythematosus: relations with disease activity, antibodies to double stranded DNA, and neutropenia. *Ann. Rheum. Dis.* *58*, 309–314.
- Crampton, S.P., Morawski, P.A., and Bolland, S. (2014). Linking susceptibility genes and pathogenesis mechanisms using mouse models of systemic lupus erythematosus. *Dis. Model. Mech.* *7*, 1033–1046.
- Cremasco, V., Woodruff, M.C., Onder, L., Cupovic, J., Nieves-Bonilla, J.M., Schildberg, F.A., Chang, J., Cremasco, F., Harvey, C.J., Wucherpfennig, K., et al. (2014). B cell homeostasis and follicle confines are governed by fibroblastic reticular cells. *Nat. Immunol.* *15*, 973–981.
- Crispín, J.C., Oukka, M., Bayliss, G., Cohen, R.A., Van Beek, C.A., Stillman, I.E., Kyttaris, V.C., Juang, Y.-T., and Tsokos, G.C. (2008). Expanded Double Negative T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus Produce IL-17 and Infiltrate the Kidneys. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 8761–8766.
- Crow, M.K. (2014). Type I Interferon in the Pathogenesis of Lupus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *192*, 5459–5468.
- Crow, M.K., Kirou, K.A., and Wohlgemuth, J. (2003). Microarray analysis of interferon-regulated genes in SLE. *Autoimmunity* *36*, 481–490.
- 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. *J. Immunol. Res.* *2016*.
- Das, A., Heesters, B.A., Bialas, A., O’Flynn, J., Rifkin, I.R., Ochando, J., Mittereder, N., Carlesso, G., Herbst, R., and Carroll, M.C. (2017). Follicular Dendritic Cell Activation by TLR Ligands Promotes Autoreactive B Cell Responses. *Immunity* *46*, 106–119.
- Das, S., Sarrou, E., Podgrabinska, S., Cassella, M., Mungamuri, S.K., Feirt, N., Gordon, R., Nagi, C.S., Wang, Y., Entenberg, D., et al. (2013). Tumor cell entry into the lymph node is controlled by CCL1 chemokine expressed by lymph node lymphatic sinuses. *J. Exp. Med.* *210*, 1509–1528.
- Dasoveanu, D.C., Shipman, W.D., Chia, J.J., Chyou, S., and Lu, T.T. (2016). Regulation of Lymph Node Vascular-Stromal Compartment by Dendritic Cells. *Trends Immunol.* *37*, 764–777.
- Debes, G.F., Arnold, C.N., Young, A.J., Krautwald, S., Lipp, M., Hay, J.B., and Butcher, E.C. (2005). Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues. *Nat. Immunol.* *6*, 889–894.
- Dema, B., and Charles, N. (2016). Autoantibodies in SLE: Specificities, Isotypes and Receptors. *Antibodies* *5*, 2.
- Deng, G.-M., and Tsokos, G.C. (2008). Cholera Toxin B Accelerates Disease Progression in Lupus-Prone Mice by Promoting Lipid Raft Aggregation. *J. Immunol.* *181*, 4019–4026.
- 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.

- Denton, A.E., Carr, E.J., Magiera, L.P., Watts, A.J.B., and Fearon, D.T. (2019a). Embryonic FAP⁺ lymphoid tissue organizer cells generate the reticular network of adult lymph nodes. *J. Exp. Med.* *216*, 2242–2252.
- Denton, A.E., Innocentin, S., Carr, E.J., Bradford, B.M., Lafouresse, F., Mabbott, N.A., Mörbe, U., Ludewig, B., Groom, J.R., Good-Jacobson, K.L., et al. (2019b). Type I interferon induces CXCL13 to support ectopic germinal center formation. *J. Exp. Med.* *216*, 621–637.
- Deocharan, B., Qing, X., Lichauco, J., and Putterman, C. (2002). Alpha-actinin is a cross-reactive renal target for pathogenic anti-DNA antibodies. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 3072–3078.
- 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*.
- Dieterich, L.C., Ikenberg, K., Cetintas, T., Kapaklikaya, K., Hutmacher, C., and Detmar, M. (2017). Tumor-Associated Lymphatic Vessels Upregulate PDL1 to Inhibit T-Cell Activation. *Front. Immunol.* *8*, 66.
- 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. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *26*, 4410–4417.
- Dixon, F.J., Andrews, B.S., Eisenberg, R.A., McConahey, P.J., Theofilopoulos, A.N., and Wilson, C.B. (1978). Etiology and pathogenesis of a spontaneous lupus-like syndrome in mice. *Arthritis Rheum.* *21*, S64–S67.
- Dorraj, S.E., Hovd, A.-M.K., Kanapathippillai, 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. *Sci. Rep.* *8*, 7861.
- Dubey, L.K., Karempudi, P., Luther, S.A., Ludewig, B., and Harris, N.L. (2017). Interactions between fibroblastic reticular cells and B cells promote mesenteric lymph node lymphangiogenesis. *Nat. Commun.* *8*, 1–13.
- 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.
- Dubrot, J., Duraes, F.V., Harlé, G., Schlaeppli, A., Brighthouse, D., Madelon, N., Göpfert, C., Stokar-Regenscheit, N., Acha-Orbea, H., Reith, W., et al. (2018). Absence of MHC-II expression by lymph node stromal cells results in autoimmunity. *Life Sci. Alliance* *1*.
- Durcan, L., O'Dwyer, T., and Petri, M. (2019). Management strategies and future directions for systemic lupus erythematosus in adults. *The Lancet* *393*, 2332–2343.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* *35*, 495–516.
- Elsner, R.A., Ernst, D.N., and Baumgarth, N. (2012). Single and Coexpression of CXCR4 and CXCR5 Identifies CD4 T Helper Cells in Distinct Lymph Node Niches during Influenza Virus Infection. *J. Virol.* *86*, 7146–7157.
- Enghard, P., Langnickel, D., and Riemekasten, G. (2006). T cell cytokine imbalance towards production of IFN-gamma and IL-10 in NZB/W F1 lupus-prone mice is associated with autoantibody levels and nephritis. *Scand. J. Rheumatol.* *35*, 209–216.
- Enyedy, E.J., Nambiar, M.P., Liou, S.-N.C., Dennis, G., Kammer, G.M., and Tsokos, G.C. (2001). Fcγ receptor type Iγ chain replaces the deficient T cell receptor ζ chain in T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *44*, 1114–1121.
- Espeli, M., Bökers, S., Giannico, G., Dickinson, H.A., Bardsley, V., Fogo, A.B., and Smith, K.G.C. (2011). Local Renal Autoantibody Production in Lupus Nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *22*, 296–305.
- Farrera, C., and Fadeel, B. (2013). Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J.*

Immunol. Baltim. Md 1950 *191*, 2647–2656.

Fayyaz, A., Igoe, A., Kurien, B.T., Danda, D., James, J.A., Stafford, H.A., and Scofield, R.H. (2015). Haematological manifestations of lupus. *Lupus Sci. Med.* *2*.

Felten, R., Scher, F., Sibilia, J., Chasset, F., and Arnaud, L. (2019). Advances in the treatment of systemic lupus erythematosus: From back to the future, to the future and beyond. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* *86*, 429–436.

Figenschau, S.L., Fismen, S., Fenton, K.A., Fenton, C., and Mortensen, E.S. (2015). Tertiary lymphoid structures are associated with higher tumor grade in primary operable breast cancer patients. *BMC Cancer* *15*, 101.

Finkin, S., Yuan, D., Stein, I., Taniguchi, K., Weber, A., Unger, K., Browning, J.L., Goossens, N., Nakagawa, S., Gunasekaran, G., et al. (2015). Ectopic lymphoid structures function as microniches for tumor progenitor cells in hepatocellular carcinoma. *Nat. Immunol.* *16*, 1235–1244.

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.

Fletcher, A.L., Malhotra, D., Acton, S.E., Lukacs-Kornek, V., Bellemare-Pelletier, A., Curry, M., Armant, M., and Turley, S.J. (2011). Reproducible isolation of lymph node stromal cells reveals site-dependent differences in fibroblastic reticular cells. *Front. Immunol.* *2*, 35.

Fong, T.A., Shawver, L.K., Sun, L., Tang, C., App, H., Powell, T.J., Kim, Y.H., Schreck, R., Wang, X., Risau, W., et al. (1999). SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res.* *59*, 99–106.

Frangou, E., Vassilopoulos, D., Boletis, J., and Boumpas, D.T. (2019). An emerging role of neutrophils and NETosis in chronic inflammation and fibrosis in systemic lupus erythematosus (SLE) and ANCA-associated vasculitides (AAV): Implications for the pathogenesis and treatment. *Autoimmun. Rev.* *18*, 751–760.

Garcia, B.A., Busby, S.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Mishra, N. (2005). Resetting the epigenetic histone code in the MRL-lpr/lpr mouse model of lupus by histone deacetylase inhibition. *J. Proteome Res.* *4*, 2032–2042.

Garin, A., Meyer-Hermann, M., Contie, M., Figge, M.T., Buatois, V., Gunzer, M., Toellner, K.-M., Elson, G., and Kosco-Vilbois, M.H. (2010). Toll-like Receptor 4 Signaling by Follicular Dendritic Cells Is Pivotal for Germinal Center Onset and Affinity Maturation. *Immunity* *33*, 84–95.

Garnier, L., Gkoutidi, A.-O., and Hugues, S. (2019). Tumor-Associated Lymphatic Vessel Features and Immunomodulatory Functions. *Front. Immunol.* *10*.

Gaspal, F.M.C., McConnell, F.M., Kim, M.-Y., Gray, D., Kosco-Vilbois, M.H., Raykundalia, C.R., Botto, M., and Lane, P.J.L. (2006). The generation of thymus-independent germinal centers depends on CD40 but not on CD154, the T cell-derived CD40-ligand. *Eur. J. Immunol.* *36*, 1665–1673.

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.

Gentek, R., and Bajénoff, M. (2017). Lymph Node Stroma Dynamics and Approaches for Their Visualization. *Trends Immunol.* *38*, 236–247.

Germain, C., Gnjjatic, 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.

GeurtsvanKessel, C.H., Willart, M.A.M., Bergen, I.M., van Rijt, L.S., 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–

- Ghodke-Puranik, Y., and Niewold, T.B. (2015). Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *J. Autoimmun.* *64*, 125–136.
- Gies, V., Bouis, D., Martin, M., Pasquali, J.-L., Martin, T., Korganow, A.-S., and Soulas-Sprauel, P. (2017). Phenotyping of autoreactive B cells with labeled nucleosomes in 56R transgenic mice. *Sci. Rep.* *7*.
- Gil-Cruz, C., Perez-Shibayama, C., Onder, L., Chai, Q., Cupovic, J., Cheng, H.-W., Novkovic, M., Lang, P.A., Geuking, M.B., McCoy, K.D., et al. (2016). Fibroblastic reticular cells regulate intestinal inflammation via IL-15-mediated control of group 1 ILCs. *Nat. Immunol.* *17*, 1388–1396.
- Girard, J.-P., Mousson, C., and Förster, R. (2012). HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 762–773.
- Glezer, I., Rivest, S., and Xavier, A.M. (2015). Chapter 3 - CD36, CD44, and CD83 Expression and Putative Functions in Neural Tissues. In *Neural Surface Antigens*, J. Pruszk, ed. (Boston: Academic Press), pp. 27–40.
- 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.
- Gonzalez-Quintal, R., Lawson, B.R., Scatizzi, J.C., Craft, J., Kono, D.H., Baccala, R., and Theofilopoulos, A.N. (2011). Systemic autoimmunity and lymphoproliferation are associated with excess IL-7 and inhibited by IL-7R α blockade. *PLoS One* *6*, e27528.
- 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. *J. Clin. Invest.* *112*, 1506–1520.
- Gregory, J.L., Walter, A., Alexandre, Y.O., Hor, J.L., Liu, R., Ma, J.Z., Devi, S., Tokuda, N., Owada, Y., Mackay, L.K., et al. (2017). Infection Programs Sustained Lymphoid Stromal Cell Responses and Shapes Lymph Node Remodeling upon Secondary Challenge. *Cell Rep.* *18*, 406–418.
- Groom, J.R., Richmond, J., Murooka, T.T., Sorensen, E.W., Sung, J.H., Bankert, K., von Andrian, U.H., Moon, J.J., Mempel, T.R., and Luster, A.D. (2012). CXCR3 chemokine receptor-ligand interactions in the lymph node optimize CD4⁺ T helper 1 cell differentiation. *Immunity* *37*, 1091–1103.
- Grossman, J.M. (2009). Lupus arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* *23*, 495–506.
- Gunn, M.D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L.T., and Nakano, H. (1999). Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J. Exp. Med.* *189*, 451–460.
- Hakim, A., Fürnrohr, B.G., Amann, K., Laube, B., Abed, U.A., Brinkmann, V., Herrmann, M., Voll, R.E., and Zychlinsky, A. (2010). Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 9813–9818.
- Hamilton, K.J., Satoh, M., Swartz, J., Richards, H.B., and Reeves, W.H. (1998). Influence of Microbial Stimulation on Hypergammaglobulinemia and Autoantibody Production in Pristane-Induced Lupus. *Clin. Immunol. Immunopathol.* *86*, 271–279.
- Hanly, J.G., O’Keeffe, A.G., Su, L., Urowitz, M.B., Romero-Diaz, J., Gordon, C., Bae, S.-C., Bernatsky, S., Clarke, A.E., Wallace, D.J., et al. (2016). The frequency and outcome of lupus nephritis: results from an

international inception cohort study. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *55*, 252–262.

Hassanalilou, T., Khalili, L., Ghavamzadeh, S., Shokri, A., Payahoo, L., and Bishak, Y.K. (2017). Role of vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus incidence and aggravation. *Auto-Immun. Highlights* *9*.

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

He, D.N., Chen, W.L., Long, K.X., Zhang, X., and Dong, G.F. (2016). Association of Serum CXCL13 with Intrarenal Ectopic Lymphoid Tissue Formation in Lupus Nephritis. *J. Immunol. Res.* *2016*.

Hedrich, C.M., Crispin, J.C., Rauen, T., Ioannidis, C., Apostolidis, S.A., Lo, M.S., Kyttaris, V.C., and Tsokos, G.C. (2012). cAMP response element modulator α controls IL2 and IL17A expression during CD4 lineage commitment and subset distribution in lupus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 16606–16611.

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 Dölff, S. (2016). Decreased IL-10(+) regulatory B cells (Bregs) in lupus nephritis patients. *Scand. J. Rheumatol.* *45*, 312–316.

Helyer, B.J., and Howie, J.B. (1963). Renal disease associated with positive lupus erythematosus tests in a cross-bred strain of mice. *Nature* *197*, 197.

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.

Hevia, A., Milani, C., López, P., Cuervo, A., Arboleya, S., Duranti, S., Turrioni, F., González, S., Suárez, A., Gueimonde, M., et al. (2014). Intestinal dysbiosis associated with systemic lupus erythematosus. *MBio* *5*, e01548-01514.

Hewagama, A., Gorelik, G., Patel, D., Liyanarachchi, P., McCune, W.J., Somers, E., Gonzalez-Rivera, T., Michigan Lupus Cohort, Strickland, F., and Richardson, B. (2013). Overexpression of X-linked genes in T cells from women with lupus. *J. Autoimmun.* *41*, 60–71.

Hirose, S., Ueda, G., Noguchi, K., Okada, T., Sekigawa, I., Sato, H., and Shirai, T. (1986). Requirement of H-2 heterozygosity for autoimmunity in (NZB X NZW)F1 hybrid mice. *Eur. J. Immunol.* *16*, 1631–1633.

Hirosue, S., and Dubrot, J. (2015). Modes of Antigen Presentation by Lymph Node Stromal Cells and Their Immunological Implications. *Front. Immunol.* *6*.

Hirosue, S., Vokali, E., Raghavan, V.R., Rincon-Restrepo, M., Lund, A.W., Corthésy-Henrioud, P., Capotosti, F., Halin Winter, C., Hugues, S., and Swartz, M.A. (2014). Steady-state antigen scavenging, cross-presentation, and CD8⁺ T cell priming: a new role for lymphatic endothelial cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *192*, 5002–5011.

Hochberg, M.C. (1997). Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *40*, 1725.

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. *Nat. Immunol.* *9*, 166–175.

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.

Huang, H.-Y., Rivas-Caicedo, A., Renevey, F., Cannelle, H., Peranzoni, E., Scarpellino, L., Hardie, D.L., Pommier, A., Schaeuble, K., Favre, S., et al. (2018). Identification of a new subset of lymph node stromal cells involved in regulating plasma cell homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *115*, E6826–E6835.

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 Med.* *6*, e1.

Hung, W.T., Chen, Y.M., Lan, J.L., Chen, H.H., Chen, Y.H., Chen, D.Y., Hsieh, C.W., and Wen, M.C. (2011). Antinucleosome antibodies as a potential biomarker for the evaluation of renal pathological activity in patients with proliferative lupus nephritis. *Lupus* *20*, 1404–1410.

Issa, A., Le, T.X., Shoushtari, A.N., Shields, J.D., and Swartz, M.A. (2009). Vascular endothelial growth factor-C and C-C chemokine receptor 7 in tumor cell-lymphatic cross-talk promote invasive phenotype. *Cancer Res.* *69*, 349–357.

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

Izui, S., Higaki, M., Morrow, D., and Merino, R. (1988). The Y chromosome from autoimmune BXSB/MpJ mice induces a lupus-like syndrome in (NZW x C57BL/6)F1 male mice, but not in C57BL/6 male mice. *Eur. J. Immunol.* *18*, 911–915.

Jackson, S.W., Scharping, N.E., Kolhatkar, N.S., Khim, S., Schwartz, M.A., Li, Q.-Z., Hudkins, K.L., Alpers, C.E., Liggitt, D., and Rawlings, D.J. (2014). Opposing impact of B cell-intrinsic TLR7 and TLR9 signals on autoantibody repertoire and systemic inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *192*, 4525–4532.

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. *J. Clin. Invest.* *100*, 3019–3026.

Janciauskiene, S.M., Bals, R., Koczulla, R., Vogelmeier, C., Köhnlein, T., and Welte, T. (2011). The discovery of α 1-antitrypsin and its role in health and disease. *Respir. Med.* *105*, 1129–1139.

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

Javierre, B.M., Fernandez, A.F., Richter, J., Al-Shahrour, F., Martin-Subero, J.I., Rodriguez-Ubreva, J., Berdasco, M., Fraga, M.F., O'Hanlon, T.P., Rider, L.G., et al. (2010). Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. *Genome Res.* *20*, 170–179.

Jenks, S.A., Cashman, K.S., Zumaquero, E., Marigorta, U.M., Patel, A.V., Wang, X., Tomar, D., Woodruff, M.C., Simon, Z., Bugrovsky, R., et al. (2018). Distinct Effector B Cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity* *49*, 725–739.e6.

Jeremiah, N., Neven, B., Gentili, M., Callebaut, I., Maschalidi, S., Stolzenberg, M.-C., Goudin, N., Frémond, M.-L., Nitschke, P., Molina, T.J., et al. (2014). Inherited STING-activating mutation underlies a familial inflammatory syndrome with lupus-like manifestations. *J. Clin. Invest.* *124*, 5516–5520.

Jitariu, A.A., Cimpean, A.M., Kundnani, N.R., and Raica, M. (2015). Platelet-derived growth factors induced lymphangiogenesis: evidence, unanswered questions and upcoming challenges. *Arch. Med. Sci. AMS* *11*, 57–66.

Jones, G.W., Bombardieri, M., Greenhill, C.J., McLeod, L., Nerviani, A., Rocher-Ros, V., Cardus, A., Williams, A.S., Pitzalis, C., Jenkins, B.J., et al. (2015). Interleukin-27 inhibits ectopic lymphoid-like structure development in early inflammatory arthritis. *J. Exp. Med.* *212*, 1793–1802.

Jones, G.W., Hill, D.G., and Jones, S.A. (2016). Understanding Immune Cells in Tertiary Lymphoid Organ Development: It Is All Starting to Come Together. *Front. Immunol.* *7*, 401.

Junt, T., Moseman, E.A., Iannaccone, M., Massberg, S., Lang, P.A., Boes, M., Fink, K., Henrickson, S.E.,

- Shayakhmetov, D.M., Di Paolo, N.C., et al. (2007). Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* 450, 110–114.
- Jury, E.C., Kabouridis, P.S., Flores-Borja, F., Mageed, R.A., and Isenberg, D.A. (2004). Altered lipid raft-associated signaling and ganglioside expression in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 113, 1176.
- 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. *Eur. J. Immunol.* 40, 569–578.
- Kabashima, K., Shiraishi, N., Sugita, K., Mori, T., Onoue, A., Kobayashi, M., Sakabe, J., Yoshiki, R., Tamamura, H., Fujii, N., et al. (2007). CXCL12-CXCR4 Engagement Is Required for Migration of Cutaneous Dendritic Cells. *Am. J. Pathol.* 171, 1249–1257.
- Kabouridis, P.S., and Jury, E.C. (2008). Lipid rafts and T-lymphocyte function: Implications for autoimmunity. *Febs Lett.* 582, 3711–3718.
- Kaisho, T., Ishikawa, J., Oritani, K., Inazawa, J., Tomizawa, H., Muraoka, O., Ochi, T., and Hirano, T. (1994). BST-1, a surface molecule of bone marrow stromal cell lines that facilitates pre-B-cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 5325–5329.
- 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 (rhuMAb interferon- α) in patients with systemic lupus erythematosus (ROSE). *Ann. Rheum. Dis.* 75, 196–202.
- Kang, I., Quan, T., Nolasco, H., Park, S.-H., Hong, M.S., Crouch, J., Pamer, E.G., Howe, J.G., and Craft, J. (2004). Defective control of latent Epstein-Barr virus infection in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 1287–1294.
- 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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 198, 2602–2611.
- Kapsogeorgou, E.K., Abu-Helu, R.F., Moutsopoulos, H.M., and Manoussakis, M.N. (2005). Salivary gland epithelial cell exosomes: A source of autoantigenic ribonucleoproteins. *Arthritis Rheum.* 52, 1517–1521.
- Karouzakis, E., Hähnlein, J., Grasso, C., Semmelink, J.F., Tak, P.P., Gerlag, D.M., Gay, S., Ospelt, C., and van Baarsen, L.G.M. (2019). Molecular Characterization of Human Lymph Node Stromal Cells During the Earliest Phases of Rheumatoid Arthritis. *Front. Immunol.* 10.
- Kasinath, V., Yilmam, O.A., Uehara, M., Jiang, L., Ordikhani, F., Li, X., Salant, D.J., and Abdi, R. (2019). Activation of fibroblastic reticular cells in kidney lymph node during crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 95, 310–320.
- Kasturi, S., and Sammaritano, L.R. (2016). Corticosteroids in Lupus. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 42, 47–62, viii.
- Katakai, T., Hara, T., Lee, J.-H., Gonda, H., Sugai, M., and Shimizu, A. (2004). A novel reticular stromal structure in lymph node cortex: an immuno-platform for interactions among dendritic cells, T cells and B cells. *Int. Immunol.* 16, 1133–1142.
- 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. Baltim. Md 1950* 181, 6189–6200.
- Kawasaki, T., and Kawai, T. (2014). Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front. Immunol.* 5.
- Kedl, R.M., Lindsay, R.S., Finlon, J.M., Lucas, E.D., Friedman, R.S., and Tamburini, B.A.J. (2017). Migratory dendritic cells acquire and present lymphatic endothelial cell-archived antigens during lymph node contraction.

Nat. Commun. 8, 1–15.

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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 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.

Khan, O., Headley, M., Gerard, A., Wei, W., Liu, L., and Krummel, M.F. (2011). Regulation of T cell priming by lymphoid stroma. *PloS One* 6, e26138.

Kim, H.-A., Sung, J.-M., Jeon, J.-Y., Yoon, J.-M., and Suh, C.-H. (2011). Vitamin D may not be a good marker of disease activity in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol. Int.* 31, 1189–1194.

Kim, S.J., Lee, K., and Diamond, B. (2018). Follicular Helper T Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Front. Immunol.* 9.

Komatsuda, A., Wakui, H., Iwamoto, K., Ozawa, M., Togashi, M., Masai, R., Maki, N., Hatakeyama, T., and Sawada, K. (2008). Up-regulated expression of Toll-like receptors mRNAs in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 152, 482–487.

Kono, D.H., Haraldsson, M.K., Lawson, B.R., Pollard, K.M., Koh, Y.T., Du, X., Arnold, C.N., Bacala, R., Silverman, G.J., Beutler, B.A., et al. (2009). Endosomal TLR signaling is required for anti-nucleic acid and rheumatoid factor autoantibodies in lupus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 12061–12066.

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.

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.

Kroeger, D.R., Milne, K., and Nelson, B.H. (2016). Tumor-Infiltrating Plasma Cells Are Associated with Tertiary Lymphoid Structures, Cytolytic T-Cell Responses, and Superior Prognosis in Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* 22, 3005–3015.

Kumar, V., Dasoveanu, D.C., Chyou, S., Tzeng, T.-C., Rozo, C., Liang, Y., Stohl, W., Fu, Y.-X., Ruddle, N., and Lu, T.T. (2015). A dendritic cell-stromal axis maintains immune responses in lymph nodes. *Immunity* 42, 719–730.

Kuo, C.-F., Grainge, M.J., Valdes, A.M., See, L.-C., Luo, S.-F., Yu, K.-H., Zhang, W., and Doherty, M. (2015). Familial Aggregation of Systemic Lupus Erythematosus and Coaggregation of Autoimmune Diseases in Affected Families. *JAMA Intern. Med.* 175, 1518–1526.

Kuroda, Y., Akaogi, J., Nacionales, D.C., Wasdo, S.C., Szabo, N.J., Reeves, W.H., and Satoh, M. (2004). Distinctive patterns of autoimmune response induced by different types of mineral oil. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 78, 222–228.

Kwan, B.C.-H., Tam, L.-S., Lai, K.-B., Lai, F.M.-M., Li, E.K.-M., Wang, G., Chow, K.-M., Li, P.K.-T., and Szeto, C.-C. (2009). The gene expression of type 17 T-helper cell-related cytokines in the urinary sediment of patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 48, 1491–1497.

Kwon, Y.-C., Chun, S., Kim, K., and Mak, A. (2019). Update on the Genetics of Systemic Lupus Erythematosus: Genome-Wide Association Studies and Beyond. *Cells* 8.

- Lacotte, S., Dumortier, H., Décossas, 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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *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.
- Lamoureux, J.L., Watson, L.C., Cherrier, M., Skog, P., Nemazee, D., and Feeney, A.J. (2007). Reduced receptor editing in lupus-prone MRL/lpr mice. *J. Exp. Med.* *204*, 2853–2864.
- Lau, C.M., Broughton, C., Tabor, A.S., Akira, S., Flavell, R.A., Mamula, M.J., Christensen, S.R., Shlomchik, M.J., Viglianti, G.A., Rifkin, I.R., et al. (2005). RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J. Exp. Med.* *202*, 1171–1177.
- 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*.
- Lee, C., Zhang, F., Tang, Z., Liu, Y., and Li, X. (2013). PDGF-C: a new performer in the neurovascular interplay. *Trends Mol. Med.* *19*, 474–486.
- Lee, L.A., Roberts, C.M., Frank, M.B., McCubbin, V.R., and Reichlin, M. (1994). The autoantibody response to Ro/SSA in cutaneous lupus erythematosus. *Arch. Dermatol.* *130*, 1262–1268.
- Lee, P.Y., Kumagai, Y., Li, Y., Takeuchi, O., Yoshida, H., Weinstein, J., Kellner, E.S., Nacionales, D., Barker, T., Kelly-Scumpia, K., et al. (2008a). TLR7-dependent and FcγR-independent production of type I interferon in experimental mouse lupus. *J. Exp. Med.* *205*, 2995–3006.
- Lee, P.Y., Weinstein, J.S., Nacionales, D.C., Scumpia, P.O., Li, Y., Butfiloski, E., Rooijen, N. van, Moldawer, L., Satoh, M., and Reeves, W.H. (2008b). A Novel Type I IFN-Producing Cell Subset in Murine Lupus. *J. Immunol.* *180*, 5101–5108.
- Lee, S., Lee, S.H., Seo, H.-B., Ryu, J.-G., Jung, K., Choi, J.W., Jhun, J., Park, J.-S., Kwon, J.Y., Kwok, S.-K., et al. (2019). Inhibition of IL-17 ameliorates systemic lupus erythematosus in Roquin san/san mice through regulating the balance of TFH cells, GC B cells, Treg and Breg. *Sci. Rep.* *9*, 1–8.
- LeibundGut-Landmann, S., Waldburger, J.-M., Krawczyk, M., Otten, L.A., Suter, T., Fontana, A., Acha-Orbea, H., and Reith, W. (2004). Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes. *Eur. J. Immunol.* *34*, 1513–1525.
- Leiss, H., Niederreiter, B., Bandur, T., Schwarzecker, B., Blüml, S., Steiner, G., Ulrich, W., Smolen, J.S., and Stummvoll, G.H. (2013). Pristane-induced lupus as a model of human lupus arthritis: evolvement of autoantibodies, internal organ and joint inflammation. *Lupus* *22*, 778–792.
- Leiss, H., Salzberger, W., Jacobs, B., Gessler, I., Kozakowski, N., Blüml, S., Puchner, A., Kiss, A., Podesser, B.K., Smolen, J.S., et al. (2017). MicroRNA 155-deficiency leads to decreased autoantibody levels and reduced severity of nephritis and pneumonitis in pristane-induced lupus. *PLoS One* *12*, e0181015.
- Lema, G.P.D., 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. *J. Am. Soc. Nephrol.* *12*, 1369–1382.
- Li, W., Deng, C., Yang, H., and Wang, G. (2019). The Regulatory T Cell in Active Systemic Lupus Erythematosus Patients: A Systemic Review and Meta-Analysis. *Front. Immunol.* *10*.
- 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. *Sci. Transl. Med.* *6*, 230ra46.
- Lindquist, J.A., Hildebrandt, J., Philipsen, L., and Mertens, P.R. (2017). Immune complexes and complexity:

investigating mechanisms of renal disease. *Int. Urol. Nephrol.* *49*, 735–739.

Link, A., Vogt, T.K., Favre, S., Britschgi, M.R., Acha-Orbea, H., Hinz, B., Cyster, J.G., and Luther, S.A. (2007). Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat. Immunol.* *8*, 1255–1265.

Liu, Z., and Davidson, A. (2012). Taming lupus—a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances. *Nat. Med.* *18*, 871–882.

Liu, K., Fan, J., and Wu, J. (2017). Sushi repeat-containing protein X-linked 2 promotes angiogenesis through the urokinase-type plasminogen activator receptor dependent integrin $\alpha\beta3$ /focal adhesion kinase pathways. *Drug Discov. Ther.* *11*, 212–217.

López, P., de Paz, B., Rodríguez-Carrio, J., Hevia, A., Sánchez, B., Margolles, A., and Suárez, A. (2016a). Th17 responses and natural IgM antibodies are related to gut microbiota composition in systemic lupus erythematosus patients. *Sci. Rep.* *6*, 1–12.

López, P., Rodríguez-Carrio, J., Caminal-Montero, L., Mozo, L., and Suárez, A. (2016b). A pathogenic IFN α , BlyS and IL-17 axis in Systemic Lupus Erythematosus patients. *Sci. Rep.* *6*.

Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* *15*, 550.

Lövgren, T., Eloranta, M.-L., Båve, U., Alm, G.V., and Rönnblom, L. (2004). Induction of interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells by immune complexes containing nucleic acid released by necrotic or late apoptotic cells and lupus IgG. *Arthritis Rheum.* *50*, 1861–1872.

Lövgren, T., Eloranta, M.-L., Kastner, B., Wahren-Herlenius, M., Alm, G.V., and Rönnblom, L. (2006). Induction of interferon-alpha by immune complexes or liposomes containing systemic lupus erythematosus autoantigen- and Sjögren's syndrome autoantigen-associated RNA. *Arthritis Rheum.* *54*, 1917–1927.

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. *J. Immunol.* *174*, 6212–6219.

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.

Lund, A.W., Duraes, F.V., Hirosue, S., Raghavan, V.R., Nembrini, C., Thomas, S.N., Issa, A., Hugues, S., and Swartz, M.A. (2012). VEGF-C Promotes Immune Tolerance in B16 Melanomas and Cross-Presentation of Tumor Antigen by Lymph Node Lymphatics. *Cell Rep.* *1*, 191–199.

Luo, G., Ducy, P., McKee, M.D., Pinero, G.J., Loyer, E., Behringer, R.R., and Karsenty, G. (1997). Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* *386*, 78–81.

Luther, S.A., Lopez, T., Bai, W., Hanahan, D., and Cyster, J.G. (2000). BLC expression in pancreatic islets causes B cell recruitment and lymphotoxin-dependent lymphoid neogenesis. *Immunity* *12*, 471–481.

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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *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.

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, Y., Xu, X., Li, M., Cai, J., Wei, Q., and Niu, H. (2019). Gut microbiota promote the inflammatory response in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Mol. Med.* *25*, 35.

- Majumder, S., Amatya, N., Revu, S., Jawale, C.V., Wu, D., Rittenhouse, N., Menk, A., Kupul, S., Du, F., Raphael, I., et al. (2019). IL-17 metabolically reprograms activated fibroblastic reticular cells for proliferation and survival. *Nat. Immunol.* *20*, 534–545.
- 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. *Nat. Immunol.* *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.
- Manjarrez-Orduño, N., Marasco, E., Chung, S.A., Katz, M.S., Kiridly, J.F., Simpfendorfer, K.R., Freudenberg, J., Ballard, D.H., Nashi, E., Hopkins, T.J., et al. (2012). CSK regulatory polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus and influences B cell signaling and activation. *Nat. Genet.* *44*, 1227–1230.
- Manzo, A., Bugatti, S., Caporali, R., Prevo, R., Jackson, D.G., Ugucioni, M., Buckley, C.D., Montecucco, C., and Pitzalis, C. (2007). CCL21 expression pattern of human secondary lymphoid organ stroma is conserved in inflammatory lesions with lymphoid neogenesis. *Am. J. Pathol.* *171*, 1549–1562.
- Martinez, V.G., Pankova, V., Krasny, L., Singh, T., Makris, S., White, I.J., Benjamin, A.C., Dertschnig, S., Horsnell, H.L., Kriston-Vizi, J., et al. (2019). Fibroblastic Reticular Cells Control Conduit Matrix Deposition during Lymph Node Expansion. *Cell Rep.* *29*, 2810-2822.e5.
- Maruhashi, T., Okazaki, I.-M., Sugiura, D., Takahashi, S., Maeda, T.K., Shimizu, K., and Okazaki, T. (2018). LAG-3 inhibits the activation of CD4⁺ T cells that recognize stable pMHCII through its conformation-dependent recognition of pMHCII. *Nat. Immunol.* *19*, 1415–1426.
- 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.
- Mathian, A., Weinberg, A., Gallegos, M., Banchereau, J., and Koutouzov, S. (2005). IFN- α induces early lethal lupus in preautoimmune (New Zealand Black x New Zealand White) F1 but not in BALB/c mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 2499–2506.
- Matsushita, T. (2014). Regulatory B cells in mouse models of systemic lupus erythematosus (SLE). *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1190*, 195–205.
- McClain, M.T., Heinlen, L.D., Dennis, G.J., Roebuck, J., Harley, J.B., and James, J.A. (2005). Early events in lupus humoral autoimmunity suggest initiation through molecular mimicry. *Nat. Med.* *11*, 85–89.
- McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., and O’Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 87–103.
- Mebius, R.E., Miyamoto, T., Christensen, J., Domen, J., Cupedo, T., Weissman, I.L., and Akashi, K. (2001). The Fetal Liver Counterpart of Adult Common Lymphoid Progenitors Gives Rise to All Lymphoid Lineages, CD45⁺CD4⁺CD3⁻ Cells, As Well As Macrophages. *J. Immunol.* *166*, 6593–6601.
- 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. *J. Clin. Invest.* *121*, 3635–3644.
- 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. *J. Am. Soc. Nephrol.* *19*, 1177–1189.

- 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.
- Migliorini, P., Baldini, C., Rocchi, V., and Bombardieri, S. (2005). Anti-Sm and anti-RNP antibodies. *Autoimmunity* 38, 47–54.
- Miller, F.W., Alfredsson, L., Costenbader, K.H., Kamen, D.L., Nelson, L.M., Norris, J.M., and De Roos, A.J. (2012). Epidemiology of environmental exposures and human autoimmune diseases: findings from a National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop. *J. Autoimmun.* 39, 259–271.
- 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.
- Mitchell, D.A., Pickering, M.C., Warren, J., Fossati-Jimack, L., Cortes-Hernandez, J., Cook, H.T., Botto, M., and Walport, M.J. (2002). C1q Deficiency and Autoimmunity: The Effects of Genetic Background on Disease Expression. *J. Immunol.* 168, 2538–2543.
- Miyasaka, M., and Tanaka, T. (2004). Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 360–370.
- Mjelle, J.E., Rekvig, O.P., and Fenton, K.A. (2007). Nucleosomes possess a high affinity for glomerular laminin and collagen IV and bind nephritogenic antibodies in murine lupus-like nephritis. *Ann. Rheum. Dis.* 66, 1661–1668.
- 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.
- Mondor, I., Jorquera, A., Sene, C., Adriouch, S., Adams, R.H., Zhou, B., Wienert, S., Klauschen, F., and Bajénoff, M. (2016). Clonal Proliferation and Stochastic Pruning Orchestrate Lymph Node Vasculature Remodeling. *Immunity* 45, 877–888.
- Monneaux, F., Dumortier, H., Steiner, G., Briand, J.P., and Muller, S. (2001). Murine models of systemic lupus erythematosus: B and T cell responses to spliceosomal ribonucleoproteins in MRL/Fas(lpr) and (NZB x NZW)F(1) lupus mice. *Int. Immunol.* 13, 1155–1163.
- Monneaux, F., Lozano, J.M., Patarroyo, M.E., Briand, J.-P., and Muller, S. (2003). T cell recognition and therapeutic effect of a phosphorylated synthetic peptide of the 70K snRNP protein administered in MR/lpr mice. *Eur. J. Immunol.* 33, 287–296.
- 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 Rheum.* 64, 1237–1246.
- Mostoslavsky, G., Fischel, R., Yachimovich, N., Yarkoni, Y., Rosenmann, E., Monestier, M., Baniyash, M., and Eilat, D. (2001). Lupus anti-DNA autoantibodies cross-react with a glomerular structural protein: a case for tissue injury by molecular mimicry. *Eur. J. Immunol.* 31, 1221–1227.
- 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. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 26, 51–62.
- Moulton, V.R. (2018). Sex Hormones in Acquired Immunity and Autoimmune Disease. *Front. Immunol.* 9, 2279.

- Moulton, V.R., Suarez-Fueyo, A., Meidan, E., Li, H., Mizui, M., and Tsokos, G.C. (2017). Pathogenesis of Human Systemic Lupus Erythematosus: A Cellular Perspective. *Trends Mol. Med.* 23, 615–635.
- Mueller, S.N., Matloubian, M., Clemens, D.M., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., Gangappa, S., Larsen, C.P., and Ahmed, R. (2007a). Viral targeting of fibroblastic reticular cells contributes to immunosuppression and persistence during chronic infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 15430–15435.
- Mueller, S.N., Hosiawa-Meagher, K.A., Konieczny, B.T., Sullivan, B.M., Bachmann, M.F., Locksley, R.M., Ahmed, R., and Matloubian, M. (2007b). Regulation of Homeostatic Chemokine Expression and Cell Trafficking During Immune Responses. *Science* 317, 670–674.
- Munoz, L., Frey, B., Appelt, U., Janko, C., Sarter Zaiss, K., Voll, R., Kern, P., Herrmann, M., and Gaipf, U. (2010). Peripheral Blood Stem Cells of Patients with Systemic Lupus Erythematosus Show Altered Differentiation into Macrophages. *Open Autoimmun J* 2.
- 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). *Am. J. Pathol.* 168, 1227–1240.
- Nacionales, D.C., Kelly-Scumpia, K.M., Lee, P.Y., Weinstein, J.S., Lyons, R., Sobel, E., Satoh, M., and Reeves, W.H. (2007). Deficiency of the type I interferon receptor protects mice from experimental lupus. *Arthritis Rheum.* 56, 3770–3783.
- 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. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 182, 4226–4236.
- Nakamura, T., Ebihara, I., Tomino, Y., Okumura, K., and Koide, H. (1991). Perforin mRNA expression in the inflamed tissues of NZB/W F1 lupus mice decreases with methylprednisolone treatment. *Am. J. Pathol.* 139, 731–736.
- 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. *J. Immunol.* 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 ζ chain restores T cell signaling and augments T cell receptor/CD3–induced interleukin-2 production in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 48, 1948–1955.
- Nayar, S., Campos, J., Chung, M.M., Navarro-Núñez, L., Chachlani, M., Steinthal, N., Gardner, D.H., Rankin, P., Cloake, T., Caamaño, J.H., et al. (2016). Bimodal Expansion of the Lymphatic Vessels Is Regulated by the Sequential Expression of IL-7 and Lymphotoxin α 1 β 2 in Newly Formed Tertiary Lymphoid Structures. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 197, 1957–1967.
- Nayar, S., Campos, J., Smith, C.G., Iannizzotto, V., Gardner, D.H., Mourcin, F., Roulois, D., Turner, J., Sylvestre, M., Asam, S., et al. (2019). Immunofibroblasts are pivotal drivers of tertiary lymphoid structure formation and local pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 13490–13497.
- Neusser, M.A., Lindenmeyer, M.T., Edenhofer, I., Gaiser, S., Kretzler, M., Regele, H., Segerer, S., and Cohen, C.D. (2011). Intrarenal production of B-cell survival factors in human lupus nephritis. *Mod. Pathol.* 24, 98–107.
- Neyt, K., Perros, F., GeurtsvanKessel, C.H., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2012). Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity. *Trends Immunol.* 33, 297–305.
- Nichols, L.A., Chen, Y., Colella, T.A., Bennett, C.L., Clausen, B.E., and Engelhard, V.H. (2007). Deletional Self-Tolerance to a Melanocyte/Melanoma Antigen Derived from Tyrosinase Is Mediated by a Radio-Resistant Cell in Peripheral and Mesenteric Lymph Nodes. *J. Immunol.* 179, 993–1003.
- Nilsson, S.C., Nita, I., Månsson, L., Groeneveld, T.W.L., Trouw, L.A., Villoutreix, B.O., and Blom, A.M. (2010). Analysis of Binding Sites on Complement Factor I That Are Required for Its Activity. *J. Biol. Chem.* 285, 6235–

Novkovic, M., Onder, L., Cheng, H.-W., Bocharov, G., and Ludewig, B. (2018). Integrative Computational Modeling of the Lymph Node Stromal Cell Landscape. *Front. Immunol.* *9*.

Odendahl, M., Jacobi, A., Hansen, A., Feist, E., Hiepe, F., Burmester, G.R., Lipsky, P.E., Radbruch, A., and Dörner, T. (2000). Disturbed Peripheral B Lymphocyte Homeostasis in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* *165*, 5970–5979.

Odobasic, D., Muljadi, R.C.M., O’Sullivan, K.M., Kettle, A.J., Dickerhof, N., Summers, S.A., Kitching, A.R., and Holdsworth, S.R. (2015). Suppression of Autoimmunity and Renal Disease in Pristane-Induced Lupus by Myeloperoxidase. *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ *67*, 1868–1880.

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.

Onder, L., and Ludewig, B. (2018). A Fresh View on Lymph Node Organogenesis. *Trends Immunol.* *39*, 775–787.

Onder, L., Narang, P., Scandella, E., Chai, Q., Iolyeva, M., Hoorweg, K., Halin, C., Richie, E., Kaye, P., Westermann, J., et al. (2012). IL-7-producing stromal cells are critical for lymph node remodeling. *Blood* *120*, 4675–4683.

Onder, L., Danuser, R., Scandella, E., Firner, S., Chai, Q., Hehlhans, T., Stein, J.V., and Ludewig, B. (2013). 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., Hehlhans, 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.

Ozmen, L., Roman, D., Fountoulakis, M., Schmid, G., Ryffel, B., and Garotta, G. (1995). Experimental therapy of systemic lupus erythematosus: the treatment of NZB/W mice with mouse soluble interferon- γ receptor inhibits the onset of glomerulonephritis. *Eur. J. Immunol.* *25*, 6–12.

Panchanathan, R., Liu, H., Leung, Y.-K., Ho, S., and Choubey, D. (2015). Bisphenol A (BPA) stimulates the interferon signaling and activates the inflammasome activity in myeloid cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* *415*, 45–55.

Pandey, S., Mourcin, F., Marchand, T., Nayar, S., Guirriec, M., Pangault, C., Monvoisin, C., Amé-Thomas, P., Guilloton, F., Dulong, J., et al. (2017). IL-4/CXCL12 loop is a key regulator of lymphoid stroma function in follicular lymphoma. *Blood* *129*, 2507–2518.

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.

Parks, C.G., Conrad, K., and Cooper, G.S. (1999). Occupational exposure to crystalline silica and autoimmune disease. *Environ. Health Perspect.* *107*, 793–802.

Pásztói, M., Misják, P., György, B., Aradi, B., Szabó, T.G., Szántó, B., Holub, M.Cs., Nagy, Gy., Falus, A., and Buzás, E.I. (2011). Infection and autoimmunity: Lessons of animal models. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* *1*, 198–207.

Pasztói, M., Pezoldt, J., Beckstette, M., Lipps, C., Wirth, D., Rohde, M., Paloczi, K., Buzas, E.I., and Huehn, J. (2017). Mesenteric lymph node stromal cell-derived extracellular vesicles contribute to peripheral de novo induction of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* *47*, 2142–2152.

Paul, E., Pozdnyakova, O.O., Mitchell, E., and Carroll, M.C. (2002). Anti-DNA autoreactivity in C4-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* *32*, 2672–2679.

van de Pavert, S.A., and Mebius, R.E. (2010). New insights into the development of lymphoid tissues. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 664–674.

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.

Perry, J.S.A., Russler-Germain, E.V., Zhou, Y.W., Purtha, W., Cooper, M.L., Choi, J., Schroeder, M.A., Salazar, V., Egawa, T., Lee, B.-C., et al. (2018). Scavenger receptor CD36 mediates cell-surface antigen transfer to promote thymic regulatory T cell receptor repertoire development and allo-tolerance. *Immunity* *48*, 923-936.e4.

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.

Pikor, N.B., Astarita, J.L., Summers-Deluca, L., Galicia, G., Qu, J., Ward, L.A., Armstrong, S., Dominguez, C.X., Malhotra, D., Heiden, B., et al. (2015). Integration of Th17- and Lymphotoxin-Derived Signals Initiates Meningeal-Resident Stromal Cell Remodeling to Propagate Neuroinflammation. *Immunity* *43*, 1160–1173.

Pimentel-Quiroz, V.R., Ugarte-Gil, M.F., and Alarcón, G.S. (2016). Abatacept for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Expert Opin. Investig. Drugs* *25*, 493–499.

Pisitkun, P., Deane, J.A., Difilippantonio, M.J., Tarasenko, T., Satterthwaite, A.B., and Bolland, S. (2006). Autoreactive B Cell Responses to RNA-Related Antigens Due to TLR7 Gene Duplication. *Science* *312*, 1669–1672.

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

Pollard, K.M. (2016). Silica, Silicosis, and Autoimmunity. *Front. Immunol.* *7*.

Postigo-Fernandez, J., Farber, D.L., and Creusot, R.J. (2019). Phenotypic alterations in pancreatic lymph node stromal cells from human donors with type 1 diabetes and NOD mice. *Diabetologia* *62*, 2040–2051.

Preble, O.T., Black, R.J., Friedman, R.M., Klippel, J.H., and Vilcek, J. (1982). Systemic lupus erythematosus: presence in human serum of an unusual acid-labile leukocyte interferon. *Science* *216*, 429–431.

Price, A.E., Shamardani, K., Lugo, K.A., Deguine, J., Roberts, A.W., Lee, B.L., and Barton, G.M. (2018). A Map of Toll-like Receptor Expression in the Intestinal Epithelium Reveals Distinct Spatial, Cell Type-Specific, and Temporal Patterns. *Immunity* *49*, 560-575.e6.

Pritchard, N.R., Cutler, A.J., Uribe, S., Chadban, S.J., Morley, B.J., and Smith, K.G.C. (2000). Autoimmune-prone mice share a promoter haplotype associated with reduced expression and function of the Fc receptor FcγRII. *Curr. Biol.* *10*, 227–230.

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. (2011). The development of inducible bronchus-associated lymphoid tissue depends on IL-17. *Nat. Immunol.* *12*, 639–646.

- Rauen, T., Hedrich, C.M., Juang, Y.-T., Tenbrock, K., and Tsokos, G.C. (2011). cAMP-responsive Element Modulator (CREM) α Protein Induces Interleukin 17A Expression and Mediates Epigenetic Alterations at the Interleukin-17A Gene Locus in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J. Biol. Chem.* *286*, 43437–43446.
- Reeves, W.H., Lee, P.Y., Weinstein, J.S., Satoh, M., and Lu, L. (2009). Induction of autoimmunity by pristane and other naturally-occurring hydrocarbons. *Trends Immunol.* *30*, 455–464.
- 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. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *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.
- Rekvig, O.P., Putterman, C., Casu, C., Gao, H.-X., Ghirardello, A., Mortensen, E.S., Tincani, A., and Doria, A. (2012). Autoantibodies in lupus: Culprits or passive bystanders? *Autoimmun. Rev.* *11*, 596–603.
- Richard, M.L., and Gilkeson, G. (2018). Mouse models of lupus: what they tell us and what they don't. *Lupus Sci. Med.* *5*.
- Richards, H.B., Satoh, M., Jennette, J.C., Croker, B.P., Yoshida, H., and Reeves, W.H. (2001). Interferon-gamma is required for lupus nephritis in mice treated with the hydrocarbon oil pristane. *Kidney Int.* *60*, 2173–2180.
- Riedel, A., Shorthouse, D., Haas, L., Hall, B.A., and Shields, J. (2016). Tumor-induced stromal reprogramming drives lymph node transformation. *Nat. Immunol.* *17*, 1118–1127.
- Riedel, A., Swietlik, J., Shorthouse, D., Haas, L., Young, T., Costa, A.S.H., Davidson, S., Pedro, L., Oskarsson, T., Hall, B.A., et al. (2018). Tumor pre-conditioning of draining lymph node stroma by lactic acid. *BioRxiv* 442137.
- 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.
- 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. Baltim. Md 1950* *195*, 4781–4791.
- Rodda, L.B., Lu, E., Bennett, M.L., Sokol, C.L., Wang, X., Luther, S.A., Barres, B.A., Luster, A.D., Ye, C.J., and Cyster, J.G. (2018). Single-Cell RNA Sequencing of Lymph Node Stromal Cells Reveals Niche-Associated Heterogeneity. *Immunity* *48*, 1014-1028.e6.
- Rojas, O.L., Pröbstel, A.-K., Porfilio, E.A., Wang, A.A., Charabati, M., Sun, T., Lee, D.S.W., Galicia, G., Ramaglia, V., Ward, L.A., et al. (2019). Recirculating Intestinal IgA-Producing Cells Regulate Neuroinflammation via IL-10. *Cell* *176*, 610-624.e18.
- Roozendaal, R., Mempel, T.R., Pitcher, L.A., Gonzalez, S.F., Verschoor, A., Mebius, R.E., von Andrian, U.H., and Carroll, M.C. (2009). Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles. *Immunity* *30*, 264–276.
- Roskoski, R. (2007). Sunitinib: a VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *356*, 323–328.
- Roubinian, J.R., Talal, N., Greenspan, J.S., Goodman, J.R., and Siiteri, P.K. (1978). Effect of castration and sex hormone treatment on survival, anti-nucleic acid antibodies, and glomerulonephritis in NZB/NZW F1 mice. *J. Exp. Med.* *147*, 1568–1583.
- 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.

Ruddle, N.H. (2014). Lymphatic vessels and tertiary lymphoid organs. *J. Clin. Invest.* *124*, 953–959.

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.

Santambrogio, L., Berendam, S.J., and Engelhard, V.H. (2019). The Antigen Processing and Presentation Machinery in Lymphatic Endothelial Cells. *Front. Immunol.* *10*.

Santi, A., Kugeratski, F.G., and Zanivan, S. (2018). Cancer Associated Fibroblasts: The Architects of Stroma Remodeling. *PROTEOMICS* *18*, 1700167.

Santiago-Raber, M.-L., Baccala, R., Haraldsson, K.M., Choubey, D., Stewart, T.A., Kono, D.H., and Theofilopoulos, A.N. (2003). Type-I interferon receptor deficiency reduces lupus-like disease in NZB mice. *J. Exp. Med.* *197*, 777–788.

Satoh, M., Kumar, A., Kanwar, Y.S., and Reeves, W.H. (1995). Anti-nuclear antibody production and immune-complex glomerulonephritis in BALB/c mice treated with pristane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *92*, 10934–10938.

Satoh, M., Richards, H.B., Shaheen, V.M., Yoshida, H., Shaw, M., Naim, J.O., Wooley, P.H., and Reeves, W.H. (2000). Widespread susceptibility among inbred mouse strains to the induction of lupus autoantibodies by pristane. *Clin. Exp. Immunol.* *121*, 399–405.

Sawaf, M., Fauny, J.-D., Felten, R., Sagez, F., Gottenberg, J.-E., Dumortier, H., and Monneaux, F. Defective BTLA functionality is rescued by restoring lipid metabolism in lupus CD4⁺ T cells. *JCI Insight* *3*.

Saxena, V., Li, L., Paluskiewicz, C., Kasinath, V., Bean, A., Abdi, R., Jewell, C.M., and Bromberg, J.S. (2019). Role of lymph node stroma and microenvironment in T cell tolerance. *Immunol. Rev.*

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. *J. Immunol.* *177*, 1451–1459.

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.

Schmidt, T., Paust, H.-J., Krebs, C.F., Turner, J.-E., Kaffke, A., Bennisstein, 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. *Arthritis Rheumatol.* *67*, 475–487.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 221–225.

Schroeder, M.A., and DiPersio, J.F. (2011). Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Dis. Model. Mech.* *4*, 318–333.

Schudel, A., Francis, D.M., and Thomas, S.N. (2019). Material design for lymph node drug delivery. *Nat. Rev. Mater.* *4*, 415–428.

Seleznik, G., Seeger, H., Bauer, J., Fu, K., Czerkowicz, J., Papandile, A., Poreci, U., Rabah, D., Ranger, A., Cohen, C.D., et al. (2016). The lymphotoxin β receptor is a potential therapeutic target in renal inflammation. *Kidney Int.* *89*, 113–126.

SENO, A., MARUHASHI, T., KAIFU, T., YABE, R., FUJIKADO, N., MA, G., IKARASHI, T., KAKUTA, S., and IWAKURA, Y. (2015). Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice deficient for DCIR, an inhibitory C-type lectin receptor. *Exp. Anim.* *64*, 109–119.

- Shaheen, V.M., Satoh, M., Richards, H.B., Yoshida, H., Shaw, M., Jennette, J.C., and Reeves, W.H. (1999). Immunopathogenesis of environmentally induced lupus in mice. *Environ. Health Perspect.* *107*, 723–727.
- 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.
- Shimizu-Hirota, R., Sasamura, H., Kuroda, M., Kobayashi, E., and Saruta, T. (2004). Functional characterization of podocan, a member of a new class in the small leucine-rich repeat protein family. *FEBS Lett.* *563*, 69–74.
- Shinde, R., Hezaveh, K., Halaby, M.J., Kloetgen, A., Chakravarthy, A., da Silva Medina, T., Deol, R., Manion, K.P., Baglaenko, Y., Eldh, M., et al. (2018). Apoptotic cell-induced, TLR9-dependent AhR activity is required for immunological tolerance and suppression of systemic lupus erythematosus in mice and humans. *Nat. Immunol.* *19*, 571–582.
- Sibilia, J., and Pasquali, J.-L. (2008). Actualités et perspectives thérapeutiques du lupus systémique. *Presse Médicale* *37*, 444–459.
- 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.
- Sieling, P.A., Porcelli, S.A., Duong, B.T., Spada, F., Bloom, B.R., Diamond, B., and Hahn, B.H. (2000). Human Double-Negative T Cells in Systemic Lupus Erythematosus Provide Help for IgG and Are Restricted by CD1c. *J. Immunol.* *165*, 5338–5344.
- 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 Rheum.* *62*, 234–244.
- 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. *J. Clin. Invest.* *123*, 712–726.
- Smith, N., Rodero, M.P., Bekaddour, N., Bondet, V., Ruiz-Blanco, Y.B., Harms, M., Mayer, B., Bader-Meunier, B., Quartier, P., Bodemer, C., et al. (2019). Control of TLR7-mediated type I IFN signaling in pDCs through CXCR4 engagement—A new target for lupus treatment. *Sci. Adv.* *5*, eaav9019.
- Srinivasan, R.S., Dillard, M.E., Lagutin, O.V., Lin, F.-J., Tsai, S., Tsai, M.-J., Samokhvalov, I.M., and Oliver, G. (2007). Lineage tracing demonstrates the venous origin of the mammalian lymphatic vasculature. *Genes Dev.* *21*, 2422–2432.
- 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.
- Stebegg, M., Kumar, S.D., Silva-Cayetano, A., Fonseca, V.R., Linterman, M.A., and Graca, L. (2018). Regulation of the Germinal Center Response. *Front. Immunol.* *9*.
- 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. *J. Immunol.* *183*, 4693–4704.
- 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.

- Summers, S.A., Hoi, A., Steinmetz, O.M., O'Sullivan, K.M., Ooi, J.D., Odobasic, D., Akira, S., Kitching, A.R., and Holdsworth, S.R. (2010). TLR9 and TLR4 are required for the development of autoimmunity and lupus nephritis in pristane nephropathy. *J. Autoimmun.* *35*, 291–298.
- Suurmond, J., Calise, J., Malkiel, S., and Diamond, B. (2016). DNA-reactive B cells in lupus. *Curr. Opin. Immunol.* *43*, 1–7.
- Suzuki, K., Grigorova, I., Phan, T.G., Kelly, L.M., and Cyster, J.G. (2009). Visualizing B cell capture of cognate antigen from follicular dendritic cells. *J. Exp. Med.* *206*, 1485–1493.
- Svensson, B. (1980). Occurrence of deficient monocyte yeast cell phagocytosis in presence of rheumatic sera. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.* *31*, 21–27.
- Tabor, D.E., and Gould, K.A. (2017). Estrogen Receptor Alpha Promotes Lupus in (NZB x NZW)F1 Mice in a B cell Intrinsic Manner. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *174*, 41–52.
- Takemura, S., Braun, A., Crowson, C., Kurtin, P.J., Cofield, R.H., O'Fallon, W.M., Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. (2001). Lymphoid Neogenesis in Rheumatoid Synovitis. *J. Immunol.* *167*, 1072–1080.
- Tamburini, B.A., Burchill, M.A., and Kedl, R.M. (2014). Antigen capture and archiving by lymphatic endothelial cells following vaccination or viral infection. *Nat. Commun.* *5*, 3989.
- Tan, K.W., Yeo, K.P., Wong, F.H.S., Lim, H.Y., Khoo, K.L., Abastado, J.-P., and Angeli, V. (2012). Expansion of cortical and medullary sinuses restrains lymph node hypertrophy during prolonged inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 4065–4080.
- 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 Rheum.* *60*, 1065–1075.
- Taylor, P.R., Pickering, M.C., Kosco-Vilbois, M.H., Walport, M.J., Botto, M., Gordon, S., and Martinez-Pomares, L. (2002). The follicular dendritic cell restricted epitope, FDC-M2, is complement C4; localization of immune complexes in mouse tissues. *Eur. J. Immunol.* *32*, 1883–1896.
- Teng, G., Hakimpour, P., Landgraf, P., Rice, A., Tuschl, T., Casellas, R., and Papavasiliou, F.N. (2008). MicroRNA-155 is a negative regulator of activation-induced cytidine deaminase. *Immunity* *28*, 621–629.
- 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. *J. Autoimmun.* *74*, 161–175.
- Tewalt, E.F., Cohen, J.N., Rouhani, S.J., Guidi, C.J., Qiao, H., Fahl, S.P., Conaway, M.R., Bender, T.P., Tung, K.S., Vella, A.T., et al. (2012). Lymphatic endothelial cells induce tolerance via PD-L1 and lack of costimulation leading to high-level PD-1 expression on CD8 T cells. *Blood* *120*, 4772–4782.
- Thanei, S., Vanhecke, D., and Trendelenburg, M. (2015). Anti-C1q autoantibodies from systemic lupus erythematosus patients activate the complement system via both the classical and lectin pathways. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *160*, 180–187.
- 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.
- Thierry, G.R., Gentek, R., and Bajenoff, M. (2019). Remodeling of reactive lymph nodes: Dynamics of stromal cells and underlying chemokine signaling. *Immunol. Rev.* *289*, 42–61.
- Thurlings, R.M., Wijbrandts, C.A., Mebius, R.E., Cantaert, T., Dinant, H.J., van der Pouw-Kraan, T.C.T.M., Verweij, C.L., Baeten, D., and Tak, P.P. (2008). Synovial lymphoid neogenesis does not define a specific clinical rheumatoid arthritis phenotype. *Arthritis Rheum.* *58*, 1582–1589.
- Tiegs, S.L., Russell, D.M., and Nemazee, D. (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J. Exp. Med.* *177*, 1009–1020.

- Timmer, T.C.G., Baltus, B., Vondenhoff, M., Huizinga, T.W.J., Tak, P.P., Verweij, C.L., Mebius, R.E., and van der Pouw Kraan, T.C.T.M. (2007). Inflammation and ectopic lymphoid structures in rheumatoid arthritis synovial tissues dissected by genomics technology: identification of the interleukin-7 signaling pathway in tissues with lymphoid neogenesis. *Arthritis Rheum.* *56*, 2492–2502.
- Tokunaga, R., Zhang, W., Naseem, M., Puccini, A., Berger, M.D., Soni, S., McSkane, M., Baba, H., and Lenz, H.-J. (2018). CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - a target for novel cancer therapy. *Cancer Treat. Rev.* *63*, 40–47.
- Tomei, A.A., Siegert, S., Britschgi, M.R., Luther, S.A., and Swartz, M.A. (2009). Fluid flow regulates stromal cell organization and CCL21 expression in a tissue-engineered lymph node microenvironment. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 4273–4283.
- Trendelenburg, M., Lopez-Trascasa, M., Potlukova, E., Moll, S., Regenass, S., Frémeaux-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. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* *21*, 3115–3121.
- Triantafyllopoulou, A., Franzke, C.-W., Seshan, S.V., Perino, G., Kalliolias, G.D., Ramanujam, M., van Rooijen, N., Davidson, A., and Ivashkiv, L.B. (2010). Proliferative lesions and metalloproteinase activity in murine lupus nephritis mediated by type I interferons and macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 3012–3017.
- Tsuchiya, N., Honda, Z., and Tokunaga, K. (2006). Role of B cell inhibitory receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus: a negative times a negative makes a positive. *J. Hum. Genet.* *51*, 741–750.
- Turley, S.J., Fletcher, A.L., and Elpek, K.G. (2010). The stromal and haematopoietic antigen-presenting cells that reside in secondary lymphoid organs. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 813–825.
- Turner, V.M., and Mabbott, N.A. (2017). Structural and functional changes to lymph nodes in ageing mice. *Immunology* *151*, 239–247.
- Ullal, A.J., Reich, C.F., Clowse, M., Criscione-Schreiber, L.G., Tochacek, M., Monestier, M., and Pisetsky, D.S. (2011). Microparticles as antigenic targets of antibodies to DNA and nucleosomes in systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmun.* *36*, 173–180.
- Vargas-Rojas, M.I., Crispín, J.C., 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.
- 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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *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 Res. Ther.* *15*, R97.
- Vondenhoff, M.F., Greuter, M., Goverse, G., Elewaut, D., Dewint, P., Ware, C.F., Hoorweg, K., Kraal, G., and Mebius, R.E. (2009). LTbetaR signaling induces cytokine expression and up-regulates lymphangiogenic factors in lymph node anlagen. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 5439–5445.
- Wallace, D.J., Furie, R.A., Tanaka, Y., Kalunian, K.C., Mosca, M., Petri, M.A., Dörner, T., Cardiel, M.H., Bruce, I.N., Gomez, E., et al. (2018). Baricitinib for systemic lupus erythematosus: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Lond. Engl.* *392*, 222–231.
- Wang, L., Zhao, P., Ma, L., Shan, Y., Jiang, Z., Wang, J., and Jiang, Y. (2014). Increased interleukin 21 and follicular helper T-like cells and reduced interleukin 10⁺ B cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* *41*, 1781–1792.
- 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, Z., Chai, Q., and Zhu, M. (2018). Differential Roles of LT β R in Endothelial Cell Subsets for Lymph Node Organogenesis and Maturation. *J. Immunol.* *201*, 69–76.
- Wardemann, H., and Nussenzweig, M.C. (2007). B-Cell Self-Tolerance in Humans. In *Advances in Immunology*, (Academic Press), pp. 83–110.
- Watson, M.L., Rao, J.K., Gilkeson, G.S., Ruiz, P., Eicher, E.M., Pisetsky, D.S., Matsuzawa, A., Rochelle, J.M., and Seldin, M.F. (1992). Genetic analysis of MRL-lpr mice: relationship of the Fas apoptosis gene to disease manifestations and renal disease-modifying loci. *J. Exp. Med.* *176*, 1645–1656.
- Weber, M., Hauschild, R., Schwarz, J., Moussion, C., de Vries, I., Legler, D.F., Luther, S.A., Bollenbach, T., and Sixt, M. (2013). Interstitial dendritic cell guidance by haptotactic chemokine gradients. *Science* *339*, 328–332.
- Weening, J.J., D’Agati, V.D., Schwartz, M.M., Seshan, S.V., Alpers, C.E., Appel, G.B., Balow, J.E., Bruijn, J.A., Cook, T., Ferrario, F., et al. (2004). The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *15*, 241–250.
- 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. *J. Immunol.* *178*, 6624–6633.
- Wermeling, F., Chen, Y., Pikkarainen, T., Scheynius, A., Winqvist, O., Izui, S., Ravetch, J.V., Tryggvason, K., and Karlsson, M.C.I. (2007). Class A scavenger receptors regulate tolerance against apoptotic cells, and autoantibodies against these receptors are predictive of systemic lupus. *J. Exp. Med.* *204*, 2259–2265.
- Williams, G.S., Malin, M., Vremec, D., Chang, C.H., Boyd, R., Benoist, C., and Mathis, D. (1998). Mice lacking the transcription factor CIITA--a second look. *Int. Immunol.* *10*, 1957–1967.
- Winkler, T.H., Fehr, H., and Kalden, J.R. (1992). Analysis of immunoglobulin variable region genes from human IgG anti-DNA hybridomas. *Eur. J. Immunol.* *22*, 1719–1728.
- Wlaschek, M., Heinen, G., Poswig, A., Schwarz, A., Krieg, T., and Scharffetter-Kochanek, K. (1994). UVA-induced autocrine stimulation of fibroblast-derived collagenase/MMP-1 by interrelated loops of interleukin-1 and interleukin-6. *Photochem. Photobiol.* *59*, 550–556.
- Wu, X., Guo, J., Ding, R., Lv, B., and Bi, L. (2015). CXCL13 blockade attenuates lupus nephritis of MRL/lpr mice. *Acta Histochem.* *117*, 732–737.
- 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.
- Xu, H., Li, X., Liu, D., Li, J., Zhang, X., Chen, X., Hou, S., Peng, L., Xu, C., Liu, W., et al. (2013). Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility. *Nature* *496*, 523–527.
- 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.
- 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. *Eur. J. Immunol.* *38*, 1664–1676.
- Yang, C.-Y., Vogt, T.K., Favre, S., Scarpellino, L., Huang, H.-Y., Tacchini-Cottier, F., and Luther, S.A. (2014). Trapping of naive lymphocytes triggers rapid growth and remodeling of the fibroblast network in reactive murine lymph nodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E109–E118.
- 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.
- Yeh, T.-M., Chang, H.-C., Liang, C.-C., Wu, J.-J., and Liu, M.-F. (2003). Deoxyribonuclease-Inhibitory Antibodies in Systemic Lupus erythematosus. *J. Biomed. Sci.* *10*, 544–551.
- Yin, C., Mohanta, S., Maffia, P., and Habenicht, A.J.R. (2017). Editorial: Tertiary Lymphoid Organs (TLOs): Powerhouses of Disease Immunity. *Front. Immunol.* *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.
- Yip, L., Creusot, R.J., Pager, C.T., Sarnow, P., and Fathman, C.G. (2013). Reduced DEAF1 function during type 1 diabetes inhibits translation in lymph node stromal cells by suppressing Eif4g3. *J. Mol. Cell Biol.* *5*, 99–110.
- Yip, L., Fuhlbrigge, R., Taylor, C., Creusot, R.J., Nishikawa-Matsumura, T., Whiting, C.C., Schartner, J.M., Akter, R., Herrath, M. von, and Fathman, C.G. (2015). Inflammation and Hyperglycemia Mediate Deaf1 Splicing in the Pancreatic Lymph Nodes via Distinct Pathways During Type 1 Diabetes. *Diabetes* *64*, 604–617.
- 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- α on IL-7 receptor- α cells that differentially engender lymph nodes and Peyer's patches. *Immunity* *17*, 823–833.
- Yu, F., Haas, M., Glasscock, R., and Zhao, M.-H. (2017). Redefining lupus nephritis: clinical implications of pathophysiologic subtypes. *Nat. Rev. Nephrol.* *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. *Clin. Dev. Immunol.* *2012*.
- Yung, S., Cheung, K.F., Zhang, Q., and Chan, T.M. (2010). Anti-dsDNA antibodies bind to mesangial annexin II in lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *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. *J. Autoimmun.* *58*, 111–122.
- Yurasov, S., Wardemann, H., Hammersen, J., Tsuiji, M., Meffre, E., Pascual, V., and Nussenzweig, M.C. (2005). Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* *201*, 703–711.
- Zeng, M., Smith, A.J., Wietgreffe, S.W., Southern, P.J., Schacker, T.W., Reilly, C.S., Estes, J.D., Burton, G.F., Silvestri, G., Lifson, J.D., et al. (2011). Cumulative mechanisms of lymphoid tissue fibrosis and T cell depletion in HIV-1 and SIV infections. *J. Clin. Invest.* *121*, 998–1008.
- Zhang, M., Fang, X., Wang, G.-S., Ma, Y., Jin, L., Li, X.-M., and Li, X.-P. (2017). Ultraviolet B decreases DNA methylation level of CD4+ T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Inflammopharmacology* *25*, 203–210.
- Zhang, Y., Tech, L., George, L.A., Acs, A., Durrett, R.E., Hess, H., Walker, L.S.K., Tarlinton, D.M., Fletcher, A.L., Hauser, A.E., et al. (2018). Plasma cell output from germinal centers is regulated by signals from Tfh and stromal cells. *J. Exp. Med.* *215*, 1227–1243.
- Zhang, Z., Kyttaris, V.C., and Tsokos, G.C. (2009). The Role of IL-23/IL-17 Axis in Lupus Nephritis. *J. Immunol.* *183*, 3160–3169.
- 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. *Mol. Biol. Rep.* *37*, 81–85.
- Zhou, X., Chen, H., Wei, F., Zhao, Q., Su, Q., Lei, Y., Yin, M., Tian, X., Liu, Z., Yu, B., et al. (2020). α -mangostin attenuates pristane-induced lupus nephritis by regulating Th17 differentiation. *Int. J. Rheum. Dis.* *23*, 74–83.

Zhu, L.-J., Yang, X., and Yu, X.-Q. (2010). Anti-TNF- α Therapies in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010.

Zhuang, H., Szeto, C., Han, S., Yang, L., and Reeves, W.H. (2015). Animal Models of Interferon Signature Positive Lupus. *Front. Immunol.* 6.

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.

Zorro, S., Arias, M., Riaño, F., Paris, S., Ramírez, L.A., Uribe, O., García, L.F., and Vásquez, G. (2009). Response to ODN-CpG by B Cells from patients with systemic lupus erythematosus correlates with disease activity. *Lupus* 18, 718–726.

Caractérisation phénotypique et fonctionnelle du compartiment stromal des organes lymphoïdes au cours du lupus

Résumé

Les cellules stromales (CS) constituent l'architecture des organes lymphoïdes secondaires, tels que les ganglions lymphatiques (GL). Elles jouent un rôle essentiel dans le transport des antigènes, la régulation des cellules immunitaires ainsi que la tolérance périphérique. Sur le site d'une inflammation chronique, l'infiltration de cellules immunitaires peut conduire à la formation de structures lymphoïdes ectopiques fonctionnelles appelées Organes Lymphoïdes Tertiaires (OLT). Dans le Lupus Erythémateux Disséminé, une maladie auto-immune systémique, ces OLT participent aux réponses immunitaires locales et sont associés à la néphrite lupique. Cependant, le rôle des CS reste à déterminer dans les GL et les OLT au cours de la pathologie.

La caractérisation phénotypique des principales sous-populations de CS, dans les GL drainant les reins des souris NZB/W (modèle murin spontané de lupus), met en lumière le rôle de support de la réponse inflammatoire par le stroma. Nos données obtenues par cytométrie en flux ainsi que par séquençage d'ARN des CS mettent en évidence des modifications quantitatives et qualitatives associées à la maladie. L'analyse des OLT rénaux révèle un compartiment stromal fonctionnel potentiellement impliqué dans le maintien des réponses immunitaires locales. Notre étude présente les CS comme des acteurs de la réponse auto-immune et ouvre la voie vers de nouvelles pistes de recherche fondamentale et thérapeutiques.

Mot clés : Ganglions lymphatiques, stroma, lupus, Organes Lymphoïdes Tertiaires (OLT)

Résumé en anglais

Stromal cells (SC) form the architectural network of secondary lymphoid organs, such as lymph nodes (LN). They play an essential role in antigen transport, immune cell regulation, and peripheral tolerance. At the site of chronic inflammation, immune cell infiltrates can lead to the formation of functional ectopic lymphoid structures called Tertiary Lymphoid Organs (TLO). In Systemic Lupus Erythematosus (SLE) (an autoimmune disease) these TLO participate in local immune responses and are associated with lupus nephritis. However, the role of SC in LN and TLO remains to be elucidated in SLE.

The phenotypical characterization of the three major SC subsets in kidney-draining LN in NZB/W mice (a spontaneous mouse model of lupus) highlights the supportive role of SC in the inflammatory response. Flow cytometry analyses and transcriptomic profiles of the SC reveal quantitative and qualitative changes associated with the disease. Analysis of renal TLO shows a functional stromal compartment, potentially involved in the maintenance of local immune responses. Our study depicts SC as contributors to the autoimmune response and paves the way for new fundamental research and therapeutic approaches in SLE.

Key words: Lymph node, stroma, lupus, nephritis, Tertiary Lymphoid Organ (TLO)