

Présentée à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg
Faculté des Sciences de la Vie pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Louis Pasteur Strasbourg I

Discipline : Sciences du vivant

Domaine : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par Anne Woods

INFECTION ET AUTOIMMUNITÉ
« APPROCHES EXPERIMENTALES DES MECANISMES DE
RUPTURE DE LA TOLERANCE B LYMPHOCYTAIRE »

Soutenue publiquement le 2 avril 2007

Membres du jury

Directeur de thèse : Dr Anne-Sophie Korganow, Faculté de Médecine de Strasbourg

Rapporteur interne : Pr Jean-Luc Imler, IBMC à Strasbourg

Rapporteur externe : Pr Luc Mouthon, Hôpital Cochin à Paris

Rapporteur externe : Pr François Tron, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rouen

A Olive et Rémy,

Je voudrais en premier lieu remercier Messieurs Jean-Luc Imler, Luc Mouthon et François Tron pour avoir accepté de juger mon travail.

Je tiens également à exprimer ma gratitude aux professeurs Jean-Louis Pasquali et Thierry Martin pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe pendant ces quatre années...et des poussières. Ce fut une expérience très enrichissante et très formatrice.

Je souhaite également remercier le docteur Anne-Sophie Korganow pour sa constante présence et son aide précieuse dans les bons et les mauvais moments.

Tout le travail présenté dans ce manuscrit n'aurait pas été ce qu'il est sans le LIP ! Je remercie absolument tout le monde pour l'aide, l'aide et encore l'aide, l'expertise, les conseils, le soutien, la rigolade, les tours en voiture, les TGFF et les pinch-punch, les boîtes à chats, les chats, les déjeuners-piscine, les truffes, les barbecues... Je crois que vous vous serez tous reconnus. Bref un très grand merci pour tout ce que vous avez fait pour moi. Après vous, je ne serais plus la même !

Je dois également beaucoup au soutien de ma famille : petits et grands, français et anglais, vosgiens et mosellans, vieux et maladroits, jeunes et bêtes... Cette fois-ci c'est bien la dernière !

Je voudrais également remercier mes amis de la chorale pour tous ces moments partagés Dil Se.

Enfin, je tiens à remercier tout spécialement mon compagnon de thèse et dans la vie. Quelles trois belles années. Vivement la suite !

INTRODUCTION **1**

Avant propos **2**

Première partie : La tolérance B lymphocytaire **4**

I/Les différents modes de tolérance B lymphocytaire	5
A/L'édiction de récepteur	5
B/la délétion clonale	8
C/L'anergie	9
D/L'ignorance immunologique	10
II/La régulation de la tolérance	12
III/Conclusion	12

Deuxième partie : Les maladies autoimmunes : facteurs intervenant **14**

I/Classification des maladies autoimmunes	15
II/Les facteurs génétiques	16
A/Les gènes affectant la présentation ou la reconnaissance de l'antigène : les gènes du CMH	17
B/Les gènes qui contrôlent le répertoire thymique	17
1)AIRE	17
2)IDDM2	18
C/Les gènes qui modifient la clairance de l'Ag	19
1)Les gènes du complément	19
2)Les gènes codant pour les récepteurs Fc γ	19
D/Les gènes contrôlant l'activation lymphocytaire	20
1)CTLA-4 (<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen</i>)	20
2)PDCDI	21
3)PTPN22 (<i>protein tyrosine phosphatase non-receptor 22</i>)	21
III/ Les facteurs environnementaux	22
A/Les facteurs non infectieux	22
1)Les rayons ultraviolets	22
2)Les facteurs hormonaux	23
3)Les facteurs médicamenteux	24
B/Les facteurs infectieux	24
1)Données épidémiologiques	24
2)Hypothèses mécanistiques	25
a)Le mimétisme moléculaire	25
b)La libération d'Ag séquestrés	27
c)Les effets de l'interféron- α	28
d)L'activation lymphocytaire non spécifique	29
#L'effet superantigène	29
#L'activation polyclonale des LB	30
IV/Conclusion	32

Troisième partie : L'activation des récepteurs « Toll-like » : un lien possible entre infection et autoimmunité **33**

I/Les récepteurs « Toll-like »	34
II/L'activation des TLR participe au développement de l'autoimmunité induit par les infections	35
A/Les ligands TLR modifient l'activité suppressive des LT régulateurs	35
1)Inhibition directe de l'activité suppressive des LT CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD45RB ^{low}	36
2)Inhibition indirecte de l'activité suppressive des LT CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD45RB ^{low}	36
B/L'activation des TLR permet la stimulation de LB autoréactifs	36
1)Le modèle tg FR de Leadbetter	37
2)Le modèle de Lau	38
C/Les TLR influencent la réponse des cellules dendritiques	38
1)L'activation des TLR induit un effet adjuvant	38
2)L'activation des TLR induit une libération d'IFN- α par les cellules dendritiques	39
III/ Conclusion	40

PRESENTATION DU PROJET DE THESE	43
MATERIELS ET METHODES	48
I/Les souris tg et knock-out	49
II/Infection par le virus influenza	49
III/Infection par Bb et charge bactérienne	50
A/Choix de la souche et sensibilité des souris	50
B/Charge bactérienne	51
III/Stimulation in vitro des cellules dendritiques	51
IV/Blocage <i>in vivo</i> des cellules NK	52
V/Blocage <i>in vivo</i> de l'IL-4	52
VI/Quantification de l'AID	52
RESULTATS ET DISCUSSION	53
<u>Première partie : une infection peut-elle rompre la tolérance des LB FR Smi et Hul ?</u>	<u>54</u>
I/ L'infection chronique par <i>Borrelia burgdorferi</i> rompt l'ignorance de cellules B FR Smi et Hul	55
II/Conclusion et discussion	58
<u>Deuxième partie : un autre agent infectieux peut-il rompre la tolérance des LB FR Smi et Hul ?</u>	<u>59</u>
II/ L'infection par le virus influenza ne rompt pas la tolérance des cellules B FR Smi et Hul	60
III/Conclusion et discussion	62
<u>Troisième partie : La protéine adaptatrice MyD88 contrôle l'activation polyclonale des cellules B lors de l'infection par <i>Borrelia burgdorferi</i></u>	<u>63</u>
I/Rôle des TLR <i>in vivo</i> dans la rupture de la tolérance des LB FR Hul	64
II/ MyD88 contribue au contrôle négatif de l'hypergammaglobulinémie polyclonale induite par <i>Borrelia burgdorferi</i>	65
II/ Résultats complémentaires	68
A/ Rôle des cellules NK dans l'hypergammaglobulinémie des souris MyD88-/-	68
B/Le phénotype des souris MyD88-/- est-il lié à un défaut de la voie IL-1/IL-18	68
C/Comment expliquer le déséquilibre de la balance Th1/Th2 dans les souris MyD88-/-	69
1)Effet de l'absence de l'IL-12 sur l'hypergammaglobulinémie des souris MyD88-/-	69
2)Rôle de L'IL-4 dans l'hypergammaglobulinémie des souris MyD88-/-	70
D/Effet de MyD88 dans le switch	70
II/Conclusion et discussion	72
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	74
ANNEXES	79
BIBLIOGRAPHIE	83

Liste des abréviations

Ac : anticorps
ADNdb : ADN double brin
ADNsb : ADN simple brin
Ag : antigène
AID : activation induced deaminase, deaminase induite par l'activation
ARNdb : ADN double brin
ARNsb : ADN simple brin
AutoAg : autoantigène
Bb : *Borrelia burgdorferi*
BCR : B cell receptor, récepteur des cellules B
CI : complexes immuns
cIgG : immunoglobuline chimérique
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
DC : cellules dendritiques
DID : diabète insulino-dépendant ou diabète de type 1
EAE : encéphalomyélite autoimmune expérimentale
EBV : virus d'Epstein-Barr
FcγR : récepteur Fcγ
FR : facteur rhumatoïde
HA : hémagglutinine
HEL : *hen egg lysozyme*, lysozyme d'œuf de poule
ICE : enzyme de conversion des interleukines
IFN : interféron
Ig : immunoglobuline
IL : interleukine
IL-18R : récepteur de l'IL-18
IPEX : *immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*, syndrome lié à une mutation du gène *foxp3*
KI : knock-in
LB : lymphocyte B
LCMV : virus de la chorioméningite lymphocytaire
LED : lupus érythémateux disséminé
LPS : lipopolysaccharide
LT : lymphocyte T
MAI : maladie autoimmune
NOD : *non obese diabetic*
PLP : *proteolipid protein*, protéine encéphalitogène dérivée de la myéline
PR : polyarthrite rhumatoïde
SEP : sclérose en plaques
SnRNA : *small nuclear RNA*, petit ARN nucléaire
SnRNP : *small nuclear ribonucleoprotein*, petite ribonucléoprotéine nucléaire
Tg : transgénique
TLR : Toll-like receptor

INTRODUCTION

Les cellules B, formées dans la moelle osseuse, expriment un récepteur membranaire ou BCR (*B cell receptor*, ou récepteur de l'antigène, Ag) reconnaissant des Ag du soi (autoAg) et du non soi (Ag exogènes). Pour éviter le développement d'une réponse immunitaire autoréactive, il existe, au cours de l'ontogénie, des étapes de sélection négative qui soit éliminent physiquement les cellules B reconnaissant le soi, soit modifient leur réactivité et leur sensibilité vis-à-vis de l'autoAg.

Malgré l'existence de cette sélection négative, il subsiste des LB reconnaissant des autoAg chez le sujet sain. Notre laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années aux mécanismes pouvant expliquer ce maintien de cellules B autoréactives. Grâce à l'étude de modèles de souris transgéniques (tg) pour des FR, ces travaux ont permis, de confirmer l'existence d'un mode de tolérance particulier des cellules B FR qui permet le maintien des LB autoréactifs en périphérie dans un état de non réactivité vis-à-vis de l'autoAg différent de l'anergie : l'ignorance immunologique. Cet état reproduit assez fidèlement la situation des cellules B autoréactives du sujet sain.

La persistance de LB autoréactifs en périphérie soulève le problème d'une éventuelle rupture de la tolérance de ces cellules et de leur participation au déclenchement des maladies autoimmunes (MAI). Plusieurs facteurs ont été associés au développement des MAI et pourraient être à l'origine d'un échappement à la tolérance. Ils peuvent être d'origine génétique ou environnementale. C'est l'association de plusieurs de ces facteurs qui confère une susceptibilité au développement des MAI.

L'objectif de ce travail de thèse a été de comprendre plus particulièrement le rôle des infections dans la rupture de la tolérance, d'une part en essayant de déterminer si une infection peut rompre la tolérance de LB autoréactifs, comme cela pourrait se produire chez le sujet sain, et d'autre part en recherchant les mécanismes d'une telle rupture et en particulier le rôle des récepteurs Toll-like, impliqués depuis peu dans l'activation des LB autoréactifs.

Nous aborderons donc, tout d'abord, les mécanismes de la tolérance B lymphocytaire, identifiés grâce à des modèles de souris tg pour des immunoglobulines (Ig). Les différents modes de tolérance des LB et les modèles qui ont permis leur mise en évidence seront décrits dans la première partie de cette introduction.

Les facteurs génétiques et environnementaux intervenant dans le développement des MAI feront l'objet d'une analyse détaillée dans la deuxième partie de cette introduction.

Enfin, la troisième partie aura pour objet le rôle potentiel des récepteurs « Toll-like » dans le lien qui semble exister entre les MAI et les infections.

Première Partie:
La tolérance B lymphocytaire

La tolérance B lymphocytaire se définit comme l'ensemble des mécanismes permettant l'élimination ou le contrôle des lymphocytes B (LB) autoréactifs. Ces mécanismes ont été essentiellement abordés dans des modèles murins tg (Goodnow CG, Proc Nat Acad Sci, 1996). En effet, chez l'Homme, les populations de cellules autoréactives sont hétérogènes et difficiles à suivre. L'utilisation de modèles de souris tg pour un anticorps (Ac) donné permet d'étudier un répertoire connu et relativement restreint de LB ce qui facilite le suivi de ces cellules.

L'établissement de la tolérance nécessite que les LB autoréactifs passent, au cours de leur développement, par différentes étapes de sélection centrale et périphérique. Cette sélection dépend des propriétés de l'autoantigène (Ag, membranaire ou soluble, localisation topographique, valence), et de l'affinité du BCR.

Dans la moelle osseuse, les LB rencontrent un grand nombre d'Ag du soi. Les cellules B ne reconnaissant pas des antigènes du soi migrent vers la périphérie et les organes lymphoïdes secondaires. Les LB reconnaissant le soi sont, en revanche, soumis aux processus de tolérance. En fonction de leur affinité pour l'antigène, les cellules B autoréactives i) modifient la spécificité de leur BCR (édition de récepteur), ii) sont éliminées (délétion clonale), ou iii) deviennent anergiques (c'est-à-dire non réactives vis-à-vis de l'autoAg) et quittent la moelle osseuse. Les cellules B autoréactives échappant à cette sélection centrale, souvent en raison d'une affinité faible pour l'autoantigène, peuvent ensuite, dans certaines circonstances, tolérisées en périphérie.

I/ Les différents modes de tolérance B lymphocytaire

A/ L'édition de récepteur

L'édition de récepteur fut mise en évidence pour la première fois en 1989 grâce à un modèle tg de souris exprimant les gènes réarrangés codant pour les chaînes lourde et légère de l'anticorps (Ac) 3-83, qui reconnaît spécifiquement les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I murin: H-2K^k et H-2K^b. Lorsque le transgène est exprimé chez des animaux H-2K^d, la majorité des cellules B exprime l'immunoglobuline (Ig) 3-83 (repérée grâce à un Ac anti-idiotype dirigé contre l'Ig 3-83). Par contre, lorsque l'antigène est présent (souris H-2K^k ou H-2K^b), l'analyse en cytométrie en flux du phénotype des LB spléniques et ganglionnaires montre une forte réduction du pourcentage des cellules IgM⁺/3-83⁺ dans la rate et une disparition presque complète de ces cellules dans les ganglions.

Le pourcentage de LB 3-83 est en revanche normal dans la moelle osseuse. En périphérie, les cellules B tg expriment, en fait, une nouvelle chaîne légère, endogène. La disparition en périphérie des lymphocytes B exprimant 3-83 s'accompagne d'une augmentation de l'expression des protéines RAG 1 et RAG 2 dans la moelle osseuse et des produits d'excision provenant du réarrangement de la chaîne légère (Tiegs S, J Exp Med, 1993). Les LB tg réarrangent aussi leur BCR suite à la rencontre avec l'antigène (H-2K^{k,b}) dans la moelle osseuse et perdent leur autoréactivité. L'étude de souris tg murines exprimant l'Ac 3-83 uniquement dans le foie confirme que l'édition de récepteur des LB 3-83 se déroule dans la moelle osseuse. Dans ce modèle, les cellules B ne rencontrent pas l'Ag au niveau central et n'éditent pas leur BCR. La sélection se fait en périphérie par délétion des LB 3-83 (Tiegs S, J Exp Med, 1993).

L'édition de récepteur des LB 3-83 se déroule au stade immature de développement des LB. Ceci est démontré par Kong-Peng Lam décrit dans un modèle d'inversion de gènes chez la souris faisant appel à un système Cré-*loxP* inducible par l'interféron (IFN) de type I (IFN- α/β). Ce modèle permet de modifier la spécificité du BCR en périphérie. Deux gènes codant pour des régions variables réarrangées, VHB1-8 et VH3-83 sont insérés dans le locus IgH. Ces deux régions i) sont entourées de deux sites *loxP* orientés de manière opposée l'un par rapport à l'autre et ii) sont placées dans le locus IgH dans deux orientations inverses, de façon à ce que la région B1-8 soit exprimée en premier. Ces souris expriment également la région variable de la chaîne légère du BCR 3-83 et la recombinaison Cré. L'injection d'IFN de type I induit une inversion des deux gènes aboutissant à l'expression du VH 3-83, qui en s'associant au VK3-83 forme un BCR autoréactif. Lorsque le BCR 3-83 est ainsi rendu autoréactif en périphérie, les LB 3-83 sont immédiatement éliminés (Lam K-P, Proc Nat Acad Sci, 1998). De plus, *in vitro*, seules les cellules B 3-83 immatures IgM+/IgD- répondent à une stimulation du BCR 3-83 avec un Ac anti-idiotype, par un réarrangement de la chaîne légère (Hertz M, Immunity, 1998).

Le second modèle ayant permis la mise en évidence de l'édition de récepteur est le modèle murin tg décrit par Denise Gay et son équipe en 1993 (Gay D, J Exp Med, 1993). Ces souris tg expriment la chaîne lourde et la chaîne légère d'un Ac anti-ADN provenant d'une souris MRL/lpr, portant une mutation dite lpr sur les deux allèles du gène Fas inactivant ce gène et qui développe une atteinte auto-immune proche du lupus érythémateux disséminé (LED) et un syndrome lymphoprolifératif. Cet Ac muté, appelé 3H9, reconnaît l'ADN simple brin, l'ADN

double brin et la cardiolipine. Malgré une expression normale des deux chaînes tg (observée chez des animaux n'exprimant que la chaîne lourde ou que la chaîne légère tg), l'Ac 3H9 n'est pas détectable en périphérie. Toutefois, le nombre de cellules B est normal chez la souris tg adulte, excluant une délétion des LB tg. L'analyse moléculaire du BCR présent à la surface des cellules B périphériques chez ces animaux montre une expression d'une chaîne légère endogène (Gay D, J Exp Med, 1993). Les mêmes résultats sont obtenus dans un modèle de souris n'exprimant que la chaîne lourde de l'Ac 3H9. Dans ce modèle, la chaîne lourde 3H9 est capable de s'associer à différentes chaînes légères endogènes et de former des Ac de spécificité variée capables pour certains de reconnaître l'ADNdb. Pourtant, aucun Ac 3H9 capable de reconnaître l'ADN double-brin n'est détecté (Radic M., J Exp Med, 1993). L'importance de l'édition de récepteur dans la tolérance des cellules B 3H9 est confirmée par l'étude de souris tg 3H9 H/L sur fond RAG2^{-/-}. Chez ces souris, les cellules B autoréactives ne peuvent pas éditer un second BCR du fait de l'absence de RAG2 et sont éliminées par apoptose (Xu H, J Exp Med, 1998).

Dans ces deux modèles, seule une partie des cellules B perd son autoréactivité suite à l'édition du BCR. L'autre partie est éliminée parce qu'elle ne peut réarranger efficacement les gènes du BCR. Ceci a longtemps conduit à envisager l'édition de récepteur comme un mode de tolérance parmi d'autres. En réalité, dans les modèles tg classiques le réarrangement secondaire des gènes d'Ig est rendu impossible en raison de l'insertion du tg au hasard dans le génome. Dans ces modèles, l'édition de récepteur est sous-estimée par rapport aux autres modes de tolérance.

L'insertion de manière ciblée (ou *knock-in*, KI) des tg IgH et IgL dans les loci des gènes des Ig, a permis de préciser l'importance de l'édition de récepteur dans la tolérance centrale des LB puisqu'elle permet un réarrangement physiologique des Ig tg capable d'éliminer efficacement des BCR autoréactifs. L'étude de ces modèles KI montre que l'édition de récepteur est en fait le mode de tolérance centrale des LB le plus fréquent (Pelanda R, Immunity 1997). Ainsi, dans les souris knock-in pour les chaînes lourdes et légères de l'Ac anti-CMH-I 3-83, le taux de réarrangement secondaire du BCR anti-H-2K^{k,b} est de presque 100% (Halverson R, Nat Immunol 2004 et Pelanda R., Immunity, 1997) alors que dans le modèle tg 3-83 classique, la délétion reste le mode de tolérance majoritaire. De même, l'étude de souris KI pour la chaîne légère de l'Ac anti-HEL réévalue l'importance de l'édition de récepteur dans ce modèle. En effet, lorsque ce KI est exprimé en présence de l'Ag HEL

membranaire (affinité forte pour l'Ac anti-HEL), le premier mode de tolérance des LB autoréactifs est l'édition de récepteur. Lorsque le KI est mis en présence de l'Ag HEL sous forme soluble (affinité faible pour le BCR anti-HEL), la moitié des cellules autoréactives éditent un nouveau BCR et l'autre moitié est rendue anergique (Hippen, K, J Immunol, 2005). L'édition de récepteur est donc le mode de tolérance principal des cellules B immatures lorsqu'elles reconnaissent un autoAg avec une forte ou avec une faible affinité. Toutefois, elle n'est pas restreinte aux modèles tg : dans un modèle de souris exprimant de manière ubiquitaire un autoAg synthétique (Ac composé de régions variables reconnaissant la région constante de la chaîne légère des Igκ de souris et de la région constante d'une IgG1 de rat, et construit pour être exprimé à la membrane), les cellules B immatures exprimant une Igκ, qui sont donc capables de se lier à l'autoAg synthétique anti-Igκ, réarrangent leur BCR. Ainsi, en périphérie, toutes les cellules B expriment une Igλ (Aït-Azzouzene D, J Exp Med, 2005).

B/La délétion clonale

L'analyse de plusieurs modèles tg classiques exprimant des Ig montre que les cellules B autoréactives peuvent être délétées après avoir rencontré leur autoAg (Tiegs S, J Exp Med, 1993, Okamoto M, J Exp Med, 1992). En réalité, ces modèles sous-estiment l'importance de l'édition de récepteur ainsi que nous l'avons évoqué plus haut. L'étude de modèles KI pour des Ig montre qu'en fait la délétion clonale n'intervient que lorsqu'une cellule B ayant un BCR de forte affinité pour un autoantigène souvent membranaire est incapable d'édition un nouveau BCR non autoréactif, lorsque le BCR réarrangé n'est pas exprimé (non-sens des gènes réarrangés) ou lorsque le réarrangement secondaire aboutit à l'expression d'un nouveau BCR autoréactif. L'interaction de la cellule B avec l'autoAg induit l'expression de la protéine Bim (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*) qui inhibe la survie des LB induite par les protéines de la famille Bcl-2 (Strasser A, Immunol.Rev, 2003). Ceci aboutit à l'apoptose de la cellule B, un à deux jours après l'arrêt de son développement.

Enfin, les LB autoréactifs peuvent être éliminés en périphérie par compétition folliculaire. Il a été démontré que ces cellules entrent en compétition avec les cellules B non autoréactives pour l'entrée dans les follicules lymphoïdes. La liaison continue avec l'autoAg semble réduire la capacité des cellules B autoréactives à répondre aux facteurs trophiques et chemoattractifs produit au niveau des follicules au profit des LB naïfs. Ainsi exclues des follicules, ces cellules meurent en quelques jours (Cyster JG, Nature, 1994, Cyster JG, Immunity, 1995).

C/L'anergie

Le troisième mode de tolérance des LB autoréactifs est l'anergie. Elle survient lors de la rencontre d'un LB avec un autoantigène de faible affinité, sans essai préalable d'édition de récepteur (Hippen K, J Immunol 2005). Elle fut surtout étudiée dans des modèles murins tg pour des Ig. Ainsi, dans le modèle HEL/anti-HEL, le croisement de souris exprimant l'IgH et l'IgL réarrangées d'un Ac anti-HEL (MD4) avec des souris exprimant la protéine HEL soluble (ML5) induit une anergie des cellules B anti-HEL (Goodnow C, Nature 1988). De même, des cellules B tg exprimant des autoAc anti-ADN simple brin (ADNsb, Erikson J, 1991, Nature), anti-Smith (Sm, Borrero M, J Immunol, 2002), anti-insuline (Rojas M, J Immunol, 2001) ou exprimant des FR (Wolfowicz CB, Clin Immunol Immunopathol, 1988) ou issues du modèle Ars/A1 (Benschop RJ, Immunity, 2001) sont anergiques en périphérie.

L'anergie est un état de tolérance réversible et nécessite une exposition constante à l'autoAg (Gauld SB, Nat Immunol, 2005). Elle se caractérise par une modification du seuil d'activation du BCR liée d'une part à une diminution de l'expression de l'IgM membranaire (Bell SE, EMBO J, 1994) et d'autre part à un défaut dans la voie de signalisation du BCR (Cooke MP, J Exp Med, 1994). Ce dernier serait dû à un rétrocontrôle négatif exercé sur les voies de signalisation du BCR et passant par SHIP-1 (Gauld SB, Curr Opin Immunol, 2006). En raison de la diminution de la sensibilité du BCR, ces cellules ne sont pas stimulables par un Ag T-indépendant (Cooke MP, J Exp Med, 1994). Ces cellules sont néanmoins activables par un Ag T-dépendant si la stimulation de BCR est suffisante pour compenser la diminution de l'expression de l'IgM membranaire et le défaut dans la signalisation du BCR (Cooke MP, J Exp Med, 1994, Rathmell JC, J Exp Med, 1998). Si ce n'est pas le cas, l'interaction avec une cellule T spécifique conduit à l'apoptose de la cellule B anergique (Rathmell JC, Nature, 1995, Ho WY, J Exp Med, 1994).

Les cellules B anergiques ont également une durée de vie réduite comparée à celle d'un LB naïf. Dans le modèle tg HEL/sHEL, les cellules B doubles tg anergiques survivent 2 à 3 jours contre 5 à 6 semaines pour les LB non tg (Fulcher DA, J Exp Med, 1994). Le mécanisme de cette réduction de la durée de vie des LB anergiques n'est pas encore élucidé, mais pourrait impliquer BAFF (*B cell activation factor*, ou BlyS pour *B lymphocyte stimulator*), facteur d'activation des LB appartenant à la famille du TNF (*tumor necrosis factor*) dont le rôle dans la survie des LB a récemment été démontré (Moore PA, Science 1999, Schneider P, J Exp Med, 1999). L'étude du modèle tg HEL/antiHEL montre en effet que la survie des cellules B matures liant l'Ag Hel dépend plus de BAFF que celle des LB matures naïfs (Lesley R,

Immunity, 2004). Ainsi, en présence d'une quantité limitée de BAFF, les cellules B autoréactives seront plus vite éliminées que les autres, rendant ainsi moins probable une rupture de la tolérance de ces cellules. Ceci pourrait expliquer i) que BAFF ait été associé au développement d'atteintes autoimmunes chez la souris (Zhang M, *Int Immunol*, 2005, Stohl W, *Arthritis Rheum*, 2005), ii) que les souris tg pour BAFF développent une glomérulonéphrite accompagnée d'une production d'Ac anti-ADN et de FR (Mackay F, *J Exp Med*, 1999) et iii) que l'on ait mesuré une élévation des taux sériques de BAFF corrélée à la production d'autoAc chez des patients atteints de LED, de PR ou du syndrome de Sjögren (Pers JO, *Ann N Y Acad Sci*, 2005).

Une étude récente identifie dans le répertoire de souris sauvages, grâce à l'analyse de différents modèles de souris tg pour des Ig dont les LB développent ou non une anergie, une population splénique de cellules B présentant toutes les caractéristiques de LB anergiques et qui avait été identifiée au départ comme une population de LB transitionnels (T3) (Allman D, *Proc Nat Acad Sci*, 2001). Ces cellules, de phénotype B220⁺CD93⁺IgM⁻CD23⁺ montrent, tout comme des cellules B anergiques, une diminution de l'expression de l'IgM membranaire mais pas de l'IgD, un défaut de la signalisation du BCR et une demi-vie réduite. Elles ne prolifèrent pas et ne s'activent pas suite à une stimulation du BCR. Une grande proportion de ces cellules sont autoréactives. Etant donné la fréquence et la demi-vie de ces cellules, il semblerait que 50% des LB formés dans la moelle osseuse sont destinés à devenir anergiques et donc que l'anergie serait le principal mode de tolérance des LB autoréactifs (Merrell KT, *Immunity*, 2006). En raison du caractère réversible de l'anergie, ces cellules constitueraient ainsi une source potentielle non négligeable de LB autoréactifs en périphérie.

D/L'ignorance immunologique

Dans certains modèles tg autoréactifs exprimant des Ig, des LB autoréactifs sont détectés en périphérie malgré la présence de l'autoAg. Ces cellules ne réagissent pas à la présence de l'autoAg, mais ne sont pas anergiques. Elles sont « immunologiquement ignorantes ». C'est le cas des cellules FR du modèle tg AM14. Ces souris furent décrites en 1993 par l'équipe de Mark Shlomchick (Shlomchik MJ, *Int Immunol*, 1993). Elles expriment un FR (Ig reconnaissant spécifiquement les IgG) murin provenant de souris autoimmunes MRL/lpr. Le FR AM14 reconnaît spécifiquement la région constante d'IgG2a d'allotype « a » (Jacobson BA, *J Immunol* 1994), ce qui permet de contrôler la présence l'Ag en croisant les animaux tg AM14 avec des animaux de fond génétique d'allotype « a » (autoAg présent) ou d'allotype

« b » (autoAg absent). Les transgènes des chaînes lourde et légère du FR AM14 sont bien exprimés et empêchent l'expression des chaînes lourdes et légères endogènes. Les LB FR AM14 ne sont pas éliminés et sont présents en périphérie puisque le nombre de ces cellules est le même que l'autoAg soit présent (fond BALB/c, allotype « a ») ou non. Néanmoins, chez les souris exprimant l'autoAg, et malgré la présence en périphérie des cellules B FR AM14, les concentrations sériques de FR AM14 sont faibles, suggérant une anergie des LB tg (Shlomchik MJ, *Int Immunol*, 1993), c'est-à-dire une incapacité de ces cellules à répondre à une stimulation par BCR. L'analyse plus précise de la fonctionnalité des cellules B FR AM14 montre qu'en réalité elles ne sont pas anergiques. En effet, elles ne présentent pas de diminution de l'expression du BCR comme les cellules anergiques, et répondent normalement à une immunisation par le trinitrophényl (TNP), même lorsque l'autoAg est présent (Hannum LG, *J Exp Med*, 1996).

Deux autres modèles tg FR ont été développés au laboratoire avant mon arrivée et confirment l'existence de ce nouveau mode de tolérance (Koenig-Marrony S, *J Immunol*, 2001, Soulas P, *Eur J Immunol*, 2002, Julien S, *J Immunol*, 2002). Les FR utilisés ici sont des FR chimériques à régions variables humaines et à région constante murine, reconnaissant la région constante des IgG humaines.

Dans le premier modèle, Smi, les souris expriment un FR de type naturel, polyréactif, reconnaissant notamment l'ADNsb, les IgG humaines, la myoglobine et la thyroglobuline et de faible affinité, appelé Smi. Malgré la présence de l'ADNsb reconnu par le FR Smi, les cellules B FR Smi ne sont pas délétées, ne sont pas activées et ne sécrètent que peu d'Ac tg. L'introduction d'un nouvel Ag en périphérie (IgG ou myoglobine humaines injectées en intraveineuse) ne modifie pas l'état des cellules B FR Smi. Ces cellules ne sont toutefois pas anergiques puisque *in vitro*, malgré leur non réactivité vis-à-vis des IgG humaines, elles prolifèrent, s'activent et sécrètent des FR lorsqu'elles sont mises en présence de stimuli BCR-dépendant (anti-IgM de souris) et indépendant (LPS). L'expression du BCR FR sous forme IgM seule ou IgM et IgD ne modifie pas le phénotype des cellules B FR Smi (Koenig-Marrony S, *J Immunol*, 2001). L'introduction des IgG humaines au niveau central (croisement avec des souris KI pour les IgG chimériques (cIgG) à région constante humaine et à régions variables murines (Zou YR, *Curr Biol*, 1994) induit une augmentation des cellules B FR Smi. Cette sélection positive des cellules B FR Smi n'existe pas chez les souris exprimant le FR Smi sous forme IgM seule et elle est spécifique du BCR. Néanmoins, ces

cellules restent ignorantes vis-à-vis de l'autoAg introduit (cIgG) mais non anergiques (Julien S, J Immunol, 2002). La sélection positive des cellules FR Smi pourrait expliquer la forte fréquence de cellules FR polyréactives et de faible affinité chez le sujet sain.

Dans le second modèle, Hul, les souris tg expriment un FR monoréactif reconnaissant les IgG humaines avec une forte affinité. Les cellules B FR Hul sont partiellement délétées lorsque le FR Hul est exprimé sous forme IgM seule. L'expression de l'IgD protège les cellules B FR Hul de la délétion. L'introduction de l'autoAg (IgG humaines) en périphérie ne modifie pas l'ignorance des LB FR Hul. Elle n'induit ni prolifération, ni activation, ni sécrétion de FR par les LB FR Hul. Ces cellules ne sont pas, elles non plus, anergiques et restent activables *in vitro* par des stimuli BCR dépendant (anti-IgM de souris) et indépendant (LPS) (Soulas P, Eur J Immunol, 2002). L'introduction des IgG humaines au niveau central ne modifie pas l'ignorance des cellules B FR Hul. Ces résultats obtenus par Pauline Soulas-Sprauel seront décrits plus loin, dans la partie « résultats » (article 1).

II/La régulation de la tolérance

Différentes molécules qui participent à la régulation de la tolérance ont été mises en évidence grâce à l'étude de modèles murins déficients pour certaines protéines et développant des MAI (quelques exemples sont présentés dans le tableau 1). Elles interviennent à plusieurs niveaux sur l'activation des LB autoréactifs. Ce sont :

- #des protéines intervenant sur l'intensité du signal intracellulaire induit par la stimulation du BCR. Celles-ci peuvent avoir un effet activateur (augmentation de l'intensité du signal) ou inhibiteur (diminution de l'intensité du signal) ;
- #des protéines qui influencent la survie des LB tolérants, comme BAFF par exemple, qui favorise la survie cellulaire ou au contraire Bim qui favorise l'apoptose ;
- #des protéines modulant la clairance de l'Ag (protéines du complément) ;
- #des protéines que permettent l'élimination des corps apoptotiques.

III/Conclusion

La tolérance est donc assurée au niveau central et périphérique surtout grâce à l'édition de récepteur et à la délétion des cellules B autoréactives, mais elle fait aussi intervenir l'anergie et l'ignorance immunologique. Le mode de tolérance choisi par le LB dépend d'un certain nombre de facteurs : i)l'affinité du BCR pour l'autoAg, ii)le stade de développement au cours

duquel le LB autoréactif rencontre l'autoAg et iii) l'existence de signaux de costimulation fournis au LB par les cellules présentatrices de l'Ag et les LT.

Il existe d'autre part chez le sujet sain des cellules B faiblement autoréactives produisant des autoAc dits « naturels ». Ces derniers sont en général polyréactifs et semblent jouer un rôle dans la réponse immédiate aux infections (Lacroix-Desmazes S, *J Immunol Meth*, 1998, Coutinho A, *Curr Biol*, 1995). Aucun lien n'a été établi pour l'instant entre ces cellules et les LB anergiques ou ignorants ou entre les autoAc naturels qu'elles sécrètent et les autoAc pathogènes associés aux MAI.

Ainsi, des LB autoréactifs persistent chez le sujet sain. La présence de ces LB autoréactifs en dehors de tout contexte de MAI soulève la question de leur contrôle et des mécanismes susceptibles d'aboutir à leur transformation en cellules pathogènes, c'est-à-dire des événements qui permettent de passer d'une autoréactivité « physiologique » à une autoimmunité. Cette dernière question fait l'objet de ce travail de thèse et des éléments de réponse seront évoqués dans la troisième partie de cette introduction.

Deuxième Partie :
Maladies autoimmunes :
Les facteurs intervenants

Les maladies autoimmunes (MAI) sont des atteintes chroniques qui résultent de la rupture de la tolérance des LB et des LT vis-à-vis des antigènes du soi. Elles touchent environ 5% de la population dans les pays occidentaux (Ulmanen I, Curr Opin Immunol, 2005). Les MAI les plus fréquentes sont : la polyarthrite rhumatoïde (PR), la maladie de Graves (ou maladie de Basedow), le diabète de type 1 (ou diabète insulino-dépendant, DID), l'anémie de Biermer, le lupus érythémateux disséminé (LED) et la sclérose en plaques (SEP). A elles seules, ces six atteintes représentent 50% de toutes les MAI (Wandstrat A, Nature Immunol, 2001).

I/Classification des maladies autoimmunes

Ces pathologies peuvent être classées en fonction de différents paramètres.

#MAI spécifique d'organe/ MAI systémique

Cette classification s'appuie sur des critères cliniques. Les MAI spécifiques d'organe ont, comme leur nom l'indique, une expression clinique limitée à un organe. C'est le cas de la polymyosite et de la SEP par exemple. Les MAI systémiques, quant à elles, affectent plusieurs organes. Le LED fait partie de cette catégorie de MAI (tableau 2).

#MAI humorale/ MAI cellulaire

Les MAI se différencient également en fonction de l'origine des lésions observées au cours de ces atteintes. Celles-ci sont les conséquences d'une réponse immunitaire humorale ou cellulaire. Dans la première catégorie, les lésions sont secondaires à la présence d'autoAc pathogènes, comme dans l'anémie hémolytique autoimmune (Naparstek Y, Annu Rev Immunol, 1993). Dans la seconde catégorie, en revanche, ce sont les LT qui participent aux lésions. C'est probablement le cas, par exemple, de la sclérose en plaques (Steinman L, Cell, 1996) et du diabète de type 1 (Hutchings P, Eur J Immunol, 1992, Wong FS, J Exp Med 1996, Haskins K, Science 1990).

Aujourd'hui, l'étude de modèles animaux a pour objectif de déterminer les mécanismes de la rupture de la tolérance et du déclenchement des MAI. Elle a déjà permis de comprendre que les MAI ont une origine multifactorielle qui implique à la fois de facteurs génétiques propres à chaque individu et de facteurs environnementaux (figure 1). Ces facteurs influencent la présentation et l'expression de l'Ag, la réactivité des cellules immunitaires à cet autoAg ainsi que la réponse des tissus cibles.

II/Les facteurs génétiques

Plusieurs éléments suggèrent un rôle important des gènes dans la prédisposition aux MAI. Par exemple, le taux de concordance de ces maladies entre jumeaux monozygotes est plus élevé qu'entre des jumeaux dizygotes ou qu'entre les membres d'une même fratrie (tableau 3).

Il existe quelques MAI **monogéniques**, comme le syndrome APECED (*autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy*) ou APS-1 (*autoimmune polyendocrinopathy syndrome-1*), lié à une mutation du gène *aire* codant pour un facteur de régulation de la transcription, qui régule l'expression thymique de certains antigènes. Le syndrome IPEX (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*) est un autre exemple de MAI monogénique. Les patients qui le développent ont une mutation du gène *foxp3*, qui code pour un facteur de transcription spécifique des LT régulateurs CD4+CD25+ (Bennett CL, Nature Genet, 2001). Il existe aussi des modèles murins reproduisant des MAI monogéniques. Par exemple, la souris Scurfy, déficiente pour le gène *foxp3*, développe une atteinte autoimmune proche du syndrome IPEX (Fontenot JD, Nature Immunol, 2003). D'autres souris déficientes (*knock-out*, KO) ou tg pour une protéine présentent des signes d'atteinte autoimmune ou produisent des autoAc et ont permis de mettre en évidence certains gènes de susceptibilité aux MAI (quelques exemples sont présentés dans le tableau 1). Toutefois, ces modèles murins sont assez artificiels. Ils ne reproduisent pas forcément un défaut génétique présent chez l'Homme, développent généralement le même type d'atteinte autoimmune (en général une glomérulonéphrite membrano-proliférative) et produisent les mêmes autoAc (souvent des anti-ADN).

La plupart des MAI sont **multigéniques** ; leur développement dépend de la présence de plusieurs gènes de susceptibilité et de l'interaction entre ces gènes. Certains modèles animaux montrent que le développement d'une atteinte autoimmune peut dépendre de l'association de nombreux gènes. Le développement d'une encéphalomyélite autoimmune, par exemple, est associé à la présence d'une dizaine de loci de susceptibilité différents (Wandstrat A, Nat Immunol, 2001), une vingtaine chez la souris NOD (Maier LM, Curr Opin immunol, 2005). On peut ainsi parler de terrain génétique favorable au développement des MAI. Ceci explique probablement pourquoi, dans une famille au sein de laquelle plusieurs personnes sont atteintes de MAI, tous les individus atteints ne développent pas la même MAI.

Nous allons maintenant évoquer quelques gènes associés au développement des MAI. Ces gènes interviennent dans : la présentation de l'Ag, la régulation de la tolérance des LT, la régulation de la réponse immunitaire cellulaire et la clairance de l'Ag.

A/Les gènes affectant la présentation ou la reconnaissance de l'antigène : les gènes du CMH

Dans la plupart des MAI, on retrouve une susceptibilité liée à la présence de certains allèles du CMH (tableau 4). L'importance de cette association est variable selon les MAI. Chez l'Homme, la prédisposition génétique liée au CMH est de 42% pour le diabète de type 1 et de seulement 15% pour la SEP.

Il est difficile d'établir avec certitude l'association entre une MAI et un allèle du CMH. D'une part, parce que cette association **varie selon les populations étudiées**. Par exemple, les allèles de classe II du CMH DRB10401 et DRB10404 sont associés au développement de la PR en Europe du Nord (Gregersen PK, Arthritis Rheum, 1987) mais pas chez les populations américaines hispaniques (Teller K, J Rheumatol, 1996). D'autre part, parce qu'il existe des **déséquilibres de liaison** entre les différents allèles du CMH. Ces allèles ne sont, en effet, pas associés au hasard. Il existe certaines combinaisons qui sont favorisées par rapport à d'autres. C'est le cas par exemple de l'haplotype A1-B8-DR3-DQ2 qui s'exprime chez 7,7% des Norvégiens alors que cette fréquence devrait être de 0,3% si l'on considère les fréquences de chacun des allèles le constituant (Thorsby E, Transplant Immunol, 2005). Ainsi, certains allèles du CMH, identifiés comme des allèles de susceptibilité, ne sont fréquemment associés à des MAI que parce qu'ils s'expriment préférentiellement avec un autre gène du locus du CMH qui est, quant à lui, bien impliqué dans la susceptibilité aux MAI.

L'association des gènes du CMH de classe II aux MAI suggère un rôle de la présentation de l'Ag aux LT dans la physiopathologie de ces maladies. Les différents allèles du CMH de classe II pourraient ainsi présenter l'Ag différemment et influencer ainsi la sélection centrale des cellules T autoréactives dans le thymus, mais aussi leur activation en périphérie (Christen U, Curr Opin Immunol, 2004). Ceci n'a toutefois pas été directement démontré.

B/Les gènes qui contrôlent le répertoire thymique

1)AIRE (pour *autoimmune regulator*)

La protéine AIRE est un facteur de transcription exprimé dans le thymus et les ganglions lymphatiques (Rizzi M, Autoimmun Rev, 2006). Chez l'Homme, certains variants de AIRE sont associés à l'apparition du syndrome autoimmun polyendocrinopathique (APECED)

(Peterson P, Immunol Today 1998). L'étude du modèle murin déficient pour Aire, qui développe lui aussi une atteinte autoimmune affectant de nombreux organes, a permis de démontrer que la protéine Aire régule l'autoimmunité en contrôlant l'expression thymique de différents Ag du soi également présents en périphérie. Son absence entraîne un défaut dans la tolérance des LT vis-à-vis de ces Ag (Anderson MS, Science 2002). Ainsi, une étude menée en 2006 montre que l'uvéite autoimmune induite chez la souris en l'absence de Aire cible un autoAg unique de l'œil et exprimé dans le thymus sous le contrôle de Aire. L'expression de cet Ag dans le thymus de souris Aire^{-/-} suffit à empêcher l'uvéite autoimmune (De Voss J, J Exp Med, 2006).

2)IDDM2

Ce locus de susceptibilité au développement du DID se situe au niveau des régions VNTR (*variable number tandem repeat*) en 5' du gène de l'insuline (*INS*) (Bennett ST, Nat Genet, 1995). Il contrôle l'expression de l'insuline et de la pro-insuline dans le thymus et dans le pancréas (Pugliese A, Nat Genet, 1997, Vafiadis P, Nat Genet, 1997).

L'insuline constitue un antigène majeur ciblé au cours de la réaction autoimmune dirigée contre les îlots β du pancréas chez la souris NOD (*non obese diabetic*), modèle murin développant spontanément un diabète insulino-requérant (Wegmann DR, Eur J Immunol, 1994). L'étude de souris NOD déficientes pour la pro-insuline 2 (une des deux isoformes de la pro-insuline murine, exprimée dans le thymus et le pancréas, souris *Ins2^{-/-}*) montre un développement accéléré du DID, une augmentation de la capacité de transfert du DID par injection de cellules spléniques suggérant un rôle probable des LT dans l'accélération de la maladie et une production d'Ac dirigés contre l'insuline. En fait, l'absence de la pro-insuline-2, induit une modification du répertoire des LT aboutissant à l'apparition d'une population T autoréactive spécifique d'un peptide commun aux deux formes de l'insuline présentes chez la souris. L'expression de la pro-insuline 2 dans le thymus semble donc contrôler la sélection de ces LT autoréactifs (Thébault-Baumont K, J Clin Invest, 2003). De même, dans un modèle de souris pour lequel il est possible de contrôler l'expression thymique de l'insuline (l'expression pancréatique restant par ailleurs inchangée), les souris exprimant l'insuline faiblement dans le thymus développent une réponse contre l'insuline en périphérie. Aucune réponse n'est détectée chez des souris qui ont une expression thymique de l'insuline normale (Chentoufi A, Diabetes, 2002).

C/Les gènes qui modifient la clairance de l'Ag

1)Les gènes du complément

Le défaut de certains des composants de la cascade du complément, en particulier C1q a été associé au développement du LED. Le degré de pénétrance de la maladie chez l'Homme, dans le cas d'une déficience homozygote du C1q, atteint 90% (Gebrehiwet B, Curr Dir Autoimm, 2004). La souris déficiente pour le C1q (C1q^{-/-}) développe une atteinte autoimmune de type lupique caractérisée par la production d'Ac anti-nucléaires et par une glomérulonéphrite. Ces souris présentent également une augmentation du nombre de corps apoptotiques (Botto M, Nat Genet, 1998). L'étude de la phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages chez ces souris montre que celle-ci est réduite en l'absence du C1q. Ce même défaut est présent chez des patients déficients pour le C1q (Taylor PR, J Exp Med, 2000). Les corps apoptotiques expriment à leur surface de nombreux autoAg ciblés au cours du LED et pourraient favoriser le déclenchement d'une réponse autoimmune contre ces autoAg conduisant au développement d'un LED s'ils sont mal éliminés, comme cela semble être le cas au cours d'un déficit en C1q.

Des défauts homozygotes d'autres éléments de la cascade du complément, comme les protéines C4 et C2, ont été associés au LED. La pénétrance de ces défauts est comparable au C1q pour le C4 mais plus faible pour le C2. Ainsi, parmi les patients présentant un défaut homozygote pour le C2, un tiers sont atteints de LED (Manderson, AP, Annu Rev Immunol, 2004).

2)Les gènes codant pour les récepteurs Fcγ

Les récepteurs Fcγ (FcγR) reconnaissent la région constante (fragment Fc) des IgG avec une affinité variable selon le type de récepteur. Ils sont, chez l'Homme, au nombre de six : les récepteurs activateurs, FcγRI (forte affinité pour les IgG), FcγRIIa, FcγRIIc (faible affinité pour les IgG), Fcγ RIIIa (affinité intermédiaire pour les IgG) et FcγRIIIb et le récepteur inhibiteur, FcγRIIb (Salmon J, Arth Rheum, 2001). Certains variants des gènes codant pour les FcγR de faible affinité pour les IgG, en particulier ceux qui codent pour le FCγRIIA et FCγRIIIA, ont été associés au LED (Karassa FB, Arthritis Rheum, 2002, Zuniga R, Arthritis Rheum, 2001, Edberg JC, Arthritis Rheum, 2002). Ceci pourrait s'expliquer par le rôle de ces récepteurs dans la clairance des complexes immuns (CI) renfermant des IgG. En effet, certains variants des gènes FcγR retrouvés chez des patients lupiques correspondent à des récepteurs Fcγ d'affinité réduite pour les IgG (par rapport à d'autres variants non associés au

LED) et qui ont donc une capacité réduite à éliminer les CI (Salmon JE, Arthritis Rheum, 2001, Wu J, J Clin Invest, 1997, Zuniga R, Arth Rheum, 2003).

D/Les gènes contrôlant l'activation lymphocytaire

Nous avons choisi de présenter ici trois gènes régulant l'activation lymphocytaire au cours de la réponse immunitaire et pour lesquels l'association avec une ou des MAI est bien démontrée (figure 2). D'autres gènes susceptibles d'agir sur l'activation lymphocytaire semblent associés au développement de MAI : par exemple, le gène *IL2RA/CD25* codant pour la chaîne α du récepteur de l'IL-2 (Wicker LS, J Autoimmun, 2005), et la famille des gènes *TIM* qui codent pour des protéines exprimées par les cellules Th1 et Th2 (Kuchroo VK, Nat Rev Immunol, 2003).

1)CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen*)

CTLA-4 est exprimé par les LT. C'est un régulateur négatif de l'activation de ces cellules qui entre en compétition avec son homologue structural CD28 pour l'interaction avec CD80 (B7.1) et CD86 (B7.2) présents sur les cellules présentatrices de l'Ag.

Des variants polymorphiques du gène codant pour CTLA-4 ont été associés à de nombreuses MAI médiées par les LT. C'est le cas par exemple de la maladie de Graves (ou maladie de Basedow), atteinte de la thyroïde d'origine autoimmune se caractérisant par une hypersécrétion d'hormones thyroïdiennes (Kotsa K, Clin Endocrinol (Oxf), 1997, Yanagawa T, Thyroid, 1997, Vaidya B, Hum Mol Genet, 1999). Ainsi, l'équipe de Hironori Ueda montre qu'il existe chez 63,4% des patients atteints de la maladie de Graves un polymorphisme particulier du gène codant pour CTLA-4 (CT60 : A/G ou G/G), présent dans la région 2q33. Ce polymorphisme n'est présent que chez 53% des cas contrôles (Ueda H, Nature 2003). Dans cet exemple, le variant du gène CTLA-4 est associé à une diminution de la sécrétion de CTLA-4 soluble, réduisant ainsi l'occupation des molécules CD80 et CD86 et permettant une activation plus importante des cellules T par CD28 (Ueda H, Nature 2003). Le rôle du CTLA-4 soluble n'est cependant pas clair puisqu'une autre étude montre que la quantité de CTLA-4 soluble est augmentée chez des patients atteints de thyroïdite autoimmune (Oaks MK, J Immunol, 2000). D'autres mécanismes de dérégulation de l'activation des LT par les variant de CTLA-4 sont envisagés, comme l'intervention de T régulateurs. En effet, une étude montre que chez des donneurs sains, le nombre de LT régulateurs circulant est augmenté lorsque le variant CT60/A/A du gène codant pour CTLA-4,

associé à une diminution du risque de développer une MAI, est présent (Atabani SF, Eur J Immunol, 2005).

2)PDCD1

Ce gène code pour la protéine PD-1 (*programmed cell death-1*). Celle-ci est impliquée dans le maintien de la tolérance périphérique aux Ag du soi en régulant négativement l'activation des LT et des LB par un recrutement de la phosphatase SHP-2 (*Src-Homology Phosphatase 2*) (Okazaki T, Proc Nat Acad Sci, 2001, Nishimura H, Immunity, 1999, Carter L, Eur J Immunol, 2002). Plusieurs études cas-contrôles ont mis en évidence une forme particulière du gène *PDCD1* chez 12% (104 sur 880 personnes testées) des patients européens atteints de LED contre 5% (16/356) des sujets contrôles (Prokunina L, Nat Genet, 2002). Ce polymorphisme a également été associé à la PR (Prokunina L, Arthritis Rheum, 2004). Par ailleurs, les souris déficientes pour PD-1 développent un syndrome lupique (Nishimura H, Immunity, 1999). L'expression de ce variant induit une altération du site de liaison du facteur de transcription RUNX-1 (*Runt-related transcription factor-1*) au promoteur du gène *PDCD1* (Prokunina L, Nat Genet, 2002). Ceci pourrait conduire à une dérégulation de l'expression de *PDCD1* et donc à une activation non contrôlée des LT et des LB.

3)PTPN22 (protein tyrosine phosphatase non-receptor 22)

Un certain nombre d'études ont montré qu'un variant du gène *PTPN22* (620W, en position 620 du gène, une arginine est remplacée par un tryptophane) est associé à une augmentation du risque de développer certaines MAI comme le diabète de type 1 (Smyth D, Diabetes, 2004), le lupus érythémateux disséminé (Kyogoku C, Am J Hum Genet, 2004) et la PR (Begovitch AB, Am J Hum Genet, 2004, Smikins HM, Arthritis Rheum, 2005, Gregersen PK, Am J Hum Genet, 2005) ainsi que d'autres MAI (Velaga MR, J Clin Endocrinol Metab, 2004, Criswell LA, Am J Hum Genet, 2005). Le gène *PTPN22* code pour la tyrosine-phosphatase *Lyp* (*lymphoid phosphatase*) qui intervient dans la régulation négative du signal transmis lors de l'activation du TCR (*T cell receptor*). Elle déphosphoryle la kinase *Lck* et d'autres kinases se trouvant au début de la cascade de signalisation du TCR (Cloutier JF, J Exp Med, 1999, Hill RJ, Exp Haematol, 2002).

Il faut préciser, toutefois, que chacun des polymorphismes évoqués dans ce chapitre ne concerne souvent qu'une faible proportion des patients atteints par la maladie associés à ces

polymorphismes. Chacun de ces facteurs apporte, en fait, un degré de prédisposition au développement d'une MAI, et c'est leur association qui détermine au final la susceptibilité de l'individu (Wandstrat A, Nature Immunology, 2001). De plus, la susceptibilité de chaque individu peut également être modifiée par des facteurs de l'environnement.

III/ Les facteurs environnementaux

Le rôle de facteurs environnementaux dans la susceptibilité aux MAI a été mis en évidence grâce à l'étude de populations génétiques homogènes mais vivant dans des conditions environnementales différentes. En effet, il existe ce que l'on appelle un gradient Nord-Sud de répartition de certaines MAI. C'est le cas, par exemple, du DID et la SEP. L'incidence de ces MAI diminue du Nord au Sud dans l'hémisphère Nord (du Sud au Nord dans l'hémisphère Sud) (Kurtzke JF, J Neurovirol, 2000, Green A, Diabetologia, 2001). De plus, le taux de développement de ces pathologies évolue avec les migrations géographiques. Ainsi, l'incidence du DID chez les enfants pakistanais immigrés en Grande-Bretagne atteint celle d'une personne non immigrée. De même, chez des personnes émigrant de Grande-Bretagne vers le Nord de l'Australie la fréquence de développement d'une SEP diminue par rapport à celle de leur pays d'origine (Hammond SR, Brain, 2000).

L'importance des facteurs environnementaux est confirmée par le taux de concordance des MAI chez les jumeaux monozygotes, qui n'est que de 20 à 40%. Les gènes ne sont donc pas, à eux seuls, responsables du développement de ces maladies. On suppose en effet que les MAI trouvent leur origine dans l'association d'un terrain génétique favorable et d'éléments déclencheurs extérieurs.

Un certain nombre de facteurs environnementaux infectieux et non infectieux ont été évoqués comme initiateurs des MAI.

A/Les facteurs non infectieux

1)Les rayons ultraviolets (UV)

L'existence d'une photosensibilisation cutanée constitue un critère diagnostique du LED (Manson JJ, Netherlands J Med, 2003). Par ailleurs, des poussées de la maladie peuvent être déclenchées par une exposition aux UV. Néanmoins, le mécanisme de cette association entre LED et rayonnements ultraviolets n'est pas connu. L'une des hypothèses évoquées est que les UV induisent une apoptose des kératinocytes provoquant ainsi la formation de corps

apoptotiques, sources potentielles d'autoAg ciblés au cours du LED (Werth VP, J Investig Dermatol Symp Proc, 2004).

2) Les facteurs hormonaux

La plupart des MAI, comme le LED et la SEP, sont plus fréquentes chez les femmes que chez les hommes (rapport femme/homme d'environ 10 pour le LED, Ansar-Ahmed S, Environ Health Perspect, 1999). A l'heure actuelle, on ne sait pas précisément si cette augmentation de la fréquences des MAI chez la femme est liée à un facteur génétique ou hormonal. Il existe, néanmoins, deux arguments en faveur du facteur hormonal. D'une part, la grossesse peut provoquer des poussées lupiques et d'autre part, une grande proportion des MAI se déclarent chez la femme en période d'activité génitale au moment où l'imprégnation hormonale est la plus forte, en particulier celles pour lesquelles le rapport femme/homme est élevé (figure 3) (Locksin MD, Autoimm Dis, 2002).

De même, dans certains modèles animaux de MAI, comme le modèle spontané de lupus, NZBxNZW (F1), les femelles sont atteintes plus précocement que les mâles. L'administration d'estrogènes à ces souris accélère le développement de la maladie à la fois chez les mâles et chez les femelles. L'équipe de Margareth Bynoe s'est intéressé au mécanisme expliquant le rôle des estrogènes dans l'accélération du lupus chez la souris et montre que, dans un modèle murin tg pour un Ac anti-ADN, l'administration d'estrogène induit une rupture de la tolérance se traduisant par l'apparition des LB anti-ADN en périphérie et aboutissant au développement d'une atteinte de type lupique avec des dépôts d'Ig dans le rein. Les cellules B non sélectionnées au niveau central présentent une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 favorisant leur survie en périphérie (Bynoe MS, Proc Nat Acad Sci, 2000). Les estrogènes pourraient donc être impliqués à la fois dans la sélection des LB autoréactifs et dans leur maintien en périphérie.

Néanmoins, il est important de noter que le développement plus fréquent de la maladie chez les femelles n'est pas une constante. Dans certains modèles animaux de MAI, ce sont les mâles qui sont plus atteints, suggérant l'implication d'autres facteurs dans le développement de ces MAI. C'est le cas par exemple des souris lupiques BXSB exprimant le locus accélérateur de l'autoimmunité lié au chromosome Y (Yaa). Yaa est la conséquence d'une translocation du gène codant pour le TLR7 depuis chromosome X vers le chromosome Y dont le résultat est une surexpression de ce récepteur chez les souris BSXB (Subramanian S, Proc Nat Acad Sci, 2006).

3) Les facteurs médicamenteux

Des drogues et des substances exogènes se comportant comme des haptènes ont également été associées au développement des MAI. Celles-ci augmentent l'immunogénicité de certains autoAg, soit grâce à une reconnaissance croisée entre ces molécules et un Ag du soi, soit par une modification de présentation de cet Ag (figure 4).

Les céphalosporines induisent une production d'autoAc à l'origine d'une anémie hémolytique. Ces anticorps reconnaissent les globules rouges couverts par la molécule antibiotique (Arndt PA, Transfusion, 1999).

L'halothane est métabolisé dans le foie en chlorure de trifluoroacétyle (TFA) capable de se lier aux protéines de manière covalente. Le complexe ainsi formé est reconnu comme un élément étranger par le système immunitaire, ce qui aboutit à une hépatite autoimmune fulminante (ou hépatite à l'halothane, Gut J, Arch Toxicol, 1998).

Enfin, la procainamide est elle aussi associée au développement de MAI, puisqu'elle induit un LED. Néanmoins, le mécanisme d'action de cette drogue est différent : dans un modèle murin de lupus induit, la procainamide hydroxylée (métabolite de la procainamide), favorise la sélection positive de LT autoréactifs dans le thymus (Kretz-Rommel A, Nat Med, 2000).

B/ Les facteurs infectieux

1) Données épidémiologiques

Plusieurs constatations faites chez l'Homme semblent suggérer une association entre les infections et les maladies autoimmunes (MAI).

Il existe quelques éléments suggérant un effet protecteur des infections vis-à-vis des MAI. Chez l'Homme, par exemple, l'incidence de la plupart des infections diminue dans les pays occidentaux alors que la fréquence des MAI, ne cesse d'augmenter (Bach JF, N Engl J Med, 2002). D'autres indications de cet effet protecteur des infections proviennent de l'étude de modèles animaux. Les souris NOD, par exemple, sont protégées du diabète lorsqu'elles sont infectées par certaines bactéries, virus ou parasites, mais développent plus rapidement la maladie dans des conditions d'élevage sans microorganisme (*germ-free*) (Bach JF, N Engl J Med, 2002) (tableau 5).

Néanmoins, il existe des exemples plus nombreux suggérant une induction des MAI par les infections (tableaux 5 et 6). Le DID et la SEP sont les deux MAI humaines qui apportent pour

l'instant le plus de preuves d'une telle association. Ainsi, le risque de développer une SEP est multiplié par deux, voir par trois pendant ou peu de temps après une infection respiratoire, gastro-intestinale ou urologique (Kamradt T, Trends in Immunol, 2005). Le DID, quant à lui, a été associé à des infections virales. Deux études épidémiologiques prospectives menées en Finlande chez des enfants présentant des gènes de susceptibilité au DID montrent qu'il existe une forte corrélation entre l'apparition des autoAc contre les îlots β du pancréas et l'infection à entérovirus, suggérant un rôle des entérovirus dans le déclenchement de la réaction autoimmune. Ce résultat ne démontre toutefois pas un lien avec le développement d'un DID puisque seule l'apparition des autoAc est prise en compte ; il n'a d'ailleurs pas pu être confirmé par d'autres études épidémiologiques menées dans d'autres pays (Knip M, Diabetes, 2005). Le DID a également été associé à des infections par le virus de la rubéole. Lorsque la prévalence de la rubéole était encore forte, environ 12% des personnes ayant développé une rubéole dans la petite enfance développaient une forme de diabète à l'âge adulte (Rouse BT, Rev Med Virol, 2002).

2)Hypothèses mécanistiques

Différents mécanismes ont été évoqués pour expliquer un effet aggravant des infections dans le développement des MAI. Ces mécanismes sont i)le mimétisme moléculaire, ii)la libération d'Ag séquestrés, iii)les effets de l'IFN- α , iv)l'effet superantigène, et v)l'activation polyclonale des LB.

a)Le mimétisme moléculaire (figure 5)

Un certain nombre de constatations faites chez l'Homme ont conduit à envisager le rôle d'un mimétisme moléculaire entre des Ag infectieux et des Ag du soi dans certaines MAI.

La fièvre rhumatismale (ou maladie de Bouillaud, ou rhumatisme articulaire aigu) est une atteinte d'origine immunologique se déclarant chez l'enfant ou l'adolescent. Les manifestations cliniques de cette pathologie sont principalement cardiaques et sont presque toujours associées à une infection à Streptocoque hémolytique de type A. L'analyse des autoAc produits au cours de cette maladie montre une réactivité croisée entre des composants du myocarde et la protéine M (facteur de virulence) du Streptocoque de type A (Cunningham MW, Clin Microbiol Rev, 2000).

Le syndrome de Guillain-Barré (ou polyradiculonévrite) est un autre exemple d'association entre MAI et infection. Ce syndrome est assez fréquemment associé à une infection par *Campylobacter jejuni* (*C jejuni*) (Rees JH, N Engl J Med, 1995). On détecte chez les patients atteints de polyradiculonévrite associée à une infection par *C. jejuni* des Ac dirigés contre le ganglioside GM1 (mono-sialo-ganglioside-1), composant lipidique exprimé dans le cerveau. Ce dernier présente une structure identique à celle de certains oligosaccharides de *C jejuni*. (Yuki, Curr Opin Immunol, 2005).

D'autres associations entre des MAI et des infections faisant intervenir le mimétisme moléculaire ont été suggérées (tableau 7). Ainsi, on soupçonne une relation entre l'infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV) et la PR. La séquence QKRAA du CMH de classe II DRB01*0401, qui porte la susceptibilité au développement de la PR, présente une homologie avec la glycoprotéine gp110 d'EBV (Roudier J, Proc Nat Acad Sci, USA, 1989). Néanmoins, le rôle de cette relation structurale dans le déclenchement de la PR n'est pas démontrée. On peut néanmoins supposer que cette homologie de structure entre la gp110 et la molécule de classe II du CMH HLADR4 pourrait conduire à une orientation de la réponse spécifique anti-gp110 contre les cellules exprimant le HLADR4, présentes par exemple au niveau des articulations. Une autre hypothèse consiste à considérer l'EBV comme un facteur aggravant et non pas initiateur de la PR, qui favoriserait la formation de CI, en raison de sa présence chronique liée à la capacité réduite des patients atteints de PR à contrôler le virus.

Chez la souris, l'importance du mimétisme moléculaire a également été démontrée notamment dans un modèle de kératite post herpétique. Ainsi, l'infection par un virus HSV-1 humain, provenant de patients atteints d'une kératite stromale post-herpétique (HSK pour *herpetic stromal keratitis*), induit une HSK chez la souris. L'analyse des clones T présents chez ces animaux et capables d'induire cette kératite montre que ces cellules reconnaissent un peptide provenant de l'enveloppe du HSV (UL-6). L'infection par un virus HSV n'exprimant pas ce peptide n'induit pas de kératite autoimmune (Zhao ZS, Science 1998). Ces résultats semblent suggérer qu'il existe une réactivité croisée entre le peptide UL6 et un élément de la cornée.

D'autres modèles plus artificiels existent et montrent que le mimétisme moléculaire pourrait jouer un rôle dans l'exacerbation d'un diabète déjà existant (Lang KS, Nat Med, 2005) ou le déclenchement d'un syndrome démyélinisant proche de la SEP (Olson K, J Clin Invest, 2001).

Néanmoins, il existe peu d'exemples qui prouvent avec certitude le rôle du mimétisme moléculaire dans le développement des MAI, à la fois chez l'Homme et chez la souris. Ceci s'explique principalement par la difficulté à mettre en évidence un tel lien. En effet, les MAI s'expriment cliniquement assez longtemps après leur initiation. A ce stade, l'agent infectieux a été éliminé et l'Ag initiateur (Ag microbien mimant un Ag du soi) n'est plus forcément le seul présent. La réponse autoimmune d'abord dirigée contre un seul Ag peut, en effet, se diversifier grâce l'inflammation locale induite par la réponse anti-infectieuse ou lors d'une maladie autoimmune chronique. Cette inflammation favorise la libération de nouveaux Ag (souvent des autoAg) et participe ainsi au recrutement de cellules T reconnaissant des Ag différents (épitope différent de la même protéine ou d'une protéine différente) de l'Ag initiateur (ou Ag dominant) (Fourneau JM, Mol Immunol, 2004, Powell AM, Clin Exp Dermatol, 2001). Ce processus est appelé *epitope spreading* (figure 6).

b)La libération d'Ag séquestrés

Lors d'une infection, l'inflammation et la destruction cellulaire survenant dans les tissus peuvent libérer des Ag séquestrés pouvant être présentés à des LB ou des LT autoréactifs non tolérés puisque n'ayant jamais rencontré leur autoAg. L'infection de souris par le virus de Theiler (ou virus de l'encéphalomyélite murine) induit une atteinte démyélinisante proche de la SEP. L'infection provoque une inflammation du cerveau et une mort neuronale conduisant à un relargage de myéline qui active les LT spécifiques responsables de l'atteinte (Miller SD, Nat Med, 1997, Katz-Levy Y, J Clin Invest, 1999, Katz-Levy Y, J Immunol, 2000).

Une libération d'Ag séquestrés pourrait également expliquer l'induction d'un DID chez la souris par le virus Coxsackie B4. Ce virus exprime une protéine (P2-C) présentant une homologie de structure avec la GAD (glutamate décarboxylase) pancréatique. Toutefois, l'équipe de M. Horwitz démontre, en infectant des souris exprimant un TCR spécifique de la GAD ou d'un autre Ag pancréatique, que le déclenchement du DID lors de cette infection n'est pas la conséquence d'un mimétisme moléculaire lié à cette homologie entre la GAD et la protéine P2-C. En effet, l'infection par le Coxsackie virus B4 accélère le développement du DID chez les souris exprimant un TCR spécifique d'un Ag pancréatique différent de la GAD (Horwitz MS, Nat Med, 1998). Une autre étude montre que l'administration de streptozocine, agent provoquant des lésions du pancréas, à des souris exprimant un répertoire T diabétoène induit un diabète et a les mêmes effets que l'infection par le virus Coxsackie B4 (Horwitz

MS, J Clin Invest, 2002). Dans ce second modèle, l'absence de l'autoAg ciblé par la réaction autoimmune (autoAg pancréatique) avant l'infection n'est pas démontrée.

c) Les effets de l'IFN- α

Plusieurs éléments suggèrent un rôle de l'IFN de type I dans le développement des MAI.

Chez l'Homme, on mesure une augmentation des taux sériques d'IFN- α au cours de différentes MAI, en particulier chez des patients atteints de LED et de DID (Huang, X, Diabetes, 1995, Somoza N, J Immunol, 1994). Cette élévation de l'IFN- α chez les patients diabétiques pourrait être liée à une infection par le Coxsackie virus de type B (Chehadeh W, J Infect Dis, 2000). L'analyse du transcriptome des cellules du sang périphérique de patients lupiques montre une signature IFN (Bennett L, J Exp Med, 2003, Baechler EC, Proc Nat Acad Sci, 2003), c'est-à-dire la surexpression de gènes codant pour l'IFN ou dont la transcription est induite par l'IFN.

Enfin, l'administration d'IFN- α dans le traitement de certains cancers ou d'infections par le virus de l'hépatite B (VHB) ou par le VHC, peut déclencher des manifestations autoimmunes (Stewart TA, Cytok Growth Fact Rev, 2003, Fabbri C, World J Gastroenterol, 2003).

Chez la souris, des modèles tg ont permis de mettre en évidence plusieurs mécanismes expliquant le rôle de l'IFN- α dans le déclenchement des MAI. Ces mécanismes peuvent expliquer certains des modes d'induction non spécifique de l'autoimmunité au cours d'une infection.

#L'IFN- α provoque la libération de chemokines favorisant le recrutement de LT autoréactifs dans l'organe cible.

Cet effet a été démontré grâce au modèle de Karl Lang dans lequel des souris tg expriment le peptide₃₃₋₄₁ de la glycoprotéine (gp33) du virus de la chorioméningite lymphocytaire (lymphocytic choriomeningitis virus ou LCMV) sous la dépendance du promoteur de l'albumine, c'est-à-dire uniquement dans le foie. Les LT anti-gp33 ne sont pas été éliminés dans le thymus puisque le gp33 n'est exprimé que dans le foie. Ils sont présents en périphérie, mais malgré la présence de l'autoAg (gp33) les souris ne développent pas d'atteinte hépatique.

L'infection de ces souris par le LCMV induit une expansion et une activation des LT CD8 anti-gp33 aboutissant au développement d'une hépatite autoimmune. En dehors de tout

contexte infectieux, l'activation des cellules T anti-gp33 ne suffit pas à reproduire cette atteinte. Seule l'administration simultanée de gp33 et de poly(IC) (ligand du TLR3) induit une hépatite. Dans ce cas, on observe également une induction du gène codant pour la chemokine CXCL9. En l'absence d'IFN- α , l'expression de CXCL9 dans le foie est réduite et les cellules T anti-gp33 n'y sont pas recrutées (Lang K, J Clin Invest, 2006). Ces résultats suggèrent que le déclenchement de l'hépatite autoimmune nécessite la présence de LT CD8 anti-gp33 mais aussi la libération de chemokines induites par l'IFN- α , qui favorisent le recrutement des cellules T au niveau hépatique.

#L'IFN- α stimule l'augmentation de l'expression des molécules de classe I du CMH au niveau de l'organe cible.

Ceci a été démontré dans un modèle de diabète induit par le LCMV chez des souris tg exprimant la glycoprotéine (GP) du LCMV uniquement dans les îlots β du pancréas (GP sous la dépendance de RIP, promoteur de l'insuline) (Lang K, Nature Medicine, 2005). Lorsque ces souris sont infectées par le LCMV, elles développent un diabète. En revanche, l'immunisation par la GP du LCMV n'a pas cet effet malgré la présence de nombreuses cellules T CD8 autoréactives. L'apparition du DID nécessite l'administration de ligands TLR3 (poly(IC)) et TLR7 (R848). Tout comme l'infection par le virus LCMV, cette dernière induit une augmentation médiée par l'IFN- α de l'expression des molécules du CMH de classe I par les cellules des îlots β du pancréas (Lang K, Nature Medicine, 2005).

#L'IFN- α favorise la rétention des LT dans les ganglions lymphatiques prolongeant ainsi leur interaction avec les cellules présentatrices de l'Ag (Shiow LR, Nature, 2006).

#L'IFN- α induit une augmentation de l'expression du TLR7 par les cellules B humaines (Bekeredjian-Ding I, J Immunol, 2005). Ces cellules sont ainsi plus facilement activées, qu'elles soient ou non autoréactives, par des ligands TLR7 exogènes (ARNsb viral) ou endogènes (snRNP/snRNA).

d) L'activation lymphocytaire non spécifique

#L'effet superantigène

Les agents infectieux viraux et bactériens expriment ce que l'on appelle des superAg. Ces derniers activent de manière non spécifique les cellules T par l'intermédiaire de la région

variable de la chaîne β du TCR. Cette activation polyclonale peut impliquer des cellules T autoréactives. Par exemple, dans un modèle d'encéphalite autoimmune expérimentale (EAE) induite chez la souris par le peptide N terminal (Ac1-11) de la protéine basique de la myéline (MBP, *myelin basic protein*), l'administration d'un superAg bactérien, l'entérotoxine B du staphylocoque, induit une rechute de l'EAE (Brocke S, Nature, 1993). Ce superAg active les LT exprimant un TCR V/ β 8 comme ceux qui reconnaissent le peptide (Ac1-11).

Il existe également des superAg des LB. Par exemple, la glycoprotéine 120 (gp120) du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) induit une activation des LB exprimant certaines familles de VH (chaîne lourde des Ig) seulement (Muller S, Int Rev Immunol, 1997).

#L'activation polyclonale

De nombreux agents infectieux ont des propriétés mitogènes et sont capables d'activer de manière non spécifique les LB et les LT, induisant une lymphoprolifération voire une production d'Ac. Cette activation polyclonale peut affecter des cellules autoréactives. Elle peut être induite par :

#des bactéries

Borrelia burgdorferi active les LB de manière polyclonale par l'intermédiaire des protéines de surface et facteurs de virulence OspA et OspB (Ma Y, Infect Immunol, 1993) reconnus par les récepteurs Toll-like présents à la surface des LB. *Yersinia enterocolitica* est une autre bactérie qui induit une activation polyclonale de LB. Celle-ci s'accompagne d'une production d'autoAc *in vivo* chez la souris. Le mécanisme de cette activation n'est pas encore connu, mais semble impliquer un facteur de virulence non plasmidique de *Y. enterocolitica* O:8 (Pereira-Ramos O, Microbiol Immunol, 2005).

#des parasites

Chez l'Homme, l'infection par *Plasmodium falciparum* est caractérisée par une activation polyclonale des LB. Une grande proportion des érythrocytes infectés par *P. falciparum*, isolés de patients, est capable de se lier aux Ig non immunes (Scholander C, Infect Immun, 1998). Daria Donati et son équipe montrent que la région riche en cystéine CIDR1 α (pour *cystein-rich interdomain protein 1 α*) de *P. falciparum* permet la liaison directe des érythrocytes infectés par le parasite à des LB humains purifiés *in vitro*. Cette liaison se fait par l'intermédiaire des Ig présentes à la surface de la cellule B. L'interaction de CIDR1 α avec ces

Ig induit une prolifération et une activation des LB (Donati D, *Infect Immun*, 2004). Il a été suggéré que ces protéines (Ig binding proteins, IBP), en induisant une activation polyclonale des LB, pourraient empêcher le développement d'une réponse spécifique contre *P. falciparum* et favoriser ainsi la survie du parasite (Daniel-Ribeiro C, *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1989). *Trypanozoma cruzi*, l'agent de la maladie de Chagas, induit une activation polyclonale des LB chez la souris (Cordeiro da Silva A, *Infect Immunol*, 2001). Cette activation pourrait être médiée par une proline racémase eucaryotique exprimée par *T. cruzi* (Reina-San-Martin *Nat Med*, 2000). Une autre protéine de *T. cruzi*, une trans-sialidase, semble elle aussi avoir un effet mitogène sur les cellules B (Gao W, *Int Immunol*, 2002). L'activation polyclonale induite par *T. cruzi* constitue, tout comme pour *P. falciparum*, un mécanisme développé par le parasite pour échapper au système immunitaire (Reina-San-Martin B, *Parasitol Today*, 2000).

#des virus

L'hémagglutinine (HA) du virus influenza (virus de la grippe) induit une prolifération des LB et une production d'Ac *in vitro* (prolifération variable en fonction du sous-type d'HA testé). Cet effet de l'HA est inhibé en présence d'Ac anti-IgM et surtout par des Ac anti-IgG, capables de se lier au BCR. Il existe en fait une compétition entre l'HA et ces Ac. L'utilisation d'un Ac anti-CD45, qui « cache » l'IgM à la surface des cellules B, empêche la prolifération de ces cellules médiée par l'HA. Enfin, l'HA du virus influenza est capable de bloquer la prolifération d'une lignée de cellules B immatures lymphomateuses (lignées WEHI-231) comme le fait un Ac anti-IgM. Il semble donc que l'activation polyclonale induite par le virus de la grippe soit médiée par la stimulation directe du BCR (Rott O, *J Immunol*, 1994).

L'infection de souris par le gammaherpes virus 68 (γ HV68, ou MHV-68, appartenant à la famille de l'*Epstein-Barr virus*, EBV) induit elle aussi une activation polyclonale des LB associée à une production d'IgG spécifiques et non spécifiques dépendante des LT CD4 (Sangster MY, *J Immunol*, 2000). Le mécanisme de cette activation n'est pas connu, mais elle pourrait être liée à l'infection directe des LB par le virus.

Dans un modèle d'infection de souris par le LCMV, Lukas Hunziker et son équipe montrent que des LB peuvent capturer des Ag viraux de manière non spécifique par pinocytose et les présentent aux LT. Les LT reconnaissant les Ag viraux présentés fournissent aux LB des signaux de costimulation et induisent leur différenciation en cellules productrices d'anticorps. Comme les Ag sont capturés de manière non spécifique par les cellules B, les LT peuvent

activer des LB autoréactifs capables de produire des autoAc (Hunziker L, Nat Immunol, 2003).

D'autres virus ont été associés à une activation polyclonale des LB, notamment l'EBV et le VIH.

IV/Conclusion

Les MAI sont des pathologies dont l'étiologie repose sur une interaction complexe entre des facteurs génétiques souvent multiples formant un terrain génétique favorable, et des facteurs environnementaux infectieux et non infectieux.

Amy Wandstratt et Edward Wakeland proposaient, en 2001, un modèle assez intéressant reflétant assez bien cette complexité : l'atteinte autoimmune se développerait à partir d'un seuil défini par la présence d'un certain nombre d'allèles de susceptibilité et par l'effet de l'environnement (figure 7).

Pour terminer cette introduction, nous allons aborder plus particulièrement un aspect important de ce travail de thèse, le rôle potentiel des récepteurs « Toll-like » dans l'association entre les infections et l'autoimmunité.

Troisième partie :
L'activation des récepteurs « Toll-like » :
un lien possible entre infection et autoimmunité

I/ Les récepteurs « Toll-like »

La famille des récepteurs « Toll-like » (ou TLR) participe à la réponse immunitaire innée en reconnaissant des motifs particuliers caractéristiques de certains agents pathogènes et commensaux (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns* ou MAMs, *microorganism-associated molecular patterns*).

Ces récepteurs sont hautement conservés au cours de l'évolution puisqu'on les trouve aussi bien chez le vers (*Caenorhabditis elegans*) que chez les mammifères. Le premier membre de la famille des TLR, la protéine Toll, fut identifié comme un régulateur du développement embryonnaire de la drosophile. Ce n'est que quelques années plus tard, grâce à l'étude de mutants de Toll que l'on découvrit son rôle dans la réponse immunitaire antifongique de la drosophile (Lemaitre B, Cell, 1996).

Chez les mammifères, on dénombre, aujourd'hui, douze TLR chez la souris (TLR1-9 et 11-13) et dix chez l'Homme (TLR1-10) (Kaisho T, J Allergy Clin Immunol, 2006). Ce sont des glycoprotéines membranaires constituées d'un domaine extracellulaire comprenant des motifs répétés riches en leucine (LRR, *leucine-rich-repeat*) (Kobe B, Curr Opin Struct Biol, 2001) et d'un domaine intracytoplasmique homologue à celui du récepteur de l'interleukine 1 (IL-1R) appelé domaine d'homologie Toll/IL-1R ou TIR (Bowie A, J Leucoc Biol, 2000).

Les TLR sont exprimés par un grand nombre de cellules immunitaires (LB, LT, DC, macrophages) (tableau 8) et non-immunitaires. Leur expression est membranaire pour les TLR1, 2, 4, 5 et 6, et intracytoplasmique (endosomale) pour les TLR3, 7, 8 et 9 (Akira S, Cell, 2006). Dans le second cas, l'internalisation du ligand est indispensable à son activité.

Les TLR peuvent être regroupés en fonction du type de ligand qu'ils reconnaissent (tableau 9) :

#le TLR2 forme des hétérodimères avec le TLR1 et le TLR6 pour reconnaître les lipides bactériens et mycoplasmaïques,

#le TLR5 reconnaît la flagelline ;

#le TLR4, reconnaît le lipopolysaccharide (LPS) bactérien entre autres ;

#le TLR11 la profiline de *Toxoplasma gondii* (chez la souris) ;

#les TLR3, 7, 8 et 9 reconnaissent les acides nucléiques, respectivement l'ARNdb, l'ARNsb, et l'ADNdb.

L'activation TLR induit la dimérisation du récepteur permettant les changements conformationnels nécessaires au recrutement de protéines adaptatrices à domaine TIR. Deux voies de signalisation sont alors possibles en fonction du TLR. La principale fait intervenir

MyD88 (myeloid differentiation factor 88), elle est impliquée dans la signalisation de la majorité des TLR et de l'IL-1R. Cette voie conduit à l'activation de NF-κB et des MAP kinases aboutissant à la transcription de gènes impliqués dans les processus inflammatoires. La seconde voie de signalisation, ou voie MyD88 indépendante, fait intervenir l'adaptateur **TRIF** (*TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN-β*), suite à l'activation des TLR3, 4, 7 et 9. Elle induit l'activation de NF-κB mais surtout la phosphorylation des facteurs régulant l'IFN : IRF-3 (*interferon-regulating factor-3*) et IRF-7 qui, une fois transloqués dans le noyau, induisent l'expression du gène de l'IFN de type I (IFNα/β) et des gènes induits par l'IFN (figure 8) (Akira S, Cell, 2006, Kawai T, Cell Death Diff, 2006).

II/L'activation des TLR participe au développement de l'autoimmunité induit par les infections

En plus de leur importance dans la reconnaissance des agents infectieux et dans l'initiation de la réponse immunitaire innée, l'activation des TLRs semble jouer un rôle dans le lien qui existe entre les infections et les MAI. Ces récepteurs peuvent intervenir sur trois éléments importants dans le développement de l'autoimmunité :

- #les lymphocytes T régulateurs ;
- #les lymphocytes B autoréactifs ;
- #les cellules dendritiques.

A/Les ligands TLR modifient l'activité suppressive des LT régulateurs

L'activation des LT autoréactifs est contrôlée, entre autres, par les cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺CD45RB^{low} (LT reg).

Il existe chez l'Homme un syndrome autoimmun, le syndrome IPEX, dont le développement est lié à une mutation du gène *foxp3*, codant pour un facteur de transcription exprimé uniquement par les LT reg et indispensable à leur développement (Bennet CL, Nat Genet, 2001). De même chez la souris, l'absence des LT reg conduit au développement de MAI. Ainsi, la souris Scurfy, déficiente pour le gène *foxp3* développe un syndrome lymphoprolifératif autoimmun (Fontenot JD, Nature Immunol, 2003).

Plusieurs études récentes ont montré que la stimulation des TLR peut inhiber l'activité suppressive des LT reg, soit directement par l'intermédiaire des TLR présents sur ces cellules (tableau 9), soit indirectement grâce à l'activation d'autres cellules exprimant des TLR.

#Inhibition directe de l'activité suppressive des LT $CD4^+CD25^+CD45RB^{low}$

Deux études montrent que le ligand TLR2, Pam3Cys-SKKKK, induit une expansion des LT reg accompagnée d'une réduction de l'activité suppressive de ces cellules aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Sutmuller RPM, J Clin Invest, 2006, Liu H, Proc Nat Acad Sci, 2006). La fonction des LT reg est rétablie lorsque l'agent pathogène (reconnu par le TLR2) ou le ligand TLR2 n'est plus présent (figure 9). Différents mécanismes pourraient expliquer cet effet inhibiteur des ligands TLR2 sur l'activité des LT reg :

I) La stimulation TLR peut moduler l'expression de Foxp3, facteur de transcription essentiel pour la régulation des LT reg. L'expression de Foxp3 est d'ailleurs diminuée lorsque les LT reg sont stimulés par un ligand TLR2 (Sutmuller RPM, J Clin Invest, 2006).

II) Les LT reg ont tendance à perdre leur activité suppressive lorsqu'ils reçoivent un signal d'activation fort (Baecher-Allan C, J Immunol, 2002). L'activation TLR pourrait fournir un tel signal.

III) La liaison d'un ligand TLR2 induit une augmentation de l'expression du récepteur de l'IL-2 (CD25) à la surface des LT reg (Sutmuller RPM, J Clin Invest, 2006) et stimule la production d'IL-2 par les LT effecteurs favorisant ainsi une inhibition de l'activité suppressive des LT reg par l'IL-2 (Liu H, Proc Nat Acad Sci, 2006).

Une autre étude plus récente montre que la stimulation des cellules T reg par un ligand du TLR8 humain inhibe elle aussi l'activité suppressive de ces cellules, indépendamment de l'activation des DC et de la production d'IL-6 (Peng G, Science, 2005).

#Inhibition indirecte de l'activité suppressive des LT $CD4^+CD25^+CD45RB^{low}$

L'inhibition de l'activité régulatrice des LT reg peut également intervenir de manière indirecte par l'intermédiaire des DC. Ainsi, au cours d'un test *in vitro* de suppression de la prolifération de LT $CD4^+CD25^-$ par des LT reg, la stimulation du TLR4 ou du TLR9 exprimés par les DC spléniques lève l'activité suppressive des LT reg. Ce phénomène est médié par l'IL-6 libérée par les DC activées par les ligands TLR. Cette cytokine agit sur les LT effecteurs en les rendant résistants à la suppression par les LT reg (Pasare C, Science, 2003).

B/L'activation des TLR permet la stimulation de LB autoréactifs

Les LB humains et murins expriment plusieurs TLR (tableau 8) et peuvent donc être activés directement par des ligands de ces récepteurs de manière polyclonale comme nous l'avons

évoqué précédemment. Il a récemment été démontré que les LB peuvent également être stimulés de manière conjointe par l'intermédiaire des TLR et du BCR par des CI comprenant l'Ag et un ligand TLR. Ce processus est capable d'activer des LB autoréactifs et d'induire une production d'autoAc. Deux modèles ont permis de mettre en évidence cette activation particulière des LB.

a) Le modèle tg FR de Leadbetter

L'activation de cellules B autoréactives par des CI a été mise en évidence grâce au modèle murin tg pour des facteurs rhumatoïdes (FR), le modèle AM14. Ces souris furent décrites en 1993 par l'équipe de Weigert (Shlomchik MJ, *Int Immunol*, 1993). Elles expriment un FR (Ig reconnaissant spécifiquement les IgG) provenant de souris autoimmunes MRL/lpr, déficientes pour Fas (mutation sur les deux allèles du gène Fas), et se liant spécifiquement aux IgG2a d'allotype « a » (Jacobson BA, *J Immunol* 1994). Lorsque le transgène est exprimé sur un fond génétique « normal » (BALB/c, allotype « a »), les cellules B AM14 se développent normalement : elles n'éditent pas leur BCR, ne sont ni éliminées, ni anergisées malgré la présence de l'autoAg (IgG2a) (Hannum LG, *J Exp Med*, 1996). En revanche, sur un fond génétique « autoimmun » (C57BL/6/lpr/IgHa), les LB FR sont activés et produisent des FR (Wang H, *J Exp Med*, 1999).

Des expériences *in vitro* ont montré que ce phénomène dépend de la présence de CI formés d'IgG2a anti-nucléosome associées à des nucléosomes purifiés (Rifkin IR, *J Immunol*, 2000), ou à du matériel présent dans le surnageant de culture de cellules mourantes (Rifkin IR, *J Immunol*, 2000, Viglianti GA, *Immunity*, 2003). *In vitro*, l'ajout de DNase, empêchant la formation de ces CI, réduit la capacité d'activation des LB AM14 par les IgG2a anti-nucléosomes (Leadbetter EA, *Nature* 2002). L'inhibition des voies de signalisation du BCR par la Cyclosporine A, qui bloque l'activation BCR dépendante des LB en inhibant la calcineurine, mais pas l'activation BCR indépendante, empêche l'activation des LB AM14 par les CI IgG2a anti-nucléosomes/nucléosomes (Viglianti GA, *Immunity*, 2003).

L'activation des LB AM14 par ces CI nécessite l'intervention du TLR9. En effet, *in vitro*, les cellules B FR AM14 déficientes pour MyD88 ne prolifèrent pas en présence des CI nucléosomes/IgG anti-nucléosomes. Il en est de même lorsque l'acidification des endosomes est bloquée par l'incubation des cellules B AM14 *in vitro* en présence des CI et de Chloroquine, de Concanamycine B ou de Bafilomycine A. Enfin, l'inhibition du TLR9 par un

olidodesoxynucléotide inhibiteur (s-ODN- 2088) empêche également la prolifération des LB AM14 (Leadbetter EA, Nature 2002).

L'ensemble de ces résultats montre que les LB FR AM14 sont activés chez la souris MRL/lpr grâce à la formation de CI contenant des nucléosomes, provenant vraisemblablement de cellules mortes ou mourantes. Ceux-ci se lient au BCR FR par l'intermédiaire des IgG2a qu'ils contiennent et sont ensuite internalisés et acheminés vers les endosomes où ils peuvent se lier au TLR9. La stimulation conjointe des deux récepteurs fournit à la cellule B FR un signal suffisant à son activation et à l'induction d'une production d'autoAc.

b)Le modèle de Lau

Les cellules B FR AM14 sont également activables par des CI formés d'Ac anti-ARN et d'ARN. Christina Lau et coll. démontrent que des CI contenant des snRNP (petits ARN nucléaires (*small nuclear RNA*, U snRNA) associés à des protéines (Sm) ou d'autres protéines), et des Ac anti-snRNP ou anti-Sm, fréquemment retrouvés dans le sérum de patients lupiques (Savarese E, Blood, 2006) activent eux-aussi les LB AM14. Cette activation est bloquée i)par l'utilisation d'une RNase, ii)lorsque l'on empêche l'acidification des endosomes et iii)quand les cellules B AM14 sont déficientes pour le TLR7. Les CI induisent là aussi un cosignal entre le BCR et un TLR, ici le TLR7 (Lau CM, J Exp Med, 2005).

C/Les TLR influencent la réponse des cellules dendritiques

L'activation des TLR module l'activité des cellules dendritiques (DC pour *dendritic cell*) de deux façons : en stimulant la maturation des DC (effet adjuvant) ou en induisant la libération d'IFN de type I par ces cellules.

1)L'activation des TLR induit un effet adjuvant

En l'absence de signaux activateurs, les DC restent immatures et circulent dans les organes périphériques. A ce stade, elles sont incapables de présenter l'Ag et fournissent aux LT des signaux tolérogènes. En présence d'un signal activateur, les DC deviennent matures : i)elles surexpriment des molécules de costimulation et les molécules du CMH, ii)elles peuvent présenter des Ag aux LT et iii)elles sécrètent des cytokines.

Les ligands des TLR présents à la surface des DC peuvent soit jouer directement le rôle de signal activateur (ou adjuvant), c'est le cas du LPS par exemple, soit induire une libération de cytokines proinflammatoires, qui constituent, elles aussi, un signal adjuvant pour les DC.

Ainsi, la stimulation des TLR favorise à la fois la réponse aux antigènes infectieux et aux autoAg présentés par les cellules dendritiques.

Par exemple, des DC chargées avec un peptide du soi exprimé spécifiquement par le cœur induisent une myocardite médiée par des LT CD4 dirigés contre ce peptide lorsqu'elles sont transférées chez la souris, si elles sont stimulées au préalable par un ligand TLR (LPS, peptidoglycane, ARN db, ou ADN-CpG) (Eriksson U, Nature Medicine, 2003).

Une autre preuve de l'effet adjuvant des TLR provient de l'étude des souris tg 5B6 exprimant un TCR spécifique du peptide 139-151 de la PLP (*proteolipid protein*, protéine encéphalitogène dérivée de la myéline, contre laquelle se développe une réponse T spécifique au cours de l'EAE). Les souris 5B6 de fond génétique SJL développent une EAE fulminante (Waldner H, Proc Nat Acad Sci USA, 2000). En revanche, lorsque le transgène 5B6 est exprimé sur le fond génétique B10.S, les souris sont résistantes au développement de l'EAE (Waldner H, J Clin Invest, 2004). Les auteurs de cette étude démontrent que la résistance des souris 5B6 B10.S est liée à un défaut de stimulation des LT spécifiques de la PLP par les cellules présentatrices de l'Ag. La stimulation préalable de ces cellules *in vivo* par des ligands TLR (LPS, toxine pertussique ou ADN-CpG) induit une EAE chez la souris B10.S (Waldner H, J Clin Invest, 2004).

2) L'activation des TLR induit une libération d'IFN- α par les cellules dendritiques

Les IFN ont été classés en deux groupes : le groupe I (IFN- α , IFN- β) et le groupe II (IFN- γ). L'IFN- α est impliqué dans la réponse anti-virale. En effet, des souris déficientes pour le récepteur de l'IFN- α sont sensibles à de nombreux virus (Hwang SY, Proc Nat Acad Sci USA, 1995). Il est produit principalement par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Siegal FP, Science, 1999) et a été associé au développement de certaines MAI.

La production d'IFN de type I est déclenchée par la stimulation des TLR3, 4, 7 et 9, sauf pour les DC plasmacytoïdes qui n'expriment pas le TLR3, et implique selon le récepteur une activation de la voie MyD88 (TLR7 et TLR9), de la voie TRIF (TLR3) ou de ces deux voies (TLR4) (Akira S, Cell, 2006) (figure 10).

Cette production est stimulée surtout par des acides nucléiques viraux mais peut également être induite par des CI ARN/anti-ARN présents chez certains patients lupiques, contenant des snRNP et évoqués plus haut dans l'activation des B FR AM14. *In vitro*, des CI snRNP/anti-

snRNP, purifiés à partir de sérums de patients lupiques, stimulent la production d'IFN- α par les DC plasmacytoïdes humaines par l'intermédiaire du TLR7 (Barrat FJ, Jexp Med, 2005). D'autres études de stimulation *in vitro* de DC plasmacytoïdes humaines par des snRNP purifiés en présence de sérum ou d'IgG purifiées anti-snRNP de patients lupiques confirment ces résultats (Vollmer J, J Exp Med, 2005, Lövgren T, Arth Rheum, 2006). L'effet de ces CI est inhibé en présence d'un Ac dirigé contre le récepteur Fc γ RIIa humain (CD32), reconnaissant spécifiquement le fragment Fc des IgG (Vollmer J, J Exp Med, 2005). Ceci suggère que les CI contenant des snRNP présents chez les patients lupiques sont acheminés vers les endosomes grâce au Fc γ RIIa, qui se lie aux IgG du CI ; ils activent alors le TLR7, comme se serait le cas pour les cellules B FR dans lesquelles le BCR joue le rôle de transporteur.

Chez la souris, des CI formés de snRNA purifié associé à un Ac monoclonal anti-Sm active des DC plasmacytoïdes murines par l'intermédiaire du TLR 7 ce qui provoque la libération d'IFN- α par ces cellules (Savarese E, Blood, 2006). Néanmoins, l'intervention d'un récepteur Fc γ permettant le transport des CI vers les endosomes n'a pas encore été démontrée.

Les CI chromatine/IgG anti-chromatine (ADN/Ac anti-ADN) sont eux aussi capables d'activer les DC chez la souris. Cette activation concerne les DC myéloïdes, fait intervenir le TLR9, lui aussi exprimé au niveau des endosomes, et aboutit à la production de TNF- α mais pas d'IFN- α . Elle dépend de la présence du Fc γ RIII, équivalent murin du Fc γ RIIa (Boulé MW, J Exp Med, 2004, Rifkin IR, Immunol Reviews, 2005).

Cette stimulation de la production d'IFN- α suite à l'activation des TLR peut avoir différentes conséquences sur le développement d'une MAI ainsi qu'expliqué précédemment dans la seconde partie de cette introduction

III/ Conclusion

Au terme de cette introduction bibliographique, nous pouvons dire que malgré l'existence de mécanismes de tolérance divers intervenant au cours du développement des LB, il subsiste des cellules B autoréactives en périphérie qui pourraient, en réponse à des facteurs génétiques et environnementaux favorables, jouer un rôle dans le déclenchement des MAI.

Un certain nombre de questions restent néanmoins sans réponse :

1) L'existence d'un état d'anergie ou d'un état d'ignorance immunologique des cellules B autoréactives permet d'expliquer la survie de ces cellules. En revanche, la question de leur activation et de leur lien avec les MAI reste entière.

2) Comme nous l'avons vu dans la deuxième partie, le développement des MAI pourrait dépendre de la survenue d'une infection. Mais jusqu'à présent les études ont été menées au cas par cas, et ne permettent pas d'établir une tendance quant à la capacité d'une infection en général à induire une MAI. De plus, on ne connaît pas, à l'heure actuelle, l'effet d'une infection *in vivo* sur la tolérance des LB.

3) Un lien a été établi entre l'activation des TLR et l'autoimmunité, notamment au cours de l'activation polyclonale des LB. Toutefois, ce rôle n'a été mis en évidence que pour quelques TLR.

Ces récepteurs sont impliqués dans la rupture de la tolérance des LB autoréactifs comme le montrent les travaux d'Elisabeth Leadbetter, grâce à la stimulation conjointe par des CI du BCR et d'un TLR (TLR7 ou TLR9). Néanmoins, ces travaux n'ont pas démontré l'induction d'une production de FR par ces CI, empêchant ainsi d'établir un lien entre l'activation des TLR et une véritable rupture de tolérance.

Dans ce modèle, les TLR sont activés par des ligands endogènes (ADN sous forme de nucléosome, ARN présent dans les snRNP). Étant donné la capacité de ces récepteurs à reconnaître des motifs exprimés par des agents infectieux, ce mécanisme peut-il expliquer une rupture de tolérance par un agent infectieux ?

De plus, l'existence d'un mode de rupture de la tolérance des LB autoréactifs par les TLR tel que décrit par Elisabeth Leadbetter impliquerait des mécanismes de régulation de cette activation des cellules B, permettant la coexistence de cellules apoptotiques et de cellules B FR chez le sujet sain sans que se développe une autoréactivité. Cette régulation pourrait se manifester soit par un contrôle de la libération des CI, soit par un contrôle négatif de l'activation des TLR (Liew, FY, Nat Rev Immunol, 2005) ou du BCR. Dans son étude, Lixin Rui montre que l'activation d'une cellule B anergique et l'induction d'une production d'autoAc par l'ADN CpG est impossible, d'une part, en raison d'un découplage entre le BCR et ses voies de signalisation intracellulaires et d'autre part, parce que la liaison continue de l'autoAg au BCR inhibe la différenciation plasmocytaire en activant la kinase Erk (Rui L, Nat Immunol, 2003). Ces deux processus s'opposent également à l'induction d'une production d'autoAc par le LPS, ligand TLR4 (Rui L, J Immunol, 2006). Toutefois, ces travaux ont été réalisés sur des cellules B anergiques (LB anti-HEL/HEL), dont la signalisation intracellulaire

en aval du BCR est altérée. Ce type de régulation est-il envisageable pour les LB autoréactifs immunologiquement ignorants ?

4) L'IFN- α est associé aux MAI et plusieurs mécanismes susceptibles d'expliquer cette association ont été évoqués. Néanmoins, rien n'indique si la libération de cette cytokine au cours d'une infection peut suffire à rompre la tolérance des LB autoréactifs et à terme induire une MAI ?

PRESENTATION DU PROJET DE THESE

L'objectif de ce travail de thèse est de mieux comprendre le rôle des infections dans la rupture de la tolérance.

Nous avons choisi de nous intéresser aux cellules B exprimant des facteurs rhumatoïdes (FR). Les FR sont des autoAc le plus souvent d'isotype IgM, mais pouvant également exister sous forme d'IgG, d'IgA ou d'IgE et reconnaissant le fragment Fc des IgG. Les LB FR reproduisent le paradoxe évoqué dans la première partie de l'introduction, à savoir que malgré l'existence de mécanismes de tolérance, des cellules B exprimant des FR sont présentes chez le sujet sain à une fréquence non négligeable (2 à 3 LB FR pour 1000 lymphocytes, Hirohata S, J Immunol, 1990). Néanmoins, le taux de FR sécrété chez le sujet sain reste faible, suggérant qu'il existe des mécanismes de régulation de l'activation de ces cellules. Ces FR sont le plus souvent polyréactifs et de faible affinité. Ils se lient aux IgG mais aussi à l'ADN, à la thyroglobuline, la myoglobine, l'actine et la myosine. Les LB exprimant des FR peuvent être activés en dehors de tout contexte d'autoimmunité, notamment au cours d'épisodes infectieux (Djavad N, Eur. J. Immunol, 1996), et produire des FR. Ainsi, de nombreuses infections, comme l'hépatite C, l'endocardite ou la tuberculose sont associées à une production de FR (Dorner T, Curr Opin Rheumatol, 2004).

Les travaux du laboratoire s'intéressent depuis plusieurs années à la tolérance des LB et en particulier à la persistance des cellules B autoréactives chez le sujet sain. Un modèle de souris tg exprimant des FR a, pour cela, été créé au laboratoire avant mon arrivée (Koenig-Marrony S, J Immunol, 2001, Soulas P, Eur J Immunol, 2002, Julien S, J Immunol, 2002). Ce modèle est décrit dans la première partie de l'introduction de ce manuscrit. Pour rappel, ces souris tg expriment des FR chimériques (régions variables humaines, régions constantes murines, figure 11). sous forme IgM seule ou sous forme IgM/IgD. Nous ne rappellerons ici que les résultats concernant la forme IgM/IgD puisque pour ce travail de thèse nous nous sommes intéressés à la rupture de la tolérance de LB matures (IgM⁺/IgD⁺). Deux lignées murines ont été créées :

#La lignée **Smi**, dont les LB expriment un FR de type naturel, de faible affinité ($K_D = 10^{-6}$ M) et polyréactif. Il reconnaît entre autres les IgG humaines, l'ADNsb, la myoglobine et la thyroglobuline (Martin T, J Exp Med., 1992).

#La lignée **Hul**, exprime un FR, monoréactif, reconnaissant les IgG humaines avec une affinité intermédiaire ($K_D = 8.10^{-8}$ M), mais pas les IgG murines. Le FR Hul présente des

mutations somatiques et correspond à un autoAc proche de ceux que l'on retrouve au cours de situations pathologiques (Soulas P, Eur J Immunol, 2002).

L'avantage de ce modèle est double. Les FR chimériques Smi et Hul ne reconnaissant pas les IgG murines, il permet i) de contrôler la présence de l'Ag (IgG humaines), en tout cas pour Hul puisque Smi est un FR polyréactif reconnaissant notamment l'ADNsb, ii) d'étudier le développement des cellules B FR en présence ou en l'absence de l'autoAg, et enfin iii) de séparer les effets de l'introduction de l'Ag en périphérie (injection d'IgG humaines en intraveineuse) ou au niveau central (croisement avec des souris cIgG, Zou YR, Curr Biol, 1994, figure 11). Par ailleurs, il permet d'aborder le rôle de l'affinité du BCR pour l'Ag, dont l'importance dans la tolérance, suggérée par les données de la littérature, est confirmée par l'existence chez le sujet sain de LB autoréactifs exprimant un BCR de faible affinité.

Malgré la présence de l'ADNsb reconnu par le FR Smi, les cellules B FR Smi ne sont pas délétées. Elles ne sont pas activées et ne sécrètent que peu d'Ac tg et ne sont pas anergiques. L'introduction d'un nouvel Ag en périphérie (injection intraveineuse d'IgG humaines) ou au niveau central (croisement des souris tg FR Smi avec des souris KI cIgG, Zou Y, Curr Biol, 1994) ne modifie pas l'état des cellules B FR Smi IgM/IgD (Koenig-Marrony S, J Immunol, 2001, Julien S, J Immunol, 2002).

Dans le modèle tg murin Hul, les cellules B FR Hul IgM/IgD ne sont pas délétées et ne sont pas, elles non plus, anergiques. L'introduction périphérique de l'autoAg (IgG humaines) n'induit ni prolifération, ni activation, ni sécrétion de FR par les LB FR Hul (Soulas P, Eur J Immunol, 2002). Le croisement des souris tg FR Hul avec les souris cIgG ne modifie pas l'ignorance des cellules B FR Hul vis-à-vis des IgG humaines. Ces résultats obtenus par Pauline Soulas-Sprauel seront décrits dans la partie « résultats » de ce travail de thèse (article 1).

L'étude de ces modèles tg FR Smi et Hul a permis de confirmer l'existence d'un nouvel état de tolérance des cellules B, l'ignorance immunologique. Quelle que soit l'affinité du FR pour les IgG, les cellules B FR ne sont pas délétées et ne sont que partiellement anergisées. Ce mode de tolérance reflète assez bien la présence paradoxale de cellules B autoréactives chez l'Homme en dépit de l'existence de mécanismes de sélection négative de ces cellules.

Nous avons utilisé ce modèle pour étudier les mécanismes de rupture de la tolérance B lymphocytaire et pour aborder deux questions restées posées au début de ce travail de thèse.

1) Une infection peut-elle rompre l'ignorance de cellules B autoréactives, dans ce modèle exprimant des FR, telles qu'on en retrouve chez le sujet sain ? Y a-t-il un rôle de l'affinité et de la réactivité du BCR ?

Nous avons mis au point, en collaboration avec Benoît Jauhlac de l'Institut de Bactériologie de Strasbourg, un modèle d'infection chronique systémique des souris tg FR exprimant ou non des IgG humaines, par *Borrelia burgdorferi* (Bb), spirochète agent de la maladie de Lyme.

Nous avons choisi ce modèle infectieux pour trois raisons :

#Bb est à l'origine d'une infection chronique i) permettant une stimulation prolongée des cellules B FR par la bactérie et ii) reproduisant les états infectieux pour la plupart chroniques qui chez l'Homme induisent une production de FR (tuberculose, hépatite C, endocardites bactériennes) ;

#l'infection par Bb aboutit à la dissémination systémique de la bactérie ;

#elle induit une forte réponse immunitaire, et en particulier une forte production d'Ac.

Nous verrons dans l'article 1 que l'infection par Bb rompt l'ignorance des cellules B FR Smi et Hul. Cette rupture dépend en partie de l'affinité du BCR et de la présence de l'Ag. Elle implique une stimulation de la cellule B FR par des CI formés entre des antigènes borréliens et des IgG spécifiques anti-Bb.

2) Le modèle Bb est-il particulier, ou en d'autres termes, un autre agent infectieux est-il capable de rompre la tolérance des cellules B FR Smi et Hul ?

Nous avons donc mis au point en collaboration avec Fanny Monneaux et Sylvianne Muller à l'IBMC de Strasbourg (CNRS UPR 9021) un modèle d'infection des souris tg FR Smi et Hul par le virus influenza (virus de la grippe). Ce modèle infectieux s'oppose en de nombreux points à l'infection par Bb :

#il s'agit d'une infection virale ;

#l'infection des souris est aiguë : les souris ont éliminé l'agent viral en 5 jours environ ;

#l'infection reste localisée au tractus respiratoire supérieur.

Il nous permet ainsi d'évaluer l'importance de facteurs tels que la localisation et la dissémination de l'infection dans la rupture de tolérance. De plus, l'infection par le virus influenza induit une production d'IFN de type I (IFN- α et IFN- β) indispensable à l'élimination du virus. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la production d'IFN- α est associée au développement de certaines MAI, en particulier au LED. Elle pourrait jouer un rôle dans la rupture de tolérance i) en favorisant la présentation des autoAg aux cellules T autoréactives (augmentation de l'expression des molécules de classe I du CMH, rétention des cellules T dans les organes lymphoïdes) ou ii) en facilitant l'activation directe des LB par des ligands exogènes (ARNsb viral) ou endogènes (snRNP/snRNA) du TLR7 dont l'expression par les LB est augmentée chez l'Homme en présence d'IFN- α (Bekeredjian-Ding I, J Immunol, 2005).

La troisième partie de ce travail ne fait pas appel aux modèles tg FR Smi et Hul. Elle s'intéresse néanmoins à un aspect de la rupture de la tolérance liée aux états infectieux : le rôle des TLR. Les données de la littérature suggèrent un rôle de ces récepteurs dans le développement des MAI. Ils ont notamment été impliqués dans la rupture de tolérance de LB autoréactifs par des CI, induite par deux signaux additifs ou synergiques provenant d'une part, de la stimulation du BCR et d'autre part, de l'activation d'un TLR par un ligand endogène présent dans les CI (Leadbetter EA, Nature 2002, Viglianti GA, Immunity, 2003, Lau CM, J Exp Med, 2005). Les résultats que nous avons obtenus au laboratoire semblent impliquer la formation de CI dans la rupture de la tolérance des LB FR Smi et Hul par Bb (voir article 1), nous nous sommes interrogé sur le rôle de ces récepteurs.

Nous avons, dans un premier temps, infecté des souris déficientes pour MyD88 par Bb. MyD88 est une protéine adaptatrice impliquée dans la signalisation intracellulaire de la plupart des TLRs, dont ceux qui pourraient reconnaître Bb (TLR1/2, TLR5 et TLR9), et des récepteurs de l'IL1 et de l'IL18. Ces études devaient nous permettre d'évaluer l'importance de ces récepteurs dans l'activation polyclonale des LB au cours de l'infection par Bb.

Elles serviront ensuite de base à l'étude du rôle des TLR dans la rupture de tolérance dépendante de l'Ag des LB FR Hul (partie de la production de FR observée uniquement chez les souris HulxcIgG et dépendante de l'aide T) grâce à l'analyse de souris tg FR Hul déficientes pour MyD88 et exprimant des cIgG de manière constitutive (souris quadruples tg exprimant les transgènes de la chaîne lourde et de la chaîne légère de Hul, knock-in pour les cIgG et déficientes pour MyD88).

MATERIELS ET METHODES

L'essentiel des matériels et méthodes utilisées est décrit dans la section « Matériels et Méthodes » des articles 1, 2 et 3. Nous ne reviendrons ici que sur quelques points importants et sur les éléments techniques des résultats complémentaires de l'article 3.

I/ Les souris tg et knock-out

Plusieurs lignées tg et déficientes ont été utilisées au cours de ce travail. En dehors des souris tg FR Smi et Hul obtenues au laboratoire, et des souris knock-in (KI) cIgG fournies par Klaus Rajewski (CBR Institute for Biochemical Research, Harvard Medical School, Boston Massachusetts, USA) et maintenues dans notre animalerie, toutes les autres lignées de souris ont été obtenues au Centre de Distribution, de Typage et d'Archivage d'Orléans (CDTA) avec l'autorisation de Bernard Ryffel.

Les croisements nécessaires à l'obtention des souris tg Smi et Hul en présence ou en l'absence de l'autoAg, utilisées pour les infections par Bb et par le virus influenza sont représentés dans la figure 12.

Remarque : Toutes les souris utilisées dans ce travail sont de fond génétique C57BL/6.

II/ L'infection par le virus influenza

Pour l'élaboration de ce modèle, nous avons travaillé en collaboration avec Fanny Monneaux et Sylvianne Muller, qui connaissaient déjà bien ce virus chez la souris.

Il existe de nombreuses souches du virus influenza de type A. Nous avons choisi la souche NT/60/68 d'une part, parce qu'elle induit une réponse humorale chez la souris et d'autre part, parce qu'elle avait déjà été utilisée auparavant par l'équipe de Fanny Monneaux et Sylvianne Muller, ce qui facilitait le suivi de l'infection et l'évaluation de la réponse humorale. Néanmoins, nous nous sommes aperçus par la suite que cette souche n'est pas celle qui active le plus les LB. Elle appartient au groupe des souches dont l'hémagglutinine possède une activité mitogène intermédiaire (Rott P, J Immunol, 1994).

Le virus est administré par voie intranasale, sous anesthésie (injection intramusculaire d'un mélange Kétamine+Xylazine). On administre de la même façon du fluide allantoïque aux souris contrôles non infectées.

L'infection par le virus influenza des souris tg FR a nécessité une mise au point de la dose de virus instillé aux souris. Pour cela nous avons infecté ces souris avec doses croissantes du virus (30, 40 et 50 μ l de virus à 1280 unités d'hémagglutination/ml) et suivi leur poids pendant cinq jours, la perte de poids étant généralement directement corrélée à l'infection.

Nos souris se sont révélées plus résistantes à l'infection que des souris BALB/c habituellement utilisées dans le laboratoire de Fanny Monneaux et Sylvianne Muller. En effet, alors que l'infection de souris BALB/c par 30 ou 40 µl de virus suffit à induire une perte de poids mortelle chez ces animaux, les souris tg FR Smi et Hul, qui sont sur un fond C57BL/6, tolèrent sans problème l'instillation d'une telle quantité de virus malgré une perte de poids allant de 10 à 40% de leur poids initial. Nous avons choisi d'infecter nos souris avec 30 µl de virus influenza A/NT/60/68, étant donné l'effet comparable de toutes les doses testées sur le poids des animaux (démontrant bien l'infection des souris) et pour des raisons d'économie du virus. Il est important de noter qu'il existe une grande variabilité interindividuelle quant à la sensibilité au virus. Nous avons pu observer, au cours de nos expériences, une mortalité certes faible mais récurrente chez les souris tg FR et non FR en raison d'une perte de poids trop importante. Ceci, ajouté à la faible probabilité d'obtenir des animaux tg FR avec ou sans l'autoAg, a rendu longue la constitution de groupes d'animaux de taille suffisante à l'analyse des résultats.

III/Infection par Bb et charge bactérienne

A/Choix de la souche et sensibilité des souris

Ce modèle d'infection a été élaboré en collaboration avec Benoît Jaulhac de l'Institut de Bactériologie de Strasbourg. Nous avons infecté les souris tg FR par la souche N40 de Bb à un inoculum moyen (10^5 - 10^6 Bb) par voie intradermique à l'âge de 4-6 semaines. Cette souche répond en effet à tous les critères que nous avons établis pour le choix de l'infection utilisée à avoir : une infection chronique, à dissémination systémique et qui stimule assez fortement la réponse immunitaire, en particulier humorale, de la souris (Barthold SW, J Infect Dis, 1990). De plus, les souris infectées par cette souche développent une arthrite entre 12 et 16 jours après l'infection ce qui nous permet de contrôler l'infection des animaux. Il est important de rappeler qu'il existe une différence de sensibilité à Bb selon la lignée de souris infectée. Les souris que nous avons infectées (souris FR et MyD88^{-/-}) sont sur un fond génétique C57BL/6, peu sensible à l'infection par Bb (Barthold SW, J Infect Dis, 1990). Nous avons effectivement constaté que toutes nos souris infectées (culture positive pour Bb), de fond C57BL/6, ne développent pas une arthrite alors que c'est le cas de 100% des souris C3H, souche sensible à l'infection par Bb habituellement utilisée dans la littérature (Barthold, 1990).

B/ Charge bactérienne

Dans la littérature, deux études de l'infection de souris MyD88^{-/-} par Bb montrent une élévation importante de la charge bactérienne évaluée par l'expression de Rec A ou de Osp A, deux protéines de Bb (augmentée d'environ 100 fois par rapport à une souris « sauvage ») en l'absence de MyD88 (Bolz DD, J Immunol, 2004, Liu N, Infect Immunol, 2004). Nous avons effectivement confirmé ces données (figure 13) en réalisant une quantification par RT-PCR quantitative l'ADN de la flageline (Fla) de Bb. L'avantage de ce choix est qu'il n'existe qu'une seule copie de ce gène par bactérie, ce qui permet une évaluation précise du nombre de bactéries. Cette technique a été développée par l'équipe de Benoît Jauhac au Laboratoire de Bactériologie de la faculté de Médecine de Strasbourg, chez qui nos échantillons ont été testés selon la méthode décrite dans la section « Matériels et Méthodes » de l'article 3.

IV/Stimulation *in vitro* des cellules dendritiques

Afin d'observer *in vitro* le comportement de cellules dendritiques déficientes pour MyD88, il a d'abord fallu mettre au point une méthode permettant d'obtenir ces cellules dendritiques en quantité suffisante. Nous avons pour cela utilisé une méthode décrite dans la littérature (Lutz MB, J Immunol Methods, 1999).

Les cellules de la moelle osseuse sont cultivées dans des boîtes de Petri de 100 mm de diamètre (Falcon, No.1029) dans du RPMI 1640 supplémenté avec de la gentamicine (40 µg/ml, GibcoBRL), 10% de sérum de veau foetal (GibcoBRL), du β-mercaptoethanol (50 µM, Sigma) et du GMCSF (20 ng/ml, Peprotech) pendant neuf jours. Le milieu de culture est changé aux jours 3 et 8 de culture, ce qui permet d'éliminer les granulocytes (cellules non adhérentes) de la culture. A J6, la moitié du surnageant contenant les cellules peu adhérentes, dont font partie les cellules dendritiques, est récupérée et centrifugée. On élimine ainsi de la culture les cellules adhérentes, comme les macrophages. Le culot est ensuite repris dans du milieu de culture (10 ml) et remis en culture dans une nouvelle boîte de Pétri. Après neuf jours de culture, 70% des cellules cultivées à partir de la moelle expriment le CD11c, marqueur des cellules dendritiques.

Les cellules dendritiques ainsi obtenues sont stimulées pendant 24h avec un anti-CD40 (10 µg/ml, Pharmingen), du LPS (1 µg/ml, Sigma) ou Bb (2.5 et 1 µg/ml) en l'absence de GMCSF, puis récupérées et marquées pour une analyse par cytométrie en flux.

V/Blocage *in vivo* des cellules NK

Les cellules NK sont bloquées *in vivo* grâce à un Ac monoclonal anti-NK1.1 (PK136). Les souris MyD88^{-/-} sont traitées par injection intrapéritonéale d'un Ac anti-NK1.1 (clone PK138) dans de l'ascite (75 µl d'ascite + 25 µl de PBS) ou de PBS (100 µl, souris contrôle) pendant toute la durée de l'infection. L'Ac est injecté une première fois deux jours avant l'infection (J-2, 200 µg), le jour de l'infection (J0, 200 µg) puis tous les six jours pendant trois semaines (J6, J12, J18, 300 µg/injection) (Nilsson N, Clin Exp Immunol, 1999). L'efficacité du blocage est vérifiée par cytométrie en flux (Ac monoclonal anti-NK1.1 (PK136)).

VI/Blocage *in vivo* de l'IL-4

Etant donné le temps nécessaire pour obtenir suffisamment d'Ac nous avons choisi de bloquer la production d'IL-4 des souris MyD88^{-/-} grâce à l'injection intrapéritonéale d'un Ac monoclonal anti-IL4 purifié (clone BVD4-1B11, Southern Biotech) ce qui a limité le nombre d'animaux traités. Nous nous sommes appuyés sur certains travaux de la littérature (Sadick MD, J Exp Med, 1990) pour déterminer le protocole d'injection de l'Ac. Nous avons ainsi réalisé deux injections de 250 µg d'Ac anti-IL4 par semaine pendant trois semaines, la première injection ayant lieu le jour de l'infection. La souris MyD88^{-/-} contrôle « non traitée » est injectée avec du PBS.

VII/Quantification de l'AID (*activation-induced deaminase*)

Pour cette quantification, nous travaillons sur des cellules B ganglionnaires purifiées grâce au système MACS (tri négatif par billes magnétiques anti-CD43).

L'ADN est extrait à l'aide de Trizol[®] (1 ml pour 10⁶ cellules B, Invitrogène), puis transformé en cDNA grâce au kit « High capacity cDNA archive kit » (Applied Biosystem) selon les instructions du fabricant.

La quantification de l'ARNm de l'AID est réalisée grâce au kit Taqman de mesure de l'expression du gène de l'AID (TaqMan Gene expression assay, Applied Biosystem) et au master mix Taqman (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystem) selon les recommandations du fabricant. De la même façon, nous avons mesuré la quantité d'ARN ribosomal 18s présent dans les LB, servant de référence (*housekeeping gene*).

RESULTATS ET DISCUSSION

Première Partie :

Une infection peut-elle rompre la tolérance
des LB FR Smi et Hul ?

I/ L'infection chronique par *Borrelia burgdorferi* rompt l'ignorance de cellules B FR Smi et Hul

Article 1

AUTOANTIGEN, INNATE IMMUNITY AND T CELLS COOPERATE TO BREAK B CELL TOLERANCE DURING BACTERIAL INFECTION

Pauline Soulas, Anne Woods, Benoît Jaulhac, Anne-Marie Knapp, Jean-Louis Pasquali,
Thierry Martin, Anne-Sophie Korganow

J Clin. Invest., 2005, 115(8), 2257-2267

L'objectif de ce travail était de savoir si une infection peut rompre l'ignorance des LB FR Smi et Hul. La première partie a été réalisée par Pauline Soulas-Sprauel (analyse du modèle HulxcIgG, infection et étude du phénotype des animaux infectés).

Les travaux précédents du laboratoire, présentés en introduction, avaient montré que les cellules FR Hul se développent normalement et que l'introduction de l'autoAg (Ig humaines) en périphérie n'induit ni la délétion des LB FR, ni leur activation. Ces cellules sont présentes en périphérie et ne sont pas anergiques. L'analyse de l'effet de l'introduction centrale de l'autoAg sur la tolérance des cellules B FR Hul, encore jamais décrite, est présentée dans cet article. Ces cellules se développent normalement et ne sont pas activées, malgré la présence des IgG chimériques. L'expression de l'autoAg de manière constitutive ne modifie pas le nombre de cellules B spléniques. La majorité des cellules B FR Hul présente un phénotype typique de LB folliculaires naïfs. Toutefois, comme cela a déjà été décrit pour les souris Hul (sans expression constitutive de l'autoAg) (Soulas P, Eur J Immunol, 2002), les cellules B FR Hul ne se développent pas de la même façon que chez les souris Smi. En effet, alors que dans le modèle FR Smi la plupart des cellules B expriment le FR tg Smi, les cellules FR Hul ne

représentent que 40% des LB spléniques et ganglionnaires (figure 14), elles sont identifiées par une expression forte de l'IgMa et de la chaîne légère du FR tg, reconnue par l'anti-idiotype 17.109. Les autres cellules B expriment l'IgMa du FR Hul mais pas ou peu la chaîne légère (17.109^{low/neg}). Ces cellules ont édité un autre BCR : elles expriment une chaîne légère endogène et ne reconnaissent pas les IgG humaines ou chimériques (Soulas P, Eur J Immunol, 2002). Enfin, les cellules B FR Hul, malgré leur non réactivité vis-à-vis des IgG humaines *in vitro* restent activables par un stimulus BCR dépendant et ne sont donc pas anergiques.

La plupart des souris FR ainsi que les contrôles non FR développent une arthrite au bout de deux semaines d'infection environ. Quatre semaines après l'infection, toutes les souris développent une réponse IgG anti-Bb et présentent une culture positive pour Bb pour au moins un organe (peau de l'oreille, cœur ou vessie).

L'infection par Bb induit une augmentation du nombre de cellules B d'au moins trois fois par rapport aux témoins non infectés quelle que soit la lignée considérée. Cette expansion affecte aussi bien les cellules B FR que les cellules B non FR.

L'analyse de l'expression du marqueur d'activation CD86 par les LB montre que les LB FR des souris Hul infectées exprimant de manière constitutive les cIgG (HulxcIgG) sont activées mais pas les cellules B non FR. De même, l'infection par Bb n'active pas les LB FR des souris Hul, Smi, et SmixcIgG.

Bb induit également une élévation des concentrations sériques d'IgM totales de 2-3 fois dans toutes les souris infectées par rapport aux souris non infectées. Les taux de FR sont eux aussi augmentés après l'infection, mais contrairement aux IgM totales, cette augmentation est influencée par l'affinité du FR (Hul>Smi) et par la présence de l'autoAg (SmixcIgG et HulxcIgG > Smi et Hul).

L'infection par Bb est donc capable de rompre la tolérance des LB FR Hul et d'induire une libération de FR par ces cellules. Nous nous sommes ensuite interrogés sur le mécanisme de cette rupture.

Des données de la littérature montrent que les lipoprotéines de Bb possède une activité mitogène sur les LB humains et murins *in vitro* et pourraient être à l'origine de l'activation polyclonale des LB observée au cours de l'infection. Les LB de souris C57BL/6 et de souris tg Hul et HulxcIgG sont effectivement activés directement par Bb *in vitro*. Cette stimulation fait intervenir les TLRs puisque des LB spléniques de souris de souris déficientes pour MyD88 ne sont pas stimulables dans les mêmes conditions. Néanmoins, cette activation directe polyclonale des LB par Bb n'explique pas l'augmentation de la production de FR

induite par l'infection lorsque l'Ag est présent. Cette différence pourrait s'expliquer par l'intervention d'une aide ou par un signal synergique entre le BCR et un autre récepteur qui renforcerait l'activation de la cellule B FR Hul.

Le récepteur apportant un signal synergique au BCR pouvait être un TLR, ainsi que l'avaient suggéré les travaux d'Elisabeth Leadbetter (Leadbetter EA, Nature, 2003). Nous avons donc stimulé des LB tg FR Hul purifiés *in vitro* par des CI formés d'Ag borréliens et d'IgG humaines anti-Bb. Ceci induit une prolifération et une activation des cellules B FR ainsi qu'une production de FR supérieures à celle que l'on observe lorsque les LB sont stimulés uniquement par Bb. Cet effet n'est pas observé pour les cellules B non FR IgMa⁺17.109^{low/neg}. L'augmentation de la prolifération des LB FR induite par les CI est bloquée par l'adjonction de cyclosporine A (inhibiteur de la signalisation du BCR), indiquant le rôle du BCR dans la stimulation des cellules B FR purifiées par les CI.

Etant donné que nous avons utilisé des LB purifiés pour ces expériences de stimulation, ni la prolifération ni l'activation ne semblaient nécessiter la présence des LT. En revanche, nous n'avons pas mis en évidence de production de FR dans ces conditions. Seule l'adjonction d'un Ac anti-CD40 agoniste aux CI Bb/IgG anti-Bb permet d'observer une telle production, démontrant que celle-ci nécessite l'aide des LT. Nous avons pu confirmer ceci *in vivo* en réalisant un blocage des cellules T CD4. Celui-ci provoque une diminution de la production de FR chez les souris infectés exprimant le FR Hul en présence constitutive de l'autoAg (HulcIgG) mais pas lorsque ce dernier est absent (Hul). Ceci suggère que seule la production de FR dépendante de l'autoAg dépend d'une aide T.

En conclusion, l'infection par Bb est capable de rompre la tolérance des LB FR et d'induire une production de FR. Celle-ci fait intervenir deux mécanismes additifs ou synergiques :

- 1) **une activation polyclonale, T-indépendante**, et probablement médiée par les TLR présents à la surface des lymphocytes B et capables de reconnaître Bb (TLR1/2 et TLR9) ;
- 2) **une activation dépendante de la présence de l'Ag (cIgG) dépendante de l'aide des LT.**

Le mécanisme de l'induction de la production de FR par Bb et les CI Bb/IgG anti-Bb est rappelé dans la figure 15

II/Conclusion et discussion

L'infection chronique et systémique par *Borrelia burgdorferi* (Bb) rompt la tolérance des LB FR Smi et Hul. Elle entraîne une expansion et une activation des lymphocytes B ganglionnaires et une différenciation en cellules productrices de FR. La production de FR est d'autant plus marquée que l'autoantigène est présent et que l'affinité du FR est élevée. Elle est la conséquence *in vitro* de deux signaux additifs ou synergiques perçus par la cellule B par l'intermédiaire du BCR et d'un TLR.

Deux points restent à éclaircir :

#Quel est le rôle des TLR *in vivo* ?

L'ensemble des résultats invoquant un rôle des TLR dans la rupture de la tolérance ont été obtenus *in vitro*. Nous souhaitons donc confirmer ce rôle *in vivo* en infectant des souris déficientes pour MyD88 et exprimant le FR Hul en présence constitutive de l'autoAg (knock-in cIgG). Ces souris quadruples tg sont longues à obtenir et en attendant, nous avons étudié la réponse de souris déficientes pour MyD88, protéine adaptatrice intervenant dans la signalisation intracellulaire de la plupart de TLR, n'exprimant pas le tg FR Hul à l'infection par Bb. Ces résultats sont présentés plus loin.

#Le modèle de rupture de la tolérance est-il propre à Bb ?

Pour répondre à cette question nous avons choisi d'étudier la réponse des cellules B FR Smi et Hul à un autre agent infectieux, le virus influenza. Ces résultats sont présentés dans la partie qui suit.

Deuxième partie :

Un autre agent infectieux peut-il rompre la tolérance des
cellules B FR Smi et Hul ?

I/ L'infection aiguë et localisée par le virus influenza ne rompt pas la tolérance des cellules B
FR Smi et Hul (manuscrit en préparation)

Article 2

INFLUENZA VIRUS INDUCED TYPE I IFN LEADS TO POLYCLONAL B CELL
ACTIVATION BUT DOES NOT BREAK B CELL TOLERANCE

Anne Woods, Fanny Monneaux, Pauline Soulas-Sprauel, Sylvianne Muller, Thierry Martin,
Anne-Sophie Korganow, and Jean-Louis Pasquali.

Nous souhaitons définir l'impact d'un autre agent infectieux sur la rupture de tolérance des LB FR dans notre modèle tg. Pour les raisons que nous avons évoquées dans la présentation du projet de thèse, nous avons infecté les souris tg FR Smi et Hul avec le virus influenza, en collaboration avec Fanny Monneaux et Sylvianne Muller de l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg (CNRS UPR 9021).

Il est important de préciser qu'*in vitro*, le virus influenza n'active pas les LB purifiés. L'activation de ces cellules n'est possible que lorsque les LB sont cultivés parmi d'autres cellules ganglionnaires. Cette activation est médiée par l'IFN de type I, puisque les cellules B ne sont pas activées par le virus lorsque le récepteur des IFNs de type I est bloqué. Ces résultats confirment des données de la littérature montrant *in vivo* que l'infection par le virus de la grippe induit chez la souris une libération d'IFN de type I et que ce dernier active directement des cellules B *in vitro* (Coro ES, J Immunol, 2006).

Les souris tg FR Smi et Hul ainsi que les souris contrôles non tg sont infectées par voie intranasale avec le virus influenza de type A/NT/60/68, souche H3N2. Elles développent une infection locorégionale, rapide et spontanément résolutive associée à une perte de poids permettant de contrôler visuellement que les animaux ont bien été infectés. Les souris infectées développent des anticorps spécifiques du virus (IgG murines et cIgG anti-influenza) dans un délai de 15 jours.

L'infection des souris tg FR Smi et Hul par le virus de la grippe entraîne une expansion et une activation des cellules B FR et non FR ganglionnaires, comparables que l'autoantigène soit présent ou non chez les souris tg et quelle que soit l'affinité du FR.

Cette activation polyclonale des lymphocytes B n'aboutit pas à la production d'IgM ou d'IgM-FR chez les animaux infectés par rapport aux contrôles non infectés. La réintroduction du virus ne suffit pas à induire de production de FR.

Cette activation des LB FR Smi et Hul est abortive, puisqu'elle n'aboutit pas à la production d'autoAc, et elle ne dépend pas de la présence des lymphocytes T. En effet, le blocage de ces cellules, par un Ac bloquant anti-CD4, ne modifie pas l'expansion des cellules FR et non FR induite par l'infection.

L'activation polyclonale des cellules B, provoquée par la libération d'IFN de type I au cours de l'infection par le virus influenza, ne suffit donc pas à rompre la tolérance des cellules B FR Smi et Hul et à induire la production de FR.

Qu'advient-il sur un fond génétique autoimmun ? Un fond génétique susceptible facilite-t-il une rupture de la tolérance par le virus influenza ?

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé le modèle murin NZBxNZW (F1). Ces souris développent spontanément une atteinte de type lupique caractérisée par une glomérulonéphrite avec dépôts de CI sur la membrane basale glomérulaire, une hypergammaglobulinémie, et une production d'autoAc anti-ADN double brin débutant à l'âge de 4-5 mois. Les souris NZBxNZW (F1) sont infectées avec le virus de la grippe, à un stade de développement de la maladie où les cellules B autoréactives sont déjà activées, mais où les animaux ne sont pas encore malades et ne produisent pas d'autoAc. L'infection induit une prolifération et une activation des cellules B. Néanmoins, comme chez les souris FR Smi et Hul, non autoimmunes, l'activation reste abortive et n'induit pas de production d'autoAc.

II/Conclusion et discussion

L'infection des souris tg FR par le virus de la grippe n'induit qu'une activation polyclonale abortive des cellules B FR Smi et Hul : l'expansion et l'activation des cellules B FR et non FR n'aboutissent pas à la production d'IgM ou d'IgM-FR. Cette activation ne dépend ni de la présence de l'autoantigène, ni d'une aide T, ni de l'affinité du FR. Elle pourrait être liée à la production d'IFN de type I au cours de l'infection.

Les résultats obtenus au cours de cette infection semblent suggérer que les conditions de rupture de la tolérance de cellules B FR Smi et Hul sont assez strictes. L'infection bactérienne chronique et systémique par Bb réunit ces conditions, mais ce n'est pas le cas d'une infection aiguë et localisée par le virus influenza.

La différence de réactivité des lymphocytes B FR au cours de ces deux infections peut d'une part être liée au type d'infection, une infection chronique et systémique paraissant plus favorable à une rupture de la tolérance. Les résultats obtenus par Lukas Hunziker semblent aller dans le même sens puisque dans ses travaux la rupture de la tolérance est induite par une infection virale **chronique** par le LCMV (Hunziker L, Nat Immuno, 2003).

D'autre part, cette différence peut s'expliquer par un mode d'activation des cellules B différent selon l'agent infectieux. En effet, nous montrons, que Bb est reconnue directement par les lymphocytes B, probablement par l'intermédiaire des TLR, alors que le virus influenza active les cellules B indirectement, peut être en induisant la libération d'IFN de type I.

Troisième partie :
Rôle des TLR dans la rupture de la tolérance
des LB FR Smi et Hul

Les résultats obtenus dans le modèle d'infection des souris tg FR par *Borrelia burgdorferi* (Bb) suggèrent que la rupture de la tolérance des cellules B FR Hul en présence constitutive de l'autoAg (cIgG) est la conséquence de deux signaux additifs ou synergiques perçus par la cellule B suite à la reconnaissance de CI Bb/IgG anti-Bb, et provenant de l'activation du BCR et des TLR.

I/ Rôle des TLR *in vivo* dans la rupture de la tolérance des LB FR Hul

Afin de confirmer *in vivo* le rôle des TLR dans la rupture de tolérance des LB FR Hul lorsque l'autoAg est présent de manière constitutive, nous avons débuté le croisement de ces souris tg FR sur un fond déficient pour MyD88 (souris MyD88^{-/-}), protéine adaptatrice impliquée dans la signalisation intracellulaire de la plupart des TLRs et des récepteurs de l'IL-1 et de l'IL-18 (Akira S, Cell, 2006). Nous avons déjà infecté plusieurs souris et les résultats de ces expériences sont en cours d'analyse.

En raison de la complexité de ces croisements (figure 16), et pour aborder plus rapidement le rôle des TLR dans l'activation polyclonale des lymphocytes B au cours de l'infection par Bb, nous avons infecté des souris MyD88^{-/-} non tg.

II/ MyD88 contribue au contrôle négatif de l'hypergammaglobulinémie polyclonale induite par *Borrelia burgdorferi* (article soumis)

Article 3

MYD88 NEGATIVELY CONTROLS HYPERGAMMAGLOBULINEMIA AND
AUTOANTIBODY PRODUCTION DURING BACTERIAL INFECTION

Running title : MyD88 controls hypergammaglobulinemia during bacterial infection

Anne Woods*, Pauline Soulas*, Bérénice Arditi, Anne-Marie Knapp,
Benoît Jaulhac, Jean-Louis Pasquali, Anne-Sophie Korganow and Thierry Martin

*These authors contributed equally to this work

Les TLRs sont importants pour la reconnaissance de nombreux pathogènes et pour la réponse innée aux infections. Bb est d'ailleurs incapable d'activer des cellules B purifiées déficientes pour MyD88 *in vitro*, alors que des LB exprimant MyD88 (MyD88^{+/-}) sont activés par cette bactérie dans les mêmes conditions. Nous nous attendions donc à une diminution voire même une absence des réponses cellulaires ou humorales chez les animaux MyD88^{-/-} infectés par Bb.

Toutefois, à notre grande surprise, nous avons mesuré chez ces souris :

- i) une expansion très importante des lymphocytes B ganglionnaires, au cours de l'infection par Bb le nombre absolu de LB multiplié par 20 chez les souris MyD88^{-/-} et par 3 chez les MyD88^{+/-},
- ii) une hypergammaglobulinémie de type IgM considérable, les taux sériques d'IgM sont 4 fois supérieurs à ceux d'une souris MyD88^{+/-}.

Les IgG murines ne sont pas augmentées dans les mêmes proportions que les IgM, mais nous avons constaté une modification de la contribution des différentes sous-classes d'IgG essentiellement des IgG1 et des IgE caractéristiques d'une réponse de type Th2. Ce profil Th2, déjà présent chez les animaux non infectés, s'accroît après l'infection par Bb. Les souris MyD88^{-/-} en revanche développent une réponse de type Th1 (IgG2c). La répartition des sous-classes d'IgG spécifiques anti-Bb est identique.

iii) une production d'autoanticorps d'isotype IgM (IgM FR, IgM anti-ADN et anti-thyroglobuline) à des taux comparables à des souris MRL/lpr.

Ces observations semblent indiquer un rôle de MyD88 dans le contrôle de l'activation non spécifique post-infectieuse des LB. Nous nous sommes donc intéressés au mécanisme de cet effet régulateur de MyD88 :

#l'hypergammaglobulinémie n'est probablement pas due à une augmentation de la charge bactérienne.

Les souris déficientes pour MyD88 présentent une charge bactérienne 100 fois supérieure à une souris C57BL/6 (Bolz DD, J Immunol, 2004, Liu N, Infect Immun, 2004 et nos propres résultats – voir section « Matériel et méthodes ») au niveau des articulations. En revanche, la charge bactérienne est la même dans les ganglions lymphatiques, que MyD88 soit présent ou non. De plus, des souris TLR2^{-/-} infectées par Bb, présentant elles aussi une charge bactérienne élevée (Wooten RM, J Immunol, 2002), ne développent pas d'hypergammaglobulinémie. L'hypergammaglobulinémie constatée chez les souris déficientes pour MyD88 infectées par Bb n'est donc pas la conséquence d'une charge bactérienne plus élevée.

#cette activation anormale n'est pas la conséquence d'un défaut intrinsèque aux LB.

En effet, les LB MyD88^{-/-} ne sont pas activables *in vitro* par Bb. De plus, le transfert de LB MyD88^{-/-} ou MyD88^{+/-} à des souris infectées dépourvues de LB (souris μ MT) induit une expansion des LB comparable, que les cellules transférées soient déficientes ou non pour MyD88, et une production d'IgM réduite lors du transfert de LB MyD88^{-/-}.

#les LT CD4 sont indispensables au développement de l'hypergammaglobulinémie post-infectieuse des souris MyD88^{-/-}.

En effet, le blocage des LT CD4 chez les souris MyD88^{-/-} infectées réduit considérablement la production d'IgM sans effet sur l'expansion des cellules B. **Cet effet s'exerce indépendamment de la présence de MyD88 dans les LT CD4**, puisque la réponse à l'infection par Bb des LB de souris CD3 ϵ ^{-/-} (dépourvus de LT), transférés avec des LT MyD88^{-/-} ou MyD88^{+/-}, est la même que MyD88 soit présent ou non.

Un rôle des LT régulateurs CD4⁺CD25⁺ sur les fonctions des LB a été suggéré dans plusieurs études récentes (Sakagushi S, Cell, 2000, Jiang H, N Engl J Med, 2006). Toutefois, nos résultats n'indiquent pas de défaut de ces cellules en l'absence de MyD88. En effet, le nombre des LT CD4⁺CD25⁺CD45RB^{low} chez les souris MyD88^{-/-} est le même que chez des souris « sauvages ». De plus, dans les expériences de transfert, malgré la présence d'un nombre similaire de cellules T CD4⁺CD25⁺ parmi les LT MyD88 et MyD88^{+/-} transférés, nous n'avons pas observé de modification de l'activation des LB.

#les fonctions des cellules dendritiques semblent altérées lorsque MyD88 est absent.

In vivo, nous observons bien une activation de ces cellules chez les animaux MyD88^{-/-} infectés par Bb, mais celle-ci s'accompagne paradoxalement d'une diminution des concentrations sériques de cytokines de type Th1 (IL-12 et IFN-gamma), par rapport à ce que l'on observe chez une souris MyD88^{+/-}. Ceci confirme les données de la littérature (Kaisho T, Int.Immunol., 2002, Muraille E, J.Immunol., 2003).

In vitro, l'environnement des LB ganglionnaires au cours de l'infection par Bb, reconstitué à partir de cellules « non B » de ganglions de souris infectées par Bb pendant 20 jours, produit de l'IL4 (Th2) en présence de Bb lorsque MyD88 est absent, et de d'IL-12 et de l'IFN-gamma (Th1) lorsque MyD88 est présent.

En l'absence de MyD88, l'infection par Bb induit une activation polyclonale des LB s'accompagnant d'une augmentation très importante des IgM sériques mais pas des IgG, suggérant un rôle régulateur de cet adaptateur sur l'hypergammaglobulinémie polyclonale post infectieuse. Cet effet de MyD88 pourrait être lié à un défaut des cellules dendritiques MyD88^{-/-} associé à un déséquilibre de la balance Th1/Th2 entraînant une production d'IL-4 et ainsi une activation polyclonale anormale des lymphocytes B (figure 17).

Nous avons réalisé quelques expériences complémentaires permettant d'éclaircir certains points de ce travail et d'approfondir notre compréhension de certains mécanismes évoqués pour expliquer le rôle de MyD88 dans l'hypergammaglobulinémie post infectieuse.

II/ Résultats complémentaires

A/ Rôle des cellules NK dans l'hypergammaglobulinémie des souris MyD88^{-/-}

Plusieurs études récentes ont montré l'importance des cellules NK (pour *natural killer*) dans les réponses immunitaires innée et adaptative grâce à leur interaction avec les cellules dendritiques (DC). Ces deux populations cellulaires interagissent par contact cellulaire mais aussi par l'intermédiaire de cytokines. Ainsi les cellules NK sécrètent du TNF- α et de l'IFN- γ qui active et induit la maturation des DC (Borg C, Blood, 2004, Walzer T, Blood, 2005). Les DC libèrent de l'IL-12 et de l'IL-15, essentielles à une production optimale de cytokines par les cellules NK, mais aussi de l'IFN de type I (IFN- α et IFN- β), indispensable à l'activité cytotoxique des cellules NK et à leur activation par les DC (Degli-Esposti MA, Nat Rev Immunol, 2005).

L'influence des cellules NK sur la maturation des DC nous a conduit à nous interroger sur le rôle de ces cellules dans l'activation polyclonale des LB induite par Bb en l'absence de MyD88.

Nous avons donc bloqué les cellules NK chez les souris MyD88^{-/-} par des injections intrapéritonéales d'un Ac monoclonal anti-NK1.1 bloquant dans de l'ascite pendant toute la durée de l'infection. L'efficacité du blocage est confirmée par un marquage des cellules NK1.1 et une observation de ces cellules par cytométrie en flux (figure 18a).

L'expansion et l'activation des LB observées chez les souris déficientes pour MyD88^{-/-} infectées par Bb ne sont pas modifiées par le blocage des cellules NK (figure 18b) par rapport à une souris MyD88^{-/-} infectée mais non traitée par l'Ac bloquant. De même, l'hypergammaglobulinémie d'isotype IgM persiste après blocage des cellules NK (figure 18b).

Les cellules NK ne semblent donc pas impliquées dans le phénotype des souris MyD88^{-/-}.

B/Rôle de la voie de l'IL-1 et de l'IL18 dans l'hypergammaglobulinémie des souris MyD88^{-/-}

La protéine adaptatrice MyD88 ne participe pas seulement à la signalisation intracellulaire des TLR. Elle intervient également dans la transmission du signal provenant des récepteurs de l'IL-1 et de l'IL-18. Le phénotype que nous observons chez les souris MyD88^{-/-} infectées par Bb pourrait donc être lié à un rôle de l'IL-1 et/ou de l'IL-18 dans la régulation de l'activation polyclonale des LB au cours de l'infection par Bb.

Pour tester cette hypothèse, nous avons infecté des souris déficientes pour ICE (*interleukine converting enzyme*), enzyme de conversion de la pro-IL-1 et de la pro-IL-18 en IL-1 et en IL-

18 (souris ICE^{-/-}, ne produisant ni IL-1, ni IL-18), ou déficientes pour le récepteur de l'IL-18 (souris IL-18R^{-/-}). Aucune de ces souris ne reproduit l'expansion des cellules B ou l'hypergammaglobulinémie d'isotype IgM des souris MyD88^{-/-} infectées par Bb (figure 19). La régulation négative de l'activation polyclonale des LB, exercée par MyD88 au cours de l'infection par Bb, semble donc passer par les TLR et non par les récepteurs de l'IL-1 et de l'IL-18.

En raison des difficultés que nous avons eu à obtenir les souris ICE^{-/-} et IL18R^{-/-} auprès du CDTA (fond génétique C57BL/6 récemment obtenu et très demandé), l'analyse présentée sur la figure 19 n'est basée que sur l'infection d'un animal ICE^{-/-} et d'un animal IL-18R^{-/-} et leurs contrôles respectifs. Elle devra être confirmée.

C/Comment expliquer le déséquilibre de la balance Th1/Th2 dans les souris MyD88^{-/-}

L'orientation de la balance Th1/Th2 vers une réponse de type Th2 dans notre modèle pourrait être liée soit à un défaut d'IL-12, soit à un excès d'IL-4. Nous avons essayé de tester ces deux hypothèses en bloquant ces deux voies.

1)Effet de l'absence de l'IL-12

Si le phénotype observé chez les animaux déficients pour MyD88 s'explique par une orientation de la réponse vers un profil Th2 liée à un défaut d'IL-12, nous avons supposé que des souris déficientes pour l'IL-12 (IL-12^{-/-}) développeraient la même hypergammaglobulinémie que les souris MyD88^{-/-}.

Nous avons donc infecté des souris IL-12^{-/-} sur fond C57BL/6 par Bb et comparé leur réponse à celle des souris C57BL/6 dont la réponse à l'infection est identique à celle des souris MyD88^{+/-}. Ces souris IL-12^{-/-} montrent une expansion des cellules B (figure 20a) et une production d'IgM (figure 20b) comparables à celles d'une souris C57BL/6, ne correspondant en rien à ce que l'on observe chez les souris déficientes pour MyD88.

Le défaut d'IL12 ne semble donc pas expliquer le phénotype des LB chez les souris MyD88^{-/-} au cours de l'infection par Bb. Néanmoins, ces résultats restent difficiles à interpréter. En effet, les souris utilisées ici ne produisent plus du tout d'IL-12 ce qui a probablement des effets sur d'autres populations cellulaires que les LT.

2)Rôle de L'IL-4

Nos résultats suggèrent un rôle de l'IL-4 dans l'hypergammaglobulinémie observée chez les souris MyD88^{-/-} infectées par Bb. Nous avons donc bloqué cette cytokine chez une souris MyD88^{-/-} pendant la durée de l'infection par Bb, et analysé sa réponse à l'infection par rapport à une souris MyD88^{-/-} non bloquée.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

#réduction de l'expansion cellulaire des LB de 34,8% (figure 21a) ;

#diminution de l'activation des cellules B ganglionnaires (figure 21b) et spléniques ;

#réduction de l'activation des DC ganglionnaires (figure 21b) et spléniques ;

#maintien de l'hypergammaglobulinémie de type IgM (figure 21c).

Nous sommes relativement surpris de l'absence d'effet de ce blocage de l'IL-4 sur l'hypergammaglobulinémie post infectieuse, au vu des résultats obtenus *in vitro* concernant la capacité de l'IL-4 à stimuler des LB et l'environnement des LB ganglionnaires de souris MyD88^{-/-} : la production d'IL-4 semblait alors être la seule différence entre l'environnement des LB de souris MyD88^{-/-} et des souris MyD88^{+/-}. Nous pensons que la quantité d'Ac anti-IL-4 injectée n'a pas été suffisante pour bloquer complètement la production de l'IL-4, ce qui explique peut être la réversion seulement partielle du phénotype des souris déficientes pour MyD88. Nous avons effectué un contrôle du blocage de l'IL-4 par un marquage intracellulaire, mais il n'a pas marché.

D/Effet de MyD88 dans le switch

Chez les souris déficientes pour MyD88, nous avons constaté, que malgré une production importante d'IgM au cours de l'infection par Bb, l'augmentation de la concentration sérique des IgG chez ces animaux est comparable à celle des animaux MyD88^{+/-}. L'hypergammaglobulinémie des souris MyD88^{-/-} infectés par Bb dépend de l'aide des LT CD4 et probablement de la production d'IL-4. Néanmoins, nous pouvons supposer que l'effet des LT CD4 sur la production d'IgM n'est pas lié à l'interaction spécifique entre les LB et les LT, qui aurait favorisé une commutation isotypique plus importante, mais seulement la conséquence de la libération d'IL-4 par ces cellules T. En l'absence d'une telle interaction le défaut des IgG n'est pas surprenant.

D'un autre coté, l'absence de MyD88 pourrait affecter directement le processus de commutation isotypique des cellules B. Pour évaluer cette hypothèse, nous avons mesurer l'expression de l'AID (pour *activation-induced deaminase*) chez les souris MyD88^{-/-} non

infectées et infectées par rapport à des souris MyD88^{+/-} par PCR quantitative. L'AID intervient très tôt dans le processus de recombinaison isotypique. Elle transforme des cytidines en uridines par déamination. D'autres enzymes agissent ensuite sur ces uridines pour former des cassures dans l'ADN. C'est entre ces cassures qu'est éliminée la région constante C μ permettant ainsi l'expression de la région constante C γ (figure 22a). L'expression de l'AID augmente après l'infection par Bb à la fois chez les souris déficientes pour MyD88 et chez les souris « sauvages » (figure 22b). L'absence d'une augmentation des IgG totales par rapport aux IgM totales chez les souris MyD88^{-/-} ne semble donc pas liée à un défaut d'expression de l'AID.

IV/Conclusion et discussion

En conclusion, outre son rôle dans la réponse immunitaire innée anti-infectieuse, la protéine adaptatrice MyD88 semble exercer, dans le cas d'une infection bactérienne, un effet régulateur sur l'hypergammaglobulinémie post infectieuse en modifiant l'équilibre de la balance Th1/Th2.

L'hypergammaglobulinémie n'est pas liée à l'augmentation de la charge bactérienne observée chez les souris déficientes MyD88^{-/-}. En effet, lorsque des souris déficientes pour le TLR2 sont infectées par Bb, elles ont, elles aussi, une charge bactérienne élevée par rapport à des souris sauvages (TLR2^{+/-}) (Wooten RM, J Immunol, 2002) mais ne développent pas d'hypergammaglobulinémie.

L'effet de MyD88 sur le contrôle de l'activation polyclonale des LB ne semble pas impliquer les récepteurs de l'IL-1 et de l'IL-18, malgré son rôle dans la signalisation de ces récepteurs. Ces résultats devront néanmoins être confirmés.

Le déséquilibre de la balance Th1/Th2 observé chez les souris MyD88^{-/-} peut avoir diverses origines. Le défaut d'IL-12 ne semble pas impliqué dans l'hypergammaglobulinémie post-infectieuse des souris déficientes pour MyD88. En revanche, plusieurs de nos résultats suggèrent un rôle de la production d'IL-4 dans cette hypergammaglobulinémie, bien que, pour l'instant, il n'ait pas été confirmé *in vivo*, ce qui paraît surprenant.

Au cours de l'infection par *Borrelia burgdorferi* des souris déficientes pour MyD88^{-/-}, l'augmentation des IgG totales n'est pas comparable à celle des IgM totales, suggérant éventuellement un défaut de commutation isotypique. Nous avons pu montrer que l'expression de l'AID, enzyme intervenant tôt dans ce processus, est normale. Une autre étude publiée cette année confirme ces résultats (Gourzi P, J Exp Med, 2007). Nous ne savons toutefois ni si cette enzyme est fonctionnelle chez les souris MyD88^{-/-}, ni ce qu'il advient des autres éléments nécessaires à la commutation isotypique en l'absence de MyD88.

Suite aux travaux d'Elisabeth Leadbetter montrant un rôle des TLR dans l'activation des LB autoréactifs, l'implication des TLR dans la réponse humorale a suscité un certain intérêt et a fait l'objet d'une controverse.

Une étude parue en 2005, étudie les LB déficients pour MyD88 transférés dans une souris μ MT, dépourvue de LB, et leur réponse à une immunisation par un Ag T indépendant (HSA, albumine sérique humaine). Elle montre que les LB MyD88^{-/-} produisent beaucoup moins d'Ac que des LB MyD88^{+/-} stimulés dans les mêmes conditions. En revanche, la réponse humorale induite par une immunisation par un Ag T indépendant n'est pas affectée (Pasare C, Nature, 2005). Ces résultats sont différents des nôtres. En effet, même si les LB MyD88^{-/-} que nous avons transférés chez des souris μ MT montrent également une diminution de leur production d'IgM, les souris déficientes pour MyD88 sont tout à fait capables de développer une réponse spécifique anti-Bb. Ces différences de résultats pourraient être liées aux Ag utilisés pour stimuler les LB.

Une étude publiée à la fin de l'année 2006 retrouve également des résultats différents de Chandrashekhar Pasare. Dans ce modèle, des souris déficientes pour MyD88 et TRIF, le second adaptateur impliqué dans la signalisation des TLR (c'est-à-dire ne pouvant être stimulées par aucun TLR) sont immunisées par un Ag T-dépendant (TNP-Hy pour *trinitrophénol-hemocyanin*) dans différents adjuvants courants. Ces souris développent une réponse humorale identique à des souris C57BL/6. Il en est de même lorsque ces animaux sont immunisés avec un Ag T-indépendant (TNP-Ficoll). En revanche, comparées à des souris C57BL/6, les souris MyD88^{-/-} TRIF^{-/-} présentent une modification de la répartition des différents isotypes d'Ig dans le répertoire pré-immun : augmentation des IgG1 et des IgE, diminution des IgG2b, 2c et 3, confirmant nos résultats sauf pour l'IgG3 (Gavin AL, Science, 2006). Les TLR ne sont donc pas indispensables au développement d'une réponse humorale même T-dépendante. Les TLR semblent impliqués plutôt dans la modulation que dans l'induction de cette réponse et pourraient influencer non pas le déclenchement de la réponse adaptative (autoréactive ou non) mais sa régulation.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

I/La rupture de la tolérance par une infection

Nous avons, au cours de ce travail, pu démontrer, grâce à l'étude d'un modèle expérimental d'autoréactivité dans lequel les cellules B expriment des FR et sont ignorantes vis-à-vis de leur autoantigène (IgG humaines), qu'une infection par Bb peut rompre la tolérance de ces cellules. Les conditions de cette rupture sont strictes, impliquant la spécificité et l'affinité du BCR ; elles sont absentes dans un autre modèle infectieux et semblent impliquer les TLR.

Notre modèle permet d'étendre les travaux d'Elisabeth Leadbetter établissant le rôle de CI activant les TLR et le BCR dans la rupture de la tolérance de LB FR. En effet, nous avons pu montrer que ce mécanisme de rupture de la tolérance peut intervenir *in vivo* au cours d'une infection bactérienne et aboutir à une production de FR, ce qui n'avait pas été démontré jusque là. Il paraît évident, aujourd'hui, de se demander si un tel mécanisme pourrait s'appliquer à d'autres autoAc que les FR. Il est toutefois difficile d'imaginer comment des cellules B exprimant d'autres BCR autoréactifs que des FR, qui n'ont donc pas la capacité de se lier aux IgG présentes dans les CI, pourraient être activés dans de telles conditions.

Notre travail soulève également le problème des conditions d'infections nécessaires à la rupture de la tolérance. Nous n'avons étudié, pour l'instant, que l'effet d'un modèle bactérien et d'un modèle viral. La réponse des LB FR Smi et Hul à d'autres agents infectieux pourrait être analysée pour comprendre mieux quelles sont ces conditions. Quel est par exemple l'effet d'une autre infection bactérienne, reproduisant les mêmes conditions d'infection chronique et systémique que Bb, comme l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* ? Qu'advient-il des cellules B FR au cours d'une infection virale chronique et systémique, par l'EBV par exemple ? Permettrait-elle de montrer que la rupture de tolérance incomplète induite par le virus influenza est en partie liée au caractère aigu et localisé de l'infection ?

Nous avons entrepris des croisements de souris tg FR Hul sur le fond MyD88^{-/-} en présence constitutive ou en absence d'autoAg (cIgG) (figure 16) afin de démontrer *in vivo* le rôle des TLR dans la rupture de tolérance des LB FR Hul. Nous supposons qu'en l'absence de MyD88 l'activation de ces cellules et la production de FR induites par les CI serait empêchée. Les premiers animaux ont été infectés et sont en cours d'analyse. Etant donné la réponse des souris MyD88^{-/-} à l'infection par Bb, il nous semble que l'interprétation des résultats sur ce modèle tg FR MyD88^{-/-} risque d'être difficile.

II/Régulation de l'hypergammaglobulinémie post infectieuse par MyD88

L'analyse plus approfondie du rôle des TLR nous a permis de découvrir qu'ils peuvent participer également à la régulation l'hypergammaglobulinémie polyclonale d'isotype IgM induite au cours d'une infection bactérienne. Cet effet semble lié à un déséquilibre, contrôlé par MyD88, de la balance Th1/Th2 : en l'absence de MyD88 c'est la réponse Th2 qui est favorisée (ou la réponse Th1 défavorisée) aboutissant à une libération d'IL-4 capable d'activer les LB.

Il est tentant de songer aux éventuelles applications thérapeutiques liées à l'implication des TLR dans l'autoimmunité. Toutefois, les résultats que nous avons obtenus chez les souris déficientes pour MyD88 encouragent à la prudence puisqu'ils suggèrent un rôle des TLR dans la régulation de l'autoréactivité. Ainsi, le blocage de la signalisation des TLR pourrait avoir des effets délétères d'une part parce qu'il permettrait une production non contrôlée d'autoAc d'isotype IgM, et d'autre part, parce qu'en favorisant une activation polyclonale des LB et en influant sur le profil de la réponse Th, il pourrait interférer avec la persistance de certains agents pathogènes (voir 3^e partie de l'introduction : activation polyclonale des LB induite par certaines infections parasitaires).

Plusieurs questions restent posées à ce sujet :

#Comment MyD88 influence l'orientation de la réponse immunitaire vers un profil Th1 ou Th2 ?

L'orientation de la réponse vers un profil Th2, pourrait être la conséquence d'un défaut d'IL-27 en l'absence de MyD88. Cette cytokine appartient à la même famille de cytokines que l'IL-12, leurs structures sont d'ailleurs très proches (Hunter CA, Nat Rev immuno, 2005). L'infection par différents parasites comme *Leshmania major*, *Trypanosoma cruzi* (Villarino AV, J Immunol, 2004) ou *Trichris muris* (Artis D, J Immunol, 2004, Bancroft AJ, J immunol, 2004) induit une réponse de type Th2 chez des souris déficientes pour le récepteur de l'IL-27, tout comme c'est le cas des souris MyD88^{-/-} infectées par *L major* (Muraille, E, J.Immunol. 2002). Ceci semble lié un effet inhibiteur direct de l'IL-27 sur la réponse Th2 (Artis D, J Immunol, 2004). Ce rôle de l'IL-27 pourrait expliquer pourquoi les souris IL-12^{-/-} ne reproduisent pas l'hypergammaglobulinémie des souris MyD88^{-/-} au cours de l'infection par Bb. Cette hypothèse pourra être testée en bloquant à la fois l'IL-12 et l'IL27 chez les souris infectées par Bb.

D'autres mécanismes peuvent expliquer l'orientation de la réponse des LT vers un profil Th2 et seraient intéressants à explorer. Bb pourrait par exemple activer directement la voie Notch, qui participe, selon le ligand Notch impliqué, à l'orientation de la réponse vers un profil Th1 ou Th2 (Amsen D, Cell, 2004). D'autre part, l'absence de MyD88 pourrait influencer l'activité de T-bet, facteur de transcription qui induit directement la transcription des gènes de la réponse Th1 et réprime la production de cytokines Th2 et dont la fonction peut être modulée par certains ligands TLR (Liu N, Nat Immunol, 2003).

#Comment l'orientation de la réponse immunitaire vers un profil Th1 contrôle-t-elle l'hypergammaglobulinémie ? Autrement dit, dans notre modèle, comment le développement d'une réponse Th2 explique-t-il le phénotype des souris MyD88^{-/-} ?

Nous restons convaincus, au vu de nos résultats *in vitro*, de l'importance de l'IL-4 dans l'hypergammaglobulinémie post infectieuse des souris MyD88^{-/-}. Mais, dans l'hypothèse où ce rôle ne se confirme pas *in vivo*, une autre cytokine pourrait être impliquée dans cet effet de la réponse Th2 sur les LB : l'IL-23. Il s'agit d'une cytokine hétérodimérique de la famille de l'IL-12, formée de deux sous-unités : p19 et p40, commune à l'IL-12 (p35 et p40). Cette cytokine a été impliquée dans le développement d'atteintes autoimmunes dans des modèles murins. Ainsi, dans un modèle d'EAE, des souris déficientes pour l'IL-12 et l'IL-23 ne sont pas malades, alors que des souris déficientes uniquement pour l'IL-12 développent une atteinte sévère (Becher B, J Clin Invest, 2002, Gran B, J Immunol, 2002). De même, les souris déficientes pour l'IL-23 sont protégées de l'arthrite induite par le collagène (Murphy CA, J Exp Med, 2003). Cet effet de l'IL-23 serait lié à l'activité proinflammatoire d'une autre cytokine, l'IL-17, dont la libération par les LT CD4 est induite par l'IL-23 (Langrish CA, J Exp Med, 2003). Cette activité proinflammatoire de l'IL-17 pourrait peut être expliquer, par un maintien de l'activation polyclonale des LB liée à l'inflammation, le développement d'une hypergammaglobulinémie au cours d'une réponse Th2.

III/Rôle de MyD88 dans la commutation isotypique

Nous avons également observé que l'augmentation des IgG totales suite à l'infection par Bb n'est pas comparable à celle des IgM chez les souris déficientes pour MyD88, suggérant un rôle de MyD88 dans la commutation isotypique. Il est possible que cette augmentation réduite des IgG par rapport aux IgM soit simplement la conséquence d'une absence d'interaction spécifique entre les LB et les LT au cours de l'infection des souris MyD88^{-/-} par Bb

(production isolée d'IL-4 par la cellules T CD4 Th2 sans interaction de type CD40/CD40 ligand entre les LT et les LB.

Nous avons commencé à vérifier l'état du processus de commutation isotypique des LB de souris MyD88^{-/-} infectées par Bb au vu de certaines données de la littérature suggérant un rôle des TLR dans la commutation isotypique. Nous avons ainsi pu observer que l'expression de l'AID, enzyme intervenant dans l'une des premières étapes de la commutation de classe, est normale chez ces souris. Néanmoins, aucune information ne nous permet pour l'instant d'assurer que cette enzyme est fonctionnelle en l'absence de MyD88. Par ailleurs d'autres éléments participant au processus de commutation isotypique pourraient être impliqués.

Cette absence d'hypergammaglobulinémie d'isotype IgG alors que les IgM sont très augmentées pourrait également être lié à un défaut de maturation des LB en cellules B mémoires. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait analyser le pourcentage des cellules mémoires et le nombre de mutations somatiques du BCR (qui apparaissent à ce stade du développement des LB) chez les souris déficientes pour MyD88 infectées par Bb.

ANNEXES

I/Les critères diagnostiques du lupus érythémateux disséminé selon l'American Rheumatism Association, 1997

La survenue concomitante ou successive de quatre critères affirme le diagnostic.

#éruption malaire en ailes de papillon,

#éruption de lupus discoïde,

#photosensibilité,

#ulcérations orales ou nasopharyngées,

#polyarthrite non érosive,

#pleurésie ou une péricardite,

#atteinte rénale : protéinurie >0.5g/24h, ou cylindres discoïdes,

#atteinte neurologique : convulsions ou psychose,

#anomalies hématologiques : anémie hémolytique ou leucopénie <4000/mm³ ou lymphopénie <4500/mm³ ou thrombopénie <100 000/mm³,

#désordre immunologique : présence de cellules LE ou d'anticorps anti-ADN natif ou d'anticorps anti-Sm ou fausse sérologie syphilitique,

#anticorps antinucléaires à taux normal (en l'absence de traitements inducteurs).

II/Les critères diagnostiques de la polyarthrite rhumatoïde selon l'American College of Rheumatology, 1987 :

Au mois quatre critères sont exigés et les quatre premiers critères doivent être présents depuis au moins six semaines.

#raideur matinale pendant au moins une heure,

#arthrite d'au moins trois groupes articulaires,

#arthrite touchant les mains,

#arthrites systémiques,

#nodules rhumatoïdes,

#facteur rhumatoïde sérique présent,

#signes radiologiques.

III/Lexique

Les maladies autoimmunes évoquées

Diabète de type 1 ou diabète insulino-dépendant : maladie autoimmune liée à la destruction des cellules β du pancréas par des lymphocytes T et peut être des autoanticorps, avec pour conséquence un déficit en insuline conduisant à des troubles métaboliques (hyperglycémie).

Lupus érythémateux disséminé (LED) : maladie autoimmune aux manifestations multiples touchant surtout la peau, le rein et le cœur probablement liée à la présence d'anticorps anti nucléaires (anti-ADN, anti-nucléosomes) qui forment des complexes immuns se déposant dans les vaisseaux sanguins (au niveau du rein, de la peau...).

Maladie de Graves ou maladie de Basedow : maladie autoimmune de la thyroïde liée à la présence d'anticorps dirigés contre le récepteur de la TSH (*thyroid stimulating hormone*) et qui provoquent une augmentation de la production d'hormones thyroïdiennes.

Polyarthrite rhumatoïde (PR) : maladie inflammatoire chronique des articulations évoluant par poussées et qui touche surtout les femmes. Elle est probablement la conséquence d'une réaction autoimmune et s'accompagne d'une production de facteurs rhumatoïdes.

Sclérose en plaques : atteinte neurologique chronique caractérisée par une démyélinisation du système nerveux central et une infiltration lymphocytaire cérébrale. Elle a pour origine une réaction autoimmune contre des antigènes divers présents dans la gaine de myéline.

Syndrome de Sjögren : syndrome autoimmun chronique caractérisé par une sécheresse généralisée des muqueuses liée à une diminution puis un arrêt des sécrétions des glandes lacrymales, salivaires, trachéales digestives et vaginales. Il est plus fréquent chez la femme.

Les modèles animaux de maladies autoimmunes évoqués

EAE (*experimental autoimmune encephalitis*) : maladie inflammatoire du système nerveux central se développant chez la souris après immunisation par des antigènes neuronaux dans de l'adjuvant.

NZBxNZW (F1) : souris provenant du croisement de souris NZB (new zealand black) et NZW (new zealand white) développant spontanément une atteinte de type lupique, touchant surtout les femelles et caractérisée par une production importante d'autoanticorps (anti-ADN natif, anti-ADN simple brin, anti-chromatine) et une glomérulonéphrite sévère médiée par des complexes immuns.

NOD (*non obese diabetic*) : souris développant spontanément une diabète insulino-dépendant dont les manifestations sont proches de celles du diabète humain de type 1 : déficience en insuline, hyperglycémie, glycosurie, polyurie. Ces souris présentent également une thyroïdite, une sialite et une anémie hémolytique autoimmune. Cette atteinte résulte surtout de l'infiltration des îlots β du pancréas par des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ et de la destruction des cellules β .

MRL/pr ou MRL/Mp lpr/lpr : souris portant une mutation appelée lpr (sur les deux allèles) du gène Fas inactivant ce gène, et développant une lymphoprolifération et une atteinte systémique proche du LED caractérisée par une hypergammaglobulinémie, une arthrite et une glomérulonéphrite. Ces souris produisent des autoanticorps (anti-ADN double-brin, anti-chromatine, et facteurs rhumatoïdes).

BIBLIOGRAPHIE

- Adachi O**, Kawai T, et al. Targeted disruption of the *MyD88* gene results in loss of IL-1 and IL-18-mediated function. *Immunity*, **1998**, 9:p143
- Ait-Azzouzene D**, Verkoczy L, et al. An immunoglobulin C κ -reactive single chain antibody fusion protein induces tolerance through receptor editing in a normal polyclonal immune system. *J Exp Med*, **2005**, 201(5):p817
- Akira S**, Uematsu S, et al. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, **2006**, 124:p783
- Amsen D**, Blander JM, et al. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different Notch ligands on antigen presenting cells. *Cell*. **2004**. p515
- Anders H-J**, Zecher D, et al. Molecular mechanisms of autoimmunity triggered by microbial infection. *Arthritis Res Ther*, **2005**, 7:p215
- Anderson MS**, Venanzi ES, et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*, **2002**, 298(5597):p1395
- Anjos S**, Polychronakos C. Mechanisms of genetic susceptibility to type 1 diabetes : beyond HLA. *Mol Genet Metab*, **2004**, 81:p187
- Ansar-Ahmed S**, Hissong BD, et al. Gender and risk of autoimmune diseases : possible role of estrogenic compounds. *Env Health Persp*, **1999**, 107(suppl5):p681
- Arndt PA**, Leger RM, et al. Serology of antibodies to second- and third-generation cephalosporins associated with immune hemolytic anemia and/or positive direct antiglobulin tests. *Transfusion*, **1999**, 39(11-12):p1239
- Artis D**, Villarino A, et al. The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity. *J Immunol*, **2004**, 173(9) :p5626
- Atabani SF**, Thio CL, et al. Association of CTLA-4 polymorphism with regulatory T cell frequency. *Eur J Immunol*, **2005**, 35:p2157
- Bach J-F**. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med*, **2002**, 347(12):p911
- Baecher-Allan C**, Viglietta V, et al. Inhibition of human CD4⁺CD25^{high} regulatory T cell function. *J Immunol*, **2002**, 169:p6210
- Baechler EC**, Batliwalla FM, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Nat Acad Sci*, **2003**, 100:p2610
- Bancroft AJ**, Humphreys NE, et al. WSX-1 : a key role in induction of chronic intestinal nematode infection. *J immunol*, **2004**, 172(12):p7635
- Barrat BL**, Payne F, et al. Remapping the insulin gene/IDDM2 locus in type 1 diabetes. *Diabetes*, **2004**, 53:p1884
- Barrat FJ**, Meeker T, et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*, **2005**, 202(8):p1131
- Barthold SW**, Beck DS, et al. Lyme borreliosis in selected strains and ages of laboratory mice. *J Infect Dis*, **1990**, 162(1):p133
- Becher B**, Durell BG, et al. Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukine-12. *J Clin Invest*, **2002**, 110(4):p493
- Begovitch AB**, Carlton VEH, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*, **2004**, 75:p330
- Bekeredjian-Ding IB**, Wagner M, et al. Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN. *J Immunol*, **2005**, 174:p4043
- Bell SE**, Goodnow CC. A selective defect in IgM antigen receptor synthesis and transport causes loss of cell surface IgM expression on tolerant B lymphocytes. *EMBO J*, **1994**, 13(4):p816

- Bennett ST**, Lucassen AM, et al. Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat Genet*, **1995**, 9(3):p284
- Bennet CL**, Christie J, et al. The immune dysregulation polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*, **2001**, 27:p20
- Bennett L**, Palucka AK, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med*, **2003**, 197(6):p711
- Benschop RJ**, Aviszus K, et al. Activation and anergy in bone marrow B cells of a novel immunoglobulin transgenic mouse that is both hapten specific and autoreactive. *Immunity*, **2001**, 14:p33
- Bolz DD**, Sundsbak RS, et al. MyD88 plays a unique role in host defense but not arthritis development in Lyme disease. *J Immunol*, **2004**, 173:p2003
- Borg C**, Jalil A, et al. NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood*, **2004**, 104(10):p3267
- Borrero M**, Clarke SH. Low-affinity anti-Smith antigen B cells are regulated by anergy as opposed to developmental arrest or differentiation to B-1. *J Immunol*, **2002**, 168(1):p13
- Botto M**, Agnola CD, et al. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat Genet*, **1998**, 19:p56
- Boulé MW**, Broughton C, et al. Toll-like receptor-9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes. *J Exp Med*, **2004**, 199(12):p1631
- Bowie A**, O'Neil LAJ. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leuk Biol*, **2000**, 67:p508
- Brocke S**, Gaur A, et al. Induction of relapsing paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by bacterial superantigen. *Nature*, **1993**, 365:p642
- Bynoe MS**, Grimaldi CM, et al. Estrogen up-regulates Bcl-2 and blocks tolerance induction of naive B cells. *Proc Natl Acad Sci*, **2000**, 97(6):p2703
- Caramalho J**, Lopes-Carvalho T, et al. Regulatory T cells selectively express Toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med*, **2001**, 197(4):p403
- Carroll MC**. The lupus paradox. *Nature Genet*, **1998**, 19:p3
- Carter LL**, Fouser LA, et al. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4⁺ and CD8⁺ T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol*, **2002**, 32:p634
- Chaudhuri J**, Alt FW. Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat Rev Immunol*, **2004**, 4:p541
- Chehadeh W**, Weill J, et al. Increased level of interferon- α in blood of patients with insulin-dependent diabetes mellitus: relationship with Coxsackievirus B infection. *J Infect Dis*, **2000**, 181:p1929
- Chehadeh W**, Kerr-Conte J, et al. Persistent infection of human pancreatic islets by coxsackievirus B is associated with alpha interferon synthesis in beta cells. *J Virol*, **2000**, 74(21):p10153
- Chentoufi AA**, Polychronakos C. Insulin expression in the thymus modulate insulin-specific autoreactive T-cell tolerance: the mechanism by which the IDDM2 locus may predispose to diabetes. *Diabetes*, **2002**, 51(5):p1383
- Christen U**, von Herrath M. Initiation of autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, **2004**, 16:p759
- Christen U**, von Herrath M. Infections and autoimmunity-Good or bad. *J Immunol*, **2005**, 174:p7481
- Cloutier JF**, Veillette A. Cooperative inhibition of T-cell Ag receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase. *J Exp Med*, **1999**, 189(1):p111

- Cooke MP**, Heath AW, et al. Immunoglobulin signal transduction guides the specificity of B cell-T cell interactions and is blocked in tolerant self reactive B cells. *J Exp Med*, **1994**, 179:p425
- Cordeiro da Silva A**, Borges MC, et al. Dual role of the *Leishmania major* ribosomal protein S3a homologue in regulation of T- and B-cell activation. *Infect Immunol*, **2001**, 69(11) :p6588
- Coro ES**, Chang WL, et al. Type I IFN receptor signals directly stimulate local B cells early following influenza virus infection. *J Immunol*, **2006**,176:p4343
- Coutinho A**, Kazatchkine MD, et al. Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol*, **1995**, 7:p812
- Criswell LA**, Pfeiffer KA, et al. Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) collection : the *PTPN22 620W* allele associates with multiple autoimmune phenotypes. *Am J Hum Genet*, **2005**, 76:p561
- Cunningham MW**. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev* **2000**, 13(3):p470
- Cyster JG**, Hartley SB, et al. Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire. *Nature*, **1994**, 371(6496):p389
- Cyster JG**, Goodnow CC. Antigen-induced exclusion from follicles and anergy separates and complementary processes that influence peripheral B cell fate. *Immunity*, **1995**, 3(6):p691
- Daniel-Ribeiro C**, de Oliveira-Ferreira J, et al. Can malaria-associated polyclonal B-lymphocyte activation interfere with the development of anti-sporozoite specific immunity ? *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **1989**, 83(3):p289
- Davidson A**, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med*, **2001**, 345(5):p340
- Degli-Esposti MA**, Smyth MJ. Close encounters of different kinds : dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5:p112
- De Milito A**. B lymphocyte dysfunctions in HIV infection. *Curr HIV Res*, **2004**, 2(1):p11
- De Voss J**, Hou Y, et al. Spontaneous autoimmunity prevented by thymic expression of a single self-antigen. *J Exp Med*, **2006**, 203(12):p2727
- Djavad N**, Bas S, et al. Comparison of rheumatoid factors of rheumatoid arthritis patients, of individuals with mycobacterial infections and of normal controls : evidence for maturation in the absence of an autoimmune response. *Eur. J. Immunol*, **1996**, 26(10):p2480
- Donati D**, Zhang LP, et al. Identification of a polyclonal B-cell activator in *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.*, **2004**, 72(9) :p5412
- Dörner T**, Egerer K, et al. Rheumatoid factors revisited. *Curr Opin Rheumatol*, **2004**,16:p246
- Edberg JC**, Langefeld CD, et al. Genetic linkage and association of Fcγ receptor IIIA (CD16A) on chromosome 1q23 with human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, **2002**, 46(8):p2132
- Eriksson U**, Ricci R, et al. Dendritic cell-induced autoimmune heart failure requires cooperation between adaptive and innate immune response. *Nature Medicine*, **2003** ; 9(12):p1484
- Fabbri C**, Jaboli MF, et al. Gastric autoimmune disorders in patients with chronic hepatitis C before, during and after interferon-alpha therapy. *World J Gastroenterol*, **2003**, 9(7):1487
- Ferry H**, Leung JCH, et al. B-cell tolerance. *Tansplant*, **2006**, 81(3):p308
- Fontenot JD**, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nature Immunol*, **2003**, 4(4):p330
- Fourneau JM**, Bach JM, et al. The elusive case for a role of mimicry in autoimmune diseases. *Mol Immunol*, **2004**, 40(14-15) :p1095
- Fulcher DA**, Basten A. Reduced life span of anergic self-reactive B cells in a double-transgenic model. *J Exp Med*, **1994**, 179:p125

- Gao W**, Wortis HH, et al. The *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase is a T cell-independent B cell mitogen and an inducer of non-specific Ig secretion. *Int Immunol*, **2002**, 14(3):p299
- Gauld SB**, Benschop RJ, et al. Maintenance of B cell anergy requires constant antigen receptor occupancy and signaling. *Nat Immunol*, **2005**, 6:p1160
- Gauld SB**, Merrell KT, et al. Silencing of autoreactive B cells by anergy : a fresh perspective. *Curr Opin Immunol*, **2006**, 18:p292
- Gavin AL**, Hoebe K, et al. Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of Toll-like receptor signaling. *Science*, **2006**, 314:p1936
- Gay D**, Saunders T, et al. Receptor editing : an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med*, **1993**, 177:p999
- Gebrehiwet B**, Peerschke EI. Role of C1q and C1q receptors in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Curr Dir Autoimm*, **2004**, 7 :p87
- Goodnow CG**, Crosbie J, et al. Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature*, **1988**, 334(6184):p676
- Goodnow CG**. Balancing immunity and tolerance : deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proc Nat Acad Sci*, 1996, 93:p2264
- Gourzi P**, Leonova T, et al. Viral induction of AID is independent of the interferon and the Toll-like receptor signaling pathways but requires NF- κ B. *J Exp Med*, **2007**,
- Gran B**, Zhang G-X, et al. IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis : evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J Immunol*, **2002**, 169:p7104
- Green A**, Patterson CC on behalf of the EURODIAB TIGER Study Group. Trends in the incidence of childhood-onset of diabetes in Europe 1989-1998. *Diabetologica*, **2001**, 44(suppl3):B3
- Gregersen PK**, Silver J, et al. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, **1987**, 30(11):p1205
- Gregersen PK**, Batliwalla F. *PTPN22* and rheumatoid arthritis : gratifying replication. *Arthritis Rheum*, **2005**, 52(7):p1952
- Groom J**, Kalled SL, et al. Association of BAFF/BlyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. *J Clin Invest*, **2002**, 109(1):p59
- Gut J**. Molecular basis of halothane hepatitis. *Arch Toxicol*, **1998**, 20:p3
- Halverson R**, Torres RM, et al. Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nat Immunol*, **2004**, 5(6):p645
- Hammond SR**, English DR, et al. The age-range of risk of developing multiple sclerosis. Evidence from a migrant population in Australia. *Brain*, **2000**, 123:p968
- Hannum LG**, Ni D, et al. A disease-related rheumatoid factor autoantibody is not tolerized in a normal mouse : implications for the origins of autoantibodies in autoimmune disease. *J Exp Med*, **1996**, 184:p1269
- Haskins K**, Mc Duffie M. Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4⁺ islet-specific T cell clone. *Science*, **1990**, 249(4975):p1433
- Hertz M**, Nemazee D. BCR ligation induces receptor editing in IgM⁺IgD⁻ bone marrow B cells *in vitro*. *Immunity*, **1997**, 6:p429
- Hill RJ**, Zozulya S, et al. The lymphoid protein tyrosine phosphatase Lyp interacts with the adaptor molecule Grb2 and functions as a negative regulator of T-cell activation. *Exp Hematol*, **2002**, 30:p237
- Hippen KL**, Schram BR, et al. In vivo assessment of the relative contributions of deletion, anergy, and editing to B cell self-tolerance. *J Immunol*, **2005**, 175:p909

- Hirohata S**, Inoue T, et al. Frequency analysis of human peripheral blood B cells producing IgM-rheumatoid factor. Differential effects of stimulation with monoclonal antibodies to CD3 and *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*, **1990**, 145(6):p1681
- Ho WY**, Cooke MP, et al. Resting and anergic B cells are defective in CD28-dependent costimulation of naive CD4⁺ T cells. *J Exp Med*, **1994**, 179:p1539
- Horwitz MS**, Bradley LM, Harbertson J, Krahl T, Lee J, Sarvetnick N. Diabetes induced by Cocksackie virus : initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med*, **1998**, 4(7):p781
- Horwitz MS**, Ilic A, et al. Presented antigen from damaged pancreatic beta cells activates autoreactive T cells in virus-mediated autoimmune diabetes. *J. Clin. Invest.*, **2002**, 109(1):p79
- Huang, X**, Yuang J, et al. Interferon in the pancreases of patients with type I diabetes. *Diabetes*, **1995**, 44(6):p658
- Hunziker L**, Recher M, et al. Hypergammaglobulinemia and autoantibody induction mechanisms in viral infections. *Nat Immunol*, **2003**, 4(4):p343
- Hunter CA**. New IL-12-family members : IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev immunol*, **2005**, 5:p521
- Hutchings P**, O'Reilly L, et al. The use of a non-depleting anti-CD4 monoclonal antibody to re-establish tolerance to beta cells in NOD mice. *Eur J Immunol*, **1992**, 22(7):p1913
- Hwang SY**, Hertzog PJ, et al. A null mutation in the gene encoding a type 1 interferon receptor component eliminates antiproliferative and antiviral response to interferon alpha and alters macrophage response. *Proc Nat Acad Sci USA*, **1995**, 92(24):p11284
- Jacobson BA**, Sharon J, et al. An isotype switched and somatically mutated rheumatoid factor clone isolated from MRL-lpr/lpr mouse exhibits limited intraclonal affinity maturation. *J Immunol*, **1994**, 152:p4489
- Jiang H**, Chess L. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med*, **2006**, 354(11):p1166
- Julien S**, Soulas P, et al. B cell positive selection by soluble self-antigen. *J Immunol*, **2002**, 169:p4198
- Kacani L**, Sprinzl GM, et al. Interleukine-15 enhances HIV-1-driven polyclonal B-cell response *in vitro*. *Exp Clin Immunogenet*, **1995**, 16(3):p162
- Kaisho T**, Hoshino K, et al. Endotoxin can induce MyD88 deficient dendritic cells to support T(h)2 cell differentiation, *Int.Immunol.* **2002** ; 14(7) : p695
- Kaisho T**, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol*, **2006**, 117:p979
- Kamradt T**, Göggel R, et al. Induction, exacerbation and inhibition of allergic and autoimmune diseases by infection. *Trends in immunol*, **2005**, 26(5):p260
- Karassa FB**, Trikalinos TA, et al. Role of the Fcgamma receptor IIa polymorphism in susceptibility to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis : a meta analysis. *Arthritis Rheum*, **2002**, 46(6) :p1563
- Katz-Levy Y**, Neville KL, et al. Endogenous presentation of self myelin epitopes by CNS-resident APCs in Theiler's virus-infected mice. *J Clin Invest*, **1999**, 104:p599
- Katz-Levy Y**, Neville KL, et al. Temporal development of autoreactive Th1 responses and endogenous presentation of self myelin epitopes by central nervous system-resident APCs in Theiler's virus-infected mice. *J Immunol*, **2000**, 165:p5304
- Kawai T**, Akira S. TLR signaling. *2006, Cell Death Diff*, 13 :p816
- Knip M**, Veijola R, et al. Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. *Diabetes*, **2005**, 54(S2):pS125
- Kobe B**, Kajava AV. The leucine rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol*, **2001**, 11(6) :p725

- Koenig-Marrony S**, Soulas P, et al. Natural autoreactive B cells in transgenic mice reproduce an apparent paradox to the clonal tolerance theory. *J Immunol*, **2001**, 166:p1463
- Kotsa K**, Watson PF, et al. A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves' disease and autoimmune hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **1997**, 46(5):p551
- Kretz-Rommel A**, Rubin RL. Disruption of positive selection of thymocytes causes autoimmunity. *Nat Med*, **2000**, 6(3):p298
- Kuchroo VK**, Umetsu D, et al. The *TIM* gene family : emerging roles in immunity and disease *Nat Rev Immunol*, **2003**, 3:p454
- Kurtzke JF**. Multiple sclerosis in time and space-geographic clues to cause. *J Neurovirol*, **2000**, 6(suppl2):pS134
- Kyogoku C**, Langefeld CD, et al. Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase *PTPN22* with human SLE. *Am J Hum Genet*, **2004**, 75:p504
- Lacroix-Desmazes S**, Kaveri SV, et al. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J Immunol Meth*, **1998**, 216:p117
- Lang KS**, Recher M, et al. Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease. *Nat Med*, **2005**, 11(2):p138
- Lang KS**, Georgiev P, et al. Immunoprivileged status of the liver is controlled by Toll-like receptor 3 signaling. *J Clin Invest*, **2006**, 116(9):p2456.
- Langrish CL**, Chen Y, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*, **2005**, 201(2):p233
- Langrish CL**, McKenzie BS, et al. IL-12 and IL-23 : master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*, **2004**, 202:p96
- Lam K-P**, Rajewsky K. Rapid elimination of mature autoreactive B cells demonstrated by Cre-induced change in B cell antigen receptor specificity *in vitro*. *Proc Nat Acad Sci*, **1998**, 95:p13171
- Lau CM**, Broughton C, et al. RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor /Toll-like receptor 7 engagement. *J Exp Med*, 2005, 202(7):p1
- Leadbetter EA**, Rifkin IR, et al. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*, **2002**, 416:p603
- Lemaitre B**, Nicolas E, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in drosophila adults. *Cell*, **1996**, 86:p973
- Lesley R**, Xu Y, et al. Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity*, **2004**, 20:p441
- Liew FY**, Xu D, et al. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*, **2005**, 5:p446
- Liu N**, Ohnishi N, et al. CpG directly induces T-bet expression and inhibits IgG1 and IgE switching in B cells. *Nat.Immunol.* **2003**. 4(7): p687
- Liu N**, Montgomery RR, et al. Myeloid differentiation antigen 88 deficiency impairs pathogen clearance but does not alter inflammation in *Borrelia burgdorferi*-infected mice. *Infect Immun*, **2004**, 72(6):p3195
- Liu H**, Komai-Koma M, et al. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Proc Nat Acad Sci*, **2006**, 103(18):p7048
- Lockshin MD**, Sex ratio and rheumatic disease. *Autoimmun Rev*, **2002**, 1:p162
- Lövgren T**, Eloranta ML, et al. Induction of interferon- α by immune complexes or liposomes containing systemic lupus erythematosus autoantigen and Sjögren syndrome autoantigen-associated RNA. *Arthritis Rheum*, **2006**, 54(6):p1917
- Lutz MB**, Kubusch N, et al. A advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Meth*, **1999**, 223:p77

- Ma Y**, Weiss JJ. *Borrelia burgdorferi* outer surface lipoproteins OspA and OspB possess B-cell mitogenic and cytokine-stimulatory properties. *Infect Immun*, **1993**, 61(9):p3843
- Mackay F**, Woodcock SA, et al. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. **1999**, *J Exp Med*, 190:p75
- Mackay F**, Browning JL. BAFF : a fundamental survival factor for B cells. *Nat Rev Immunol*, **2002**, 2:p465
- Maier LM**, Wicker LS. Genetic susceptibility to type 1 diabetes. *Curr Opin Immunol*, **2005**, 17:p601
- Marrack P**, Kappler J, Kotzin BL. Autoimmune disease : why and where it occurs. *Nat Med*, **2001**, 7(8):p899
- Manderson AP**, Botto M, et al. The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol*, **2004**, 22 :p431
- Manson JJ**, Isenberg DA. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Netherlands J Med*, **2003**, 61(11):p343
- Martin T**, Duffy SF, et al. Evidence for somatic selection of natural antibodies. *J Exp Med*, **1992**, 175(4):p983
- McDaniel DO**, Alarcon GS, et al. Most african-american patients with rheumatoid arthritis do not have the rheumatoid antigenic determinant (epitope). *Ann Intern Med*, **1995**, 123(3):p181
- Merrell KT**, Benschop RJ, et al. Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire. *Immunity*, **2006**, 25:p953
- Miller SD**, Vanderlugt CL, et al. Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat Med*, **1997**, 3(10):p1133
- Moore PA**, Belvedere O, et al. BlyS : member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science*, **1999**, 285:p260
- Muller S**, Kohler H. B cell superantigen in HIV-1 infection. *Int Rev Immunol*, 1997, 14(4):p339
- Muraille E**, De Trez C, et al. Genetically resistant mice lacking MyD88-adaptor protein display a high susceptibility to *Leishmania major* infection associated with a polarized Th2 response. *J Immunol*. 2003;170(8) : p4237
- Murphy CA**, Langrish CL, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 on joint autoimmune inflammation. *J Exp Med*, **2003**, 198(12) :p1951
- Naparstek Y**, Plotz PH. The role of autoantibodies in autoimmune disease. *Annu Rev Immunol*, **1993**, 11:p79
- Nath SK**, Kilpatrick J, et al. Genetics of human systemic lupus erythematosus : the emerging picture. *Curr Opin Immunol*, **2004**, 16:p794
- Nilsson N**, Bremell T, et al. Protective role of NK1.1⁺ cells in experimental *Staphylococcus aureus* arthritis. *Clin Exp Immunol*, **1999**, 117:p63
- Nishimura H**, Nose M, et al. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*, **1999**, 11:p141
- Oaks MK**, Hallett KM. Cutting edge : a soluble form of CTLA-4 in patients with autoimmune thyroid disease. *J Immunol*, **2000**, 164:p5015
- Ohashi P**, DeFranco AL. Making and breaking tolerance. *Curr Opin Immunol*, **2002**, 14:p744
- Okamoto M**, Murakami M, et al. A transgenic model of autoimmune hemolytic anemia. *J Exp Med*, **1992**, 175(1):p71
- Okazaki T**, Maeda A, et al. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci*, **2001**, 98(24):p13866

- Olson JK**, Croxford JL, et al. A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. *J Clin Invest*, **2001**, 108(2):p311
- Panoutsakopoulou V**, Sanchirico ME, et al. Analysis of the relationship between viral infection and autoimmune disease. *Immunity*, **2001**, 15:p137
- Pasare C** and Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*, **2003**, 299:p1033
- Pasare C**, Medzhitov R. Control of B-cell response by Toll-like receptors. *Nature*, **2005**, 438:p364
- Pearce SHS**, Meriman TR. Genetic progress towards the molecular basis of autoimmunity. *Trends in Mol Med*, **2006**, 12(2):p90
- Pelanda R**, Schwers S, et al. Receptor editing in a transgenic mouse model : site, efficiency, and role in B cell tolerance and antibody diversification. *Immunity*, **1997**, 7:p765
- Peng G**, Guo Z, et al. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4⁺ regulatory T cell function. *Science*, 2005, 309 :p1380
- Pereira-Ramos O**, Silva EEC, et al. Production of autoantibodies associated with polyclonal activation in *Yersinia enterocolitica* O: 8-infected mice. *Microbiol. Immunol.*, **2005**, 49(2):p129
- Pers JO**, Daridon C, et al. BAFF overexpression is associated with autoantibody production in autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*, **2005**, 1050:p34
- Peterson P**, Nagamine K, et al. APECED : a monogenic autoimmune disease providing new clues to self tolerance. *Immunol Today*, **1998**, 19(9):p384
- Prokunina L**, Castillejo-Lopez C, et al. A regulatory polymorphism in *PDCD1* is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet*, **2002**, 32:p666
- Prokunina L**, Padyukov L, et al. Association of the PD-1.3 allele of the *PDCD1* gene in patients with rheumatoid arthritis negative for rheumatoid factor and the shared epitope. *Arth Rheum*, **2004**, 50(6):p1770
- Powell AM**, Black MM. Epitope spreading : protection from pathogens, but propagation of autoimmunity ? *Clin Exp Dermatol*, **2001**, 26(5):p427
- Pugliese A**, Zeller M, et al. The insulin gene is translocated in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDD3 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet*, **1997**, 15(3):p293
- Radic MZ**, Erikson J, et al. B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. *J. Exp. Med.*, **1993**, 177:p1165
- Ragimbeau J**, Avrameas S. Single lipopolysaccharide-reactive B cells in the non-immune mouse spleen cell population secrete natural multispecific autoantibodies. *Scand J Immunol*, **1987**, 26(1):p29
- Rathmell JC**, Cooke MP, et al. CD95(Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4⁺ T cells. *Nature*, **1995**, 376(6536):p181
- Rathmell JC**, Townsend SE, et al. Expansion or elimination of B cells in vivo : dual roles for CD40- and Fas(CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell*, **1996**, 87:p319
- Rathmell JC**, Fournier S, et al. Repression of B7.2 on self-reactive B cells is essential to prevent proliferation and allow Fas-mediated deletion by CD4⁺ T cells. *J Exp Med*, **1998**, 188(4):p651
- Recher M**, Lg KS. Innate (over)immunity and adaptive autoimmune disease. *Curr Top Microbiol Immunol*, **2006**, 305:p89
- Rees JH**, Soudain SE, et al. *Campylobacter jejuni* infection and Guillain-Barré syndrome. *N Engl J Med*, **1995**, 333 :p1374
- Reina-San-Martin B**, Degraeve W, et al. A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. *Nat Med*, **2000**, 6(8):p890

- Reina-San-Martin B**, Cosson A, et al. Lymphocyte polyclonal activation : A pitfall for vaccine design against infectious agents. *Parasitol Today*, **2000**, 16(2):p62
- Rifkin IR**, Leadbetter EA, et al. Immune complexes present in the sera of autoimmune mice activate rheumatoid factor B cells. *J Immunol*, **2000**, 165:p1626
- Rifkin IR**, Leadbetter EA, et al. Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunol Rev*, **2005**, 204:p27
- Rizzi M**, Ferrera F, et al. Disruption of immunological tolerance : role of AIRE gene in autoimmunity. *Autoimmun Rev*, **2006**, 5:p145
- Rojas M**, Hulbert C, et al. Anergy and not clonal ignorance determines the fate of B cells that recognise a physiological autoantigen. *J Immunol*, **2001**, 166:p3194
- Rott O**, Cash E. Influenza virus hemagglutinin induces differentiation of mature resting B cells and growth arrest of immature WEHI-231 lymphoma cells. *J Immunol*, **1994**, 152:p5381
- Rouse BT**, Deshpande S. Viruses and autoimmunity : an affair but not a marriage contract. *Rev Med Virol*, **2002**, 12:p107
- Rui L**, Vinuesa C, et al. Resistance to CpG DNA-induced autoimmunity through tolerogenic B cell antigen receptor ERK signaling. *Nat Immunol*, **2003**, 4(6):p594
- Rui L**, Healy JJ, et al. ERK signaling is a modulator switch integrating opposing inputs from B cell receptor and T cell cytokines to control TLR4-driven plasma cell differentiation., *J Immunol*, **2006**, 177:p5337
- Sadick MD**, Heinzl FP, et al. Cure of murine Leishmania with anti-interleukine 4 monoclonal antibody : evidence for a T cell-dependent, interferon γ -independent mechanism. *J Exp Med*, **1990**, 171:p115
- Sakaguchi S**. Regulatory T cells : key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*, **2000**, 101:p455
- Salmon JE**, Pricop L. Human receptors for immunoglobulin G. *Arthritis Rheum*, **2001**, 44(4):p739
- Sangster MY**, Topham DJ, et al. Analysis of the virus-specific and nonspecific B cell response to a persistent B-lymphotropic gammaherpesvirus. *J Immunol*, **2000**, 164:p1820
- Savarese E**, Chae OW, et al. U1 small nuclear ribonucleoprotein immune complexes induce type 1 interferon plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Blood*, **2006**, 107(8):p3229
- Schneider P**, MacKay F, et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med*, **1999**, 189(11):p1747
- Scholander C**, Carlson J, et al. Extensive immunoglobulin binding on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in a group of children with moderate anemia. *Infect Immun*, **1998**, 66(1):p361
- Shiow LR**, Rosen DB, et al. CD69 acts downstream of interferon- α/β to inhibit S1P₁ and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature*, **2006**, 440:p540
- Shlomchik MJ**, Zharhary D, et al. A rheumatoid factor transgenic mouse model of autoantibody regulation. *Int Immunol*, **1993**, 5(10):p1329
- Siegal FP**, Kadowaki N, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*, **1999**, 284:p1835
- Simkins HM**, Merriman ME, et al. Association of the PTPN22 locus with rheumatoid arthritis in a New Zealand caucasian cohort. *Arthritis Rheum*, **2005**, 52(7):p2222
- Smyth D**, Cooper JD, et al. Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (*LYP/PTPN22*) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes*, **2004**, 53:p3020
- Somoza N**, Vargas F, et al. Changes in HLA, adhesion molecules and autoantigens, restricted T cell receptor V beta usage, and cytokine profile. *J Immunol*, **1994**, 153(3):p1360
- Soulas P**, Koenig-Marrony S, et al. A role for membrane IgD in the tolerance of pathological human rheumatoid factor B cells. *Eur J Immunol*, **2002**, 32 :p2623

- Soulas P.** Autoréactivité B lymphocytaire : de la tolérance à sa rupture. Thèse de l'université Louis Pasteur de Strasbourg, **2003**
- Steinman RM,** Hawiger D, et al. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, **2003**, 21:p685
- Stewart TA.** Neutralizing interferon alpha as a therapeutic approach to autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, 14:p139
100(5):p2610
- Stohl W,** Xu D, et al. BAFF overexpression and accelerated glomerular disease in mice with an incomplete genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, **2005**, 52(7):p2080
- Strasser A,** Bouillet P. The control of apoptosis in lymphocyte selection. *Immunol Rev*, **2003**, 193:p82
- Subramanian S,** Tus K, et al. A *Tlr7* translocation accelerates systemic autoimmunity in murine lupus. *Proc Nat Acad Sci*, **2006**, 103(26):p9970
- Sutmuller RPM,** Morgan ME, et al. Toll-like receptors on regulatory T cells : expanding immune regulation. *Trends in Immunol*, **2006**, 27(8):p387
- Sutmuller RPM,** den Brok M HMJM, et al. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest*, **2006**, 116(2):p485
- Takeda K,** Akira S. Toll-like receptor in innate immunity. *Int Immunol*, **2005**, 17(1):p1
- Taylor PR,** Carugati A, et al. A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. *J Exp Med*, **2000**, 192(3):p359
- Teller K,** Budhai L, et al. HLA-DRB1 and DQB typing of hispanic american patients with rheumatoid arthritis : the "shared epitope" hypothesis may not apply. *J Rheumatol*, **1996**, 23(8):p1363
- Thébault-Baumont K,** Dubois-Laforgue D, et al. Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2-deficient NOD mice. *J Clin Invest*, **2003**, 111(6):p851
- Thorsby E,** Lie BA. HLA associated genetic predisposition to autoimmune diseases : genes involved and possible mechanisms. *Transplant Immunol*, **2005**, 14:p175
- Tiegs S,** Russell DM, et al. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med*, **1993**, 177:p1009
- Ueda H,** Howson JMM, et al. Association of the T -cell regulatory gene *CTLA4* with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*, **2003**, 423:p506
- Ulmán I,** Halonen M, et al. Monogenic autoimmune diseases-lessons of self tolerance. *Curr Opin Immunol*, **2005**, 17:p609
- Vafiadis P,** Bennett ST, et al. Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. *Nat Genet*, **1997**, 15(3):p289
- Vaidya B,** Imrie H, et al. The cytotoxic T lymphocyte antigen-4 is a major Graves' disease locus. *Hum Mol Genet*, **1999**, 8(7):p1195
- Velaga MR,** Wilson V, et al. The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphate (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab*, **2004**, 89(11):p5862
- Viglianti GA,** Lau CM, et al. Activation of autoreactive B cells by CgG dsDNA. *Immunity*, **2003**, 19:p837
- Villarino AV,** Huang E, et al. Understanding the pro- and anti-inflammatory properties of IL-27. *J Immunol*, **2004**, 173:p715
- Vollmer J,** Tluk S, et al. Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J Exp Med*, **2005**, 202(11):p1575
- Waldner H,** Whitters MJ, et al. Fulminant spontaneous autoimmunity of the central nervous system in mice transgenic for the myelin proteolipid protein-specific T cell receptor. *Proc Nat Acad Sci USA*, **2000**, 97(7):p3412

- Waldner H**, Collins M, et al. Activation of antigen-presenting cells by microbial products breaks self tolerance and induces autoimmune disease. *J Clin Invest*, **2004**, 113(7):p990
- Walzer T**, Dalod M, et al. Natural-killer cells and dendritic cells : « l'union fait la force ». *Blood*, **2005**, 106(7) :p2252
- Wandstrat A**, Wakeland E. The genetics of complex autoimmune diseases : non-MHC susceptibility genes. *Nat Immunol*, **2001**, 2(9):p802
- Wang H**, Shlomchik MJ. Autoantigen-specific B cell activation in Fas-deficient rheumatoid factor immunoglobulin transgenic mice. *J Exp Med*, **1999**, 190(5):p639
- Wegmann DR**, Norbury-Glaser M, et al. Insulin-specific T cells are a predominant component of islet infiltrates in pre-diabetic NOD mice. *Eur J Immunol*, **1994**, 24(8):p1853
- Werth VP**, Bashir M, et al. Photosensitivity in rheumatic diseases. *J Investig Dermatol Symp Proc*, **2004**, 9(1):p57
- Wicker LS**, Clark J, et al. Type 1 diabetes and pathways shared by humans and NOD mice. *J Autoimmun*, **2005**, 25p29
- Wolfowicz CB**, Sakorafas P, et al. Oligoclonality of rheumatoid factors arising spontaneously in lpr/lpr mice. *Clin Immunol Immunopathol*, **1988**, 46(3) :382
- Wong FS**, Visintin I, et al. CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. *J Exp Med*, **1996**, 183:p67
- Wooten RM**, Ma Y, et al. Toll-like receptor 2 is required for innate, but not acquired, host defense to *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol*, **2002**, 168:p348
- Wraith DC**, Goldman M, et al. Vaccination and autoimmune disease : what is the evidence ? *Lancet*, **2003**, 362:p1659
- Wu J**, Edberg JC, et al. A novel polymorphism of Fcgamma RIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest*, **1997**, 100(5):p1059
- Xu H**, Li H, et al. Regulation of anti-DNA B cells in recombination-activating gene-deficient mice. *J Exp Med*, **1998**, 7:p1247
- Yanagawa T**, Taniyama M, et al., CTLA-4 gene polymorphism confers susceptibility to Graves' disease in Japanese. *Thyroid*, **1997**, 7(6):p843
- Youinou P**, Hillion S, et al. B lymphocytes on the front line of autoimmunity. *Autoimmun Rev*, **2005**, 5:p215
- Yuki N**. Carbohydrate mimicry : a new paradigm of autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol*, **2005**, 17:p577
- Zhang M**, Ko K-H, et al. Expression and function of TNF family member B cell-activating factor in the development autoimmune arthritis. *Int Immunol*, **2005**, 17(8):p1081
- Zhao Z-S**, Granucci F, et al. Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1 : autoimmune disease after viral infection. *Science*, **1998**, 279:p1344
- Zou YR**, Muller W, et al. Cre-lox mediated gene replacement : a mouse strain producing humanized antibodies. *Curr Biol*, **1994**, 4(12):p1099
- Zuniga R**, Ng S, et al. Low-binding alleles of Fcgamma receptor types IIA and IIIA are inherited independently and are associated with systemic lupus erythematosus in hispanic patients. *Arthritis Rheum*, **2001**, 44(2):p361
- Zuniga R**, Markovitz GS, et al. Identification of IgG subclasses and C-reactive protein in lupus nephritis : the relationship between the composition of immune deposits and Fcgamma receptor type IIA alleles. *Arthritis Rheum*, **2003**, 48(2):p460

Autoimmunity and infection

“Experimental approaches of the mechanisms of B cell tolerance breakdown”

Autoimmune diseases are associated with genetic and environmental factors. Among the latter, infections have been particularly implicated. However, the mechanisms of such an association between infections and autoimmune diseases are still unknown. We have tried to understand those mechanisms by using transgenic mouse models expressing chimeric rheumatoid factors (RF) in the presence or in the absence of their autoantigen (human IgG). In these models, RF B cells are ignorant towards their autoantigen. However, infection of RF transgenic mice with *Borrelia burgdorferi* (Bb) breaks this state of tolerance thanks to the formation of Bb/anti-Bb human IgG immune complexes that induce a synergic signal between the BCR and a receptor recognising Bb antigens (probably a Toll-like receptor, TLR). This tolerance breakdown needs T cell help.

On the other hand, infection with influenza virus does not break RF B cell tolerance in our tg model although this infection is able to induce type I IFN production, otherwise often associated with autoimmune diseases, and even when the transgene is expressed on an autoimmune background, NZBxNZW(F1).

Bb infection induces a polyclonal B cell activation. The phenomenon is not well known, it has consequences on the immune response against infections and on the production of potentially harmful autoantibodies. The infection of MyD88 deficient mice (considered at first to understand the role of TLR in the RF B cell tolerance breakdown) showed that this protein is important for polyclonal B cell activation. MyD88 inhibits the development of a Th2 immune response, thus probably preventing an increased production of IL-4 that can directly and excessively activate B cells.

Keywords : B cell tolerance, rheumatoid factors, transgenic mouse models, tolerance breakdown, infection, TLR, MyD88

Infection et Autoimmunité

« Approches expérimentales des mécanismes de rupture de la tolérance B lymphocytaire »

Les maladies autoimmunes sont liées à des facteurs génétiques et environnementaux, parmi lesquels les états infectieux semblent tout particulièrement impliqués. Toutefois, les mécanismes par lesquels les infections influencent le développement de ces maladies restent inconnus. Nous avons tenté d'approcher ces mécanismes par des modèles transgéniques murins exprimant des facteurs rhumatoïdes (FR) chimériques en présence ou en absence de leur autoantigène (IgG humaines). Dans ce modèle, les cellules B FR restent immunologiquement ignorantes vis-à-vis de leur autoantigène. Toutefois, l'infection des souris transgéniques FR par *Borrelia burgdorferi* (Bb) rompt cet état d'ignorance grâce à la formation de complexes immuns Bb/IgG humaines anti-Bb induisant un signal synergique entre le BCR et des récepteurs reconnaissant les antigènes de Bb (probablement des récepteurs Toll-like, TLR). Cette rupture de tolérance nécessite également l'intervention d'une aide T.

En revanche, une infection par le virus de la grippe ne rompt pas l'ignorance des cellules B FR dans notre modèle transgénique, malgré la capacité de cette infection à induire une libération d'IFN de type I associée par ailleurs à de nombreuses atteintes autoimmunes, même lorsque le transgène est exprimé sur un fond autoimmun NZBxNZW(F1).

L'infection par Bb provoque une hyperactivation B polyclonale. Ce phénomène mal connu a des conséquences à la fois sur la réponse immunitaire anti-infectieuse et sur la production d'autoanticorps potentiellement pathogènes. L'infection de souris déficientes pour MyD88 (envisagée au départ pour comprendre le rôle des TLR dans la rupture de tolérance des cellules B FR) nous a permis de mettre en évidence le rôle de cette protéine dans l'hyperactivation B polyclonale. MyD88 inhibe le développement d'une réponse de type Th2 empêchant ainsi probablement une production accrue d'IL-4 capable d'activer directement et de manière excessive les cellules B.

Mots clés : tolérance B lymphocytaire, facteurs rhumatoïdes, modèles transgéniques murins, rupture de tolérance, infection, TLR, MyD88