

Thèse

présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline: Sciences du Vivant / Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

par

Jean-Nicolas SCHICKEL

Lupus érythémateux disséminé et sous-expression de *Carabin* et *Sh3kbp1* : étude par génomique fonctionnelle.

Soutenue publiquement le 21 septembre 2011 devant la commission
d'examen composée de :

Mme. Le Docteur Anne DURANDY Rapporteur externe
INSERM U768 Hôpital Necker - Enfants Malades

M. Le Professeur Hans-Hartmut PETER Rapporteur externe
Universitätsklinikum Freiburg

M. Le Professeur Jean-Luc IMLER Examineur interne
Université de Strasbourg

M. Le Professeur Thierry MARTIN Directeur de thèse
Université de Strasbourg - Faculté de médecine de Strasbourg

REMERCIEMENTS

En premier lieu j'aimerais remercier le Dr Anne DURANDY, le professeur Hans-Hartmut PETER et le professeur Jean-Luc IMLER d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Merci à Thierry MARTIN de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans son équipe puis à Sylviane MULLER de nous avoir accueilli dans son unité.

Un immense merci "aux chefs" : Jean-Louis, Thierry, Anne-Sophie et Pauline pour leur encadrement et leurs conseils. Toujours accessibles pour donner les réponses aux questions qui passent par la tête des thésards. Vous m'avez tous les quatre beaucoup apporté.

Durant ma thèse j'ai eu la grande chance d'être encadré par une personne passionnée par son travail, ne laissant rien au hasard, d'une efficacité et d'une rapidité redoutable. Une personne toujours disponible qui arrive à tirer le meilleur de chaque personne et qui vous remonte le moral durant les périodes difficiles. Un énorme merci à toi Pauline pour tout ce que tu as fait pour moi durant ces cinq années passées au laboratoire. J'espère vraiment que j'aurais un jour l'occasion de travailler à nouveau à tes côtés (malgré mon côté "bourrique").

Merci à tous les membres de l'UPR 9021 tout particulièrement Marion pour son aide pour les manip de microscopie et sa bonne humeur permanente.

Un immense merci à tout le LIP (non il n'est pas mort !), travailler dans un climat de confiance et d'entraide est primordial pour un thésard.

Anne, je ne saurais jamais assez te remercier pour toute l'aide que tu m'as apporté durant ces années. Ton expertise technique et ton expérience valent de l'or. Merci Annala pour ta bonne humeur, je me souviendrais longtemps de tes exclamations : "je refuse", "ca c'est fort de café", "TGFF" plus une que je ne préfère pas écrire ici (c'est de l'anglais je crois). J'espère vraiment que l'on gardera contact même si je n'ai pas vraiment de doute sur ce point.

Un grand merci à toi Anne-Marie (alias LIPAM) pour tous tes précieux conseils techniques et ton aide tout au long de ma thèse.

Merci Sylvia pour ton aide et ta bonne humeur communicative. Tu m'auras manqué pendant ma quatrième année.

Un grand merci à Vincent mon pote d'apérolabo pour ses bonnes vieilles blagues (parfois un peu pourries mais bon...). Au fait je t'ai déjà raconté l'histoire des deux...
On finira finalement nos thèses ensemble tout un symbole.

Un grand merci à toutes les autres étudiantes du labo, Julie, Sophie et Dana pour m'avoir supporté durant un nombre variable d'années et bon courage pour la suite.

Un merci tout particulièrement à vous Sophie et François pour les moments de détente sur la terrasse du Dubliners, en forêt noire et au sommet du Hohneck (faites gaffe au tiques).

Un grand merci aussi à tous les anciens et nouveaux membres de l'équipe. Ceux qui sont à la retraite maintenant Françoise, Elisabeth et Jean-Claude, et Aurélie qui vient d'arriver.

Merci également à Valérie, Cécile, Mirjana, Véronique, Eléonore, Phillippe, Françoise et Denise de l'Institut d'Immuno-hématologie pour leur aide.

Enfin, merci aux petites stagiaires, Yazhuo Gong, Neila Chekkat, Roxane Alles, Emilie Audran, Elodie Woellet, Adeline Aubry, Catherine Muller, Yara Tarabay et Aurélie Revolon qui m'ont accompagné durant ma thèse : bon courage pour la suite de vos études !

Merci à toute l'équipe Reina de l'IGBMC et plus particulièrement Sara pour son aide pour les productions de lentivirus. Un grand merci également à Claudine toujours disponible pour un petit tri de cellules B.

Je dois également beaucoup à ma famille. Merci à vous tous pour votre soutien tout au long de ces années d'études !

Enfin, un merci spécial pour toi Aurélie. Merci de m'avoir soutenu durant ces années, merci pour le recul que tu as su me faire prendre quand il le fallait !

Table des matières

Liste des Abréviations

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Introduction 1

I. Les Lymphocytes B 2

A) La maturation des Lymphocytes B 3

1) *De la cellule souche hématopoïétique au progéniteur lympoïde commun* 3

2) *La maturation de la lignée des lymphocytes B* 5

B) Les mécanismes de tolérance 10

1) *La tolérance centrale* 10

2) *La tolérance périphérique* 12

C) Les modèles murins d'étude des mécanismes de tolérance 14

1) *Le modèle anti-HEL* 15

2) *Les modèles anti-ADN* 18

3) *Le modèle anti-CMH-I* 20

II. Le lupus érythémateux disséminé 22

A) Epidémiologie 23

B) Manifestations cliniques 24

C) Les anomalies du système immunitaire au cours du LED 27

1) *Les lymphocytes T* 27

2) *Les cellules dendritiques* 29

D) Le rôle central des lymphocytes B 30

1) *Les anomalies dans les sous-populations de lymphocytes B* 31

2) *Les anomalies de la voie de signalisation du lymphocyte B* 32

3) *Anomalies des LB au cours du LED : intrinsèques ou induites ?* 36

III. L'influence des facteurs environnementaux dans le déclenchement des MAI 38

A) Les infections 39

1) *Le mimétisme moléculaire* 43

2) *L'activation "bystander" et "l'épitope spreading"* 44

3) L'hypothèse du "fertile field" (terrain favorable).....	46
4) Un rôle protecteur ?.....	46
B) Les facteurs hormonaux et l'inégalité homme/femme face au développement des MAI	48
C) Les facteurs médicamenteux	49
D) Autres facteurs environnementaux prédisposant au MAI.....	50
IV. La génétique des MAI.....	52
A) Les facteurs génétiques de prédisposition au LED découverts chez l'homme	54
1) Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).....	54
2) Les gènes n'appartenant pas au CMH.....	55
3) Les mécanismes épigénétiques dans le LED humain.....	67
4) Les analyses du transcriptome réalisées chez les patients atteints de LED.....	68
B) Les modèles murins de LED	72
1) Les modèles spontanés	72
2) Les modèles induits de LED.....	79
3) Les souris génétiquement modifiées développant un phénotype lupique.....	81
Présentation du projet de thèse.....	88
Matériels et méthodes.....	91
I. Analyse transcriptomique de lymphocytes B issus de patients atteints de lupus quiescent	92
II. Etude du gène <i>Carabin</i>.....	92
A) Préparation d'ADNc de splénocytes totaux et de lymphocytes B spléniques de souris Balb/c et BW	92
1) Dissection de rate de souris Balb/c et BW.....	92
2) Préparation d'ARN de splénocytes totaux ou de lymphocytes B spléniques de souris Balb/c et BW.....	92
3) Préparation d'ADNc.....	93
B) Clonage du vecteur pTOPO-Tbc1d10c-V5	93
1) Amplification par PCR de la partie codante de <i>Tbc1d10c</i>	93
2) Purification du fragment d'ADN d'intérêt	94
3) Ligation dans le vecteur pTOPO-V5.....	94
4) Transformation de bactéries compétentes.....	94
5) Criblage de colonies positives.....	95
6) Séquençage.....	95
C) Clonage des vecteurs pSUPER	95

1) Choix des shRNA dirigés contre Carabin	95
2) Choix des shRNA dirigés contre <i>Sh3kbp1</i>	97
3) Génération des shRNA	98
4) Digestion du vecteur pSUPER.....	99
5) Ligation des shRNA dans le vecteur pSUPER.....	99
6) Criblage.....	99
D) Clonage du vecteur pTRIP	101
1) Digestion des vecteurs pSUPER-shRNA.....	101
2) Digestion du vecteur pTRIP.....	101
3) Ligation dans le vecteur pTRIP.....	101
4) Criblage des colonies positives.....	101
E) Culture cellulaire et transfection des cellules.....	102
1) Cellules 293T.....	102
2) Transfection et co-transfection	102
F) Récolte des lysats cellulaires et analyse de l'expression protéique par western blot	102
G) Détermination du nombre d'intégration virale par Southern Blot.....	103
1) Principe du Southern Blot.....	103
2) Préparation et digestion d'ADN génomique de queue de souris.....	104
3) Migration sur gel d'agarose puis transfert sur membrane de nitrocellulose.....	104
4) Préparation de la sonde.....	104
5) Pré-Hybridation et hybridation.....	105
6) Lavages et révélation.....	105
III. Etude du gène <i>Sh3kbp1</i>	105
Résultats et discussion.....	106
I. Identification des gènes dérégulés dans les lymphocytes B au cours du LED quiescent	107
A) Analyse transcriptomique de lymphocytes B de patients atteints de LED quiescent.....	108
B) Arguments utilisés dans le choix des gènes à étudier.....	132
C) Conclusions et discussion.....	133
II. Etude de la fonction de Carabin.	135
A) Les fonctions connues de Carabin	136
B) Régulation de l'expression de Carabin dans les lymphocytes B.....	137
C) Clonage puis expression de Carabin	138
1) Clonage du gène <i>Tbc1d10c</i> dans le vecteur pTOPO-V5.....	138

2) Expression de <i>Tbc1d10c-V5</i> dans des fibroblastes humains.....	143
D) Modulation de l'expression de Carabin par ARN interférence	144
1) Clonage des <i>shRNA</i> dirigés contre l'ARNm de <i>Tbc1d10c</i> dans le vecteur <i>pSUPER</i>	145
2) Clonage des <i>shRNA</i> dans le vecteur lentiviral <i>pTRIP</i>	148
E) Etude de l'effet d'une sous-expression de Carabin <i>in vitro</i> dans une lignée de lymphocytes B	148
F) Etude de l'effet d'une sous-expression de Carabin chez la souris.....	148
1) Souris Carabin <i>KD</i>	148
2) Souris Carabin <i>KO</i> et <i>KO</i> conditionnelles	156
G) Conclusions, discussion et perspectives	191
III. Etude de la fonction de Sh3kbp1	195
A) Les multiples fonctions de Sh3kbp1.....	196
B) Régulation de l'expression de Sh3kbp1 dans les lymphocytes B.....	198
C) Modulation de l'expression de Sh3kbp1 par ARN interférence	199
1) Test des <i>shRNA</i> spécifiques de l'ARNm de <i>Sh3kbp1</i>	199
2) Clonage des <i>shRNA</i> choisis dans le vecteur lentiviral <i>pTRIP</i>	201
D) Etude de l'effet d'une sous-expression de Sh3kbp1 sur la fonction des lymphocytes B dans la lignée A20 <i>in vitro</i>	201
E) Etude de l'effet d'une sous-expression de Sh3kbp1 chez la souris	203
F) Conclusions, discussion et perspectives	204
Conclusions générales et perspectives	209
I. Identification des gènes dérégulés dans les lymphocytes B au cours du LED quiescent	210
II. Etude de la fonction du gène <i>Carabin</i>	210
III. Etude de la fonction du gène <i>Sh3kbp1</i>	211
IV. Etude des effets de la dérégulation de Carabin et de Sh3kbp1 dans un contexte multigénique	212
V. Conclusions quant à l'utilisation de la technique de transgénèse lentivirale.....	212
Références Bibliographiques	215

Liste des Abréviations

AcADNdb : Anticorps anti-ADN double brin
AcChromatin : Anticorps anti-Chromatin
AcRBC : Anticorps anti-Red Blood Cells
ADN : Acide Desoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADNdb : ADN double brin
ADNsb : ADN simple brin
ALPS : Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome
ANA : Anti-nuclear Antibody, Anticorps anti-nucléaire
APOBEC3C : Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3C
APS : Autoimmune polyglandular syndrome
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ATF2 : Activating transcription factor 2
ATG5 : Autophagy-related 5
AutoAc : Auto-anticorps
BAFF : B-cell activating Factor
BANK1 : B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1
BAT1 : HLA-B associated transcript 1
BCR : B-cell receptor
BDNF : Brain-derived neurotrophic factor
BLK : B lymphoid tyrosine kinase
BLNK : B-cell linker
BNIP3L : BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like
BTK : Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase
Carabin : Calcineurin / Ras binding
CASP6 : Caspase 6
CASP8 : Caspase 8
Cbl : Casitas B lineage lymphoma
CCR2 : Chemokine (C-C motif) receptor 2
CDR : Complementarity determining region
CES1 : Carboxylesterase 1
CFLAR : CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
CIN85 : Cbl-interacting protein of 85K
CLP : Common lymphoid progenitor
CMH : Complexe Majeur d'histocompatibilité
CMV : Cytomegalovirus
CPA : Cellule présentatrice d'antigènes
CpG DNA : ADN hypométhylé
CR1 : Complement receptor 1
CSK : c-src tyrosine kinase
CTB : Cholera Toxin B Subunit
CXCL12 : Chemokine (C-X-C motif) ligand 12
CXCR6 : Chemokine (C-X-C motif) receptor 6
DAMPs : Danger-associated molecular patterns
DDX1 : DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 1

DGKA : Diacylglycerol kinase, alpha 80kDa
DGKD : Diacylglycerol kinase, delta 80kDa
DIL : Drug induced lupus
DNMT1 : DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1
EAE : Experimental autoimmune encephalitis
EBF : Early B-cell factor 1
EBNA-1 : Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1
EBV : Epstein-Barr virus
EGF : Epidermal Growth Factor
ELA3 : Elastase-3A
ELISA : Enzyme- linked immunosorbent assay
ERCC3 : Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3
ERK : Extracellular signal-regulated kinases
EST : Expressed sequence Tag
FAM167A : Family with sequence similarity 167, member A
FASL : Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
Fc γ R : Fc fragment of IgG receptor
Fc γ R2A : Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor
Fc γ R2B : Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor
Fc γ R3A : Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor
FDR : False discovery rate
FLT3 : Fms-related tyrosine kinase 3
FR : Facteur rhumatoïde
GADD45a : Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
GFP : Green Fluorescence protein
GN : Glomérulonéphrite
GTP : Guanine tri-phosphate
GWAS : Genome Wide association Study
HATs : Histone acétyl-transférases
HDAC : Histone déacétylase
HEL : Hen Egg Lysosyme
HMGB1 : High mobility group box 1
HSA : Heat Stable Antigen (CD24)
HSCs : Hematopoietic Stem Cells
HTLV : Human. T-cell Lymphotropic Virus
HyperIgG : Hypergammaglobulinémie
IBD : Inflammatory Bowel disease
ICS : Institut clinique de la souris
IFI6 à 16 : Interferon, gamma-inducible protein 6 à 16
IFIT1 : Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
IFIT2 : Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
IFIT4 : Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 4
IFN : Interféron
IKK- β : Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta
IL-1 : Interleukine 1
IL-2 : Interleukine 2
IL-4 : Interleukine 4
IL-6 : Interleukine 6
IL-7 : Interleukine 7

IL-8 : Interleukine 8
IL-12 : Interleukine 12
IRAK1 : Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
IRF5 : Interferon regulated factor 5
IRF7 : Interferon regulated factor 7
ISG15 : Ubiquitin-like modifier
ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITGAM : Integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)
ITIM : Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
JAK : Janus kinase
JNK : c-Jun N-terminal kinase
KD : Knock down
Kd : Kilodalton
KI : Knock in
KO : Knock out
LB : Lymphocyte B
LCK : Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LCMV : Lymphocytic Choriomeningitis Virus (virus de la chorioméningite)
LED : Lupus érythémateux disséminé
LMPP : Lymphoid-primed multipotent progenitor
Lpr : Lymphoproliferative (mutation)
LPS : Lipopolysaccharide
LT : Lymphocyte T
LTR : Long Terminal Repeat
LY6E : Lymphocyte antigen 6 complex, locus E
LYN : Lck/yes-related novel
LYP : Lymphoid protein tyrosine phosphatase
MAI : Maladie Autoimmune
MAPK : Mitogen-associated protein kinase
Marco : Macrophage receptor with collagenous structure
MBD4 : Methyl-CpG binding domain protein 4
MBP : Myelin basic protein
mDC : Myeloid dendritic cell
MPP : Multi potent progenitor
MSH3 : DNA mismatch repair protein 3
MSTP9 : Macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like) pseudogene 9
MX1 : Myxovirus (influenza virus) resistance 1
MX2 : Myxovirus (influenza virus) resistance 2
MyD88 : Myeloid differentiation primary response gene (88)
NEL2 : NEL-like 2
NFATc : Nuclear Factor of Activated T cell c
NFκB : Nuclear Factor κ-B
NK : Natural Killer
NOD : Non-Obese Diabetic Mice
NZB : New Zealand Black
NZW : New Zealand White
OAS1 : 2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa
OAS2 : 2',5'-oligoadenylate synthetase 2, 40/46kDa
OAS3 : 2',5'-oligoadenylate synthetase 3, 40/46kDa
OASL : 2',5'-oligoadenylate synthetase ligand

ORF : Open Reading Frame
PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBMCs : Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR : Polymerase Chain Reaction
PD-1 : Programmed cell death 1
pDC : Plasmacytoid Dendritic cell
PDCD1 : Programmed cell death 1
PI3K : Phosphoinositide-3-kinase
PIP3 : Phosphatidyl- inositol 3,4,5 triphosphat
PLC γ : Phospholypase C γ
PLP : Proteolipid protein
POLS : Polymerase (DNA directed) sigma
PP2Ac : Protein phosphatase 2A
PR : Polyarthrite Rhumatoïde
PRKR : Interferon- inducible RNA-dependent protein kinase
PTPN22 : Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22
PXK : PX domain containing serine/threonine kinase
RAGE : Renal tumor antigen
RANKL : Receptor activator of NF-kappa-B ligand
RFX1 : Regulatory factor X, 1 (influences HLA class II expression)
RIP : Regulation of phenobarbitol-inducible P450
RISC : RNA-induced silencing complex
RUNX1 : Runt-related transcription factor 1
SCF : Stem Cell Factor
SERPING1 : Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1
SH3 : Src-homology 3
Sh3kbp1 : SH3-domain kinase binding protein 1
SHIP : SH2 containing inositol phosphotase
shRNA : Short Hairpin RNA
SLC : Surrogate Light Chain
SLEDAI : Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
SLEGEN : International Consortium on the Genetics of Systemic Lupus Erythematosus
Sm : Antigène Smith
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SnRNP : Small nuclear ribonucleoproteins
STAT : Signal-transducer and activator of transcription protein
STAT4 : Signal-transducer and activator of transcription protein 4
Tbc1d10c : TBC1 domain family, member 10C
TIAL1 : TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1
TLRs : Toll Like Receptors
TMEV : Theiler's murine encephalomyelitis virus
TNF-R : Tumor Necrosis Factor Receptor
TNF- α : Tumor Necrosis Factor α
TNFAIP3 : Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3
TNFSF4 : Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4
TP53 : Tumor protein p53
TRADD : TNFRSF1A-associated via death domain
TRAF2 : TNF receptor-associated factor 2
TRAF6 : TNF receptor-associated factor 6

TRAP2 : Tumor rejection antigen (gp96) pseudogene 2
Treg : Lymphocyte T régulateur
TREX1 : Three prime repair exonuclease 1
TRIP : TRAF interacting protein
TSC1 : Tuberosus sclerosis 1
UBD : Ubiquitin Binding Domain
UBE2G2 : Ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2
UBE2M : Ubiquitin-conjugating enzyme E2M
UPR : Unfolded Protein Response
UV : Ultra-Violet
XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis
XKR6 : XK, Kell blood group complex subunit-related family, member 6
ZAP70 : Zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa

Liste des Tableaux

Légende	Page
Tableau 1 : Marqueurs utilisés pour l'identification des cellules B transitionnelles.	8
Tableau 2 : Les mécanismes de tolérance découverts grâce aux modèles murins dont les cellules B expriment un BCR transgénique autoréactif.	15
Tableau 3 : Les critères de l'ARA (American Rheumatism Association) pour le diagnostic d'un lupus.	25
Tableau 4 : Les différents critères utilisés dans le calcul du SLEDAI.	25
Tableau 5 : Les souris génétiquement modifiées développant des manifestations lupiques.	83
Tableau 6 : Taux sérique des anticorps anti-ADN après transfert de lymphocytes pré-B issus de souris lupiques dans des souris immunodéficientes.	37
Tableau 7 : L'autoimmunité induite par les médicaments.	50
Tableau 8 : Les analyses microarrays réalisées sur les PBMCs de patients lupiques.	69
Tableau 9 : Loci et sous-loci identifiés sur les chromosomes 1 à 4 grâce à l'approche congénique de Morel et al.	75
Tableau 10 : Loci et sous-loci identifiés sur les chromosomes 5 à 19 grâce à l'approche congénique de Morel et al.	76
Tableau 11 : Tableau récapitulatif pour le choix de l'ADNc de la phase codante du gène <i>Tbc1d10c</i> .	140
Tableau 12 : Analyse par cytométrie en flux des sous-populations lymphocytaires des souris Carabin KD et contrôles.	152

Liste des Figures

Légende	Page
Figure 1 : Les phases précoces de la maturation des cellules composant le système immunitaire.	4
Figure 2 : La maturation de la lignée des lymphocytes B : de la cellule souche hématopoïétique au plasmocyte.	5
Figure 3 : Identification des fractions A à F par cytométrie de flux.	6
Figure 4 : Les processus de réarrangements des chaînes d'immunoglobulines.	7
Figure 5 : Schéma du devenir des lymphocytes B transitionnels après leur arrivée dans la rate.	9
Figure 6 : Devenir de la cellule B autoréactive après fixation d'un antigène du soi dans la moelle osseuse.	11
Figure 7 : Représentation schématique des mécanismes de tolérance centrale et périphérique permettant le maintien de la tolérance B.	13
Figure 8 : Les voies d'activation enclenchées lors d'une exposition permanente à des antigènes du soi.	17
Figure 9 : La régulation de la voie du BCR par CD22 et CD72.	34
Figure 10 : La régulation de la voie du BCR par le récepteur FcγRIIb.	36
Figure 11 : Implication des différents agents infectieux dans les maladies autoimmunes.	41
Figure 12 : Vision schématique des mécanismes par lesquels des agents infectieux pourraient déclencher une autoimmunité.	45
Figure 13 : L'hypothèse du « fertile-field » (terrain favorable).	47
Figure 14 : Fréquence des maladies autoimmunes chez les femmes, en comparaison aux hommes.	48
Figure 15 : Frise chronologique représentant les avancées majeures en génétique humaine et l'identification des gènes de susceptibilité du lupus.	53

Légende	Page
Figure 16 : Carte des loci de susceptibilité pour le lupus chez l'homme.	57
Figure 17 : Stratégie globale de recherche sur le lupus.	58
Figure 18 : Les voies biologiques dans lesquelles sont impliquées les gènes de susceptibilité pour le lupus.	59
Figure 19 : Localisation des gènes de susceptibilité pour le lupus dans les voies de signalisation des cellules immunitaires.	61
Figure 20 : Schéma d'ensemble du modèle de déclenchement d'une autoimmunité induite par l'IFN α .	62
Figure 21 : Modèle décrivant les trois étapes impliquées dans la pathogénie du lupus, ainsi que les gènes/loci de susceptibilité associées à ces étapes.	74
Figure 22 : Distribution génomique des loci de susceptibilités (en vert) identifiés par des études de liaison chez la souris.	74
Figure 23 : Clonage des shRNA dans le vecteur pSUPER puis dans le vecteur pTRIP.	100
Figure 24 : Représentation schématique de la protéine Carabin.	136
Figure 25 : Alignement des ARNm référencés dans la base de donnée NCBI pour le gène <i>Tbc1d10c</i> murin.	139
Figure 26 : Amplification de l'ADNc de la partie codante du gène <i>Tbc1d10c</i> à partir de l'ADNc de LB de souris Balb/c.	142
Figure 27 : Carte du vecteur pTOPO- <i>Tbc1d10c</i> -V5.	143
Figure 28 : Expression de <i>Tbc1d10c</i> -V5 dans des fibroblastes humains (293T).	143
Figure 29 : Mécanisme de l'ARN interférence.	145
Figure 30 : Schéma des régions d'hybridation des shRNA le long du transcrit de <i>Tbc1d10c</i> .	146
Figure 31 : Expression de <i>Tbc1d10c</i> après co-transfection de cellules 293T avec les vecteurs pTOPO- <i>Tbc1d10c</i> -V5 et pSUPER-shRNA.	147
Figure 32 : Détermination du nombre d'intégrations lentivirales dans le génome des souris lentigéniques.	149

Légende	Page
Figure 33 : Expression de Carabin dans les cellules de rate de souris Carabin KD et de souris contrôles.	150
Figure 34 : La réponse des lymphocytes B à une stimulation BCR-dépendante ou BCR-indépendante est comparable dans les souris Carabin KD et les souris contrôles.	154
Figure 35 : Production d'immunoglobulines dans le surnageant de culture de cellules B Carabin KD stimulées de façon BCR-indépendante.	155
Figure 36 : Augmentation de la prolifération et de la surexpression du marqueur d'activation CD69 dans les cellules T Carabin KD après activation de la voie du TCR.	155
Figure 37 : Modèle de déclenchement d'une autoimmunité induite par une stimulation conjointe du BCR et de TLRs.	193
Figure 38 : Représentation schématique de la protéine Sh3kbp1.	196
Figure 39 : Expression de Sh3kbp1 dans les lymphocytes B après activation BCR-dépendante ou BCR-indépendante.	198
Figure 40 : Schéma des régions d'hybridation des shRNA le long du transcrit de <i>Sh3kbp1</i> .	199
Figure 41 : Expression de Sh3kbp1 après transfection de cellules L929 avec le vecteur pSUPER-shRNA.	200
Figure 42 : Vérification du KD de Sh3kbp1 dans les cellules A20 transduites.	201
Figure 43 : Etat de phosphorylation d'Erk, d'Akt, et de JNK, dans les cellules A20 Sh3kbp1 KD, après activation BCR-dépendante.	202
Figure 44 : Expression de l'ARNm codant pour Sh3kbp1 dans les cellules de sang total de souris Sh3kbp1 KD.	203
Figure 45 : Expression de Sh3kbp1 dans les cellules de rate de souris Sh3kbp1 KD.	204
Figure 46 : Les isoformes de Sh3kbp1 référencées.	206
Figure 47 : Génération de la souris Sh3kbp1 KO permettant une délétion ciblée de l'isoforme Sh3kbp1-l.	207
Figure 48 : Implication des protéines Carabin et Sh3kbp1 dans les voies de signalisation du BCR.	213

Introduction

I. Les Lymphocytes B

Au cours de leur maturation dans la moelle osseuse, les lymphocytes B ont la capacité de générer, grâce à des mécanismes de réarrangements de leurs chaînes d'immunoglobulines, une très grande variété de BCRs (B cell receptor) différents. Du fait de cette diversité de récepteurs générée de façon aléatoire, certains lymphocytes B vont être capables de reconnaître des antigènes du soi et auront ainsi le potentiel de déclencher une réaction immunitaire contre des composants du soi qui peut, si elle n'est pas contrôlée, aboutir au développement de maladies autoimmunes (MAI). Il a été montré chez les individus sains que plus de la moitié des lymphocytes B produits dans la moelle osseuse possèdent une réactivité contre le soi (Wardemann 2003). Pour éviter l'accumulation de ces lymphocytes B autoréactifs dans les organes lymphoïdes secondaires, le système immunitaire a mis en place des mécanismes de tolérances pour tenter de contrôler ou d'éliminer les lymphocytes B autoréactifs, tout en préservant un large répertoire de lymphocytes B lui permettant de reconnaître des antigènes étrangers, et de combattre un grand nombre d'infections.

Dans cette partie nous verrons brièvement les différentes étapes de maturation des lymphocytes B, en se focalisant plus particulièrement sur les différents mécanismes de tolérance mis en jeu au cours de l'ontogénie des lymphocytes B.

A) La maturation des Lymphocytes B

1) De la cellule souche hématopoïétique au progéniteur lymphoïde commun

Chez les mammifères, les lymphocytes B sont issus de la moelle osseuse et dérivent, comme toutes les cellules sanguines, d'une cellule souche hématopoïétique (HSC Hematopoietic Stem Cell). L'HSC va, dans un premier temps, se différencier en MPPs (MultiPotent Progenitor cells) puis en LMPPs (Lymphoid-primed MultiPotent Progenitor). A ce dernier stade, les cellules perdent leurs capacités d'auto-renouvellement. Les LMPPs sont également caractérisés par l'expression de FLT3 à leur surface (FMS-related tyrosine kinase 3, encore appelé FLK2) (Adolfsson et al. 2001). L'augmentation progressive du niveau d'expression de FLT3 va marquer la ségrégation graduelle des cellules dans le compartiment lymphoïde. L'interaction entre FLT3 et son ligand (FLT3 ligand), exprimé par les cellules stromales de la moelle osseuse, va induire l'expression du récepteur pour l'IL-7 (IL-7R ou

CD127) à la surface des LMPPs, ce qui va permettre leur différenciation en un progéniteur lymphoïde appelé CLP (Common Lymphocyte Progenitor). A ce stade de différenciation, la cellule possède encore la capacité de se différencier en lymphocytes B, lymphocytes T, cellules NK et cellules dendritiques, mais a perdu celle de se différencier en cellules de la lignée myéloïde (granulocytes, mégacaryocytes ou érythrocytes) (Figure 1, et Figure 2 Page 5).

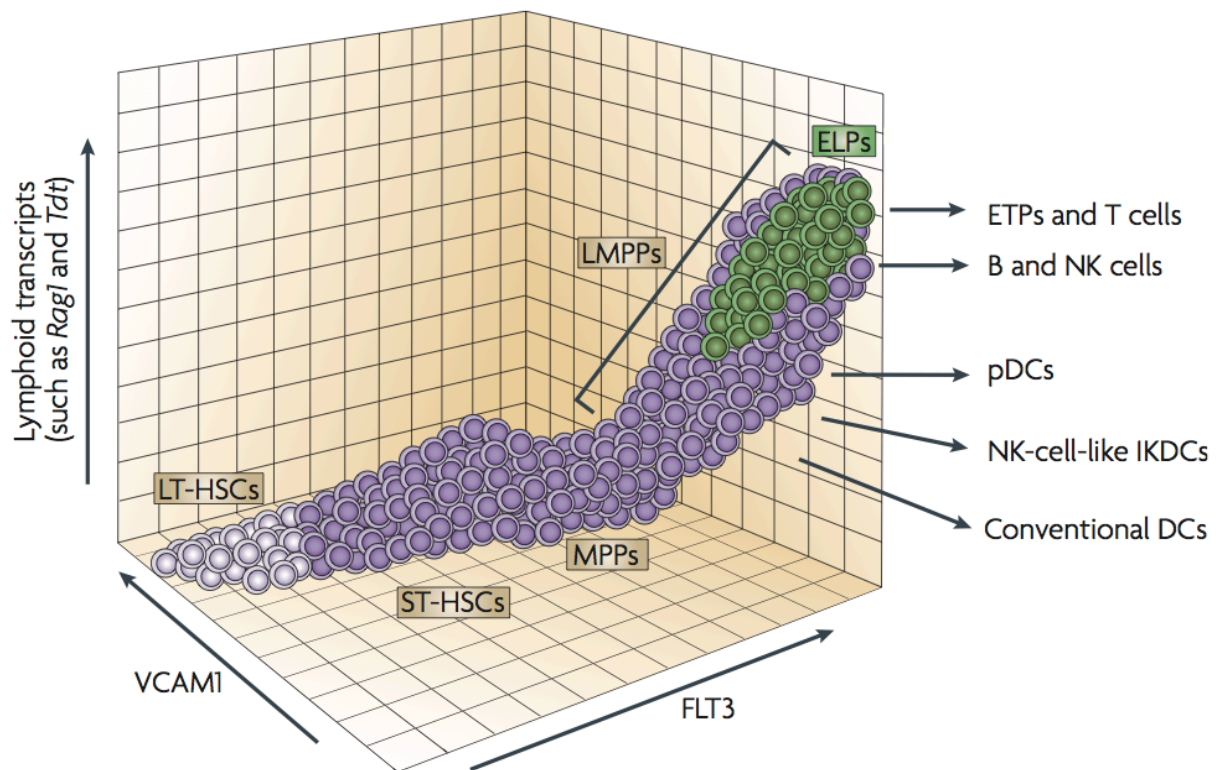


Figure 1 : Les phases précoces de la maturation des cellules composant le système immunitaire.

Les différents types cellulaires sont représentés en fonction de l'expression de VCAM1, FLT3 et de certaines molécules importantes dans le développement lymphoïde. LT-HSCs (Long-term repopulating haematopoietic stem cells) ; ST-HSCs (Short-term repopulating haematopoietic stem cells) ; MPPs (Multipotent progenitors) ; LMPPs (Lymphoid-primed multipotent progenitors) ; ELPs (Early lymphoid progenitors) ; ETPs (Early T cell-lineage progenitors) ; pDCs (plasmacytoid dendritic cells) ; IKDCs (Interferon-producing killer dendritic cells).

D'après (Welner et al. 2008).

Les facteurs nécessaires aux CLPs pour s'orienter vers une différenciation en lymphocytes B restent aujourd'hui encore mal connus. Cependant, il apparaît que le développement des précurseurs des lymphocytes B requiert : 1/ la présence de facteurs

solubles sécrétés par les cellules stromales tels que CXCL12 (CXC-chemokine ligand 12), FLT3L, SCF (stem-cell factor) (Figure 2) ; 2/ l'expression de protéines membranaires par les cellules stromales comme RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand) 3/ une expression séquentielle de facteurs de transcription comme Ikaros, PU.1, E2A, EBF (early B-cell factor) et PAX5.

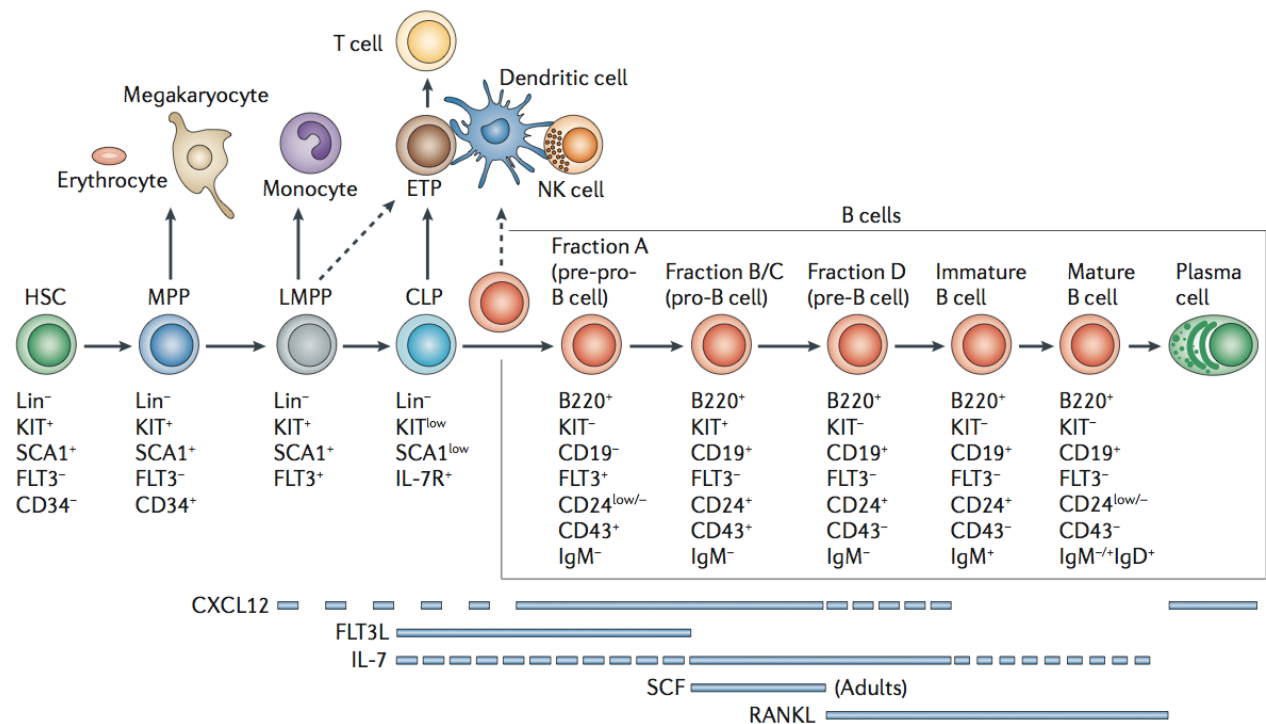


Figure 2 : La maturation de la lignée des lymphocytes B : de la cellule souche hématopoïétique au plasmocyte.

Les marqueurs spécifiques des cellules à chaque stade de différenciation, ainsi que les facteurs solubles présents dans l'environnement cellulaire, sont indiqués. HSCs (Haematopoietic stem cells) ; MPPs (Multipotent progenitors) ; LMPPs (Lymphoid-primed multipotent progenitors) ; CLPs (Common lymphoid progenitors) ; ETPs (Early T cell-lineage progenitors) ; CXCL12 (CXC-chemokine ligand 12) ; FLT3L (fms-related tyrosine kinase 3 ligand) ; IL-7 (Interleukine 7) ; SCF (Stem-cell factor) ; RANKL (Receptor of activated nuclear factor- κ B ligand).

D'après (Nagasawa 2006).

2) La maturation de la lignée des lymphocytes B

En 1991, Hardy R.R. et al vont établir une nouvelle subdivision des précurseurs des lymphocytes B, qui étaient jusqu'alors considérés comme des cellules exprimant le marqueur B220 et n'exprimant pas d'immunoglobuline à leur surface, en quatre sous-catégories

appelées fractions A, B, C et D (Hardy et al. 1991) (Figure 3). Ces subdivisions ont été faites sur la base de l'expression de marqueurs de surface tels que CD43, BP-1 (Ly-51), HSA (heat-stable antigen ou CD24). Cette classification des lymphocytes B a ensuite été validée et affinée par de nombreux groupes durant les années 90, montrant la cohérence de l'enchaînement des différentes fractions décrites, en terme d'expression de marqueurs de surface, d'activité fonctionnelle des cellules mais aussi en terme de réarrangement des chaînes d'immunoglobulines. Les cellules des fractions B, C et D découlant des cellules de la fraction A, ces cellules de la fraction A ont donc été définies comme les précurseurs apparaissant le plus tôt dans la maturation des lymphocytes B et appelées cellules pré-pro-B.

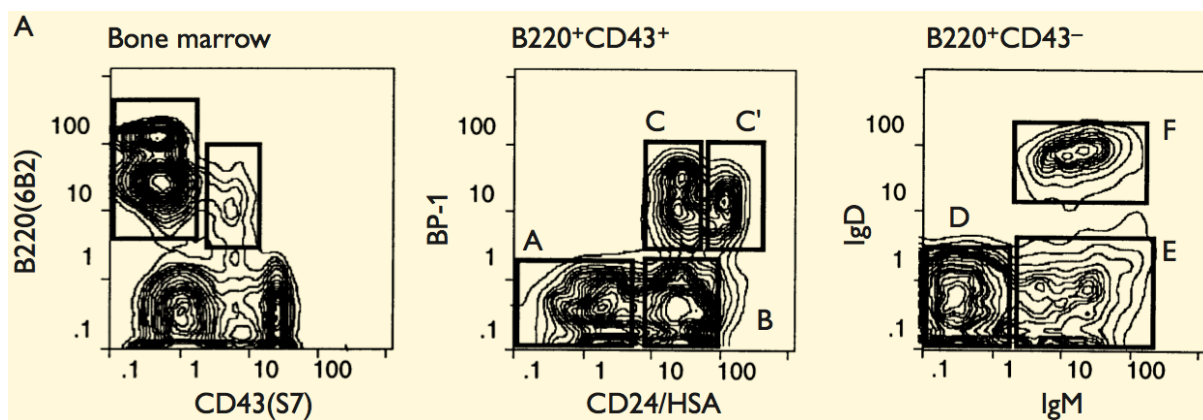


Figure 3 : Identification des fractions A à F par cytométrie de flux.

Une première analyse permet de dissocier deux fractions prédominantes dans la population $B220^+$, les fractions $CD43^+$ et $CD43^-$ (contour-plot de gauche). Les marqueurs BP-1 et CD24/HSA sont utilisés pour définir les fractions A, B, C et C' dans la population $B220^+CD43^+$. Les marqueurs IgM et IgD sont utilisés pour définir les fractions D, E, F dans la population $B220^+CD43^-$.

D'après (Hardy et al. 2000).

La maturation des lymphocytes B proprement dite va débiter avec le réarrangement de la chaîne lourde des immunoglobulines. Ces processus de réarrangements vont débiter au stade pro-B précoce (early pro-B) et se terminer au stade de lymphocyte B immature (Figure 4a page 7).

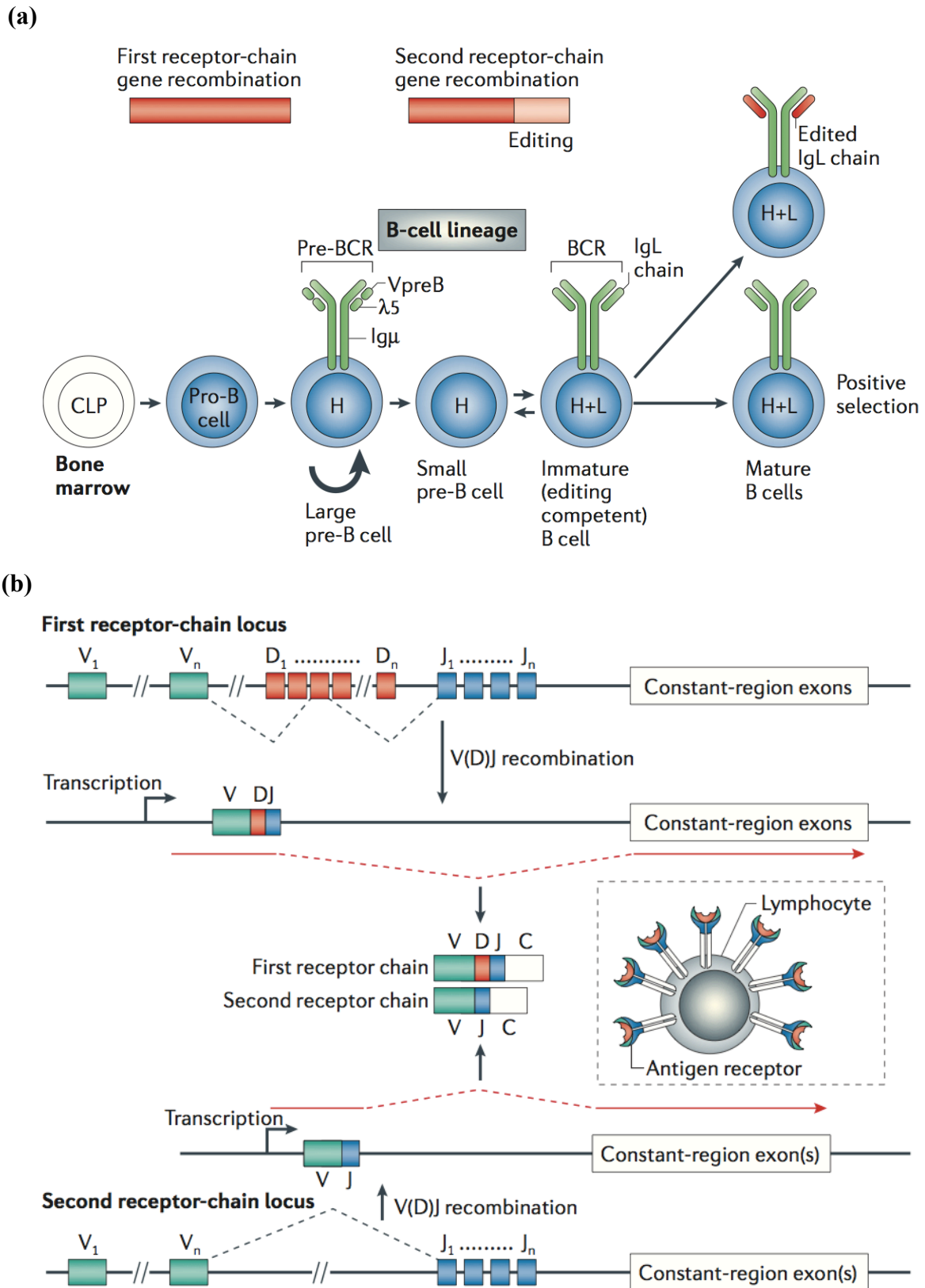


Figure 4 : Les processus de réarrangements des chaînes d'immunoglobulines.

(a) Les réarrangements des chaînes d'immunoglobulines durant la maturation de la lignée B.

(b) Schéma général de la recombinaison V(D)J.

D'après (D. Nemazee 2006).

Durant le stade pro-B précoce, les facteurs de transcription E2A et EBF vont permettre l'expression de protéines cruciales pour les processus de réarrangement des chaînes d'immunoglobulines comme les protéines Rag-1 et Rag-2. Grâce à ces protéines va s'opérer la recombinaison de gènes D_H et J_H de chaîne lourde d'immunoglobuline, sur un allèle. Les cellules passent ensuite au stade pro-B tardif (late pro-B) durant lequel un gène V_H va se recombiner avec la séquence D_HJ_H existante, pour former le segment $V_HD_HJ_H$ (Figure 4b page 7). Ceci va permettre l'expression d'une chaîne lourde à la surface de la cellule, en association avec une pseudo chaîne légère appelée SLC (surrogate light chain). Cette pseudo chaîne légère n'est pas encodée dans le locus des immunoglobulines et a pour but de tester si la chaîne lourde d'immunoglobuline formée au cours du processus de réarrangement est fonctionnelle. L'association de la chaîne lourde réarrangée avec la SLC forme le pré-BCR qui est exprimé à la surface de la cellule appelée désormais lymphocyte pré-B. L'expression du pré-BCR à la surface du lymphocyte pré-B va stopper le réarrangement des chaînes lourdes d'immunoglobuline, permettant au lymphocyte B de réarranger une seule chaîne lourde et ainsi d'éviter l'expression de plusieurs BCRs différents : ce processus est connu sous le nom d'exclusion allélique. Le signal émanant du pré-BCR va également induire la prolifération du lymphocyte pré-B et initier le réarrangement de la chaîne légère d'immunoglobuline (pour revue (Herzog et al. 2009)). Le réarrangement de la chaîne légère s'effectue grâce aux protéines Rag qui sont à nouveau exprimées à ce stade de différenciation. A nouveau, le réarrangement de la chaîne légère s'effectue sur un allèle après l'autre (d'abord la chaîne κ puis la chaîne λ sur le premier chromosome puis le second), ce qui permettra la mise en place de l'exclusion allélique. Quatre chaînes légères peuvent donc potentiellement être réarrangées pour produire l'expression d'une IgM fonctionnelle, augmentant la chance pour un lymphocyte pré-B de passer au stade de différenciation suivant et devenir un lymphocyte B immature. Les lymphocytes B immatures vont ensuite migrer en périphérie via la circulation sanguine, en passant par trois stades transitionnels qu'on appelle T1, T2 et T3. Les lymphocytes B transitionnels peuvent être identifiés sur a base de l'expression des marqueurs CD93, CD21, CD23, IgM et IgD (Tableau 1).

	T1	T2	T3
CD19	++	++	++
CD93	++	+	(+)
CD21	-	++	++
CD23	-	++	++
IgM	++	++	+
IgD	(+)	++	++

Tableau 1:
Marqueurs utilisés pour
l'identification des cellules
B transitionnelles.

Une fois arrivés dans les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate, les lymphocytes B vont se différencier soit en lymphocytes B folliculaires ou en lymphocytes B de la zone marginale (Figure 5). Les facteurs gouvernant ce choix sont aujourd'hui encore mal connus, mais il semblerait que la force du signal provenant du BCR et du récepteur pour BAFF (B-cell activation factor) soient les facteurs les plus importants (pour revue (Pillai & Annaiah Cariappa 2009)). Outre ces deux populations de lymphocytes B qui constituent la grande majorité des lymphocytes B spléniques (70% de cellules B folliculaires et 15% de cellules B de la zone marginale), les lymphocytes B1 représentent environ 3% des cellules B de la rate. Les cellules B1 ont pour fonction de sécréter les anticorps naturels (anticorps présents dans le serum d'individus sains en absence de toute immunisation avec l'antigène contre lequel ils sont dirigés) et sont également impliqués dans l'immunité mucoale (pour revue (Baumgarth 2010)).

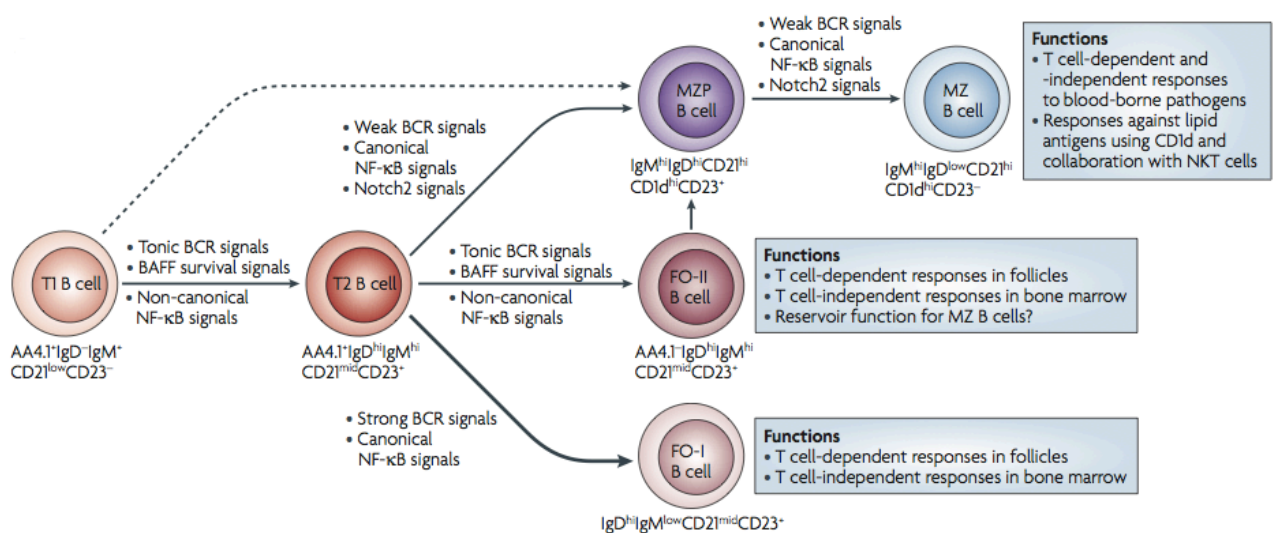


Figure 5 : Schéma du devenir des lymphocytes B transitionnels après leur arrivée dans la rate.

MZP (marginal zone precursor) ; MZ (marginal zone B cells) ; FO-I (follicular type I B cell) FO-II (follicular type II B cell) ; T1 (transitionnal 1 B cell) ; T2 (transitionnal 2 B cell) D'après (Pillai & Annaiah Cariappa 2009).

B) Les mécanismes de tolérance

1) La tolérance centrale

C'est au stade de lymphocyte B immature que s'effectue le premier contrôle de la spécificité du BCR. A ce stade les lymphocytes B vont être testés sur la base de leur réactivité contre des antigènes du soi (Figure 6 page 11). Ce mécanisme de contrôle dans la moelle osseuse est appelé tolérance centrale. Bien qu'il a récemment été décrit un mécanisme de sélection négative au stade pré-B, mettant en jeu une possible reconnaissance d'antigènes du soi par le pré-BCR (Figure 7, n°1 page 13) (Keenan et al. 2008), l'essentiel des mécanismes de tolérance centrale se produit au stade de lymphocyte B immature (Figure 7, page 13).

Lorsque le lymphocyte B immature ne possède pas de réactivité contre le soi, il va poursuivre son développement, quitter la moelle osseuse puis être acheminé vers la rate. Si le lymphocyte B réagit avec des antigènes du soi, plusieurs issues sont possibles (Figure 6 page 11) (pour revue (Christopher C Goodnow et al. 2005)) :

- dans le cas d'une forte fixation d'antigènes du soi, le BCR va rapidement être internalisé et provoquer l'arrêt du développement du lymphocyte B (Hartley et al. 1993). Ces cellules vont exprimer très faiblement le récepteur pour BAFF (B-cell-activating factor), facteur de survie important pour le lymphocyte B. Ces cellules vont également continuer à exprimer les protéines Rag, permettant le réarrangement de nouvelles chaînes d'immunoglobuline et l'édition d'un nouveau BCR à la surface (Figure 7, n°2 page 13). Dans le cas où elles ne réussissent pas à produire un réarrangement de chaîne légère conduisant à un BCR fonctionnel et non autoréactif, les lymphocytes B vont mourir dans la moelle osseuse ou très peu de temps après leur arrivée dans la rate (Figure 7, n°3 et 5 page 13). La mort des cellules ayant une forte réactivité contre des antigènes du soi est connue sous le nom de : « déletion clonale ». Cette mort cellulaire fait intervenir Bim, une molécule pro-apoptotique qui va inhiber les protéines de la famille Bcl-2, facteurs de survie importants pour le lymphocyte B. De façon intéressante, la souris *Bim* déficiente produit spontanément des anticorps anti-ADN, illustrant l'importance de ce facteur dans les processus de tolérance centrale (Andreas Strasser & Philippe Bouillet 2003).

• dans le cas d'une faible fixation d'antigènes du soi, la cellule B autoréactive va pouvoir migrer en périphérie, mais n'aura pas la capacité de répondre à un antigène : c'est ce qu'on appelle l'anergie (Figure 7, n°6 page 13). Les cellules anergiques sont caractérisées par une durée de vie plus courte que les cellules B non autoréactives (1-5 jours comparé à 40 jours), une exclusion folliculaire et une altération du signal provenant du BCR (Cambier et al. 2007). Dans le cas d'une faible réactivité envers le soi, les lymphocytes B peuvent également devenir ignorants (Figure 7, n°6 page 13). Cet état d'ignorance est caractérisé par une absence de réponse à la liaison d'un antigène au BCR parce que l'antigène réagit trop faiblement avec le BCR (Pauline Soulas et al. 2002) ou parce que l'antigène n'est pas accessible dans la moelle osseuse ou plus tard dans la rate.

Après avoir passé ces étapes de sélection, les lymphocytes B vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate et les ganglions lymphoïdes et continuer leur développement en se différenciant en cellules B de la zone marginale ou en lymphocyte B folliculaire.

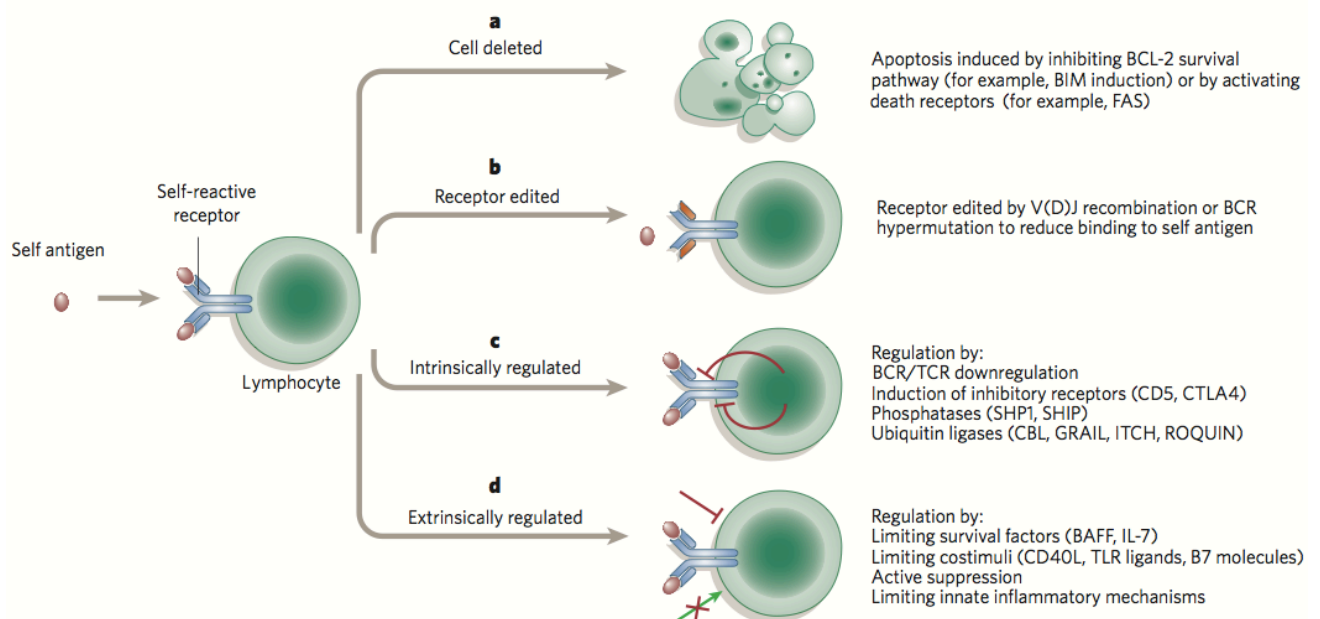


Figure 6 : Devenir de la cellule B autoréactive après fixation d'un antigène du soi dans la moelle osseuse.

Suivant la force du signal engendré par la liaison de l'autoantigène, la cellule B peut :

- a/ être éliminée par apoptose
- b/ produire un nouveau BCR (par le mécanisme d'édition de récepteur)
- c/ entrer dans un état d'ignorance
- d/ entrer dans un état d'anergie

D'après (Christopher C Goodnow et al. 2005).

2) La tolérance périphérique

Seuls 10% des lymphocytes B immatures produits dans la moelle osseuse arrivent jusqu'au stade suivant de différenciation : les lymphocytes B transitionnels. Ces lymphocytes vont migrer vers la rate via la circulation sanguine, où d'autres mécanismes de tolérance se mettent en place pour éliminer les lymphocytes B ayant une spécificité contre des autoantigènes de la périphérie, qui seraient absents dans la moelle osseuse (Figure 7 page 13). Une forte affinité contre de tels autoantigènes va provoquer l'induction rapide de l'apoptose de ces cellules (Figure 7, n°6 page 13). Une affinité faible va rendre ces cellules anergiques ou ignorantes. Comme nous l'avons énoncé précédemment, les cellules anergiques ont une durée de vie plus courte que les cellules non autoréactives cependant, dans le cas d'une forte stimulation par les lymphocytes T, par BAFF ou par la voie TLR, ces cellules peuvent échapper à la sélection négative et entrer dans les centres germinatifs où elles peuvent subir le processus de maturation d'affinité, pouvant conduire à l'apparition de lymphocytes B autoréactifs de plus forte affinité, et donc potentiellement pathogènes (Mark J Shlomchik 2008).

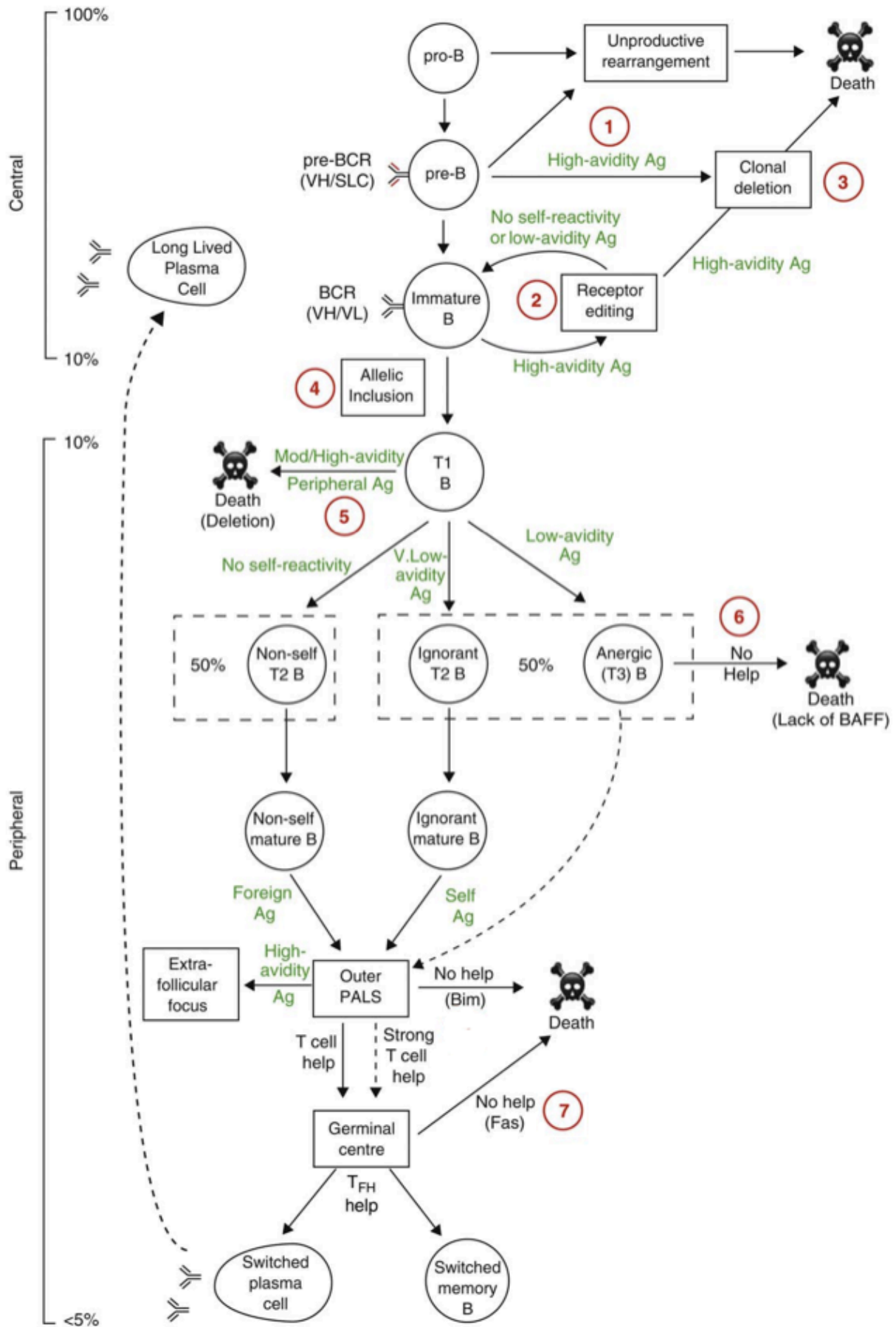


Figure 7 : Représentation schématique des mécanismes de tolérance centrale et périphérique permettant le maintien de la tolérance B.

- (1) Les cellules pré-B exprimant une chaîne lourde (VH) ayant une forte réactivité contre le soi, associée à une pseudo chaîne légère (SLC), vont être éliminées par délétion.
 - (2) Les cellules B immatures exprimant une chaîne lourde et une chaîne légère (VL) possédant une forte réactivité envers le soi vont avoir la capacité de réarranger leurs chaînes d'immunoglobuline (receptor editing) pour réduire la reconnaissance du soi.
 - (3) Après édition de récepteur, les cellules B ayant toujours une forte réactivité envers le soi sont éliminées par délétion.
 - (4) L'inclusion allélique désigne un processus selon lequel les BCR autoréactifs vont être « dilués » grâce à l'expression d'une autre chaîne légère.
 - (5) Dans la rate les lymphocytes B transitionnels de type 1 (T1) exprimant un BCR reconnaissant un antigène du soi présent en périphérie vont être éliminés par apoptose.
 - (6) Les lymphocytes B reconnaissant faiblement mais de façon continue des antigènes du soi vont devenir anergiques et être éliminés si elle ne sont pas stimulées par BAFF.
 - (7) Les cellules B ayant acquis une réactivité contre le soi après le processus d'hypermutation somatique dans les centres germinatifs vont être éliminés par apoptose médiée par Fas.
- D'après (Basten & Silveira 2010).

C) Les modèles murins d'étude des mécanismes de tolérance

L'étude des mécanismes de tolérance B a été rendue possible grâce à l'existence de modèles murins permettant l'expression, à la surface des lymphocytes B, d'un BCR transgénique autoréactif (Tableau 2 page 15). Dans ces modèles l'autoantigène est soit endogène (ex : modèle anti-ADN et anti-CMH-I H-2k) soit apporté par l'expression d'un autre transgène (ex : modèle anti-HEL et anti-CMH-I K^b). Ces modèles ont permis de caractériser les différents points de contrôle qui régulent le développement du lymphocyte B autoréactif ainsi que certaines des protéines impliquées dans la sélection, l'activation ou la mort des lymphocytes B autoréactifs durant les processus de maturation.

Dans cette partie nous décrirons trois des modèles de souris transgéniques les plus étudiés, en insistant sur les mécanismes de tolérance B ayant pu être décrits grâce à ces modèles.

Tableau 2 : Les mécanismes de tolérance découverts grâce aux modèles murins dont les cellules B expriment un BCR transgénique autoréactif.

D'après (Mark J Shlomchik 2008).

Phenotype	Example	Description
Deletion	anti-MHCII Tg, anti-RBC, high-affinity anti-IgG (RF) Tg (20.8.3)	lack of cells beyond the pre-B cell stage in BM and in peripheral lymphoid tissue
Receptor editing	anti-MHCII Tg, 3H9/V κ 4 anti-dsDNA Tg, 3H9 or 56R site-directed Tg, HEL site-directed Tg with mHEL	cells express an endogenous V _L rather than the Tg-encoded one, or cells express a limited repertoire of L chains that veto autoreactivity
Allelic inclusion	anti-MHC II site-directed Tg, 3H9 56R	cells coexpress an endogenous V _L with the Tg-encoded one, or cells express two L chains, including one that vetoes autoreactivity
Anergy	anti-HEL Tg with sHEL, anti-DNA (3H9/V λ_1), anti-Sm Tg (2-12), ArsA1	cells have variably reduced sIgM expression, shortened life span, and localize to the T-B interface; variably impaired response to LPS and reduced response to BCR ligation
Clonal ignorance	anti-IgG (RF) AM14 Tg, anti-La	cells assume a normal follicular B cell phenotype

1) Le modèle anti-HEL

Le modèle anti-HEL (hen egg lysozyme), conçu par Goodnow et al, fut l'un des premiers modèles et est probablement le plus étudié (C C Goodnow et al. 1988; C C Goodnow et al. 1989). Il a été d'une aide précieuse dans la compréhension des mécanismes de tolérance B.

Dans ce modèle, la chaîne lourde (Ig μ et Ig δ) et la chaîne légère (Ig κ), toutes les deux spécifiques du HEL, sont issues de l'hybridome (BALB/cJ) HyHEL10, permettant l'expression d'un BCR transgénique anti-HEL d'allotype *a*, comparé aux BCR endogènes d'origine C57BL/6 d'allotype *b*. Chez la souris anti-HEL, plus de 90% des cellules B spléniques ont un phénotype IgM^{a(high)}IgD^{a(low/high)} (c'est à dire mature) et entre 60 et 90% sont spécifiques du HEL. Les quelques cellules IgM^{a+} n'ayant pas de spécificité anti-HEL pourraient être le résultat de l'association de la chaîne lourde transgénique avec une chaîne légère endogène (C C Goodnow et al. 1989). L'un des inconvénients de ce modèle anti-HEL, qui est un modèle transgénique classique et non Knock-in (KI), est qu'il ne permet pas la commutation de classe d'immunoglobuline ni l'édition de récepteur du transgène. Ce

problème a été résolu par Brink et al qui ont généré une souris SW_{HEL} KI pour la région variable de la chaîne lourde V_H10 de spécificité anti-HEL dans le locus *IgH* endogène. Lorsque ces souris sont croisées avec celles exprimant une chaîne légère transgénique anti-HEL, on obtient des animaux pourvus de lymphocytes B exprimant un BCR spécifique du HEL, ayant la capacité de réaliser la commutation de classe d'immunoglobuline et l'édition de récepteur (Phan et al. 2003).

Dans les deux modèles, l'antigène HEL est apporté par d'autres transgènes, qui permettent l'expression de HEL sous forme soluble (sHEL) ou sous forme membranaire (mHEL). L'avantage de ce modèle est de pouvoir étudier les mécanismes de tolérance en présence ou en absence de l'autoantigène. Grâce à ces différents modèles, il a été montré que les mécanismes de tolérance mis en jeu varient suivant que HEL soit exprimé à l'état soluble ou de façon membranaire. Chez les souris double transgéniques anti-HEL/mHEL exprimant le HEL de façon membranaire, on observe plutôt une tolérance au niveau central caractérisée par une élimination (délétion) de la plupart des lymphocytes B ayant une forte affinité pour le HEL (Hartley et al. 1991). Dans le modèle anti-HEL/sHEL exprimant du HEL sous forme soluble, les lymphocytes B ne sont pas éliminés dans la moelle osseuse et peuvent migrer en périphérie. Cependant, ces lymphocytes B ne sont pas capable de sécréter des IgM anti-HEL, prouvant que ces lymphocytes B sont "tolérisés" (ou rendus tolérants vis à vis du HEL) (C C Goodnow et al. 1988). Ces expériences ont permis de mettre en évidence le mécanisme d'anergie des cellules B autoréactives décrit dans la partie "la tolérance centrale".

Le modèle anti-HEL a permis de mieux comprendre la biologie des cellules anergiques. Premièrement, des études ont montré l'importance de l'IgD membranaire dans l'induction de l'anergie des lymphocytes B. En utilisant des souris transgéniques uniquement pour la chaîne lourde *Igμ* ou *Igδ*, Brink et al ont montré que des lymphocytes B anergiques peuvent être induits uniquement via un signal provenant de l'IgD (Brink et al. 1992). Deuxièmement, le rôle de l'interaction entre les lymphocytes B et T dans l'établissement/le maintien de la tolérance a également été approfondi grâce à ce modèle. Dans des expériences de transfert adoptif de lymphocytes T pré-cultivés avec du HEL, Eris et al ont montré que ces lymphocytes T sont capables de rompre l'état d'anergie des lymphocytes B dans le modèle anti-HEL/sHEL (Eris et al. 1994). Troisièmement, le modèle anti-HEL a permis de mettre en évidence les voies de signalisations impliquées dans l'induction et le maintien de l'état d'anergie des lymphocytes B. Les cellules anergiques, après une stimulation de type anti-IgM, sont caractérisées par une diminution de la réponse calcique, de la phosphorylation des

protéines composant la voie de signalisation du BCR et de la prolifération (Healy et al. 1997). De plus ces cellules montrent également une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire à l'état basal (c'est à dire sans antigène) accompagnée d'une activation résiduelle permanente. Ceci a pour conséquence d'engendrer une réponse différente de ces cellules anergiques après rencontre avec le HEL, comparée à celle des cellules B naïves. En effet, après une stimulation BCR-dépendante, les cellules B naïves vont induire une forte augmentation de la concentration en calcium intracellulaire activant préférentiellement les facteurs ERK, ATF2, NFATc et NFκB. D'autre part les cellules B anergiques (ou tolérantes), du fait de l'augmentation du flux calcique intracellulaire à l'état basal, vont préférentiellement déclencher une activation des voies NFATc et ERK donnant lieu à une réponse plutôt de type inhibitrice (Figure 8) (Healy et al. 1997).

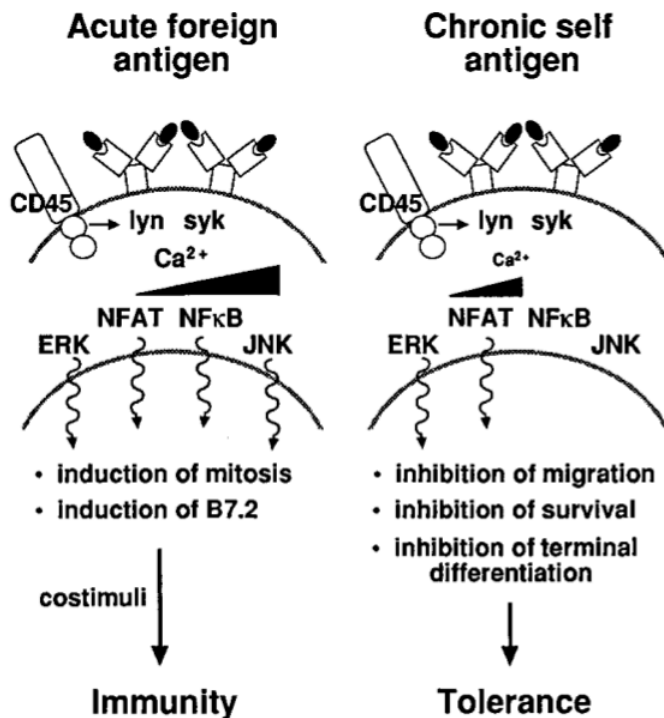


Figure 8 : Les voies d'activation enclenchées lors d'une exposition permanente à des antigènes du soi.

Dans le cadre d'une réponse de la cellule B à un antigène étranger (tel qu'un antigène d'un agent infectieux), le signal calcique engendré est important, et les voies Erk, NFAT, NFκB et JNK sont activées.

Dans le cas d'une activation chronique de la cellule B par un antigène du soi, le signal calcique est réduit et seules les voies Erk et NFAT sont activées. Ceci va entraîner la cellule B dans un état de tolérance.

D'après (Healy et al. 1997).

Enfin, des analyses par microarrays, comparant l'expression des gènes entre cellules B naïves et anergiques, ont été réalisées. Les résultats de ces analyses ont montré une augmentation de l'expression de 22 gènes dans les cellules B anergiques comparées aux cellules B naïves à l'état basal : parmi ces gènes, on retrouve *Egr1*, *CD72*, *Vβ5*, *Lck* et *IgD*. Après activation du BCR, 500 gènes voient leur expression augmentée dans les cellules B naïves alors que c'est le cas pour seulement 16 gènes pour les cellules anergiques, la plupart de ces gènes étant des régulateurs négatifs de la voie de signalisation du BCR.

2) Les modèles anti-ADN

Plusieurs MAI dont le lupus érythémateux disséminé (LED), ou lupus érythémateux systémique, sont caractérisées par la production d'autoanticorps de type anti-ADN. Dans le but de mieux comprendre la biologie de ces anticorps, plusieurs équipes ont généré des modèles de souris transgéniques exprimant des BCR ayant une spécificité pour divers autoantigènes nucléaires. L'étude de ces modèles a permis, conjointement avec l'étude des modèles anti-HEL et anti-CMH-I, de mettre en évidence certains des mécanismes de tolérance B, plus particulièrement le mécanisme d'édition de récepteur.

a) *Le modèle 3H9 de Martin Weigert*

Ce modèle fut le premier modèle de souris transgénique de type anti-ADN à être décrit. Le transgène utilisé permet l'expression de la région variable de la chaîne lourde de l'anticorps 3H9 provenant de la souris MRL/*lpr* (voir partie « Les modèles murins de LED ») (Erikson et al. 1991). L'association de cette chaîne lourde transgénique avec les chaînes légères endogènes $V_{\kappa 8}$ et $V_{\kappa 4}$ va conférer respectivement une spécificité anti-ADN simple-brin (anti-ADNsb) et anti-ADN double-brin (anti-ADNdb). Bien que ces souris transgéniques génèrent de nombreux lymphocytes B ayant un BCR spécifique de l'ADN, aucune production d'anticorps anti-ADN n'est détectée dans le sérum, montrant l'établissement d'une tolérance B chez ces souris. Comme chez la souris anti-HEL, les cellules B anti-ADN ont un phénotype anergique, qui est réversible par l'apport d'une aide des lymphocytes T (Noorchashm et al. 1999).

Le modèle anti-ADN ainsi que le modèle anti-CMH-I (voir partie «Le modèle anti-CMH-I») ont permis d'introduire le concept de l'édition de récepteur, stipulant que la chaîne lourde d'une immunoglobuline peut s'associer à une nouvelle chaîne légère dont la genèse est permise par la réactivation de la recombinaison VDJ, afin d'éviter la reconnaissance d'un antigène du soi (Gay et al. 1993).

Dans le modèle transgénique 3H9 l'introduction d'une mutation dans la partie CDR2 de la région V_H 3H9 (mutation 56R, modèle alors appelé 3H9(56R)) va permettre d'augmenter l'affinité des anticorps anti-ADN (C. Chen et al. 1994). Comme pour le modèle non muté 3H9, la tolérance est maintenue puisque très peu d'IgM anti-ADN et aucun IgG anti-ADN ne sont retrouvés dans le sérum de ces souris. Les cellules B anti-ADN arrivant

tout de même à migrer vers la rate sont celles qui ont réussi à remplacer leurs chaînes légères par des chaînes $V\kappa$ endogènes (dites éditrices) permettant la perte de la spécificité anti-ADN. Par contre, lorsque ce transgène est placé sur un fond génétique de type MRL/*lpr*, les cellules B anti-ADN vont utiliser des chaînes $V\kappa$ différentes (dites non-éditrices) qui ne permettent pas de perdre la réactivité contre l'ADN (Y Li et al. 2002). Ceci va permettre une rupture de tolérance vis à vis de l'ADN et engendrer une forte production d'IgG anti-ADN chez les souris MRL/*lpr*.3H9 (56R).

Chen et al ont produit un modèle KI présentant une insertion ciblée de la région variable de la chaîne lourde de l'anticorps 3H9 dans le locus J_H endogène (C. Chen et al. 1997). Chez ces souris les cellules B anti-ADN vont être éliminées au cours de leur maturation ou devenir anergiques. Il a été montré que ces cellules B anergiques sont exclues du follicule B, et plus précisément arrêtées à l'interface B-T, les empêchant de se différencier en plasmocytes ou en cellules B mémoires. Ce mécanisme de tolérance a été nommé : l'exclusion folliculaire (Mandik-Nayak et al. 1997).

Le fond génétique sur lequel sont exprimés les transgènes anti-ADN semble jouer un rôle important dans l'efficacité des mécanismes de tolérance B. En effet, les premières études utilisant les modèles 3H9 et 3H9(56R), ont été réalisées sur fond Balb/c. Comme nous l'avons mentionné précédemment, la tolérance semble être maintenue sur ce fond génétique. Cependant, contrairement à la souris Balb/c.56R, le modèle C57BL/6.56R se caractérise par une production d'IgM et d'IgG anti-ADN, suggérant ainsi que le fond C57BL/6 contient des facteurs génétiques le rendant plus susceptible à une rupture de tolérance B (Sekiguchi et al. 2006).

b) Le modèle D42 de Dan Eilat

Un autre modèle KI basé sur l'expression d'une chaîne lourde provenant d'un anticorps de spécificité anti-ADN a été développé par Eilat et al. Dans ce modèle l'anticorps anti-ADN produit est issu d'un hybridome (D42) dérivé d'un clone de lymphocyte B provenant de la souris (NZBxNZW) F1 (ou BW voir partie "Les modèles murons de LED") (Pewzner-Jung et al. 1998). Sur fond C57BL/6, aucun anticorps n'est détecté dans le sérum des souris grâce à l'efficacité des mécanismes de tolérance B qui comprennent essentiellement une délétion, une édition de récepteur et une anergie. Une des caractéristiques

de ce modèle est l'utilisation de différents mécanismes de tolérance suivant le type de chaînes légères associées à la chaîne lourde transgénique. Les souris exprimant une chaîne légère de type $V\kappa 1/J\kappa 1$ vont préférentiellement utiliser l'édition comme mécanisme de tolérance (car un certain nombre d'autres gènes $J\kappa$ de régions variables de chaîne légères sont disponibles en aval du transgène, pour la mise en place d'une nouvelle recombinaison de chaîne légère). Les cellules B des souris exprimant une chaîne légère de type $V\kappa 8/J\kappa 5$ vont plutôt devenir anergiques. Enfin, les souris exprimant une chaîne légère $V\kappa 4/J\kappa 4$ vont utiliser l'édition de récepteur et l'anergie pour maintenir la tolérance B (Pewzner-Jung et al. 1998).

Le transfert du transgène D42 sur un fond autoimmun de type BW donne lieu à une production importante d'IgG anti-ADN de forte affinité (Friedmann et al. 1999). Dans ce modèle on ne détecte pas de cellule B anti-ADN anergique, et le mécanisme d'édition de récepteur censé abolir la spécificité anti-ADN de l'anticorps engendre au contraire un gain d'affinité envers l'ADN (Yachimovich-Cohen et al. 2003). Cette observation met en évidence que le processus d'édition de chaînes légères peut être à double tranchant, permettant d'un côté le maintien de la tolérance, et de l'autre un gain d'affinité pour l'autoantigène lorsque la tolérance est rompue (pour revue (Pelanda & Torres 2006)).

3) Le modèle anti-CMH-I

Nemazee et al décrivent en 1989 un modèle de souris transgénique permettant l'expression d'un anticorps (appelé 3-83) ayant une spécificité envers les molécules de CMH de classe I d'haplotype $H-2K^k$ et $H-2K^d$. Les anticorps produits ont une affinité moyenne pour les molécules du CMHI d'haplotype $H-2K^k$, une affinité faible pour $H-2K^d$ et ne peuvent pas se fixer à $H-2^d$. Ainsi, dans ce modèle, la tolérance peut être étudiée en présence de l'antigène (sur un fond génétique Balb/k $H-2K$ exprimant donc les antigènes $H-2K^k$ et $H-2K^d$) ou en absence de l'antigène (sur un fond génétique Balb/c $H-2^d$). Comme pour le modèle anti-HEL/mHEL, les cellules B ayant une spécificité anti- $H-2^k$ sont toutes éliminées dans la moelle osseuse ; ainsi aucune production d'anticorps anti- $H-2^k$ n'est détectée dans le sérum de ces souris (D. A. Nemazee & Bürki 1989).

Un deuxième modèle à ensuite été généré permettant d'étudier plus spécifiquement les mécanismes de tolérance périphérique. Ces souris sont transgéniques pour les gènes codant pour les chaînes lourdes (VDJ plus les régions constantes $C\mu$ et $C\delta$) et légères (VJ plus la région constante) de l'anticorps 3-83 de spécificité anti- $H-2K^b$. Les lymphocytes B de ces

souris expriment donc un BCR anti-CMH-I de type IgM et IgD. Dans ce modèle l'anticorps (toujours dérivé de 3-83) possède une spécificité contre l'haplotype K^b du CMH-I et l'autoantigène est apporté par l'expression au niveau du foie d'un autre transgène (appelé MT-K^b) codant pour le CMH-I K^b. Chez ces souris on observe comme dans le modèle initial, le maintien de la tolérance B, à ceci près que la délétion des cellules B autoréactives s'effectue en périphérie et non plus dans la moelle osseuse (Russell et al. 1991). Cette constatation fut à l'origine d'une découverte de base en immunologie, à savoir que la tolérance est un processus continu débutant dans la moelle osseuse puis se poursuivant en périphérie. Ces modèles anti-CMH ont ensuite également été très utiles dans la compréhension du mécanisme d'édition des chaînes légères (Tiegs et al. 1993). Du fait d'une réaction croisée de l'anticorps 3-83 avec H-2^d, les souris 3-83/H-2^d vont tout de même avoir une petite portion de lymphocytes B capables d'éditer leurs chaînes légères, montrant l'impact de la force du signal provenant du BCR sur l'intensité de l'édition de récepteur (Braun et al. 2000).

II. Le lupus érythémateux disséminé

Les maladies autoimmunes sont par définition des pathologies induites par une réponse immunitaire dirigée contre le soi. Ces maladies sont probablement souvent le fruit d'une défaillance d'un ou plusieurs mécanismes de tolérance décrits dans la première partie de ce manuscrit. Notre compréhension de l'autoimmunité s'est améliorée durant les vingt dernières années, surtout grâce au développement de nombreux modèles animaux et de l'identification de gènes qui peuvent prédisposer à l'autoimmunité. Néanmoins, l'étiologie de la plupart des MAI chez l'homme reste mal connue. Ce manque de compréhension est principalement dû à trois difficultés : les MAI chez l'homme sont habituellement hétérogènes et multifactorielles, les antigènes du soi inducteurs des réactions autoimmunes et leurs cibles sont souvent inconnus, et enfin les maladies peuvent n'être détectées cliniquement que longtemps après que les réactions autoimmunes aient été déclenchées.

Le lupus érythémateux disséminé (LED) est considéré comme le prototype des maladies autoimmunes systémiques et est aujourd'hui une des MAI les plus répandues. La pathologie se caractérise par des périodes de quiescence, durant lesquelles la maladie est inactive, et des périodes de poussées, caractérisées par une inflammation généralisée qui peut atteindre de nombreux organes, dont les reins, le cerveau et le cœur.

Dans ce chapitre nous aborderons les différentes caractéristiques de la maladie en commençant par l'épidémiologie du LED ; puis dans une seconde partie, nous décrirons brièvement les manifestations cliniques de la maladie. Enfin, dans une troisième partie, nous décrirons le type de cellules immunitaires impliquées dans la pathologie lupique.

A) Epidémiologie

Le lupus érythémateux systémique (LES), ou lupus érythémateux disséminé (LED), est une maladie autoimmune systémique grave. La prévalence de la maladie est très variable selon les populations (pour revue (Borchers et al. 2010)) : elle est par exemple d'environ 40 pour 100 000 en Europe du Nord et de 400 pour 100 000 chez les femmes afro-américaines (Chakravarty et al. 2007). En l'absence de données épidémiologiques précises, la prévalence de la maladie en France est estimée à 35 pour 100 000 (inférieure au seuil de 1 pour 2 000 définissant les maladies rares). Le LED touche en grande majorité les femmes : en effet, le LED survient 85 fois sur 100 chez la femme. Le LED pédiatrique quant à lui représenterait 5 à 10 % environ de l'ensemble des cas.

B) Manifestations cliniques

Le LED est caractérisé par la production d'anticorps antinucléaires dirigés contre diverses molécules du soi tels que l'ADN natif, l'ARN, les nucléosomes, les ribonucléoprotéines, les histones... Les manifestations cliniques observées au cours du LED varient fortement en fonctions des populations (de l'ethnie) et de l'évolution de la maladie, cependant environ la moitié des patients vont développer des complications sévères de la maladie, à savoir : des glomérulonéphrites, des atteintes du système nerveux central, des atteintes cardio-pulmonaires ou encore des accidents thrombo-emboliques notamment cérébraux. Bien que de nombreux organes puissent être affectés par la maladie, une des manifestations cliniques les plus graves et les plus fréquentes est la glomérulonéphrite dont il existe cinq types histologiques différents. Cette atteinte rénale est initiée par le dépôt de complexes immuns au niveau du glomérule rénal, entraînant sa destruction et l'apparition d'une protéinurie et d'une insuffisance rénale. La morbidité et la mortalité observées chez les patients lupiques sont étroitement corrélées à la sévérité de l'atteinte rénale (Balow 2005).

L'évolution d'un LED est variable : la maladie se caractérise par des phases de poussée, pendant lesquelles la maladie est active avec l'apparition de manifestations cliniques intenses, entrecoupées de phases de quiescences durant lesquelles les patients atteints sont peu malades voire asymptomatiques. La variabilité de la maladie est illustrée par une liste de différents critères de diagnostic mise en place par l'ACR (American College of rheumatology) (Tableau 3 page 25) : si un patient présente 4 des 11 critères consignés dans cette liste, le diagnostic de LED peut être établi avec une spécificité de plus de 95%. Une conséquence de ceci est que deux patients lupiques peuvent n'avoir comme seul point commun la présence d'anticorps anti-nucléaires. L'hétérogénéité du LED est également mise en évidence par la diversité des méthodes de mesure de la sévérité de la maladie. Les 5 méthodes les plus couramment utilisées sont les suivantes : le SLEDAI (Tableau 4 page 25) (Systemic Lupus Erythematosus Activity Index), le SLAM (Systemic Lupus Activity Measure), le BILAG (British Isles Lupus Assesment Group), le SLAM-R (Revised Systemic Lupus Activity Measure) et l'ECLAM (European Consensus Lupus Activity Measure) (Bae et al. 2001; Bombardier et al. 1992; Hay et al. 1993; Liang et al. 1989).

Tableau 3 : Les critères de l'ACR (American College of Rheumatology) pour le diagnostic d'un lupus.

D'après (Fairhurst et al. 2006).

<ul style="list-style-type: none"> ◆ Eruption malaire en ailes de papillon ◆ Lupus discoïde ◆ Photosensibilité ◆ Ulcérations buccales et nasopharyngées ◆ Polyarthrite non érosive ◆ Pleurésie ou péricardite ◆ Atteinte rénale : protéinurie >0.5 g/24 h, cylindres urinaires ◆ Atteinte neurologique : convulsions, psychose en l'absence de médicaments inducteurs ◆ Atteinte hématologique : Anémie hémolytique avec hyper-réticulocytose ou leucopénie < 4 000/mm³ constatée au moins à 2 reprises ou lymphopénie < 1 500/mm³ constatée au moins à 2 reprises ou thrombopénie < 100 000/mm³ en l'absence de cause médicamenteuse ◆ Désordre immunologique : <ul style="list-style-type: none"> - anticorps anti-ADN natif, - anticorps anti-Sm, - anticorps anti-phospholipides soit anticardiolipine de type IgG ou IgM à taux élevés ou anticoagulant circulant lupique ou sérologie syphilitique dissociée ◆ Présence d'un titre anormal d'anticorps anti-nucléaires
--

Tableau 4: Les différents critères utilisés dans le calcul du SLEDAI.

Valeur	Manifestations	Définition
8	Convulsion	Apparition récente. Exclusion des causes métaboliques, infectieuses ou médicamenteuses
8	Psychose	Perturbation de l'activité normale en rapport avec une altération sévère de la perception de la réalité. Comprend : hallucinations, incohérence, appauvrissement du contenu de la pensée, raisonnement illogique, comportement bizarre, désorganisé ou catatonique. Exclusion d'une insuffisance rénale ou d'une cause médicamenteuse
8	Atteinte cérébrale	Altération des fonctions mentales avec troubles de l'orientation, de la mémoire ou autre d'apparition brutale et d'évolution fluctuante. Comprend : troubles de la conscience avec réduction des capacités de concentration, incapacité à rester attentif avec en plus 2 au moins des manifestations suivantes : troubles perceptifs, discours incohérent, insomnie ou somnolence diurne, augmentation ou diminution de l'activité psychomotrice.
8	Troubles visuels	Atteinte rétinienne du lupus. Comprend : nodules dysoriques, hémorragies rétiniennes, exsudats séreux ou hémorragies choroïdiennes, névrite optique. Exclusion d'une cause hypertensive, infectieuse ou médicamenteuse.
8	Nerfs crâniens	Neuropathie sensitive ou motrice d'apparition récente touchant un nerf crânien

8	Céphalées	Céphalées sévères et persistantes, pouvant être migraineuses mais résistant aux antalgiques majeurs.
8	AVC	Accident vasculaire cérébral d'apparition récente. Artériosclérose exclue.
8	Vascularite	Ulcérations, gangrène, nodules digitaux douloureux, infarctus péri-unguéaux ou preuve histologique ou artériographie de vascularite.
4	Arthrites	Plus de 2 articulations douloureuses avec des signes inflammatoires locaux (douleur, tuméfaction ou épanchement articulaire).
4	Myosite	Douleur/faiblesse musculaire proximale associées à une élévation des CPK et/ou aldolases ou à des modifications électromyographiques ou à une biopsie montrant des signes de vascularite.
4	Cylindres urinaires	Cylindres de globules rouges
4	Hématurie	> 5 GR / champ en l'absence de lithiase, d'infection ou d'une autre cause.
4	Protéinurie	>0,5 g/24h. Apparition récente ou majoration récente de plus de 0,5g/24h
4	Pyurie	> 5 GB/champ en l'absence d'infection
2	Alopécie	Apparition récente ou récurrence d'une alopécie en plaque ou diffuse.
2	Ulcères muqueux	Apparition récente ou récurrence d'ulcérations orales ou nasales
2	Pleurésie	Douleur thoracique d'origine pleurale avec frottement ou épanchement ou épaississement pleural.
2	Péricardite	Douleur péricardique avec au moins l'une des manifestations suivantes : frottement, épanchement ou confirmation électrographique ou échographique.
2	Complément	Diminution du CH50, du C3 ou du C4 < à la normale inférieure du laboratoire
2	Anti-ADN	Positivité > à 25% par le test de Farr ou taux > à la normale du laboratoire
1	Fièvre	>38° en l'absence de cause infectieuse
1	Thrombopénie	< 100 000 plaquettes/mm ³
1	Leucopénie	< 3 000 GB/mm ³ en l'absence de cause médicamenteuse.

C) Les anomalies du système immunitaire au cours du LED

Un grand nombre d'altérations, touchant quasiment toutes les cellules du système immunitaire, ont été décrites au cours du LED. Par ailleurs, de nombreuses souris génétiquement modifiées présentent des anomalies ressemblant de près ou de loin au LED humain. Il existe donc de nombreux modèles tentant d'expliquer les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu dans l'apparition d'une autoimmunité mais peu sont clairement démontrés. Il n'est pas possible dans cette introduction de les revoir de manière exhaustive. Certains mécanismes effecteurs sont bien compris comme par exemple l'hémolyse et les thrombopénies autoimmunes, mais les processus à l'origine de l'autoimmunité restent peu clairs. Par exemple, certaines données indiquent que des autoantigènes provenant de débris cellulaires ou de corps apoptotiques qui sont insuffisamment éliminés vont être phagocytés par les cellules dendritiques et les lymphocytes B puis présentés via le CMH aux lymphocytes T. L'activation de ces lymphocytes T autoréactifs va permettre une co-stimulation des lymphocytes B autoréactifs mettant en action les processus classiques d'une réponse immunitaire, à savoir : la commutation de classe d'immunoglobuline, la maturation d'affinité, la différenciation de lymphocytes B activés en plasmocytes et enfin la production d'IgG de forte affinité. Ces IgG vont ensuite se lier aux autoantigènes et former des complexes immuns. Les complexes immuns sont normalement éliminés par la cascade du complément, les récepteurs FcγR et les phagocytes. Au cours du LED, un défaut dans les mécanismes d'élimination de ces complexes immuns pourrait provoquer leurs dépôts, notamment au niveau du glomérule rénal, provoquant une inflammation via l'activation du complément allant jusqu'au développement d'une glomérulonéphrite.

Dans cette partie nous aborderons les anomalies identifiées au cours du LED et affectant trois populations de cellules exerçant une fonction très importante dans le système immunitaire : les lymphocytes T, les cellules dendritiques et les lymphocytes B.

1) Les lymphocytes T

On retrouve des autoanticorps chez des sujets sains sans que ceux-ci ne causent de maladies autoimmunes. Au cours du LED, les autoanticorps produits possèdent donc des propriétés particulières qui les rendent pour certains pathogéniques. Les études cliniques

réalisées chez l'homme, ainsi que les études effectuées sur les modèles murins de LED, ont permis de montrer que les autoanticorps présents au cours de la maladie lupique sont essentiellement d'isotype IgG ont des mutations somatiques dans leurs régions variables et possèdent une forte affinité pour leur autoantigène. La commutation de classe d'immunoglobuline et la maturation d'affinité sont les mécanismes permettant la génération d'anticorps d'isotype IgG de forte affinité. Les lymphocytes B, en plus de la stimulation par la voie du BCR, ont besoin d'une aide des lymphocytes T pour mettre en place ces mécanismes. Ce concept est crucial dans la compréhension du rôle des lymphocytes T dans la physiopathologie du LED, et cohérent avec l'idée qu'un défaut de tolérance des lymphocytes B et T est généralement nécessaire à l'établissement d'une autoimmunité (M J Shlomchik et al. 2001).

Les premiers arguments montrant l'importance des lymphocytes T dans le LED datent des années 80, durant lesquelles deux expériences simples ont permis de montrer que l'absence de lymphocytes T (en éliminant les lymphocytes T CD4⁺ par un traitement avec un anticorps anti-CD4) chez des souris BW empêche le développement de la maladie (Wofsy & Seaman 1987; Mihara et al. 1988). Un an plus tard Shivakumar et al. montrèrent que le nombre de lymphocytes T double-négatifs (CD4⁻CD8⁻TCRαβ⁺) est augmenté dans le sang de patients lupiques, et que ces mêmes lymphocytes T ont la capacité de stimuler la production d'autoanticorps par les lymphocytes B, lorsqu'ils sont co-cultivés avec des lymphocytes B autologues (Shivakumar et al. 1989). De plus des lymphocytes T activés exprimant un TCR spécifique des nucléosomes ont été retrouvés dans le sang de patients atteints de LED (Bruns et al. 2000) : une fois activés, ces lymphocytes T pourraient proliférer et fournir le second signal nécessaire aux lymphocytes B autoréactifs pour enclencher les processus de commutation de classe d'IgM en IgG et de maturation d'affinité.

L'émergence de lymphocytes T autoréactifs en périphérie peut être due à des défauts dans les mécanismes de tolérance centrale mis en place dans le thymus et qui permettent l'élimination des lymphocytes T présentant une reconnaissance trop forte du soi. Cependant au cours du LED ces mécanismes semblent ne pas être touchés : ceci est illustré par le fait que chez la souris BW, la tolérance centrale des lymphocytes T semble ne pas être affectée (Wither & Vukusic 1998; Fatenejad et al. 1998). Au contraire, il est généralement admis que ce sont plutôt les mécanismes de tolérance périphérique qui sont défectueux dans le LED (La Cava 2009). Ces défauts peuvent être de différentes natures : 1/ la résistance à l'induction de l'anergie (Xu et al. 2004) ; 2/ un défaut d'apoptose des lymphocytes T autoréactifs pendant les processus de délétion clonale (Budagyan et al. 1998) ; 3/ un abaissement du seuil

d'activation du lymphocyte T ; 4/ une baisse du nombre et de la fonctionnalité des lymphocytes T régulateurs (Bonelli et al. 2010).

2) Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques représentent une population cellulaire rare et hétérogène ayant une grande plasticité et se trouvant à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Deux sous-populations principales de cellules dendritiques ont été identifiées : les cellules dendritiques myéloïdes (mDC) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Les cellules dendritiques myéloïdes ont la capacité de reconnaître des pathogènes via leurs TLRs (Toll like receptors) puis de présenter des antigènes aux lymphocytes T ; elles expriment également à leur surface des molécules de co-stimulation permettant l'activation des lymphocytes T. Les cellules dendritiques immatures ont également la capacité de présenter aux lymphocytes T des antigènes provenant de débris cellulaires, sans livrer de signal de costimulation, ce qui aura pour conséquence d'induire une tolérance pour certains autoantigènes. Cette tolérance se manifeste par l'induction d'une anergie ou une élimination de certains lymphocytes T autoréactifs, et également l'expansion de lymphocytes T régulateurs (pour revue (Fransen et al. 2010)). Les pDC sont quant à elles impliquées dans la reconnaissance des virus, en effet elles expriment notamment les TLR-7 et TLR-9 permettant une très forte production d'interféron de type I en réponse à un constituant viral, mais sont moins efficaces dans l'activation des lymphocytes T.

Il existe de nombreuses études décrivant une implication des cellules dendritiques dans l'établissement d'une autoimmunité. Il a notamment été montré que la déplétion des cellules dendritiques chez la souris sauvage (C57BL/6) engendre une rupture de tolérance des lymphocytes T CD4⁺ suivie par l'apparition d'une autoimmunité caractérisée par une perte de poids, une splénomégalie et un syndrome de type IBD (inflammatory bowel disease) (Ohnmacht et al. 2009).

Il a été décrit au cours du LED un déficit dans l'élimination des corps apoptotiques (pour revue (Muñoz et al. 2010)). Les cellules dendritiques myéloïdes sont capables, après maturation, de phagocyter ce matériel apoptotique et ainsi de présenter des autoantigènes aux lymphocytes T autoréactifs (Inaba et al. 1998). Dans ce modèle, la maturation des cellules dendritiques est nécessaire pour l'activation des lymphocytes T autoréactifs. On pense que cette maturation peut être provoquée par différents PAMPs (pathogen-associated molecular

patterns) reconnus via les TLRs exprimés par les cellules dendritiques, ou encore par des DAMPs (danger-associated molecular patterns) qui sont des molécules du soi capable de stimuler la voie des TLRs. Un membre bien caractérisé des DAMPs est HMGB1 (high mobility group box 1), protéine couplée à la chromatine et retrouvée dans les cellules en apoptose. Elle a la capacité de stimuler les cellules dendritiques via TLR-2, TLR-4 et RAGE (receptor for advanced glycation end products) (Urbonaviciute et al. 2008). Un autre argument en faveur de l'implication des cellules dendritiques dans le LED est l'induction de la production d'autoanticorps de type anti-nucléaire après injection de cellules dendritiques chargées en cellules apoptotiques ou nécrotiques chez la souris normale. De plus la même expérience réalisée chez des souris plus susceptibles de développer une autoimmunité (souris BW) permet d'induire une autoimmunité plus sévère et plus précoce que chez les souris contrôles (Bondanza et al. 2003).

Les pDC produisent de grandes quantités d'interféron de type I, or il a été montré depuis longtemps une augmentation du taux d'IFN- α dans le sérum de patients lupiques (Crow & Kirou 2004). Il a donc été supposé que les pDC sont la source de cette production anormale d'IFN- α au cours du LED. En ce sens, il a été montré que la production d'IFN- α par des PBMCs incubés avec du sérum de patients lupiques peut être inhibée par des anticorps bloquant les récepteurs BDCA-2 et BDCA-4, deux récepteurs exprimés par les pDC et ayant un rôle probable dans la capture d'antigènes extracellulaires (Dzionek et al. 2001). Une des voies possibles d'activation de ces pDC serait une internalisation, via les récepteurs Fc γ RIIa, de complexes immuns comprenant des acides nucléiques, suivie d'une activation des TLR-7 et TLR-9 dans les endosomes des pDC (Lövgren et al. 2004).

D) Le rôle central des lymphocytes B

Les lymphocytes B sont les cellules qui produisent les autoanticorps caractéristiques du LED. Ceci constitue le premier argument majeur en faveur d'un rôle primordial de ces cellules dans la maladie lupique. Chez les patients lupiques, on retrouve ces autoanticorps plusieurs années avant l'apparition des premières manifestations cliniques de la maladie : ceci laisse supposer une activation précoce des lymphocytes B autoréactifs (Arbuckle et al. 2003). De plus, il a été montré que les lymphocytes B de patients lupiques sont plus sensibles à une activation par la voie du BCR, ceci se manifestant par une augmentation de la réponse

calcique et une augmentation de la phosphorylation des tyrosines après stimulation de ces cellules avec un anticorps anti-IgM *in vitro* (Liopsis et al. 1996).

1) Les anomalies dans les sous-populations de lymphocytes B

On note une absence de développement de la maladie de type lupique (production d'autoanticorps et glomérulonéphrite) chez les modèles murins de LED MRL/*lpr* et BW lorsque la mutation *xid* est présente (B. J. Steinberg et al. 1982; E. B. Steinberg et al. 1983). Cette mutation va avoir pour conséquence d'inactiver la protéine Btk et ainsi causer un blocage dans la maturation des lymphocytes B. De plus, dans un autre modèle dans lequel une délétion ciblée du segment J_H (permettant également un blocage dans la maturation B) est réalisée sur le fond autoimmun de type MRL/*lpr*, la maladie est fortement atténuée, comparée aux souris contrôles qui développent une glomérulonéphrite sévère (M J Shlomchik et al. 1994). L'implication des lymphocytes B dans la physiopathologie du LED ne se limite pas à la production d'autoanticorps. Il a été montré que la souris MRL/*lpr* produisant des lymphocytes B exprimant une IgM membranaire transgénique dépourvu de pièce sécrétoire, développe tout de même une glomérulonéphrite (Chan et al. 1999). Ceci illustre bien le fait que les lymphocytes B sont aussi impliqués dans le développement du LED par des mécanismes indépendants de leur fonction de cellule sécrétrice d'anticorps, par exemple par leurs fonctions de cellules présentatrices d'antigènes et de cellules productrices de cytokines.

Plusieurs anomalies dans le nombre et la distribution des lymphocytes B ont été rapportées au cours du LED : on observe une augmentation du nombre de lymphocytes B immatures (transitionnels), de lymphocytes B mémoires et de plasmocytes, associés à une baisse des lymphocytes B naïfs, dans le sang périphérique de patients atteints de LED en phase active (pour revue (Dörner et al. 2011)). Les lymphocytes B mémoires ($CD27^+$) et les plasmocytes ($CD27^{++}$) sont des cellules ayant subi les processus de commutation de classe et de maturation d'affinité se déroulant dans les centres germinatifs. Il a donc été suspecté qu'une réponse exacerbée pourrait avoir lieu dans ces centres germinatifs au cours du LED. En ce sens, il a été montré que les lymphocytes T et B de patients atteints de LED expriment spontanément la molécule de co-stimulation CD154 (ou CD40L) et que ceci pourrait être à l'origine d'une réponse accrue dans les centres germinatifs ou d'un défaut des mécanismes de tolérance, permettant ainsi l'émergence de cellules B mémoires autoréactives et de

plasmocytes sécréteur d'autoanticorps, en périphérie (Grammer et al. 2003). Enfin, une population controversée de lymphocytes B régulateurs a également été identifiée dans le sang périphérique chez l'homme. Bien que le phénotype exact de ces cellules soit aujourd'hui encore discuté, une étude récente a montré une baisse de la fonctionnalité de lymphocytes B régulateurs (CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}) chez des patients lupiques (Blair et al. 2010).

2) Les anomalies de la voie de signalisation du lymphocyte B

Des défauts dans les différentes voies de signalisation des lymphocytes B ont également été détectés au cours du LED, à la fois chez la souris et chez l'homme. Chez l'homme, les défauts identifiés par des approches dites de gènes candidats ou par des études d'association génétique touchent dans la grande majorité des cas des protéines régulatrices de la voie du BCR tels que FcγRIIb, SHIP, CD72, LYN, CD22, BANK1 et BLK, mais d'autres voies peuvent également être touchées comme la voie de BAFF. Les protéines FcγRIIb, LYN, BANK1 et BLK ont été associées au LED dans des études de GWAS (genome-wide association scan). Nous parlerons de l'implication de ces protéines dans la signalisation du BCR et dans la pathologie lupique de façon plus détaillée dans la partie traitant de la génétique des MAI.

Un exemple de régulateur positif de la voie de signalisation du lymphocyte B impliqué dans le LED est BAFF. Une augmentation du taux de BAFF a été observée dans le sérum de patients lupiques (J. Zhang et al. 2001). De plus, les souris transgéniques pour *BAFF* développent un phénotype de type lupique caractérisé par la production de facteurs rhumatoïdes et d'autoanticorps de type anti-ADN, ainsi que par le dépôt de complexes immuns au niveau rénal (Mackay et al. 1999) (Tableau 5 page 83). Il a été montré qu'une stimulation des lymphocytes B par BAFF active la voie Akt/mTOR, induisant la prolifération et la sécrétion d'immunoglobulines (Moore et al. 1999). De ce fait l'augmentation de BAFF pourrait permettre la survie et la prolifération de lymphocytes B autoréactifs au cours du LED.

a) *La voie LYN / CD22 / SHP-1*

Après la liaison d'un antigène au BCR, une des premières étapes dans la voie d'activation du lymphocyte B est l'activation de la tyrosine kinase LYN. LYN activée va ensuite phosphoryler les motifs ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activating motif) présents sur les chaînes Ig α et Ig β associées à l'immunoglobuline membranaire, et permettre la mise en place de la cascade de phosphorylation conduisant à l'activation de la cellule. Il existe des mécanismes de contrôles de cette voie d'activation, qui se révèlent importants dans l'établissement d'un seuil d'activation et empêchent une activation trop forte du lymphocyte B. LYN, outre ses fonctions d'activation de la voie du BCR va également permettre l'enclenchement de ces mécanismes de régulation négative.

L'axe LYN/CD22/SHP-1 est très important dans la régulation du signal émanant du BCR (Figure 9 page 34) : une déficience de l'une de ces trois protéines chez la souris donne lieu à des manifestations autoimmunes de types lupique (pour revue (Nitschke 2009)). Les souris CD22 knock out (KO) développent des autoanticorps anti-ADN d'isotype IgG de forte affinité (O'Keefe et al. 1999). CD22 est un récepteur membranaire de la famille des immunoglobulines qui possède dans sa partie intracellulaire des domaines de type ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif). Une fois phosphorylés par LYN, les motifs ITIM de CD22 vont avoir la capacité de recruter SHP-1. SHP-1 est une tyrosine phosphatase capable d'inhiber la voie d'activation du BCR en déphosphorylant certaines protéines composant la voie du BCR. La souris *motheaten* ayant une mutation dans le gène codant pour SHP-1 développe un syndrome lupique (Shultz 1988). Il en est de même chez la souris ayant une délétion spécifique du gène *SHP-1* dans les lymphocytes B (Pao et al. 2007) (Tableau 5 page 83). Cependant, aucune donnée n'est aujourd'hui disponible quant à l'implication de SHP-1 dans la pathologie humaine

Le récepteur CD72 est également impliqué dans la régulation négative du signal provenant du BCR par des mécanismes similaires à ceux utilisés par CD22, en faisant également intervenir la phosphatase SHP-1 (Figure 9 page 34). *CD72* a été identifié comme un gène important dans le développement de la vascularite chez les souris *MRL/lpr*, présentant une maladie proche du LED (Qu et al. 2000). Les souris déficientes pour le gène *CD72* ne développent pas de signe d'autoimmunité, mais sont caractérisées par une augmentation du nombre de cellules B-1 et une hyperactivation des cellules B après une

stimulation BCR-dépendante par un anticorps anti-IgM (C. Pan et al. 1999). Peu de données ont été récoltées concernant l'implication de CD72 dans la pathologie lupique humaine. On peut néanmoins citer une étude montrant une baisse de l'expression de *CD72* chez des patients développant une néphrite lupique (Nakano et al. 2007).

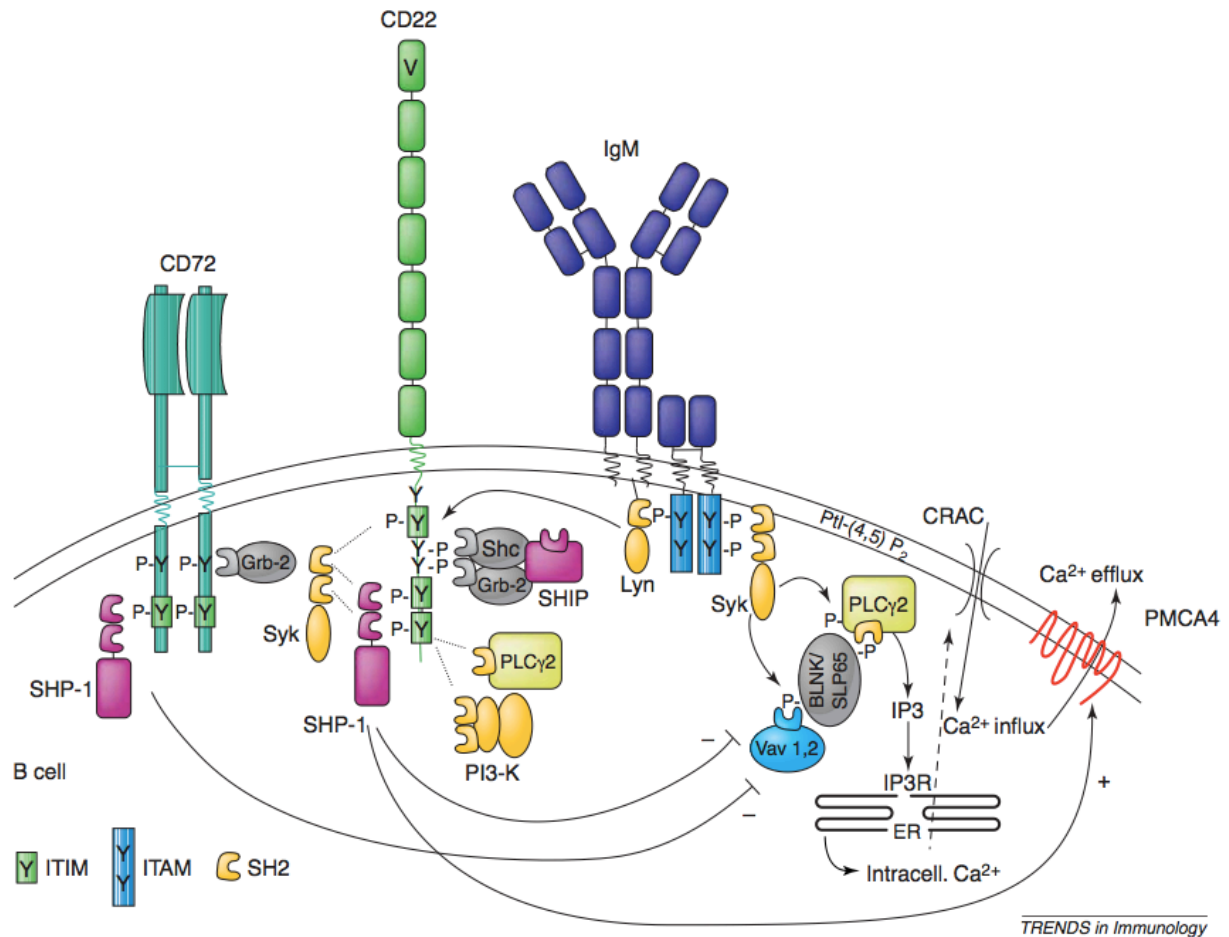


Figure 9 : La régulation de la voie du BCR par CD22 et CD72.

Les protéines interagissant avec CD22 et CD72 sont indiquées. DAG (diacylglycerol), CRAC (Ca²⁺ release-activated channel), ER (endoplasmic reticulum), IP₃ (inositol 3,4,5-triphosphate), IP₃R (IP₃ receptor), ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif), ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif), PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase), PLC (phospholipase C), PtdI-(4,5) P₂ (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate), PtdI-(3,4,5) P₃ (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate), SHP-1 (Src-homology domain 2 (SH2)-containing protein tyrosine phosphatase-1).

D'après (NITSCHKE & TSUBATA 2004).

b) La voie *FcγRIIb* / *LYN* / *SHIP*

FcγRIIb est un récepteur de la famille des immunoglobulines, il a la capacité de fixer la fraction Fc des IgG. Comme CD22 et CD72, il possède dans son domaine intracellulaire un motif ITIM lui permettant de réguler négativement les signaux provenant d'une activation du BCR. Après activation de *FcγRIIb* et du BCR, le motif ITIM va être phosphorylé par LYN, ce qui va permettre le recrutement de SHIP. La protéine SHIP va ensuite inhiber le flux calcique et la prolifération induite par une activation de la cellule B via le BCR (Q. Liu et al. 1998). Le mécanisme précis par lequel SHIP inhibe le flux calcique reste controversé. Cependant, des études réalisées sur des souris déficientes pour *Ship* ont montré que cette inhibition est la conséquence d'une déphosphorylation de PIP₃ (un second messager de la voie du BCR), donnant lieu à la dissociation de BTK et de la PLCγ (Brauweiler et al. 2000). La prolifération pourrait quant à elle être inhibée par le blocage de la voie Akt et la voie des MAPKs (Figure 10 page 36) (Helgason et al. 2000).

Une déficience dans l'un des acteurs de la voie *FcγRIIb* peut être à l'origine de l'apparition d'un phénotype lupique chez la souris. Ainsi la souris *FcγRIIb* KO sur un fond génétique C57BL/6 développe des autoanticorps de type anti-ADNdb et anti-chromatine, conduisant au dépôt de complexes immuns au niveau rénal et au développement d'une glomérulonéphrite fatale à 9 mois (Tableau 5 page 83). De façon intéressante, la tolérance pour les autoantigènes nucléaires est maintenue chez la souris *FcγRIIb*^{-/-} sur un fond génétique Balb/c, ce qui laisse supposer l'existence d'une régulation épistatique dans l'apparition du phénotype lupique (Bolland & J V Ravetch 2000). L'importance de la voie de régulation déclenchée par le récepteur *FcγRIIb* dans le développement du LED chez l'homme est soulignée par une méta-analyse récente de plusieurs études d'associations génétiques, qui montre une association de polymorphismes dans les gènes *FcγRIIb* (et *FcγRIIIb*) avec le LED (Y. H. Lee, Ji, et al. 2009b).

Les souris *Ship*^{-/-} ne développent pas de signe d'autoimmunité mais sont caractérisées par un défaut de maturation des lymphocytes B associé à une augmentation du compartiment des lymphocytes B matures de la rate, et une augmentation du taux sérique d'IgM, IgG2a, IgG2b, IgG3 et d'IgA (Q. Liu et al. 1998; Helgason et al. 2000; Brauweiler et al. 2000) (Tableau 5 page 83).

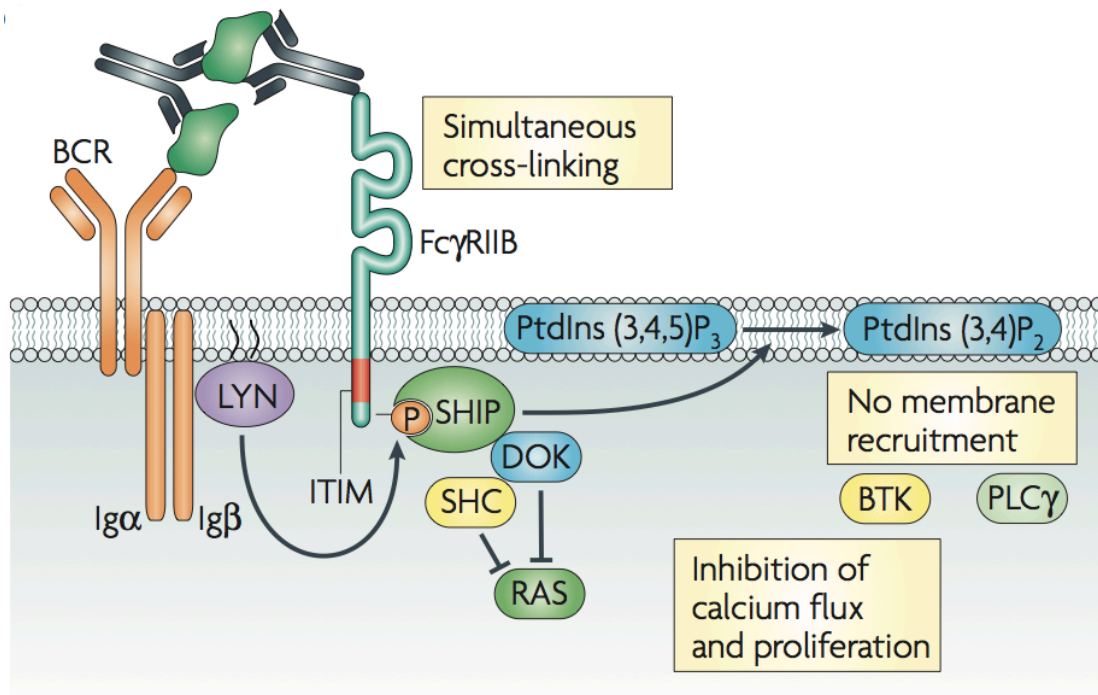


Figure 10 : La régulation de la voie du BCR par le récepteur Fc γ RIIb.

Les protéines interagissant avec Fc γ RIIb sont indiquées. Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P₃) ; Bruton's tyrosine kinase (BTK) and phospholipase C γ (PLC γ) ; B-cell receptor (BCR) ; ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) ; SRC-homology-2-domain-containing inositol-5-phosphatase (SHIP) ; PtdIns(3,4,5)P₃ ; phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) ; DOK, docking protein ; InsP₃, inositol-1,4,5-trisphosphate ; SHC, SH2-domain-containing transforming protein C. D'après (Nimmerjahn & Jeffrey V Ravetch 2008).

3) Anomalies des LB au cours du LED : intrinsèques ou induites ?

Les études évoquées précédemment montrent bien l'existence d'anomalies cellulaires et fonctionnelles des lymphocytes B au cours du LED. Cependant ces défauts peuvent être intrinsèques au lymphocyte B, ou induits par des facteurs extrinsèques tels que des interactions cellulaires ou l'action de cytokines. Un argument majeur mettant en évidence l'existence d'anomalies intrinsèques des lymphocytes B au cours du LED se base sur une étude de Reininger et al de 1996 montrant que la maladie peut être transférée par les cellules B. Dans cette étude, le transfert de cellules pré-B issues de la souris BW, à des souris immunodéficientes (Scid) ou Rag2 KO, conduit dans plus de 20% des cas au développement d'un phénotype lupique caractérisé par une hypergammaglobulinémie et la production d'autoanticorps anti-ADN (Tableau 6 page 37), responsables d'un dépôt d'immunoglobulines au niveau rénal et du développement d'une glomérulonéphrite (Reininger et al. 1992; Reininger et al. 1996).

Tableau 6 : Taux sérique des anticorps anti-ADN après transfert de lymphocytes pré-B issus de souris lupiques dans des souris immunodéficientes.

Le rectangle rouge met en lumière le transfert de lymphocytes pré-B de souris lupique BW (de 3 à 5 mois) à des souris immunodéficientes de type SCID et Rag KO.

D'après (Reininger et al. 1996).

Group	n*	Ig concentrations [†]					Anti-DNA [‡]	
		IgM	IgG3	IgG2a	IgG1	IgG2b	IgM	IgG
					$\mu\text{g/ml}$			
BDF1	5	280 ± 50	205 ± 75	1150 ± 200	670 ± 120	1060 ± 190	1.5 ± 0.5	<0.1
→SCID	8	145 ± 50	155 ± 45	110 ± 75	<20	75 ± 55	1.5 ± 1.2	<0.1
BW	6	1050 ± 140	735 ± 295	2880 ± 655	1100 ± 250	1095 ± 145	16.6 ± 5.2	8.5 ± 4.6
→SCID	7	735 ± 130	650 ± 190	1020 ± 560	95 ± 110	140 ± 100	12.6 ± 7.1	4.7 ± 5.0
→RAG	8	1275 ± 490	465 ± 225	590 ± 285	<20	110 ± 30	11.8 ± 4.8	3.1 ± 2.5
NZB	8	1290 ± 200	670 ± 220	1680 ± 590	1010 ± 335	850 ± 260	23.6 ± 6.5	1.6 ± 2.1
→SCID	12	790 ± 315	305 ± 300	125 ± 100	135 ± 140	140 ± 130	24.1 ± 17.8	0.1 ± 0.1
→RAG	8	1575 ± 460	670 ± 385	275 ± 140	<20	115 ± 70	29.3 ± 13.1	0.2 ± 0.1
NZW	8	205 ± 15	100 ± 10	1590 ± 215	1260 ± 285	655 ± 90	1.9 ± 0.4	0.4 ± 0.2
→SCID	9	370 ± 135	410 ± 150	1805 ± 1200	230 ± 270	150 ± 65	7.3 ± 1.3	13.5 ± 14.0
→RAG	9	435 ± 315	540 ± 340	1270 ± 865	25 ± 75	74 ± 40	4.7 ± 1.8	5.6 ± 5.5
(NZW × B6)F1	5	295 ± 105	190 ± 15	960 ± 205	2255 ± 535	765 ± 155	1.8 ± 0.2	0.3 ± 0.3
→RAG	8	900 ± 275	485 ± 370	<20	<20	130 ± 65	9.8 ± 6.5	0.1 ± 0.2

III. L'influence des facteurs environnementaux dans le déclenchement des MAI

Le taux de concordance de la maladie lupique chez les jumeaux monozygotes est de 20 à 40%, ce qui indique une étiologie génétique importante (Harley et al. 2009). Cependant, ce taux de concordance n'est pas de 100% : ceci implique obligatoirement l'influence de facteurs environnementaux sur le développement de la maladie. Dans cette partie nous aborderons dans un premier temps les facteurs environnementaux impliqués dans le déclenchement des MAI. Dans la partie IV, nous développerons de façon plus détaillée les facteurs génétiques des MAI, et en particulier du LED.

Plusieurs facteurs environnementaux ont été identifiés comme ayant un rôle potentiel dans le déclenchement des MAI. Nous traiterons dans un premier temps les infections bactériennes et virales identifiées comme facteurs déclenchants des MAI, nous décrirons ensuite les hypothèses concernant l'implication de facteurs hormonaux dans les MAI puis nous énoncerons brièvement des situations où des facteurs médicamenteux sont impliqués dans l'apparition des MAI.

A) Les infections

Les microorganismes induisent de fortes réponses immunitaires, la plupart de ces réponses étant dirigées spécifiquement contre des antigènes de ces microorganismes. Cependant, les infections microbiennes peuvent également être détournées et engendrer des réponses immunitaires dirigées contre des antigènes du soi. Il est cependant aujourd'hui difficile d'associer un microorganisme donné à une MAI particulière. Dans cette partie nous aborderons les virus, bactéries et parasites ayant été identifiés comme impliqués dans l'apparition, le déclenchement et/ou l'amplification des MAI, ainsi que les mécanismes mis en jeu dans l'établissement d'une autoimmunité.

Les microorganismes sont-ils nécessaires au développement d'une MAI ? Chez l'homme il est difficile voire impossible de répondre de façon précise à cette question car l'historique des épisodes infectieux d'un individu est souvent très difficile à établir. Cependant, l'étude de différents modèles murins de MAI (voir partie "Les modèles murins de LED" [page 72](#)), reproduisant avec plus ou moins de fidélité les MAI humaines, a permis de fournir des ébauches de réponse. Ces modèles murins de MAI peuvent être élevés en animalerie dans des conditions stériles (germ-free), ce qui permet d'étudier le développement de la maladie en l'absence d'agent infectieux. Cependant cette méthode comporte des

limites : le système immunitaire d'animaux placés dans des conditions germ-free n'est pas entièrement mature, et il peut subsister dans l'eau de boisson et les aliments (bien qu'autoclavés) des PAMPs (Pathogen associated molecular pattern) qui peuvent activer les cellules immunitaires. Dans le modèle de souris MRL-*lpr*, l'élevage en conditions stériles n'affecte ni l'apparition, ni la sévérité de la maladie. Cependant lorsque que l'on nourrit ces animaux avec de la nourriture ultra-filtrée et dénuée de tout antigène (GF-AF : germ-free antigen free), on remarque une diminution de la lymphoprolifération et de la sévérité de la néphrite lupique (Maldonado et al. 1999). Enfin, chez la souris KO pour le récepteur antagoniste de l'interleukine 1 (*Il1rn^{-/-}*) développant en temps normal une arthrite autoimmune, la maladie est totalement absente chez les souris élevées en conditions stériles. En conclusion, ces résultats montrent que les agents infectieux pourraient être impliqués dans le développement de MAI. Cependant, chez la souris NOD (Non-obese diabetic mice), un modèle de diabète de type 1, la fréquence de la maladie augmente dans le groupe d'animaux élevés dans des conditions stériles, indiquant que les microorganismes ne sont pas nécessaires au déclenchement du diabète de type 1 voir même peuvent être protecteurs (voir partie “ Un effet protecteur ? “ [page 46](#)) (Wen et al. 2008).

Ainsi, l'étude de ces modèles dans des conditions stériles a permis de mettre en évidence que la tolérance aux antigènes du soi peut être rompue en absence d'agent infectieux dans certains cas, alors que dans d'autres cas, les agents infectieux pourraient jouer un rôle déclencheur.

Plusieurs infections virales ont été suspectées comme jouant le rôle de facteurs initiateurs de MAI chez l'homme ([Figure 11 page 41](#)). On peut par exemple citer le virus HTLV1 (Human T-lymphotropic virus type 1) impliqués dans différentes arthropathies (Nishioka et al. 1993; Levin et al. 2002), les Coxsackievirus impliqués dans le diabète de type 1 (M S Horwitz et al. 1998; Marc S Horwitz et al. 2002) ou encore le virus de l'hépatite C impliqués dans plusieurs MAI comme la maladie de Crohn, le syndrome polyendocrinien autoimmun (APS) et la thyroïdite autoimmune (Agmon-Levin et al. 2009). Concernant plus particulièrement le LED, des virus comme EBV (Epstein-Barr Virus) également connu sous le nom de HHV-4, le CMV (cytomégalovirus) et le parvovirus B19 ont été identifiés comme étant des agents viraux associés à la maladie (James et al. 2006; Lunardi et al. 2008). Cependant, l'établissement de ces virus comme étant des agents causatifs de la maladie lupique reste difficile à démontrer. De plus, des études réalisées chez la souris ont permis de mettre en évidence l'apparition d'autoanticorps, voire même le développement de signes d'autoimmunité suite à une infection virale chez certaines souches de souris ; ainsi l'infection

par LCMV (virus de la chorioméningite lymphocytaire) engendre la production d'autoanticorps et le développement d'une anémie hémolytique auto-immune chez la souris (Hunziker et al. 2003). Dans un modèle d'infection par le TMEV (Theiler's murine encephalomyelitis virus) les souris normales (SJL/J) développent, 30 à 40 jours après infection, une réactivité contre des autoépitopes de la myéline, ce qui conduit au développement d'une maladie démyélinisante proche de la sclérose en plaques (Miller et al. 1997).

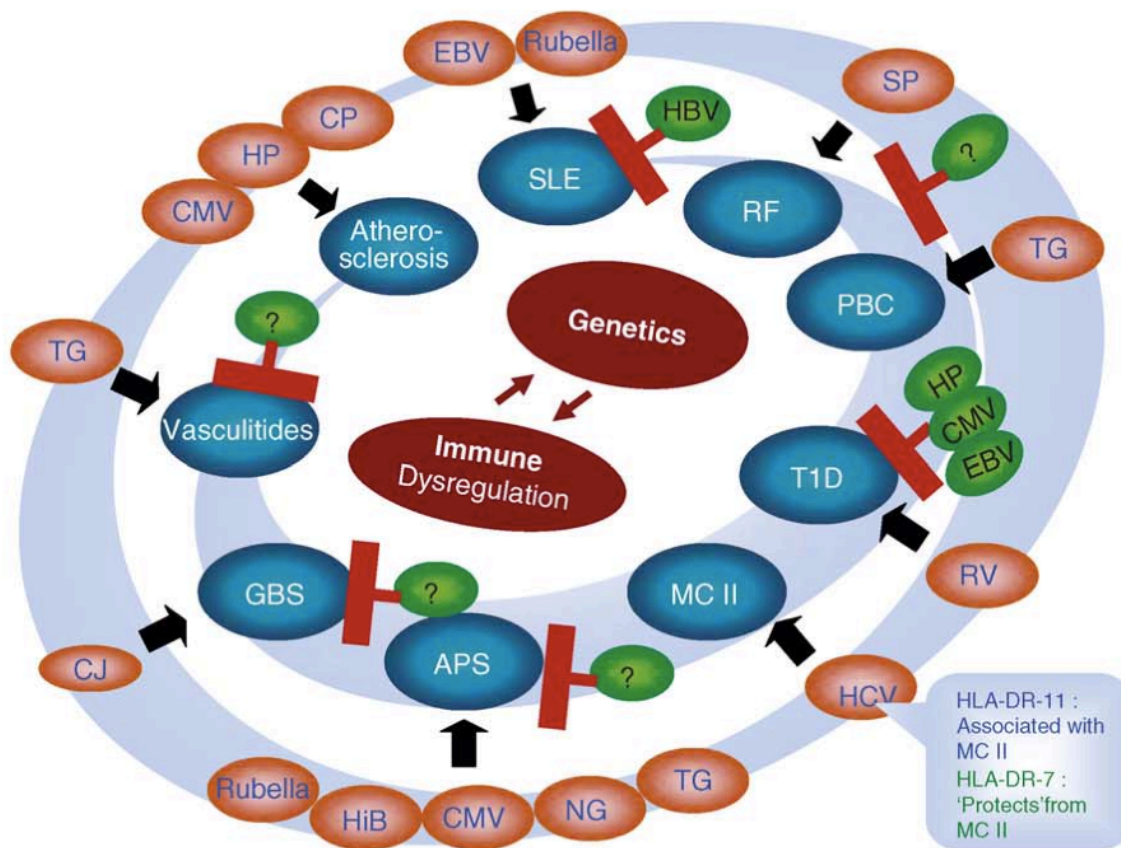


Figure 11 : Implication des différents agents infectieux dans les maladies autoimmunes.

Les maladies autoimmunes (en bleu) pourraient être causées par des agents infectieux (en orange). Mais certains agents infectieux (en vert) pourraient avoir un effet protecteur contre les maladies autoimmunes. CJ (Campylobacter jejuni), CP (Chlamydia pneumonia), HiB (Haemophilus influenza), HP (Helicobacter pylori), NG (Neisseria gonorrhoeae), SP (Streptococcus pyogenes), RV (Rotavirus), TG (Toxoplasma gondii) ; GBS (Guillain-Barré syndrome) ; SLE (Systemic lupus erythematosus) ; RF (Rheumatic fever) ; PBC (primary biliary cirrhosis) ; MCII (mixed cryoglobulinemia) ; T1D (Type I diabetes) ; APS (Anti-phospholipid syndrome).

D'après (Kivity et al. 2009).

D'autres agents infectieux comme certaines bactéries sont capables d'induire ou d'exacerber une autoimmunité. Bien que ceci reste très difficile à prouver chez l'homme, il existe quelques exemples. Le plus connu est celui du rhumatisme articulaire aigu qui succède à une infection bactérienne à streptocoques (Guilherme & Kalil 2010). De plus, il a été montré que la maladie de Lyme causée par le spirochète *Borrelia burgdorferi* déclenche une arthrite qui ressemble à celle observée au cours de la polyarthrite rhumatoïde (PR). Des travaux réalisés dans notre laboratoire, sur un modèle de souris transgéniques permettant l'expression d'un facteur rhumatoïde (FR) humain, ont d'ailleurs montré que l'infection par *Borrelia burgdorferi* permet de rompre la tolérance des cellules B FR et conduit à la production de FR sériques, selon un mécanisme TLR-dépendant et T-dépendant (P Soulas 2005). A l'inverse, l'infection de souris (NZBxNZW)F1 par ce même agent n'influe pas sur le cours de la maladie (observations non publiées de notre groupe). On peut également citer *Helicobacter pylori* qui pourrait être impliqué dans le développement d'une gastrite autoimmune (Annibale et al. 2001) mais aussi dans le syndrome de Gougerot-Sjögren chez l'homme (Gasbarrini et al. 1998). De plus, il a été décrit qu'une infection par la toxine B du choléra (cholera toxin B, CTB) produit par *Vibrio cholerae*, ou une injection de LPS (Lipopolysaccharide), peut induire et accélérer l'apparition de l'autoimmunité chez des souris BW (G.-M. Deng & Tsokos 2008; Ka et al. 2007).

Bien que moins connues, il existe aussi des études associant certaines infections parasitaires et le développement de MAI chez l'homme : on peut notamment citer des travaux sur la maladie de Chagas causée par *Trypanosoma cruzi*, qui montrent que 30% des patients développent une cardiomyopathie autoimmune, mettant ainsi en évidence l'éventualité d'une composante autoimmune à la maladie, et ainsi un lien possible entre l'agent infectieux et l'autoimmunité observée (Gironès et al. 2005).

Ainsi, globalement, de nombreux agents infectieux semblent capables d'aggraver ou encore de favoriser l'émergence de MAI. Les mécanismes moléculaires et cellulaires permettant de dévier une réponse spécifique de l'agent infectieux vers une réponse contre le soi sont de différentes natures. De façon générale, les agents infectieux vont notamment entraîner une activation polyclonale du système immunitaire : ils peuvent donc se comporter comme un adjuvant pour les réponses autoimmunes dans le cas où des cellules autoreactives pré-existaient chez l'individu. En vue de préciser les mécanismes permettant le déclenchement et/ou l'aggravation des MAI par les microorganismes, nous allons maintenant définir brièvement les notions de mimétisme moléculaire, "d'épitope spreading" (que l'on pourrait traduire par : « diversification des épitopes »), de "bystander activation" (que l'on

pourrait traduire par : « activation collatérale ») et enfin exposer une hypothèse appelée “fertile field hypothesis” (terrain favorable).

1) Le mimétisme moléculaire

Le terme de mimétisme moléculaire (Figure 12a page 45) désigne la reconnaissance croisée par un lymphocyte T ou un lymphocyte B d'un antigène microbien possédant une structure similaire à un antigène du soi. De ce fait, la réponse immunitaire qui est initialement dirigée contre l'agent infectieux va s'étendre aux tissus présentant le peptide du soi, ayant pour conséquence de déclencher une autoimmunité.

Le mécanisme de mimétisme moléculaire fut pour la première fois proposé par Fujinami et al. (Fujinami & Oldstone 1985). Ils identifièrent, grâce à un modèle d'injection de MBP (Myelin Basic Protein) chez le lapin, une homologie entre un épitope du virus de l'hépatite B et un épitope particulier de la myéline de lapin dont la reconnaissance est impliquée dans certaines encéphalites autoimmunes chez l'animal.

Ce mécanisme a par ailleurs été décrit dans de nombreux modèles murins de MAI comme dans le modèle d'infection par coxsackie virus B3. Dans ce modèle la souris développe une myocardite autoimmune provoquée par une forte homologie entre la protéine VP1 du virus et la myosine, la trypomysine et la vimentine de l'hôte (Huber et al. 1993). Dans le modèle de souris (RIP-LCMV-NP), exprimant la protéine NP du LCMV spécifiquement dans les cellules β du pancréas et dans les thymocytes, il a été montré qu'une infection répétée par le LCMV provoque une augmentation rapide du nombre de lymphocytes T autoréactifs avec pour conséquence d'accélérer la destruction des cellules β du pancréas (Christen et al. 2004). Plus récemment, Bonney et al. ont montré que l'injection d'antigènes issus de broyat du parasite *Trypanosoma cruzi* (impliqué dans la maladie de Chagas), dans de l'adjuvant complet de Freund, provoque la production d'autoanticorps de type IgG de spécificité classiquement observée chez les patients atteints de la maladie de Chagas (actine, antigène Cha, desmine, laminine, myoglobine, myosine, tropomyosine) (Bonney et al. 2011).

Concernant le LED en particulier, le virus Epstein-Barr est sans doute l'exemple le plus documenté chez l'homme (pour revue : (Poole et al. 2006)). En effet, il a notamment été montré que la séquence PPPGRRP de la protéine virale EBNA-1 (Epstein-Barr nuclear antigen-1) pourrait être à l'origine de la réactivité contre la protéine SmB observée au cours du LED (Poole et al. 2008). Une autre étude a décrit une similarité entre un épitope de la

protéine EBNA-1 du virus et la protéine Ro60 (McClain et al. 2005) : cette similarité pourrait être à l'origine de la présence des autoanticorps anti-Ro détectés chez certains patients lupiques.

Ainsi le mimétisme moléculaire semble être un des mécanismes impliqués dans la rupture de la tolérance au soi après une infection, et le développement de MAI. D'autres mécanismes ont cependant été proposés : l'activation "bystander" suivi de "l'épitope spreading".

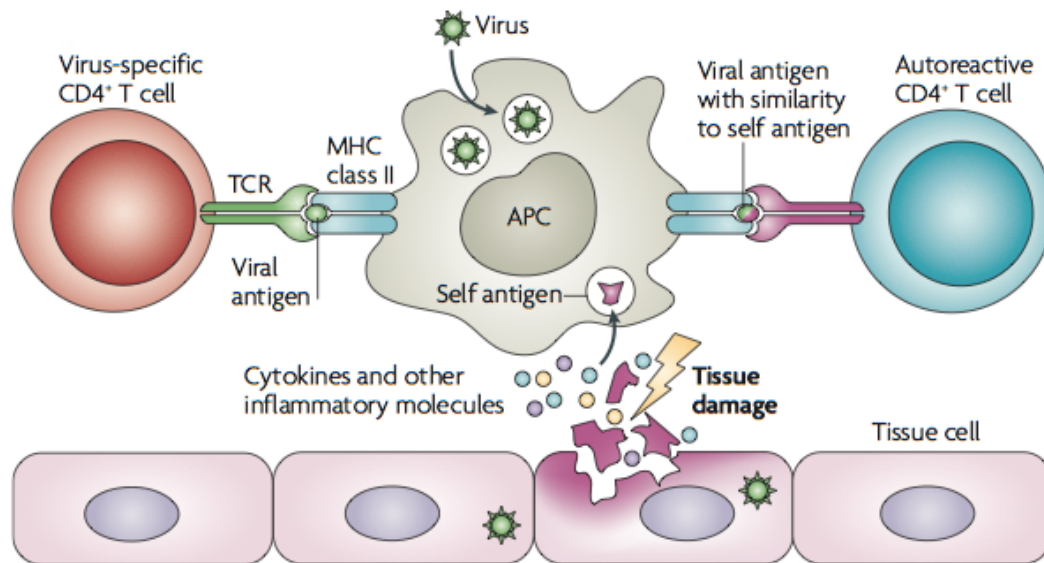
2) L'activation "bystander" et "l'épitope spreading"

Les CPA (cellules présentatrices d'antigènes), activées par des agents infectieux au niveau du site d'inflammation via les TLRs (Toll like receptors), peuvent par ailleurs présenter des peptides du soi (issu de débris de cellules mortes ou en apoptose) aux lymphocytes T ou B autoréactifs (Zipris et al. 2005; Walker & Abbas 2002). D'autre part au cours d'un évènement infectieux, les cellules immunitaires sécrètent de grandes quantités de cytokines qui peuvent également favoriser l'activation de cellules B ou T autoréactives. Ces processus sont regroupés en activation "bystander" que l'on pourrait traduire par : activation accessoire ou annexe (Figure 12b page 45).

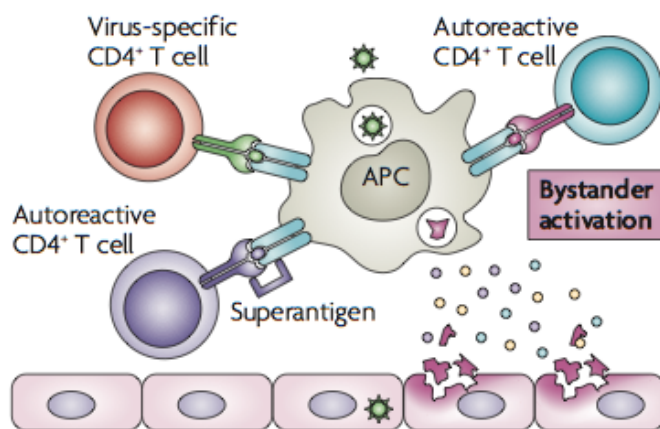
Le phénomène de "bystander activation" (lorsqu'il est à l'origine du développement d'une MAI) est généralement suivi par une diversification des épitopes reconnus par les lymphocytes T ou B autoréactifs vers des épitopes plus immunogènes. Cette diversification épitopique, appelée "epitope spreading" (Figure 12c page 45) permet, dans des conditions non pathologiques, la diversification des épitopes reconnus par les lymphocytes B et T, empêchant de ce fait l'agent infectieux d'échapper au système immunitaire par la modification de certaines de ces protéines de surface. La première étude décrivant le rôle du mécanisme "d'épitope spreading" dans le développement d'une autoimmunité pathologique a été publiée en 1992 par Lehmann et al. Dans cet article les auteurs montrent que dans un modèle d'encéphalite expérimentale autoimmune (EAE), des épitopes cryptiques (ici de la myéline) peuvent devenir immunogènes après immunisation par MBP (Lehmann et al. 1992). De plus, dans le modèle d'infection au TMEV, l'évolution de la reconnaissance de la myéline par les lymphocytes T suit une hiérarchie bien précise, débutant par la reconnaissance de peptides dominants tel que PLP₁₃₉₋₁₅₁ (proteolipid protein) puis, au fur et à mesure du développement de la maladie, des réponses contre d'autres épitopes de la myéline

apparaissent, comme par exemple contre le peptide PLP₁₇₈₋₁₉₁ (Miller et al. 1997). Les résultats de cette étude coïncident avec des observations faites chez les patients atteints du syndrome IMDS (isolated monosymptomatic demyelinating syndrome). Au cours de cette maladie la réponse lymphocytaire T contre des épitopes de la PLP décroît puis une autoactivité contre d'autres épitopes de la PLP apparaît quand la maladie évolue en une sclérose en plaques (Tuohy et al. 1997).

(a)



(b)



(c)

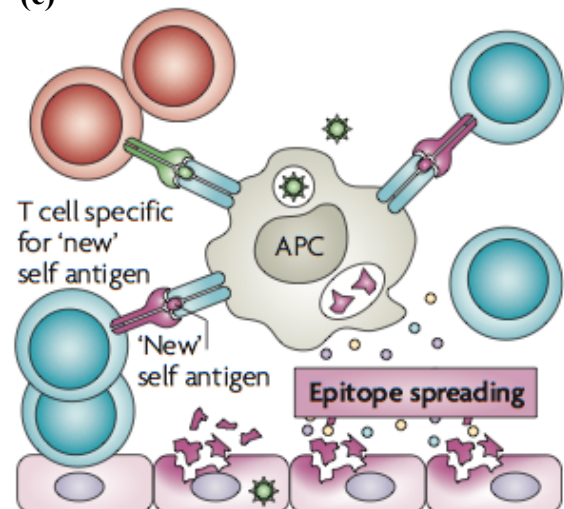


Figure 12 : Vision schématique des mécanismes par lesquels des agents infectieux pourraient déclencher une autoimmunité.

(a) Le mimétisme moléculaire.

(b) L'activation « bystander ».

(c) L'« epitope spreading ». APC (Antigen presenting cell).

D'après (Münz et al. 2009)

3) L'hypothèse du “ fertile field “ (terrain favorable)

Comme nous venons de le voir, il existe, aussi bien chez l'homme que dans les modèles murins de MAI, de solides preuves de l'implication des agents infectieux dans l'apparition des MAI. Dans ce cas pourquoi a-t-il été jusqu'alors impossible d'associer un agent infectieux au développement d'une MAI de façon certaine ?

Une hypothèse énoncée par Herrath et al. en 2003 avance la notion de terrain favorable pour le déclenchement d'une MAI. En effet, de nombreux arguments montrent que “l'histoire immunologique“ de l'individu est importante, et que l'événement initiateur d'une MAI peut se produire longtemps avant le déclenchement proprement dit de la maladie. Ainsi des études effectuées sur des populations immigrantes montrent que l'exposition précoce à des agents infectieux pouvait conférer une susceptibilité au développement de la sclérose en plaques (Gale & Martyn 1995). De plus, il a été montré une association entre le taux d'anticorps anti-nucléaires chez l'adulte et des infections survenues plus tôt, chez le nourrisson (rubéole, oreillons) (Edwards et al. 2006). L'hypothèse du “fertile field“ représentée dans la [figure 13 \(page 47\)](#) repose sur le fait que les microorganismes peuvent induire un état temporaire d'activation du système immunitaire (un terrain propice) pouvant entraîner, si des antigènes du soi sont présents, une activation de lymphocytes T ou B autoréactifs, sans toutefois conduire immédiatement au déclenchement d'une MAI. Cette hypothèse est séduisante car elle propose que les agents infectieux contribuent à l'apparition des MAI en conjonction avec d'autres facteurs, mais ne soient pas forcément les seuls agents responsables de ces maladies.

4) Un rôle protecteur ?

Contrairement à ce qui a été développé ci-dessus, certaines études ont montré que les agents infectieux peuvent dans certains cas avoir un effet protecteur contre les MAI. Ce concept, appelé hypothèse hygiéniste (hygiene hypothesis), a été suggéré par Strachan et al en 1989, et propose que l'augmentation de l'incidence des MAI dans les pays occidentaux à partir de la deuxième moitié du XX^{ème} siècle soit partiellement due à l'accroissement des conditions d'hygiène (Strachan 1989). Cette hypothèse est néanmoins très difficile à vérifier du fait que les agents pathogènes dits protecteurs sont rarement identifiés et que les patients sains ne sont pas suivis de manière régulière. C'est pourquoi la plupart des études, allant dans

le sens d'un effet protecteur des agents infectieux contre les MAI, se basent sur des études rétrospectives. Cependant quelques rares études réalisées sur différents modèles murins de MAI ont permis de rendre l'hypothèse hygiéniste plus crédible. Il a par exemple été montré que l'infection de souris NOD avec le parasite *Schistosoma mansoni* ou avec des virus de la famille Coxsackievirus peut empêcher l'apparition du diabète. Cet effet protecteur serait dû à une forte réponse de type Th2 et l'induction de lymphocyte T régulateurs (Zaccane et al. 2003).

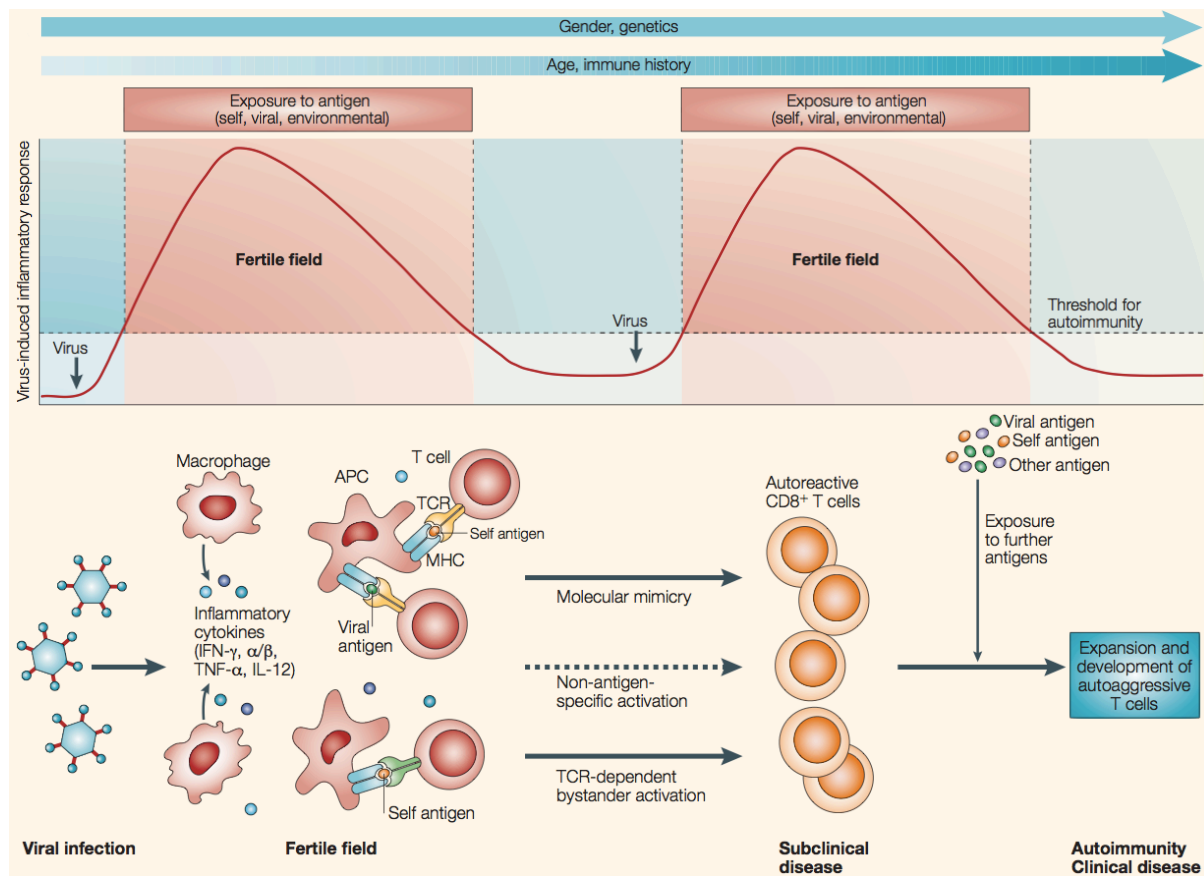


Figure 13 : L'hypothèse du « fertile-field » (terrain favorable).

(a) Représentation schématique de l'hypothèse du « fertile-field ». La composante génétique (flèche du haut) de l'individu ne varie pas tout au long de la vie, alors que l'âge augmente et "l'histoire immunologique" de l'individu est variable au cours du temps. Le terrain favorable à l'apparition d'une autoimmunité est symbolisé par la période suivant une infection virale.

(b) L'hypothèse du « fertile-field » dans le contexte d'une infection virale. APC (antigen presenting cells), IFN (interferon), IL-12 (interleukin-12), MHC (major histocompatibility complex), TCR (T-cell receptor), TNF- α (tumor necrosis factor- α).

D'après (Herrath et al. 2003).

B) Les facteurs hormonaux et l'inégalité homme/femme face au développement des MAI

L'implication de facteurs hormonaux dans la physiopathologie des MAI semble être évidente compte tenu du sex-ratio observé dans les différentes MAI. En effet, dans la plupart des MAI, les femmes sont beaucoup plus touchées que les hommes (Figure 14) (Libert et al. 2010; Fujinami & Oldstone 1985). Les hormones sexuelles ont donc logiquement été proposées comme des facteurs favorisant l'apparition d'une autoimmunité.

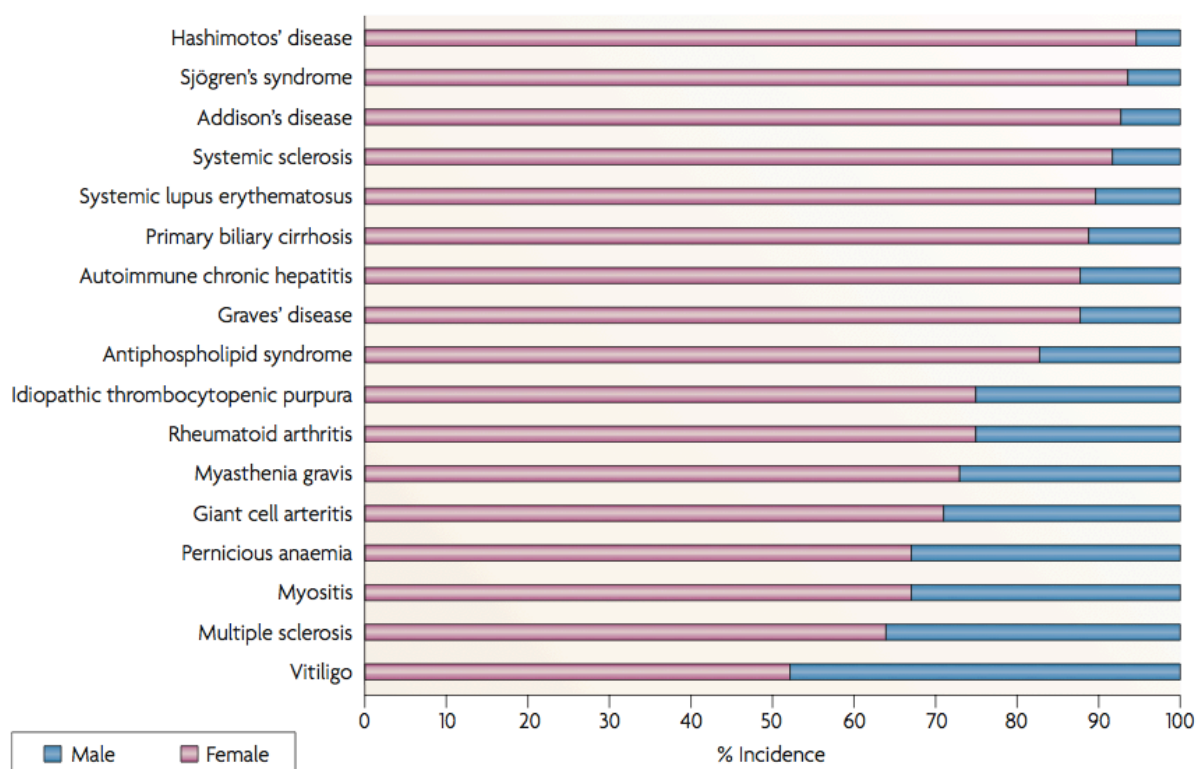


Figure 14 : Fréquence des maladies autoimmunes chez les femmes, en comparaison aux hommes.

D'après (Libert et al. 2010)

Bien que des arguments indirects émanant de l'observation de patients lupiques aillent en faveur d'un rôle des facteurs hormonaux dans le développement des MAI, peu d'études ont montré de façon convaincante l'implication de ces hormones dans les modèles murins de MAI. Ainsi on peut notamment observer chez l'homme que : 1/ la prévalence du LED augmente avec la puberté et décroît avec la ménopause (Rider & Abdou 2001) ; 2/ la sévérité de la maladie varie en fonction du cycle menstruel (Ahmed & Talal 1990) ; 3/ une

augmentation du taux d'oestrogènes et une diminution du taux de testostérone (aussi bien chez la femme que chez l'homme) sont corrélées à l'entrée dans une phase de poussée de la maladie (K Maas 2005). De plus, chez la femme enceinte, il a été montré une augmentation de la sévérité de la maladie notamment du à l'augmentation du risque de développer une poussée de la maladie (pour revue (Märker-Hermann & Fischer-Betz 2010)).

Chez le modèle murin de LED BW, les femelles développent une production d'autoanticorps, une lymphadénopathie, une glomérulonéphrite et meurent de façon plus précoce que les mâles. Il a été montré que l'administration d'oestrogènes aux mâles BW provoque une rapide augmentation du taux d'autoanticorps de type anti-ADNdb puis le développement d'une glomérulonéphrite, conduisant à une augmentation de la mortalité (Roubinian et al. 1978; González et al. 2010). De plus des études plus récentes décrivent un rôle éventuel des oestrogènes dans la voie de signalisation de PD-1 (programmed cell death 1), un récepteur de la famille des molécules de co-stimulation ayant un rôle de régulateur négatif des lymphocytes T (Dinesh et al. 2010). Cependant la connaissance du mécanisme exact par lequel ces hormones pourraient conduire au développement d'une autoimmunité nécessite de plus amples investigations.

Smith-Bouvier et al. ont montré de façon séduisante le rôle important du chromosome X dans la susceptibilité au développement de MAI. Dans cette étude les auteurs ont généré des souris transgéniques ayant subi une ovariéctomie ou une castration, permettant de comparer des animaux XX et XY sans influence du type de gonades (ovaires ou testicules). Leurs résultats montrent que les souris XX sont plus susceptibles de développer une EAE (encéphalite auto-immune expérimentale) et un LED comparées aux souris XY (Smith-Bouvier et al. 2008).

C) Les facteurs médicamenteux

Les molécules pharmacologiques peuvent être à l'origine de manifestations autoimmunes : le LED est sans conteste la pathologie auto-immune la plus documentée dans ce domaine. En effet, le DIL (drug induced lupus) constitue environ 10% des cas de LED au Etats-Unis. Le [tableau 7 \(page 50\)](#) présente la variété des agents pharmacologiques pouvant être à l'origine du développement de MAI.

Les mécanismes mis en jeu dans le DIL sont très dépendants de l'agent pharmacologique : la procainamide, par exemple, induit un défaut de tolérance centrale dans

le thymus en affectant la sélection positive des lymphocytes T ; la minocycline pourrait quant à elle provoquer la production d'autoanticorps par une réaction croisée avec des cytochromes de la cellule (Chang & Gershwin 2010).

Une meilleure compréhension des mécanismes d'action des agents pharmacologiques permettra dans l'avenir de mieux définir leurs implications dans l'émergence des MAI.

Tableau 7 : L'autoimmunité induite par les médicaments.

ANA (Anti nuclear antibody) ; H2A (Histone 2A) ; DIL (Drug induced lupus) ; ANCA (Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies)

D'après (Chang & Gershwin 2010).

Drug	Approximate date of first report	Incidence/cases reported	Diseases/symptom complexes	Clinical features	Autoantibodies reported	Dose dependent
Procainamide	1962	Approx 20%	DIL	Arthritis, arthralgias, fever	ANA, anti-histone antibodies, anti-histone–DNA complex antibodies	Yes
Minocycline	1992	>60 cases	DIL, autoimmune hepatitis, autoimmune thyroiditis	Rash, arthralgias, arthritis, elevated liver enzymes, jaundice	ANA Anti-ds-DNA pANCA	No
Hydralazine	1968	50% autoantibodies, 5–10% autoimmune disease	DIL, vasculitis	Fever, rash, arthralgias, cutaneous involvement, vasculitis, myalgias, pleuritis, leukopenia	ANA, anti ds-DNA, ANCA	Yes
Sulfasalazine	1977	Case reports	DIL, vasculitis	Inflammatory arthropathy, cutaneous vasculitis	Anti-(H2A-H2B)DNA, anti ds-DNA	No
Aromatase inhibitors	1998	3.5%–27.8%	DIL, sicca syndrome, Sjogren's syndrome, inflammatory arthropathies	Arthralgias	Not reported	No data
Isoniazid	1968	Approx 22%	DIL	Arthralgias, arthritis, anemia, fever, pruritis	Anti-(H2A-H2B)DNA	No
Statins	2001	28 cases	DIL, dermatomyositis, polymyositis, lichen planus pemphigoides	Myalgias, polyarthralgias, polyarthritis, leukopenia, photosensitivity, serositis	ANA, Anti Jo-1, Anti-histone, Anti-dsDNA	No
Cyclosporin	1988	N/A	GVH disease – in rat only, scleroderma – like disease	N/A	N/A	No
Quinidine	1988	7 cases	DIL	Polyarthropathies	ANA, anti-histone antibodies	No
Methylodopa	1968	0.02%	Autoimmune hemolytic anemia	Hemolytic anemia	+ Coombs test	No data

D) Autres facteurs environnementaux prédisposant au MAI

Outre les infections, les hormones et les médicaments, il existe d'autres facteurs environnementaux favorisant l'apparition des MAI.

Au cours du LED, les manifestations cliniques sont associées à une photosensibilité, suggérant un rôle possible du rayonnement UV (ultra-violets) dans la pathologie. Dans le cadre d'une exposition prolongée, les UV engendrent une apoptose des kératinocytes au niveau de la peau, libérant ainsi des autoantigènes qui peuvent être captés par les cellules de Langerhans et induire une autoimmunité (Maverakis et al. 2010).

Certaines études ont également montré une augmentation de la prévalence des MAI chez les fumeurs, laissant supposer une implication possible de la fumée de cigarette dans l'apparition des MAI (Arnson et al. 2010). Bien que les mécanismes d'action soient aujourd'hui controversés, il semble probable que la fumée de cigarette engendre une forte mort cellulaire, conduisant à une saturation des systèmes d'élimination des corps apoptotiques, pouvant ainsi donner lieu au relargage d'autoantigènes. Il a également été décrit que la fumée de cigarette peut provoquer une expansion des lymphocytes B autoréactifs par un mécanisme aujourd'hui inconnu (Grimaldi et al. 2002).

IV. La génétique des MAI.

Durant les vingt dernières années, un nombre considérable de nouvelles données ont pu être récoltées concernant la génétique des MAI. Ceci a été possible grâce à de nouveaux outils techniques comme la mise à disposition de la séquence complète du génome humain, les plateformes de séquençage à haut débit et les analyses transcriptomiques (Figure 15). Ces avancées ont entraîné une réévaluation de la complexité génétique de nombreuses MAI, grâce à la constitution de larges cohortes de patients rendant les études d'associations génétiques plus représentatives et plus fiables.

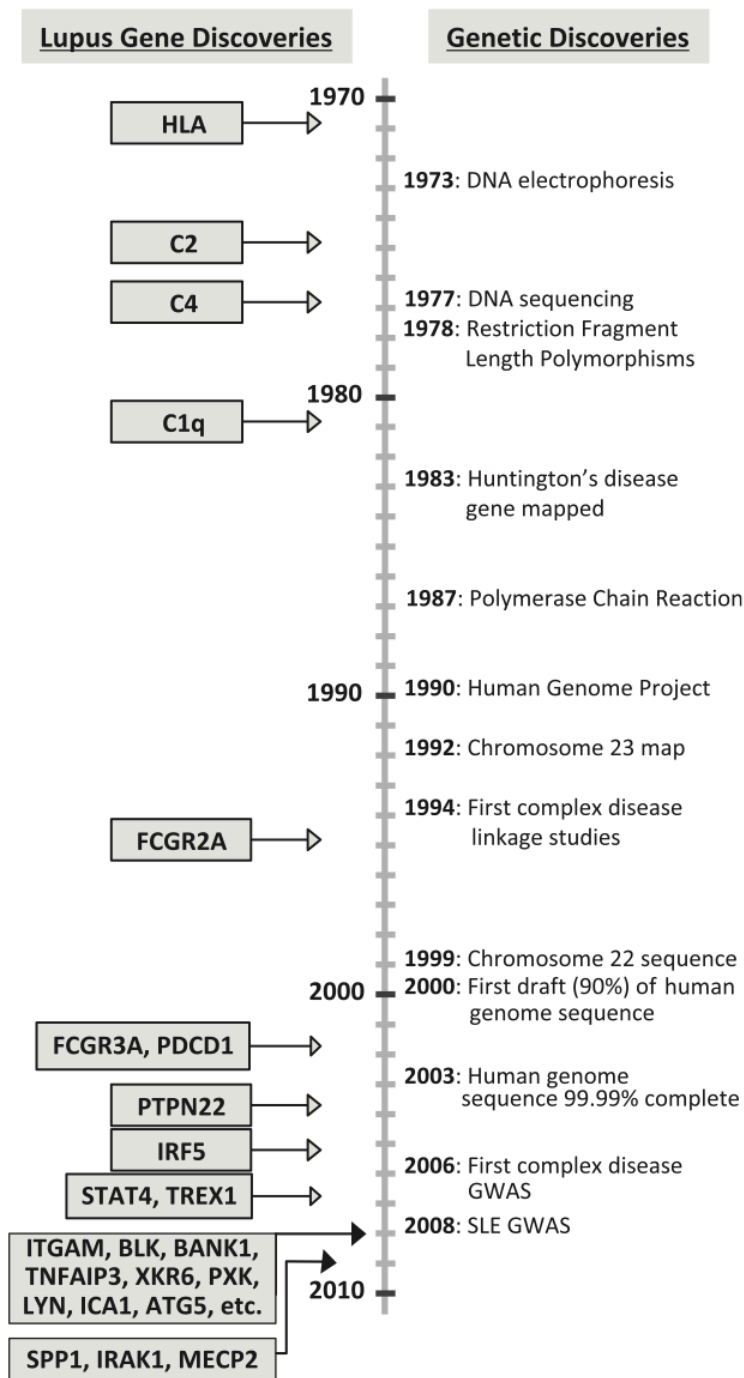


Figure 15 :
Frise chronologique représentant les avancées majeures en génétique humaine et l'identification des gènes de susceptibilité du lupus. D'après (Moser et al. 2009)

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'importance des facteurs génétiques au cours du LED est illustrée par le taux de concordance de la maladie lupique chez les jumeaux monozygotes qui est de 20 à 40%, comparé à 2 à 5% chez les jumeaux hétérozygotes. Un très grand nombre d'études, reposant sur des analyses transcriptomiques, des études d'association sur des familles multiplex (dans lesquelles au moins deux individus sont atteints de maladie auto-immune) et d'association sur génome entier (ou GWAS pour genome-wide association study), couplées à l'analyse de souris transgéniques, ont permis de montrer l'implication de nombreux gènes dans les MAI (Delgado-Vega et al. 2010; Zennewicz et al. 2010)

Dans cette partie nous énoncerons certains des facteurs génétiques de prédisposition aux MAI chez l'homme à travers l'exemple du LED ; nous décrirons ensuite les modèles murins de LED les plus utilisés, et enfin nous établirons la liste de toutes les lignées de souris transgéniques développant un phénotype de type lupique.

A) Les facteurs génétiques de prédisposition au LED découverts chez l'homme

1) Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

Il a été décrit depuis longtemps que les individus portant certains allèles du CMH sont plus susceptibles de développer un LED (Reinertsen et al. 1978; Gibofsky et al. 1978). Ces associations ont par la suite été confirmées grâce à l'utilisation, sur de larges cohortes de patients, de nouvelles techniques de génie génétique telle que les études d'associations pan-génomiques. Dans une étude récente, il a été montré que l'association génétique la plus forte avec le LED chez les caucasiens concerne les gènes du CMH, et plus précisément la région 6p21.3 s'étalant sur 7,2 Mb (contenant environ 400 gènes). Il n'existe pas d'autre région dans le génome possédant une association aussi évidente avec le LED (International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus Genetics (SLEGEN) et al. 2008; Forabosco et al. 2006). Les allèles montrant l'association la plus importante sont ceux codant pour les molécules du CMH de classe II HLA-DR3 et HLA-DR2. Cependant certains gènes codant pour des molécules du CMH d'autres classes telles que celles de classe III semblent également présenter une très forte association avec la maladie. Ceci laisse supposer un rôle important de ces gènes dans la susceptibilité au LED. Ces associations peuvent cependant aussi concerner

des gènes situés dans le locus du CMH, mais sans rapport avec le CMH. Par exemple, dans une de ces études d'associations, le gène *MSH5* (*mutS homologue 5*) a été identifié comme montrant la plus forte association avec le LED (International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus Genetics (SLEGEN) et al. 2008) : ce gène se situe dans le locus codant pour les molécules du CMH de classe III, et est impliqué dans la commutation de classe d'immunoglobuline. Il faut noter que le locus du CMH de classe III comprend également les gènes codant pour les protéines de la cascade du complément comme C4A et C4B, dont la déficience est également associée au LED (Fernando et al. 2008) (voir ci-dessous).

2) Les gènes n'appartenant pas au CMH

Bien que les gènes du CMH soient sans aucun doute ceux ayant la plus forte association avec le LED, d'autres gènes ont été identifiés comme étant associés à la maladie.

a) Les rares cas de LED monogéniques

Le LED est une maladie polygénique dans laquelle de nombreux gènes contribuent à la maladie, cependant il existe quelques rares cas de LED monogéniques. Le déficit en certains composants de la cascade du complément est directement associé au LED aussi bien chez l'homme que chez la souris.

90% des individus ayant un déficit en C1q ou C1r/C1s et 10 à 20% des individus ayant un déficit en C2 développent un LED (M. Chen et al. 2010). Le déficit en C4 est également associé à un risque plus élevé de développer un LED chez l'homme. La souris KO pour les gènes C1q ou C4 est caractérisée par une forte production d'autoanticorps de type anti-nucléaires (ANA) et par le développement d'une glomérulonéphrite (Botto et al. 1998; Paul et al. 2002) (Tableau 5 page 83).

L'association d'une déficience des protéines de la cascade du complément avec le développement du LED peut s'expliquer par plusieurs mécanismes : 1/ l'altération de la clairance des complexes immuns (autoantigènes / autoanticorps) ; 2/ le défaut d'élimination des corps apoptotiques ; 3/ un défaut de tolérance, notamment du à des défaut d'élimination de lymphocytes B autoréactifs lors de la mise en place des mécanismes de tolérance centrale (Carroll 2000); 4/ l'altération de la production de cytokines (plus particulièrement de l'IFN et de l'IL-12) par les cellules dendritiques (Truedsson et al. 2007).

Les mécanismes les plus étudiés sont sans conteste l'élimination des corps apoptotiques et la clairance des complexes immuns. Il a été montré une augmentation du nombre de cellules apoptotiques au cours du LED : les corps apoptotiques ainsi générés constituent alors une source d'autoantigènes potentiels (de type Ro, La, ADN, snRNP) qui peuvent initier une production d'autoanticorps (Casciola-Rosen et al. 1994). La cascade du complément est impliquée dans l'élimination de ces corps apoptotiques, ce qui explique qu'une déficience en un composant de cette cascade protéique peut être à l'origine du développement d'un LED (Korb & Ahearn 1997). Concernant l'élimination des complexes immuns, il a été décrit une baisse de l'expression de CR1 (complement receptor 1 ou CD35) sur les érythrocytes au cours du LED. Ce récepteur est impliqué, dans un cadre non pathologique, dans l'élimination des complexes immuns, empêchant le dépôt de ces complexes dans les organes (Arora et al. 2004).

b) Les loci de susceptibilité et les gènes de susceptibilité au LED identifiés chez l'homme

Dans les années 90, les études d'associations basées sur l'étude de familles multiplex ont permis d'identifier des loci de susceptibilité pour les MAI. De façon intéressante certains de ces loci de susceptibilité semblent être communs à plusieurs MAI. La [figure 16 \(page 57\)](#) représente les loci de susceptibilité identifiés pour le LED.

Grace à ces études d'association, certains gènes ont pu être identifiés comme importants dans la maladie lupique. C'est le cas pour les gènes *IRF5* (interferon regulator factor 5), *PTPN22* (protein tyrosine phosphatase non receptor type 22), *FCGR2A* (Fc gamma receptor 2 alpha), *FCGR3A* (Fc gamma receptor 2 alpha), *PDCDI* (Programmed cell death 1) et *STAT4* (signal transducer and activator of transcription 4) (Arora et al. 2004). Ces études sont basées sur l'association entre un trait de phénotype des individus au sein de la famille multiplex étudiée, et une région chromosomique donnée. Ces associations sont très fortes dans le cas de maladies montrant une ségrégation de type mendélienne, ce qui n'est pas le cas pour la plupart des MAI. Au cours du LED, les associations identifiées sont donc modestes (odds ratio de 1,5 en moyenne) avec une faible significativité statistique. L'association de certains de ces gènes a cependant ensuite été parfois confirmée lors d'études d'associations pan-génomiques.

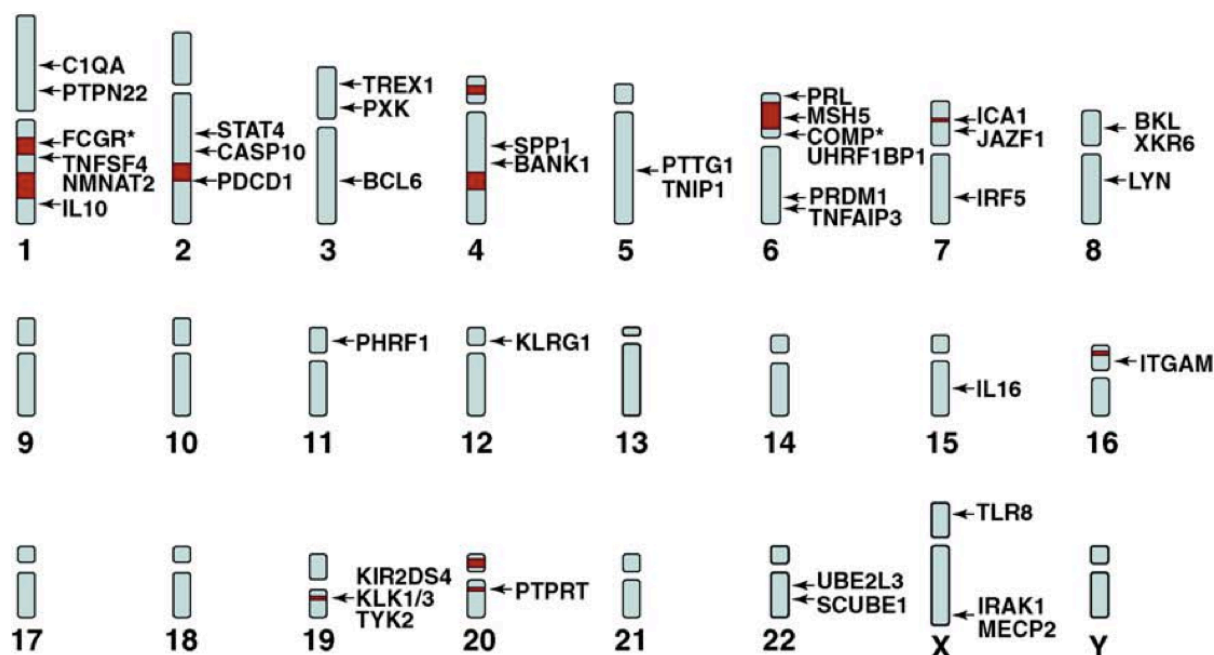


Figure 16 : Carte des loci de susceptibilité pour le lupus chez l'homme.

Les positions approximatives des loci (rouge) et des gènes (flèches) associés au lupus sont représentées. *FCGR symbolise la famille des récepteurs FcγR (FCGR2A, FCGR3A et FCGR3B), COMP symbolise les protéines de la cascade du complément (C2, C4A et C4B). D'après (Crispín et al. 2010).

Depuis 2008 sont parues huit études d'associations pan-génomiques dans le LED, effectuées sur des populations d'origines caucasiennes et asiatiques (Graham et al. 2008; Hom et al. 2008; Kozyrev et al. 2008; International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus Genetics (SLEGEN) et al. 2008; J.-W. Han et al. 2009a; W. Yang et al. 2010; Chung et al. 2011; J. Yang et al. 2011).

Le LED est généralement une maladie polygénique, ceci étant illustré par le fait que chaque allèle est faiblement associé à la maladie. Il se pose donc une question : quelle est la relevance clinique de ces études d'association génétique ? Un premier élément de réponse serait que la découverte d'un seul polymorphisme associé à la maladie n'est pas vraiment utile dans la prédiction des risques de développer un LED, mais que l'association de plusieurs de ces allèles serait plutôt nécessaire pour augmenter de façon significative le risque de développer la maladie. Cependant les combinaisons d'allèles augmentant le risque de développer la maladie ainsi que les mécanismes aboutissant au développement d'une autoimmunité restent aujourd'hui mal connus. Un second élément de réponse est que ces études d'associations pourraient être utiles dans la prédiction d'une réponse à un traitement et ainsi permettre de traiter de façon ciblée des patients ayant des manifestations cliniques

particulières associés à certains polymorphismes. Enfin, ces études d'associations se sont avérées être très utiles dans l'identification de nouvelles voies biologiques impliquées dans le LED. Elles doivent donc être perçues non pas seulement comme des outils de prédiction de risques de développer la maladie, mais plutôt comme des outils permettant d'élaborer de nouvelles hypothèses sur les mécanismes moléculaires aboutissant au développement d'un LED. Ainsi, par une stratégie dite de « gènes candidats », le développement de modèles animaux génétiquement modifiés permet de valider chez l'animal le rôle d'un gène donné dans le développement d'un LED (Figure 17). Ceci n'est cependant possible que si la variation d'expression (augmentation ou diminution) d'un gène, si elle existe, est connue pour un polymorphisme donné, ce qui est rarement le cas aujourd'hui.

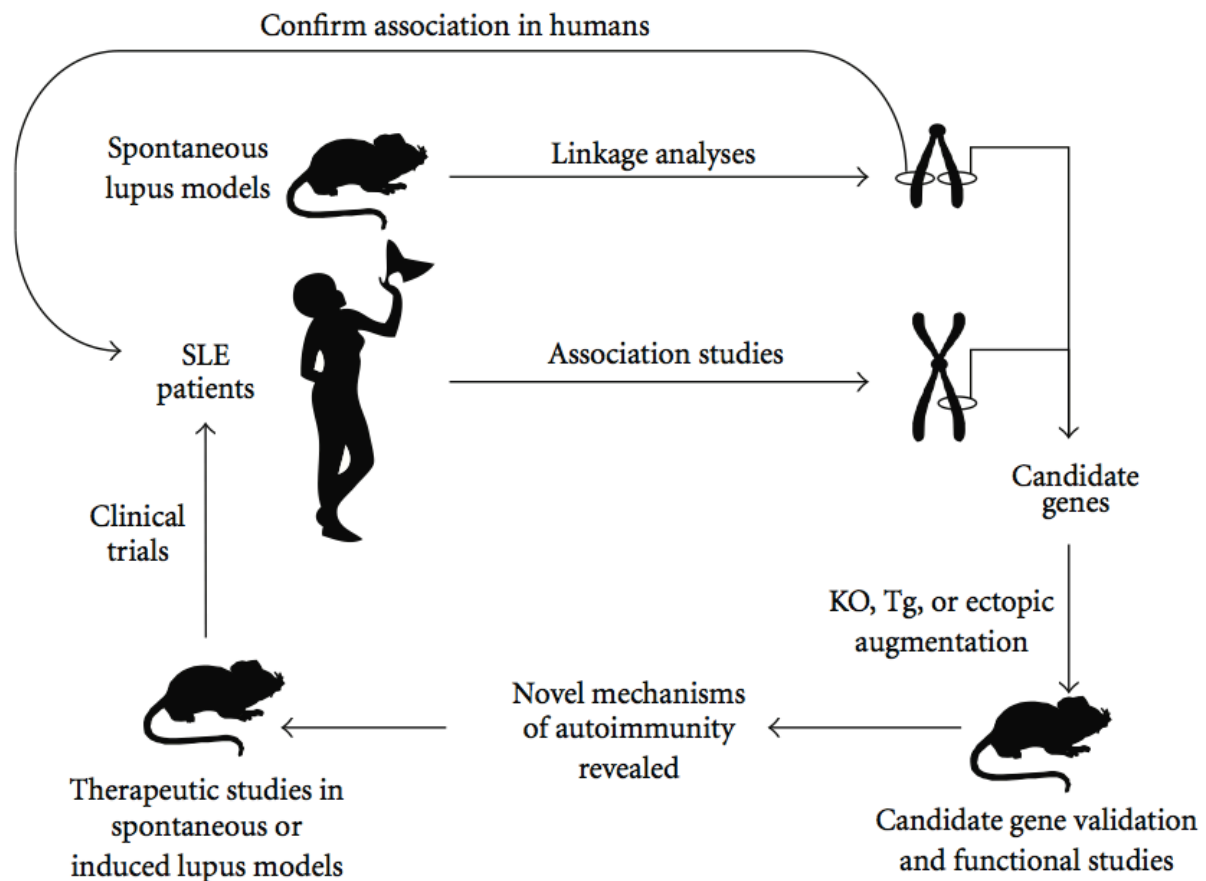


Figure 17 : Stratégie globale de recherche sur le lupus.

Les études sur les patients lupiques et les modèles murins de lupus ont permis la découverte de nouveaux gènes candidats / nouvelles cibles thérapeutiques. Des études plus approfondies réalisées sur des modèles murins permettent de valider les études préliminaires. Les traitements qui en découlent sont dans un premier temps testés chez la souris puis chez l'homme.

D'après (Perry et al. 2011).

Nous allons maintenant décrire les fonctions des gènes ayant été associés de façon reproductible avec le LED chez l'homme, lorsque celles-ci sont connues, en les regroupant selon leurs implications potentielles dans les différentes voies biologiques (Figure 18). Dans certains cas, que nous évoquerons, le rôle de ces gènes dans le développement du LED a été confirmé chez la souris par le développement de modèles transgéniques.

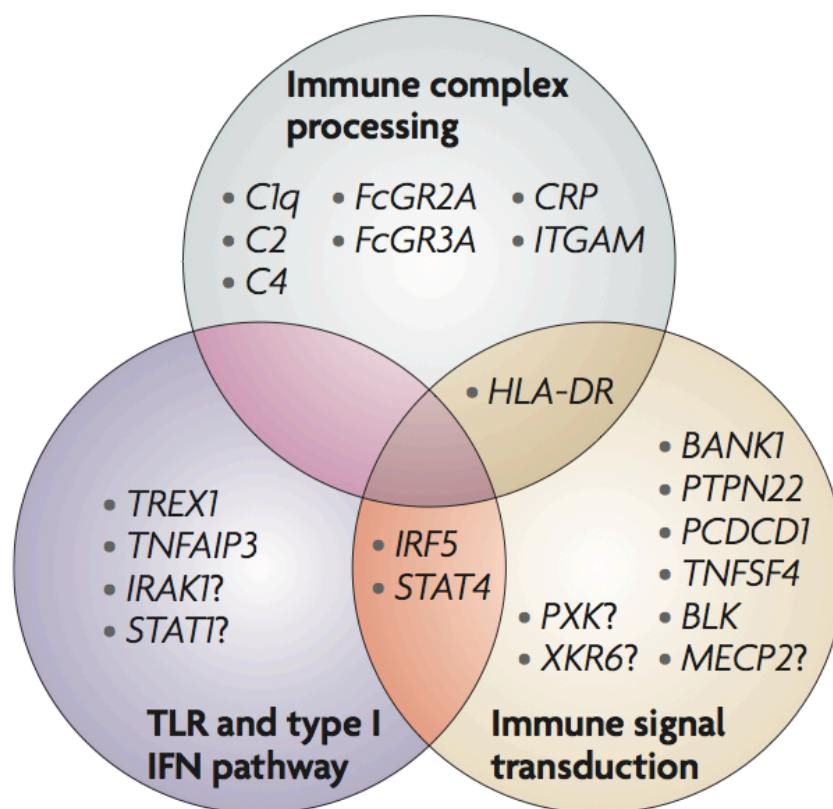


Figure 18 : Les voies biologiques dans lesquelles sont impliquées les gènes de susceptibilité pour le lupus.

Les gènes impliqués dans chacune des voies sont représentés.

BANK1 (B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1), BLK (B lymphoid tyrosine kinase), C1Q (complement component 1, q subcomponent), C2 (complement component 2), C4 (complement component 4), CRP (C-reactive protein, pentraxin-related), FcGR2A (Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor (CD32)), FcGR3A (Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor (CD16a)), HLA-DR (major histocompatibility complex, class II, Dr; IFN, interferon), IRAK1 (interleukin 1 receptor-associated kinase 1), IRF5 (interferon regulatory factor 5), ITGAM (integrin, alpha M), MECP2 (methyl CpG binding protein 2), PCDCD1 (programmed cell death 1), PTPN22 (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22), PTK (PX domain containing serine/threonine kinase), STAT (signal transducer and activator of transcription), TLR (Toll-like receptor), TNFAIP3 (tumor necrosis factor- α induced protein 3), TNFSF4 (tumour necrosis factor superfamily, member 4), TREX1 (three prime repair exonuclease 1), XKR6 (XK, Kell blood group complex subunit-related family, member 6).

D'après (Harley et al. 2009).

i. Les gènes impliqués dans l'immunité innée

Les mécanismes de l'immunité innée jouent un rôle important dans la physiopathologie du LED, de ce fait plusieurs gènes impliqués notamment dans les voies de signalisation des TLRs et de l'interféron ont été associés au LED (Figure 19a page 61). En effet, il a été décrit chez les patients atteints de LED une “signature interféron“, désignant l'augmentation de l'expression des gènes inductibles par l'interféron, et corrélée avec la sévérité de la maladie (Crow & Kirou 2004). D'autre part, le gène *IRF5* est fortement associé au LED. IRF5 est un facteur de transcription régulant l'expression des gènes induits par l'IFN α . Les polymorphismes détectés chez les patients lupiques provoqueraient une augmentation de la stabilité d'IRF5, influençant l'initiation de la transcription des gènes inductibles par l'IFN (Cunningham Graham et al. 2007; Kelly et al. 2008). Un grand nombre de cellules produisent de l'interféron de type I (IFN α et IFN β) durant une infection virale, cependant les cellules en produisant le plus sont les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Chez des patients lupiques il a été observé une production anormalement élevée d'IFN α (Hooks et al. 1979; Preble et al. 1982).

Ces études ont permis d'établir un modèle expliquant l'implication de la voie de l'interféron dans le LED. Ce modèle fait intervenir la voie de signalisation des TLRs, plus particulièrement TLR7 et TLR9. Il est connu que ces TLRs peuvent reconnaître des acides nucléiques provenant notamment de cellules en apoptose, de débris cellulaires ou encore de complexes immuns. Ainsi l'activation des voies de signalisation de TLR7 et/ou TLR9 va provoquer une forte production d'interféron de type I par les pDCs, ceci de façon IRF5-dépendante. De plus l'expression d'IRF5 est dépendante de l'IFN α : ceci laisse donc supposer un processus de rétrocontrôle positif, pouvant être un des mécanismes moléculaires engendrant un emballement de la réponse immunitaire et conduisant au développement d'une autoimmunité (Figure 20 page 62).

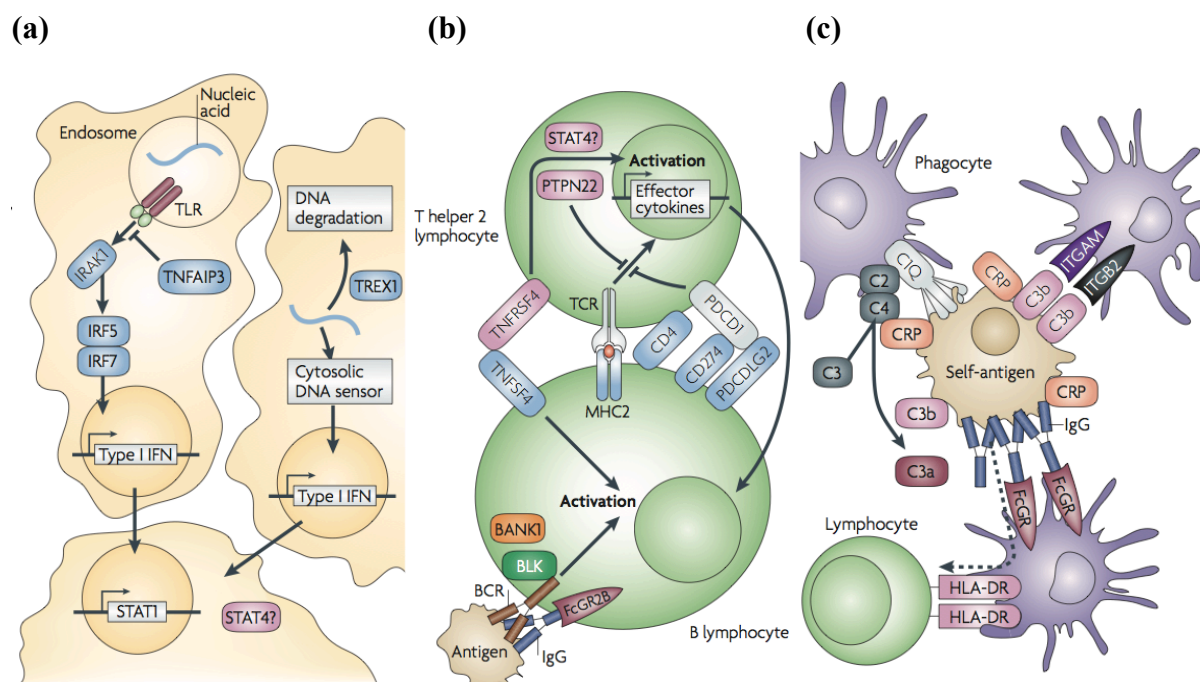


Figure 19 : Localisation des gènes de susceptibilité pour le lupus dans les voies de signalisation des cellules immunitaires.

(a) Voie des TLR et production d'interféron.

(b) Voies du BCR et du TCR.

(c) Voies des mécanismes de phagocytose et d'élimination des complexes immuns.

BANK1 (B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1), BCR (B cell receptor), BLK (B lymphoid tyrosine kinase), C1Q (complement component 1, subcomponent q), C2 (complement component 2), C3 (complement component 3), C3a (C3 cleavage product a), C3b (C3 cleavage product b), C4 (complement component 4), CD274 (programmed cell death 1 ligand 1 precursor), CRP (C-reactive protein), FCGR (Fc fragment of IgG receptor), HLA-DR (major histocompatibility complex, class II, Dr), IFN (interferon), IrAK1 (interleukin 1 receptor associated kinase-1), IRF (interferon regulatory factor), ITGAM (integrin alpha M), ITGB2 (integrin, beta 2), MHC2 (CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain), PDCD1 (programmed cell death 1), PDCD1LG2 (programmed cell death 1 ligand 2 precursor), PTPN22 (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22), STAT (signal transducer and activator of transcription), TNFAIP3 (tumor necrosis factor- α induced protein 3), TNFRSF4 (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4), TNFSF4 (tumor necrosis factor superfamily, member 4), TREX1 (three prime repair exonuclease 1).

D'après (Harley et al. 2009).

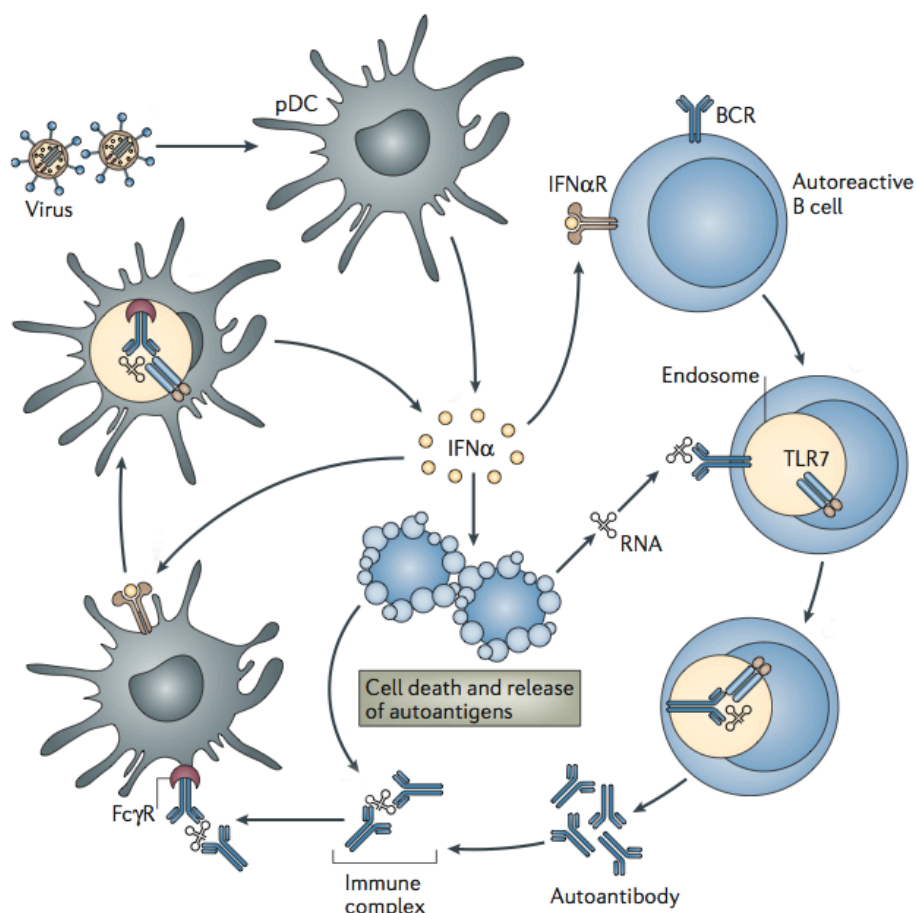


Figure 20 : Schéma d'ensemble du modèle de déclenchement d'une autoimmunité induite par l'IFN α .

pDC (plasmacytoïde dendritic cells)

D'après (Marshak-Rothstein 2006).

IRAK1 (interleukine-1 receptor associated kinase) code pour une protéine impliquée dans la voie NF κ B et ayant pour fonction d'activer TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6). Il a été associé au LED dans une étude de 2007 (Jacob et al. 2007). Dans une autre étude parue en 2009, les mêmes auteurs ont montré que le KO d'*Irak1* dans certains modèles murins de LED comme les modèles *Sle1* et *Sle3* (voir partie "Les modèles murins de LED" page 72) permettait d'empêcher l'apparition de tous les symptômes lupiques normalement présents chez ces souris (Jacob et al. 2009). Donc l'association d'*IRAK1* avec le LED chez l'homme serait plutôt de type « gain de fonction ». De plus, le gène *IRAK1* est situé sur le chromosome X, très proche d'un autre gène associé au LED (*MECP2* pour methyl-CpG-binding protein 2) laissant également supposer que le dosage génétique pourrait être important pour expliquer la prévalence du LED chez les femmes (Sawalha et al. 2008). La proximité des gènes *IRAK1* et *MECP2* est d'ailleurs source de controverse, car la région génomique Xq28 ayant été décrite comme associée au LED englobe les deux gènes : ainsi on

ne sait pas réellement lequel de ces deux gènes est responsable de l'association observée (Sawalha 2009).

Le gène **STAT4** (signal transducer and activator of transcription 4) code pour un facteur de transcription impliqué dans la voie JAK/STAT, jouant un rôle important dans la signalisation des cytokines et des facteurs de croissance, et régulant de nombreux processus cellulaires tels que la différenciation, la prolifération et l'apoptose. **STAT4** a été associé pour la première fois au développement du LED dans une étude de Remmers et al (Remmers et al. 2007). Bien que cette association fut décrite comme faible pour le LED (odds ratio d'environ 1,25), deux autres études d'associations pan-génomiques ont confirmé cette association génétique avec plus de force (odds ratio supérieur à 1,5) (International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus Genetics (SLEGEN) et al. 2008; Hom et al. 2008). **STAT4** semble être associé plus particulièrement à certaines manifestations cliniques telles qu'une forte production d'autoanticorps de type anti-ADNdb et la glomérulonéphrite (K. E. Taylor et al. 2008). De plus, il a été reporté un effet additif de **STAT4** et **IRF5** dans l'augmentation du risque de développer un LED montrant encore une fois l'importance de la voie de l'interféron dans le LED (Abelson et al. 2009).

TNFAIP3 (tumor necrosis factor- α -induced-protein 3) a également été associé au risque de développer un LED (Graham et al. 2008; Musone et al. 2008). Bien que l'haplotype soit présent dans une minorité de patients lupiques, il montre néanmoins une forte significativité statistique (odds ratio de 2,28). Ce gène code pour une protéine nommée A20 qui a été identifiée comme un régulateur négatif de la voie NF κ B en provoquant l'ubiquitination puis la dégradation de TRAF6 et RIP (pour revue (Verecke et al. 2009)). Les souris KO pour *Tnfaip3* développent un syndrome inflammatoire sévère, sont hypersensibles à une injection de LPS ou de TNF- α et meurent prématurément à l'âge de 6 semaines (E. G. Lee 2000). Deux études récentes ont montré que le KO conditionnel de *Tnfaip3* dans les lymphocytes B provoque chez la souris une augmentation du nombre de lymphocytes B dans les centres germinatifs, la production d'autoanticorps et le dépôt d'anticorps au niveau rénal (Tavares et al. 2010; Chu et al. 2011) (Tableau 5 page 83). Ces résultats montrent l'importance de ce gène dans la prédisposition au LED et propose une hypothèse moléculaire aux études d'associations réalisées préalablement.

TREX1 (three prime repair exonuclease 1) est dans de rares cas associé au LED (9 fois sur 417 patients comparé à 0/1712 contrôles) (Lee-Kirsch et al. 2007). TREX1 est une exonucléase initialement impliquée dans le syndrome d'Aicardi-Goutières (une leucodystrophie touchant le système nerveux central). Cependant une étude réalisée sur une

lignée de souris *Trex1* KO a montré l'importance de cette protéine dans la dégradation et la reconnaissance d'ADN intra-cytoplasmique. Cette reconnaissance peut ensuite stimuler la production d'IFN α et générer une réponse autoimmune (Stetson et al. 2008) (Tableau 5 page 83).

ii. Les voies de signalisations des lymphocytes B et T

Une des caractéristiques majeures de la maladie lupique est une production d'autoanticorps, processus médié par un antigène. De ce fait, les lymphocytes B et T jouent un rôle central dans la physiopathologie du LED (voir partie "Les anomalies du système immunitaires au cours du LED" page 27). C'est pourquoi les voies de signalisation du BCR et du TCR contiennent de nombreux gènes de susceptibilité pour le LED qui ont partiellement été identifiés au cours des récentes avancées de la génétique (Figure 19b page 61).

Au cours de la maturation des lymphocytes T, une augmentation du seuil d'activation du TCR peut : 1) permettre aux lymphocytes T autoréactifs qui réagissent fortement avec le soi d'échapper aux mécanismes de sélection négative et de migrer en périphérie, 2) empêcher les lymphocytes T régulateurs (Treg) de contrôler les réponses immunitaires inadaptées. Les protéines régulant la voie d'activation du TCR sont donc importantes pour contrôler la force du signal induit par une liaison d'un peptide au TCR. Certains gènes codant pour ces protéines régulatrices ont été identifiés comme étant des gènes de susceptibilité au développement d'un LED.

PTPN22 (protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 22), par exemple, est un gène codant pour un régulateur négatif de la voie du TCR : la protéine LYP (ou PEP) (Chung & Criswell 2007). *PTPN22* a été dans un premier temps identifié comme un gène de susceptibilité pour le diabète de type I par une approche d'étude de gène candidat (Bottini et al. 2004), puis dans la polyarthrite rhumatoïde et enfin dans le LED grâce à des études d'association sur génome entier (Begovich et al. 2004; Kyogoku et al. 2004). *PTPN22* est l'exemple type d'un gène de susceptibilité retrouvé dans de nombreuses MAI telles que la maladie de Basedow, la thyroïdite de Hashimoto, la myasthénie (myasthenia gravis), la sclérose en plaques, le vitiligo ou encore la maladie d'Addison. Plusieurs polymorphismes sont à l'origine de cette association génétique, le plus documenté étant le remplacement d'une cytosine par une thymidine en position 1858 qui résulte en un changement d'acide aminé arginine en tryptophane (R620W) dans la partie codée par l'exon 14 de la protéine

LYP. LYP a pour fonction de déphosphoryler LCK et ainsi réguler de façon négative le signal provenant du TCR. La souris *Lyp* KO présente une hyperactivation des lymphocytes T combinée à une augmentation de la production d'anticorps, après une immunisation avec un antigène T-dépendant (Hasegawa et al. 2004). Il semblerait cependant que chez l'homme la mutation R620W soit plutôt de type gain de fonction (Vang et al. 2005). En effet, il est aujourd'hui défini que ce polymorphisme empêche la liaison de LYP à la protéine CSK ce qui a pour conséquence de perturber la régulation du signal provenant du TCR. En effet, CSK a pour fonction d'inhiber l'activité de LCK et ainsi réduire le signal TCR (pour revue (Chung & Criswell 2007) : de ce fait, chez l'homme, le polymorphisme identifié conduirait à empêcher CSK d'inhiber LCK. Ainsi, les mécanismes exacts de cette association génétique restent aujourd'hui encore mal connus.

TNFSF4 (tumor necrosis factor ligand superfamily, member 4) ou OX40L est exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Son récepteur TNFSFR4 (ou OX40) est exprimé à la surface des lymphocytes T. La liaison de OX40L sur OX40 délivre au lymphocyte T un signal de co-stimulation (Stüber & Strober 1996). Le gène *TNFSF4* a été associé au LED : il est localisé sur le génome près du cluster de gènes codant pour les récepteurs de la famille FcγR (dont certains membres ont également été associés au LED) (Cunningham Graham et al. 2008). Le polymorphisme identifié engendre une surexpression du gène, donnant un signal de co-stimulation exacerbé qui peut provoquer une hyperactivation du lymphocyte T et perturber les mécanismes de tolérance.

Un autre gène de la famille des récepteurs inhibiteurs des lymphocytes T et B a également été impliqué dans la pathologie lupique. ***PD-1*** (programmed cell death 1 ou *PDCD1*) fut l'un des tous premiers gènes à être découverts grâce aux études d'associations génétiques dans des familles multiplex (Prokunina et al. 2002). Le SNP associé au LED (PD-1.3) se trouve dans une partie intronique du gène. Lorsqu'il est présent, ce polymorphisme empêche la fixation du facteur de transcription RUNX1 sur l'ADN et perturbe la transcription de *PD-1*, abaissant ainsi le seuil d'activation des cellules B et T. Bien que d'autres publications aient infirmé l'association de PD-1 avec le LED, une méta-analyse regroupant plusieurs études d'associations a néanmoins permis de prouver une contribution de *PD-1* au risque développer un LED (Y. H. Lee, Woo, et al. 2009a).

La dérégulation de la voie du BCR est un des mécanismes souvent évoqués dans le développement de certaines MAI. Au cours du LED il a été mis en évidence des polymorphismes dans des gènes codant pour des protéines étant des composants de la voie du

BCR, ou des protéines impliquées dans la régulation de cette voie. Ces polymorphismes, dans la plupart des cas, donnent lieu à une hyperactivation du lymphocyte B, qui est un des phénotypes observés chez les patients atteints de LED.

LYN est un exemple de protéine appartenant à la voie du BCR et dont le gène a été identifié comme associé au LED (odds ratio 0,8). Cependant, cette association est faible et restreinte à une population d'origine européenne. De plus, il a été montré une baisse de l'expression de *LYN* chez les patients lupiques (Liossis et al. 2001). Enfin, les souris *Lyn* déficientes développent une autoimmunité sévère caractérisée par la forte production d'autoanticorps, et une glomérulonéphrite médiée par le dépôt de complexes immuns (voir partie "Les souris génétiquement modifiées développant un phénotype lupique" [page 81](#) et [Tableau 5 page 83](#)) (Hibbs et al. 1995). Tous ces arguments montrent que *LYN* constitue bien un gène de susceptibilité pour le LED.

BANK1 (B cell scaffold adapter protein with ankyrin repeats) est une protéine adaptatrice exprimée majoritairement par les lymphocytes B, qui a été identifiée par Yokoyama et al. Dans cette étude, les auteurs ont montré que cette protéine est phosphorylée suite à une activation du BCR et qu'elle régule le flux calcique via un mécanisme IP3R-dépendant (Yokoyama et al. 2002). Plus récemment, la génération de la souris *Bank1* KO a permis de montrer l'implication de la protéine dans la régulation de la voie du récepteur CD40 dans les lymphocytes B (Aiba et al. 2006). Les souris *Bank1* KO montrent également une augmentation du nombre de lymphocytes B des centres germinatifs et une augmentation de la sécrétion d'IgM suite à une immunisation avec un antigène T-dépendant. En 2008, une étude a décrit l'association de trois SNPs dans le gène *BANK1* avec un risque de développer un LED (odds ratio 1,38) (Kozyrev et al. 2008). Cette association a ensuite été confirmée dans une deuxième étude d'association pan-génomique effectuée sur des patients lupiques présentant une production d'autoanticorps de type anti-ADNdb (Chung et al. 2011). Ces polymorphismes affectent des domaines importants pour la fonction de la protéine comme par exemple le domaine d'interaction avec LYN. Ces défauts peuvent, encore une fois, provoquer une activation prolongée ou une hyperactivation du lymphocyte B en réponse à une stimulation antigénique, phénomènes classiquement observés chez les patients lupiques.

Un deuxième gène exprimé essentiellement dans les lymphocytes B a été identifié dans plusieurs études comme un facteur de risque pour le LED, le gène **BLK** (odds ratio 1,33) (Hom et al. 2008). BLK (B-lymphoid tyrosine kinase) est un membre de la famille des tyrosine kinases Src. Peu de données sont aujourd'hui disponibles quant à la fonction de ces protéines dans les lymphocytes B. BLK pourrait jouer un rôle dans le développement des

lymphocytes B, plus précisément dans la formation du pré-BCR (Tretter 2003). La souris *Blk* KO n'a pas de phénotype apparent. L'association de *BLK* avec le LED est aujourd'hui controversée, car une méta-analyse récente indique qu'il est nécessaire d'analyser un nombre plus important de patients avant de pouvoir définir *BLK* comme un gène de susceptibilité pour le LED (Ye Fan et al. 2010).

iii. Gènes impliqués dans d'autres voies biologiques

ITGAM (intégrin, alpha M), plus connu sous le nom de Mac-1 ou CD11b, a été associé au LED dans deux études indépendantes réalisées en 2008 (International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus Genetics (SLEGEN) et al. 2008; Nath et al. 2008). Ce gène code pour une protéine ayant un rôle dans l'élimination des complexes immuns, l'adhésion et la migration cellulaire (Figure 19c page 61). Une méta-analyse récente a permis de confirmer que ce gène est bien associé au LED (Y Fan et al. 2011). Il est intéressant de noter que l'allèle responsable de l'association avec le LED est monomorphique dans les populations asiatiques (S. Han et al. 2009b) : ceci montre bien que certains polymorphismes de susceptibilité peuvent être spécifiques d'une population donnée.

Il existe également plusieurs gènes ayant été associés au LED par les études d'associations sur génome entier mais n'ayant pas de fonction connue dans le système immunitaire. Ces gènes sont probablement parmi les plus intéressants car ils ouvrent un large champ d'investigation pour les prochaines années. L'étude des gènes *KIAA1542*, *PXK*, *XKR6*, *FAM167A*, *ATG5* et d'autres permettront peut être d'identifier de nouvelles voies biologiques importantes dans la physiopathologie du LED.

3) Les mécanismes épigénétiques dans le LED humain

L'épigénétique désigne une modification de l'expression des gènes n'étant pas due à un changement dans la séquence de l'ADN. La méthylation de l'ADN et l'acétylation ou la méthylation des histones sont les principaux mécanismes épigénétiques.

Plusieurs arguments sont en faveur d'une composante épigénétique dans le développement du LED: 1/ certains médicaments provoquant la déméthylation de l'ADN peuvent causer une maladie de type lupique ; 2/ l'ADN des lymphocytes T du sang de patients lupiques est hypométhylé (Richardson et al. 1990) ; 3/ le taux de concordance de la

maladie chez les jumeaux monozygotes n'est pas de 100% et, chez les jumeaux monozygotes n'ayant pas tous les deux développé la maladie, seul le jumeau malade montre une déméthylation de l'ADN dans ses lymphocytes (Javierre et al. 2010) ; 4/ *DNMT1* (DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1), une enzyme permettant la méthylation de l'ADN, est sous-exprimée dans les lymphocytes T du sang de patients lupiques (C. Deng et al. 2001).

GADD45a est une enzyme impliquée dans la déméthylation de l'ADN, et est impliquée dans la pathologie lupique ([Tableau 5 page 83](#)). Il a été montré que cette enzyme est surexprimée dans les lymphocytes T de patients atteints de LED. De plus le niveau d'expression de GADD45a est corrélé avec le SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) et inversement corrélé au taux global de méthylation de l'ADN (Yaping Li et al. 2010). D'autres protéines comme RFX1 (regulatory factor X 1) et PP2Ac (protein phosphatase 2), contrôlant la méthylation de l'ADN, sont dérégulées dans les lymphocytes T de patients atteints de LED.

Les histone-acétyl-transférases (HATs) et les histone-déacetylases (HDAC) sont les enzymes qui régulent l'accessibilité à la chromatine. Dans les lymphocytes T de patients lupiques le niveau global d'acétylation des histones H3 et H4 est plus faible que chez des individus sains, suggérant un défaut de régulation des HATs ou des HDAC au cours de la maladie (Hu et al. 2008).

Ainsi la dérégulation de certains mécanismes épigénétiques semble impliquée dans le développement du LED. Il reste cependant à découvrir les gènes cibles de l'hypométhylation de l'ADN, ainsi que la nature des modifications observées sur les histones au cours du LED.

4) Les analyses du transcriptome réalisées chez les patients atteints de LED

A partir des années 2000, le développement de la technologie des microarrays a permis de mesurer l'expression de plusieurs milliers de gènes simultanément, ouvrant ainsi un nouveau champ d'étude pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques de nombreuses pathologies, dont le LED. Les analyses transcriptomiques réalisées chez des patients atteints de LED sont résumées dans le [tableau 8 \(page 69\)](#). Elles ont permis de mieux comprendre les fonctions, les régulations et les interactions des gènes dans une pathologie caractérisée par une grande hétérogénéité, que se soit en termes de manifestations cliniques ou de sévérité.

Tableau 8 : Les analyses microarrays réalisées sur les PBMCs de patients lupiques.

Technologie	Nbre de gènes	Patients/ contrôles	Voies biologiques	Références
Microarray	375	21 LED/ 12	TNF, IL-6	(Rus et al. 2002)
Affymetrix U95	> 4000	24 LED / 9	Inflammation, second messenger, autoantigènes, apoptose, ubiquitine protéasome, cycle cellulaire	(Kevin Maas et al. 2002)
Affymetrix U95	12000	48 LED / 42	Interféron	(Baechler et al. 2003)
Mergen expressChip	12000	30 LED / 9	Interféron, granulocyte	(Bennett et al. 2003)
Expression Diagnostic	3002	10 LED / 18	Interféron	(G.-M. Han et al. 2003)
Affymetrix U95	> 8000	22 LED / 9	Interféron	(Crow & Wohlgemuth 2003)
Corning GAPS slides	12000	5 LED / 18	Inflammation, adhésion cellulaire, réparation de l'ADN, apoptose	(Mandel et al. 2004)
Panorama Cytokine Gene array membrane	3602	11 LED / 2	Interféron	(Peterson et al. 2004)
GF211 Gene filter Microarrays	375 (cytokines)	12 LED inactifs	Protéase, TNF α	(Rus et al. 2004)
GF211 Gene filter Microarrays	5184	6 LED / 3	TNF, CD22, SnRNP, splicing factor 3a	(Pereira et al. 2004)
? Home made	5184	4 LED / 6	Signature similaire dans famille lupique	(K Maas 2005)
? Home made	256	269 entre patients	Interféron lien avec la sévérité du LED	(Nikpour et al. 2008)
? Home made	25342	LT triés de 13 LED / 25	Homing, activation LT	(Lyons et al. 2010)
? Home made	960	LT triés de 7 LED / 6	?	(Trevisan et al. 2006)

En 2002, Rus et al. furent les premiers à réaliser une étude transcriptomique sur des PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) issues de 21 patients atteints de LED, comparés à 12 contrôles, en utilisant des ADNc marqués au P³² (Rus et al. 2002). Sur les 375 gènes étudiés, 50 furent identifiés comme différentiellement exprimés entre les patients et les contrôles : parmi ces gènes on peut citer les gènes *TNF/death receptor*, l'*IL-1*, le gène *IL-8* et le gène codant son récepteur.

Dans une autre étude, Maas et al. comparèrent le niveau d'expression de plus de 4000 gènes dans les PBMCs de 24 patients lupiques, permettant l'identification d'un cluster de gènes communs comprenant 95 gènes surexprimés codant notamment pour différents médiateurs pro-inflammatoires (MSTP9, BDNF, CES1, ELA3) et pour des seconds messagers de certaines voies d'activation (DGKA, DGKD). D'autres gènes sous-exprimés furent également identifiés, jouant un rôle dans des processus tels que l'apoptose (*TRADD*, *TRAP2*, *TRIP*, *TRAF2*, *CASP6*, *CASP8*, *TP53*) ou l'ubiquitination (*UBE2M*, *UBE2G2*, *POH1*) (Kevin Maas et al. 2002).

Dans une troisième étude, Mandel et al. identifièrent un pattern d'expression génique spécifique chez 5 patients lupiques, comprenant 723 gènes surexprimés et 423 gènes sous-exprimés. Parmi les gènes identifiés certains sont impliqués dans les processus inflammatoires (*IFI16*, *BATI*), dans la réparation de l'ADN (*POLS*, *MBD4*, *ERCC3*, *MSH3*), l'adhésion cellulaire (*NELL2*, *EED*, *CCR2*, *TSC1*), dans la régulation négative de la prolifération cellulaire (*DDX1*) et dans l'apoptose (*TIAL1*) (Mandel et al. 2004).

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'IFN α est une cytokine depuis longtemps décrite comme exerçant un rôle important dans la pathogénie du LED. En 2003, deux équipes ont réalisé une analyse transcriptomique de PBMCs de patients lupiques à l'aide de puces Affymetrix (U95) permettant de mesurer l'expression simultanée de 12000 gènes. Ces deux études ont mis en évidence une surexpression des gènes induits par la voie de l'IFN chez les patients lupiques, en comparaison aux individus sains. La première de ces études est basée sur l'analyse du transcriptome de 30 enfants atteints de LED pédiatrique, en comparaison à 9 contrôles sains appariés. Un "clustering" hiérarchique a permis de montrer que les gènes les plus fortement surexprimés étaient des gènes inductibles par une stimulation interféron (par exemple *IFIT1*, *IRF7B*, *MX1*, *MX2*, *IFI6 à 16*, *XIAP*, *ISG15*). Les auteurs ont nommé ce pattern particulier d'expression la "signature interféron" (Bennett et al. 2003). Dans la deuxième étude, le profil d'expression de PBMCs de 48 patients atteints de LED a été analysé. 53 des 161 gènes différentiellement exprimés chez les patients lupiques sont liés

à la voie de l'interféron. Parmi ces gènes on peut citer *SERPING1*, *OASL*, *LY6E*, *XIAP associated factor-1*. De plus, dans cette étude, le niveau d'expression de ces gènes semble être corrélé à la sévérité des manifestations cliniques observées chez les patients. D'autres études transcriptomiques ont également confirmé l'existence d'une "signature interféron" au cours du LED. Han et al., en utilisant un autre système de microarrays, ont également montré une augmentation du niveau des transcrits codants pour des gènes tels que *IFIT1*, *IFIT2*, *IFIT4*, *LY6E*, *OAS1*, *OAS2*, *OASL* (G.-M. Han et al. 2003). Enfin de façon similaire, Crow et al. ont montrés une surexpression de certains gènes régulés par l'interféron (*PRKR*, *APOBEC3C*, *OAS3* et *IRF7*) chez 22 patients atteints de LED (Crow & Kirou 2004). Cependant, une étude longitudinale réalisée sur 11 patients lupiques indique que la réponse interféron (mesurée par microarrays) n'est pas corrélée à la sévérité de la maladie ni à ces différents stades (quiescence / poussée) (Petri et al. 2009). Il est important de préciser que souvent, ces études ont été réalisées sur des PBMCs totaux, et sur des groupes de patients lupiques relativement hétérogènes en terme de sévérité de la maladie.

Plus récemment, des études plus fines, analysant le profil d'expression des gènes dans des populations de cellules mieux définies (lymphocyte T ou B, monocytes, etc...) ont permis d'identifier de nouvelles voies biologiques importantes au cours du LED. Ainsi, une analyse transcriptomique sur des lymphocytes T triés à partir de PBMCs de patients lupiques a permis de mettre en évidence un pattern d'expression particulier des lymphocytes T comprenant des gènes importants dans le homing et la survie des lymphocytes T (*CXCR6*, *BNIP3L*, *CFLAR*) (Lyons et al. 2010). Enfin une étude transcriptomique sur des lymphocytes B triés issus de patients atteints de LED présentant des degrés de sévérité de la maladie très différents a été réalisé en 2006. Dans cette étude les auteurs décrivent 8 nouveaux gènes potentiellement impliqués dans la pathologie lupique (Trevisan et al. 2006).

En conclusion, les deux principaux défauts des analyses transcriptomiques réalisées chez les patients lupiques sont : 1/ l'hétérogénéité en terme de sévérité et d'évolutivité des patients choisis dans ces études ; 2/ l'utilisation de PBMCs qui constitue une population très hétérogène, ne comprenant que 1 à 10% de lymphocytes B.

Ainsi, une seule a été réalisée sur des lymphocytes B triés, justifiant ainsi l'analyse transcriptomique réalisée par notre laboratoire, et dont nous reparlerons dans la partie « résultats ».

B) Les modèles murins de LED

L'étude des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement du LED a été rendue possible grâce à l'existence de modèles murins développant des manifestations cliniques proches de celles observées chez les patients lupiques. Ces modèles murins ont permis de mettre en évidence l'importance de certaines voies biologiques dans l'établissement d'une autoimmunité. Il existe plusieurs modèles murins de LED qui peuvent être spontanés ou induits et permettent de reproduire certains traits phénotypiques de la pathologie humaine. Ces modèles possèdent chacun leurs propres spécificités telles que des traits phénotypiques, des anomalies immunitaires et des facteurs génétiques et hormonaux particuliers. Ils illustrent également la diversité des facteurs qui participent à l'apparition, l'expression clinique et l'hétérogénéité de la maladie lupique (pour revue (Theofilopoulos & Dixon 1985)).

1) Les modèles spontanés

a) Le modèle (NZBxNZW) F1

Le modèle (NZBxNZW) F1 (ou BW) est un des modèles murins de LED les plus étudiés. Il est issu du croisement de deux lignées parentales appelées NZB (New Zealand Black) et NZW (New Zealand White).

La lignée NZB présente une prolifération anormale des cellules B et une augmentation de la production d'IgM. Les signes d'autoimmunité sont représentés par une anémie hémolytique responsable de la mort prématurée de l'animal, et par la présence d'anticorps anti-thymocytes et anti-ADN dont le taux est corrélé à la survenue tardive d'une glomérulonéphrite vers l'âge de 18 à 20 mois.

La souris NZW présente peu d'anomalies du système immunitaire, limitées à quelques dépôts glomérulaires d'immunoglobulines et à la production tardive d'autoanticorps de type anti-nucléaires. Cependant, sa contribution génétique à la maladie lupique développée par les souris hybrides de première génération (NZB x NZW) F1 (ou BW) est très importante.

Ces souris BW constituent le modèle le plus proche de la maladie humaine. La maladie apparaît plus précocement et est plus sévère chez les femelles. Ces animaux développent des autoanticorps de type anti-nucléaires, anti-ADN, anti-ARN, anti-histones et anti-ribonucléoprotéines, responsables de la formation de complexes immuns se fixant au niveau rénal. Ces dépôts vont par la suite provoquer le développement d'une glomérulonéphrite sévère, apparaissant vers l'âge de 5-6 mois, et responsable de la mort de l'animal vers l'âge de 10-12 mois.

En 1994, Morel et al. ont réalisé la première étude d'association génétique chez une lignée de souris très proche de la souris BW (plus précisément le modèle NZM2410 qui est un croisement accidentel d'une souris BW avec une souris NZW, et présente le même type de pathologie que la souris BW), permettant ainsi l'identification de trois loci de susceptibilité étant significativement corrélés à l'apparition de certains traits phénotypiques de la maladie : les loci *Sle1*, *Sle2* et *Sle3* (L Morel et al. 1994). Outre les loci de susceptibilité, les auteurs ont également mis en évidence l'existence de loci de résistance à la maladie, le plus important étant le locus *Sle1s*. Ces résultats sont en cohérence avec les résultats obtenus au cours des études effectuées chez l'homme, qui montrent que c'est l'additivité de plusieurs loci de susceptibilité et de résistance présents dans le génome d'un individu qui va dicter l'apparition d'un LED. Comme évoqué précédemment, l'étude de ces trois loci transférés isolément sur un fond génétique de type C57BL/6 a permis de montrer que les loci *Sle1*, *Sle2* et *Sle3* contribuent à l'apparition de différents traits de phénotype chez la souris NZW2410. Ainsi le locus *Sle1* est responsable de la rupture de tolérance vis à vis des antigènes nucléaires, permettant la prolifération de lymphocytes B et T autoréactifs et aboutissant à la production d'autoanticorps anti-nucléaires (Mohan et al. 1998). Le locus *Sle2* serait quant à lui plutôt impliqué dans l'hyperactivation des lymphocytes B et l'augmentation du nombre de cellules B-1 (Mohan et al. 1997). Enfin le locus *Sle3* jouerait un rôle dans la baisse de l'AICD (activation induced cell death) des lymphocytes T CD4⁺ (Figure 21 page 74) (Mohan et al. 1999). En poursuivant cette approche congénique, Morel et al. sont ensuite parvenus à subdiviser les loci *Sle1*, *Sle2* et *Sle3* en de multiples sous-loci permettant d'affiner les résultats obtenus et ainsi réduire le nombre de gènes contenus dans chaque loci (Tableau 9 page 75, Tableau 10 page 76 et Figure 22 page 74) (pour revue (Laurence Morel 2010)).

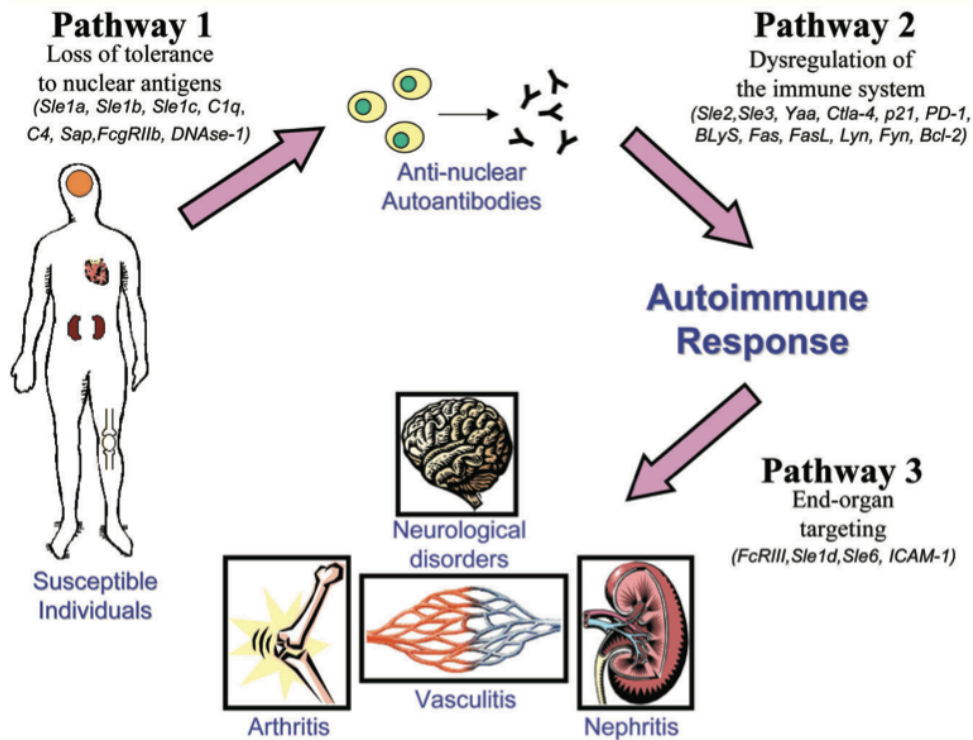


Figure 21 : Modèle décrivant les trois étapes impliquées dans la pathogénie du lupus, ainsi que les gènes/loci de susceptibilité associées à ces étapes. D'après (Nguyen et al. 2002).

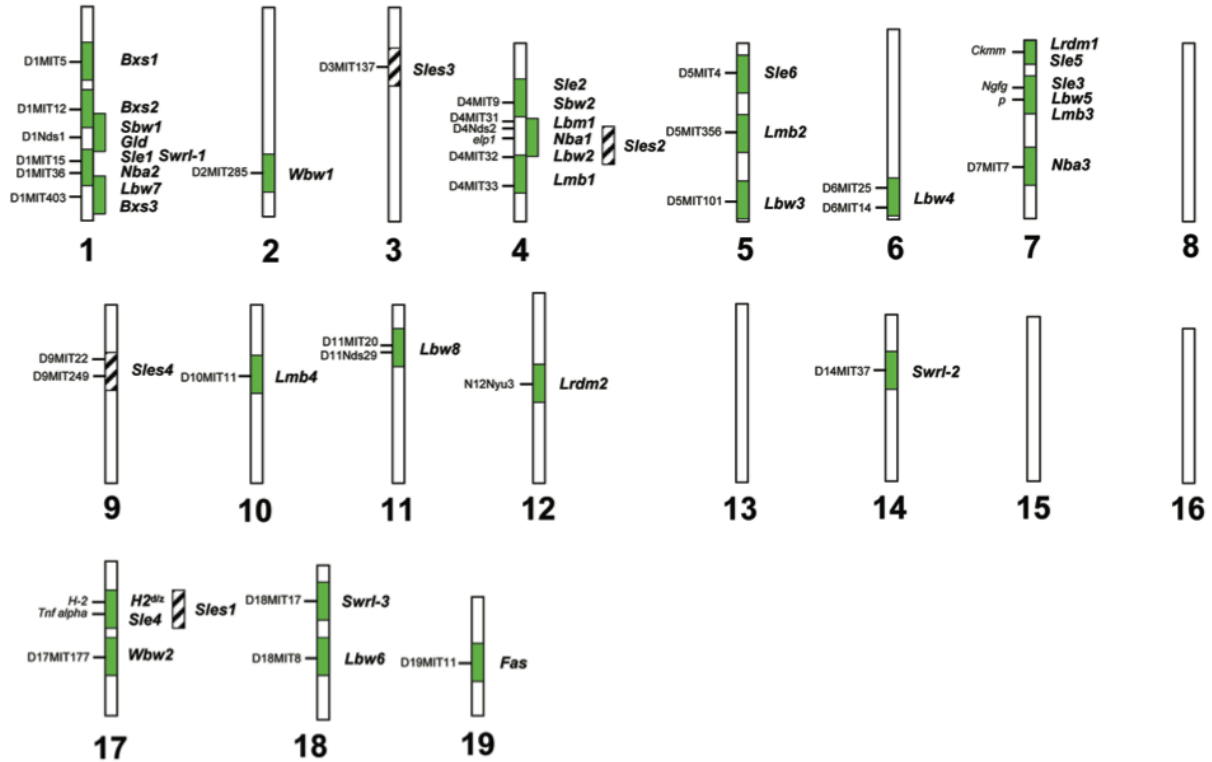


Figure 22 : Distribution génomique des loci de susceptibilités (en vert) identifiés par des études de liaison chez la souris. D'après (Nguyen et al. 2002).

Tableau 9: Loci et sous-loci identifiés sur les chromosomes 1 à 4 grâce à l’approche congénique de Morel et al.
(QTL) Quantitative trait locus.
D’après (Laurence Morel 2010).

QTL	Chromosome (congenic interval) ²	Susceptible strain	Congenic strain	Major autoimmune phenotype	Candidate gene ⁵
Bxs4	1 (0–40 Mb)	BXSB	B10.Yaa.Bxs1/4	Increased autoantibody spectrum and titer	Unknown
Bxs1	1 (40–90 Mb)	BXSB	B10.Yaa.Bxs1/4	Glomerulonephritis	Unknown
Bxs2	1 (90–160 Mb)	BXSB	B10.Yaa.Bxs1/2 B10.Yaa.Bxs2/3	Increased titers of anti-dsDNA IgG	Marco
Bxs3	1 (160–200 Mb)	BXSB	B10.Yaa.Bxs2/3	Increased autoantibody titer; glomerulonephritis	Unknown
Unnamed	1 (60–192 Mb)	NZB	B6.NZBc1	Autoantibodies; B-cell activation; glomerulonephritis	Unknown
Sle1	1 (154–197 Mb)	NZM2410 (NZW)	B6.Sle1	Anti-chromatin IgG; B-cell and T-cell activation	Unknown
Sle1a.1, Sle1a.2	1 (170 Mb) 1 (171–173 Mb)	NZM2410 (NZW)	B6.Sle1a.1 B6.Sle1a.2	Anti-chromatin IgG; activated autoreactive CD4 ⁺ T cells	Unknown
Unnamed	1 (173 Mb)	NZM2410 (NZW)	B6.Sle1(111–148)	Abnormal germinal center formation	Fcgr2b
Sle1b	1 (173–174 Mb)	NZM2410 (NZW)	B6.Sle1b	Anti-chromatin IgG; defect in B-cell tolerance	Slamf1 Slamf2 Slamf5 Slamf6
Sle1d	1 (175–188 Mb)	NZM2410 (NZW)	(B6.Sle1[113–407] x NZW)F1	Glomerulonephritis severity	Unknown
Sle1c1, Sle1c2	1(194–197 Mb) 1(190–193 Mb)	NZM2410 (NZW)	B6.Sle1c	Anti-chromatin IgG; defect in B-cell tolerance; activated autoreactive CD4 ⁺ T cells	Cr2
FCgzn1	1 (82–112 cM)	NZM2328 (NZW)	NZM.C57Lc1	Reduced glomerulonephritis	Unknown
Sle16	1 (170–180 Mb)	129	B6.129-Sle16	ANA; defect in B-cell tolerance	Unknown
Nba2	1 (90–98 cM)	NZB	B6.Nba2 B6.Nba2.Yaa	Type I IFN-dependent ANA; altered antibody responses; persistence of plasma cells; monocytosis	Ifi202 Fcgr2b Fcgr2b
Mag	1 (82–100 cM)	MRL/MpJ	B6.MRLc1(82–100)	Anti-dsDNA IgG antibodies; immune-complex-mediated glomerulonephritis	Unknown
Sle18	3 (39–129 Mb)	B6	129.B6-Sle18	Autoantibodies; activated T cells; glomerulonephritis	Unknown
Adnz1	4 (25–147 Mb)	NZM2328 (NZW)	NZM.C57Lc4	Glomerulonephritis	Unknown
Sle2	4 (50–129 Mb)	NZM2410 (NZW/NZB)	B6.Sle2	Lower threshold of B cell activation; increased numbers of B1a cells; polyclonal IgM autoantibodies; defect in B-cell tolerance	Unknown
Sle2a	4 (50–80 Mb)	NZM2410 (NZW)	B6.Sle2a B6.Sle1.Sle3.Sle2a	Increased numbers of B1a cells, Increased glomerulonephritis	Unknown
Sle2b	4 (91–100 Mb)	NZM2410 (NZW)	B6.Sle2b B6.Sle1.Sle3.Sle2b	Increased numbers of B1a cells, Increased glomerulonephritis; decreased IFN- α production	Ifna
Sle2c	4 (104–117 Mb)	NZM2410 (NZB)	B6.Sle2c1	Increased numbers of B1a cells	Unknown
Unnamed	4 (30–150 Mb)	NZB	B6.NZBc4L	Increased numbers of B1a and natural killer T cells	Unknown
Lbw2	4 (129–134 Mb)	NZB	BWF1.NZW-Lbw2	B-cell activation	Unknown

Tableau 10 : Loci et sous-loci identifiés sur les chromosomes 5 à 19 grâce à l’approche congénique de Morel et al.
 (QTL) Quantitative trait locus.
 D’après (Laurence Morel 2010).

QTL	Chromosome (congenic interval) [†]	Susceptible strain	Congenic strain	Major autoimmune phenotype	Candidate gene [§]
<i>Sle5</i>	7 (4–20 Mb)	NZM2410 (NZW)	B6. <i>Sle1Sle5</i>	Severe lupus when <i>Sle5</i> and <i>Sle1</i> are co-expressed	Unknown
<i>Sle3.1</i>	7 (50.7–124 Mb)	NZM2410 (NZW)	B6. <i>Sle3</i> B6. <i>Sle1Sle3</i>	Severe lupus when <i>Sle3</i> and <i>Sle1</i> are coexpressed activated B cells and T cells; accelerated renal pathology when <i>Sle3</i> alone expressed	<i>Klk</i>
<i>Sle3.2</i>	7 (53.5–124 Mb)	NZM2410 (NZW)	B6. <i>Sle3</i> (158-40) B6. <i>Sle1Sle3</i> (158-40)	Severe lupus when combined with <i>Sle1</i> ; activated T cells	Unknown
<i>Nba5</i>	7 (4–27 cM)	NZB	B6.NZB- <i>Nba5</i> <i>Yaa</i>	Increased anti-gp70 antibody production and glomerulonephritis	Unknown
<i>Lmb3</i>	7 (3–65 Mb)	MRL	B7.MRL.c7 <i>Fas</i> ^{lpr}	Enhanced <i>Fas</i> -deficiency mediated autoimmunity	Unknown
<i>Lmb3</i>	7 (16–94 Mb)	B6- <i>Fas</i> ^{lpr} / <i>Scr</i>	MRL.B6- <i>Lmb3</i> <i>Fas</i> ^{lpr}	T-cell proliferation, apoptosis and activation	<i>Coro1a</i>
<i>Ssb2</i>	12 (15–26 Mb)	BALB/c	B6. <i>FcyR2B</i> ^{-/-} - <i>ssb2</i> ^{ss}	Suppressed production of <i>Fcgr2b</i> -induced pathogenic autoantibodies	Unknown
<i>Spg3</i>	13 (60–72 Mb)	NZW NZB BXSb	B6.NZW- <i>Sgp3</i> /2 B6.NZW- <i>Sgp3</i> /2 <i>Yaa</i> B6.NZB- <i>Sgp3</i> B10.BXSb- <i>Sgp3</i>	Gp70–anti-gp70 antibodies; autoantibodies, enhanced <i>Yaa</i> -induced autoimmunity, abnormal RNA retrovirus expression, TLR7-dependent anti-gp70 antibodies	Unknown
Unnamed	13 (38–120 Mb)	NZB	B6.NZBc13	Autoantibodies, B-cell activation, glomerulonephritis	Unknown
<i>Sles1</i>	17 (34–35 Mb)	NZW, 129	B6. <i>Sle1Sles1</i> <i>Rec.6</i>	Suppressed <i>Sle1</i> phenotypes	Unknown

Bien que tous les gènes de susceptibilité présents dans ces loci ne soient pas encore identifiés, certains polymorphismes sont actuellement en cours de validation dans différentes études effectuées chez la souris. De plus, certains de ces variants ont été associés à la maladie humaine, permettant de valider l’implication de certains gènes dans la maladie et d’augmenter le poids des découvertes réalisées chez la souris. Ainsi un allèle particulier du gène *FcγRIIb*, un régulateur négatif de la voie d’activation du lymphocyte B, contribue au phénotype autoimmun observé chez la souris NZM2410 (Rahman et al. 2007) : ce gène a par la suite été associé au LED humain dans plusieurs études (Y. H. Lee, Ji, et al. 2009b).

b) Le modèle MRL/*lpr*

La lignée MRL-*lpr/lpr* est une lignée présentant un fond génétique complexe. La maladie est identique chez les mâles et les femelles, plus sévère que chez la souris BW femelle et est caractérisée par une forte production d'autoanticorps de type anti-nucléaire, anti-ADNsb, anti-ADNdb et anti-Sm. Ces souris développent un syndrome lymphoprolifératif, responsable de lymphadénopathies dû essentiellement à l'accumulation de lymphocytes T double-négatifs (CD4⁻CD8⁻B220⁺), d'une splénomégalie, de vascularite et d'arthrite. La raison de l'apparition d'un tel phénotype est la présence d'une mutation dans le gène Fas (appelée *lpr*) responsable d'un défaut de transcription de l'ARNm codant pour le récepteur Fas, sur un fond génétique particulier, le fond MRL (voir ci-dessous).

Le récepteur Fas fait partie de la famille des TNF-R (tumor necrosis factor receptor) et induit une apoptose après liaison de son ligand FasL. Le défaut de transcription du gène Fas du à la mutation *lpr* est le résultat d'une insertion d'un retrotransposon (ETn) introduisant un site d'épissage alternatif, donnant lieu à la production d'un transcrit instable. Il est aujourd'hui bien décrit que le phénotype de la souris MRL/*lpr* est bien dû à un défaut de la voie du récepteur Fas. En effet, il a été confirmé que les lymphocytes B et T ayant un récepteur Fas non-fonctionnel ont bien un défaut d'apoptose (Reap et al. 1995) ; d'autre part une mutation (appelée *gld* pour generalized lymphoproliferative disease) du gène *FASL*, codant pour le ligand du récepteur Fas, déclenche chez la souris MRL une MAI similaire à celle observée chez la souris MRL/*lpr* (Takahashi et al. 1994; Lynch et al. 1994). Chez l'homme une dérégulation de la voie de signalisation de Fas engendre un syndrome lymphoprolifératif autoimmun (ALPS pour autoimmune lymphoproliferative syndrome) qui comporte des similarités avec le LED (Teachey et al. 2010).

L'effet du fond génétique MRL n'est pas négligeable dans l'apparition du syndrome lupique chez la souris MRL/*lpr*, puisque la mutation *lpr*, lorsqu'elle est portée sur d'autres fonds génétiques tels que C3H/HeJ ou C57BL/6J, ne permet pas le développement d'une glomérulonéphrite (Izui et al. 1984). De plus les souris MRL ne portant pas la mutation *lpr* développent également une néphrite, bien que l'apparition de la maladie soit considérablement retardée. Les études sur les bases génétiques du phénotype lupique observé chez la souris MRL/*lpr* sont nettement moins avancées que pour la souris BW. Cependant, des études d'associations génétiques sur des souris (MRL-*lpr* x C57BL/6-*lpr*)F2 ont permis l'identification de 4 loci de susceptibilité liés à la production d'autoanticorps anti-ADNdb et à la glomérulonéphrite : les loci *Lmb1*, *Lmb2*, *Lmb3* et *Lmb4* (Vidal et al. 1998). Le locus

Lmb3 en particulier, a montré une forte association avec la lymphoprolifération, et plus précisément avec la prolifération des lymphocytes T (Santiago-Raber et al. 2007). En 2008, Haraldsson et al. ont montré qu'une mutation dans le gène codant pour la Coronin-1A (situé dans le locus *Lmb3*) permet de réduire considérablement le phénotype lupique de la souris MRL/*lpr* grâce à une diminution de l'activation et une augmentation de l'apoptose des lymphocytes T (Haraldsson et al. 2008). Une étude plus approfondie du fond génétique MRL permettra à l'avenir d'identifier de nouveaux gènes de susceptibilité pour l'apparition de l'autoimmunité chez la souris MRL/*lpr*.

c) *Le modèle BXSB*

Dans la lignée BXSB, le syndrome lupique s'observe chez pratiquement 100% des animaux. Chez le mâle, la maladie est plus sévère et apparaît plus précocement que chez la femelle. Les manifestations autoimmunes sont dominées par la production d'anticorps anti-ADN de classe IgG2a et IgG2b, une hypocomplémentémie et la production de complexes immuns responsables d'une glomérulonéphrite sévère, responsable de la mort de l'animal à l'âge de 5-6 mois (14-15 mois chez la femelle).

La prévalence et la sévérité de la maladie chez le mâle laisse supposer l'existence d'un loci de susceptibilité au niveau du chromosome Y ou l'implication de facteurs hormonaux. Or l'orchiectomie chez le mâle ainsi que l'ovariéctomie chez la femelle n'affectent en rien l'apparition de la maladie, ce qui rend peu probable l'hypothèse d'un rôle des hormones sexuelles dans la maladie chez ces souris. Par contre, le chromosome Y des souris BXSB accélère et exacerbe la maladie chez les souris ayant un fond génétique de type NZW ou MRL. On sait aujourd'hui que le phénotype observé chez le mâle BXSB est lié à un segment génomique porté par le chromosome Y appelé *Yaa* (pour Y-linked autoimmune accelerator). *Yaa* est due à une translocation d'une partie télomérique du chromosome X sur le chromosome Y. Cette région chromosomique contient au moins 16 gènes qui sont surexprimés d'environ un facteur 2 chez la souris BXSB (Pisitkun et al. 2006; Subramanian et al. 2006). Parmi ces gènes on peut citer le gène codant pour le récepteur TLR7 (Toll-like receptor 7), qui pourrait être à l'origine de l'accélération et l'exacerbation de la maladie chez la souris BXSB mâle en donnant un second signal d'activation aux lymphocytes B. Il a été montré que la délétion du gène *Tlr7* endogène (sur le chromosome X) permet de réduire l'activation des lymphocytes B, la splénomégalie, la glomérulonéphrite et d'augmenter la

survie des souris BXSB (Deane et al. 2007). De plus certaines études réalisées chez des patients lupiques ont montré une association de certains polymorphismes permettant une surexpression du gène *TLR7*, avec la maladie (Shen et al. 2010).

Bien que, comme nous venons de le voir, le phénotype lupique observé chez la souris BXSB soit largement dû au segment de gènes *Yaa*, le fond génétique BXSB joue également un rôle dans la maladie. Ceci est illustré par le fait que le transfert du chromosome Y (de la souche BXSB) sur un fond génétique C57BL6/J ou CBA ne permet pas le développement d'un LED chez ces souris (Hudgins et al. 1985). Les études de liaison génétique réalisées sur les souris BXSB a permis l'identification de loci de susceptibilité pour certains traits de phénotype observés chez la souris BXSB. Ces loci se trouvent sur les chromosomes 1, 3 et 13, sont nommés *Bxs1* à *6* et sont tous dérivés de la lignée parentale SB/Le, sauf *Bxs5*. La région *Bxs3* semble être la plus fortement associée à la maladie. De façon intéressante les régions *Sle1* décrites dans le modèle BW et *Bxs3* se chevauchent, laissant supposer une importance accrue de cette région dans la susceptibilité au LED. Parmi les 4 loci de susceptibilité situés au niveau du chromosome 1, seul *Bxs2* contient un gène candidat potentiel : le gène *Marco* (macrophage receptor with collagenous structure). Les souris congéniques portant le loci *Bxs2* présentent une diminution de l'ARNm et de la protéine Marco, conduisant à un déficit d'élimination des corps apoptotiques, un des facteurs initiateurs d'autoimmunité (Muñoz et al. 2010).

2) Les modèles induits de LED

Contrairement aux modèles décrits plus haut, dans lesquels les facteurs génétiques jouent un rôle primordial, les modèles induits de LED développent la maladie après une exposition à certains agents chimiques.

a) Le LED induit par le pristane

L'injection de pristane (ou 2,6,10,14 tétraméthylpentadécane ou TMPD), une molécule retrouvée dans l'huile minérale, à des souris Balb/c, va générer la production d'autoanticorps caractéristiques du LED tels que des autoanticorps anti-RNP (ribonucléoprotéine), anti-ADN, anti-histones, et ceci à des taux comparables à ceux trouvés chez la souris MRL/lpr (Satoh & Reeves 1994). Ces souris développent également une

néphrite liée au dépôt de complexes immuns au niveau rénal. La susceptibilité au pristane est retrouvée dans d'autres lignées de souris ayant un fond génétique différent. Cependant la maladie est nettement réduite (Sato et al. 2000). D'autre part, à l'instar de la maladie humaine et de celle des souris BW, les femelles sont plus affectées par le traitement au pristane que les mâles (Smith et al. 2007).

Les cytokines IL-6, IL-12 et l'interféron de type I jouent un rôle important dans la maladie induite par le pristane : ainsi, les souris *Il-6* KO présentent une diminution notable de la production d'anticorps anti-ANDdb, anti-ADNsb et anti-chromatine (Richards et al. 1998), alors que le KO du gène *Il-12* empêche la production d'IgG anti-RNP et le développement de la néphrite lupique (Calvani et al. 2003). L'administration de pristane induit la production d'IFN de type I selon un mécanisme dépendant de TLR7 et de MyD88 (P. Y. Lee et al. 2008). Ceci est illustré par le fait qu'une déficience en *Tlr7* empêche la production d'IFN de type I, bloque totalement la production d'autoanticorps et le développement de la néphrite chez les souris traitées au pristane (P. Y. Lee et al. 2008).

b) Le LED induit par le mercure

Un phénotype lupique peut également survenir chez la souris par injection sous-cutanée de mercure (Hg), par ingestion de chlorure de mercure (HgCl₂), ou par inhalation de vapeurs de mercure. L'exposition au mercure a des conséquences variables en fonction du fond génétique de la souris, allant d'une absence totale de réponse à l'apparition d'une maladie sévère caractérisée par une lymphadénopathie, une hypergammaglobulinémie, une production d'autoanticorps et une glomérulonéphrite médiée par le dépôt de complexes immuns (POLLARD et al. 2005).

Les mécanismes responsables du phénotype lupique après une exposition au mercure sont très peu connus, cependant il est suspecté que le mercure pourrait induire une forte mort cellulaire suivi par le clivage de certains autoantigènes (Pollard et al. 2000). La phagocytose de ces autoantigènes par les CPA (macrophage, cellules dendritiques) pourrait ensuite provoquer l'activation des lymphocytes T CD4⁺ ainsi que d'autres cellules comme les cellules NK (natural killer), provoquant une réponse immunitaire contre des composants du soi (Pollard & Landberg 2001).

3) Les souris génétiquement modifiées développant un phénotype lupique

Un certain nombre de souris transgéniques, KO, knock in (KI) ou possédant une mutation dans un gène, développent un phénotype de type lupique. Dans le [tableau 5 \(page 83\)](#) sont consignées toutes les souris présentant une déficience ou une surexpression d'un seul gène qui provoque l'apparition de manifestations autoimmunes ressemblant à celle observées au cours du LED. Les gènes y sont regroupés en fonction de leurs implications dans certains des mécanismes pouvant conduire à une autoimmunité, à savoir: 1/ l'hyperactivation des lymphocytes B, 2/ l'hyperactivation des lymphocytes T, 3/ un défaut d'apoptose, 4/ une augmentation de la présentation antigénique, 5/ l'établissement d'un profil cytokinique pro-autoimmun, et 6/ un défaut de clairance des corps apoptotiques.

Parmi les gènes induisant une augmentation de l'activation des lymphocytes B on trouve *CD45*, *CD19*, *Aiolos*, *PKCδ*, *Tnfrsf3*, *Act1* et *Siae*. On retrouve également des gènes codant pour des protéines appartenant aux voies régulatrices du lymphocyte B tels que *CD22*, *Lyn*, *SHP-1*, *FcγRIIb* et *SHIP*, dont nous avons parlé plus en détail dans la partie "Le rôle central du lymphocyte B" ([page 30](#)). D'autres gènes comme *BAFF*, *TACI*, *CD40L* et *Mitf* sont importants dans le maintien de l'homéostasie des lymphocytes B. Enfin, les mécanismes par lesquels la surexpression de *Fli-1* et le KO de *PECAM-1* engendrent une hyperactivation des lymphocytes B ne sont aujourd'hui pas déterminés.

Les gènes *CTLA-4*, *PD-1*, *Mgat5*, *Roquin*, *Gadd45a* à γ , *E2F*, *TGFβ1*, *LAT*, *Pcmt1*, *G2A*, *Cbl-b*, *p21* et *LIGHT* sont impliqués dans une hyperactivation des lymphocytes T.

L'altération des mécanismes d'apoptose de la cellule est également un des mécanismes contribuant à l'apparition d'un LED. De ce fait, les souris KO pour les gènes *Bim*, *IL-2* et son récepteur, *Ras GRP1*, *TSA δ* , *Stra13*, ou transgéniques pour les gènes *Bcl-2* ou *IEX-1*, développent certains traits de phénotypes caractéristiques du LED.

Les gènes associés à un défaut de clairance des corps apoptotiques sont *C1q*, *C4*, la famille des gènes *Tyro 3* (*Merk*, *Tyro3*, *Ax1*), *DNase 1* et *Ro*. Une déficience en l'un de ces gènes va avoir pour conséquence d'augmenter la quantité d'autoantigènes potentiels chez la souris.

Les mécanismes impliqués dans l'apparition d'un phénotype lupique chez les souris *Nfe2l2*, *Man2a1* ou *Mark2* déficientes ne sont à ce jour toujours pas connus.

En conclusion, un phénotype lupique peut être obtenu chez la souris par une altération unique dans la séquence d'une multitude de gènes. Nombre de ces défauts mènent à une

défaillance dans les voies biologiques qui régulent l'homéostasie, l'activation et l'apoptose des lymphocytes T et B ; ceci est compatible avec les différentes hypothèses relatives à la physiopathologie de la maladie lupique.

Tableau 5 : Les souris génétiquement modifiées développant des manifestations lupiques.

Nom	Nom du gène	Modèle	Chr.	Manifestations autoimmunes	Références
Hyperactivation des lymphocytes B					
CD45	<i>Ptprc</i>	KI	1	Lymphoprolifération, AcADNdb, splénomégalie, GN	(Majeti et al. 2000)
FcγRIIb	<i>FcγRIIb</i>	KO	1	GN tardives ur fond C57BL/6 Aggravation du LED	(Yajima et al. 2003)
Lyn	<i>Lyn</i>	KO	4	Splénomégalie, hyperIgM, AutoAc, GN	(Hibbs et al. 1995; Nishimura et al. 1999)
Mitf	<i>Mitf</i>	KO transfert souris Rag ^{-/-}	6	KO : Baisse du nombre de LB ; transfert chez Rag ^{-/-} : pas de baisse des LB, mais hyperIgM, AcADNsb et FR	(Lin et al. 2004)
CD22	<i>Cd22</i>	KO	7	AutoAc	(O'Keefe et al. 1996; O'Keefe et al. 1999)
CD19	<i>Cd19</i>	Tg	7	Augmentation du nombre de B1, hyperIgG, autoAc	(Tedder et al. 1997)
BAFF, BLyS	<i>Tnfsf13b</i>	Tg	8	AutoAc, GN	(Khare et al. 2000; Mackay et al. 1999)
A20	<i>Tnfaip3</i>	KO spé LB	10	AutoAc, dépôts Ig rénale après injection de CpG, splénomégalie, GN	(Tavares et al. 2010; Chu et al. 2011)
SHIP	<i>Inpp5d</i>	KO	1	Splénomégalie, augmentation LB matures, augmentation du taux sérique IgM/G2a/G2b/G3/A	(Q. Liu et al. 1998; Helgason et al. 2000)
SHP-1	<i>Ptpn6</i>	Mutation <i>motheaten</i> KO spé LB	6	Augmentation du nombre de B1, hyperactivation LB KO Spé B : AcADN, GN	(Shultz 1988; Pao et al. 2007) (Shultz 1998)
Act1	<i>Act-1</i>	KO	5	ANA, splénomégalie, lymphadénopathie, GN	(Qian et al. 2004; Qian et al. 2008)

Nom	Nom du gène	Modèle	Chr.	Manifestations autoimmunes	Références
9-O-acetyl sialic acid esterase	<i>Siae</i>	KO	9	ANA, GN	(A Cariappa et al. 2009)
Fli-1	<i>Fli1</i>	Tg	9	Hyperplasie lymphoïde, AutoAc, GN	(L. Zhang et al. 1995)
TACI	<i>Taci</i>	KO	11	Lymphoprolifération fatale, AutoAc, GN	(Seshasayee et al. 2003)
Aiolos	<i>Aiolos</i>	KO	11	HyperIgG, AutoAc	(J. H. Wang et al. 1998)
PECAM-1, CD31	<i>Pecam1</i>	KO	11	ANA, GN tardive	(Wilkinson et al. 2002)
Protein kinase C δ	<i>Prkcd</i>	KO	14	Splénomégalie, lymphadénopathie, hyperIgM/G1/G2a, AcADNdb, GN	(Mecklenbräuer et al. 2002)
Hyperactivation des lymphocytes T					
CTLA-4	<i>Cd152</i>	KO	1	Infiltration lymphocytaire, myocardite, pancréatite	(Tivol et al. 1995; Tivol et al. 1997; Waterhouse et al. 1995)
PD-1	<i>Pdcd1</i>	KO	1	Arthrite proliférative, GN, dépôt d'IgG3	(Nishimura et al. 1999)
Mannoside acetyl glucosaminyltransferase 5	<i>Mgat5</i>	KO	1	GN proliférative	(Demetriou et al. 2001)
Roquin	<i>Rc3h1</i>	Mutation M199R	1	AutoAcs, augmentation des T _{FH} et du nombre de GCs	(Vinuesa et al. 2005)
Gadd45 α	<i>Gadd45a</i>	KO	3	AutoAc, GN, mortalité précoce	(Salvador et al. 2002)
E2F2	<i>E2f2</i>	KO	4	Infiltrats lymphocytaires tardifs, GN, ANA	(Murga et al. 2001)
TGF β 1	<i>Tgfb1</i>	KO	7	Infiltration lymphocytaire	(Dang et al. 1995)
Linker for activation of T cell	<i>Lat</i>	KI	7	Lymphoprolifération	(Sommers et al. 2002)

Nom	Nom du gène	Modèle	Chr.	Manifestations autoimmunes	Références
Protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase 1	<i>Pcmt1</i>	KO	10	AcADNdb et GN	(Doyle et al. 2003)
Gadd45 β	<i>Gadd45b</i>	KO	10	Splénomégalie, dépôt d'Ig rénale, pas d'AutoAc; Gadd45 β /Gadd45 γ double KO : splénomégalie, AutoAc, GN	(L. Liu et al. 2005)
G2A	<i>Grp132</i>	KO	12	Hyperplasie lymphoïde hyperIgG, AutoAc, GN	(Le et al. 2001)
Gadd45 γ	<i>Gadd45</i> □	KO	13	Synergie avec Gadd45 β KO	(L. Liu et al. 2005)
Cbl-b	<i>Cbl-b</i>	KO	16	Infiltrat lymphocytaire, AcADNdb	(Bachmaier et al. 2000)
P21 ^{cip1/waf1}	<i>Cdkn1a</i>	KO	17	AcChromatin, GN préférentiellement chez les femelles	(Balomenos et al. 2000)
LIGHT	<i>Tnfrsf14</i>	Tg	17	Hyperplasie lymphoïde, AutoAc, GN, infiltrats lymphocytaires	(J. Wang et al. 2001)
Défaut d'apoptose					
Bcl-2	<i>Bcl-2</i>	Tg	1	Hyperplasie lymphoïde hyperIgG, AutoAc, GN	(A Strasser et al. 1991)
IL-2R α	<i>Il-2R</i> □	KO	2	Lymphoprolifération, hyperIgG, AutoAc, AcRBC	(Willerford et al. 1995)
Ras GRP1	<i>Rasgrp1</i>	Mutation	2	LT CD4 ⁺ AICD-résistante, lymphoprolifération, AutoAc	(Layer et al. 2003)
Bim	<i>Bcl2l11</i>	KO	2	Augmentation du compartiment lymphoïde et myéloïde, AutoAc, GN, vascularites	(P Bouillet et al. 1999)
IL-2	<i>Il2</i>	KO	3	Lymphoprolifération, hyperIgG, AutoAc, AcRBC	(Sadlack et al. 1995)

Nom	Nom du gène	Modèle	Chr.	Manifestations autoimmunes	Références
TSAd	<i>Sh2d2a</i>	KO	3	Baisse de l'apoptose des LT, hyperIgG, AutoAcs, GN	(Drappa et al. 2003)
Stra13	<i>Stra13</i>	KO	11	Hyperplasie lymphoïde, AutoAc, GN	(Sun et al. 2001)
IL-2R β	<i>Il2r</i> \square	KO	15	Lymphoprolifération, hyperIgG, AutoAc, AcRBC	(Suzuki et al. 1995)
IEX-1	<i>Ier3</i>	Tg	17	Lymphoprolifération, AutoAc, GN, lésions cutanées, arthrites	(Y. Zhang et al. 2002)
Pten	<i>Pten</i>	+/- et KO	19	Lymphadénopathie, AutoAc, GN, augmentation de la mortalité chez la femelle	(Di Cristofano et al. 1999)
Augmentation de la présentation antigénique					
CD154, CD40L	<i>Cd40lg</i>	Tg spé LB	X	AutoAc tardifs, GN	(Higuchi et al. 2002)
Environnement cytokinique pro-autoimmun					
30 repair exonuclease 1	<i>Trex1</i>	KO	9	Myocardite, infiltrats lymphocytaires	(Stetson et al. 2008; Morita et al. 2004)
Zfp-36 (tristetraprolin)	<i>Zfp36</i>	KO	7	Maladie systémique complexe : cachexie, dermatite, arthrite	(Carballo et al. 1998; Lai et al. 1999; G. A. Taylor et al. 1996)
IFN- γ	<i>Ifn</i> \square	Tg	10	AutoAc, GN préférentiellement chez les femelles	(Seery et al. 1997)
IL-4	<i>Il4</i>	Tg	11	HyperIgG1/E, AutoAc, GN	(Erb et al. 1997)
Défaut d'élimination des corps apoptotiques					
Ro, SS-A	<i>Trove2</i>	KO	1	AcRibosome, AcChromatine, GN	(Xue et al. 2003)

Nom	Nom du gène	Modèle	Chr.	Manifestations autoimmunes	Références
TYRO3	<i>Tyro3</i>	KO	2	Triple KO (Tyro3, Axl, Mertk): lymphoprolifération, hyperactivation LB et LT, AutoAc, GN	(Lu & Lemke 2001)
C-mer proto-oncogene tyrosine kinase	<i>Mertk</i>	KO	2	AutoAc (Mertk KO seul), (voir au-dessus TYRO3)	(Cohen et al. 2002)
C1q α	<i>C1qa</i>	KO	4	AutoAc, GN	(Botto et al. 1998; Walport et al. 1998)
Milk fat globule-EGF factor 8	<i>Mfge8</i>	KO	7	Splénomégalie, augmentation du nombre de GC, AutoAcs, GN	(Hanayama et al. 2004)
DNase1	<i>Dnase1</i>	KO	16	ANA, GN	(Napirei et al. 2000)
Complement component 4	<i>C4</i>	KO	17	ANA, GN préférentiellement chez les femelles	(Z. Chen et al. 2000)
Autres mécanismes					
Nrf2 (antioxydant)	<i>Nfe2l2</i>	KO	2	HyperIgG, AcADNdb, GN, splénomégalie	(Yoh et al. 2001)
α -mannosidase II	<i>Man2a1</i>	KO	17	HyperIgG, AutoAc, GN	(Chui et al. 2001)
Emk, Par-1	<i>Mark2</i>	KO	19	Retard de croissance, splénomégalie, infiltrats lymphocytaires, GN	(Hurov et al. 2001)

*Présentation du projet
de thèse*

Ces travaux de thèse font partie d'un projet plus large initié au laboratoire en 2005, qui vise à identifier des anomalies génétiques des lymphocytes B au cours du LED.

Comme nous l'avons évoqué précédemment (Partie « Introduction »), les lymphocytes B jouent un rôle central dans la pathogénie du LED, et des défauts génétiques responsables du développement de la maladie pourraient être intrinsèquement présents dans les lymphocytes B de patients lupiques. Dans le but d'identifier ces défauts, une analyse du transcriptome de lymphocytes B issus de patients lupiques quiescents en comparaison à des sujets sains a été réalisée au laboratoire. Le choix d'inclure dans l'étude uniquement des patients ayant un LED quiescent avait pour but d'éviter au mieux la sélection de gènes dont la dérégulation serait due à l'activation des lymphocytes B observée au cours des poussées et qui ne sont pas spécifiques de la maladie. Cette étude transcriptomique a permis d'établir une liste de gènes sous-exprimés ou sur-exprimés dans les lymphocytes B de patients lupiques. Les critères utilisés dans le choix des gènes à étudier sont de différentes natures, se basant sur la biologie de ces gènes (rôle connu ou potentiel dans les lymphocytes B, dans les mécanismes de tolérance ou dans l'autoimmunité) ou sur des arguments purement statistiques (faible FDR (« False Discovery Rate »), forte significativité statistique).

Ce projet de thèse propose d'explorer les effets de la dérégulation de l'expression de deux de ces gènes candidats (*Carabin* et *Sh3kbp1*) sur la fonction des LB et le développement d'une autoimmunité chez la souris, en utilisant une approche de génomique fonctionnelle. Ces deux gènes sont fortement conservés entre l'homme et la souris et ont été identifiés comme sous-exprimés dans les lymphocytes B des patients de la cohorte.

Dans le but d'étudier la conséquence de la sous-expression de ces gènes et leur fonction, nous avons mis en place plusieurs stratégies :

1/ nous avons dans un premier temps créé des constructions lentivirales permettant l'expression de shRNA spécifiques de l'ARNm du gène d'intérêt, que nous avons ensuite utilisées pour générer des lignées de cellules B (cellules murines A20) et des souris transgéniques lentivirales sous-exprimant les gènes d'intérêt.

2/ nous avons également généré des souris KO et KO conditionnelles pour *Carabin*, et obtenu récemment des souris KO pour *Sh3kbp1*, permettant d'évaluer l'effet d'une déficience totale du gène d'intérêt sur le phénotype des lymphocytes B et sur le développement éventuel de manifestations autoimmunes *in vivo*.

Les gènes que nous avons étudiés se nomment *Tbc1d10c* (ou *Carabin*) qui est sous-exprimé au cours du LED humain ($p=0,012$), et *Sh3kbp1* (ou *CIN85* ou *Ruk* ou *SETA*) qui est également sous-exprimé chez les patients lupiques ($p=0,007$).

Dans une première partie nous verrons les résultats de l'analyse transcriptomique de 17 patients atteints de LED quiescent comparés à 9 sujets sains. Nous décrirons ensuite les résultats obtenus relatifs à la fonction du gène *Tbc1d10c* puis dans une dernière partie nous verrons les données obtenues concernant la fonction de *Sh3kbp1*.

Matériels et méthodes

I. Analyse transcriptomique de lymphocytes B issus de patients atteints de lupus quiescent

Toutes les méthodes utilisées dans cette partie de l'étude sont exposées dans les rubriques "Matériels et Méthodes" de l'article 1.

II. Etude du gène *Carabin*

Certaines méthodes utilisées dans cette partie de l'étude sont exposées dans les rubriques "Matériels et Méthodes" de l'article 2.

A) Préparation d'ADNc de splénocytes totaux et de lymphocytes B spléniques de souris Balb/c et BW

1) Dissection de rate de souris Balb/c et BW

La rate de souris Balb/c et BW âgées de six mois est reprise dans du PBS (Phosphate Buffer Saline :137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM Na₂HPO₄7H₂O, 1,4mM KH₂PO₄) puis dilacérée à l'aide d'une seringue. Après comptage sur hématimètre de Neubauer, les splénocytes sont centrifugés 5' à 1500 rpm.

2) Préparation d'ARN de splénocytes totaux ou de lymphocytes B spléniques de souris Balb/c et BW

Le culot de splénocytes totaux ou de lymphocytes B spléniques triés de rate de souris Balb/c et BW est repris dans du TRIzol (Invitrogen) dans un rapport de 1ml de TRIzol pour

10.10⁶ cellules. Après un temps d'incubation de 15' permettant la dissociation complète des complexes nucléoprotéiques, 200µl de chloroforme sont ajoutés pour 5'. Le mélange est ensuite centrifugé 15' à 14000 rpm à 4°C ce qui forme deux phases : une phase aqueuse contenant l'ARN et une phase contenant le phénol-chloroforme. Après prélèvement de la phase aqueuse, l'ARN est précipité par ajout de 400µl d'isopropanol suivi d'un temps d'incubation de 10'. Après une centrifugation de 10' à 14000 rpm, le culot d'ARN est lavé avec de l'éthanol 75% puis repris dans 20 µl d'eau bidistillée. L'ARN est ensuite quantifié par mesure de la DO à 260nm.

3) Préparation d'ADNc

Pour la synthèse d'ADNc, 1 µg d'ARN a été ajouté à une solution contenant 2 µl de pdN6 (amorce consensus à 10µM (Pharmacia)) et 1 µl de dNTP à 10mM, qsp 10 µl H₂O bidistillée, puis mis à incuber pour 5' à 65°C suivi de 2' sur glace. Ensuite, 4 µl de FSB 5X (First Strand Buffer, Invitrogen), 2 µl de DTT 0,1M (Dithiothreitol, Cleland's reagent), 1µl de RNaseOut (40U) (Invitrogen) et 1µl de transcriptase inverse Superscript III (200U) (Invitrogen) ont été ajoutés. Le mélange est ensuite placé aux températures suivantes : 5' à 25°C, suivi de 50' à 42°C puis 15' à 70°C, dans l'appareil à PCR (Applied Biosystems).

B) Clonage du vecteur pTOPO-Tbc1d10c-V5

1) Amplification par PCR de la partie codante de *Tbc1d10c*

5 µl d'ADNc issu de splénocytes totaux ou de lymphocytes B triés de rate Balb/c ont été utilisés comme matrice pour les réactions de PCR. Le couple d'oligonucléotides LIP28 et LIP31 a été utilisé pour amplifier la phase codante de *Tbc1d10c* (Figure 25, page 139). Les séquences des oligonucléotides sont les suivantes :

LIP 28 → 5'-CACCATGGCCCAGGCCCTGGGAGAGGA-3' 5 (Sigma)

LIP 31 → 5'-GAATCGGGTGTCCAGGAAAGAGGCAGAGC-3' (Sigma)

5 µl de Tampon 5X (ClonTech), 2,5 µl de GC Melt 5M (ClonTech), 0,5 µl de chaque oligonucléotide à 10 µM, 1 µl de dNTP à 10mM (Invitrogen), 0,5 µl de TaqGC 50X (ClonTech) et H₂O bidistillée qsp 25 µl ont été mélangés et incubés dans l'appareil à PCR

(Applied Biosystems). Les conditions de PCR sont les suivantes : 94°C 5' ; puis 25 cycles de 90°C 30'', 63,4°C 30'', 72°C 2' ; enfin 72°C 7'.

2) Purification du fragment d'ADN d'intérêt

La réaction de PCR et un marqueur de taille (MBI Fermentas) sont déposés sur gel d'agarose LMG (Low Melting Gel (Invitrogen) coloré au Bromure d'Ethidium) à 1% dans du tampon TAE (0,04 M Tris base ; 0,002 M EDTA-Na₂), afin de séparer le fragment à cloner. Après migration, la bande de la bonne taille est découpée sous une lampe UV (Ultra-Violet longueur d'onde de 365nm) et l'ADN est purifié à l'aide d'un Kit (Quick Extraction Kit de Qiagen).

3) Ligation dans le vecteur pTOPO-V5

L'insert *Tbc1d10c* (fragment de 1332pb) est présent dans un rapport molaire de 0,5 / 1 fois par rapport au vecteur pTOPO-V5 (fragment de 6846pb) (vecteur : 20ng ; insert : 24ng). La réaction de ligation se fait pendant 10' à température ambiante en présence de 1 µl solution saline (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂) dans un volume de H₂O bidistillée qsp 10µL (pcDNA 3.1 Directional TOPO Expression Kit (Invitrogen))

4) Transformation de bactéries compétentes

La totalité de la ligation est ensuite ajoutée à 50 µl de bactéries compétentes TOP10 (Invitrogen). Après 30' d'incubation sur glace, un choc thermique est réalisé en plaçant les bactéries 90" à 42°C puis 2' sur glace. 800 µl de S.O.C. (2% Tryptone, 0,5% de Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂, 20mM Glucose) sont ajoutés, puis le mélange est mis à incuber 45' à 37°C. Les bactéries sont ensuite étalées sur une boîte de pétri contenant de l'agar, et de l'ampicilline à 10mg/ml (Euromedex) et incubées toute la nuit à 37°C.

5) Criblage de colonies positives

Les colonies obtenues après transformation de bactéries compétentes, sont criblées pour vérifier la présence du vecteur pTOPO-Tbc1d10c-V5. Les colonies sont dans un premier temps repiquées dans 100 µl d'H₂O bidistillée, puis une réaction de PCR est réalisée en utilisant les oligonucléotides T7 (5'-taatacgaactactataggg-3') (Sigma) et LIP 34 (5'-GCTACAGGTCCCTGAGCCT-3') (Sigma). 20 µl de bactéries sont lysées (5' à 80°C), puis 10 µl de mélange de PCR sont ajoutés (mélange de PCR : 0,5 µl de chaque oligonucléotide (Ci : 10 µM), 0,6 µl de dNTP à 10mM (Invitrogen), 6 µl de tampon 5X, 2,4 µl de MgCl₂ (Ci : 2,5 mM), 0,2 µl de GoTaq (Ci : 5U/µl) (Promega)). Les conditions de PCR sont les suivantes : 94°C 5' ; puis 35 cycles à 94°C 30", 55°C 30", 72°C 40" ; enfin 72°C 10' (appareil à PCR Applied Biosystems). Pour les colonies possédant l'insert la taille attendue est de 621pb ; si l'insert n'est pas présent aucune amplification n'est possible.

6) Séquençage

Après production du vecteur par mini-préparation d'ADN plasmidique, celui-ci a été séquençé en mélangeant : 1 µl de vecteur (2µg), 2 µl de BigDye Terminator v3.1 Cycle (Applied Biosystems) et 1 µl d'oligonucléotide T7 (5'-taatacgaactactataggg-3') à 10 µM (Sigma) ou BGH (5'-cctcgactgtgccttct-3') à 10 µM (Sigma), ou des oligonucléotides s'hybridant tout le long de la séquence d'intérêt, qsp 10 µl H₂O bidistillée. Les réactions de séquence sont ensuite placées dans le séquenceur (ABI Prism 3100 Genetic Analyser). Les séquences obtenues sont analysées à l'aide du logiciel Vector NTI 10.0.3 (Invitrogen).

C) Clonage des vecteurs pSUPER

1) Choix des shRNA dirigés contre Carabin

Le choix des shRNA a été réalisé à l'aide de la méthode développée par Tuschl et *al* : <http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/> (Pei & Tuschl 2006). Huit shRNA ont été choisis en vue du clonage dans le vecteur pSUPER. Les oligonucléotides utilisés pour préparer ces shRNA sont :

shRNA n° 1 Oligonucléotide "Sens"

GATCCCCGATACAAGAAGGTAAAGATTCAAGAGATCTTTACCTTCTTGTATCGT
TTTTGGAAA

Oligonucléotide "Antisens"

AGCTTTTCCAAAAACGATACAAGAAGGTAAAGATCTCTTGAATCTTTACCTTCTT
GTATCGGGG

shRNA n° 2 Oligonucléotide "Sens"

GATCCCCACTTTAAGGACTGTATCATCAAGAGATGATACAGTCCTTAAAGTGT
TTTTGGAAA

Oligonucléotide "Antisens"

AGCTTTTCCAAAAACACTTTAAGGACTGTATCATCTCTTGAATGATACAGTCCTT
AAAGTGGGG

shRNA n° 3 Oligonucléotide "Sens"

GATCCCCGAACACTACAGGATGATTCTATTCAAGAGATAGAATCATCCTGTAGTTCT
TTTTGGAAA

Oligonucléotide "Antisens"

AGCTTTTCCAAAAAGAACTACAGGATGATTCTATCTCTTGAATAGAATCATCCTG
TAGTTCGGG

shRNA n° 4 Oligonucléotide "Sens"

GATCCCCGACTTGTTATCAGAACTATTCAAGAGATAGTTCTGATAACAAGTCCT
TTTTGGAAA

Oligonucléotide "Antisens"

AGCTTTTCCAAAAAGGACTTGTTATCAGAACTATCTCTTGAATAGTTCTGATAAC
AAGTCCGGG

shRNA n° 5 Oligonucléotide "Sens"

GATCCCCACCTTACACTGGGAGAAGATTCAAGAGATCTTCTCCCAGTGTAAGGTT
TTTTGGAAA

Oligonucléotide "Antisens"

AGCTTTTCCAAAAACCTTACACTGGGAGAAGATCTCTTGAATCTTCTCCCAGTG
TAAGGTGGG

shRNA n° 6 Oligonucléotide "Sens"

GATCCCCGAGTCCTGCAACAGGAAATTCAAGAGATTTCTCTGTTGCAGGACTCGT

TTTTGGAAA

Oligonucléotide "Antisens"

AGCTTTTCCAAAAACGAGTCCTGCAACAGGAAATCTCTTGAAATTCCTGTTGCAG
GACTCGGGG

shRNA n° 7 Oligonucléotide "Sens"

GATCCCCGCATGTATCCTCTATTGCTTCAAGAGAAGCAATAGAGGATACATGCT
TTTTGGAAA

Oligonucléotide "Antisens"

AGCTTTTCCAAAAAGCATGTATCCTCTATTGCTTCTCTTGAAAGCAATAGAGGAT
ACATGCGGG

shRNA n° 8 Oligonucléotide "Sens"

GATCCCCCATCAAAGCCAGCACTGAATTCAAGAGATTTCAGTGCTGGCTTTGATGT
TTTTGGAAA

Oligonucléotide "Antisens"

AGCTTTTCCAAAAACATCAAAGCCAGCACTGAATCTCTTGAAATTCAGTGCTGGCT
TTGATGGGG

Les parties en noir correspondent à la séquence cible.

2) Choix des shRNA dirigés contre Sh3kbp1

Cinq shRNA ont été choisis en vue du clonage dans le vecteur pSUPER en utilisant la même méthode que pour le gène *Carabin*. Les oligonucléotides utilisés pour préparer ces shRNA sont :

shRNA n° 1 Oligonucléotide "Sens"

GATCCCCGCATGATGATGAGCTGACATTCAAGAGATGTCAGCTCATCATCATGC
TTTTTGGAAA

Oligonucléotide "Antisens"

AGCTTTTCCAAAAAGCATGATGATGAGCTGACATCTCTTGAAATGTCAGCTCATC
ATCATGCGGG

shRNA n° 2 Oligonucléotide "Sens"

GATCCCCAAGTCAAGCTTAAGAGAAA**TTCAAGAGA**TTTCTCTTAAGCTTGACTT
TTTTTGGAAA

Oligonucléotide "Antisens"

AGCTTTTCCAAAAAAGTCAAGCTTAAGAGAAA**TCTCTTGAA**TTTCTCTTAAGCT
TGACTTGGG

shRNA n° 3 Oligonucléotide "Sens"

GATCCCCGGAAGGAGATATAGTGACT**TTCAAGAGA**AGTCACTATATCTCCTTCC
TTTTTGGAAA

Oligonucléotide "Antisens"

AGCTTTTCCAAAAAGGAAGGAGATATAGTGACT**TCTCTTGAA**AGTCACTATATC
TCCTTCCGGG

shRNA n° 4 Oligonucléotide "Sens"

GATCCCCAGAACAGAAGAGAAAGAAA**TTCAAGAGA**TTTCTTTCTCTTCTGTTCT
TTTTTGGAAA

Oligonucléotide "Antisens"

AGCTTTTCCAAAAAGAACAGAAGAGAAAGAAA**TCTCTTGAA**TTTCTTTCTCTT
CTGTTCTGGG

shRNA n° 5 Oligonucléotide "Sens"

GATCCCCGATATCATCTACTGAGAA**TTCAAGAGA**TTTCTCAGTAGATGATATC
TTTTTGGAAA

Oligonucléotide "Antisens"

AGCTTTTCCAAAAAGATATCATCTACTGAGAA**TCTCTTGAA**TTTCTCAGTAGAT
GATATCGGG

3) Génération des shRNA

Deux oligonucléotides sens et antisens sont hybridés (3 µg de chaque oligonucléotide qsp 50 µl dans un tampon d'hybridation : 100mM NaCl, 50mM HEPES pH7,4) à 90°C 4', 70°C 10' puis 37°C 20' et 4°C sur la nuit, pour former une molécule double-brin possédant des extrémités compatibles avec les enzymes Hind III et Bgl II. (voir le schéma ci dessous)

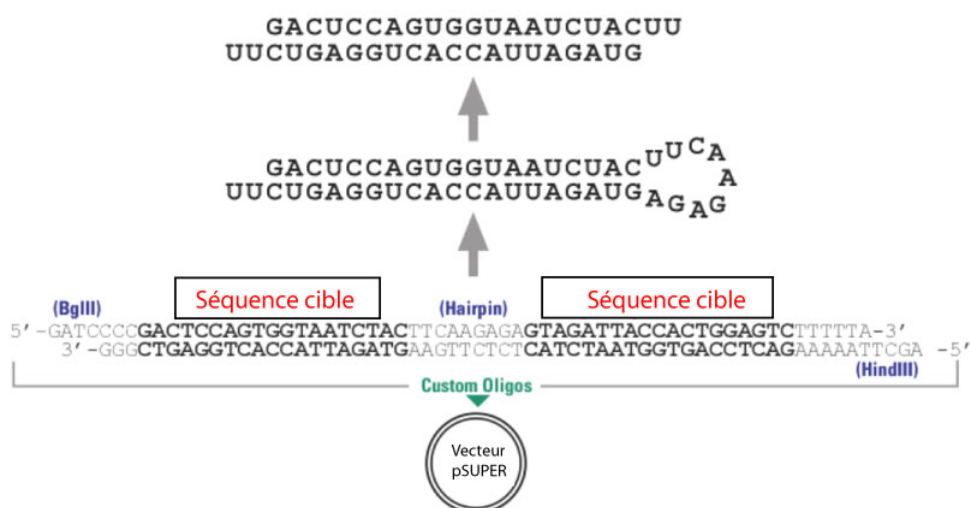


Schéma de l'assemblage des oligonucléotides permettant la formation du shRNA.

4) Digestion du vecteur pSUPER

10 μg de vecteur sont ajoutés à 5 μl de tampon 5X (NEB n°2) et 50U d'enzyme Hind III (Biolabs) et Bgl II (Appligene) qsp 50 μl H₂O bidistillée. Le mélange est incubé 2 h à 37°C. Le produit de digestion est ensuite déposé sur gel d'agarose 1% (coloré au B.E.T), puis la bande d'intérêt de 3170pb est purifiée comme décrit dans la partie "purification du fragment d'ADN d'intérêt" (page 94).

5) Ligation des shRNA dans le vecteur pSUPER

L'insert shRNA (fragment de 64pb) est présent dans un excès molaire de 3 fois par rapport au vecteur pSUPER (fragment de 3170pb) (insert : 3 μg vecteur : 240ng). La ligation se déroule sur la nuit à 14°C en présence de 2 μL de Tampon Ligase 5X (Invitrogen) et de 1 unité de T₄ ADN ligase (Invitrogen) qsp 10 μl H₂O bidistillée.

6) Criblage

Après transformation de bactéries compétentes, les colonies sont criblées par une réaction de PCR avec les oligonucléotides T7 et M13r (5'-catggctcatagctgtt-3'). Pour les colonies possédant l'insert la taille attendue de la bande est de 472pb ; si l'insert n'est pas présent la taille du produit de PCR est de 412pb.

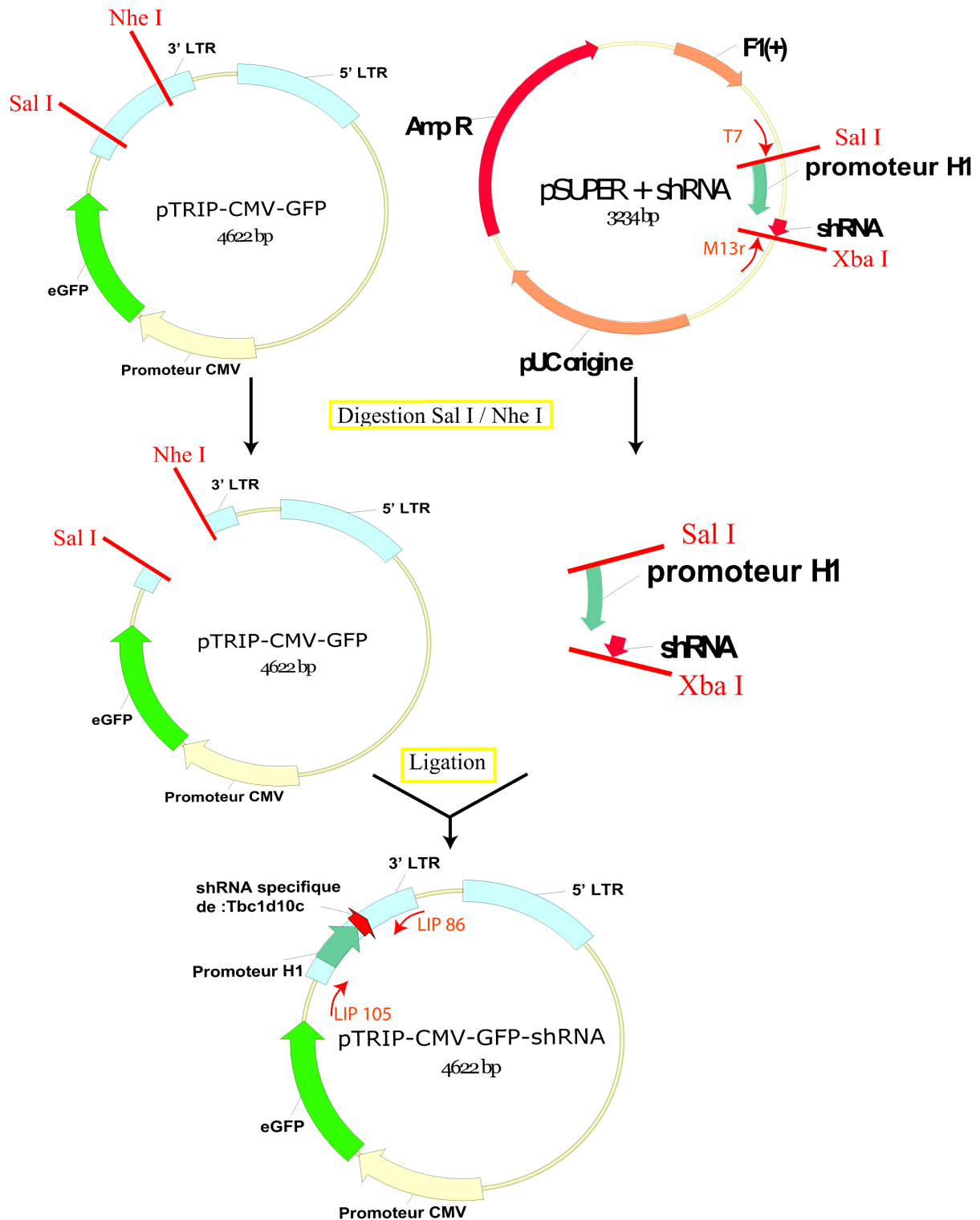


Figure 23 : Clonage des shRNA dans le vecteur pSUPER puis dans le vecteur pTRIP. Une digestion du vecteur pSUPER avec les enzymes Sal I et Xba I, et du vecteur pTRIP avec les enzymes Sal I et NheI, a été réalisée. La cassette contenant le promoteur H1 et le shRNA dirigé contre *Tbc1d10c* a ensuite été liguée dans le vecteur pTRIP digéré.

D) Clonage du vecteur pTRIP

1) Digestion des vecteurs pSUPER-shRNA

10 µg de vecteur pSUPER-shRNA sont ajoutés à 5 µl de tampon 5X (NEB n°3), 0,1 µl de BSA 100X (Bovine Serum Albumine) et 50U d'enzyme Xba I (Biolabs) et Sal I (Fermentas) qsp 50 µL H₂O bidistillée. Le mélange est incubé 2 h à 37°C, puis le produit de digestion est ensuite déposé sur gel d'agarose 1% (coloré au B.E.T). La bande d'intérêt de 330pb est purifiée comme décrit dans la partie " Purification du fragment d'ADN d'intérêt" (page 94).

2) Digestion du vecteur pTRIP

10 µg de vecteur pTRIP sont ajoutés à 5 µl de tampon 5X (NEB n°3), et 50U d'enzyme Nhe I (Biolabs) et Sal I (Fermentas) qsp 50 µL H₂O bidistillée. Le mélange est incubé 2 h à 37°C, puis le produit de digestion est ensuite déposé sur gel d'agarose 1% (coloré au B.E.T.) La bande d'intérêt de 3917pb est purifiée comme décrit dans la partie " Purification du fragment d'ADN d'intérêt" (page 94).

3) Ligation dans le vecteur pTRIP

Le vecteur pTRIP (fragment de 3917pb) est présent dans un excès molaire de 3 fois par rapport à l'insert H1+shRNA (fragment de 330pb) (insert : 300 ng ; vecteur : 100 ng). La ligation se déroule sur la nuit à 14°C en présence de 4 µL de Tampon Ligase 5X (Invitrogen) et de 1 unité de T₄ ADN ligase (Invitrogen) qsp 20µL H₂O bidistillée.

4) Criblage des colonies positives

Les colonies obtenues après transformation de bactéries compétentes, sont criblées pour vérifier la présence du vecteur pTRIP-shRNA. Les colonies sont dans un premier temps repiquées dans 100 µl d'eau puis une réaction de PCR est réalisée en utilisant les

oligonucléotides LIP 96 (5'-agaggaggaggaggtgggtt-3') (Sigma) et LIP 105 (5'-cctctcactctctgatattcat-3') (Sigma) (Figure 23 page 100). Pour les colonies possédant l'insert la taille attendue est de 808pb. Si l'insert n'est pas présent la taille du produit de PCR est de 484pb. Le vecteur est produit puis séquencé avec les mêmes oligonucléotides, comme décrit précédemment (page 95).

E) Culture cellulaire et transfection des cellules

1) Cellules 293T

Les cellules 293T sont une lignée de fibroblastes humains. Elles sont cultivées dans le milieu DMEM (Gibco) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (PAN) et de Gentamycine 50 µg/ml (BioWhittaker), dans un incubateur à 37°C 5% CO₂.

2) Transfection et co-transfection

Les cellules sontensemencées à une confluence de 60% dans des plaques de 6 puits (Falcon). 2,5 µg d'ADN (2,5 µg de vecteur pTOPO-Tbc1d10c-V5 dans l'expérience de transfection ; 0,475 µg de vecteur pTOPO-Tbc1d10c-V5 + 2,025 µg de vecteur pSUPER – shRNA pour l'expérience de co-transfection) sont mélangés avec 500 µl de milieu OPTI-MEM (Gibco) puis incubés 5' à température ambiante. 6,25 µL de Lipofectamine (Invitrogen) sont ajoutés au mélange, ce qui va permettre la formation de liposomes contenant le ou les vecteurs à transférer. Après un temps d'incubation de 30' à température ambiante, le mélange est ajouté goutte à goutte sur les cellules. Le lendemain, le milieu de transfection est remplacé par du milieu frais.

F) Récolte des lysats cellulaires et analyse de l'expression protéique par western blot

24h, 48h, ou 72h après transfection, les cellules sont récoltées et lavées au PBS, puis centrifugées 5' à 1500 rpm. Le culot est ensuite resuspendu dans du tampon de lyse (TNE :

50mM Tris pH=8, 1% NP-40, 2mM EDTA pH=8 auquel est ajouté extemporanément 1 tablette cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche) pour 10mL de TNE). Après dosage des protéines par Bradford, 50 µg ou 100 µg de protéines sont ensuite ajoutés à 1 volume de bleu de charge (400mM Tris base ; 8% SDS [Sodium Dodécyl Sulfate] ; 30% glycérol ; 0,1% bleu de Bromophénol). Après ajout de 10% de β-mercaptoethanol (Sigma) puis incubation 5' à 95°C, les échantillons et le marqueur de taille (Page Ruler MBI Fermentas) sont déposés dans les puits d'un gel de polyacrylamide 8% (30% Acrylamide Mix (Biorad); 1,5M Tris pH 8,8 (Gel de concentration) ou pH 6,8 (Gel de séparation) ; 10% APS [Ammonium PerSulfate] ; 0,05% TEMED). La migration se fait à 90V dans un tampon de migration 1X (25mM Tris pH 8,3 ; 192mM Glycine ; 0,1% SDS). Le transfert du gel sur une membrane de nitrocellulose se fait en milieu liquide à 100V dans un tampon de transfert 1X (25mM Tris pH 8,3 ; 192mM Glycine). Après transfert, la membrane est saturée 2 h à température ambiante sous agitation dans une solution de blocage (5% lait (poudre Régilait), 100mM Tris-HCl pH 7,2 ; NaCl 90g/L ; 0,5% Tween 20 (Sigma)). Après saturation, le tampon de blocage est retiré et remplacé par l'anticorps anti-V5-HRP (Invitrogen) ou anti-actine-HRP (Santa Cruz Biotechnology), respectivement dilués au 5000^e et 2000^e dans le tampon de blocage pendant 1h30 à température ambiante sous agitation. La membrane est rincée au TBS (1M Tris pH=7,5, 0,5M EDTA pH=8, NaCl 90g/L, 0,5% Tween 20). Après 5 lavages au TBS sur une période d'une demi-heure, on procède à une révélation par une réaction de chemiluminescence (kit ECL Plus, Amersham). La membrane est alors exposée sur un film autoradiographique et le film est développé.

G) Détermination du nombre d'intégration virale par Southern Blot

1) Principe du Southern Blot

Les sites EcoNI et AvaII étant uniques dans le pTRIP mais présents de manière fréquente dans le génome, la sonde utilisée va hybrider, pour chaque copie intégrée dans le génome, un fragment de 780 pb (correspondant au fragment EcoNI/AvaII du pTRIP) et un autre fragment de taille toujours supérieure (correspondant au fragment allant du site de coupure dans la génome au site EcoNI du pTRIP). En cas de multi-copies, nous obtiendrons x fois le fragment de 780 pb et x fragments de tailles variables correspondant aux différentes copies intégrées (voir schéma ci-dessous).

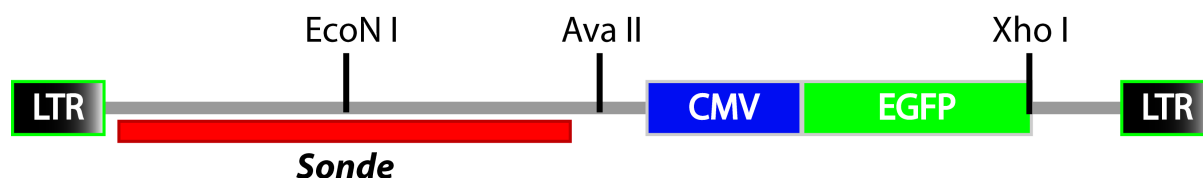


Schéma du vecteur pTRIP et de la sonde utilisée pour la détermination par Southern-Blot du nombre de copies intégrées dans la génome. D'après (Zennou et al. 2000).

2) Préparation et digestion d'ADN génomique de queue de souris

Environ 0,5 cm de queue de souris est prélevé puis digéré dans le tampon de lyse (Tris 1M pH 8,5 100 mM ; EDTA 5 mM ; SDS 0,2% ; NaCl 200 mM ; Protéinase K 500 µg/ml). Une extraction de l'ADN génomique est ensuite réalisée par précipitation Phénol / Chloroforme. 12 µg d'ADN génomique sont ajoutés à 5 µl de tampon 5X (NEB n°4) et 36U d'enzyme EcoN I (Biolabs) et 36U d'enzyme Ava II (New England Biolabs) qsp 50 µL H₂O bidistillée. Le mélange est incubé sur la nuit à 37°C

3) Migration sur gel d'agarose puis transfert sur membrane de nitrocellulose

Les 12 µg d'ADN génomique digérés sont ensuite déposés sur un gel d'agarose 0,9 % (coloré au B.E.T.). Après migration (à 40 Volts), l'ADN génomique digéré est ensuite transféré sur une membrane de nitrocellulose (Perkin Elmer Genescreen Plus Hybridation Transfer Roll) par pressage dans du tampon de transfert (NaOH 0,4N ; NaCl 1,5M). Après lavage de la membrane dans du tampon SSC 2X pendant 15 min (Tampon SSC 20X : NaCl 3M ; Na₃citrate-2H₂O 0,3M), une étape de pré-hybridation est réalisée.

4) Préparation de la sonde

La sonde a été décrite précédemment (Zennou et al. 2000). Brièvement, une PCR est réalisée à partir du vecteur pTRIP en utilisant les amorces 5EcoNI et 3EcoNI permettant d'amplifier une séquence correspondant à la sonde. Après purification sur gel d'agarose, le fragment de PCR est dosé puis conservé à -20°C.

5) Pré-Hybridation et hybridation

Les membrane sont incubées dans 10 ml de tampon Church (Tampon Church : Formamide 1l ; SDS 20% 100 ml ; NaCl 5M 400 ml ; Tris 2M pH 7,5 50 ml ; Pyrophosphate de Na 10% 20 ml ; Denhardt 100 x 200 ml ; Dextran sulfate 100g) plus 500 µl de sperme de saumon (ssDNA sperme saumon). Après marquage de 25 ng de sonde à l'aide du Kit "High Prime DNA labeling kit" (Roche), la sonde est purifié avec des colonnes "Microspin G50 Columns" (Amersham). La sonde est ensuite déposée dans le tube contenant la membrane et 10 ml de tampon d'hybridation puis le tube est incubée à 42°C toute une nuit.

6) Lavages et révélation

Après deux lavages dans le tampon SSC 2x + SDS 0,1%, puis deux lavage dans le tampon SSC 0,1x + SDS 0,1%, la membrane est séchée puis disposé dans une cassette en contact avec un écran (Kodak). 3 jours après, l'écran est lu grâce à un Phosphorimager (Amersham).

III. Etude du gène *Sh3kbp1*

Les méthodes utilisées dans cette partie sont les mêmes que celles utilisées dans la partie "Etude du gène *Carabin*". La construction lentivirale pTRIP utilisée pour permettre la sous-expression de ce gène est la même à ceci près que le promoteur CMV, guidant l'expression de la GFP, a cependant été remplacé par celui de l'Ubiquitine C humaine (promoteur ubiquitaire permettant une expression significative dans les organes lymphoïdes) (Soulas-Sprauel et al. 2007).

Résultats et discussion

I. Identification des gènes dérégulés dans les lymphocytes B au cours du LED quiescent

A) Analyse transcriptomique de lymphocytes B de patients atteints de LED quiescent

L'article 1 présente les résultats de l'analyse transcriptomique des lymphocytes B de 17 patients lupiques quiescents comparés à 9 sujets sains.

Article 1

B cell signature during inactive systemic lupus is heterogeneous: toward a biological dissection of lupus

Authors : *J.C. Garaud (1), ***J.N. Schickel** (1), G. Blaison (2), A.M. Knapp (1,5), D. Dembele (3), J. Ruer-Laventie (1), A.S. Korganow (1,4,5), T. Martin (1,4,5), P. Soulas-Sprauel (1,4,5), J.L. Pasquali (1,4,5).

* **These authors contributed equally to this work.**

Affiliations and adresses:

(1) CNRS UPR 9021, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France

(2) Hôpital civil de Colmar, France

(3) Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch-Graffenstaden, France

(4) Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France

(5) Université de Strasbourg, France

Correspondance: J.L. Pasquali, e-mail: jean-louis.pasquali@chru-strasbourg.fr

Grants: French Ministry of Health (Projet Hospitalier de Recherche Clinique), and the GIS for rare diseases.

Summary

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease with an important clinical and biological heterogeneity. B lymphocytes appear central to the development of SLE which is characterized by the production of a large variety of autoantibodies and hypergammaglobulinemia. In mice, immature B cells from spontaneous lupus prone animals are able to produce autoantibodies when transferred into immunodeficient mice, strongly suggesting the existence of intrinsic B cell defects during lupus. In order to approach these defects in humans, we compared the peripheral B cell transcriptomas of quiescent lupus patients to normal B cell transcriptomas. When the statistical analysis is performed on the entire group of patients, the differences between patients and controls appear quite weak with only 14 mRNA genes having a false discovery rate ranging between 11 and 17%, with 6 underexpressed genes (*PMEPA1*, *TLR10*, *TRAF3IP2*, *LDOC1L*, *CD1C* and *EGR1*). However, unforced hierarchical clustering of the microarrays reveals a subgroup of lupus patients distinct from both the controls and the other lupus patients. This subgroup has no detectable clinical or immunological phenotypic peculiarity compared to the other patients, but is characterized by 1/ an IL-4 signature and 2/ the abnormal expression of a large set of genes with an extremely low false discovery rate, mainly pointing to the biological function of the endoplasmic reticulum, and more precisely to genes implicated in the Unfolded Protein Response, suggesting that B cells entered an incomplete BLIMP1 dependent plasmacytic differentiation which was undetectable by immunophenotyping. Thus, this microarray analysis of B cells during quiescent lupus suggests that, despite a similar lupus phenotype, different biological roads can lead to human lupus.

1. Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease which is clinically and biologically characterized by a wide spectrum of signs variable from one patient to another. Indeed, the diagnosis of SLE mainly relies on the association of clinical and biological symptoms, some of which being validated as diagnostic criteria [1]. Not only different organs can be affected in groups of patients with SLE, but also the immunological hallmark of the disease, the autoantibodies, are diversely expressed with the exception of antinuclear antibodies which are quasi-constant in patients. This phenotypic heterogeneity of SLE patients may reflect different genetic contributions (i.e. various combinations of susceptibility genes) and/or different environmental factors which could lead to diverse immunopathological consequences.

Among the many immune cell types which have been implicated in this heterogeneous disease, B lymphocytes appear central to the development of lupus and deserve further attention because: 1/ they produce the autoantibodies, 2/ they are activated during the disease, 3/ they are responsible for the frequent hypergammaglobulinemia, and 4/ they could present some intrinsic defects responsible for lupus traits and currently unknown. Indeed, in the spontaneous lupus prone mice NZB/W F1, it was shown that immature B cells from the parental lines NZB and NZW, when transferred to immunodeficient mice, produced hypergammaglobulinemia and antiDNA antibodies [2]. In the recent years, the B cell phenotype was extensively studied during lupus leading to the dissection of quantitative abnormalities of B cell subpopulations like naïve B cells, CD5 B cells, transitional B cells, memory and plasma B cells based on the expression of various membrane markers [3-8]. Some of these B cell abnormalities correlate with lupus activity and could reflect the extrinsic influence of various factors, like type I Interferons and/or BAFF, on the B cell subpopulations [9-11]. In an effort to track down putative intrinsic B cell defects during SLE, we analysed the transcriptomas of purified B cells from inactive patients without immunosuppressive treatment, and compared the SLE B cell gene expression to healthy individual B cell transcriptomas. This approach, using purified B lymphocytes instead of a mixture of peripheral mononuclear cells and non hypothesis driven large scale microarrays, should be able to point out the implication of some biological pathways, and to define such intrinsic B cell defects. The overall statistical analysis of the differential gene expression (17 patients versus 9 controls) identified a very low number of genes with an acceptably low false discovery rate (FDR) showing that gene expressions were quite similar between quiescent

lupus B cells and controls. However, a subgroup of patients was clearly distinct from the others and from the controls, with differentially expressed genes mainly implicated in plasmacytic differentiation and confirming at the B cell level the heterogeneity of the pathways leading to lupus.

2. Patients, materials and methods

2.1. Patients

17 patients (15 females and 2 males) with the diagnosis of SLE were selected for this study after they gave their informed consent. The SLE diagnosis was based on the presence of at least 4 criterias among those defined by the American College of Rheumatology. The lupus was inactive in these patients for more than 6 months, with a Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) score less than 4 [12], and they did not receive any immunosuppressive drug. If they needed steroids, the patients were not treated with more than 10 mg of prednisone per day (4 patients). 10 patients were treated with hydroxychloroquine. The clinical characteristics of the patients are presented in Table 1. The 10 control subjects were healthy individuals, (8 females and 2 males) ageing from 23 to 53 years, with no personal nor familial history of autoimmune disease. This study was approved by the ethic comity of the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.

2.2. B lymphocyte preparation and RNA purification

Peripheral blood was drawn into heparin-containing sterile tubes and peripheral blood mononuclear cells were prepared by Ficoll (Amersham) density gradient centrifugation for immediate use. B cells were labeled with a biotin anti-CD19 monoclonal antibody (HIB19 clone, Pharmingen) at 4°C and revealed by phycoerythrin-labelled streptavidin (Biomeda) before immediate B cell sorting with high speed cell sorter (FACS Diva, Beckton-Dickinson). Total RNAs from the sorted B cells were extracted using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. They were then precipitated in Glycogen (Invitrogen) and suspended in DNAase-free and RNAase-free water (Gibco). The quality of the RNA preparations was always checked with RNAlabChip (Agilent) before any further step. Good quality RNA preparations (approximately 50 ng per preparation) were amplified using the Affymetrix 2 cycle cDNA synthesis kit. In order to reduce the variability

of these preparations, one control B cells and generally 2 patients' B cells preparations were treated simultaneously.

2.3. Gene micro arrays preparations and GeneChip analysis

cRNAs were synthesized, biotin-labelled and hybridized to the Affymetrix GeneChip human genome U133 plus 2.0 (with probe sets representing 38,572 UniGene clusters) according to the manufacturer's instructions. After hybridization and washings, arrays were stained with PE-conjugated streptavidin (10 µg/ml) before scanning. Raw Affymetrix data (available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/query/acc.cgi?acc=GSE30153>) were analyzed using R (R Development Core Team, 2008; The Comprehensive R Archive Network: <http://cran.r-project.org/>) and Bioconductor [13; Bioconductor: <http://www.bioconductor.org/>] softwares. The quality of the 27 Affymetrix genechips and RNA was assessed using the Bioconductor AffyPLM and simpleaffy packages, with qc, AffyRNAdeg, fitPLM, image, RLE and NUSE functions: one control chip showing too many defects was left aside, thus further analysis were carried out on 9 control and 17 patient chips. For normalization and background correction, Raw values were pre-processed with RMA or GCRMA (library simpleAffy). As further analysis with RMA or GCRMA data gave similar results, only results with GCRMA expression values will be shown.

According to the histogram distribution of GCRMA expression values (Fig. 1), we considered as unexpressed genes (both in patients and controls), genes with expression values below 4. Genes with values lower than this threshold were eliminated: of the 54,675 Affymetrix probe sets, only 18,271 (33 %) correspond to genes expressed in B lymphocytes. Identification of differentially expressed genes and estimation of the False Discovery Rate (FDR,[14,15]) were carried out using the Significance Analysis of Microarrays (SAM) algorithm available in the siggenes package [16].

2.4. Data clustering

The dist and hclust functions of the simpleaffy library were used to build hierarchical clusterings of the data.

2.5. QRT-PCR Analysis

cDNAs from total RNAs were prepared after patients and control B cell separations using the high capacity cDNA Reverse transcription Kit (Applied Biosystems). 10 ng of each cDNA was subjected to QRT-PCR using Applied Biosystems TaqMan assays (validated for each selected gene) on the ABI Prism 7000 instrument. The $\Delta\Delta C_t$ provided the target gene expression value by comparison with a calibrator sample (Applied Biosystems). The patients and control samples and the calibrator were first normalized by the relative expression of the 18s.

2.6. B Lymphocyte ligands and lupus

Zhu et al. in 2004 published an extensive analysis of mouse splenic B cell gene expression changes in response to in vitro stimulation with 33 ligands of B lymphocytes [18, and Data available online: UCSD-Nature Signaling Gateway, Alliance for Cellular Signaling, AfCS Data Center, B-cell ligand screen, <http://www.signaling-gateway.org/data/cgi-bin/table.cgi?cellabbr=BC>]. In an attempt to find associations between human SLE and these ligands, we compared patterns of genes differentially expressed in B lymphocytes during SLE (our results in the subgroup of 5 patients) and in response to these ligands (Zhu's results). In order to identify homolog human and mouse genes, i.e gene with the same symbol name, clone identifiers are converted to gene symbol names. For Affymetrix probe sets the conversion to gene symbols is straightforward using the Affymetrix NetAffx Analysis Center (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>). In contrast the conversion of mouse clone ID to symbol names require queries to several data bases as the custom Agilent cDNA Microarray chip used in Zhu et al. publication was made up of clones from four libraries: RIKEN, NIA, Research Genetics, and Genome systems.

The Representing Factor (http://www.nemates.com/uky/MA/progs/overlap_stats.html) and the Resampling statistical methods (19, and available online: <http://www.resample.com/content/text/index.shtml>) were used to compare the patterns of genes differentially expressed in human and mouse B lymphocytes.

The identification of the biological pathways and of the ontology groups (biological processes and molecular functions) of selected list of genes differentially expressed in the 5 lupus patients subgroup was performed using the DAVID program with a Bonferroni

correction for multiple testing (DAVID Bioinformatic Resources, NIAID, NIH), and the CYTOSCAPE program with the MiMI plugin [17].

3. Results

The patients' characteristics are presented in Table 1. They were all considered of having an inactive phase of SLE with a variable disease duration (2 to 26 years). B cell purity was checked by FACS analysis of sorted CD19 positive cells (more than 96%).

3.1. Differentially expressed genes in lupus B cells compared to normal B cells

According to the MIAME recommendations, the data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO Series accession number GSE30153 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/query/acc.cgi?acc=GSE30153>) as well as the full normalized and annotated results of the RMA analysis of the 2,327 genes with initial p values of less than 0.05 (supplementary Table 1).. Then, the B cells transcriptional profiles originating from the 17 lupus patients compared to the 9 normal individuals were analysed using the SAM algorithm and multiple testing correction according to Benjamini et al [14, 15]. Using this stringent statistical analysis, and after removing the upregulated Ig genes from this short list, it appears that only a very small number of genes (14 out of the 18,271 which were expressed in B cells) are differentially expressed with a FDR ranging from 11 to 17% (Table 2). At first glance, these results indicate that, at the transcriptomal level, and during the inactive phases of the disease, lupus B cells are very similar to normal B cells. The differentially expressed genes were checked by real time qPCR only in a few patients (because of the availability of the cDNAs) and were confirmed to be up or downregulated during lupus. Among these genes, it is interesting to note that TRAF3IP2 (alias ACT1) is a negative regulator of B cell function, its absence leading to lymphoproliferation and autoantibody production [20], but ACT1 is also essential in IL-17 dependent signaling during autoimmune diseases [21], IL-17 being implicated during lupus physiopathology [22]. On the other hand, the low level of expression of *CD1c* mRNA could be related to the fact that CD1c is highly expressed on unswitched memory B cells or circulating counterpart of marginal zone B cells [23], this subpopulation being decreased during the inactive phase of lupus [24].

TLR10 has to date no defined agonist or function but is apparently functional with a distinct signaling pathway in B cells [25, 26].

3.2. A subset of SLE patients have a distinct gene expression profile

Unforced hierarchical clustering of the patients and the controls was performed with the 18,271 genes expressed in the B cells. The figure 2A shows that the gene expressions of the patients and the controls were quite similar, confirming the previous statistical analysis. However, the same unforced hierarchical clustering identifies a subgroup of 5 patients with a distinct gene expression profile. The statistical analysis comparing the gene expression of these 5 patients with the controls and the other patients was indeed highly significant. Extremely low FDRs (less than 0.01) were associated with the differential expression of approximately 800 genes (supplementary Table 2, and Heat-map of the first 50 genes in Fig. 2B). Considering the availability of the mRNAs, we only checked by real time qPCR the expression levels of 6 selected genes in 2 patients and one control (*ADA*, *RRM2*, *CAVI*, *XBPI*, *ARHGAP24*, *FKBP11*) and confirmed the microarray results (Fig. 3). Looking for the origin of this peculiar gene expression profiles in these 5 patients, we first tried to find differences in the clinical phenotype of the patients but we were unable to find such differences (gender, age of onset, disease duration, activity score, levels of serum Ig and anti nuclear antibodies, treatments at the time of sampling). Second, since the difference could originate from a distinct representation of the B cell subpopulations in these 5 patients, we checked the detailed cytofluorometric patterns (CD19, IgG, IgM, IgD, CD138, CD27, CD86) observed on B cells from both controls and patients. Differences were evidenced between the patient and the control groups [24], but we did not see any statistical difference between the 2 patients subgroups (12 *versus* 5): equivalent percentages of CD19/ CD138 double positive cells, CD19/CD27 double positive cells, and CD19/CD86 double positive cells were found. Third, the differential gene expression could originate from B cell extrinsic or intrinsic properties pointing to original biological pathways in these 5 patients.

3.3. Ligand signature ?

Still focusing on the differential gene expression between the subgroup of patients and the controls, the results could represent intrinsic or extrinsic gene expression abnormalities or both. In order to approach the possible influence of extrinsic factors, we took advantage of

the Signaling gateway data center which gives the results of an extensive analysis of microarrays performed on murine purified splenic B cells during in vitro stimulation with 33 different ligands [18]. Thus, we compared our list of in vivo differentially expressed human genes during SLE with differentially expressed murine genes under influence of these ligands. To be precise, we specifically compared the differentially expressed (1.5 fold change) murine genes after 4h ligand stimulations with our list of highly differentially expressed genes originating from the subgroup of the 5 SLE patients (thereby named SLE list). Different steps were required: 1/ only genes which were present on both murine and human microarrays were considered for this analysis, 2/ we identified the different ligand regulated gene files, 3/ among these files, we identified the murine genes which were also present in the SLE list (common lists of genes) and counted the number of genes varying in the same direction for each ligand, 4/ then, for each ligand, we calculated the Representing Factor and the associated probability of finding an overlap set of genes [http://www.nemates.com/uky/MA/progs/overlap_stats.html]. This calculation leads to identify IL4 imprinting as the only significant signature in these 5 patients B cells: the common list of genes for IL4 contained 112 genes with 101 genes varying in the same direction. This was confirmed by another statistical method (Resampling, [19]). Type I Interferon (only 35 genes on the common list, with 30 moving in the same direction), BAFF (33 genes on the common list, with 25 moving in the same direction) and CD40L (84 genes on the common list, but 59 only varying in the same direction) did not reach statistical significance.

3.4. Biological pathways in the subgroup of 5 patients

In order to analyse the biological significance of differentially expressed genes in these 5 patients compared to controls, different tools are available. We used the DAVID program to look for statistically represented biological pathways. If we enter the SLE list of genes into the DAVID program, it appears that one biological pathway is highly significantly overrepresented after a Bonferroni correction for multiple testing: the endoplasmic reticulum (p less than 8.8×10^{-11}). Among these genes which point to the endoplasmic reticulum, a large set of genes participate to the Unfolded Protein Response. Many of these genes are controlled by the overexpression of BLIMP1, a master regulator of B cell terminal differentiation: *DNAJC3*, *SEC61A*, *BIP*, *SSR4*, *PPIB*, *RPNI*... This overexpression of *BLIMP1* mRNAs is not related to *EGR1* because the later is also down regulated in these 5 patients [27]. On the other

hand, XBP1, whose mRNAs are also overexpressed, could be inactive since its specific target genes are not upregulated (*SLC30A*, *ARHQ*, *OBFI*). It is interesting to note that 1/ IL4 is indeed able to induce *XBPI*, but not the IRE1 activation induced *XBPI* splicing which is necessary to produce the active form of XBP1 [28], and not to induce BLIMP1, and 2/ *BII* mRNAs (Bax Inhibitor 1) are increased in these B cells and BI1 is known to repress IRE1 activation [29].

At the level of gene interactions, using Cytoscape and the MiMI program, analysis indicates complex relationships between differentially expressed genes which can belong to distinct biological pathways. As an example, Fig. 4 shows the complex network of possible interactions between FYN, whose mRNAs are down regulated in these patients, and 8 directly interacting gene products whose mRNAs are overexpressed in the same cells.

4. Discussion

Based on two main considerations (the central role of B cells during SLE, and the possible intrinsic abnormalities of SLE B cells), we performed the transcriptomic analysis of purified B cells during non active phases of the disease. Such an analysis 1/ should reduce the variability of the transcriptomas because of the purity of the analysed cells, and 2/ should reduce the risk of focusing on gene expressions associated with lupus flares and their medical treatments. The interpretation of the microarrays is here limited to B cells, avoiding difficulties in data mining linked to heterogeneous populations of cells present in the peripheral blood mononuclear cells in unknown proportions [30]. Still the interpretation can be obscured by the presence of different B cell subpopulations in the human peripheral blood. Indeed, in a separate set of experiments starting with the same blood samples, we performed a detailed B cell immunophenotyping which showed some differences between control B cells and SLE B cells [24], some of which being potentially able to explain differentially expressed genes. Despite these differences, one of the main results of our study is the important similarity at the transcriptomic level between normal B cells and SLE B cells during non active phase of the disease. At a threshold close to 10% for the FDR (upper limit of reasonably acceptable risk for microarray analysis [31]), only 14 genes out of 18,271 appear differentially expressed. The biological significance of these differences could be diverse. For instance, the down expression of *CD1c* mRNAs could be related to the low percentage of the CD1c high unswitched memory B cells among total SLE B cells. On the other hand, the down expression of *ACT1* (*TRAF3IP2*), could be linked to SLE because of the

importance of this negative regulator on the B cell function [20-22]. At that stage, it is almost impossible to compare the results of the different SLE wide genome scans with our microarray results because of the very limited informations of the functionality of the different polymorphisms which were described. However, it is interesting to note that BLK (C8orf13) does not appear on our list of differentially expressed genes despite the B cell down expression of this kinase when its regulatory region expresses the “SLE” polymorphism [32]. Whether this polymorphism is present or not in our patients, or whether the downregulation of BLK only occurs during an active phase of the disease, remains to be determined.

The second main result of our data is related to the transcriptomic heterogeneity of the patients. The unforced hierarchical clustering of the patients and controls revealed a subgroup of 5 patients with a distinct pattern of mRNA expression in B cells leading to the identification of a set of genes with a high statistical significance. Looking for clinical or biological peculiarities in these 5 patients, we did not find any difference with the other 12 SLE patients. We also compared their B cell subpopulations patterns, but again did not find any difference. Thus, we are left with the possibility that the B cell signature of these 5 patients could be the result of either extrinsic or intrinsic B cell properties.

Looking for an extrinsic signature of the SLE B cell transcriptoma in these five patients, we found a significantly enriched expression of genes induced by IL4. However, this approach has several limits: 1/ ligand induced gene expression in purified B cells could be different in mouse and human, although generally speaking these biological pathways are quite conserved, 2/ for comparisons with our human gene list, we only considered mouse genes that were consistently modified 4 h after in vitro ligand stimulations, which could ignore some interesting early and late gene changes, 3/ the analysis can be obscured by the frequent sharing of expression change patterns between different ligands (anti-Ig, CD40L, BAFF, IL-4, CpG, Type I Interferons, data not shown). Having in mind these limitations, it appears that B cells from these 5 inactive SLE patients have only one weak signature, although we did not find an increase of serum IL-4 level in these patients (data not shown). However, the serum level of IL-4, or the IL-4 production by peripheral blood mononuclear cells during lupus is not clear, with conflicting results maybe linked to the activation status of the patients [33-36]. It is interesting to note that the type I interferon signature which was reported during active SLE was not clearly detected during the inactive phase of the disease.

To look for intrinsic B cell defects in these 5 patients, we removed from the list of differentially expressed genes all those that were shown to be in vitro ligand regulated [18].

Analysis of the gene product interactions through the Cytoscape program gives some interesting clues. For instance, the Src family kinase FYN could be central to the disease: it is slightly down regulated in almost all the patients, and FYN deficiency in mice induces a tendency to produce anti-DNA antibodies and proteinuria through a non immunological mechanism [37]. FYN appears physically connected to 8 gene products whose mRNAs are overexpressed in the subgroup of 5 patients (SLAMF1, RICS, CSF2RB, CAV1, CDK5, CASP3, IL2RB, ATXN1 [38-42]) and could compete for FYN. The consequences on B cell biology of such a competition between the possible overexpressed proteins and the deficient target FYN are currently unknown. Looking for the origin of low FYN expression in these 5 patients, it is interesting to note that it is associated with the down expression of EGR1 which is known to control the FYN gene expression through an EGR1 binding site located in the promotor region of FYN [43]. Beside FYN, other genes coding for adhesion molecules like ICAM and CD44, can be regulated by EGR1 [44, 45] their mRNAs being down regulated in these patients as well.

In order to find activation of biological pathways in the B cells of these 5 patients, we used the DAVID program. It identifies a large overrepresented set of genes which are deregulated during the plasmacytic differentiation of B cells as well as during the Unfolded Protein Response in different cell types. The fine analysis of the deregulated genes in these B cells suggests that B cells underwent Blimp1 induced partial plasmacytic differentiation, but without further terminal plasma cell differentiation (Fig. 5): *BLIMP1* and *XBPI* mRNAs are both overexpressed, but *XBPI* could be inactive because 1/ *HERPUD1*, *ADA* and *ELL2* (all being target genes for *BLIMP1*, but not for *XBPI*) mRNAs are increased, 2/ On the contrary, specific target genes for *XBPI* (*SLC30A5*, *ARHQ*) are not deregulated, which is consistent with an IL-4 influence [46, 28]. The precise stimulus that induces *BLIMP1* over expression, but not *XBPI* splicing, is not clear but if IL-21 is an obvious candidate, others are still possible alone or in combination: BCR, Calcineurin/NFAT, CD40/NFkB [47]. On the other hand, a new polymorphism associated with SLE was recently described in the vicinity of the *BLIMP1* gene locus, suggesting an intrinsic property of B cells bearing this variant [48]. Thus, it seems that, in these patients, B cells are in a stage of intermediate differentiation, maybe arrested at a step before IRE1 induced *XBPI* unconventional splicing which is necessary to produce the active form of the protein required for the full plasmacytic differentiation [49, 50]. Consistent with this hypothesis, the serum levels of IgG were not different in these 5 patients compared to the 12 others, but 20 out of the 32 genes of the plasmablast signature (module M1.1, [51]) are present in our list. Such a possible stage opens

new questions: 1/ is this developmental arrest an intrinsic (constitutive) abnormality of B cells in these patients, or is it linked to permanent extrinsic stimulation (IL-4?, IL-21?, Antigen?), 2/ do these cells express some new surface markers which were not detectable during our quite extensive B cell immunophenotyping? , 3/ is this stage linked to lupus susceptibility in these patients, or is it an indication for flare susceptibility ? All these questions will have to be addressed in a new and large cohort of patients that will be longitudinally tested.

Finally, the description of this subgroup of lupus patients adds some new insights on the different biological roads which can lead to a lupus phenotype.

References

[1] Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997 ;40 :1725.

[2] Reininger L, Winkler TH, Kalberer CP, Jourdan M, Melchers F, Rolink AG. Intrinsic B cell defects in NZB and NZW mice contribute to systemic lupus erythematosus in (NZB x NZW)F1 mice. *J Exp Med.* 1996 ;184 :853-61.

[3] Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, Feist E, Hiepe F, Burmester GR, Lipsky PE, Radbruch A, Dörner T. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2000 ;165 :5970-9.

[4] Jacobi AM, Odendahl M, Reiter K, Bruns A, Burmester GR, Radbruch A, Valet G, Lipsky PE, Dörner T. Correlation between circulating CD27^{high} plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2003 ;48:1332-42.

[5] Grammer AC, Lipsky PE. B cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2003; 5 :S22-7.

[6] Dörner T, Lipsky PE. Correlation of circulating CD27^{high} plasma cells and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2004;13 :283-9.

[7] Jacobi AM, Reiter K, Mackay M, Aranow C, Hiepe F, Radbruch A, Hansen A, Burmester GR, Diamond B, Lipsky PE, Dörner T. Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95. *Arthritis Rheum.* 2008 ;58 :1762-73.

[8] Youinou P, Renaudineau Y. The paradox of CD5-expressing B cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2007 ;7 :149-54.

[9] Lipsky PE. Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat Immunol.* 2001; 2 :764-6.

[10] Mackay F, Silveira PA, Brink R. B cells and the BAFF/APRIL axis: fast-forward on autoimmunity and signaling. *Curr Opin Immunol.* 2007 ;19 :327-36.

[11] Banchereau J, Pascual V. Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity.* 2006 ;25 :383-92.

[12] Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum.* 1992 ;35 :630-40.

[13] Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Ben Bolstad, Dettling M , Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W , Iacus S , Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JYH , Zhang J. Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology.* 2004: 5, R80 (<http://genomebiology.com/2004/5/10/R80>)

[14] Benjamini Y; Hochberg, Y . Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B (Methodological).*1995; 57 : 289–300.

[15] Benjamini Y; Yekutieli D . The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Annals of Statistics* 2001; 29 : 1165–88.

- [16] Schwender H., Krause A., Ickstadt K. Identifying Interesting Genes with siggenes. *Rnews*. 2006; 6 : 45–50.
- [17] Gao J, Ade AS, Tarcea VG, Weymouth TE, Mirel BR, Jagadish HV, States DJ. Integrating and Annotating the Interactome using the MiMI plugin for Cytoscape. *Bioinformatics* 2009; 25 :137-8.
- [18] Zhu X, Hart R, Chang MS, Kim JW, Lee SY, Cao YA, Mock D, Ke E, Saunders B, Alexander A, Grossoehme J, Lin KM, Yan Z, Hsueh R, Lee J, Scheuermann RH, Fruman DA, Seaman W, Subramaniam S, Sternweis P, Simon MI, Choi S. Analysis of the major patterns of B cell gene expression changes in response to short-term stimulation with 33 single ligands. *J Immunol.*, 2004 ;173: 7141-9.
- [19] Julian L. Simon: *Resampling: The New Statistics*" Second Edition published October 1997 (réf suffisante ?)
- [20] Qian Y, Qin J, Cui G, Naramura M, Snow EC, Ware CF, Fairchild RL, Omori SA, Rickert RC, Scott M, Kotzin BL, Li X. Act1, a negative regulator in CD40- and BAFF-mediated B cell survival. *Immunity*. 2004 ;21 :575-87.
- [21] Qian Y, Liu C, Hartupee J, Altuntas CZ, Gulen MF, Jane-Wit D, Xiao J, Lu Y, Giltiay N, Liu J, Kordula T, Zhang QW, Vallance B, Swaidani S, Aronica M, Tuohy VK, Hamilton T, Li X. The adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nat Immunol*. 2007 ;8 :247-56.
- [22] Doreau A, Belot A, Bastid J, Riche B, Trescol-Biemont MC, Ranchin B, Fabien N, Cochat P, Pouteil-Noble C, Trolliet P, Durieu I, Tebib J, Kassai B, Ansieau S, Puisieux A, Eliaou JF, Bonnefoy-Bérard N. Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol*. 2009 ;10 :778-85
- [23] Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME, Plebani A, Kumararatne DS, Bonnet D, Tournilhac O, Tchernia G, Steiniger B, Staudt LM, Casanova JL, Reynaud CA, Weill JC. Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic

marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood*. 2004 ;104 :3647-54.

[24] Korganow AS, Knapp AM, Nehme-Schuster H, Soulas-Sprauel P, Poindron V, Pasquali JL, Martin T. Peripheral B cell abnormalities in patients with systemic lupus erythematosus in quiescent phase: Decreased memory B cells and membrane CD19 expression. *J Autoimmun*. 2010; 34: 426-34

[25] Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, Saulnier V, Merck E, Tancredi S, Guiet C, Brière F, Vlach J, Lebecque S, Trinchieri G, Bates EE. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol*. 2005;174 :2942-50.

[26] Guan Y, Ranoa DR, Jiang S, Mutha SK, Li X, Baudry J, Tapping RI. Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling. *J Immunol*. 2010;184 :5094-103.

[27] Mora-López F, Pedreño-Horrillo N, Delgado-Pérez L, Brieva JA, Campos-Caro A. Transcription of PRDM1, the master regulator for plasma cell differentiation, depends on an SP1/SP3/EGR-1 GC-box. *Eur J Immunol*. 2008; 38 :2316-24

[28] Iwakoshi NN, Lee AH, Vallabhajosyula P, Otipoby KL, Rajewsky K, Glimcher LH. Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nat Immunol*. 2003; 4: 321-9

[29] Lisbona F, Rojas-Rivera D, Thielen P, Zamorano S, Todd D, Martinon F, Glavic A, Kress C, Lin JH, Walter P, Reed JC, Glimcher LH, Hetz C. BAX inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1alpha. *Mol Cell*. 2009; 33 :679-91

[30] Lyons PA, McKinney EF, Rayner TF, Hatton A, Woffendin HB, Koukoulaki M, Freeman TC, Jayne DR, Chaudhry AN, Smith KG. Novel expression signatures identified by transcriptional analysis of separated leucocyte subsets in systemic lupus erythematosus and vasculitis. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:1208-13

[31] Breitling R. Biological microarray interpretation: the rules of engagement. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1759: 319-27

[32] Hom G, Graham RR, Modrek B, Taylor KE, Ortmann W, Garnier S, Lee AT, Chung SA, Ferreira RC, Pant PV, Ballinger DG, Kosoy R, Demirci FY, Kamboh MI, Kao AH, Tian C, Gunnarsson I, Bengtsson AA, Rantapää-Dahlqvist S, Petri M, Manzi S, Seldin MF, Rönnblom L, Syvänen AC, Criswell LA, Gregersen PK, Behrens TW. Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *N Engl J Med*. 2008; 358: 900-9

[33] Tao J, Dong J, Li Y, Liu YQ, Yang J, Wu Y, Li L, Shen GX, Tan ZJ, Tu YT. Up-regulation of cellular FLICE-inhibitory protein in peripheral blood B lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus is associated with clinical characteristics. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009 ;23: 433-7.

[34] Wong CK, Ho CY, Li EK, Lam CW. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2000;9: 589-93

[35] Nagy G, Pállinger E, Antal-Szalmás P, Aleksza M, Marschalkó M, Brózik M, Falus A, Gergely P. Measurement of intracellular interferon-gamma and interleukin-4 in whole blood T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Immunol Lett*. 2000;74: 207-10

[36] Yu HH, Liu PH, Lin YC, Chen WJ, Lee JH, Wang LC, Yang YH, Chiang BL. Interleukin 4 and STAT6 gene polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus in Chinese patients. *Lupus*. 2010;19:1219-28

[37] Yu CC, Yen TS, Lowell CA, DeFranco AL. Lupus-like kidney disease in mice deficient in the Src family tyrosine kinases Lyn and Fyn. *Curr Biol*. 2001; 9: 34-8.

[38] Engel P, Eck MJ, Terhorst C. The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 813-21.

[39] Luciano F, Ricci JE, Auberger P. Cleavage of Fyn and Lyn in their N-terminal unique regions during induction of apoptosis: a new mechanism for Src kinase regulation. *Oncogene*. 2001; 20: 4935-41.

[40] Wary KK, Mariotti A, Zurzolo C, Giancotti FG. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell*. 1998; 94: 625-34

[41] Li S, Couet J, Lisanti MP. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 1996; 271: 29182-90.

[42] Xu Y, Yang G, Hu G. Binding of IFITM1 enhances the inhibiting effect of caveolin-1 on ERK activation. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2009; 41: 488-94

[43] Gao Y, Howard A, Ban K, Chandra J. Oxidative stress promotes transcriptional up-regulation of Fyn in BCR-ABL1-expressing cells. *J Biol Chem*. 2009; 284: 7114-25

[44] Maltzman JS, Carman JA, Monroe JG. Role of EGR1 in regulation of stimulus-dependent CD44 transcription in B lymphocytes. *Mol Cell Biol*. 1996; 16: 2283-94.

[45] Maltzman JS, Carmen JA, Monroe JG. Transcriptional regulation of the Icam-1 gene in antigen receptor- and phorbol ester-stimulated B lymphocytes: role for transcription factor EGR1. *J Exp Med*. 1996;183:1747-59

[46] Shaffer AL, Shapiro-Shelef M, Iwakoshi NN, Lee AH, Qian SB, Zhao H, Yu X, Yang L, Tan BK, Rosenwald A, Hurt EM, Petroulakis E, Sonenberg N, Yewdell JW, Calame K, Glimcher LH, Staudt LM. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity*. 2004; 21: 81-93.

[47] Calame K. Activation-dependent induction of Blimp-1. *Curr Opin Immunol*. 2008; 20: 259-64

[48] Gateva V, Sandling JK, Hom G, Taylor KE, Chung SA, Sun X, Ortmann W, Kosoy R, Ferreira RC, Nordmark G, Gunnarsson I, Svenungsson E, Padyukov L, Sturfelt G, Jönsen A, Bengtsson AA, Rantapää-Dahlqvist S, Baechler EC, Brown EE, Alarcón GS, Edberg JC, Ramsey-Goldman R, McGwin G Jr, Reveille JD, Vilá LM, Kimberly RP, Manzi S, Petri MA, Lee A, Gregersen PK, Seldin MF, Rönnblom L, Criswell LA, Syvänen AC, Behrens TW, Graham RR. A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2009; 41:1228-33.

[49] Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* 2001; 107: 881-91

[50] Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature.* 2002; 415: 92-6.

[51] Chaussabel D, Quinn C, Shen J, Patel P, Glaser C, Baldwin N, Stichweh D, Blankenship D, Li L, Munagala I, Bennett L, Allantaz F, Mejias A, Ardura M, Kaizer E, Monnet L, Allman W, Randall H, Johnson D, Lanier A, Punaro M, Wittkowski KM, White P, Fay J, Klintmalm G, Ramilo O, Palucka AK, Banchereau J, Pascual V. A modular analysis framework for blood genomics studies: application to systemic lupus erythematosus. *Immunity.* 2008; 29:150-64

Tables

Table 1 - Clinical features, and disease activity index at the time of the study

Disease and treatment were stable for at least 6 months. SLEDAI: Systemic Lupus erythematosus disease activity index; IgG normal range: 7–14 g/l, ANA: antinuclear antibodies

Patient n°	Age	Sex	Duration of disease (years)	SLEDAI	IgG levels (g/l)	ANAs titre	Anti-dsDNA	Steroids	Chloroquine
1	36	F	3	0	8.49	1/160	–	–	–
2	59	F	20	3	8.15	1/1280	+	–	+
3	38	F	18	0	8.29	1/1280	–	–	+
4	37	F	9	2	7.3	1/640	+	+	+
5	36	F	8	4	7.22	1/1280	+	–	–
6	36	F	9	0	10.2	1/160	–	–	–
7	41	M	9	0	11.2	1/640	–	–	–
8	55	F	15	4	13.8	1/320	–	–	–
9	47	F	9	0	15.9	1/320	–	–	–
10	36	F	12	4	7.68	1/1280	+	–	–
11	37	F	8	2	9.47	1/1280	+	+	+
12	53	F	19	0	9.76	1/1280	–	+	+
13	30	F	2	0	7.8	1/160	–	–	+
14	41	F	7	0	11.9	1/1280	–	+	+
15	23	M	8	4	7.3	1/640	+	–	+
16	37	F	18	4	8.07	1/1280	+	–	+
17	50	F	26	0	10.5	1/640	–	–	+

Table 2 - Genes over or underexpressed in lupus patients B cells (FDR from 11 to 17%) compared to control B cells.

Probes	Xfold (log2)	Unigene	Gene symbol
1554474_a_a 209708_at	1.93	Hs.6909	MOXD1
201890_at 209773_s_at	4.44	Hs.226390	RRM2
202589_at 1554696_s_at	3.79	Hs.592338	TYMS
201543_s_at 210790_s_at	1.97	Hs.499960	SAR1A
228486_at 228485_s_at	2.32	Hs.573495	SLC44A1
201923_at	1.98	Hs.83383	PRDX4
203857_s_at	2.63	Hs.477352	PDIA5
39249_at	1.40	Hs.234642	AQP3
222450_at	0.49	Hs.517155	PMEPA1
215411_s_at	0.71	Hs.654708	TRAF3IP2
223751_x_at	0.67	Hs.120551	TLR10
205987_at	0.42	Hs.132448	CD1c
223228_at	0.66	Hs.715637	LDOC1L
227404_s_at 201694_s_at	0.38	Hs.326035	EGR1

Figures

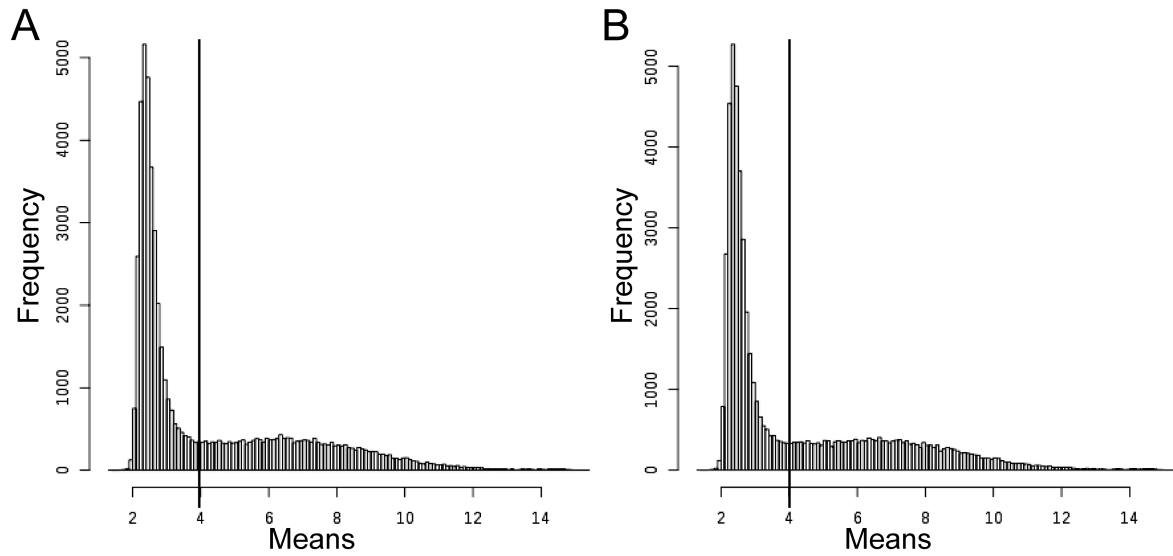


Figure 1. Histogram distribution of GCRMA expressions values. Genes with expression values below 4 were considered unexpressed in B cells both in patients (A) and in control (B).

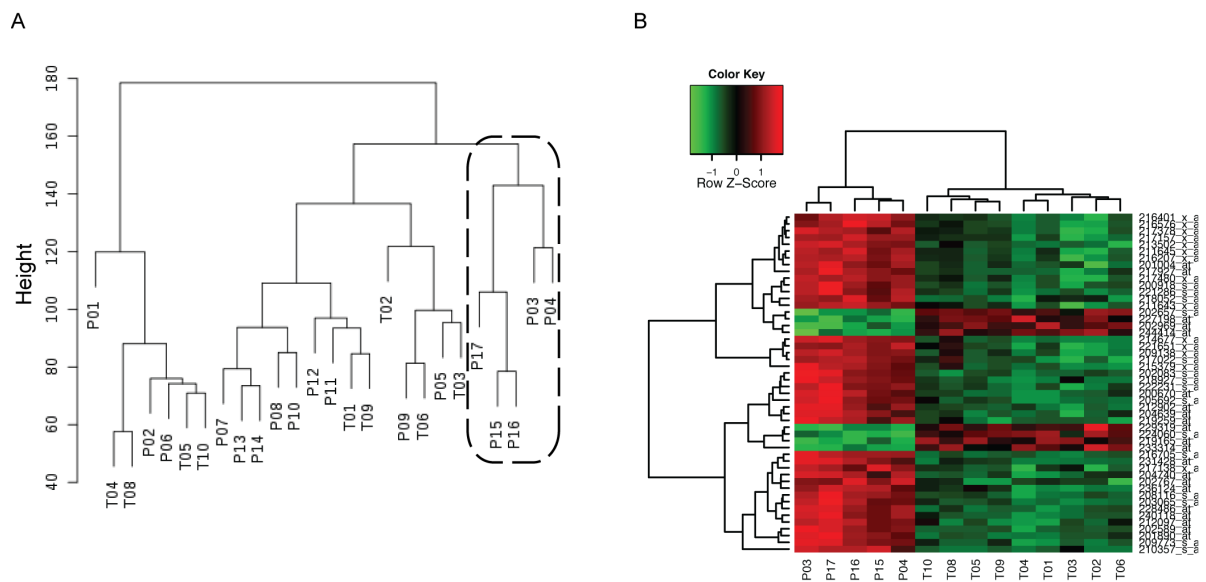


Figure 2. (A) Dendrogram obtained by unforced hierarchical clustering of the microarrays from the 17 patients and the 9 controls. A subgroup of 5 patients (surrounded by a dashed line) stands out from the others. (B) Heat-map of the 50 first differentially expressed genes in these 5 patients compared to controls after filtering the results for low signal. Over-expressed genes are shown in red and under-expressed are depicted in green.

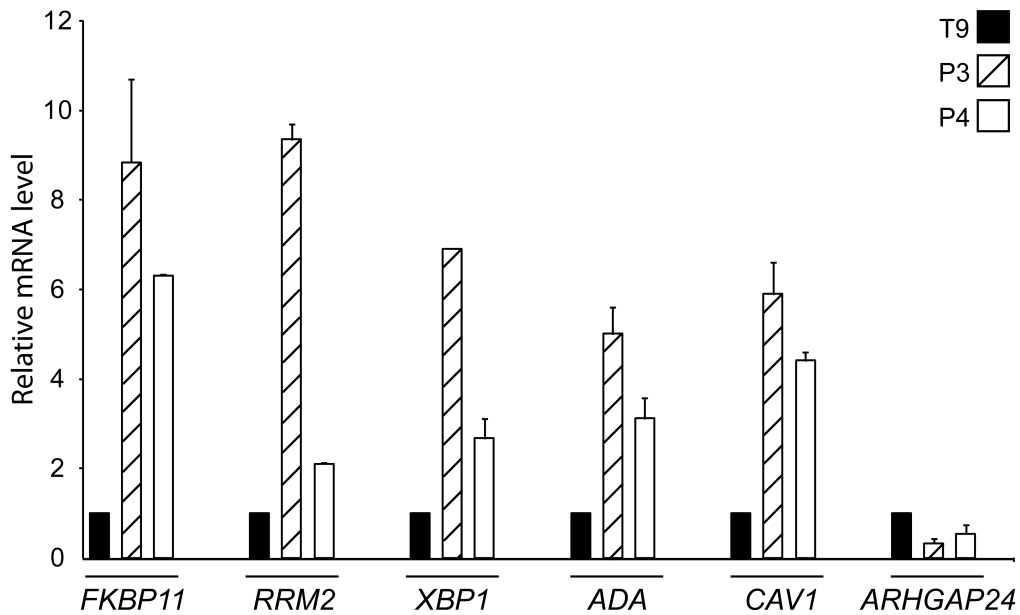


Figure 3. Quantitative RT-PCR of 6 selected genes in 2 patients and one control. *FKBP11*, *RRM2*, *XBP1*, *ADA*, *CAV1* and *ARHGAP24* expressions were determined by real time quantitative RT-PCR. Each sample was normalized to the endogenous control 18S.

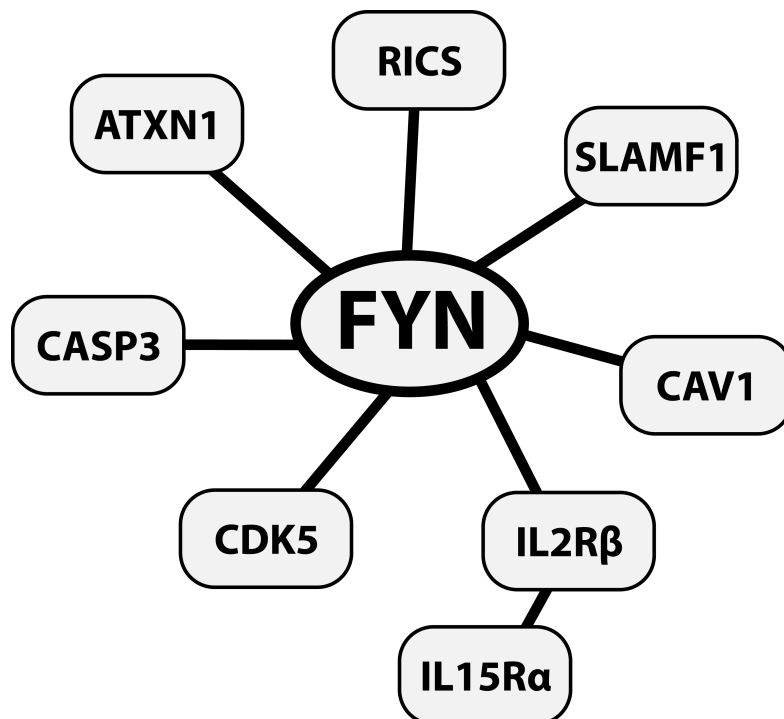


Figure 4. Physical possible interactions between FYN and the products of 8 deregulated genes in the 5 patients according to Cytoscape and MIMI programs.

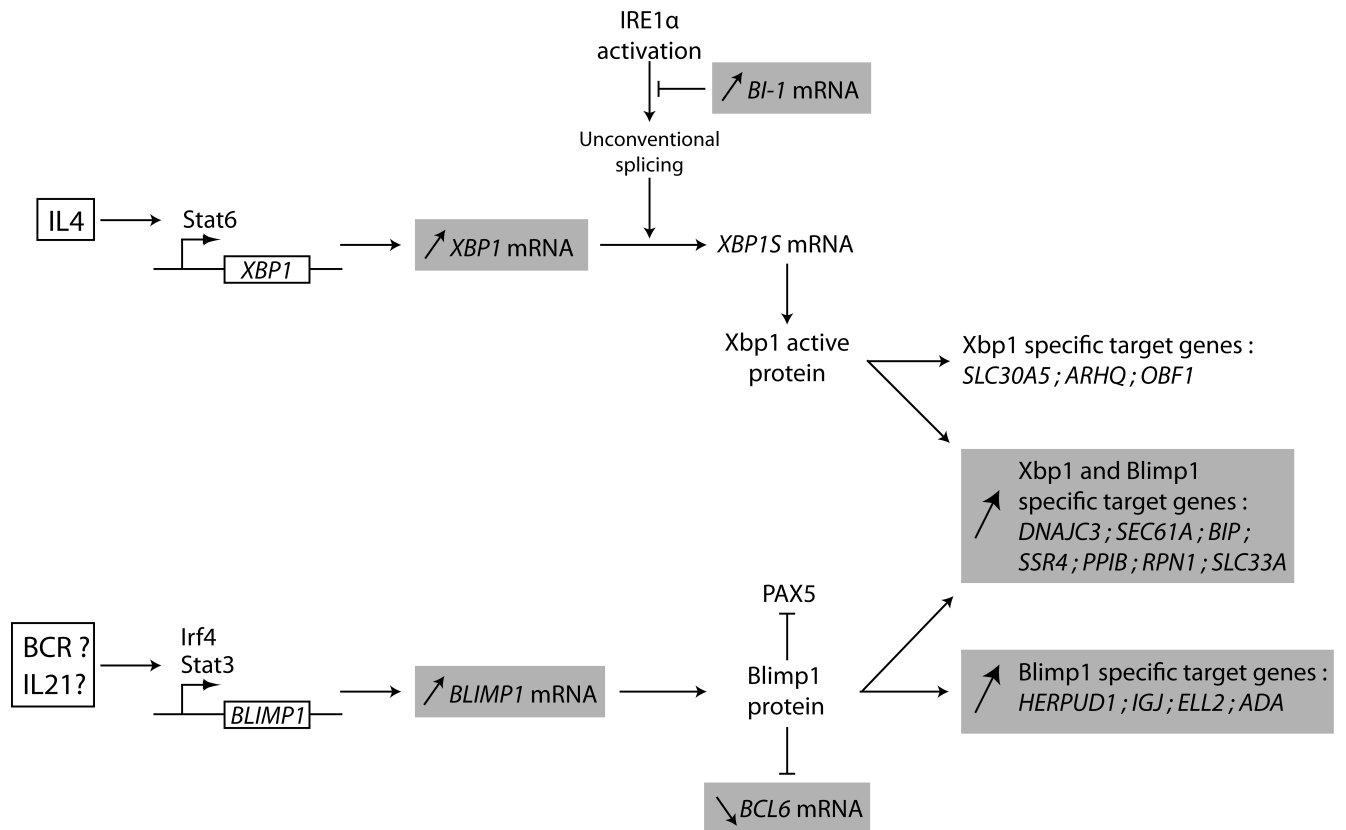


Figure 5. The observed significant variations of mRNAs in the B cells of the five patients are surrendered and suggest a *BLIMP1* induced partial plasmacytic differentiation.

Supplementary Table 1. Non normalized data of the 17 patients and 8 controls with probe identification, gene names and statistics. List of genes with p-values less than 0.05 (Wilcoxon test).

Supplementary Table 2. List of differentially expressed gene with a FDR less than 0.01 in the 5 patients compared to controls.

B) Arguments utilisés dans le choix des gènes à étudier

L'analyse du transcriptome des lymphocytes B chez les patients lupiques quiescents a été suivie d'une étape de sélection de gènes d'intérêt, dont la dérégulation est à présent étudiée au laboratoire grâce à des études de génomique fonctionnelle chez la souris.

Ainsi, après analyse statistique (Wilcoxon), 2327 gènes furent identifiés comme significativement dérégulés chez les 17 patients lupiques comparés aux 9 sujets sains ($p < 0,05$). Différentes approches ont été utilisées lors des étapes de sélection des gènes dont les fonctions dans les lymphocytes B vont être étudiées :

- **Une approche basée sur un travail bibliographique.** Cette approche avait pour but de sélectionner des gènes ayant des rôles connus ou suspectés (par la présence de domaines fonctionnels et de données bibliographiques) dans les différentes fonctions des lymphocyte B (maturation, activation, prolifération, différenciation, commutation de classe d'immunoglobuline, sécrétion d'anticorps, tolérance B etc...).
- **Une approche basée sur les statistiques.** Cette approche avait pour but la sélection de gènes ayant des fonctions parfois totalement inconnues mais présentant une expression dérégulée chez les patients lupiques avec une très forte significativité statistique.
- Une analyse transcriptomique de lymphocytes B triés de souris lupiques BW ainsi que des deux lignées parentales NZB et NZW comparées à des souris contrôles de type Balb/c ($n=2$ pour chaque lignée) a également été réalisée au laboratoire. Le choix des gènes a donc également été renforcé par les données de cette étude. Ainsi une préférence a été donnée aux gènes dont l'expression est dérégulée à la fois chez les patients lupiques et chez la souris lupique BW.

C) Conclusions et discussion

Dans cette première partie nous avons montré que :

1/ Les lymphocytes B de patients lupiques atteints de LED quiescents présentent un pattern d'expression génique globalement similaire à ceux des sujets sains, puisque seuls 14 gènes semblent être statistiquement dérégulés dans les lymphocytes B de patients lupiques comparés aux individus sains. Ce résultat est surprenant du fait que de nombreux arguments indiquent qu'au cours du LED, les lymphocytes B possèdent des anomalies génétiques intrinsèques (voir partie "Anomalies des LB au cours du LED : intrinsèques ou induites ?" [page 36](#)). Ce résultat pourrait s'expliquer par une hétérogénéité entre les patients qui aurait pour effet de minimiser les différences d'expression observables chez les patients lupiques pris individuellement. De plus, nos résultats laissent également supposer que différentes voies biologiques sont impliquées dans la physiopathologie du LED. Ainsi une déficience ou une hyperactivation de différentes voies biologiques très différentes pourraient aboutir au développement d'une pathologie commune.

2/ Parmi les 17 patients lupiques étudiés, 5 d'entre eux présentent un profil d'expression génique très comparable. Aucun phénotype clinique commun à ces 5 patients n'a par ailleurs été identifié. Ce résultat permet d'émettre l'hypothèse qu'il existe des sous-groupes de patients lupiques pour lesquels les mécanismes physiopathologiques, ou tout au moins les voies biologiques responsables de l'apparition de la maladie, sont similaires.

3/ Le profil d'expression des gènes dans les lymphocytes B de ces 5 patients montrent une signature d'un ligand (l'IL-4) et également une forte sur-représentation des gènes impliqués dans les fonctions du réticulum endoplasmique, plus particulièrement dans l'UPR (Unfolded Protein Response). L'UPR est une réponse de la cellule suite à un stress qui provient de l'accumulation de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique. Dans les lymphocytes B, cette réponse est généralement déclenchée lors de phases de forte synthèse protéique, c'est à dire essentiellement dans les lymphocytes B activés et surtout dans les plasmocytes qui secrètent de grande quantités d'immunoglobulines.

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées quant à l'implication de l'UPR dans les processus conduisant à une autoimmunité. La dérégulation de certains gènes impliqués dans

l'UPR observé dans les patients atteints de lupus quiescent pourrait : 1/ conduire à une perturbation des mécanismes de tolérance des cellules B ayant une UPR défectueuse et ainsi permettre l'émergence de lymphocytes B autoréactifs ; 2/ permettre une augmentation de la survie des lymphocytes dans le cas d'une UPR d'efficacité augmentée et ainsi agir sur le seuil d'activation du lymphocyte B.

Enfin, l'utilisation d'approches basées sur des critères bibliographiques ou purement statistiques nous a permis de sélectionner des gènes d'intérêts qui sont désormais étudiés grâce à une analyse par génomique fonctionnelle. Les critères de choix nous ont fait converger vers une liste d'environ une dizaine de gènes. Ce travail de thèse se propose d'explorer les conséquences de la dérégulation de l'expression de deux de ces gènes sur la fonction des lymphocytes B et le développement d'une autoimmunité : *Tbc1d10c* (ou *Carabin*) et *Sh3kbp1* (ou *CIN85* ou *Ruk* ou *SETA*).

II. Etude de la fonction de Carabin.

A) Les fonctions connues de Carabin

Au moment où nous avons débuté l'analyse de la fonction de *Tbc1d10c* (ou Carabin ou EPI64C), aucune étude n'avait décrit ce gène ni en terme de structure, ni en terme de fonction. Cependant, l'analyse de la séquence protéique a permis d'identifier un domaine TBC (Tre-2/Bub2/Cdc16) laissant supposer une possible fonction de Ras/Rab GTPase. Quelques mois après le début des investigations sur le gène *Tbc1d10c*, une étude parue dans la revue *Nature* a décrit *Tbc1d10c* comme un régulateur négatif de la voie du TCR (F. Pan et al. 2007). Dans cet article les auteurs montrent que Carabin inhibe l'activation de la voie du TCR de deux manières: 1/ il se fixe à Ras et inhibe la voie des MAP kinases, grâce à son domaine RasGAP position en N-terminale ; 2/ il inhibe l'activité phosphatase du complexe Calmoduline/Calcineurine en se fixant à la Calcineurine, grâce à son domaine Calcineurine en position C-terminale. Etant donné la double fonction de cette protéine dans la régulation de la voie du TCR, les auteurs l'ont nommé Carabin (CA pour Calcineurine, RA pour Ras et BIN pour Binding) (Figure 24).

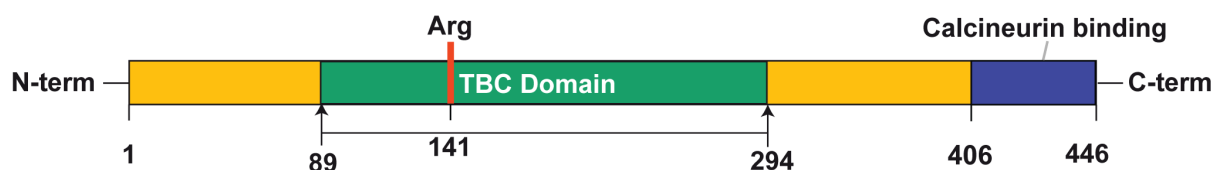


Figure 24: Représentation schématique de la protéine Carabin.

Les positions des domaines fonctionnels connus sont indiquées.

En 2009, une seconde équipe s'intéressant aux régulateurs de la voie Ras dans l'oncogénèse a confirmé le rôle de Carabin comme régulateur négatif de l'activation de la protéine Ras. Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'expression d'un siRNA spécifique de Carabin dans deux lignées de cellules tumorales du rein (786-0 et Caki-1) engendre une augmentation de la prolifération des cellules. De façon intéressante, les auteurs ont également montré que ceci est dû à une augmentation de la présence de H-Ras sous forme active (c'est à dire liée au GTP) (Datta et al. 2009).

Outre ces deux études décrivant Carabin comme un régulateur négatif de Ras et de la calcineurine, deux autres études parues en 2008 et 2010 font état d'une toute autre fonction pour *Tbc1d10c*. En effet, Patino-Lopez et al ont montré que *Tbc1d10c* (aussi appelé EPI64C) est également capable d'inhiber la protéine Rab35 via son domaine Ras/Rab GTPase. Les

protéines de la famille Rab sont impliquées dans les mécanismes de régulation du transport des vésicules intracytoplasmiques et participent au trafic des endosomes entre les différents compartiments subcellulaires. La protéine Rab35 serait plus particulièrement impliquée dans la régulation des compartiments de recyclage de la membrane plasmique (recycling endosomes) (Chua et al. 2010). Dans cette étude les auteurs ont montré dans un modèle *in vitro* que Rab35 et Tbc1d10c participent à la formation de la synapse immunologique entre une cellule B et une cellule T (Patino-Lopez et al. 2008). La deuxième étude, parue en 2010, a confirmé que la famille de protéines comprenant Tbc1d10a, Tbc1d10b et Tbc1d10c est bien capable d'inhiber l'activité de Rab35. De plus, ces protéines sont capables de réguler la formation des exosomes dans les oligodendrocytes (cellules du système nerveux) (Hsu et al. 2010).

La forte significativité statistique avec laquelle *Carabin* est sous-exprimé dans les lymphocytes B de patients atteints de LED quiescent, ainsi que des données provenant de notre étude du transcriptome de lymphocytes B de souris BW montrant également une sous-expression de *Carabin* chez ces souris lupiques, nous ont amené à étudier les conséquences de la sous-expression de ce gène sur la fonction des lymphocytes B et le développement d'une autoimmunité.

B) Régulation de l'expression de Carabin dans les lymphocytes B

La fonction de Carabin étant inconnues dans les lymphocytes B, nous avons dans un premier temps mesuré l'expression de Carabin dans les lymphocytes B normaux, à savoir dans les différentes sous-populations de lymphocytes B puis dans des lymphocytes B matures activés de façon BCR-dépendante (anticorps anti-IgM) ou BCR-indépendante (LPS). La partie "Carabin expression is tightly regulated during B cell development and activation" de l'article 2 (page 159) présente les résultats obtenus. Brièvement, l'expression de Carabin augmente avec la maturation du lymphocyte B, atteignant son niveau le plus élevé au stade de lymphocyte B mature folliculaire. Ceci laisse supposer une fonction plus importante de Carabin dans le compartiment des lymphocytes B matures. De plus, on observe une forte chute de l'expression de Carabin après activation du lymphocyte B.

C) Clonage puis expression de Carabin

1) Clonage du gène *Tbc1d10c* dans le vecteur pTOPO-V5

Le but de ce travail était dans un premier temps de choisir une séquence de shRNA spécifique de *Carabin* murin, qui serait clonée dans une construction lentivirale, afin de produire des cellules B Carabin knock down (KD) et des souris transgéniques KD, et d'étudier ainsi les effets de la sous-expression de Carabin sur la fonction des lymphocytes B et le développement d'une autoimmunité. Aucun anticorps permettant la détection du produit protéique du gène *Tbc1d10c* n'étant disponible au moment où nous avons commencé cette étude, nous avons décidé de cloner l'ADNc de la partie codante de ce gène dans le vecteur d'expression pTOPO-V5, permettant l'expression d'une forme de la protéine fusionnée à un épitope V5. L'expression de *Tbc1d10c*-V5 dans des cellules serait alors détectée à l'aide d'un anticorps anti-V5. Cette construction pTOPO-Carabin-V5, ainsi que l'utilisation de n'anticorps V5, nous permettrait donc ensuite de valider le choix d'un shRNA pour la suite de l'étude.

a) Choix de la partie codante du gène *Tbc1d10c*

Lorsque nous avons débuté l'étude de ce gène, dix variants d'épissage différents du gène *Tbc1d10c* murin étaient référencés dans la base de données NCBI (Figure 25 page 139). Au moment de débiter ce travail, aucune étude n'avait décrit l'une de ces isoformes ni en terme de structure, ni en terme de fonction. Il était donc nécessaire, dans une première étape, de sélectionner l'un des variants d'épissage de *Tbc1d10c*, en vue de cloner l'ADNc de son ORF (Open Reading Frame : Cadre ouvert de lecture) dans un vecteur d'expression. Le tableau 11 (page 140) résume les arguments utilisés pour ce choix.

Pour réaliser la sélection de l'ADNc à cloner nous avons dans un premier temps : i) exclu les séquences n'étant pas reconnues par la sonde utilisée dans l'expérience de RT-PCR quantitative (hybridation de la sonde au niveau des exons n° 2 et n° 3, voir figure 25 page 139), et les séquences non détectées avec les EST (Expressed Sequence Tag) présents sur les puces à ADN utilisées pour l'analyse du transcriptome. Ce premier critère nous a permis d'exclure les séquences n° 1 et n° 2 ; ii) un deuxième critère visait à écarter les séquences décrites dans NCBI comme possédant un codon initiateur différent d'ATG : ceci nous a

permis d'écarter la séquence n° 6 ; iii) enfin, nous avons choisi l'ORF la plus représentée parmi les variants d'ARNm restants, ce qui exclue les formes n° 4, 5 et 9.

Ces critères nous ont conduit à sélectionner une séquence d'une taille de 1332 pb (paires de bases) allant du codon initiateur ATG au codon stop théorique des variants n° 3 et n° 7. La traduction de l'ORF de ces ARNm génère une protéine théorique de 444 acides aminés. La base de donnée NCBI ne met pas à disposition de séquences protéiques théoriques pour les variants n° 8 et n° 10, cependant, une possible ORF (allant d'un ATG à un codon stop), identique à celle des variants n° 3 et n° 7 est bien présente dans ces ARNm : ceci nous a ainsi permis de valider le choix de cette séquence comme étant l'ORF du gène *Tbc1d10c*. L'expérience de PCR réalisée dans la suite de l'étude permettra de valider ce choix.

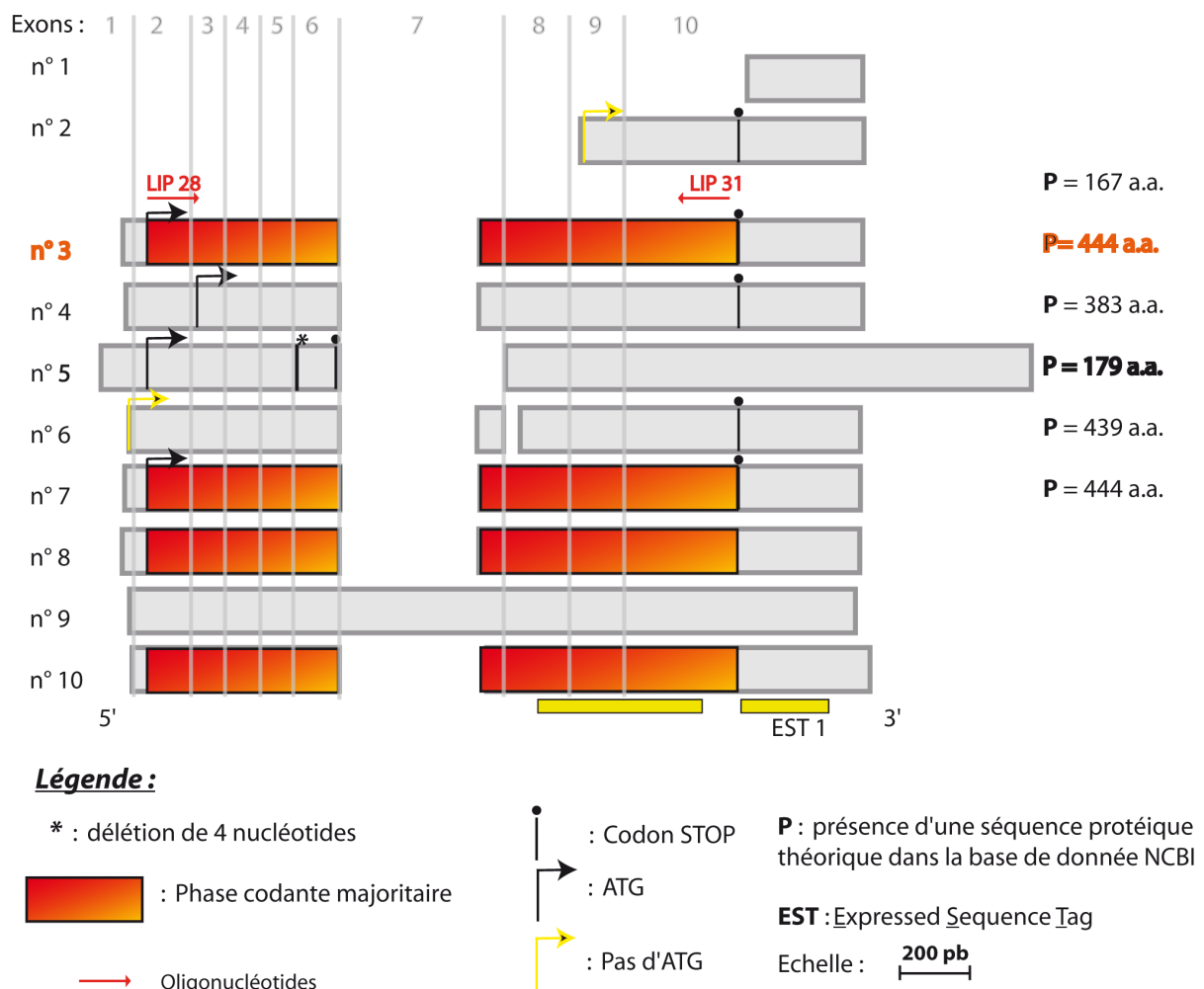


Figure 25 : Alignement des ARNm référencés dans la base de donnée NCBI pour le gène *Tbc1d10c* murin.

Tableau 11 : Tableau récapitulatif pour le choix de l'ADNc de la phase codante du gène *Tbc1d10c*.

Numéros des variants	Arguments en faveur	Arguments en défaveur	Taille attendue en PCR avec les amorces LIP28 et LIP31
n°1	-reconnu par l'EST 1	-Non reconnu par l'EST 2 -Non reconnu par la sonde RT-PCR -Pas de phase codante référencée	
n°2	-Reconnu par l'EST 1 -Reconnu par l'EST 2 -Phase codante référencée	-Phase codante sans ATG initiateur -Non reconnu par la sonde RT-PCR	
n°3	-Reconnu par l'EST 1 -Reconnu par l'EST 2 -Reconnu par la sonde RT-PCR -Phase codante référencée -Présence d'un ATG initiateur		1332pb
n°4	-Reconnu par l'EST 1 -Reconnu par l'EST 2 -Reconnu par la sonde RT-PCR -Phase codante référencée -Présence d'un ATG initiateur	-Utilisation d'un deuxième ATG en aval.	1332pb
n°5	-Reconnu par l'EST 1 -Reconnu par l'EST 2 -Reconnu par la sonde RT-PCR -Phase codante référencée -Présence d'un ATG initiateur	-différence de 4pb donnant lieu à un codon stop en phase de lecture dans l'exon 10.	1383pb
n°6	-Reconnu par l'EST 1 -Reconnu par l'EST 2 -Reconnu par la sonde RT-PCR -Phase codante référencée	-Phase codante sans ATG initiateur	1398pb
n°7	-Reconnu par l'EST 1 -Reconnu par l'EST 2 -Reconnu par la sonde RT-PCR -Phase codante référencée -Présence d'un ATG initiateur		1332pb
n°8	-Reconnu par l'EST 1 -Reconnu par l'EST 2 -Reconnu par la sonde RT-PCR	-Pas de séquence codante référencée	1332pb
n°9	-Reconnu par l'EST 1 -Reconnu par l'EST 2 -Reconnu par la sonde RT-PCR	-Pas de séquence codante référencée	1746pb
n°10	-Reconnu par l'EST 1 -Reconnu par l'EST 2 -Reconnu par la sonde RT-PCR	-Pas de séquence codante référencée	1332pb

**b) Amplification de la partie codante du gène
Tbc1d10c.**

Une amplification par PCR a été réalisée à l'aide des oligonucléotides LIP 28 et LIP 31 (Figure 25 page 139, pour les séquences cf Matériels et Méthodes), dans le but de cloner la partie codante du gène *Tbc1d10c*. Plusieurs mises au point ont été nécessaires pour amplifier le fragment d'ADNc de 1332 pb correspondant à la phase codante du gène *Tbc1d10c*.

Ainsi les paramètres suivants ont été testés :

- *La température d'hybridation des oligonucléotides*
- *Le type de Taq polymérase utilisée* : l'amplification la plus efficace de l'ADNc d'intérêt a été obtenue en utilisant la Taq-GC (ClonTech).
- *La banque d'ADNc utilisé comme matrice* : le meilleur rendement pour l'amplification du fragment a été obtenu en utilisant la banque d'ADNc issue de lymphocytes B triés.

Les oligonucléotides utilisés lors de la réaction de PCR permettent théoriquement d'amplifier des fragments de :

- 1746pb correspondant à l'amplification du variant n° 9.
- 1398pb correspondant à l'amplification du variant n° 6.
- 1383pb correspondant à l'amplification du variant n° 5.
- 1332pb correspondant à l'amplification du variant n° 3, 4, 7, 8 ou 10 (Figure 25 page 139 et Tableau 11 page 140).

Le dépôt sur gel d'agarose du produit de PCR n' pas mis en évidence de fragment de 1746pb (Figure 26 page 142) : ceci permettait ainsi d'exclure le variant n° 9 comme phase codante du gène *Tbc1d10c*. Sur la figure 26 (page 142), il n'est pas possible de différencier les fragments de 1398pb, 1383pb et 1332pb, cependant l'étape de séquençage réalisée après le clonage du produit de PCR dans le vecteur pTOPO-V5, a permis d'identifier la séquence codante des variants n°3, 4, 7, 8 ou 10 et non celle des variants n° 5 et n° 6. Ces résultats permettent de valider le choix de la séquence codante des variants n° 3, 4, 7, 8 ou 10 comme étant la phase codante du gène *Tbc1d10c*.

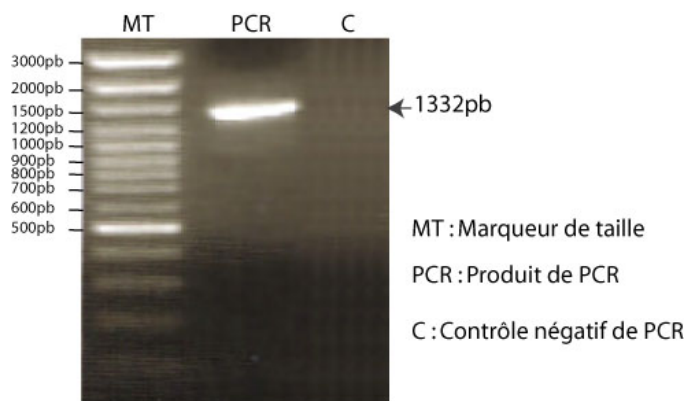


Figure 26 : Amplification de l'ADNc de la partie codante du gène *Tbc1d10c* à partir de l'ADNc de LB de souris Balb/c.

Le produit de PCR attendu, correspondant à la partie codante du gène *Tbc1d10c*, a une taille de 1332pb.

c) Clonage de l'ADNc de la phase codante du gène *Tbc1d10c* dans le vecteur *pTOPO-V5*

L'intérêt du vecteur *pTOPO-V5* est de permettre l'expression du produit protéique du gène cloné, fusionné à une étiquette peptidique de type V5, ce qui rend la protéine détectable en Western Blot à l'aide d'un anticorps anti-V5.

Le produit de PCR correspondant à la phase codante du gène *Tbc1d10c* a été cloné dans le vecteur *pTOPO-V5*, pour obtenir le vecteur *pTOPO-Tbc1d10c-V5* (Figure 27 page 143). Après transformation de bactéries compétentes avec le produit de ligation, le criblage des colonies possédant le vecteur a été réalisé par PCR à l'aide des oligonucléotides T7 et LIP34 (pour les séquences cf Matériels et Méthodes). Le vecteur *pTOPO-Tbc1d10c-V5* a ensuite été produit, puis l'ADNc codant pour *Tbc1d10c* a été séquencé à l'aide d'oligonucléotides s'hybridant à différents endroits, tout au long de la séquence de l'ADNc cloné. Cette étape a également eu pour but de vérifier la présence de la séquence d'intérêt (séquence codante des variants n° 3, 4, 7, 8 ou 10) et également de rechercher la présence d'éventuelles mutations pouvant être générées durant la phase d'amplification par PCR. De manière intéressante, le séquençage des différents vecteurs contenus dans les colonies a révélé la présence en grande majorité de la séquence codante correspondant aux variants n° 3, 4, 7, 8 ou 10. Cependant une autre séquence minoritaire non référencée dans la base de données NCBI, a été identifiée. Ce nouveau variant est caractérisé par un défaut d'épissage de l'intron situé entre les exons n° 6 et n° 7 : ceci a pour conséquence de placer un codon stop en phase de lecture et ainsi générer une protéine tronquée.

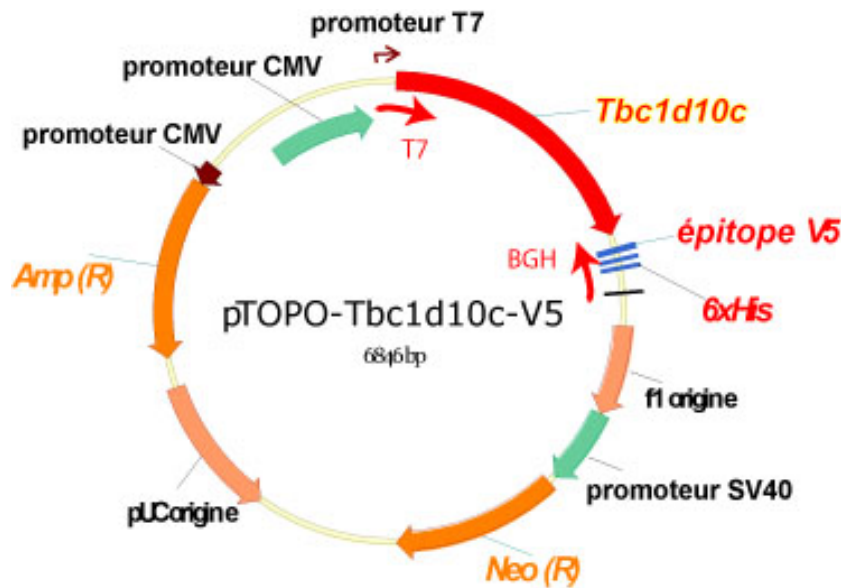


Figure 27 : Carte du vecteur pTOPO-Tbc1d10c-V5.

Le vecteur pTOPO-Tbc1d10c-V5 permet l'expression du produit du gène *Tbc1d10c*, fusionné à une étiquette peptidique de type V5.

Les oligonucléotides T7 et LIP34 ont été utilisés pour cribler les colonies contenant le vecteur, et pour le séquençage de *Tbc1d10c*.

2) Expression de *Tbc1d10c-V5* dans des fibroblastes humains.

Dans le but de tester la capacité du vecteur pTOPO-Tbc1d10c-V5 à exprimer *Tbc1d10c-V5*, nous avons réalisé une expérience de transfection de cellules 293T (lignée de fibroblastes humains) avec le vecteur pTOPO-Tbc1d10c-V5. Une analyse par Western Blot à l'aide d'un anticorps anti-V5 a été ensuite réalisée à partir de lysats cellulaires, récoltés 48h après transfection de cellules 293T avec le vecteur pTOPO-Tbc1d10c-V5. Cette analyse a permis de détecter la présence d'une bande située à 55 Kd (KiloDalton) correspondant au poids moléculaire théorique de *Tbc1d10c* couplé à son étiquette peptidique V5 (Figure 28). Ces résultats montrent que le vecteur pTOPO-Tbc1d10c-V5 permet bien l'expression d'une protéine *Tbc1d10c-V5* de taille attendue dans les cellules 293T transfectées.

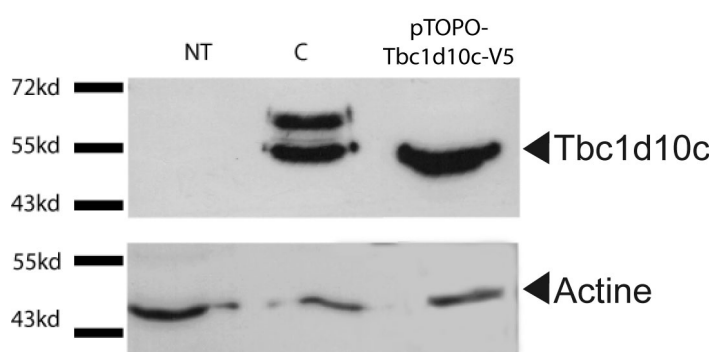


Figure 28 : Expression de *Tbc1d10c-V5* dans des fibroblastes humains (293T).

Analyse par Western Blot du lysat de cellules 293T, 48h après transfection avec : i) le vecteur contrôle pTOPO-XRCC4-V5, ii) le vecteur pTOPO-Tbc1d10c-V5.

NT : cellules non transfectées ;
C : contrôle : pTOPO-XRCC4-V5.

D) Modulation de l'expression de Carabin par ARN interférence

L'expression du gène *Tbc1d10c* dans les lymphocytes B est diminuée au cours du LED chez l'homme ($p=0,012$) et la souris BW ($p=0,007$). En vue d'étudier dans un premier temps le rôle biologique de *Tbc1d10c* dans les lymphocytes B, nous avons souhaité moduler son expression dans les cellules B par une technique d'interférence ARN. L'interférence ARN a pour avantage de permettre la diminution d'expression d'une protéine cible en provoquant la dégradation de son ARNm (Figure 29 page 145). Cette technique est donc une méthode de choix pour induire une baisse de l'expression du produit du gène *Tbc1d10c*. Pour réaliser l'inhibition de l'expression de *Tbc1d10c*, nous avons choisi de cloner des shRNA (Short Hairpin RNA) dirigés contre l'ARNm de *Tbc1d10c* dans un vecteur lentiviral (pTRIP), en vue de transduire des cellules B. Cette technique a pour avantage de permettre l'intégration du vecteur dans le génome de la cellule transduite et ainsi de générer une lignée stable exprimant le shRNA. Une analyse du phénotype des lymphocytes B (activation, commutation de classe d'immunoglobuline, voies de signalisation intracellulaires) après inhibition de l'expression de *Tbc1d10c* permettra ensuite éventuellement de définir une ou plusieurs fonctions pour cette protéine. A plus long terme, l'infection d'embryons de souris par les vecteurs lentiviraux produits, permettra de générer une souris sous-exprimant *Tbc1d10c* ("knock down"), et définir le développement éventuel d'un phénotype lupique *in vivo*.

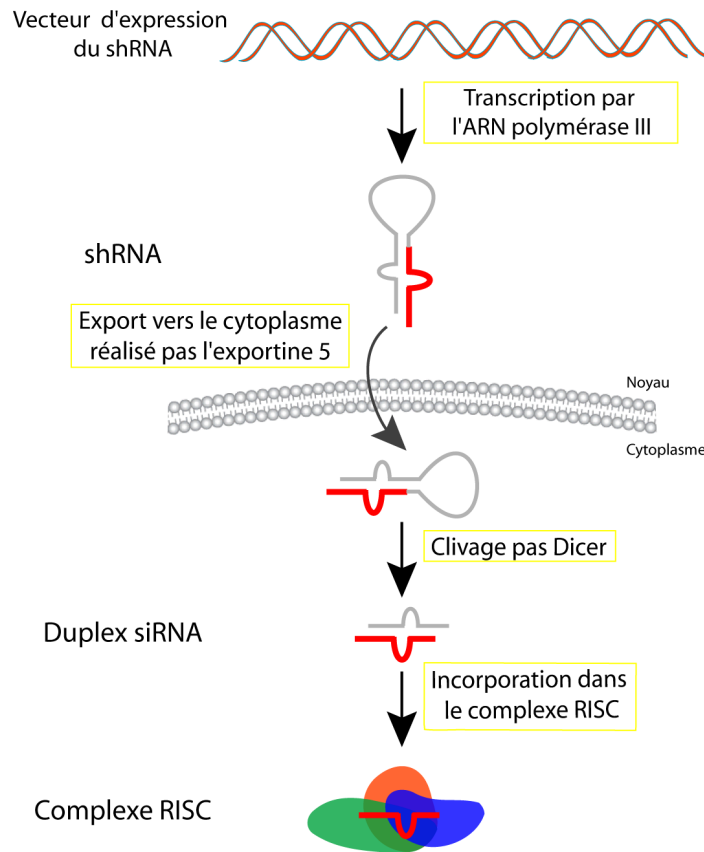


Figure 29 : Mécanisme de l'ARN interférence.

Les shRNA exprimés par le vecteur sont exportés par l'Exportine 5 dans le noyau. Après clivage par Dicer, le duplexe siRNA va être incorporé dans le complexe RISC et permettre la dégradation du transcrit cible.

1) Clonage des shRNA dirigés contre l'ARNm de *Tbc1d10c* dans le vecteur pSUPER

Pour réaliser l'inhibition de l'expression de *Tbc1d10c*, nous avons testé dans un premier temps huit shRNA différents dirigés contre l'ARNm de *Tbc1d10c*, dans le système pSUPER. Le vecteur pSUPER a pour particularité de placer les shRNA sous la dépendance d'un promoteur eucaryotique de type H1 (Figure 23 page 100 matériels et méthodes), permettant la transcription du shRNA par l'ARN polymérase III. Ce vecteur nous permettra dans un premier temps de tester l'efficacité des différents shRNA après transfection de cellules 293T. Pour générer une lignée stable exprimant le shRNA, la cassette contenant le promoteur H1 suivi du shRNA sera ensuite clonée dans le vecteur lentiviral pTRIP. Nous avons choisi des séquences de shRNA (selon les critères détaillés dans la partie Matériels et Méthodes) s'hybridant à différents endroits le long du transcrit de *Tbc1d10c* (Figure 30 page 146).

1/20. Les lysats cellulaires des cellules co-transfectées sont récoltés 24h et 48h après co-transfection et l'expression du produit de *Tbc1d10c* est analysée par Western Blot à l'aide d'un anticorps anti-V5 (Figure 31). 24h après co-transfection avec les vecteurs dans un rapport : pTOPO-Tbc1d10c-V5 / pSUPER-shRNA de 1/10, on observe une baisse de l'expression de Tbc1d10c-V5, par rapport au contrôle, lors de la co-transfection avec les vecteurs pSUPER-shRNA n° 1 et n° 3. De plus, ce résultat est également observable 24h après co-transfection dans un rapport de vecteurs de 1/20. Cependant la baisse d'expression de Tbc1d10c-V5 semble moins forte 48h après co-transfection que ce soit dans un ration de 1/10 ou de 1/20. Ceci peut s'expliquer par des différences de vitesse de répllication des deux vecteurs, pouvant biaiser le rapport molaire entre eux. Néanmoins, ces résultats indiquent que le système d'ARN interférence semble avoir fonctionné avec les vecteurs pSUPER n° 1 et n° 3. Ces deux vecteurs ont donc été choisis en vue du clonage de leurs cassettes contenant le promoteur H1 et le shRNA, dans le vecteur lentiviral pTRIP.

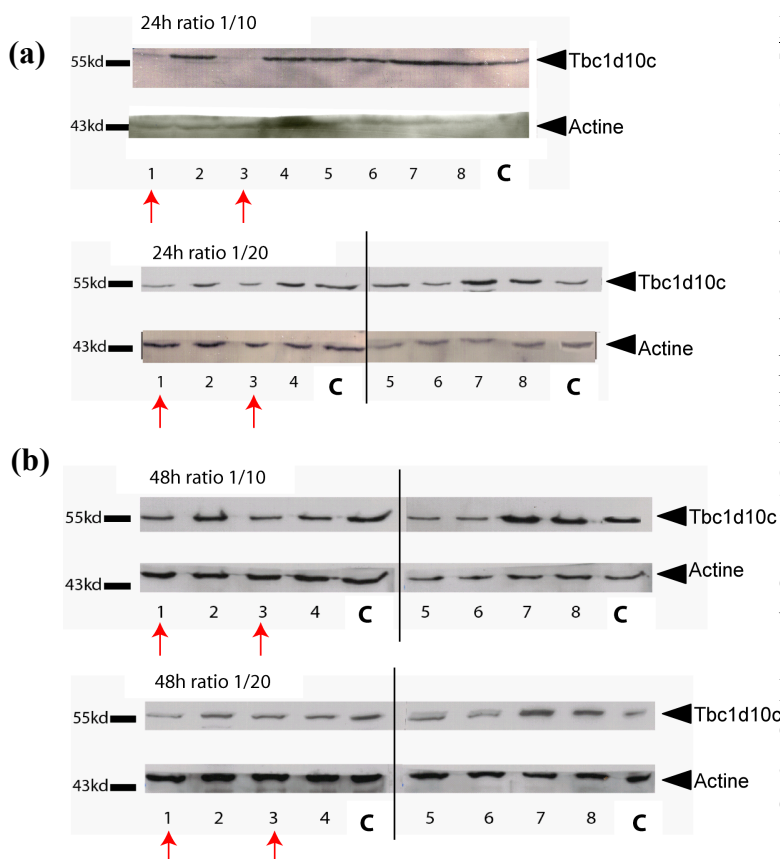


Figure 31 : Expression de Tbc1d10c après co-transfection de cellules 293T avec les vecteurs pTOPO-Tbc1d10c-V5 et pSUPER-shRNA.

Analyse par Western Blot des lysats de cellules 293T 24h (a) ou 48h (b) après co-transfection avec les vecteurs pTOPO-Tbc1d10c-V5 et pSUPER-shRNA dans un rapport molaire de 1/10 ou 1/20. L'expression de Tbc1d10c-V5 a été testée après co-transfection avec le vecteur pTOPO-Tbc1d10c-V5 et 8 vecteurs pSUPER-shRNA différents (numérotés de 1 à 8), le vecteur pSUPER sans shRNA servant de contrôle (C).

L'expression de Tbc1d10c-V5 est détectée à l'aide d'un anticorps anti-V5, et celle de l'actine à l'aide d'un anticorps anti-actine.

2) Clonage des shRNA dans le vecteur lentiviral pTRIP

Une digestion de pSUPER-shRNA à l'aide des enzymes de restriction Sall et XbaI, a permis l'obtention de fragments d'ADN constitué de la cassette contenant le shRNA en aval du promoteur H1 (Figure 23 page 100, Matériels et méthodes). Cette cassette a ensuite été clonée dans le vecteur lentiviral pTRIP digéré avec Sall et NheI. Après transformation de bactéries compétentes avec les vecteurs pTRIP-shRNA, le criblage des colonies possédant le vecteur a été réalisé par PCR à l'aide des oligonucléotides LIP 86 et LIP 105. En vue de vérifier la séquence des différents vecteurs, une étape de séquençage a également été réalisée.

E) Etude de l'effet d'une sous-expression de Carabin *in vitro* dans une lignée de lymphocytes B

Afin d'étudier l'implication de Carabin dans la fonction des lymphocytes B, nous avons utilisé les constructions lentivirales décrites précédemment pour transduire une lignée de lymphocyte B : la lignée A20. Cette lignée a été choisie car elle est caractérisée par l'expression d'une IgG de surface et peut donc être facilement activée par un anticorps anti-IgG. Les résultats des expériences de modulation de l'expression de Carabin dans la lignée A20 sont consignés dans la partie "Carabin underexpression led to an acceleration of Erk signaling in B cells" de l'article 2 (page 160). Ces résultats ont permis de montrer que la sous-expression de Carabin dans les cellules A20 provoque une augmentation de l'expression basale des marqueurs d'activation CD86 et CD69, et une accélération spécifique de la voie Erk après stimulation du BCR.

F) Etude de l'effet d'une sous-expression de Carabin chez la souris

1) Souris Carabin KD

Dans le but d'étudier la fonction de Carabin *in vivo*, nous souhaitons analyser les effets de la sous-expression de Carabin chez la souris. Pour ce faire nous avons dans un premier temps généré une lignée de souris exprimant le shRNA spécifique de Carabin aboutissant à une sous-expression de Carabin *in vivo*, par la technique de transgénèse

lentivirale (en utilisant les mêmes lentivirus que ceux utilisés dans les expériences réalisées sur les cellules A20 *in vitro*).

a) Vérification du modèle Carabin KD

Les souris fondatrices obtenues après transgénèse contiennent dans la plupart des cas plusieurs intégrations de la construction lentivirale dans leurs génomes. Nous avons tout d'abord cherché à sélectionner les souris possédant une seule intégration virale, dans le but d'avoir une homogénéité d'expression du shRNA, et un KD reproductible, dans nos souris. En effet, au fur et à mesure des générations, les copies de lentivirus intégrées ségrègent et ceci a pour conséquence d'obtenir des souris présentant des sous-expressions variables de Carabin. Un génotypage classique à partir d'ADN génomique de queue de souris permet d'identifier les souris ayant au moins une intégration mais ne permet pas de définir le nombre d'intégrations. Nous avons donc déterminé par Southern Blot le nombre d'intégrations du lentivirus dans les souris fondatrices et dans certains de leurs descendants. La [figure 32](#) représente un exemple de Southern Blot.

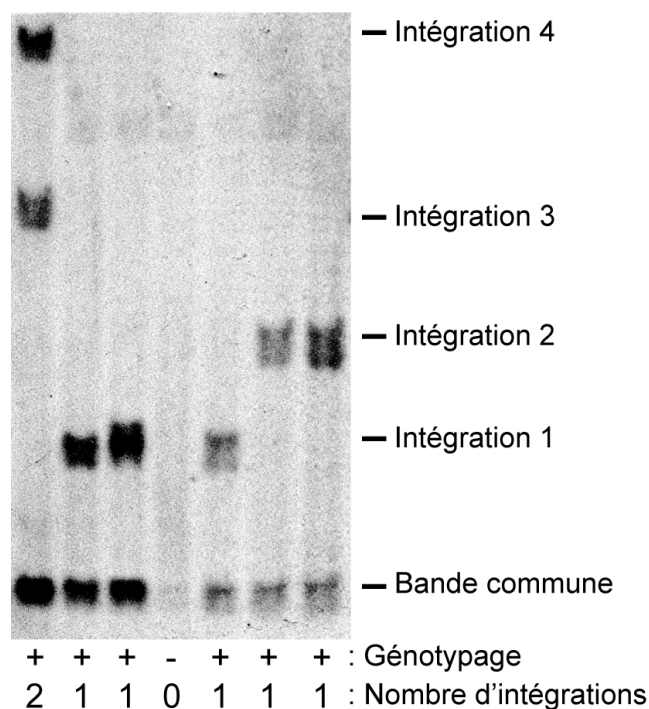


Figure 32 : Détermination du nombre d'intégrations lentivirales dans le génome des souris lentigéniques.

La sonde utilisée pour le Southern-Blot permet la détection à la fois d'une bande de taille fixe, commune à toutes les intégrations, et d'une bande de taille variable, propre à chaque intégration (voir Matériels et Méthodes).

Nous avons ensuite vérifié par Western blot la sous-expression de Carabin dans la rate de souris possédant des nombres d'intégrations différents. Malheureusement, aucune des souris ayant une seule intégration lentivirale n'a présenté de diminution dans l'expression de Carabin. Une sous-expression de Carabin a été observée uniquement chez trois souris fondatrices ayant plusieurs intégrations lentivirales et présentant donc une variabilité dans le la sous-expression de Carabin (Figure 33). Après croisement, ces souris fondatrices n'ont pas donné de descendance avec un nombre d'intégration permettant une sous-expression suffisante de Carabin. Ainsi, l'analyse de l'effet de la sous-expression de Carabin dans ce modèle se résume à l'étude de seulement 3 souris Carabin KD.

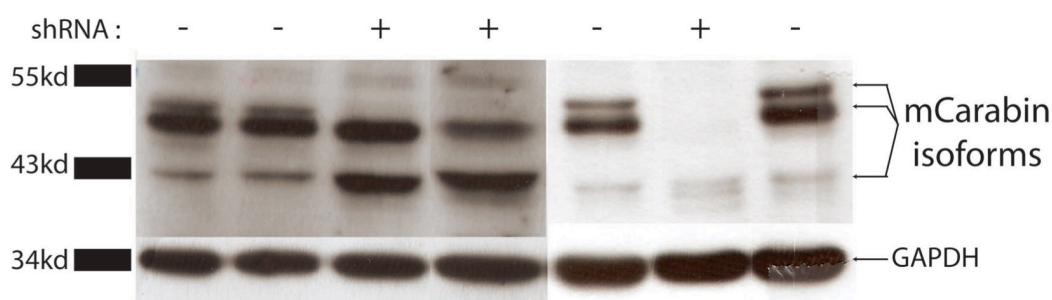


Figure 33 : Expression de Carabin dans les cellules de rate de souris Carabin KD et de souris contrôles.

Plusieurs explications sont possibles quant à l'absence de KD chez les souris ayant une seule intégration :

- **Le contexte génomique.** Certaines régions du génome sont plus accessibles que d'autres à la transcription. Ceci est essentiellement dépendant de l'état de méthylation de l'ADN. Si le transgène est intégré dans une région hyper-méthylée, la transcription du shRNA peut être diminuée voir totalement inhibée.
- **L'efficacité du shRNA *in vivo*.** Bien que le shRNA spécifique de Carabin utilisé pour la génération des souris lentigéniques soit le même que celui utilisé dans les expériences *in vitro*, un doute subsiste quant à l'efficacité du shRNA *in vivo*.
- **L'efficacité du promoteur.** Le promoteur permettant l'expression du shRNA est de type H1. La cassette d'expression du shRNA est située dans la partie LTR (Long terminal repeat) de la construction lentivirale. Lors de l'intégration du génome virale dans celui de la cellule hôte, la partie LTR va être dupliquée. Deux cassettes d'expression du shRNA sont donc *in fine* présentes dans le génome de la cellule transduite. Le promoteur H1 a été utilisé *in vivo* avec succès dans une étude

précédente, cependant l'information quant au nombre d'intégrations du virus dans cette étude est absente (Tiscornia 2003).

- Enfin, et surtout, **le nombre de d'intégrations lentivirales**. Le KD de Carabin est efficace dans les cellules A20 Carabin KD transduites avec le même lentivirus que celui utilisé pour la transgénèse lentivirale. Cependant, le nombre d'intégrations présentes dans ces cellules A20 Carabin KD est probablement très élevé, ce qui explique une supériorité de l'efficacité du KD *in vitro* par rapport à la situation observée *in vivo*.

De plus, il est à noter qu'aucune expression de GFP n'a été détectée *in vivo*. Ceci était probablement dû à une mauvaise efficacité du promoteur CMV (duquel l'expression de la GFP dépend) *in vivo*, ou également du faible nombre d'intégrations lentivirales dans le génome des cellules. Pour l'étude du deuxième gène (voir partie "Etude de la fonction de Sh3kbp1" [page 195](#)) nous avons remplacé dans le vecteur lentiviral le promoteur CMV par le promoteur de l'Ubiquitine C humaine.

b) Résultats obtenus sur les 3 souris Carabin KD

i. Analyse des souris Carabin KD

Dans le but d'évaluer l'effet d'une sous-expression de Carabin dans la maturation des lymphocytes B et T, nous avons dans un premier temps analysé par cytométrie de flux les différentes sous-populations de lymphocytes B et T dans la rate, les ganglions et le thymus des trois souris Carabin KD. Les résultats de cette analyse sont consignés dans le [tableau 12 \(page 152\)](#). Les souris Carabin KD n'ont pas montré pas de différence statistiquement significative d'une population lymphocytaire que ce soit en terme de pourcentages de cellules, ou en terme de nombres absolus. Ces résultats suggèrent que Carabin n'est pas impliqué dans les processus de maturation des lymphocytes B et T. Cette observation confirme également, dans un système plus physiologique, les résultats obtenus par Pan et al (F. Pan et al. 2007). Dans cette étude, les auteurs ont montré que le transfert de cellules souches embryonnaires (HSC), préalablement transduites avec un lentivirus exprimant un shRNA anti-Carabin, dans des souris receveuses, n'affecte pas le développement des lymphocytes T.

Tableau 12 : Analyse par cytométrie en flux des sous-populations lymphocytaires des souris Carabin KD et contrôles.

	n=5 Contrôles	n=3 Carabin KD
Nombre de cellules totale (x10⁶)		
Rate	101 ± 25,3	157 ± 80
Ganglions	1,1 ± 0,5	4,4 ± 3
Rate		
Lymphocytes B	66,2% ± 2,6 (66,7.10 ⁶ ± 15,9)	40,1% ± 13,9 (54,6.10 ⁶ ± 13,9)
LB Transitionnels 1	11,0% ± 0,92 (11,2.10 ⁶ ± 3,6)	18,3% ± 7,15 (33,8.10 ⁶ ± 3,3)
LB Transitionnels 2	4,13% ± 0,49 (4,15.10 ⁶ ± 1,1)	8,37% ± 1,1 (12,5.10 ⁶ ± 6)
LB Folliculaires	80,12% ± 2,0 (80,9.10 ⁶ ± 20,4)	74,53% ± 5,61 (113.10 ⁶ ± 62)
LB de la zone marginale	11,8% ± 2,18 (11,9.10 ⁶ ± 3,2)	15,7% ± 1,6 (25,6.10 ⁶ ± 18)
Lymphocytes T CD4+	15,0 % ± 0,8 (13,0.10 ⁶ ± 0,5)	13,6% ± 3,4 (13,7.10 ⁶ ± 3,4)
Lymphocytes T CD8+	7,51 % ± 2,1 (6,5.10 ⁶ ± 1,8)	8,32% ± 2,5 (8,3.10 ⁶ ± 2,5)
Ganglions		
Lymphocytes B	44,0% ± 17,2 (0,6.10 ⁶ ± 0,1)	50,4% ± 16,6 (2,6.10 ⁶ ± 2)
Lymphocytes T CD4+	23,6% ± 9,1 (0,35.10 ⁶ ± 0,1)	16,8% ± 0,07 (1.10 ⁶ ± 0,1)
Lymphocytes T CD8+	21,6% ± 10,5 (0,3.10 ⁶ ± 0,1)	14,6% ± 2,4 (0,9.10 ⁶ ± 0,2)
Thymus		
Lymphocytes T CD4+	6,8% ± 1,37	8,2% ± 1
Lymphocytes T CD8+	1,9% ± 0,5	2,06% ± 0,7
DN	3,9% ± 2,54	4,5% ± 1
DP	84,2% ± 2,4	85,1% ± 2,2

ii. Activation des lymphocytes B et T de souris Carabin KD

Dans les lymphocytes T, Carabin a été décrit comme un régulateur négatif de la voie de signalisation du TCR. Au vu des similarités des voies de signalisation du TCR et du BCR, il est légitime de suspecter un rôle semblable pour Carabin dans les lymphocytes B. Pour répondre à cette question nous avons activé les cellules B ou T de souris Carabin KD en utilisant différents stimuli, puis mesuré 1) la surexpression des marqueurs d'activation et la prolifération cellulaire par cytométrie de flux, et 2) la sécrétion d'immunoglobulines dans le surnageant de culture par ELISA.

Les résultats n'ont montré aucune différence d'activation des cellules B (en terme de surexpression des marqueurs d'activation) et de prolifération en réponse à un stimulus BCR-dépendant (anticorps anti-IgM) ou BCR indépendant (LPS et LPS+IL-4) (Figure 34 page 154) en ce qui concerne la sécrétion d'Ig, la sécrétion d'IgM semble être plus importante après activation, pour l'une des souris Carabin KD (Figure 35a page 155). De plus, les cellules B Carabin KD semblent produire plus d'IgG, 72h après une stimulation de type LPS et LPS+IL-4 (Figure 35b page 155).

De plus, nos résultats ont permis de montrer que, contrairement à la situation observée dans les lymphocytes B, la prolifération des lymphocytes T (et, dans une moindre mesure, la surexpression du marqueur d'activation CD69) augmente de manière nette chez la souris carabin KD après stimulation avec un anticorps anti-CD3 (Figure 36 page 155). Ces résultats confirment ceux obtenus sur des cellules humaines par Pan et al., décrivant une augmentation de la prolifération de cellules T Carabin KD associée à une augmentation de la production d'IL-2, après une stimulation TCR-dépendante.

Cependant, malheureusement cette analyse n'a pu être réalisée que sur 2 souris, étant donné que les fondateurs Carabin KD n'ont jamais donné de descendance.

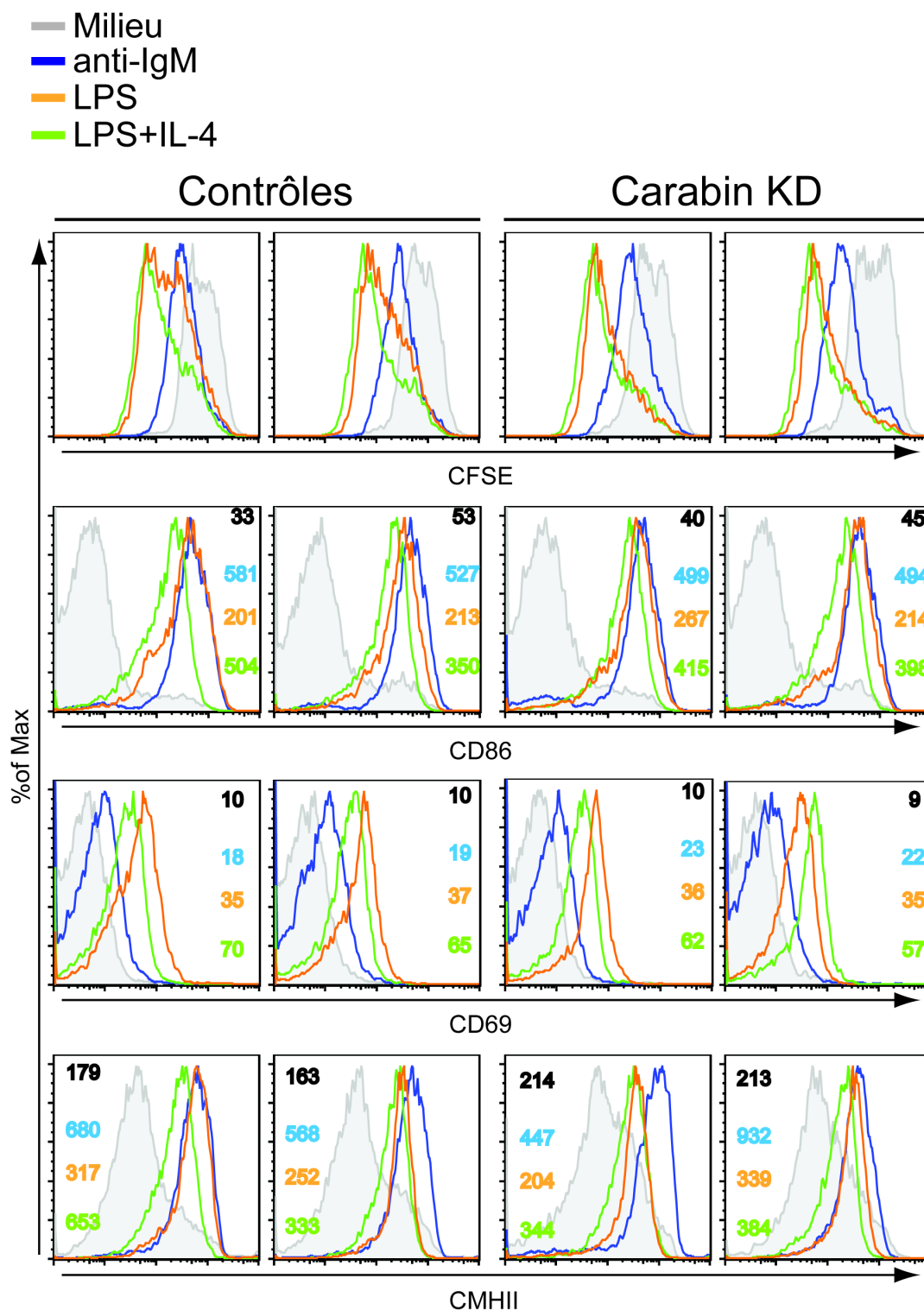


Figure 34 : La réponse des lymphocytes B à une stimulation BCR-dépendante ou BCR-indépendante est comparable dans les souris Carabin KD et les souris contrôles.

Analyse par cytométrie de flux de la prolifération et de l'expression des marqueurs d'activation CD86, CD69 et CMHII sur les cellules B (B220⁺) de rate de souris Carabin KD et contrôles. Les cellules de rates ont été stimulées avec un anticorps anti-IgM (10 µg/ml), du LPS (10 µg/ml) ou du LPS (10 µg/ml) plus de l'IL-4 (20 ng/ml) pendant 48h.

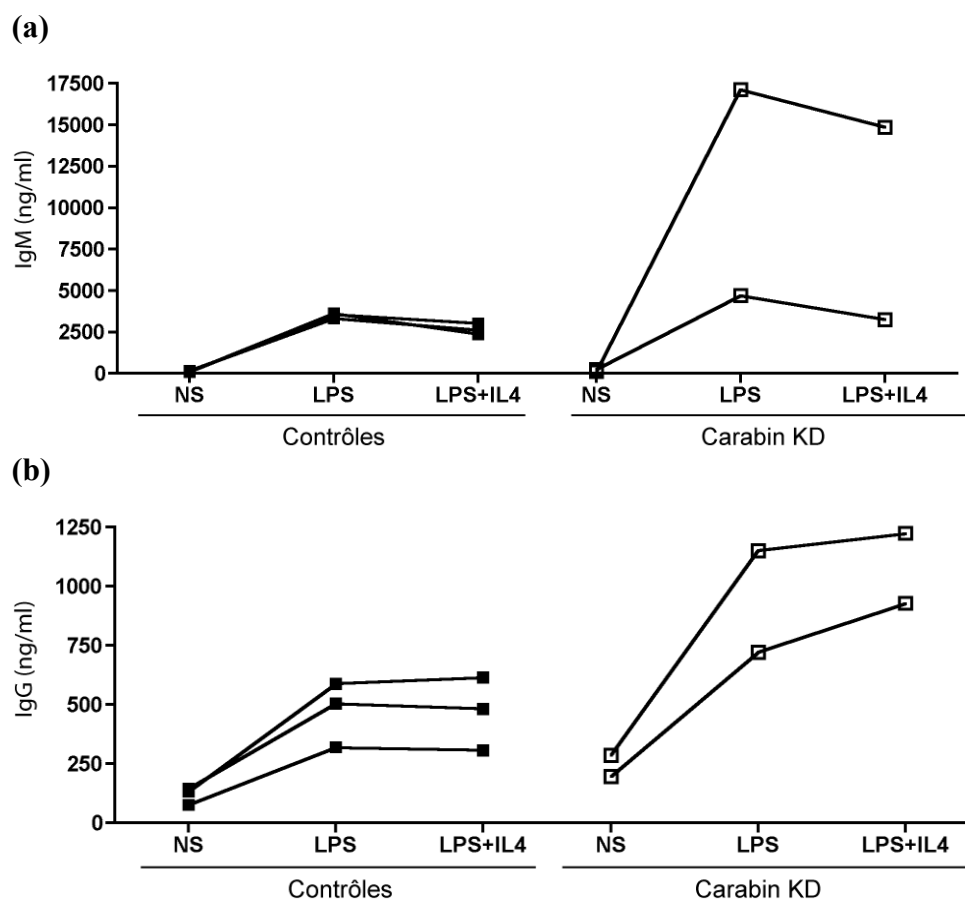


Figure 35 : Production d'immunoglobulines dans le surnageant de culture de cellules B Carabin KD stimulées de façon BCR-indépendante.

Les surnageant de culture ont été récoltés 48h après stimulation de cellules spléniques par du LPS (10 µg/ml) ou du LPS (10 µg/ml) plus de l'IL-4 (20 ng/ml). Le dosage des IgM (a) ou des IgG totales (b) à été réalisé par ELISA.

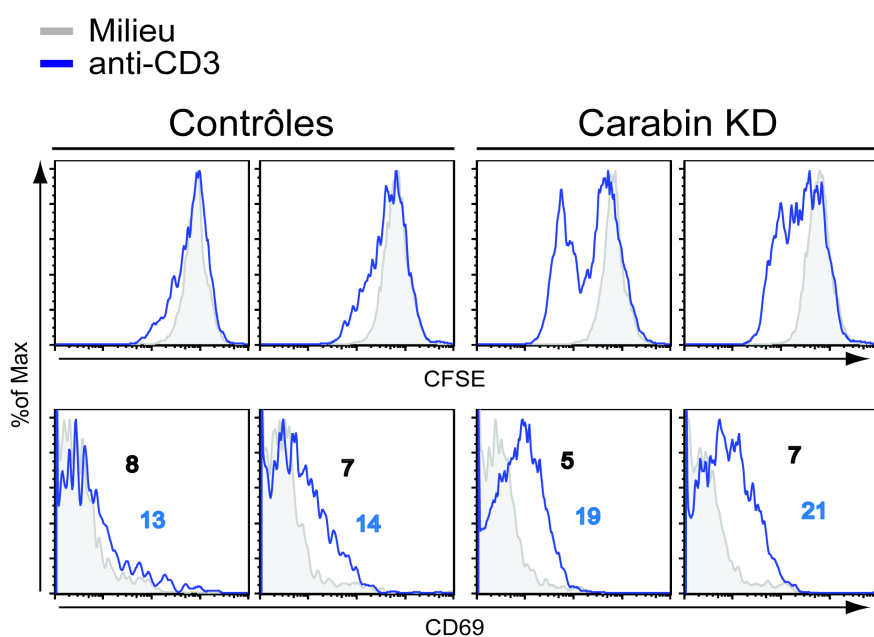


Figure 36 : Augmentation de la prolifération et de la surexpression du marqueur d'activation CD69 dans les cellules T Carabin KD après activation de la voie du TCR.

Analyse par cytométrie de flux de la prolifération et de l'expression du marqueur d'activation CD69 sur les cellules T (CD4⁺) de rate de souris Carabin KD et contrôles. Les cellules de rate ont été stimulées avec un anticorps anti-CD3 (2 µg/ml) pendant 48h.

2) Souris Carabin KO et KO conditionnelles

Etant donné les fonctions importantes décrites pour Carabin dans les lymphocytes T en 2007 par Pan et al., nous avons engagé, en parallèle de la genèse de souris Carabin KD, la production de souris dans lesquelles les exons 4 et 5 du gène Carabin sont floxés, en collaboration avec l'Institut Clinique de la Souris (ICS, Strasbourg). Ces souris nous ont permis d'évaluer l'effet d'un KO complet de *Carabin* chez la souris mais également d'analyser l'effet d'une déficience du gène *Carabin* spécifiquement dans les lymphocytes B ou T.

L'article 2 présente les résultats obtenus suite à l'analyse des souris Carabin KO et KO conditionnelles.

Article 2

Carabin, a negative regulator of B cells, points out a new defective biological pathway in systemic lupus erythematosus

Jean-Nicolas Schickel¹, Jean-Louis Pasquali^{1,3,5}, Anne Soley^{1,3}, Anne-Marie Knapp^{1,3}, Marion Decossas¹, Luc Marcellin⁴, Anne-Sophie Korganow^{1,3,5}, Thierry Martin^{1,3,5} and Pauline Soulas-Sprauel^{1,2,5}.

Author affiliations:

1: CNRS UPR9021, IBMC, Strasbourg, France; **2:** Université de Strasbourg, UFR Sciences Pharmaceutiques, Illkirch, France; **3:** Université de Strasbourg, UFR Médecine, Strasbourg, France; **4:** Department of Anatomopathology, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France. **5:** Department of Clinical Immunology, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France.

Address correspondence and reprint requests to Dr Pauline Soulas-Sprauel, CNRS UPR9021, IBMC, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France. Phone: +33 3 88 41 70 25; Fax: +33 3 88 61 06 80; E-mail: Pauline.soulas@ibmc-cnrs.unistra.fr

Summary

Carabin is a known negative regulator of T cells that inhibits calcineurin and Ras pathways. Here, we show that Carabin is also a negative regulator of B cells. Upon BCR stimulation, Carabin deficient B cells accelerate Erk phosphorylation. *In vivo*, Carabin deficient mice speed up both T-dependent and T-independent B cell responses. Moreover, CpG treatment of non autoimmune-prone Carabin deficient mice induces a prolonged overproduction of anti-DNA autoantibodies and a lupus-like glomerulonephritis. Finally, B-cell Carabin expression is low in young (NZB/NZW) F1 mice before the appearance of the disease, is associated with increased Erk phosphorylation, and is also low in a subset of lupus patients. Taken together, these results point to Carabin as a new player in autoimmunity.

Introduction

The mechanisms of B cell-dependent autoimmunity are not entirely elucidated. Generally speaking, B cell autoimmunity could result from the loss of one of the mechanisms which normally lead to the establishment of B cell tolerance (deletion, anergy, receptor editing), or could be the consequence of a faulty negative regulation of mature B cells, these mechanisms being not mutually exclusive. Indeed, intrinsic defects of several B-cell negative regulators lead to the development of a systemic lupus erythematosus (SLE)-like disease in mice^{1,2}, with production of antinuclear autoantibodies, sometimes associated to the development of a glomerulonephritis (GN). B-cell dependent autoimmunity has been described for defects of the following B-cell negative regulators: 1) negative regulators of BCR belonging to inhibitory co-receptors pathways, including BCR co-receptors which modulate BCR signaling negatively (CD22³⁻⁶, and 9-O-acetyl sialic acid esterase or Siae⁷, which regulates the function of CD22, FcγRIIB⁸, PD-1⁹), kinases phosphorylating co-receptors ITIM motifs after BCR/co-receptor association (Lyn¹⁰), and finally phosphatases being recruited by the phosphorylated ITIMs (SHP1¹¹); 2) B cell negative regulators of BCR-independent pathways, for example Act1 (TRAF3IP2)^{12, 13}, which negatively regulates CD40 and BAFF-R pathways, and the ubiquitin-modifying enzyme A20 (TNFAIP3), regulating NF-κB signals in TLR, BCR, BAFF-R and CD40 pathways^{14, 15}.

SLE, a prototype of human systemic autoimmune disease, is characterized by a wide variety of multi-organ damages (among which one of the hallmarks is GN), triggered by an autoantibody-mediated inflammation¹⁶. The genetic predisposition to SLE is clearly supported by the high disease concordance rate for monozygotic twins (24-58%). Surprisingly, among the negative regulators of B cells described above, only two (A20 and FcγRIIB) have been shown to be candidate genes for human SLE¹⁷. Yet, several lines of evidence indicate that B cells are central to the disease process¹⁸: 1) B cells produce the autoantibodies, some of which are clearly pathogenic by immune complex deposits or by destroying their target; 2) (NZBxNZW)F1 and MRL-Fas^{lpr/lpr} (murine models of human SLE) mice harboring the *xid* mutation, which inactivates Btk and causes a blockade of B cell development and B cell responses, no longer develop lupus phenotype, including autoantibodies and GN^{19, 20}, as do (NZBxNZW)F1 mice having a very restricted IgM transgenic repertoire²¹; 3) the disease can be transferred in mice by B cells: immunodeficient SCID mice populated with pre-B cells of (NZBxNZW)F1 mice, but not those populated with

pre-B cells from non autoimmune mice, develop many of the characteristics of (NZBxNZW)F1 mice, suggesting that genetic defects responsible for the development of SLE disease in (NZBxNZW)F1 mice are expressed in their B cells²².

Taking into account the crucial role of B cells in the development of autoimmunity, and notably of SLE, we can hypothesize that the defect of other, yet unknown negative regulators of B cells, could be linked to the development of autoimmunity (and SLE in particular) in mice and in humans. Carabin (TBC1D10C) was recently described as a negative regulator of T cell function, by a dual inhibitory activity on calcineurin (by its carboxy-terminal domain of interaction with calcineurin) and Ras (by its amino-terminus Ras/GAP domain) pathways²³. Knockdown of Carabin leads notably to a significant enhancement of IL-2 production by specific T cells after antigen stimulation. Considering the important molecular similarities of antigen receptor signaling in T and B cells, including the role of Ras and Calcineurin pathways in BCR signaling, we decided to evaluate the role of Carabin in B cells, which is currently unknown, and to look for signs of autoimmunity in Carabin deficient mice. For these purposes, we analyzed the phenotype of Carabin knock-down (KD) A20 B cells, we generated Carabin knock-out (KO) and B cell specific conditional KO mice, and analyzed B cell functions and autoimmune symptoms in these animals. Our results support the idea that Carabin is a negative regulator of B cell responses, and that its deficiency can lead to autoimmunity. In addition, we show that Carabin expression is low in B cells from (NZBxNZW)F1 mice and from patients with quiescent SLE.

Results

Carabin expression is tightly regulated during B cell development and activation.

Since the role of Carabin in B cell function was totally unknown, we analyzed the variation of Carabin expression in normal murine B cells after activation, and during B cell development in mice. BCR or LPS activation lead to a fast decrease of Carabin expression (**Fig. 1a, b**). In addition, Carabin expression was tightly regulated during B cell maturation in normal mice, with a gradual increase from bone marrow pro/preB cells to splenic mature follicular B cells (**Fig. 1c**). The highest expression of Carabin in mature B cells could be indicative of a more important role of Carabin in mature B cell function.

Carabin underexpression led to an acceleration of Erk signaling in B cells.

To clarify the function of Carabin in B cells, we first analyzed the phenotype of Carabin KD IgG⁺, A20 B cell line transduced with a pTRIP lentivirus allowing for the expression of a *Carabin* specific shRNA. pTRIP-shCarabin transduced A20 B cells showed a 70% decrease of *Carabin* expression compared to pTRIP-control transduced A20 B cells, as assessed by quantitative real-time RT-PCR (**Fig. 2a**). The underexpression of Carabin was further confirmed by Western-Blot analysis (**Fig. 2b**). When compared to control A20 B cells, Carabin KD A20 B cells induced a modest increase in the expression of CD86 and CD69 activation markers before and after stimulation with LPS or anti-IgG antibody (**Fig. 2c**). Because Carabin has been shown in T cells to inhibit Ras pathway and Erk1/2 phosphorylation²³, we evaluated the effects of Carabin KD on the Ras pathway in A20 B cells. Interestingly, Carabin KD accelerated Erk1/2 phosphorylation in BCR-stimulated B cells (**Fig. 2d**). This effect was specific for the BCR pathway, because LPS stimulation did not lead to a faster Erk1/2 phosphorylation in Carabin KD A20 B cells, compared to control B cells (data not shown). To test the specificity of Carabin for the Ras MAP kinase signaling pathway in B cells, we analyzed the activation of another related member of the MAP kinase superfamily, c-Jun N-terminal kinase, which is not targeted by Ras. JNK phosphorylation was not affected by Carabin KD in A20 B cells (**Fig. 2e**). In conclusion, Carabin is a negative regulator of Ras/Erk pathway in B cells, as described for T cells²³.

Production of Carabin KO and conditional KO mice.

In order to fully analyze Carabin function *in vivo*, we generated Carabin KO mice. Mice with complete Carabin deficiency were generated by introduction of loxP sites on both sides of the 4th-5th exons (**Supplementary Fig. 1a, b**), because the TBC domain, responsible for the Ras GAP activity, extends from the 4th to the 8th exon, and because the 5th exon contains the Arg139 (5th exon), corresponding to Arg141 in humans, and which is necessary for this activity²³. Targeted ES clone were used to generate Carabin flox mouse line, which was then crossed to an ubiquitous Cre deleter (for the production of Carabin KO mouse line) or with T or B cell specific Cre transgenic animals. The validation of exons 4-5 deletion strategy was performed on Carabin ^{-/-} mice. Carabin mRNA expression was analyzed by quantitative real-time RT-PCR in splenocytes from Carabin ^{-/-} mice using different probes, showing an complete absence of production of any transcript containing exons 4-5, but the production of transcripts containing exons 2-3 or exons 6-7 (**Supplementary Fig. 1c**). This suggests the expression of a shorter transcript in Carabin ^{-/-} mice compared with Carabin ^{+/+} mice, which

could be the result of an out-of-frame splicing of exon 4 to 6, generating a premature stop codon immediately downstream exon 6 (data not shown). In addition, Western-Blot analysis failed to detect any Carabin expression in Carabin *-/-* splenocytes and thymocytes (**Supplementary Fig. 1d**). To analyze the specific role of Carabin in B or T cells, we developed two Carabin conditional KO models: 1) an immature B cell model, by crossing Carabin *f/-* mice to Mb1-Cre animals (The *Mb-1* gene encodes the Ig- α subunit of the BCR, and is expressed at the very early pro-B cell stage in bone marrow²⁴); 2) a mature T cell model, by crossing Carabin *f/-* mice to dLck-Cre animals, which have been generated using a Cre transgene regulated by the distal promoter of the mouse *Lck* gene, expressed in mature T cells²⁵. Carabin flox deletion was almost complete in the corresponding B or T cells, as shown by PCR and Western-Blot analysis on purified splenic B or T lymphocytes, respectively, without any deletion in thymocytes (**Supplementary Fig. 1e, f**). These Carabin conditional KO mice will be thereafter used to address specific issues.

Carabin is not involved in B cell development and in the basal secretion of immunoglobulins.

Carabin *-/-* mice were obtained with a Mendelian frequency and developed normally. The development of B and T cells was extensively studied in these mice. Concerning T cell development, total cellularity of thymus, spleen and lymph nodes and percentages of developing thymocytes and of mature CD4⁺ and CD8⁺ T cells were comparable in Carabin *-/-* and control littermate Carabin *+/+* mice (Table I), thus confirming in a physiological model that Carabin does not influence T cell maturation, as proposed by Pan and coll in their Carabin KD hematopoietic stem cell transfer model²³. Similarly, there was no statistical difference in the absolute numbers and proportions of the different sub-populations of B cells in primary and secondary lymphoid organs in Carabin *-/-* and control mice (Table I). In addition there was no noticeable difference in the structures of the spleens and lymph nodes (data not shown). Finally, at baseline, the secretion of serum IgM, IgG and IgG subtypes was not statistically different between the two groups of mice (**Fig. 3**). In conclusion, our data show that Carabin is not involved in B cell development and in basal production of Ig.

Increased response of Carabin *-/-* T and B cells *in vitro*.

Pan and coll have shown that the shRNA-dependent downregulation of Carabin expression in T cells leads to an increased secretion of IL-2 at baseline and after T cell activation *in vitro*²³.

In order to complete this phenotype, we stimulated T cells from Carabin *-/-* mice with anti-CD3 or a combination of anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, and analyzed T cell proliferation after CFSE incorporation, T cell activation status by the quantification of expression of T cell activation markers, and finally phospho-Erk activation. Carabin *-/-* T cells displayed an increased proliferative response, as measured by the proportion of T cells in the highest proliferative (CFSE^{low}) cell population (**Fig. 4a**). In addition, complete deletion of Carabin led to an increased basal expression of CD25 and CD44 activation markers at baseline, and increased expression of CD69 and CD25 after stimulation with anti-CD3 or anti-CD3/anti-CD28 antibodies (**Fig. 4b**). The phosphorylation of Erk was also enhanced in Carabin *-/-* T cells before and after stimulation with anti-CD3 or anti-CD3/anti-CD28 antibodies (**Fig. 4c**). In conclusion, our results confirm the phenotype of hyperactivated T cells after Carabin deletion, and the role of negative regulator of Carabin in T cell signaling. Considering the B cells of the Carabin *-/-* mice, we made the following observations: 1) Carabin *-/-* B cells proliferated normally in response to BCR-dependent (anti-IgM) or BCR-independent (LPS) stimulation (**Fig. 5a**) and displayed a normal overexpression of activation markers (CD86, CD69, MHCII) compared to control Carabin *+/+* mice (**Fig. 5b**); 2) the serum levels of IgG, IgM, and IgG subtypes were almost identical in basal conditions when compared to Carabin *+/+* mice (data not shown), and there was no difference in Ig production after stimulation with LPS or LPS+IL4 *in vitro* (**Fig. 5c**); 3) Carabin *-/-* B cells showed an acceleration of Erk phosphorylation compared to Carabin *+/+* B cells after BCR activation with anti-IgM antibody (**Fig. 5d**), confirming the results obtained in Carabin KD A20 B cells (**Fig. 2d**). To conclude, acceleration of the Erk pathway appears to be a common consequence of Carabin deficiency in T and B cells. Contrary to T cells, this acceleration of Erk activation in B cells is not associated to increased expression of activation markers and proliferation.

Carabin deficiency in B cells accelerated antigen-specific B cell response *in vivo*.

To evaluate the role of Carabin in physiological B cell activation *in vivo*, we first analyzed the response of B cells after exposure to a T-cell dependent antigen (ovalbumin, OVA). Interestingly, Carabin deficiency speeds up the production of anti-OVA IgM and IgG seven days after immunization (**Fig. 6a, b**), although the difference was statistically significant only for IgG. In addition, this increase was not observed in dLck-Cre Carabin conditional KO mice, but was still observed in Mb1-Cre Carabin conditional KO mice (**Fig. 6a, b**). These results indicate that the early B cell response to T-dependent antigen in Carabin KO mice is

linked to a deficiency of Carabin in B cells, but not in T cells. This effect is transient since at day 14, the levels of anti-OVA IgG were comparable in Carabin *-/-* and control mice (data not shown). This accelerated antigen-specific IgG response could simply be related to the *in vitro* observed acceleration of Erk phosphorylation and indicates that Carabin deficiency in B cells accelerates the Ig class switching. In order to test if this early B cell switch was also associated with a change in the affinity of the antigen-specific IgG antibodies, we compared the relative affinities of anti-OVA IgG in Carabin *+/+* and Carabin *-/-* mice at day 7 after immunization, in a competitive inhibition ELISA assay: although the difference was not statistically significant, the affinity of antigen-specific IgG was slightly higher in Carabin *-/-* mice (**Fig. 6c**). Finally, at day 7 after immunization, the percentages of OVA-specific B cells (B220⁺/OVA⁺), and of germinal center B cells (CD95⁺/GL7⁺) in OVA-specific population were similar in the spleen or lymph nodes of Carabin *-/-* and control mice (**Supplementary Fig. 2a, b**), indicating that there was no drastic modification in the germinal center kinetics of Carabin *-/-* OVA-specific B cells, compared to Carabin *+/+* OVA-specific B cells.

We also evaluated the response of Carabin *-/-* mice to T-independent antigens. Similarly, T-independent IgG (but not IgM) B cell response in the absence of Carabin (immunization of mice with 4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl (NP)-LPS) was enhanced seven days after immunization (**Supplementary Fig. 3a, b**). Thus, the early B cell response to both T-dependent and T-independent antigens are transiently increased in the absence of Carabin.

Altogether these results could be linked to the acceleration of Erk phosphorylation that we observed *in vitro* after BCR-dependent stimulation of Carabin KD and KO B cells.

Carabin *-/-* mice develop signs of autoimmunity after CpG immunization.

Carabin being a negative regulator of BCR-dependent B cell activation, its deficiency may favor the development of autoimmunity. Carabin *-/-* mice did not produce antinuclear autoantibodies and in particular anti-DNA autoantibodies, and did not develop any symptom of autoimmunity (including glomerulonephritis), even in older ages (12-14 month-old, data not shown). However the phenotype of these mice may still confer them a higher susceptibility to the development of autoimmunity in some conditions. Overt autoimmunity is usually a multistep process that can involve the escape of autoreactive B cells from negative selection but also abnormal B cell responses to the activation of the innate immune system and particularly of TLR pathways. Thus, we decided to immunize Carabin *-/-* and control mice with CpG because of the known synergy between self-antigen BCR activation and TLR

activation²⁶⁻²⁹, and because CpG is known to induce type I interferon production which is a key factor to SLE pathogenesis^{26,30}. Indeed, CpG treatment induced a sustained production of anti-DNA IgG (**Fig. 7a**) as well as an important deposition of IgG in renal glomeruli from Carabin *-/-* mice, compared to Carabin *+/+* littermate. Not only we observed these Ig deposits, but classical histology of kidney in KO mice was very similar to mesangial type II lupus glomerulonephritis with a clear increase of mesangium cellularity (**Fig. 7b**). It seems that CpG immunization directly acts on spontaneously occurring anti-DNA B cells because anti-thyroglobulin and anti-actin autoantibodies did not increase in Carabin *-/-* mice compared to control mice (**Fig. 7c, d**). This strongly suggests that the production of anti-DNA in Carabin deficient mice is more the consequence of an anti-DNA BCR-specific pathway, than of a non specific polyclonal activation. Noteworthy NP-LPS immunization led to the production of various antibodies (anti-DNA and anti-thyroglobulin) in both groups of mice, without any significant difference between Carabin *-/-* and *+/+* mice (**Supplementary Fig. 3c, d**).

Acceleration of Erk phosphorylation is a feature of lupus mice, and Carabin expression is low during murine and human lupus.

Then, we tested Carabin expression and Erk phosphorylation levels in B cells of (NZBxNZW)F1 mice which spontaneously develop a disease similar to human SLE. In a transcriptoma analysis of splenic B cells from 4-month-old (NZBxNZW)F1 mice (before the occurrence of the disease), *Carabin* mRNAs were lower than in control mice ($p < 0.05$, unpublished data). A 50% reduction of *Carabin* expression was confirmed by real-time quantitative RT-PCR in (NZBxNZW)F1 mice B cells at 4 months (**Fig. 8a**). In addition, Erk phosphorylation was upregulated in 4-month-old BCR-stimulated (NZBxNZW)F1 B cells (**Fig. 8b**), akin to BCR-stimulated Carabin KD A20 B cells and Carabin *-/-* B cells (**Fig. 2d and 5d**). Thus, underexpression of Carabin and acceleration of the Erk pathway are characteristic features of B cells from mice with SLE.

Our group has recently performed a pangenomic transcriptoma analysis (Affymetrix GeneChip human genome U133 plus 2.0) of purified B cells from 17 patients with SLE in quiescent phase (SLE disease activity score -SLEDAI- less than 4) compared to B cells from age- and sex-matched controls (submitted data). We studied patients with inactive disease and with minimum treatment in order to avoid the background due to non-specific B cell activation that occurs during flares of the disease. Most interestingly *Carabin* is significantly underexpressed in 10 out of the 17 patients ($p < 0.01$). Taken together, we conclude that

Carabin in B cells is low in young (NZBxNZW)F1 lupus mice, and low in a subgroup of quiescent lupus patients.

Discussion

Carabin is a negative regulator of T cells, whose function in B cells was totally unknown. Here we present the first analysis of Carabin functions *in vivo*, and show that Carabin is also a negative regulator of B cells. The KD or KO of Carabin in B cells triggers a hypersensitive state, mainly characterized by an acceleration of Erk phosphorylation and an accelerated response to both T-dependent and T-independent antigens. Pan and coll have first analyzed the phenotype of Carabin KD in human T cells and have shown an increase of IL-2 production²³. Our results further describe this phenotype in murine cells, by showing an increased expression of activation markers in stimulated Carabin -/- KO T cells, associated to an increased proliferation and phospho-Erk expression. It seems that the consequences of Carabin deficiency in T and B cells are noticeably different, although both share the common phenotype of an acceleration of the Erk pathway after antigen-specific stimulation. This suggests that the Erk pathways display some differences in B and T cells, either in the molecular partners or in the downstream targets of Erk.

Pan and coll have shown that the development of T cells is not impaired in Carabin KD mice produced by transplantation of Carabin KD bone-marrow-derived hematopoietic stem cells isolated from haemagglutinin-specific TCR transgenic mice²³. Here we confirm the absence of T cell development defect in a more physiological model with an ubiquitous and complete deficiency of Carabin. In addition, Carabin KO mice do not present any defect in B cell development. This may appear in contrast with previous studies indicating that BCR signal strength may control the development of immature B cells in the different mature populations (follicular, marginal zone, B1)³¹. A possibility could be that the effect of carabin deficiency on BCR signaling is not strong enough to induce detectable differences on these B cell subpopulations. However, Carabin deficiency clearly impacts on the function of mature Carabin deficient B cells, notably on the early B cell response to T-dependent and T-independent antigens. The acceleration of the Erk pathway being the second phenotypic trait of these mice, we could hypothesize that the acceleration of B cell response *in vivo*, and of Erk pathway *in vitro*, could be linked. This point will deserve further studies.

In summary the phenotype of Carabin deficient B cells is quite moderate, without any alteration in B cells or spontaneous production of autoantibodies, but with an acceleration of Erk phosphorylation after BCR stimulation, and finally a modification of early B cell response. This subtle phenotype is original compared to the phenotype of mice deficient for other negative regulators. A defect in CD22³⁻⁶, Lyn^{10, 32}, SHP-1¹¹, belonging to the same pathway, leads to a common phenotype, characterized by an increased Ca²⁺ signaling in B cells after BCR stimulation, a decrease of MZ and mature B cell populations in spleen, a normal or decreased response to T-dependent and T-independent antigens *in vivo*, and by the spontaneous production of antinuclear autoantibodies associated to the development of GN. A defect in FcγRIIB^{8, 33}/SHIP^{34, 35} pathway triggers an increased Ca²⁺ response, an increased activation of Erk2 and Akt pathways, a proliferative response in B cells after BCR stimulation, an increased response to T-dependent and T-independent antigens *in vivo*, and also (for FcγRIIB) the spontaneous production of antinuclear autoantibodies associated to the development of GN. Finally, a deficiency of A20 leads to hyperactivation of B cells after BCR, LPS or CD40 activation, and to the spontaneous production of autoantibodies but, similar to Carabin deficiency, A20 defect is associated to the development of a GN after TLR9 stimulation^{14, 15}. Thus Carabin, being localized in a different biological pathway than the other described negative regulators of B cells, is associated to a distinctive phenotype in deficient mice.

Despite the moderate phenotype of Carabin *-/-* mice, and the short window of Carabin's action on B cell response *in vivo*, the simultaneous activation of the BCR and TLR led to autoimmunity. Indeed, under TLR9 activation, autoreactive Carabin *-/-* B cells were continuously producing autoantibodies, leading to the development of a disease similar to mesangial type II lupus GN. Thus the deficiency of Carabin makes B cells able to a sustained production of autoantibodies, and possibly the development of an autoimmune pathology, providing that a TLR signal is concomitant. These results are consistent with 1) the role of type I IFN in the pathogenesis of SLE^{26, 30}; 2) the role of endogenous TLR ligands in autoantibody production: it has first been shown in the AM14 Rheumatoid Factor (RF, anti-Fcγ autoantibody) transgenic murine model. AM14 B cells proliferated in response to chromatin-IgG complexes³⁶. This was blocked by inhibitors of TLR7 and TLR9, and B cells deficient in TLR7 or TLR9 responded poorly to these immune complexes²⁸. The same BCR/TLR dual signaling applied to anti-DNA transgenic B cells: anti-DNA 3H9 transgenic B cell proliferated in response to CpG dinucleotides (CG50), in a TLR9 specific manner³⁷.

From these results, can be drawn a model in which an autoreactive B cell can be activated by autoantigenic ligands for TLR9, such as CpG, thanks to a dual signaling involving TLR9 and an autoreactive BCR, transporting the immune complexes (for RF) or the DNA (for anti-DNA BCR) to the endosome, leading to an activation of TLR9 signaling. The frequent exposure of an individual to TLR ligands (during infectious events) without the systematic development of autoimmunity suggests the existence of a negative regulation of this dual signaling process. The fact that Carabin KO mice immunized with CpG produce higher titers of anti-DNA antibodies, but not of other autoantibodies, than control mice, indicates that Carabin and regulation of the Erk pathway could be implicated in this negative regulation. In line with our results, Calcineurin inhibitor Ciclosporin A (CsA) was shown to block the AM14 response to chromatin-containing immune complexes³⁷. In the periphery, the mature B cell repertoire still contains a large pool of autoreactive B cells that are self-antigen anergic or ignorant. Because the desensitization of the Erk pathway has been described as one of the strategies preventing activation of autoreactive B cells in the case of anergic B cells³⁸, we suggest that Carabin could be a player in this desensitization process; Carabin could prevent the early activation of ignorant autoreactive B cells after infection-induced TLR, and notably TLR9, signaling. Further experiments will directly test this model.

Interestingly, Erk phosphorylation was increased in BCR-stimulated B cells from 4-month-old (NZBxNZW)F1 mice, otherwise showing a 50% decrease of *Carabin* expression. Our results are consistent with the data presented by Wu and coll, showing that the Erk pathway was upregulated in murine lupus B cells in B6.*Sle1* congenic mice, and was even constitutively activated in B6.*Sle1.Sle3* mice³⁹. B6 mice congenic for the *Sle1a* and *Sle1b* subloci also show increased levels of the Erk2 pathway⁴⁰. *Carabin* gene being located outside *Sle1* and *Sle3* loci, the upregulation of Erk pathway in B cells from mice with spontaneous lupus could be the consequence of the deregulation of different genes. In addition, we showed, by transcriptoma analysis, that *Carabin* was underexpressed in purified B cells in a subset of lupus patients. Unfortunately, we couldn't analyze the expression of Erk in these cells. Very few studies have evaluated Erk phosphorylation status in lupus purified B cells, and they gave contradictory results (either an increase or no change of Erk phosphorylation in lupus B cells compared to normal B cells). These discrepancies could be attributed either to the low number of patients (no more than 7 in these studies), or to the common analysis of active and quiescent patients, or finally to the differences in the assays used for this analysis⁴¹⁻⁴³. A prospective analysis of a large cohort of patients with defined activation status is necessary to precise if *Carabin* underexpression and Erk phosphorylation in B cells

are linked to the severity of the disease, to the SLE flare susceptibility and to the type of flare.

Methods

Cell preparation and culture. A20 cell line was from American Type Culture Collection (ATCC) and was cultured in RPMI with 10% (vol/vol) FCS (PAN). 2.10^6 cells were stimulated with LPS alone (10 µg/ml; Sigma) or with F(ab')₂ anti-Mouse IgG (10 µg/ml; Jackson ImmunoResearch). Splenic cells were cultured in RPMI with 10% (vol/vol) FCS (PAN). Cells were stimulated with LPS alone (10 µg/ml; Sigma), LPS (10 µg/ml) plus IL-4 (20 ng/ml Sigma), F(ab')₂ anti-Mouse IgM (10 µg/ml; Jackson ImmunoResearch), anti-CD3 (2 µg/ml; BD Biosciences) or anti-CD3 (2 µg/ml; BD Biosciences) plus anti-CD28 antibodies (2 µg/ml BD Biosciences). Purification of splenic total, or mature B cells and splenic total T cells was done using B cell isolation kit, CD43 (Ly-48) microbeads and Pan-T cell isolation kit (all from Miltenyi Biotec), respectively. For the analysis of proliferation, cells were stained with CFSE (Molecular Probes) before the stimulation. Bone marrow and splenic B cell subsets were sorted by flow cytometry with a FACS Aria cell sorter (BD Biosciences).

A20 B cells transduction. Lentiviral particles were produced by transient transfection of 293T cells, as previously described⁴⁴. Viruses were then used to transduce 3.10^5 A20 B cells in the presence of polybrene (Sigma). GFP-positive A20 B cells were sorted by flow cytometry with a FACS Aria cell sorter (BD Biosciences).

Quantitative real-time RT-PCR analysis. mRNA was prepared with RNeasy Kit (Qiagen) and cDNA was obtained with High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Quantitative real-time PCR was performed on 10 ng cDNA using Taqman Universal Mastermix (Applied Biosystems) and Assays-on-Demand probes (*Hprt1*: Mm01318743_m1, 18S: Mm03928990_g1, *Carabin* probe 1: Mm01236554_m1, *Carabin* probe 2: Mm01236552_m1, *Carabin* probe 3: Mm01236550_g1, *Aicda*: Mm00507774_1; Applied Biosystems). Each sample was amplified in triplicate in a StepOnePlus real-time PCR machine (Applied Biosystems). mRNA levels were calculated with the StepOne v2.1 software (Applied Biosystems), using the comparative cycle threshold method, and normalized to the endogenous control *Hprt1*.

Immunoblot analysis. Proteins were extracted by standard techniques. Primary antibodies and dilutions were as follows: anti-C-ter Carabin, 1:2,000 (Abcam); anti-Actin, 1:5,000 (Santa Cruz); anti-GAPDH, 1:5,000 (Santa Cruz); anti-phospho-SAPK/JNK, 1:2,000 (Cell Signaling); anti-SAPK/JNK, 1:2,000 (Cell Signaling); anti-phospho-p44/42 (anti-phospho-Erk1/2), 1:2,000 (Cell Signaling); anti-p44/42 (anti-Erk1/2), 1:2,000 (Cell Signaling).

Mice

Generation of ES cells, Carabin $-/-$, and conditional Carabin $-/-$ mice: the targeting vector was constructed as follows. A 0.6 kb fragment encompassing exons 4 and 5 was amplified by PCR (from 129S2/SvPas ES cells genomic DNA) subcloned in an ICS proprietary vector. This ICS vector contains a LoxP site as well as a floxed and flipped Neomycin resistance cassette. A 4.6 kb fragment (corresponding to the 5' homology arm and 3.3 kb fragment corresponding to the 3' homology arms) were amplified by PCR and subcloned in step1 plasmid to generate the final targeting construct. The linearized construct was electroporated in 129S2/SvPas mouse embryonic stem (ES) cells. After selection, targeted clones were identified by PCR using external primers and further confirmed by Southern blot with 5' and 3' external probes. Two positive ES clones were injected into C57BL/6J blastocysts, and male chimaeras derived gave germline transmission. Chimeras were with Flp deleter mice for direct excision of the flipped NeoR cassette. The obtained Carabin $f/+$ mice were backcrossed on C57BL/6 background for at least 8 generations. Carabin $f/+$ mice were crossed to CMV-Cre animals to produce Carabin $+/-$ mice. Homozygous Carabin KO mice were generated by intercross of Carabin $+/-$ mice. Carabin $f/+$ mice were crossed to Carabin $+/-$ mice and then to Mb1-Cre (provided by M. Reth, Freiburg, Germany) and dLck-Cre transgenic mice (provided by N. Killeen, California, USA) to generate immature B cell and mature T cell Carabin conditional KO models, respectively. The presence of the *Carabin*⁻, -floxed (*Carabin*^f) or -wt (*Carabin*⁺) allele was assessed in offsprings by PCR analysis using specific primers (Lf1 : 5'-GCAGCACAGCAGCTACAGGTCCC-3' ; Ef : 5'-GCGCCACCATTGCCAGCTCTA-3' ; Er1 : 5'-CCCTCTGCAGACCTCATCCGCC-3'). All animal experiments were performed with approval by the Direction départementale des services vétérinaires (Strasbourg, France). (NZBxNZW)F1 mice were obtained from Harlan.

Flow cytometry analysis. Cell phenotype was performed on thymic, splenic, and bone marrow lymphoid populations by four-color fluorescence analysis according to standard protocols. The following antibodies and reagents were used: FITC, PE, or APC anti-mouse

B220, CD3, CD4, CD8, CD19, CD21, CD23, CD44, CD69, CD86, I-A/I-E, CD25, and IgM (all from BD Biosciences), biotin-OVA (5 µg/ml), Cy5-streptavidin (Jackson ImmunoResearch). Propidium iodide was used for live-dead discrimination. Intracellular staining was performed as previously described⁴⁵. Antibody used for intracellular staining was: anti-Erk1/2 (BD Biosciences). Cells were analyzed using a FACSCalibur. We then analyzed data with FlowJo software (Treestar).

Antibody detection by ELISA. Total IgG, IgG1, IgG2b, IgG3 or IgM levels were measured in serum from 8- to 12-week-old mice, and in supernatants after 3 days of stimulation, as previously described⁴⁶. The wells were developed with Fast OPD substrate (Sigma-Aldrich). Absorbance was measured at 490 nm. Levels of Ig were determined by comparison with a standard curve using purified IgG, IgG1, IgG2b, IgG3, IgMκ (Sigma-Aldrich; Southern Biotechnology Associates). The serum reactivity was tested with thyroglobulin, dsDNA, actin as previously described⁴⁷. To measure anti-OVA or anti-NP specific antibodies, 96-wells ELISA plates were coated with OVA (50 µg/ml, Sigma) and NP-bovine serum albumin (BSA) (5 µg/ml, Biosearch Technologies) respectively, in sodium carbonate buffer (pH 9.6). The wells were blocked with 1% BSA for 30 min at 37°C and incubated with diluted sera for 2h at 37°C. Horseradish peroxidase-conjugated isotype-specific antibodies (all from Interchim) were used as revealing antibodies. For anti-OVA competitive inhibition ELISA assay, the previous ELISA was modified by prior incubation of sera with increasing concentrations of soluble OVA, according to Friguet's method⁴⁸.

Immunization. 6- to 8-week-old mice were injected intraperitoneally (i.p.) and bled on days indicated in the figures. Mice were injected with 100 µg Ovalbumin (Sigma) in complete Freund's adjuvant (Sigma) or with 100 µg NP-LPS (Biosearch Technologies) in PBS. For CpG treatment, 8-week-old mice were injected i.p., every other day for 2 weeks, with 40 µg CpG ODN 2395 (tcgtcgttttcggcgcgcgccg) with phosphorothioate bases (Invivogen). Serum was collected before treatment, and every weeks after the first injection.

Histology and Immunohistochemistry. Kidneys were fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin. Sections and Hematoxylin/Eosin (HE) and Trichrome (T) stain were performed. For immunohistochemistry, kidneys were embedded in Tissue-Tek OCT compound and snap frozen in methyl-butane with liquid nitrogen. Tissue sections were then

stained with IgG-FITC (Jackson Immunoresearch), IgM-biotin (Beckman Coulter) followed by streptavidin-Alexa546 (Molecular Probes), IgG1-FITC (BD Biosciences), IgG2c-FITC (BD Biosciences) or IgG3-FITC (Southern Biotech). Samples were analysed by an anatomopathologist.

Statistical analysis. Statistical significance was calculated with a two-tailed Mann & Whitney test, using Prism software (GraphPad).

Acknowledgements

We thank Dr N. Killeen for providing the dLck-Cre transgenic mice and Dr M. Reth for providing the Mb1-Cre transgenic mice. We also thank M. Duval, D. Bock, and K. Sablon for excellent animal care.

This work was supported by grants from Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS), Université de Strasbourg (UdS), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and Arthritis foundation. J-N.S was supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie and Arthritis foundation.

Author contributions

J-N.S., J-L.P, A-S.K, T.M. and P.S.S. designed the study, analyzed the data and wrote the manuscript. J-N.S. and A.S. did experiments. A-M.K. helped in flow-cytometry analysis. M.D. and L.M. were in charge of the immunochemistry analysis.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

References

1. Pritchard, N.R. & Smith, K.G. B cell inhibitory receptors and autoimmunity. *Immunology* **108**, 263-273 (2003).
2. Nitschke, L. The role of CD22 and other inhibitory co-receptors in B-cell activation. *Curr Opin Immunol* **17**, 290-297 (2005).
3. O'Keefe, T.L., Williams, G.T., Batista, F.D. & Neuberger, M.S. Deficiency in CD22, a B cell-specific inhibitory receptor, is sufficient to predispose to development of high affinity autoantibodies. *J Exp Med* **189**, 1307-1313 (1999).
4. Otipoby, K.L. *et al.* CD22 regulates thymus-independent responses and the lifespan of B cells. *Nature* **384**, 634-637 (1996).
5. O'Keefe, T.L., Williams, G.T., Davies, S.L. & Neuberger, M.S. Hyperresponsive B cells in CD22-deficient mice. *Science* **274**, 798-801 (1996).
6. Poe, J.C., Fujimoto, M., Jansen, P.J., Miller, A.S. & Tedder, T.F. CD22 forms a quaternary complex with SHIP, Grb2, and Shc. A pathway for regulation of B lymphocyte antigen receptor-induced calcium flux. *J Biol Chem* **275**, 17420-17427 (2000).
7. Cariappa, A. *et al.* B cell antigen receptor signal strength and peripheral B cell development are regulated by a 9-O-acetyl sialic acid esterase. *J Exp Med* **206**, 125-138 (2009).
8. Bolland, S. & Ravetch, J.V. Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity* **13**, 277-285 (2000).
9. Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. & Honjo, T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* **11**, 141-151 (1999).
10. Hibbs, M.L. *et al.* Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell* **83**, 301-311 (1995).
11. Pao, L.I. *et al.* B cell-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase Shp1 promotes B-1a cell development and causes systemic autoimmunity. *Immunity* **27**, 35-48 (2007).
12. Qian, Y. *et al.* Deficiency of Act1, a critical modulator of B cell function, leads to development of Sjogren's syndrome. *Eur J Immunol* **38**, 2219-2228 (2008).

13. Qian, Y. *et al.* Act1, a negative regulator in CD40- and BAFF-mediated B cell survival. *Immunity* **21**, 575-587 (2004).
14. Tavares, R.M. *et al.* The Ubiquitin Modifying Enzyme A20 Restricts B Cell Survival and Prevents Autoimmunity. *Immunity* **33**, 181-191.
15. Chu, Y. *et al.* B cells lacking the tumor suppressor TNFAIP3/A20 display impaired differentiation and hyperactivation and cause inflammation and autoimmunity in aged mice. *Blood* **117**, 2227-2236.
16. Croker, J.A. & Kimberly, R.P. SLE: challenges and candidates in human disease. *Trends Immunol* **26**, 580-586 (2005).
17. Moser, K.L., Kelly, J.A., Lessard, C.J. & Harley, J.B. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* **10**, 373-379 (2009).
18. Shlomchik, M.J. & Madaio, M.P. The role of antibodies and B cells in the pathogenesis of lupus nephritis. *Springer Semin Immunopathol* **24**, 363-375 (2003).
19. Steinberg, B.J., Smathers, P.A., Frederiksen, K. & Steinberg, A.D. Ability of the xid gene to prevent autoimmunity in (NZB X NZW)F1 mice during the course of their natural history, after polyclonal stimulation, or following immunization with DNA. *J Clin Invest* **70**, 587-597 (1982).
20. Steinberg, E.B., Santoro, T.J., Chused, T.M., Smathers, P.A. & Steinberg, A.D. Studies of congenic MRL-Ipr/Ipr.xid mice. *J Immunol* **131**, 2789-2795 (1983).
21. Wellmann, U., Letz, M., Schneider, A., Amann, K. & Winkler, T.H. An Ig mu-heavy chain transgene inhibits systemic lupus erythematosus immunopathology in autoimmune (NZB x NZW)F1 mice. *Int Immunol* **13**, 1461-1469 (2001).
22. Reininger, L. *et al.* Intrinsic B cell defects in NZB and NZW mice contribute to systemic lupus erythematosus in (NZB x NZW)F1 mice. *J Exp Med* **184**, 853-861 (1996).
23. Pan, F. *et al.* Feedback inhibition of calcineurin and Ras by a dual inhibitory protein Carabin. *Nature* **445**, 433-436 (2007).
24. Hobeika, E. *et al.* Testing gene function early in the B cell lineage in mb1-cre mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13789-13794 (2006).
25. Zhang, D.J. *et al.* Selective expression of the Cre recombinase in late-stage thymocytes using the distal promoter of the Lck gene. *J Immunol* **174**, 6725-6731 (2005).

26. Baccala, R., Hoebe, K., Kono, D.H., Beutler, B. & Theofilopoulos, A.N. TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat Med* **13**, 543-551 (2007).
27. Soulas, P. *et al.* Autoantigen, innate immunity, and T cells cooperate to break B cell tolerance during bacterial infection. *J Clin Invest* **115**, 2257-2267 (2005).
28. Marshak-Rothstein, A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* **6**, 823-835 (2006).
29. Peng, S.L. Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* **17**, 230-236 (2005).
30. Theofilopoulos, A.N., Baccala, R., Beutler, B. & Kono, D.H. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* **23**, 307-336 (2005).
31. Pillai, S. & Cariappa, A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol* **9**, 767-777 (2009).
32. Chan, V.W., Lowell, C.A. & DeFranco, A.L. Defective negative regulation of antigen receptor signaling in Lyn-deficient B lymphocytes. *Curr Biol* **8**, 545-553 (1998).
33. Takai, T., Ono, M., Hikida, M., Ohmori, H. & Ravetch, J.V. Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice. *Nature* **379**, 346-349 (1996).
34. Liu, Q. *et al.* The inositol polyphosphate 5-phosphatase ship is a crucial negative regulator of B cell antigen receptor signaling. *J Exp Med* **188**, 1333-1342 (1998).
35. Helgason, C.D. *et al.* A dual role for Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase (SHIP) in immunity: aberrant development and enhanced function of b lymphocytes in ship *-/-* mice. *J Exp Med* **191**, 781-794 (2000).
36. Leadbetter, E.A. *et al.* Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* **416**, 603-607 (2002).
37. Viglianti, G.A. *et al.* Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity* **19**, 837-847 (2003).
38. Rui, L., Vinuesa, C.G., Blasioli, J. & Goodnow, C.C. Resistance to CpG DNA-induced autoimmunity through tolerogenic B cell antigen receptor ERK signaling. *Nat Immunol* **4**, 594-600 (2003).
39. Wu, T. *et al.* Shared signaling networks active in B cells isolated from genetically distinct mouse models of lupus. *J Clin Invest* **117**, 2186-2196 (2007).
40. Liu, K., Liang, C., Liang, Z., Tus, K. & Wakeland, E.K. Sle1ab mediates the aberrant activation of STAT3 and Ras-ERK signaling pathways in B lymphocytes. *J Immunol* **174**, 1630-1637 (2005).

41. Grammer, A.C., Fischer, R., Lee, O., Zhang, X. & Lipsky, P.E. Flow cytometric assessment of the signaling status of human B lymphocytes from normal and autoimmune individuals. *Arthritis Res Ther* **6**, 28-38 (2004).
42. Taher, T.E. *et al.* Protein phosphorylation and kinome profiling reveal altered regulation of multiple signaling pathways in B lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **62**, 2412-2423.
43. Wong, C.K. *et al.* Activation profile of intracellular mitogen-activated protein kinases in peripheral lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* **29**, 738-746 (2009).
44. Zennou, V. *et al.* HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* **101**, 173-185 (2000).
45. Krutzik, P.O. & Nolan, G.P. Intracellular phospho-protein staining techniques for flow cytometry: monitoring single cell signaling events. *Cytometry A* **55**, 61-70 (2003).
46. Soulas-Sprauel, P. *et al.* Role for DNA repair factor XRCC4 in immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* **204**, 1717-1727 (2007).
47. Koenig-Marrony, S. *et al.* Natural autoreactive B cells in transgenic mice reproduce an apparent paradox to the clonal tolerance theory. *J Immunol* **166**, 1463-1470 (2001).
48. Friguet, B., Chaffotte, A.F., Djavadi-Ohanian, L. & Goldberg, M.E. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods* **77**, 305-319 (1985).

Figures

	Carabin ^{+/+}	Carabin ^{-/-}
Total cellularity (x10⁶)		
Spleen	112 ± 12,9	105 ± 35
Lymph nodes	4,8 ± 2,9	4,1 ± 3,5
Spleen (% and absolute numbers)		
B cells	50,4% ± 5,6 (48,9.10 ⁶ ± 15,9)	45,9% ± 9,3 (50,1.10 ⁶ ± 12,9)
Transitional 1	15,8% ± 3,1 (15,0.10 ⁶ ± 4,7)	20,3% ± 4,8 (21,7.10 ⁶ ± 9,7)
Transitional 2	3,5% ± 1,1 (3,3.10 ⁶ ± 1,32)	2,9% ± 0,8 (3,0.10 ⁶ ± 0,6)
Follicular B cells	68,9% ± 2,29 (65,9.10 ⁶ ± 17,6)	66,1% ± 4,7 (68,9.10 ⁶ ± 12,7)
Marginal zone	9,6% ± 1,1 (9,3.10 ⁶ ± 3,2)	8,2% ± 3,5 (9,0.10 ⁶ ± 3,6)
CD4+ T cells	23,9% ± 8,8 (22,3.10 ⁶ ± 6,0)	21,8% ± 4,9 (22,0.10 ⁶ ± 7,1)
CD8+ T cells	15,5% ± 4,3 (14,8.10 ⁶ ± 3,7)	14,4% ± 4,9 (14,1.10 ⁶ ± 4,3)
Lymph nodes (% and absolute numbers)		
B cells	22,8% ± 5,3 (1,13.10 ⁶ ± 0,8)	27,2% ± 3,6 (1,0.10 ⁶ ± 0,8)
CD4+ T cells	43,7% ± 4,6 (1,9.10 ⁶ ± 1,2)	40,2% ± 1,2 (1,8.10 ⁶ ± 1,5)
CD8+ T cells	29,0% ± 4,5 (1,3.10 ⁶ ± 0,7)	29,7% ± 3,7 (1,3.10 ⁶ ± 1,1)
Bone marrow (%)		
ProB/Pre-B	12,6% ± 3,2	15,2% ± 5,5
Immatures	4,5% ± 0,7	4,2% ± 2,5

Transitional	1,0% ± 0,5	0,9% ± 0,4
Recirculating mature	6,2% ± 2,3	5,2% ± 1,8
Thymus (%)		
CD4+ T cells	9,2% ± 0,5	8,4% ± 0,4
CD8+ T cells	4,3% ± 0,03	4,3% ± 0,6
DN	2,1% ± 0,2	3,1% ± 1,1
DP	84,3% ± 0,2	84,1% ± 2,2

Table 1. Cellularity of lymphoid organs and respective subpopulations in Carabin KO mice. Quantitation of lymphoid populations in the indicated tissues from the indicated genotypes of 12-week-old mice. The total cellularity of spleen and lymph nodes is shown in the top panel. B cell subpopulations were identified by flow cytometry with the following markers: B cells (B220⁺IgM⁺); Pro/PreB (B220⁺IgM⁻); Immature (B220^{med}IgM⁺); recirculating mature (B220^{high}IgM⁺); transitional 1 (IgM⁺CD23⁻CD21⁻); transitional 2 (IgM⁺CD23⁺CD21^{high}); follicular (IgM⁺CD23⁺CD21^{low}) and marginal zone (IgM⁺CD23⁻CD21^{high}). DN: double-negative; DP: double-positive T cells. Means and standard deviation of six Carabin -/- and seven Carabin +/+ mice are shown.

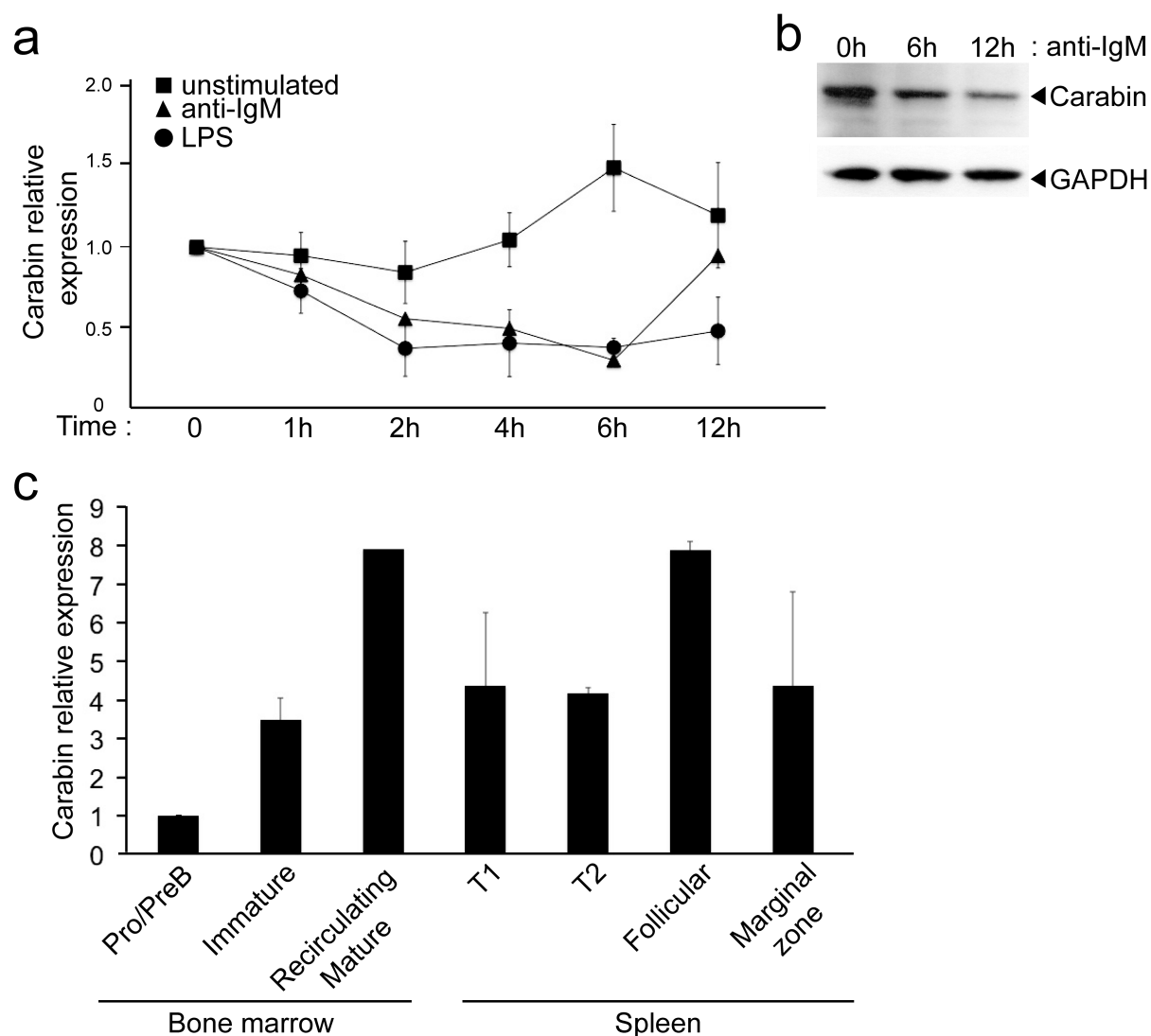


Figure 1. Carabin expression is tightly regulated during B cell maturation and activation. Purified splenic mature B cells were stimulated with anti-IgM (10 μ g/ml), LPS (10 μ g/ml), or left unstimulated for the indicated time. Carabin expression was evaluated by (a) quantitative real-time RT-PCR or (b) Western blot. (c) Quantitative real-time RT-PCR analysis of *Carabin* expression in FACS-sorted B cell subsets: Pro/PreB (B220⁺IgM⁻); Immature (B220^{med}IgM⁺); recirculating mature (B220^{high}IgM⁺); T1 (IgM⁺CD23⁻CD21⁻); T2 (IgM⁺CD23⁺CD21^{high}); follicular (IgM⁺CD23⁺CD21^{low}); marginal zone (IgM⁺CD23⁻CD21^{high}). Samples were normalized to the endogenous control *Hprt1*. (a-c) Data are representative of three independent experiments. (a, c; errors bars, standard deviation).

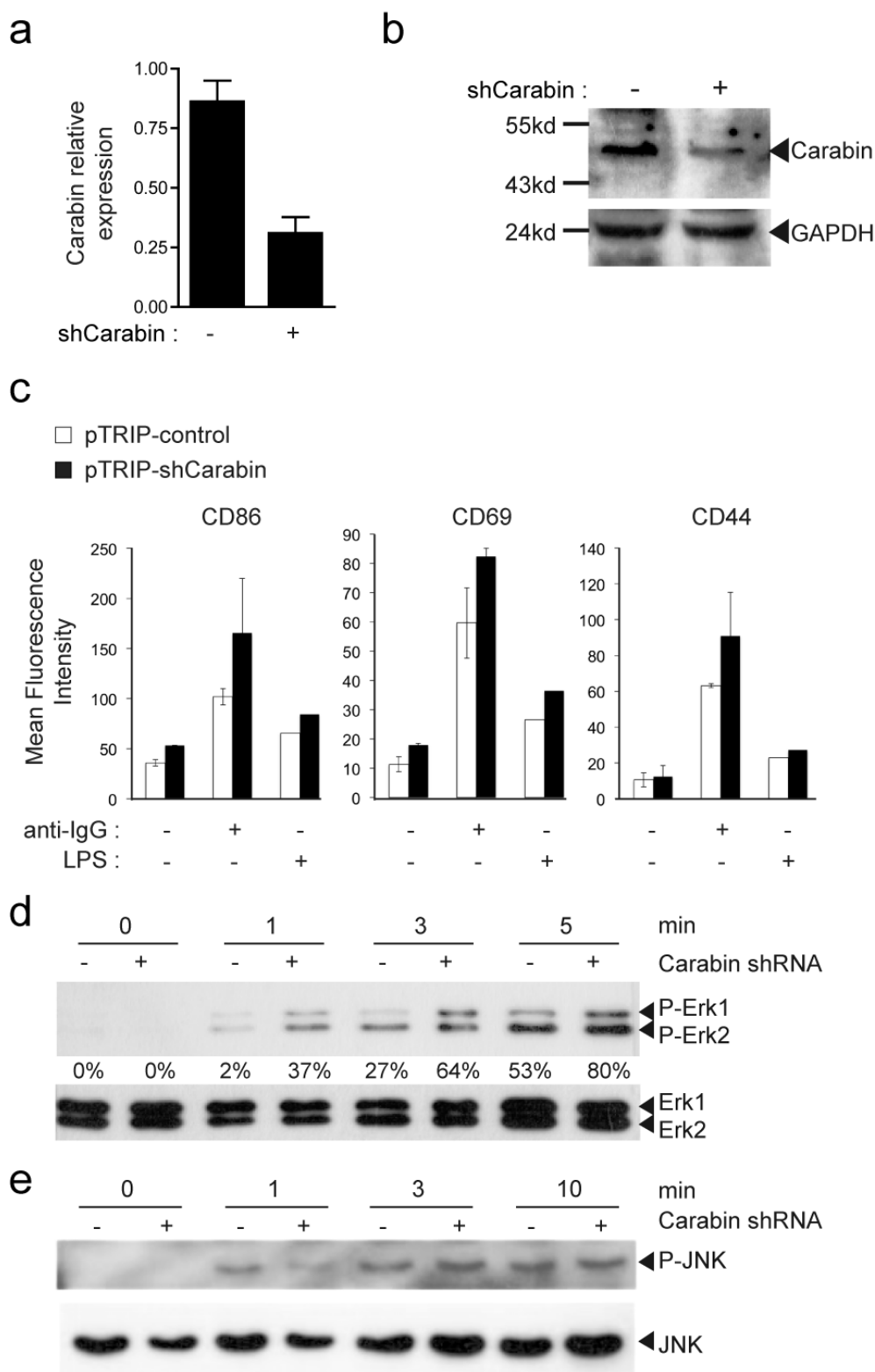


Figure 2. Carabin underexpression increases Erk1/2 phosphorylation after stimulation of A20 B cells. (a) A20 cells were transduced with lentiviral constructs containing no shRNA (pTRIP-control, -) or an shRNA targeting *Carabin* (pTRIP-shCarabin, +) and GFP⁺ cells were sorted. *Carabin* expression was determined by quantitative real-time RT-PCR. Each

sample was normalized to the endogenous control 18S. Bars represent the level of *Carabin* transcript expression in transduced A20 cells relative to non-transduced A20 cells. **(b)** Immunoblot analysis of Carabin expression in A20 B cells after transduction as in **a**. GAPDH was used as loading control. **(c)** Flow cytometry analysis of activation markers on GFP⁺ A20 B cells, transduced and sorted as in **a**, then stimulated with an anti-IgG antibody (10 µg/ml) or with LPS (10 µg/ml) for 24h. **(d)** A20 B cells transduced and sorted as in **a**, then stimulated with an anti-IgG antibody (10 µg/ml) for 1, 3 or 5 minutes. Cell lysates were analysed by Western blot using anti-phospho Erk1/2 antibody. Erk1/2 was used as a loading control. The percentages of phospho-Erk1/2 were normalized to the total Erk1/2 proteins in the corresponding lane. **(e)** A20 B cells were treated as in **d**. Cell lysates were analysed by Western blot using anti-phospho JNK antibody. JNK was used as a loading control. Notation: +, cells stably expressing *Carabin* specific shRNA; -, control cells. **(a-e)** Data are representative of three independent experiments. **(a, c;** errors bars, standard deviation).

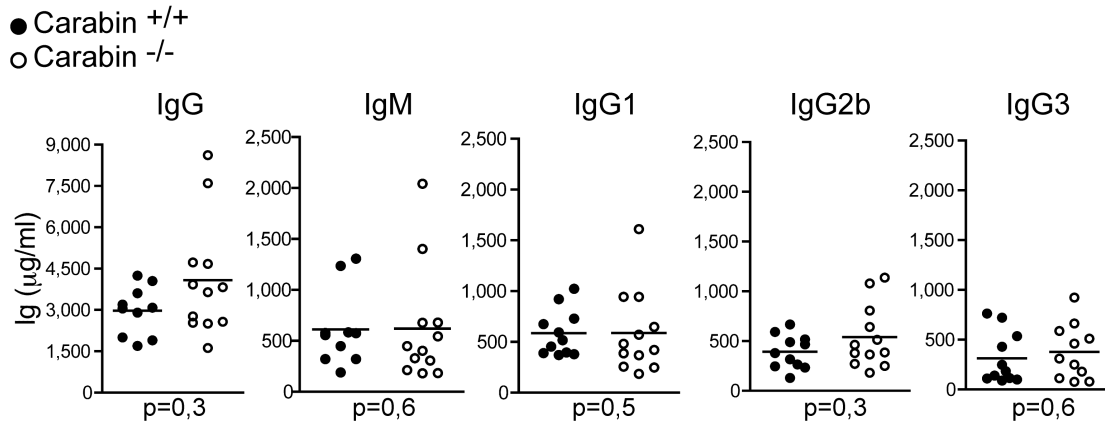


Figure 3. Serum Ig production in Carabin -/- mice. Sera from Carabin +/+ and Carabin -/- mice were collected and total IgG, IgM, IgG1, IgG2b, and IgG3 were determined by ELISA (microgram / milliliter). The results of two-tailed Mann-Whitney test are indicated.

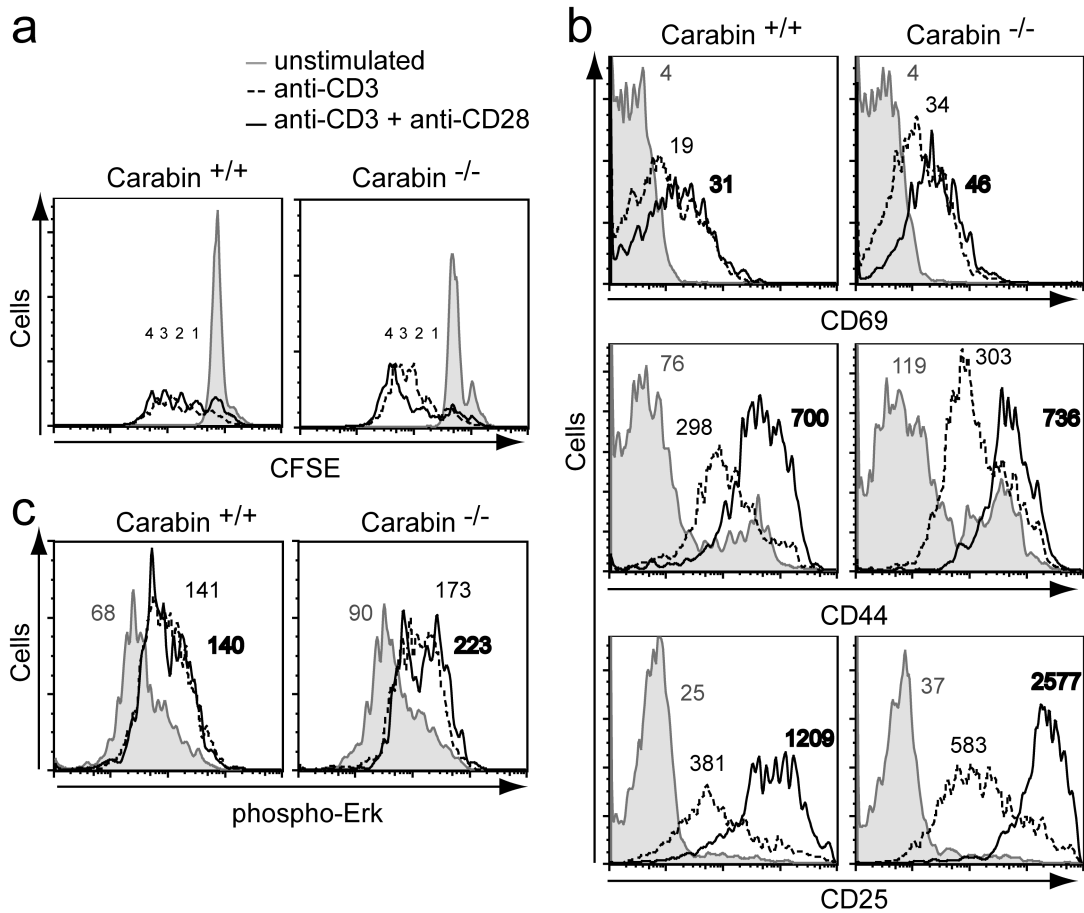


Figure 4. Hyperresponsiveness of Carabin-deficient T Cells. Flow cytometry analysis of (a) dilution of CFSE-labeled and (b) cell surface expression of the activation marker CD69, CD44 and CD25 on Carabin +/+ and Carabin -/- CD4⁺ T cells after stimulation for 72h with anti-CD3 antibody (2 µg/ml) (dashed line), anti-CD3 plus anti-CD28 antibodies (2 µg/ml each) (solid line), or medium alone (shaded gray). (c) Flow cytometry analysis of Erk phosphorylation on Carabin +/+ and Carabin -/- CD4⁺ T cells after stimulation for 10 min with anti-CD3 antibody (2 µg/ml) (dashed line), anti-CD3 plus anti-CD28 antibodies (2 µg/ml each) (solid line), or with medium alone (shaded gray). Numbers indicate Mean Fluorescence Intensity. (a-c) Data are representative of three independent experiments.

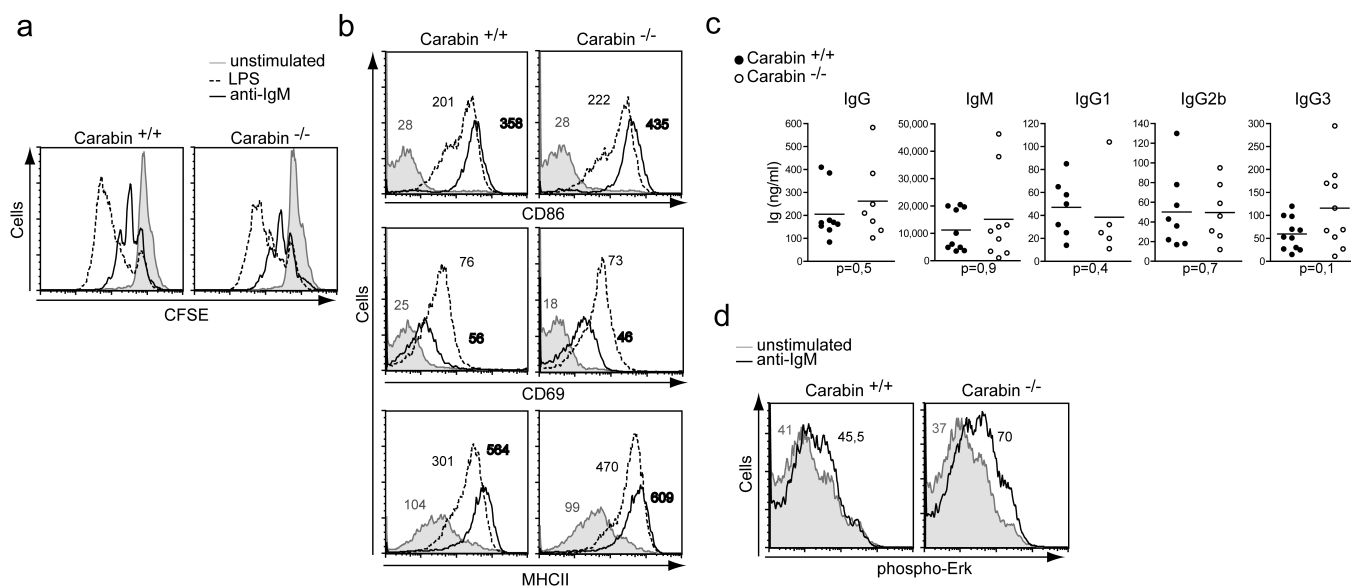


Figure 5. Increased response of Carabin-deficient B Cells. Flow cytometry analysis of (a) dilution of CFSE-labeled and (b) cell surface expression of the activation marker CD86, CD69 and MHCII on Carabin +/+ and Carabin -/- CD19⁺ B cells after stimulation for 72h with LPS (10 µg/ml) (dashed line), anti-IgM antibody (10 µg/ml) (solid line), or medium alone (shaded gray). (c) Ig levels (nanogram/milliliter) were analyzed in supernatants from splenic cell cultures, after 72h of stimulation with LPS (10 µg/ml) (in this case, IgM, IgG, IgG2b, IgG3 were quantified) or LPS (10 µg/ml) + IL-4 (20 ng/ml) (in this case, IgG1 were quantified). The results of two-tailed Mann-Whitney test are indicated. (d) Flow cytometry analysis of Erk phosphorylation on Carabin +/+ and Carabin -/- B220⁺ B cells after stimulation for 10 min with anti-IgM antibody (10 µg/ml) (solid line), or with medium alone (shaded gray). Numbers indicate Mean Fluorescence Intensity. (a-d) Data are representative of three independent experiments.

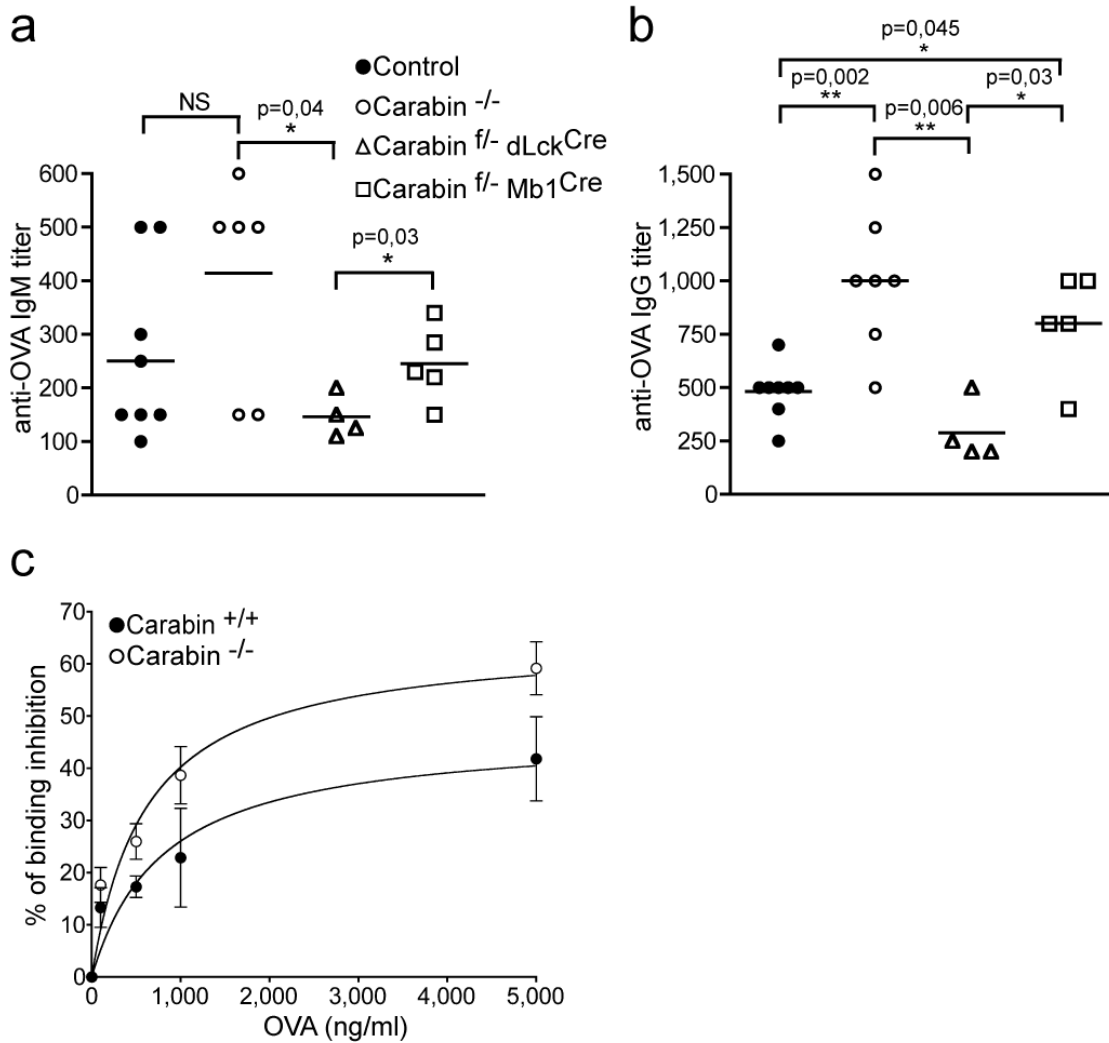


Figure 6. Increased early antigen-specific B cell response in Carabin KO and Carabin conditional KO mice. (a,b) Six- to eight-week-old mice of the indicated genotype were injected intraperitoneally with 100 μ g OVA in complete Freund’s adjuvant and bled seven days after injection. Anti-OVA (a) IgM or (b) IgG titers were determined by ELISA. The results of two-tailed Mann-Whitney test are indicated. Because the results obtained in Carabin $+/+$ and in Carabin $f/-$ Cre-negative mice were not different, these animals were pooled in the same “control” group. (c) The relative affinities of anti-OVA IgG in the Carabin $-/-$ (n=7) and control mice (n=4) were determined by a competitive inhibition ELISA assay, using increasing concentrations of soluble OVA in the ELISA assay presented in b. (c; errors bars, standard deviation).

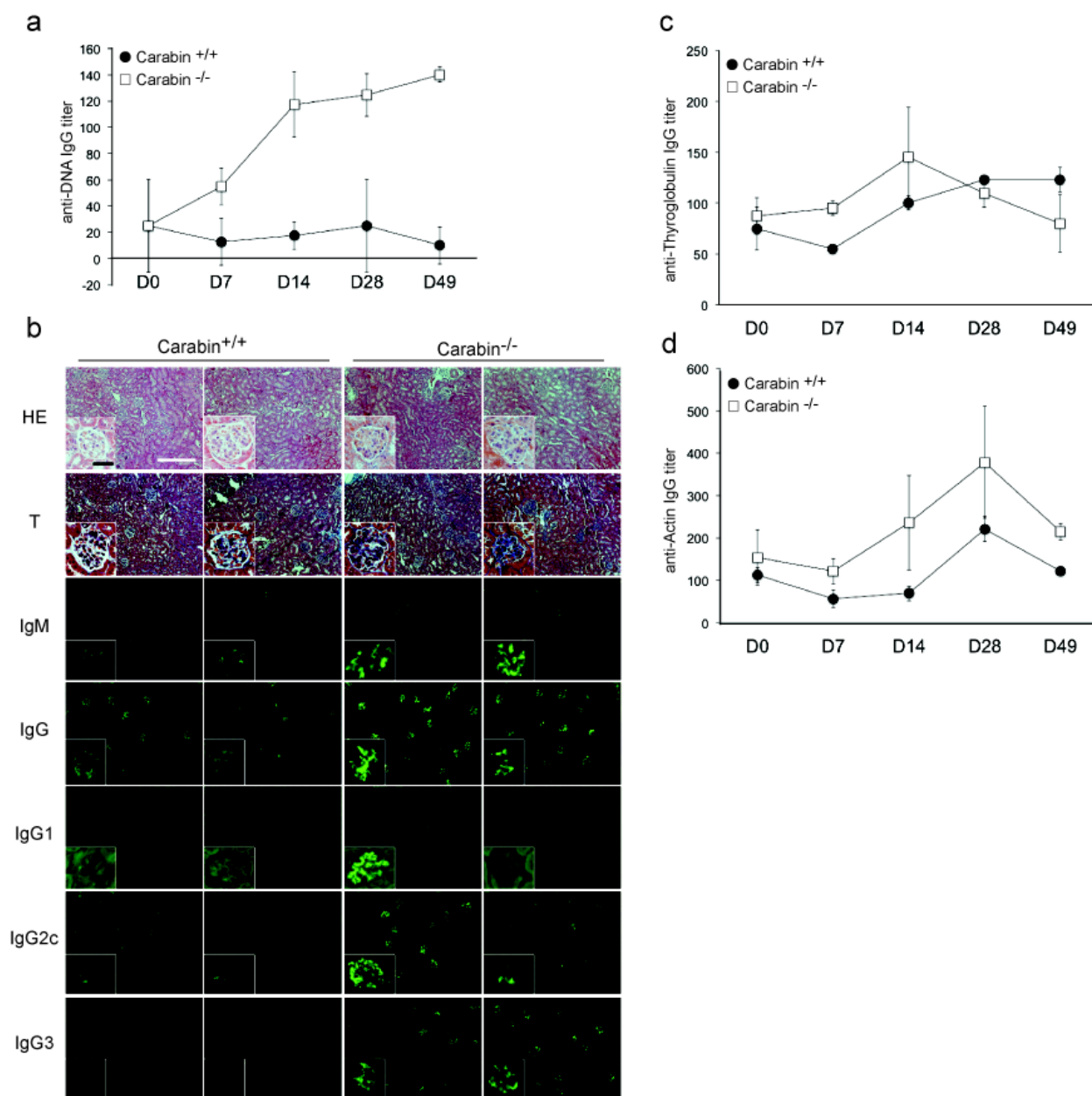


Figure 7. Autoimmunity in CpG treated Carabin $-/-$ mice. (a,b) Eight to ten-week-old mice of the indicated genotypes were treated with 40 μ g of CpG intraperitoneally every other day for 2 weeks. (a) Serum was collected before treatment (day 0), and at day 7, 14, 28, 49 after the first injection. Anti-dsDNA IgG titers were determined by ELISA. (b) Immunofluorescent analyses of glomerular deposition of Igs of the indicated isotypes after CpG treatment. Mice were analyzed 6 weeks after start of treatment. Hematoxylin and eosin (HE) and trichrome (T) sections are shown above. Scale bars: white 200 μ m; black 20 μ m. (c, d), anti-thyroglobulin (c) and anti-actin (d) IgG titers were determined by ELISA. (a-d) Data are representative of three independent experiments. (a, c, d; errors bars, standard deviation).

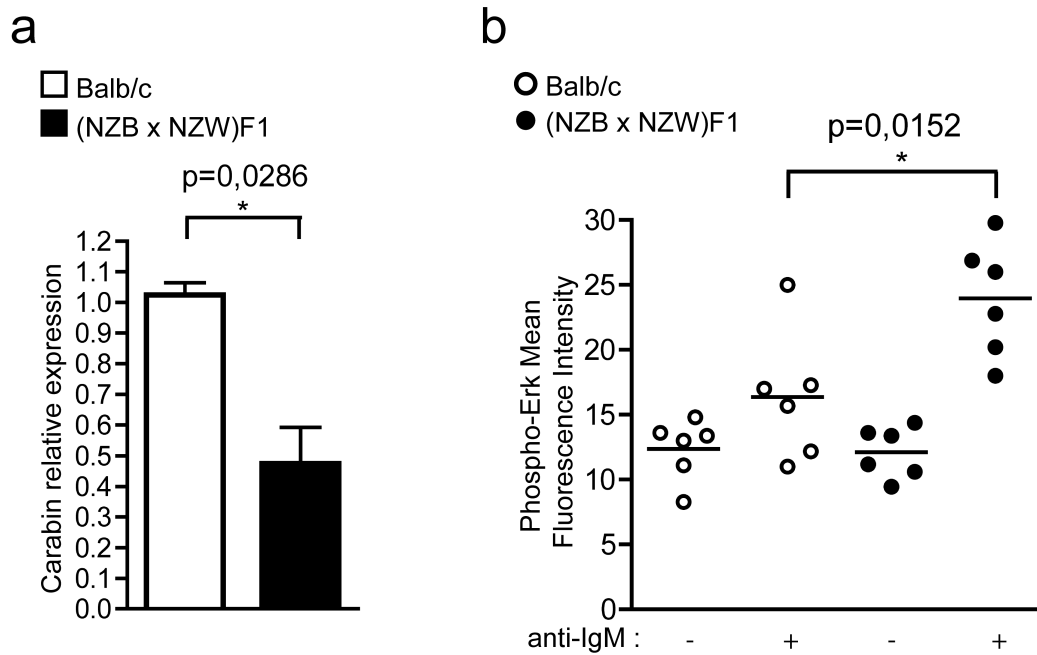
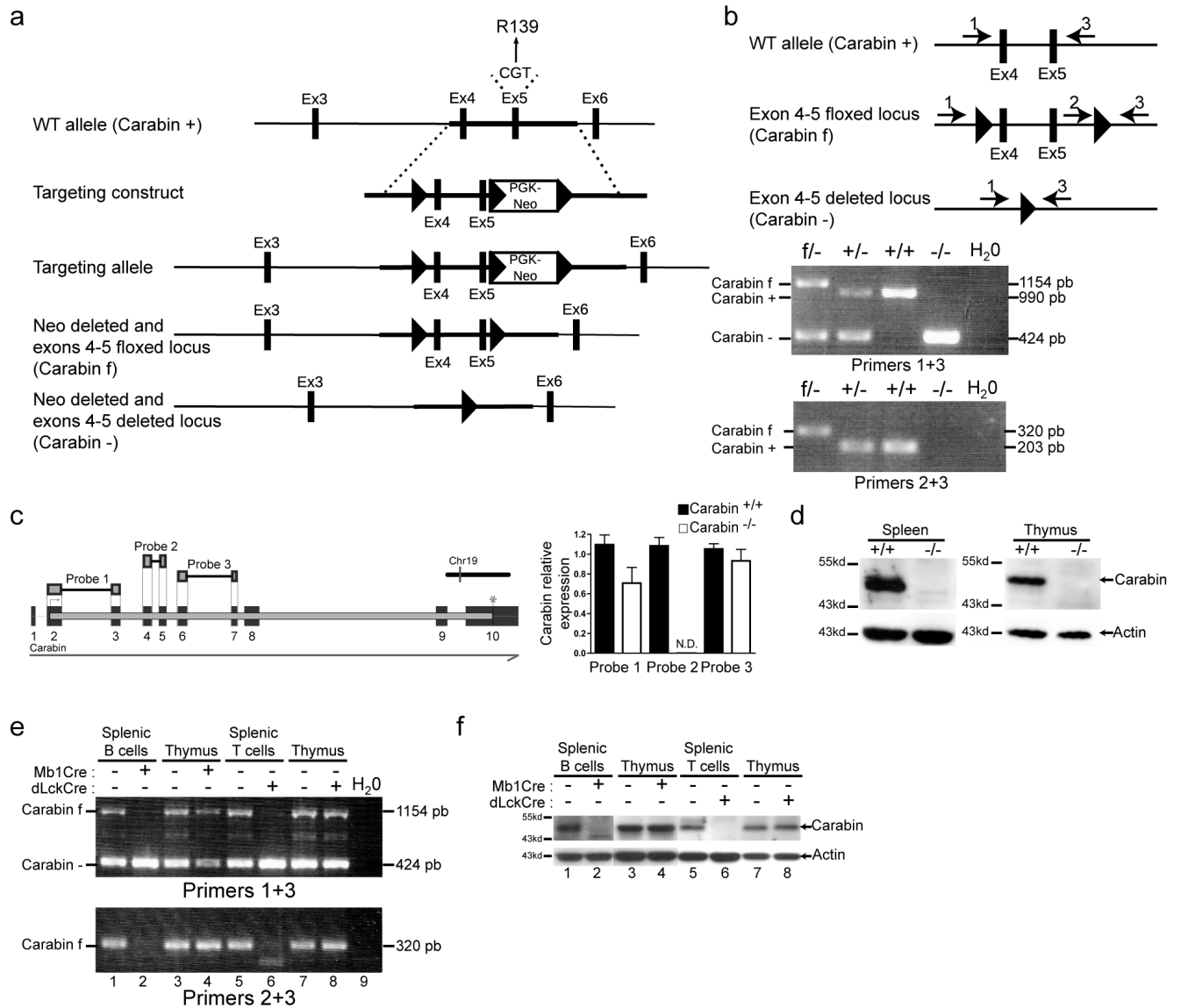
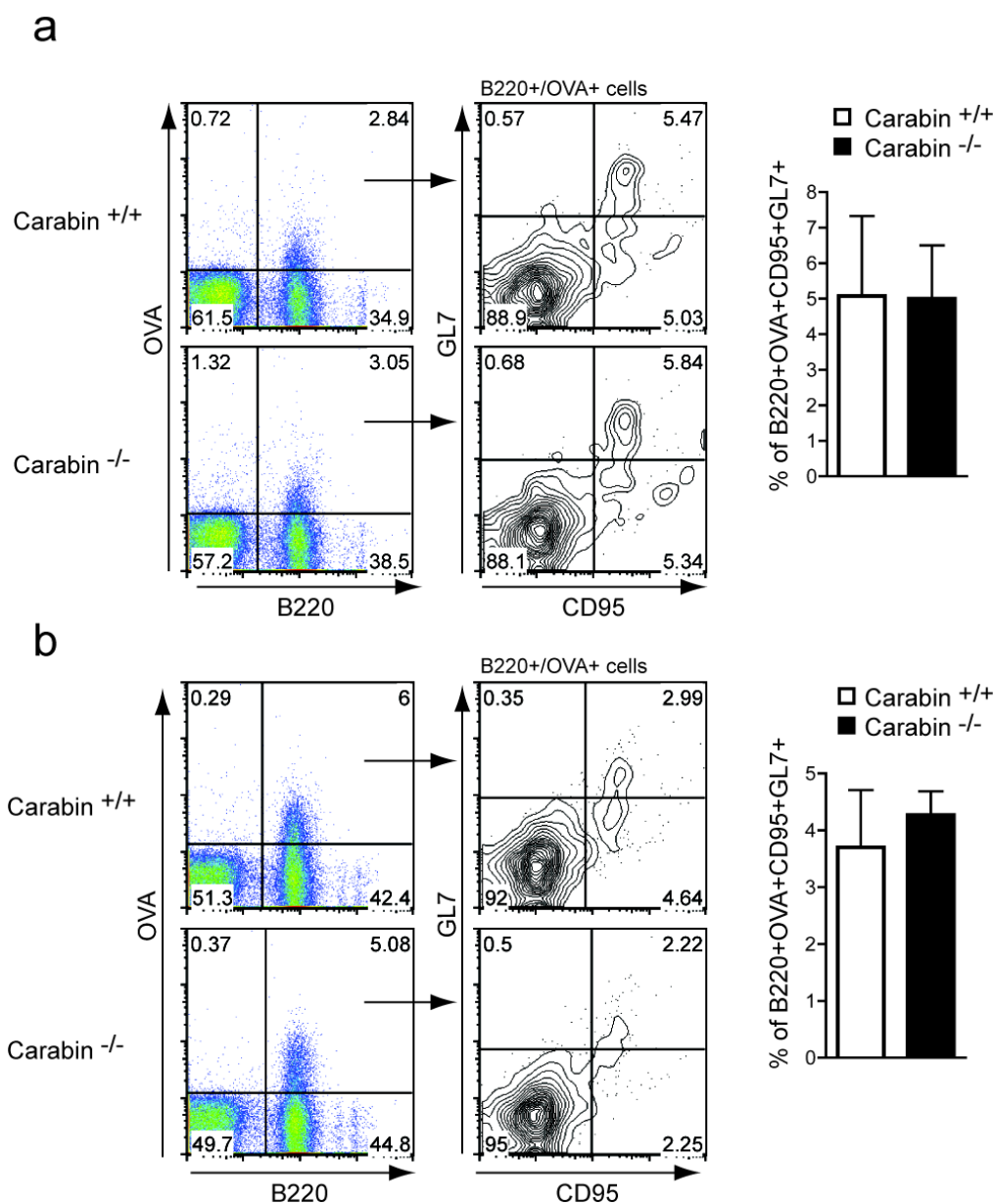


Figure 8. Carabin is underexpressed in (NZBxNZW)F1 B cells. (a) Quantitative real-time RT-PCR analysis of *Carabin* mRNA expression in splenic mature B cells purified from 4-month-old Balb/c (n=4) and (NZBxNZW)F1 (n=4) mice. Each sample was normalized to the endogenous control *Hprt1*. (b) Flow cytometry analysis of Erk phosphorylation on Balb/c or (NZBxNZW)F1 B220⁺ B cells after stimulation for 10 min with anti-IgM antibody (10 µg/ml) (+) or with medium alone (-). (a; errors bars, standard deviation).

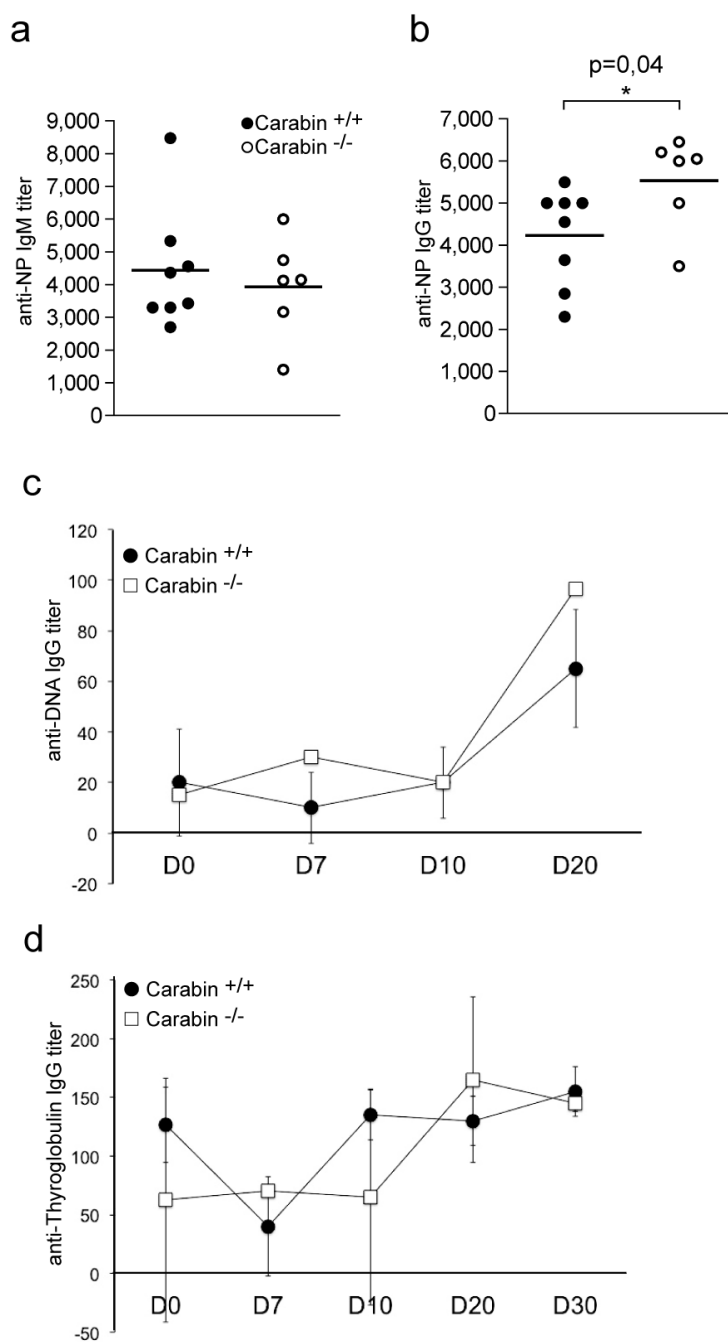


Supplementary Figure 1. Carabin gene targeting. (a) Schematic representation of the targeted region of murine *Carabin* locus (Carabin +), targeting construct, targeting allele, Neo-deleted and exons 4-5 floxed (Carabin f) allele, and Neo-deleted and exons 4-5 deleted (Carabin -) allele. Filled boxes represent exons; filled triangles, LoxP sites. Note that the NeoR cassette is flipped and floxed (FRT sites are not represented) (b) Screening of Carabin f/-, Carabin +/-, Carabin +/+ and Carabin -/- mouse line progenies by PCR on tail DNA, using primers 1 (Lf1), 2 (Ef) and 3 (Er1); see “Generation of ES cells, Carabin -/-, and conditional Carabin -/- mice” in the Methods section. Filled box represents exons; filled triangles, LoxP sites. Primers 1 and 3 reveal a 1.15 kb floxed (Carabin f), a 0.99 kb WT (Carabin +) and a 0.42 kb deleted (Carabin -) alleles, respectively. Primers 2 and 3 reveal a 0.20 kb WT and 0.32 kb floxed alleles, respectively. (c) Quantitative real-time RT-PCR

analysis of *Carabin* mRNA expression in splenocytes from *Carabin* $+/+$ or *Carabin* $-/-$ mice, using three different probes matching exons 2-3 (Probe 1), exons 4-5 (Probe 2), exons 6-7 (Probe 3). Each sample was normalized to the endogenous control *Hprt1*. **(d)** Western blot analysis of splenic and thymic cells from *Carabin* $+/+$ or *Carabin* $-/-$ mice. Actin was used as loading control. **(e)** PCR analysis of *Carabin* deletion. *Carabin* *f* and *Carabin* $-$ alleles were amplified from genomic DNA of purified splenic total B or T cells (depending on the conditional KO model), and thymocytes from *Carabin* *f*/ $-$ mice expressing Cre (+) or not (-), using a combination of primers 1, 2, and 3 (depicted in Supplementary Figure 1b). **(f)** Immunoblot analysis of *Carabin* expression in purified splenic total B or T cells, and thymocytes from *Carabin* *f*/ $-$ mice expressing Cre (+) or not (-), using an anti-*Carabin* antibody. Actin was used as loading control. **(c;** errors bars, standard deviation).



Supplementary Figure 2. Carabin deficiency did not modify germinal center kinetics in OVA-immunized mice. (a,b) Flow cytometry analysis of OVA-specific B cells ($B220^+/OVA^+$) (left) and germinal center B cells ($CD95^+/GL7^+$) in OVA-specific population (middle, flow cytometry plots; right: the histograms show percentages of cells) in spleen (a) and lymph nodes (b), of Carabin $-/-$ and Carabin $+/+$ mice, at day 7 after immunization with 100 μ g OVA in complete Freund's adjuvant. (a, b) Data are representative of three independent experiments. (a, b; errors bars, standard deviation).



Supplementary Figure 3. Increased early antigen-specific T-independent B cell response

in Carabin KO mice. (a,b) 12-week-old mice of the indicated genotype were injected intraperitoneally with 100 µg NP-LPS in PBS and bled seven days after injection. Anti-NP (a) IgM or (b) IgG titers were determined by ELISA. The results of two-tailed Mann-Whitney test are indicated. (c, d) Anti-dsDNA (c), anti-thyroglobulin (d) IgG titers were determined by ELISA in sera of Carabin +/+ (n=3) and Carabin -/- (n=3) mice. (c, d; errors bars, standard deviation).

G) Conclusions, discussion et perspectives

Les données exposées dans cette deuxième partie sur l'étude du gène *Carabin* nous ont permis de montrer que :

1/ les lymphocytes T issus de souris Carabin KO et Carabin KD répondent plus rapidement et plus fortement à une stimulation de la voie du TCR. Ceci se manifeste par une accélération de la phosphorylation de Erk, une augmentation de la prolifération et une augmentation de la surexpression des marqueurs d'activation, après activation de lymphocytes T déficients en Carabin. Ces résultats confirment dans un système plus physiologique les données obtenues par Pan et al. définissant Carabin comme un régulateur négatif de la voie du TCR (F. Pan et al. 2007).

2/ la déficience en Carabin dans les lymphocytes B aussi bien *in vitro* (cellules A20) qu'*ex vivo* (lymphocytes B issus de souris Carabin *-/-*) engendre, après une stimulation BCR dépendante, une accélération de la phosphorylation de Erk, un composant essentiel de la voie de signalisation du BCR. Ces résultats mettent en évidence une fonction similaire pour Carabin dans la voie du BCR et du TCR, en jouant un rôle important dans la régulation négative des signaux provenant d'une stimulation du BCR.

La fonction régulatrice de Carabin sur la signalisation du BCR peut supposer que Carabin joue un rôle dans les mécanismes de tolérance B, qui dépendent de la force du signal du BCR suite à la liaison d'un autoantigène. Les investigations pour tenter de répondre à cette question porteront sur l'étude des mécanismes de tolérance dans le modèle anti-ADN 3H9 (56R) de Weigert sur fond Carabin KO. Les croisements sont en cours au laboratoire.

3/ l'absence de Carabin chez la souris donne lieu à une augmentation de la réponse précoce à un antigène T-dépendant et T-indépendant. De plus, ce phénotype est également observé chez les souris ayant un KO conditionnel de Carabin dans les lymphocytes B (Mb1-Cre) alors qu'il n'est pas observé lors d'un KO conditionnel de Carabin dans les lymphocytes T (dLck-Cre). Ces données confirment le rôle de Carabin comme un régulateur négatif des lymphocytes B. En perspective de ce travail, il sera intéressant d'étudier l'effet de cette accélération de la réponse à un antigène, dans le cadre d'une infection bactérienne ou virale. L'étude de la réponse immunitaire de souris Carabin KO dans un modèle d'infection nous permettra de répondre à cette question. Des études d'infection par *Borrelia burgdorferi* sont

en cours de réalisation.

4/ Les souris Carabin KO ne développent pas de signe d'autoimmunité à elles seules. Cependant, leurs lymphocytes B présentent des signes d'hypersensibilité. Ainsi, étant donné le caractère multigénique de la maladie lupique, il sera important d'étudier si une déficience en *Carabin* est capable d'accélérer l'apparition et/ou la sévérité d'une autoimmunité dans des modèles murins de LED. Cette hypothèse sera testée en analysant le développement des signes autoimmuns dans des souris *B6lpr*, *Sle1,2* ou *3 Carabin* déficientes.

5/ les souris Carabin KO développent des signes d'autoimmunité après une double stimulation BCR et TLR-9 délivrée par l'injection de CpG. En effet, peu de temps après injection, les lymphocytes B de souris Carabin KO produisent des autoanticorps exclusivement de type anti-ADNdb et présentent des dépôts rénaux d'Ig. Ceci aboutit au développement d'une atteinte rénale qui peut être apparentée à une glomérulonéphrite lupique de type II. Ces résultats montrent que, bien qu'une déficience en Carabin à elle seule ne permette pas le développement d'une autoimmunité, une stimulation des cellules B par le BCR et TLR-9 déclenche l'apparition d'une autoimmunité.

Le déclenchement d'une autoimmunité par une co-stimulation BCR et TLR a déjà été évoqué par plusieurs groupes. Cette hypothèse a été pour la première fois proposée par Leadbetter et al en 2002. Dans cette étude, les auteurs montrent que l'activation d'une lignée de cellules B (AM14) exprimant un BCR spécifique de la partie Fc des IgG (encore appelé facteur rhumatoïde) nécessite deux signaux : 1/ un signal provenant du BCR apporté par la fixation de complexes immuns IgG/chromatine ; 2/ un signal provenant de TLR9 apporté par l'endocytose via le BCR des complexes immuns contenant de l'ADN (Leadbetter et al. 2002). Par la suite d'autres études ont permis de confirmer cette hypothèse en étendant ce mode d'activation aux cellules exprimant un BCR dirigé contre l'ADNdb. Ainsi, dans le modèle 3H9 de Weigert, une stimulation des cellules B avec de l'ADN hypométhylé de type CpG engendre une activation de ces cellules, activation qui n'est pas observée lors de l'utilisation de cellules AM14 (Viglianti et al. 2003).

De plus, l'un des premiers effets d'une injection de CpG est une forte production de d'IFN- α (Hartmann et al. 2003). Cette production d'interféron va provoquer une augmentation de l'expression des TLR7 et TLR9 à la surface des cellules B et va aussi générer une mort cellulaire. Les débris provenant de cellules mortes contiennent des

autoantigènes potentiels notamment de l'ARN et de l'ADN qui vont pouvoir être reconnus par le BCR de cellules B de spécificité anti-ADN ou anti-ARN. Après endocytose du BCR, les molécules d'ARN ou d'ADN endosomiques vont avoir la possibilité de stimuler le TLR7 ou le TLR9, respectivement (Figure 37).

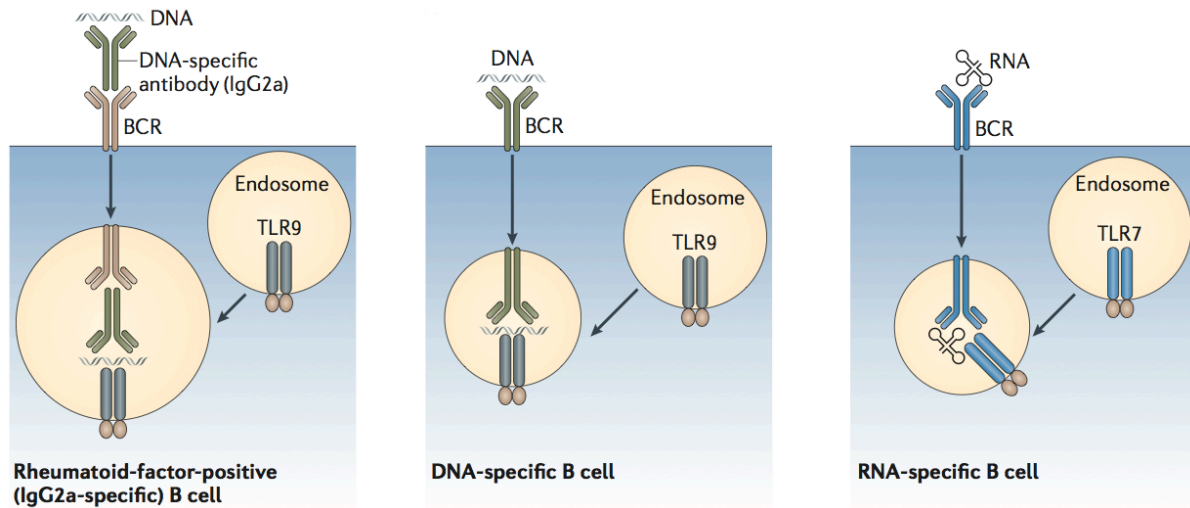


Figure 37 : Modèle de déclenchement d'une autoimmunité induite par une stimulation conjointe du BCR et de TLRs.

Scénarios possibles pour le transport BCR-dépendant de complexes immuns anti-ADN/ADN, de l'ADN ou de l'ARN, dans les compartiments endosomiques, dans lesquels sont exprimés les TLR7 et TLR9.

D'après (Marshak-Rothstein 2006).

Toutes ces données ont abouti à l'élaboration d'un modèle décrivant le déclenchement d'une boucle d'amplification qui peut conduire à une activation de cellules B anti-ADN ou anti-ARN. Chez l'homme, lors d'une infection virale, une grande quantité d'IFN- α est produite. Ceci pourrait enclencher la boucle d'amplification décrite précédemment. Cependant, il semble évident qu'il existe des mécanismes de régulation permettant d'éviter ce phénomène puisque la majorité des individus ayant contracté une infection virale ne développent pas d'autoimmunité.

Nous avons montré dans cette partie que l'activation par le BCR et le TLR9 permet l'apparition d'une autoimmunité chez la souris Carabin KO. D'autre part, plusieurs études ont montré que la voie Erk, qui est directement régulée par Carabin, est d'une grande importance notamment dans le maintien de l'état d'ignorance ou d'anergie des lymphocytes B autoréactifs (Rui et al. 2003). Tous ces résultats obtenus chez la souris Carabin KO couplés aux données issues de notre analyse du transcriptome de patients atteints de LED, faisant état

d'une diminution de l'expression de Carabin au cours du LED, constituent un faisceau de preuves laissant supposer un rôle important de Carabin dans les mécanismes de régulation de l'activation de cellules B autoréactives.

Cette partie des résultats obtenus sur l'étude de Carabin nous ouvre plusieurs perspectives de travail :

- il sera intéressant d'évaluer la réponse de souris Carabin KO conditionnelles spécifiques des lymphocytes B à une immunisation par le CpG DNA, afin d'évaluer indirectement la contribution des autres cellules que les lymphocytes B, au phénotype que nous observons.

- nos résultats tendent à montrer que Carabin pourrait réguler de manière négative l'activation de lymphocytes B autoréactifs co-activés par le BCR et le TLR9. Ainsi, outre sa fonction de régulateur négatif de la voie du BCR, Carabin pourrait également être impliquée dans la régulation de la voie de signalisation du récepteur TLR9. Cette hypothèse sera testée par une analyse de la prolifération, de la surexpression des marqueurs d'activation et de la cascade d'activation, induite après stimulation de lymphocytes B Carabin KO avec du CpG, en présence ou absence d'inhibiteur de TLR9, et d'anticorps anti-IgM en dose suboptimale (afin de stimuler la voie du BCR).

- Ensuite, afin de confirmer les résultats, il sera intéressant d'étudier l'activation de cellules B anti-ADN 3H9, déficients ou non en Carabin, par du CpG DNA (permettant de co-activer dans ce cas la voie du BCR et du TLR9, [Figure 37 page 193](#)) *in vitro*, et enfin d'étudier l'effet de l'injection de CpG DNA à des souris transgéniques anti-ADN 3H9 Carabin KO.

6/ Les partenaires de Carabin dans les lymphocytes T sont connus (Ras et la calcineurine) (F. Pan et al. 2007), mais pas dans les lymphocytes B. Même si nos résultats sont en faveur de l'hypothèse que Carabin interagit également avec Ras dans les lymphocytes B, il sera important d'étudier les partenaires de Carabin dans ces cellules. Ainsi, des expériences d'immunoprécipitation, réalisées dans des cellules B transduites avec un vecteur lentiviral permettant l'expression d'une protéine Carabin fusionnée à une étiquette V5, nous permettront de répondre à cette question.

7/ Enfin, afin de mieux comprendre les effets de la sous-expression de Carabin dans les lymphocytes B, nous envisageons d'étudier l'effet de la sous-expression de Carabin sur l'expression d'autres gènes des LB grâce à des puces affymetrix pangénomiques.

III. Etude de la fonction de Sh3kbp1

A) Les multiples fonctions de Sh3kbp1

Sh3kbp1 (ou CIN85 ou Ruk ou Seta) est une protéine adaptatrice, composée de 3 domaines SH3 (Src-Homology 3) dans sa partie N-terminale, d'un domaine riche en proline et d'un domaine coiled-coil au niveau C-terminal. Grâce à ces différents domaines fonctionnels, Sh3kbp1 a la capacité de se lier à un grand nombre de protéines (Figure 38), comme le prouvent les données de la littérature : en effet Sh3kbp1 semble appartenir à différents complexes protéiques (pour revue (Dikic 2002)). Lorsque nous avons débuté l'étude sur Sh3kbp1, plusieurs fonctions de cette protéine étaient d'ores et déjà décrites.

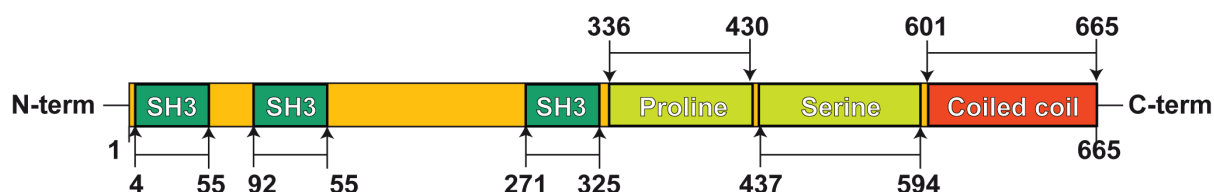


Figure 38: Représentation schématique de la protéine Sh3kbp1.

Les positions des domaines fonctionnels connus sont indiquées.

La première étude ayant permis d'identifier Sh3kbp1 a été publiée en 2000 et a mis en évidence la capacité de Sh3kbp1 à se lier aux protéines de la famille Cbl (Casitas B-lineage Lymphoma). Dans cette étude, les auteurs ont également montré l'implication du couple Sh3kbp1/Cbl-b dans la voie de signalisation du récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Take et al. 2000). Au cours des années 2000, de nombreux travaux ont corroboré la fonction exercée par Sh3kbp1 dans la voie du récepteur à l'EGF et ont également permis de préciser les mécanismes d'action de Sh3kbp1. Ainsi, dans deux études parues dans *Nature* en 2002, deux équipes ont montré simultanément que Sh3kbp1 fait partie d'un complexe comprenant la protéine Cbl et l'endophiline (Soubeyran et al. 2002; Petrelli et al. 2002). Après liaison de l'EGF à son récepteur, ce complexe permet l'internalisation du récepteur et sa dégradation.

Une autre étude montre un rôle de Sh3kbp1 dans la régulation de la PI3K (Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase). Dans cette étude, les auteurs montrent que Sh3kbp1 est capable, grâce à son domaine riche en proline, de se lier à une sous-unité régulatrice de la PI3K appelée p85 α , et que la surexpression de Sh3kbp1 dans une culture primaire de neurones engendre l'apoptose des cellules due à une suractivation des cellules (Gout et al. 2000). D'autre part, une interaction entre Sh3kbp1 et BLNK (B-Cell Linker Protein), une protéine impliquée dans la voie de signalisation du BCR, a également été décrite (Watanabe

et al. 2000). Enfin, Sh3kbp1 a été impliquée dans la voie de signalisation du pré-TCR : il a été montré que la liaison de la chaîne alpha du pré-TCR aux protéines Sh3kbp1 et C2AP est importante pour l'activation de la voie de signalisation de ce récepteur (Navarro et al. 2007). Ainsi, dans cette étude Sh3kbp1 a plutôt un rôle positif dans la signalisation intracellulaire du pré-TCR.

Au cours de l'activation des voies de signalisation du TCR et du BCR de nombreuses protéines vont être ubiquitinylées, ce qui va engendrer soit leur dégradation via le protéasome, soit leur permettre de recruter d'autres protéines portant des UBD (Ubiquitin binding domain). Il a été montré que le domaine SH3C de Sh3kbp1 est également capable de se lier à des protéines ubiquitinylées et peut donc jouer le rôle d'UBD (Bezsonova et al. 2008). Ainsi Sh3kbp1 est capable de s'associer à de nombreuses protéines, pour éventuellement former des complexes protéiques importants.

Cependant, dans les cellules immunitaires, c'est l'interaction entre Sh3kbp1 et les protéines de la famille Cbl qui semble jouer le rôle le plus important. La famille des protéines Cbl comporte trois membres : c-Cbl (ou Cbl), Cbl-b et Cbl-3. Deux protéines de cette famille (Cbl-b et c-Cbl) sont fortement exprimées dans les cellules de la lignée lymphoïde et jouent un rôle important dans la régulation des voies de signalisation du BCR, du TCR et des récepteurs pour la partie Fc des immunoglobulines (FcR). Les protéines de la famille Cbl sont des E3 ubiquitine ligases qui permettent l'ubiquitination de certains composants des voies de signalisation intracellulaire. Dans les lymphocytes T de souris, une déficience en c-Cbl engendre une augmentation de l'activation de ZAP70 (ζ -associated protein of 70kDa) qui va permettre une augmentation de la phosphorylation de Erk et provoquer un défaut dans les processus de sélection négative dans le thymus (M Naramura et al. 1998). Le KO de Cbl-b n'affecte pas la sélection thymique mais va provoquer en revanche une hyperactivation des lymphocytes T et des lymphocytes B, donnant lieu à l'apparition de signes d'autoimmunité, qui se manifestent par la présence d'autoanticorps anti-ADNdb dans le sérum et d'infiltrats lymphocytaires dans de nombreux organes (Bachmaier et al. 2000). Enfin, un double KO de c-Cbl et Cbl-b va engendrer une réponse exacerbée des lymphocytes T suite à une stimulation par la voie du TCR. Ceci est dû à un défaut d'internalisation du TCR qui empêche l'extinction du signal provenant du TCR (Mayumi Naramura et al. 2002). Une double déficience en c-Cbl et Cbl-b spécifiquement dans les lymphocytes B provoque une augmentation du nombre de lymphocytes B1 et des lymphocytes B de la zone marginale chez la souris, ainsi que l'apparition chez 50% des animaux d'une maladie de type lupique à l'âge

de 10 mois (Kitaura et al. 2007). Ces données montrent bien le rôle fondamental des protéines de la famille Cbl dans la régulation des signaux provenant du TCR et du BCR.

Sh3kbp1 est un interactant direct des protéines de cette famille. En effet, il a été montré, dans une lignée de mastocytes, que *Sh3kbp1* est capable de se lier à Cbl et de promouvoir l'ubiquitination puis la dégradation de Syk (spleen tyrosine kinase) après activation. Syk est par ailleurs un composant clé de la voie de signalisation du BCR (Peruzzi et al. 2007).

Toutes ces données bibliographiques, ajoutées au fait que l'expression de *Sh3kbp1* est diminuée dans les lymphocytes B de patients atteints de LED quiescent dans notre analyse transcriptomique, nous a poussé à étudier les conséquences de la sous-expression de *Sh3kbp1* dans les lymphocytes B et dans le développement d'une autoimmunité.

B) Régulation de l'expression de *Sh3kbp1* dans les lymphocytes B

Nous avons dans un premier temps analysé l'expression de *Sh3kbp1* dans des lymphocytes B, activés de façon BCR-dépendante (anticorps anti-IgM) (Figure 39a) ou BCR-indépendante (LPS) (Figure 39b). Les résultats montrent une augmentation de l'expression de *Sh3kbp1*, 24h et 48h après activation avec un anticorps anti-IgM. De façon intéressante, cette augmentation n'est pas observée lors d'une stimulation BCR-indépendante. Ces résultats montrent que l'expression de *Sh3kbp1* est régulée au cours d'une stimulation du BCR, laissant supposer une fonction importante de cette protéine dans cette voie d'activation.

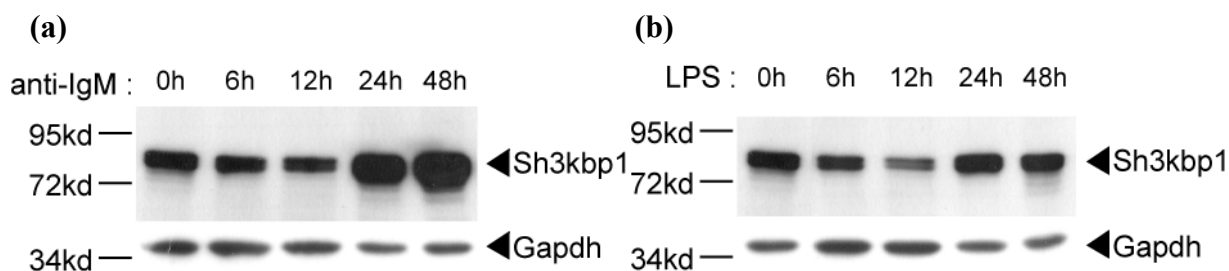


Figure 39 : Expression de *Sh3kbp1* dans les lymphocytes B après activation BCR-dépendante ou BCR-indépendante.

Analyse par Western Blot de lysats protéiques de lymphocytes B de souris, triés (CD43⁻) puis activés avec un anticorps anti-IgM (10 µg/ml) (a) ou du LPS (10 µg/ml) (b) pendant les temps indiqués.

C) Modulation de l'expression de *Sh3kbp1* par ARN interférence

Comme pour *Carabin*, le but de ce travail était, dans un premier temps, de choisir une séquence de shRNA spécifique de *Sh3kbp1* murin, qui serait clonée dans une construction lentivirale, afin de produire des cellules B *Sh3kbp1* KD et des souris transgéniques KD, et d'étudier ainsi les effets de la sous-expression de *Sh3kbp1* sur la fonction des lymphocytes B et le développement d'une autoimmunité. Les méthodes utilisées pour générer les différentes constructions permettant l'expression d'un shRNA spécifique de l'ARNm de *Sh3kbp1* sont identiques à celles utilisées pour le gène *Carabin* (voir partie "Modulation de l'expression de *Carabin* par ARN interférence" [page 144](#)).

Contrairement au gène *Carabin*, un anticorps spécifique de la protéine *Sh3kbp1* était disponible au début de cette étude. Ceci nous a permis de directement tester les shRNA dans une lignée de fibroblastes murins (cellules L929).

1) Test des shRNA spécifiques de l'ARNm de *Sh3kbp1*

Pour réaliser l'inhibition de l'expression de *Sh3kbp1*, nous avons testé 20 shRNA différents dirigés contre l'ARNm de *Sh3kbp1* dans le système pSUPER. ([Figure 23 page 100](#) matériels et méthodes). Ce vecteur nous a permis dans un premier temps de tester l'efficacité des différents shRNA après transfection de cellules L929. Pour générer une lignée stable exprimant le shRNA, la cassette contenant le promoteur H1 suivi du shRNA a ensuite été clonée dans le vecteur lentiviral pTRIP. Nous avons choisi des séquences de shRNA (selon les critères détaillés dans la partie Matériels et Méthodes) s'hybridant à différents endroits le long du transcrit de *Sh3kbp1* ([Figure 40](#)).

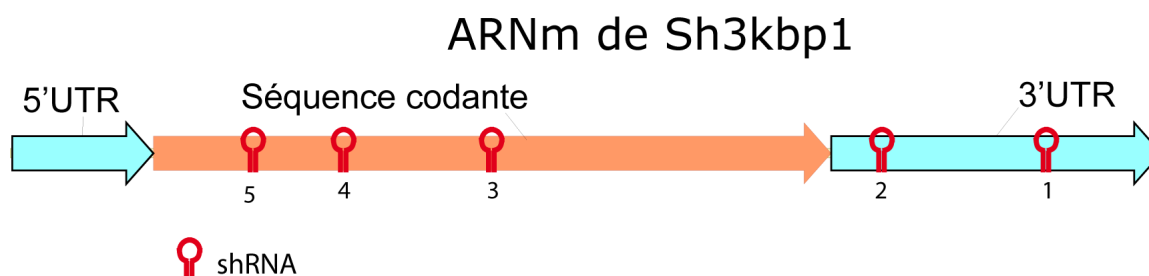


Figure 40 : Schéma des régions d'hybridation des shRNA le long du transcrit de *Sh3kbp1*.

Les shRNA (numérotés de 1 à 5) ont été choisis en utilisant la méthode développée par Tusch et *al.* (cf matériels et méthodes).

a) Sous-clonage des shRNA dans le vecteur pSUPER.

La méthode utilisée pour le sous-clonage du shRNA spécifique de *Sh3kbp1* dans le vecteur pSUPER est la même que celle décrite pour le gène Carabin (page 146).

b) Expression des shRNA dans des cellules L929

Une transfection du vecteur pSUPER-shRNA dans des fibroblastes murins (L929) a été réalisée dans le but de tester l'efficacité des différents shRNA, et ainsi de sélectionner les shRNA efficaces qui ont ensuite pu être clonés dans le vecteur lentiviral pTRIP. Les lysats cellulaires des cellules transfectées ont été récoltés 48h après transfection et l'expression du produit de *Sh3kbp1* a été analysée par Western Blot à l'aide d'un anticorps anti-*Sh3kbp1*. La figure 41 montre le résultat d'un Western Blot représentant le test de 5 shRNA différents. Nous avons pu observer une baisse de l'expression de *Sh3kbp1*, par rapport au contrôle, lors de la transfection avec les vecteurs pSUPER-shRNA n° 1 et n° 2. Ces résultats indiquent que le système d'ARN interférence semble avoir fonctionné avec les vecteurs pSUPER n° 1 et n° 2. Ainsi, le vecteur pSUPER n° 2 a été choisi en vue du clonage de la cassette contenant le promoteur H1 et le shRNA, dans le vecteur lentiviral pTRIP.

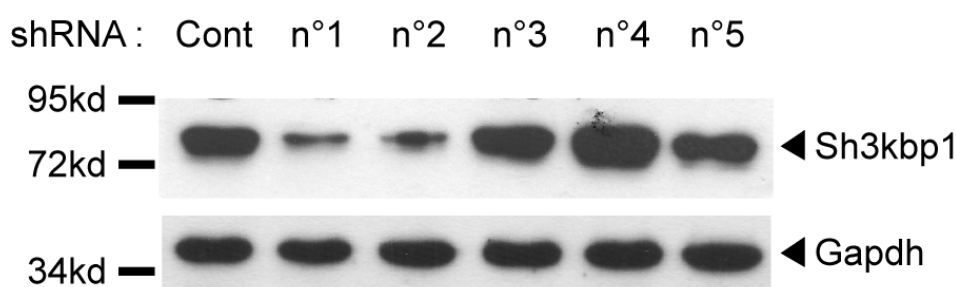


Figure 41 : Expression de *Sh3kbp1* après transfection de cellules L929 avec le vecteur pSUPER-shRNA.

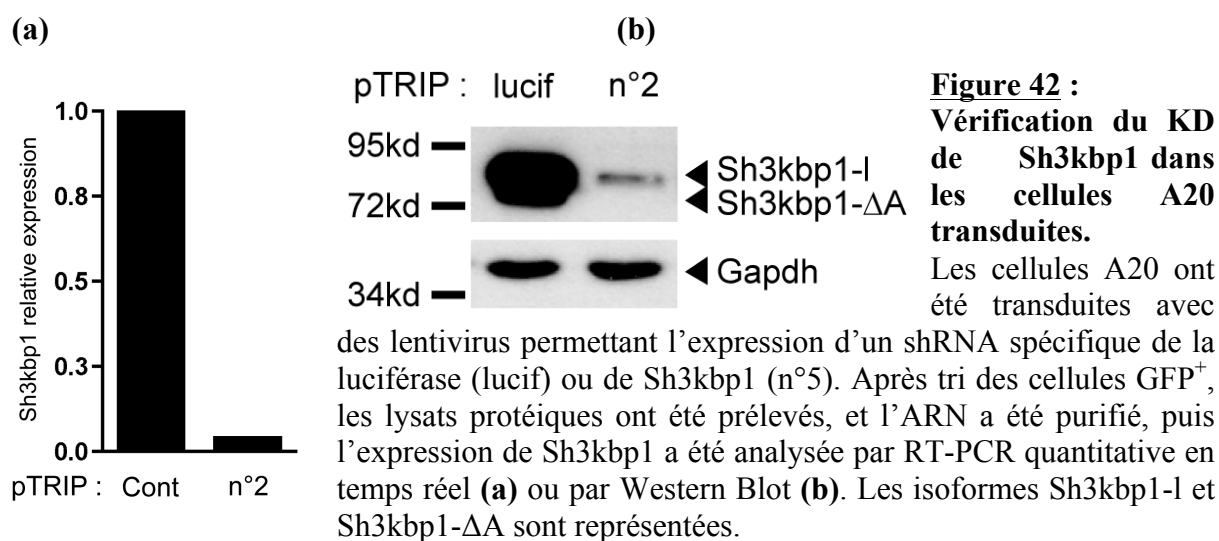
Analyse par Western Blot des lysats de cellules L929, 48h après transfection avec le vecteur pSUPER-shRNA. L'expression de *Sh3kbp1* a été testée après transfection avec 5 vecteurs pSUPER-shRNA différents, le vecteur pSUPER sans shRNA servant de contrôle (Cont). L'expression de *Sh3kbp1* est détectée à l'aide d'un anticorps anti-*Sh3kbp1*, et celle de l'actine à l'aide d'un anticorps anti-actine.

2) Clonage des shRNA choisis dans le vecteur lentiviral pTRIP

La méthode utilisée pour le clonage des shRNA dans le vecteur pTRIP est la même que celle décrite pour le gène Carabin (page 148). Pour les raisons évoquées précédemment dans l'étude du gène Carabin, le promoteur CMV, guidant l'expression de la GFP, a cependant été remplacé par celui de l'Ubiquitine C humaine (promoteur ubiquitaire permettant une expression significative dans les organes lymphoïdes) (Soulas-Sprauel et al. 2007).

D) Etude de l'effet d'une sous-expression de *Sh3kbp1* sur la fonction des lymphocytes B dans la lignée A20 *in vitro*

Dans le but d'évaluer l'effet d'une sous-expression de *Sh3kbp1* sur la fonction des lymphocytes B nous avons utilisé la construction lentivirale (Figure 23 page 100 matériels et méthodes) décrite précédemment pour transduire des cellules de la lignée A20. Comme pour l'étude de Carabin, la construction lentivirale utilisée contient un gène rapporteur de type GFP. Ainsi, après un tri des cellules GFP⁺ (l'expression de la GFP étant le témoin d'une intégration lentivirale) nous avons vérifié la sous-expression de *Sh3kbp1* par RT-PCR quantitative en temps réel et par Western Blot. La transduction des cellules A20 avec le lentivirus permettant une expression du shRNA spécifique de *Sh3kbp1* engendre une forte sous-expression de l'ARNm (Figure 42a) et de la protéine *Sh3kbp1* (Figure 42b).



Nous avons ensuite activé ces cellules A20 à l'aide d'un anticorps anti-IgG puis analysé la phosphorylation de plusieurs protéines de la voie de signalisation du BCR (Erk, Akt et JNK) par Western Blot. Les résultats montrent que la sous-expression de *Sh3kbp1* dans les cellules A20 provoque une accélération de la voie Erk et Akt après stimulation BCR-dépendante (Figure 43a et b). La voie JNK, au contraire, ne semble pas être impactée par la sous-expression de *Sh3kbp1* (Figure 43c). Ces observations montrent que *Sh3kbp1* est important dans la régulation du signal provenant du BCR et permet de suspecter un rôle de régulateur négatif de cette voie pour cette protéine.

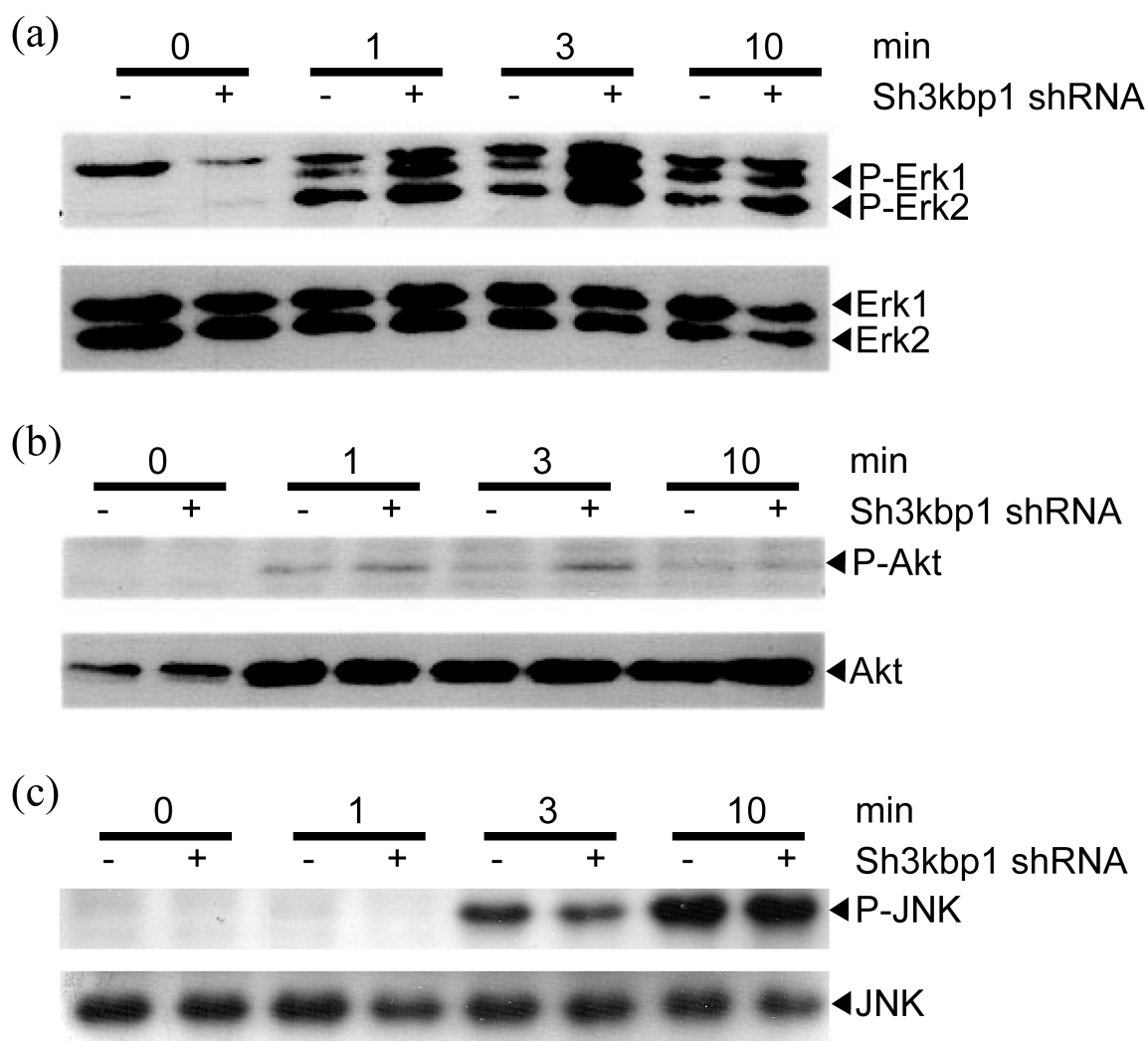


Figure 43 : Etat de phosphorylation d'Erk, d'Akt, et de JNK, dans les cellules A20 *Sh3kbp1* KD, après activation BCR-dépendante. Analyse par Western Blot des lysats de cellules A20 *Sh3kbp1* KD ou de cellules contrôles (shRNA anti-luciférase) 1, 3, et 10 min après stimulation avec un anticorps anti-IgG ou avec du milieu de culture seul. L'expression de Erk et phospho-Erk (a), Akt et phospho-Akt (b), JNK et phospho-JNK (c) a été testée.

E) Etude de l'effet d'une sous-expression de *Sh3kbp1* chez la souris

Dans le but d'étudier les effets de la sous-expression de *Sh3kbp1* *in vivo*, nous avons dans un premier temps généré (en utilisant le même lentivirus que celui utilisé pour les expériences sur les cellules A20) une lignée de souris exprimant le shRNA spécifique de *Sh3kbp1* par transgénèse lentivirale, afin de permettre une sous-expression de *Sh3kbp1* *in vivo*.

Après production des animaux transgéniques fondateurs, nous avons vérifié par RT-PCR quantitative en temps réel la sous-expression de *Sh3kbp1* dans les cellules de sang total d'un grand nombre de souris transgéniques lentivirales, provenant de fondateurs différents et présentant un nombre varié d'intégrations lentivirales. Dans un second temps, nous avons analysé la sous-expression de *Sh3kbp1* dans la rate de souris issues d'un des fondateurs, par Western blot. Malheureusement, aucune des souris analysées n'a permis de mettre en évidence une sous-expression de *Sh3kbp1* que ce soit dans les cellules du sang total (Figure 44) ou dans les cellules de rate (Figure 45 page 204). De ce fait le phénotype de ces souris n'a pas été analysé en détail (sous-population des lymphocytes B, T, activation, etc...).

Les raisons de cette absence de KD chez les souris lentigéniques sont vraisemblablement les mêmes que celles concernant les souris Carabin KD, et sont discutées dans le paragraphe "Vérification du modèle Carabin KD" (page 149).

Nous avons pu cependant noter une expression de la GFP suffisamment importante pour être détectable en cytométrie de flux sur les cellules sanguines. Ainsi l'utilisation du promoteur de l'Ubiquitine C humaine dans un modèle *in vivo* se révèle plus efficace que celle du promoteur CMV.

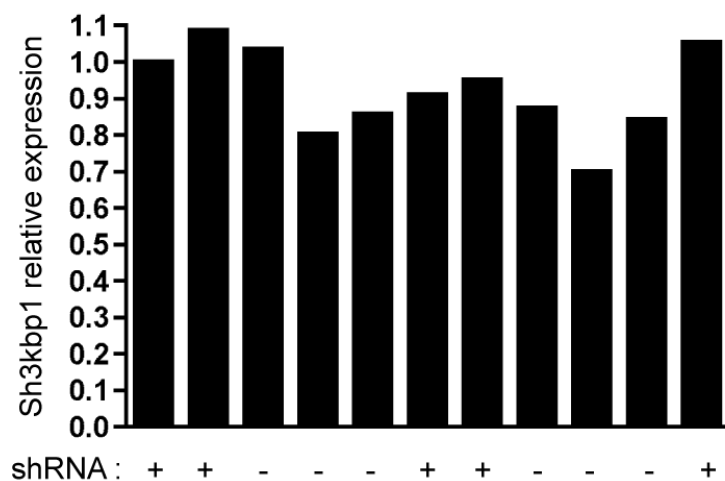


Figure 44 : Expression de l'ARNm codant pour *Sh3kbp1* dans les cellules de sang total de souris *Sh3kbp1* KD.

L'expression de *Sh3kbp1* a été analysée par RT-PCR quantitative en temps réel, à partir d'ADNc de cellules de sang total de souris *Sh3kbp1* KD (shRNA +) et contrôles (shRNA -).

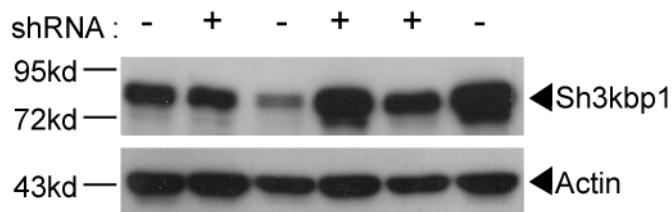


Figure 45 : Expression de Sh3kbp1 dans les cellules de rate de souris Sh3kbp1 KD.

L'expression de Sh3kbp1 a été analysée par Western Blot à partir de lysats protéiques de cellules de rate de souris Sh3kbp1 KD et de souris contrôles.

F) Conclusions, discussion et perspectives

Dans cette troisième partie nous avons montré que :

1/ l'expression de Sh3kbp1 dans les lymphocytes B augmente après activation de la voie du BCR. De plus, cette augmentation semble être spécifique de la voie du BCR puisque qu'elle n'est pas observée lors d'une activation BCR-indépendante (LPS). Ces résultats laissent supposer un rôle important pour Sh3kbp1 dans la régulation du signal provenant du BCR. De plus, compte tenu du rôle décrit pour Sh3kbp1 dans d'autres voies de signalisation, notamment dans l'activation des protéines de la famille Cbl, on peut émettre l'hypothèse que l'augmentation de l'expression de Sh3kbp1 dans la cellule B après activation du BCR pourrait permettre d'inhiber le signal émanant du BCR, dans le but de mettre fin à l'activation et d'empêcher une activation trop forte de la cellule B.

2/ lors d'une activation BCR-dépendante d'une lignée de cellules B (A20), la sous-expression de Sh3kbp1 provoque une accélération de la phosphorylation de Erk et de Akt alors que celle de JNK ne semble pas être affectée. Ceci montre que Sh3kbp1 semble être un régulateur négatif de certaines voies de signalisation du lymphocyte B. Cette hypothèse sera rediscutée plus loin, à la lumière d'un article publié tout récemment.

L'effet de la sous-expression de Sh3kbp1 dans les voies impliquant Erk et Akt peut s'expliquer de plusieurs manières. D'une part, il a été montré dans des cellules d'insecte (SF9) que Sh3kbp1 a la capacité de se lier à une sous-unité régulatrice (p85 α) de la PI3K, mais on ne connaît pas les effets de cette interaction (Gout et al. 2000). Le fait que la PI3K soit située en amont d'Akt dans la voie de signalisation du BCR, et que la phosphorylation d'Akt soit augmentée dans les cellules B Sh3kbp1 KD, laissent supposer que Sh3kbp1 pourrait être un régulateur négatif de la PI3K dans les lymphocytes B. D'autre part, il a été montré, dans une lignée de fibroblaste (RBL-2H3), que Sh3kbp1 est capable de se lier et d'activer la protéine c-Cbl, qui elle-même va promouvoir l'ubiquitination puis la dégradation

de Syk (Peruzzi et al. 2007). Dans les cellules B, Syk est une tyrosine kinase directement associée au BCR, se situant très tôt dans la voie d'activation du BCR. Ainsi une sous-expression de *Sh3kbp1* devrait impacter toutes les voies de signalisation déclenchées par une stimulation du BCR incluant celles aboutissant à la phosphorylation de Erk, d'Akt mais également de JNK. Or d'après nos résultats, l'activation de JNK ne semble pas être touchée par la sous-expression de *Sh3kbp1* dans les lymphocytes B activés par la voie du BCR. Dans le but de compléter ces résultats, nous souhaitons également tester la phosphorylation de p38, autre protéine impliquée dans une voie de signalisation comportant des acteurs communs avec celle impliquant JNK.

Une étude très récente a décrit le phénotype d'une souris *Sh3kbp1* KO conditionnelle dans les lymphocytes B (Kometani et al. 2011). Dans cette étude, les auteurs montrent que la réponse des souris *Sh3kbp1^{flloxY} Mb1Cre⁺* à une immunisation T-dépendante est déficiente et que ce phénotype provient d'un défaut d'activation de IKK- β . Les cellules B *Sh3kbp1* KO sont également caractérisées par une absence de réponse à une stimulation par un anticorps anti-IgM *in vitro*. Par ailleurs, aucune différence significative dans la phosphorylation de Erk, Akt et JNK n'a été observée dans cette étude. Ces résultats, qui sont en faveur d'un rôle positif de *Sh3kbp1* dans la signalisation du BCR, sont en désaccord avec ceux que nous avons obtenus concernant Erk et Akt. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène :

1/ la lignée A20 exprime un BCR de type IgG alors que les expériences d'activation *in vitro* réalisées dans cette étude ont été effectuées sur des cellules B spléniques, stimulées avec un anticorps anti-IgM. Il a été montré que les voies de signalisation engagées par l'activation d'un BCR de type IgG et IgM sont différentes : en effet, il a notamment été montré que l'oligomérisation des BCR de type IgG à la surface des cellules B est accélérée et que ceci s'accompagne d'une phosphorylation plus rapide de Syk, comparé à la situation observée dans le cas de BCR de type IgM (W. Liu et al. 2010). Compte tenu des multiples fonctions décrites pour *Sh3kbp1*, il est donc envisageable que cette protéine ne joue pas le même rôle dans la voie de signalisation des BCR de type IgG et de type IgM.

2/ Plusieurs isoformes de la protéine *Sh3kbp1* ont été référencées (Figure 46 page 206). Les deux isoformes majoritairement exprimées dans la lignée lymphoïde (et notamment dans les lymphocytes B) sont *Sh3kbp1-l* et *Sh3kbp1- Δ A*. Dans les lymphocytes B ces isoformes sont exprimées à des niveaux équivalents (Kometani et al. 2011). Par contre, dans les cellules A20, il semblerait que l'isoforme *Sh3kbp1-l* soit plus fortement exprimée que l'isoforme *Sh3kbp1- Δ A* (Figure 42b page 201). Les différences de résultat obtenues sur la phosphorylation des protéines de la voie du BCR après activation pourraient donc également

s'expliquer par exemple par le fait que l'une des deux isoformes pourrait jouer le rôle de dominant négatif.

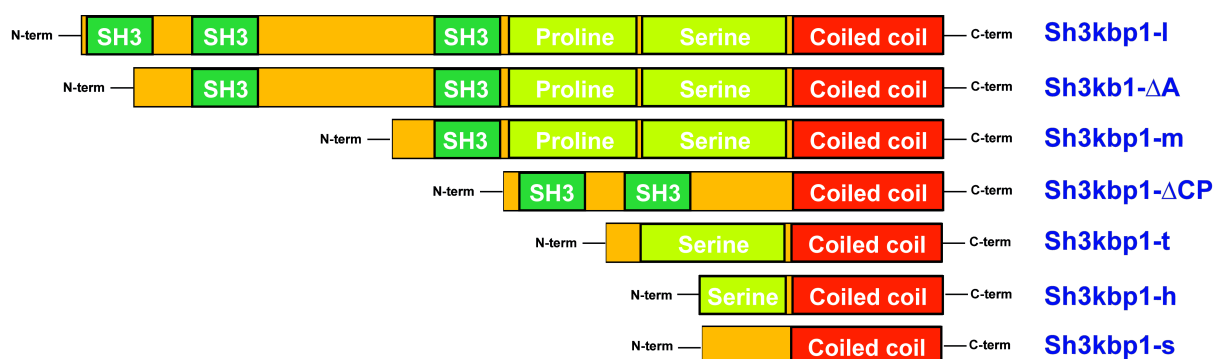


Figure 46 : Les isoformes de *Sh3kbp1* référencées.

Les domaines fonctionnels sont indiqués.

D'après (Buchman et al. 2002).

Cependant la fonction de *Sh3kbp1* est aujourd'hui encore très controversée. En effet, une étude encore très récente de Juillet 2011 a montré que, dans les lymphocytes B, *Sh3kbp1* est capable de se lier à un grand nombre de protéines via ses domaines SH3 (Büchse et al 2011). Ainsi dans cet article, les auteurs confirment la capacité de *Sh3kbp1* à se lier à Cbl et BLNK et identifient de nouvelles protéines pouvant fixer *Sh3kbp1*, telles que SHIP-1. SHIP-1 joue un rôle très important dans la régulation négative du signal provenant du BCR, notamment en agissant sur la PI3K. Les auteurs suggèrent que *Sh3kbp1* pourrait avoir un rôle dans le recrutement de SHIP-1 au niveau de la membrane plasmique, lui permettant ainsi d'inhiber l'action de la PI3K. Akt étant l'une des cibles de la PI3K, ces résultats sont en accord avec ceux que nous avons obtenus *in vitro* dans les cellules B A20 *Sh3kbp1* KD, montrant une accélération de la phosphorylation de la voie Akt, suggérant ainsi que *Sh3kbp1* pourrait avoir un rôle de régulateur négatif de la voie d'activation du BCR.

Plusieurs perspectives de travail s'offrent à nous :

- Nous souhaitons confirmer l'hypothèse du rôle de régulateur négatif du BCR dans les lymphocytes B par l'analyse d'une souris KO pour une isoforme de *Sh3kbp1*. Ces souris ont été générées par l'équipe du Prof. Dikic à Frankfort (Shimokawa et al. 2010) et sont maintenant disponibles au laboratoire. Dans ce modèle, le KO de *Sh3kbp1* a été réalisé par l'insertion ciblée d'une construction dans l'exon 2 du gène *Sh3kbp1* (Figure 47 page 207), qui permet, contrairement à celui publié tout récemment par Kometani et al., une délétion de l'isoforme *Sh3kbp1-l* mais pas de l'isoforme *Sh3kbp1-ΔA*.

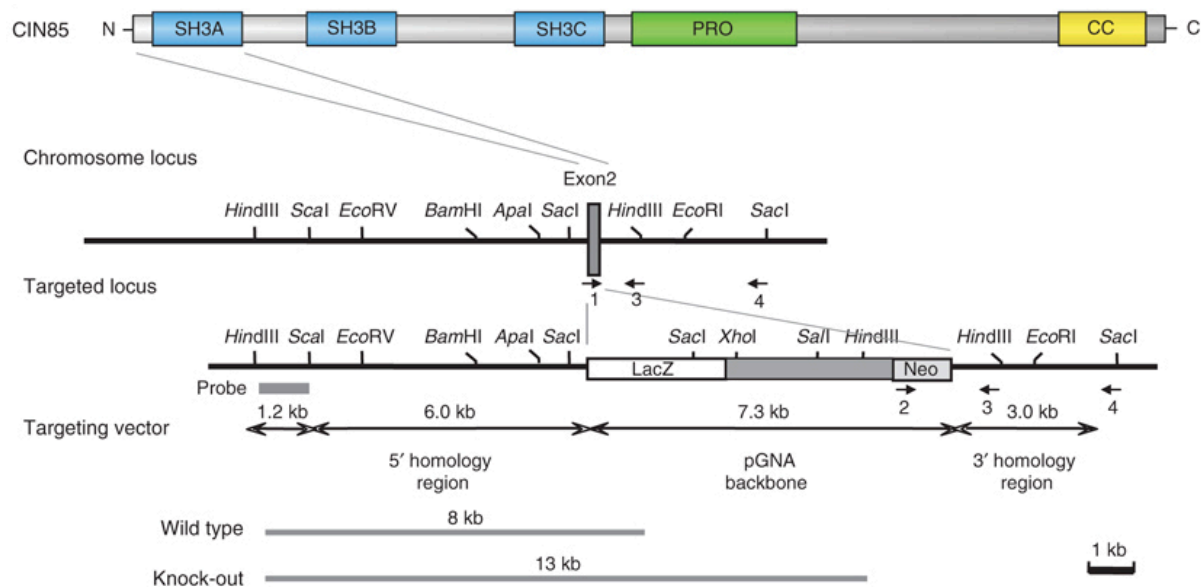


Figure 47: Génération de la souris *Sh3kbp1* KO permettant une délétion ciblée de l'isoforme *Sh3kbp1-l*.

D'après (Shimokawa et al. 2010).

L'analyse des souris *Sh3kbp1* KO fournies par le Prof. Dikic nous permettra de :

- réaliser une étude fine du phénotype des lymphocytes B (avant et après immunisation avec un antigène T-dépendant, ou T-indépendant, et éventuellement après infection) dans les souris *Sh3kbp1* KO pour l'isoforme *Sh3kbp1-l*, afin de confirmer ou d'infirmer un rôle potentiel de *Sh3kbp1* comme régulateur négatif du lymphocyte B, *in vivo*, et surtout de comparer le phénotype obtenu à celui publié récemment par Kometani et al. La comparaison des phénotypes des 2 animaux, s'ils sont différents, permettrait de mieux dissocier le rôle de différentes voies de signalisation du BCR dans la fonction de *Sh3kbp1*. En effet, la souris KO de Kometani et al. présente une déficience complète de *Sh3kbp1*, alors que celle du Prof Dikic présente une expression conservée de l'isoforme *Sh3kbp1-ΔA* ; or il semblerait que cette isoforme *Sh3kbp1-ΔA* conserve une capacité de liaison à la PI3K (Watanabe 2000), tout en ayant perdu sa capacité de liaison à Cbl et BLNK.

- d'analyser les effets d'une déficience en *Sh3kbp1* (notamment en isoforme *Sh3kbp1-l*) dans le développement éventuel d'une autoimmunité, avant et après injection de CpG DNA.

Selon les résultats obtenus, il sera intéressant, comme pour l'étude du gène *Carabin*, d'étudier si une déficience en *Sh3kbp1* (notamment en isoforme *Sh3kbp1-l*) est capable d'accélérer l'apparition et/ou la sévérité d'une autoimmunité dans des modèles murins de LED. Cette hypothèse sera testée en analysant le développement de signes autoimmuns dans des souris *B6lpr*, *Sle1,2* ou *3* croisées avec les souris *Sh3kbp1* KO dont nous disposons au laboratoire.

Enfin, afin de mieux comprendre les effets de la sous-expression de *Sh3kbp1* dans les lymphocytes B, nous envisageons d'étudier l'effet de la sous-expression de *Sh3kbp1* sur l'expression d'autres gènes des LB grâce à des puces affymetrix pangénomiques, comme pour *Carabin* (soit dans des cellules B issues des souris dont nous disposons au laboratoire, soit dans les cellules A20 *Sh3kbp1* KD).

Conclusions générales et perspectives

Les conclusions importantes apportées par les trois parties de cette étude sont détaillées et discutées dans les articles associés et en fin de chaque partie dans les sections intitulées : Conclusions, discussion et perspectives. Nous résumons ici les principaux points.

I. Identification des gènes dérégulés dans les lymphocytes B au cours du LED quiescent

Grâce à l'étude du profil d'expression des gènes dans des lymphocytes B triés de patients lupiques quiescents, nous avons pu mettre en évidence que les lymphocytes B de patients lupiques en phase quiescente ne présentent globalement pas de profil d'expression génique très différent de celui des lymphocytes B des sujet sains. Seuls 14 gènes semblent être dérégulés de façon convaincante dans les lymphocytes B des patients. Cependant, un groupe de 5 patients semble présenter une forte homologie dans le profil d'expression génique avec de nombreux gènes fortement dérégulés, en comparaison aux contrôles. De plus, l'analyse détaillée du transcriptome de ces 5 patients a permis de détecter une signature transcriptomique du ligand IL-4 ainsi qu'une sur-représentation de gènes impliqués dans les fonctions du réticulum endoplasmique et plus précisément dans l'UPR (Unfolded Protein Response). Une augmentation d'expression des gènes régulant l'UPR pourrait être le signe d'une différenciation plasmocytaire différente chez les patients, bien que, lors du phénotypage des lymphocytes B issus des mêmes patients, et réalisée par cytométrie de flux, aucun signe de différenciation plasmocytaire n'ait été détecté (Korganow et al. 2010). Il faudra envisager de nouvelles études phénotypiques encore plus détaillées sur les lymphocytes B de patients lupiques, afin de mieux étudier les différents stades de différenciation plasmocytaire.

Ainsi, ces résultats montrent que des défauts dans une grande variété de voies biologiques peuvent provoquer l'apparition d'un LED. En vue de confirmer ces résultats, il est indispensable de réaliser le même type d'analyse sur une plus grande cohorte de patients.

II. Etude de la fonction du gène *Carabin*

L'analyse transcriptomique de lymphocytes B de patients atteints de LED quiescent a permis de mettre en évidence que *Carabin* est sous-exprimé dans les lymphocytes B de patients lupiques. De plus, notre analyse transcriptomique réalisée dans les lymphocytes B de

souris BW à l'âge de 4 mois (c'est à dire avant l'apparition de la maladie) a montré que ce gène est le plus fortement dérégulé ($p=0,007$).

En utilisant une approche de génomique fonctionnelle, afin de reproduire la sous-expression de Carabin détectée chez les patients lupiques, nous avons abouti à plusieurs conclusions importantes. Nous avons dans un premier temps montré que l'expression de Carabin semble être étroitement régulée au cours de la maturation et de l'activation des lymphocytes B. Ceci se caractérise par une augmentation de l'expression de Carabin avec la maturation du lymphocyte B et une diminution de l'expression après activation. D'autre part nos résultats mettent en évidence un rôle de régulateur négatif de l'activation des lymphocytes B et une hypersensibilité du lymphocyte B après sous-expression du gène. De plus, Carabin semble jouer un rôle important dans le maintien de la tolérance des lymphocytes B dans le cas d'une stimulation co-stimulation BCR-TLR9. Ceci est illustré par le fait que les souris Carabin KO développent des signes d'autoimmunité après stimulation avec de l'ADN hypométhylé de type CpG.

Toutes ces données montrent que Carabin peut donc être considéré comme un gène important dans le maintien de la tolérance des lymphocytes B envers certaines molécules du soi, peut être plus particulièrement dans le cadre d'événement infectieux, considérés comme l'un des facteurs environnementaux déclencheurs d'autoimmunité.

III. Etude de la fonction du gène *Sh3kbp1*

L'analyse transcriptomique de lymphocytes B de patients atteints de LED quiescent a permis de mettre en évidence que *Sh3kbp1* est sous-exprimé dans les lymphocytes B de patients lupiques. Notre étude des effets de la sous-expression de *Sh3kbp1* sur la fonction des lymphocytes B *in vitro* nous a permis de dégager plusieurs conclusions intéressantes. D'une part, nous avons montré que l'expression de *Sh3kbp1* semble être régulée, tout comme celle de Carabin, après une activation du BCR, ce qui laisse supposer un rôle de *Sh3kbp1* dans le contrôle de cette voie d'activation du lymphocyte B. Cependant, seules certaines de ces voies d'activation (Erk et Akt), parmi celles que nous avons étudiées jusqu'à présent, semblent être impactées par une sous-expression de *Sh3kbp1*, mettant en avant la complexité du mode d'action de cette protéine dans les lymphocytes B.

Tous ces résultats préliminaires sur la fonction de *Sh3kbp1* tendent vers le postulat que *Sh3kbp1* semble avoir un rôle dans la régulation négative du signal émanant du BCR.

Ceci associé à l'observation d'une diminution d'expression de Sh3kbp1 dans les lymphocytes B de patients lupiques permet de suspecter un rôle de Sh3kbp1 dans la pathologie lupique. L'étude des souris Sh3kbp1 KO nous permettra de préciser ces résultats.

IV. Etude des effets de la dérégulation de Carabin et de Sh3kbp1 dans un contexte multigénique

Compte tenu du caractère multigénique de la maladie lupique, il sera important de tester les effets additifs de plusieurs défauts génétiques sur la fonction des lymphocytes B et le développement d'une autoimmunité. Ceci a déjà été évoqué en perspective de ce travail, par le croisement des souris Carabin KO ou Sh3kbp1 KO, avec différents modèles de LED (B6^{lpr}, *Sle1*, *Sle2*, *Sle3*).

Une autre des perspectives de ce projet est de croiser les souris Carabin ou Sh3kbp1 KO entre elles (ce qui paraît particulièrement intéressant si ces 2 protéines exercent toutes deux un rôle de régulateur négatif du BCR, [figure 48 page 214](#)), ou avec d'autres modèles transgéniques développés au laboratoire suite à notre analyse transcriptomique, et qui surexpriment ou sous-expriment d'autres gènes identifiés comme dérégulés au cours du LED. Il conviendra ensuite d'analyser le phénotype des lymphocytes B et le développement d'une autoimmunité dans ces souris multi-transgéniques.

V. Conclusions quant à l'utilisation de la technique de transgénèse lentivirale :

L'utilisation de la transgénèse lentivirale au cours de ce projet, dans le but de permettre *in vivo* l'expression d'un shRNA spécifique d'un gène donné, s'est révélée être un échec. Les hypothèses de cet échec ont déjà été évoquées dans ce manuscrit. C'est pourquoi des techniques alternatives seront désormais envisagées au laboratoire pour l'étude d'autres gènes. Cette technique a également été utilisée dans notre laboratoire en transgénèse additive, afin de permettre, chez la souris, la surexpression de gènes surexprimés dans les lymphocytes B des patients lupiques. Dans ce cas-là la technique s'est révélée plus efficace (surexpression correcte du gène), mais la sélection des fondateurs est longue et fastidieuse ; ainsi, nous

envisageons également à l'avenir l'utilisation de techniques alternatives pour la surexpression des gènes d'intérêt *in vivo*.

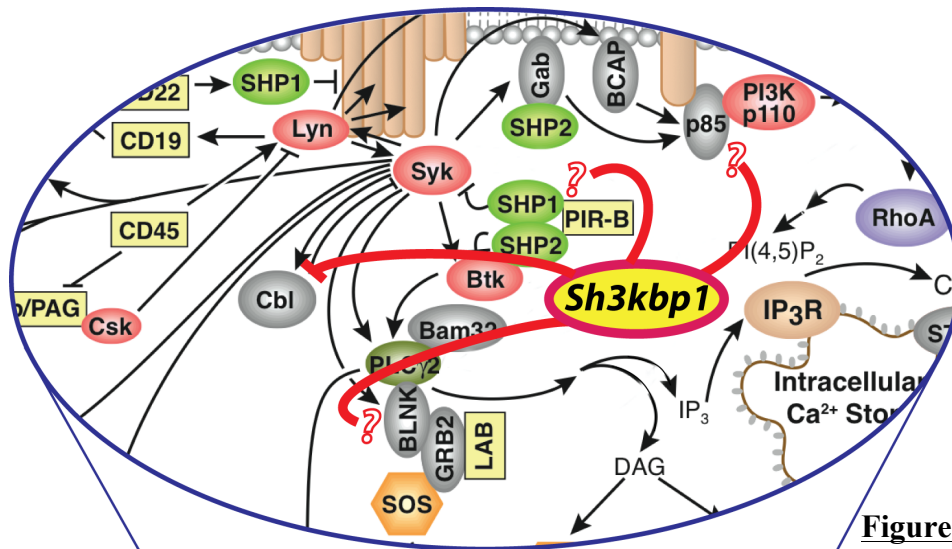
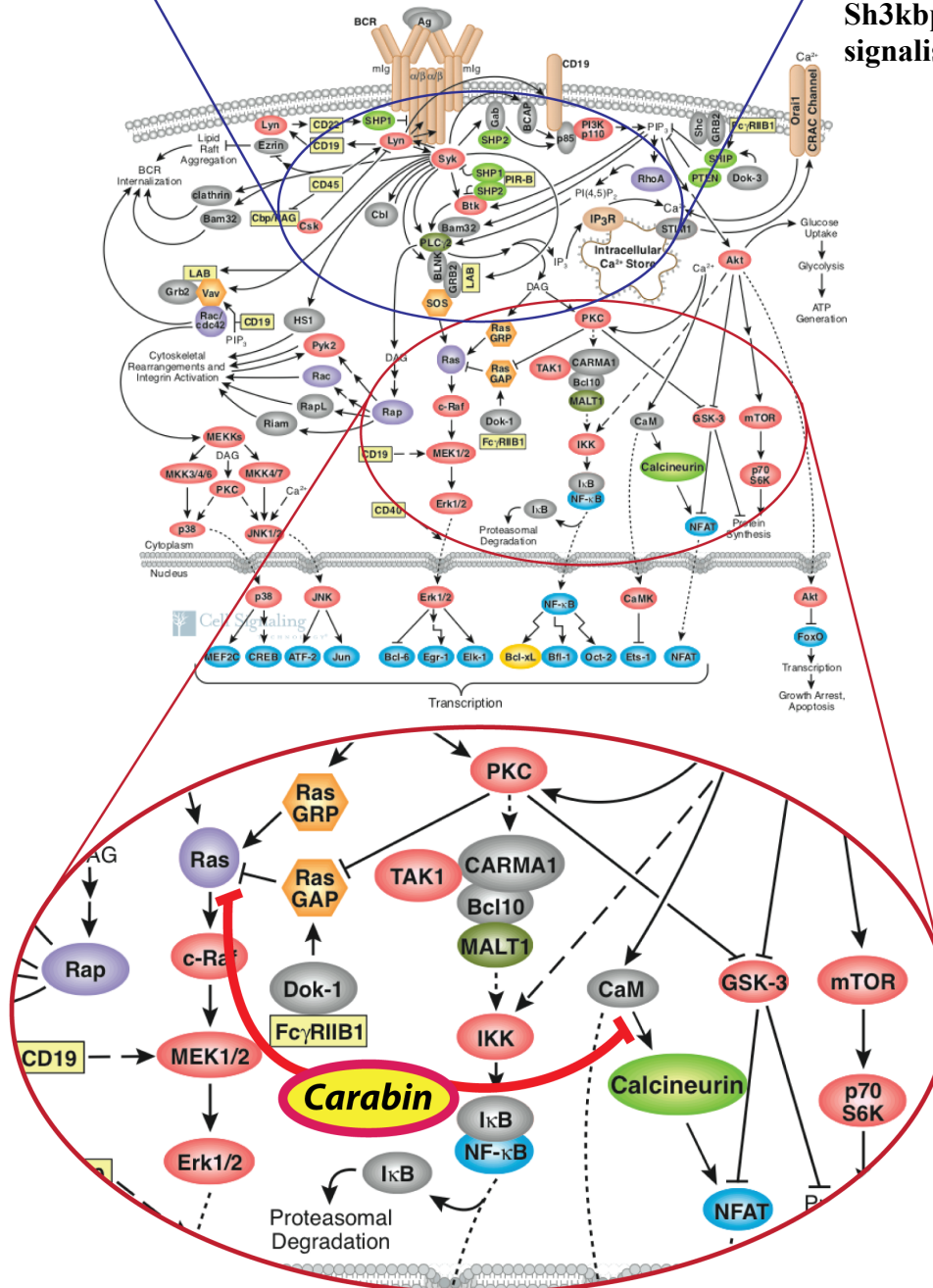


Figure 48 : Implication des protéines Carabin et Sh3kbp1 dans les voies de signalisation du BCR.



Références Bibliographiques

- Abelson, A.-K. et al., 2009. STAT4 associates with systemic lupus erythematosus through two independent effects that correlate with gene expression and act additively with IRF5 to increase risk. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 68(11), pp.1746–1753.
- Adolfsson, J. et al., 2001. Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity*, 15(4), pp.659–669.
- Agmon-Levin, N. et al., 2009. Prevalence of hepatitis C serum antibody in autoimmune diseases. *Journal of autoimmunity*, 32(3-4), pp.261–266.
- Ahmed, S.A. & Talal, N., 1990. Sex hormones and the immune system--Part 2. Animal data. *Baillière's clinical rheumatology*, 4(1), pp.13–31.
- Aiba, Y. et al., 2006. BANK Negatively Regulates Akt Activation and Subsequent B Cell Responses. *Immunity*, 24(3), pp.259–268.
- Annibale, B. et al., 2001. Two-thirds of atrophic body gastritis patients have evidence of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter*, 6(3), pp.225–233.
- Arbuckle, M.R. et al., 2003. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine*, 349(16), pp.1526–1533.
- Arnson, Y., Shoenfeld, Y. & Amital, H., 2010. Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *Journal of autoimmunity*, 34(3), pp.J258–J265.
- Arora, V. et al., 2004. Reduced complement receptor 1 (CR1, CD35) transcription in systemic lupus erythematosus. *Molecular immunology*, 41(4), pp.449–456.
- Bachmaier, K. et al., 2000. Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. *Nature*, 403(6766), pp.211–216.
- Bae, S.-C. et al., 2001. Reliability and validity of systemic lupus activity measure-revised (SLAM-R) for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 10(6), pp.405–409.
- Baechler, E.C. et al., 2003. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), pp.2610–2615.
- Balomenos, D. et al., 2000. The cell cycle inhibitor p21 controls T-cell proliferation and sex-linked lupus development. *Nature Medicine*, 6(2), pp.171–176.
- Balow, J.E., 2005. Clinical presentation and monitoring of lupus nephritis. *Lupus*, 14(1), pp.25–30.
- Basten, A. & Silveira, P.A., 2010. B-cell tolerance: mechanisms and implications. *Current Opinion in Immunology*, 22(5), pp.566–574.
- Baumgarth, N., 2010. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nature Reviews Immunology*, 11(1), pp.34–46.

- Begovich, A.B. et al., 2004. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *American journal of human genetics*, 75(2), pp.330–337.
- Bennett, L. et al., 2003. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *The Journal of experimental medicine*, 197(6), pp.711–723.
- Bezsonova, I. et al., 2008. Interactions between the three CIN85 SH3 domains and ubiquitin: implications for CIN85 ubiquitination. *Biochemistry*, 47(34), pp.8937–8949.
- Blair, P.A. et al., 2010. CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity*, 32(1), pp.129–140.
- Bolland, S. & Ravetch, J V, 2000. Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity*, 13(2), pp.277–285.
- Bombardier, C. et al., 1992. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis & Rheumatism*, 35(6), pp.630–640.
- Bondanza, A. et al., 2003. Cutting edge: dissociation between autoimmune response and clinical disease after vaccination with dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170(1), pp.24–27.
- Bonelli, M., Smolen, J.S. & Scheinecker, C., 2010. Treg and lupus. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69 Suppl 1, pp.i65–66.
- Bonney, K.M. et al., 2011. Heat-Killed *Trypanosoma cruzi* Induces Acute Cardiac Damage and Polyantigenic Autoimmunity D. Unutmaz, ed. *PLoS ONE*, 6(1), p.e14571.
- Borchers, A.T. et al., 2010. The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity reviews*, 9(5), pp.A277–87.
- Bottini, N. et al., 2004. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nature genetics*, 36(4), pp.337–338.
- Botto, M. et al., 1998. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nature genetics*, 19(1), pp.56–59.
- Bouillet, P et al., 1999. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science*, 286(5445), pp.1735–1738.
- Braun, U., Rajewsky, K. & Pelanda, R., 2000. Different sensitivity to receptor editing of B cells from mice hemizygous or homozygous for targeted Ig transgenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(13), pp.7429–7434.
- Brauweiler, A. et al., 2000. Differential regulation of B cell development, activation, and death by the src homology 2 domain-containing 5' inositol phosphatase (SHIP). *The Journal of experimental medicine*, 191(9), pp.1545–1554.

- Brink, R. et al., 1992. Immunoglobulin M and D antigen receptors are both capable of mediating B lymphocyte activation, deletion, or anergy after interaction with specific antigen. *The Journal of experimental medicine*, 176(4), pp.991–1005.
- Bruns, A. et al., 2000. Nucleosomes are major T and B cell autoantigens in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 43(10), pp.2307–2315.
- Buchman, V.L. et al., 2002. Organization of the mouse Ruk locus and expression of isoforms in mouse tissues. *Gene*, 295(1), pp.13–17.
- Büchse et al, T.B.E., 2011. CIN85 INTERACTING PROTEINS IN B CELLS - SPECIFIC ROLE FOR SHIP-1. pp.1–43.
- Budagyan, V.M. et al., 1998. The resistance of activated T-cells from SLE patients to apoptosis induced by human thymic stromal cells. *Immunology letters*, 60(1), pp.1–5.
- Calvani, N. et al., 2003. Nephritogenic autoantibodies but absence of nephritis in Il-12p35-deficient mice with pristane-induced lupus. *Kidney international*, 64(3), pp.897–905.
- Cambier, J.C. et al., 2007. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nature Reviews Immunology*, 7(8), pp.633–643.
- Carballo, E., Lai, W.S. & Blakeshear, P.J., 1998. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. *Science*, 281(5379), pp.1001–1005.
- Cariappa, A et al., 2009. B cell antigen receptor signal strength and peripheral B cell development are regulated by a 9-O-acetyl sialic acid esterase. *Journal of Experimental Medicine*, 206(1), pp.125–138.
- Carroll, M.C., 2000. The role of complement in B cell activation and tolerance. *Advances in immunology*, 74, pp.61–88.
- Casciola-Rosen, L.A., Anhalt, G. & Rosen, A., 1994. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *The Journal of experimental medicine*, 179(4), pp.1317–1330.
- Chakravarty, E.F. et al., 2007. Prevalence of adult systemic lupus erythematosus in California and Pennsylvania in 2000: Estimates obtained using hospitalization data. *Arthritis & Rheumatism*, 56(6), pp.2092–2094.
- Chan, O.T. et al., 1999. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *The Journal of experimental medicine*, 189(10), pp.1639–1648.
- Chang, C. & Gershwin, M.E., 2010. Drugs and autoimmunity - A contemporary review and mechanistic approach. *Journal of autoimmunity*, 34(3), pp.J266–J275.
- Chen, C. et al., 1994. Deletion and editing of B cells that express antibodies to DNA. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 152(4), pp.1970–1982.
- Chen, C., Prak, E.L. & Weigert, M., 1997. Editing disease-associated autoantibodies. *Immunity*, 6(1), pp.97–105.

- Chen, M., Daha, M.R. & Kallenberg, C.G.M., 2010. The complement system in systemic autoimmune disease. *Journal of autoimmunity*, 34(3), pp.J276–J286.
- Chen, Z., Koralov, S.B. & Kelsoe, G., 2000. Complement C4 inhibits systemic autoimmunity through a mechanism independent of complement receptors CR1 and CR2. *The Journal of experimental medicine*, 192(9), pp.1339–1352.
- Christen, U. et al., 2004. A viral epitope that mimics a self antigen can accelerate but not initiate autoimmune diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 114(9), pp.1290–1298.
- Chu, Y. et al., 2011. B cells lacking the tumor suppressor TNFAIP3/A20 display impaired differentiation and hyperactivation and cause inflammation and autoimmunity in aged mice. *Blood*, 117(7), pp.2227–2236.
- Chua, C.E.L., Lim, Y.S. & Tang, B.L., 2010. Rab35 – A vesicular traffic-regulating small GTPase with actin modulating roles. *FEBS Letters*, 584(1), pp.1–6.
- Chui, D. et al., 2001. Genetic remodeling of protein glycosylation in vivo induces autoimmune disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(3), pp.1142–1147.
- Chung, S.A. & Criswell, L.A., 2007. PTPN22: Its role in SLE and autoimmunity. *Autoimmunity*, 40(8), pp.582–590.
- Chung, S.A. et al., 2011. Differential Genetic Associations for Systemic Lupus Erythematosus Based on Anti-dsDNA Autoantibody Production P. I. W. de Bakker, ed. *PLoS Genetics*, 7(3), p.e1001323.
- Cohen, P.L. et al., 2002. Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase. *The Journal of experimental medicine*, 196(1), pp.135–140.
- Crispín, J.C. et al., 2010. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends in molecular medicine*, 16(2), pp.47–57.
- Crow, M.K. & Kirou, K.A., 2004. Interferon-alpha in systemic lupus erythematosus. *Current opinion in rheumatology*, 16(5), pp.541–547.
- Crow, M.K. & Wohlgemuth, J., 2003. Microarray analysis of gene expression in lupus. *Arthritis Research & Therapy*, 5(6), pp.279–287.
- Cunninghame Graham, D.S. et al., 2007. Association of IRF5 in UK SLE families identifies a variant involved in polyadenylation. *Human molecular genetics*, 16(6), pp.579–591.
- Cunninghame Graham, D.S. et al., 2008. Polymorphism at the TNF superfamily gene TNFSF4 confers susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Nature genetics*, 40(1), pp.83–89.
- Dang, H. et al., 1995. SLE-like autoantibodies and Sjögren's syndrome-like lymphoproliferation in TGF-beta knockout mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 155(6), pp.3205–3212.

- Datta, D. et al., 2009. Calcineurin Inhibitors Activate the Proto-Oncogene Ras and Promote Protumorigenic Signals in Renal Cancer Cells. *Cancer Research*, 69(23), pp.8902–8909.
- Deane, J.A. et al., 2007. Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation. *Immunity*, 27(5), pp.801–810.
- Delgado-Vega, A. et al., 2010. Recent findings on genetics of systemic autoimmune diseases. *Current Opinion in Immunology*, 22(6), pp.698–705.
- Demetriou, M. et al., 2001. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature*, 409(6821), pp.733–739.
- Deng, C. et al., 2001. Decreased Ras-mitogen-activated protein kinase signaling may cause DNA hypomethylation in T lymphocytes from lupus patients. *Arthritis & Rheumatism*, 44(2), pp.397–407.
- Deng, G.-M. & Tsokos, G.C., 2008. Cholera toxin B accelerates disease progression in lupus-prone mice by promoting lipid raft aggregation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(6), pp.4019–4026.
- Di Cristofano, A. et al., 1999. Impaired Fas response and autoimmunity in Pten^{+/-} mice. *Science*, 285(5436), pp.2122–2125.
- Dikic, I., 2002. CIN85/CMS family of adaptor molecules. *FEBS Letters*, 529(1), pp.110–115.
- Dinesh, R.K., Hahn, B.H. & Singh, R.P., 2010. PD-1, gender, and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*, 9(8), pp.583–587.
- Doyle, H.A., Gee, R.J. & Mamula, M.J., 2003. A failure to repair self-proteins leads to T cell hyperproliferation and autoantibody production. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(6), pp.2840–2847.
- Dörner, T. et al., 2011. Abnormalities of B cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Immunological Methods*, 363(2), pp.187–197.
- Drappa, J. et al., 2003. Impaired T cell death and lupus-like autoimmunity in T cell-specific adapter protein-deficient mice. *The Journal of experimental medicine*, 198(5), pp.809–821.
- Dzionic, A. et al., 2001. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *The Journal of experimental medicine*, 194(12), pp.1823–1834.
- Edwards, C.J. et al., 2006. Infections in infancy and the presence of antinuclear antibodies in adult life. *Lupus*, 15(4), pp.213–217.
- Erb, K.J. et al., 1997. Constitutive expression of interleukin (IL)-4 in vivo causes autoimmune-type disorders in mice. *The Journal of experimental medicine*, 185(2), pp.329–339.
- Erikson, J. et al., 1991. Expression of anti-DNA immunoglobulin transgenes in non-autoimmune mice. *Nature*, 349(6307), pp.331–334.

- Eris, J.M. et al., 1994. Anergic self-reactive B cells present self antigen and respond normally to CD40-dependent T-cell signals but are defective in antigen-receptor-mediated functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(10), pp.4392–4396.
- Fairhurst, A.-M., Wandstrat, A.E. & Wakeland, E.K., 2006. Systemic lupus erythematosus: multiple immunological phenotypes in a complex genetic disease. *Advances in immunology*, 92, pp.1–69.
- Fan, Ye et al., 2010. Association of BLK (rs13277113, rs2248932) polymorphism with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Molecular Biology Reports*.
- Fan, Y et al., 2011. Association of ITGAM polymorphism with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 25(3), pp.271–275.
- Fatenejad, S. et al., 1998. Central T cell tolerance in lupus-prone mice: influence of autoimmune background and the lpr mutation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(11), pp.6427–6432.
- Fernando, M.M.A. et al., 2008. Defining the Role of the MHC in Autoimmunity: A Review and Pooled Analysis E. M. C. Fisher, ed. *PLoS Genetics*, 4(4), p.e1000024.
- Forabosco, P. et al., 2006. Meta-analysis of genome-wide linkage studies of systemic lupus erythematosus. *Genes and immunity*, 7(7), pp.609–614.
- Fransen, J.H. et al., 2010. The role of dendritic cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*, 12(2), p.207.
- Friedmann, D. et al., 1999. Production of high affinity autoantibodies in autoimmune New Zealand Black/New Zealand white F1 mice targeted with an anti-DNA heavy chain. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(8), pp.4406–4416.
- Fujinami, R.S. & Oldstone, M.B., 1985. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science*, 230(4729), pp.1043–1045.
- Gale, C.R. & Martyn, C.N., 1995. Migrant studies in multiple sclerosis. *Progress in neurobiology*, 47(4-5), pp.425–448.
- Gasbarrini, A. et al., 1998. Helicobacter pylori infection and vascular diseases. *Italian journal of gastroenterology and hepatology*, 30 Suppl 3, pp.S307–9.
- Gay, D. et al., 1993. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *The Journal of experimental medicine*, 177(4), pp.999–1008.
- Gibofsky, A. et al., 1978. Disease associations of the Ia-like human alloantigens. Contrasting patterns in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *The Journal of experimental medicine*, 148(6), pp.1728–1732.
- Gironès, N., Cuervo, H. & Fresno, M., 2005. Trypanosoma cruzi-induced molecular mimicry and Chagas' disease. *Current topics in microbiology and immunology*, 296, pp.89–123.

- González, D.A. et al., 2010. Sex hormones and autoimmunity. *Immunology letters*, 133(1), pp.6–13.
- Goodnow, C C et al., 1988. Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature*, 334(6184), pp.676–682.
- Goodnow, Christopher C et al., 2005. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature*, 435(7042), pp.590–597.
- Goodnow, C C et al., 1989. Induction of self-tolerance in mature peripheral B lymphocytes. *Nature*, 342(6248), pp.385–391.
- Gout, I. et al., 2000. Negative regulation of PI 3-kinase by Ruk, a novel adaptor protein. *The EMBO Journal*, 19(15), pp.4015–4025.
- Graham, R.R. et al., 2008. Genetic variants near TNFAIP3 on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nature genetics*, 40(9), pp.1059–1061.
- Grammer, A.C. et al., 2003. Abnormal germinal center reactions in systemic lupus erythematosus demonstrated by blockade of CD154-CD40 interactions. *Journal of Clinical Investigation*, 112(10), pp.1506–1520.
- Grimaldi, C.M. et al., 2002. Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. *Journal of Clinical Investigation*, 109(12), pp.1625–1633.
- Guilherme, L. & Kalil, J., 2010. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: cellular mechanisms leading autoimmune reactivity and disease. *Journal of clinical immunology*, 30(1), pp.17–23.
- Han, G.-M. et al., 2003. Analysis of gene expression profiles in human systemic lupus erythematosus using oligonucleotide microarray. *Genes and immunity*, 4(3), pp.177–186.
- Han, J.-W. et al., 2009a. Genome-wide association study in a Chinese Han population identifies nine new susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. *Nature genetics*, 41(11), pp.1234–1237.
- Han, S. et al., 2009b. Evaluation of imputation-based association in and around the integrin- α -M (ITGAM) gene and replication of robust association between a non-synonymous functional variant within ITGAM and systemic lupus erythematosus (SLE). *Human molecular genetics*, 18(6), pp.1171–1180.
- Hanayama, R. et al., 2004. Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science*, 304(5674), pp.1147–1150.
- Haraldsson, M.K. et al., 2008. The lupus-related Lmb3 locus contains a disease-suppressing Coronin-1A gene mutation. *Immunity*, 28(1), pp.40–51.
- Hardy, R.R. et al., 2000. B-cell commitment, development and selection. *Immunological reviews*, 175, pp.23–32.
- Hardy, R.R. et al., 1991. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *The Journal of experimental medicine*, 173(5), pp.1213–

1225.

- Harley, I.T.W. et al., 2009. Genetic susceptibility to SLE: new insights from fine mapping and genome-wide association studies. *Nature reviews. Genetics*, 10(5), pp.285–290.
- Hartley, S.B. et al., 1991. Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens. *Nature*, 353(6346), pp.765–769.
- Hartley, S.B. et al., 1993. Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell*, 72(3), pp.325–335.
- Hartmann, G. et al., 2003. Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells. *European journal of immunology*, 33(6), pp.1633–1641.
- Hasegawa, K. et al., 2004. PEST domain-enriched tyrosine phosphatase (PEP) regulation of effector/memory T cells. *Science*, 303(5658), pp.685–689.
- Hay, E.M. et al., 1993. The BILAG index: a reliable and valid instrument for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. *The Quarterly journal of medicine*, 86(7), pp.447–458.
- Healy, J.I. et al., 1997. Different nuclear signals are activated by the B cell receptor during positive versus negative signaling. *Immunity*, 6(4), pp.419–428.
- Helgason, C.D. et al., 2000. A dual role for Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase (SHIP) in immunity: aberrant development and enhanced function of B lymphocytes in ship ^{-/-} mice. *The Journal of experimental medicine*, 191(5), pp.781–794.
- Herrath, von, M.G., Fujinami, R.S. & Whitton, J.L., 2003. Microorganisms and autoimmunity: making the barren field fertile? *Nature reviews. Microbiology*, 1(2), pp.151–157.
- Herzog, S., Reth, M. & Jumaa, H., 2009. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 9(3), pp.195–205.
- Hibbs, M.L. et al., 1995. Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell*, 83(2), pp.301–311.
- Higuchi, T. et al., 2002. Cutting Edge: Ectopic expression of CD40 ligand on B cells induces lupus-like autoimmune disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(1), pp.9–12.
- Hom, G. et al., 2008. Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *The New England journal of medicine*, 358(9), pp.900–909.
- Hooks, J.J. et al., 1979. Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease. *The New England journal of medicine*, 301(1), pp.5–8.
- Horwitz, M S et al., 1998. Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nature Medicine*, 4(7), pp.781–785.

- Horwitz, Marc S et al., 2002. Presented antigen from damaged pancreatic beta cells activates autoreactive T cells in virus-mediated autoimmune diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 109(1), pp.79–87.
- Hsu, C. et al., 2010. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *The Journal of Cell Biology*, 189(2), pp.223–232.
- Hu, N. et al., 2008. Abnormal histone modification patterns in lupus CD4+ T cells. *The Journal of rheumatology*, 35(5), pp.804–810.
- Huber, S. et al., 1993. T lymphocyte responses in CVB3-induced murine myocarditis. *Scandinavian journal of infectious diseases. Supplementum*, 88, pp.67–78.
- Hudgins, C.C. et al., 1985. Studies of consomic mice bearing the Y chromosome of the BXSb mouse. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 134(6), pp.3849–3854.
- Hunziker, L. et al., 2003. Hypergammaglobulinemia and autoantibody induction mechanisms in viral infections. *Nature Immunology*, 4(4), pp.343–349.
- Hurov, J.B. et al., 2001. Immune system dysfunction and autoimmune disease in mice lacking Emk (Par-1) protein kinase. *Molecular and cellular biology*, 21(9), pp.3206–3219.
- Inaba, K. et al., 1998. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*, 188(11), pp.2163–2173.
- International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus Genetics (SLEGEN) et al., 2008. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PTK, KIAA1542 and other loci. *Nature genetics*, 40(2), pp.204–210.
- Izui, S. et al., 1984. Induction of various autoantibodies by mutant gene *lpr* in several strains of mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 133(1), pp.227–233.
- Jacob, C.O. et al., 2009. Identification of IRAK1 as a risk gene with critical role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(15), pp.6256–6261.
- Jacob, C.O. et al., 2007. Identification of novel susceptibility genes in childhood-onset systemic lupus erythematosus using a uniquely designed candidate gene pathway platform. *Arthritis & Rheumatism*, 56(12), pp.4164–4173.
- James, J.A., Harley, J.B. & Scofield, R.H., 2006. Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus. *Current opinion in rheumatology*, 18(5), pp.462–467.
- Javierre, B.M. et al., 2010. Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. *Genome Research*, 20(2), pp.170–179.
- Ka, S.-M. et al., 2007. Mesangial cells of lupus-prone mice are sensitive to chemokine production. *Arthritis Research & Therapy*, 9(4), p.R67.

- Keenan, R.A. et al., 2008. Censoring of autoreactive B cell development by the pre-B cell receptor. *Science*, 321(5889), pp.696–699.
- Kelly, J.A. et al., 2008. Interferon regulatory factor-5 is genetically associated with systemic lupus erythematosus in African Americans. *Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus*, 9(3), pp.187–194.
- Khare, S.D. et al., 2000. Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), pp.3370–3375.
- Kitaura, Y. et al., 2007. Control of the B cell-intrinsic tolerance programs by ubiquitin ligases Cbl and Cbl-b. *Immunity*, 26(5), pp.567–578.
- Kivity, S. et al., 2009. Infections and autoimmunity – friends or foes? *Trends in Immunology*, 30(8), pp.409–414.
- Kometani, K. et al., 2011. CIN85 drives B cell responses by linking BCR signals to the canonical NF- B pathway. *Journal of Experimental Medicine*.
- Korb, L.C. & Ahearn, J.M., 1997. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 158(10), pp.4525–4528.
- Korganow, A.-S. et al., 2010. Peripheral B cell abnormalities in patients with systemic lupus erythematosus in quiescent phase: decreased memory B cells and membrane CD19 expression. *Journal of autoimmunity*, 34(4), pp.426–434.
- Kozyrev, S.V. et al., 2008. Functional variants in the B-cell gene BANK1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nature genetics*, 40(2), pp.211–216.
- Kyogoku, C. et al., 2004. Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *American journal of human genetics*, 75(3), pp.504–507.
- La Cava, A., 2009. Lupus and T Cells. *Lupus*, 18(3), pp.196–201.
- Lai, W.S. et al., 1999. Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Molecular and cellular biology*, 19(6), pp.4311–4323.
- Layer, K. et al., 2003. Autoimmunity as the consequence of a spontaneous mutation in Rasgrp1. *Immunity*, 19(2), pp.243–255.
- Le, L.Q. et al., 2001. Mice lacking the orphan G protein-coupled receptor G2A develop a late-onset autoimmune syndrome. *Immunity*, 14(5), pp.561–571.
- Leadbetter, E.A. et al., 2002. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*, 416(6881), pp.603–607.
- Lee, E.G., 2000. Failure to Regulate TNF-Induced NF-kappa B and Cell Death Responses in

- A20-Deficient Mice. *Science*, 289(5488), pp.2350–2354.
- Lee, P.Y. et al., 2008. TLR7-dependent and FcγR-independent production of type I interferon in experimental mouse lupus. *Journal of Experimental Medicine*, 205(13), pp.2995–3006.
- Lee, Y.H., Woo, J.H., et al., 2009a. Association of programmed cell death 1 polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Lupus*, 18(1), pp.9–15.
- Lee, Y.H., Ji, J.D. & Song, G.G., 2009b. Fcγ receptor IIB and IIIB polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a meta-analysis. *Lupus*, 18(8), pp.727–734.
- Lee-Kirsch, M.A. et al., 2007. Mutations in the gene encoding the 3'–5' DNA exonuclease TREX1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nature genetics*, 39(9), pp.1065–1067.
- Lehmann, P.V. et al., 1992. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature*, 358(6382), pp.155–157.
- Levin, M.C. et al., 2002. Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease. *Nature Medicine*, 8(5), pp.509–513.
- Li, Y et al., 2002. Anti-DNA B Cells in MRL/lpr Mice Show Altered Differentiation and Editing Pattern. *Journal of Experimental Medicine*, 196(12), pp.1543–1552.
- Li, Yaping et al., 2010. Overexpression of the growth arrest and DNA damage-induced 45α gene contributes to autoimmunity by promoting DNA demethylation in lupus T cells. *Arthritis & Rheumatism*, 62(5), pp.1438–1447.
- Liang, M.H. et al., 1989. Reliability and validity of six systems for the clinical assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 32(9), pp.1107–1118.
- Libert, C., Dejager, L. & Pinheiro, I., 2010. The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. *Nature Reviews Immunology*, 10(8), pp.594–604.
- Lin, L., Gerth, A.J. & Peng, S.L., 2004. Active inhibition of plasma cell development in resting B cells by microphthalmia-associated transcription factor. *The Journal of experimental medicine*, 200(1), pp.115–122.
- Liou, S.N. et al., 1996. B cells from patients with systemic lupus erythematosus display abnormal antigen receptor-mediated early signal transduction events. *Journal of Clinical Investigation*, 98(11), pp.2549–2557.
- Liou, S.N. et al., 2001. B-cell kinase lyn deficiency in patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*, 49(2), pp.157–165.
- Liu, L. et al., 2005. Gadd45 beta and Gadd45 gamma are critical for regulating autoimmunity. *The Journal of experimental medicine*, 202(10), pp.1341–1347.

- Liu, Q. et al., 1998. The inositol polyphosphate 5-phosphatase ship is a crucial negative regulator of B cell antigen receptor signaling. *The Journal of experimental medicine*, 188(7), pp.1333–1342.
- Liu, W. et al., 2010. Intrinsic Properties of immunoglobulin IgG1 Isotype-Switched B Cell Receptors Promote Microclustering and the Initiation of Signaling. *Immunity*, 32(6), pp.778–789.
- Lövgren, T. et al., 2004. Induction of interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells by immune complexes containing nucleic acid released by necrotic or late apoptotic cells and lupus IgG. *Arthritis & Rheumatism*, 50(6), pp.1861–1872.
- Lu, Q. & Lemke, G., 2001. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science*, 293(5528), pp.306–311.
- Lunardi, C. et al., 2008. Human parvovirus B19 infection and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*, 8(2), pp.116–120.
- Lynch, D.H. et al., 1994. The mouse Fas-ligand gene is mutated in gld mice and is part of a TNF family gene cluster. *Immunity*, 1(2), pp.131–136.
- Lyons, P.A. et al., 2010. Novel expression signatures identified by transcriptional analysis of separated leucocyte subsets in systemic lupus erythematosus and vasculitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69(6), pp.1208–1213.
- Maas, K., 2005. Shared gene expression profiles in individuals with autoimmune disease and unaffected first-degree relatives of individuals with autoimmune disease. *Human molecular genetics*, 14(10), pp.1305–1314.
- Maas, Kevin et al., 2002. Cutting edge: molecular portrait of human autoimmune disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(1), pp.5–9.
- Mackay, F. et al., 1999. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *The Journal of experimental medicine*, 190(11), pp.1697–1710.
- Majeti, R. et al., 2000. An inactivating point mutation in the inhibitory wedge of CD45 causes lymphoproliferation and autoimmunity. *Cell*, 103(7), pp.1059–1070.
- Maldonado, M.A. et al., 1999. The role of environmental antigens in the spontaneous development of autoimmunity in MRL-lpr mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(11), pp.6322–6330.
- Mandel, M. et al., 2004. Autoimmunity gene expression portrait: specific signature that intersects or differentiates between multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental immunology*, 138(1), pp.164–170.
- Mandik-Nayak, L. et al., 1997. Regulation of anti-double-stranded DNA B cells in nonautoimmune mice: localization to the T-B interface of the splenic follicle. *The Journal of experimental medicine*, 186(8), pp.1257–1267.
- Marshak-Rothstein, A., 2006. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nature*

- Reviews Immunology*, 6(11), pp.823–835.
- Maverakis, E. et al., 2010. Light, including ultraviolet. *Journal of autoimmunity*, 34(3), pp.J247–J257.
- Märker-Hermann, E. & Fischer-Betz, R., 2010. Rheumatic diseases and pregnancy. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 22(6), pp.458–465.
- McClain, M.T. et al., 2005. Early events in lupus humoral autoimmunity suggest initiation through molecular mimicry. *Nature Medicine*, 11(1), pp.85–89.
- Mecklenbräuker, I. et al., 2002. Protein kinase Cdelta controls self-antigen-induced B-cell tolerance. *Nature*, 416(6883), pp.860–865.
- Mihara, M. et al., 1988. Immunologic abnormality in NZB/NZW F1 mice. Thymus-independent occurrence of B cell abnormality and requirement for T cells in the development of autoimmune disease, as evidenced by an analysis of the athymic nude individuals. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 141(1), pp.85–90.
- Miller, S.D. et al., 1997. Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nature Medicine*, 3(10), pp.1133–1136.
- Mohan, C. et al., 1998. Genetic dissection of SLE pathogenesis. Sle1 on murine chromosome 1 leads to a selective loss of tolerance to H2A/H2B/DNA subnucleosomes. *Journal of Clinical Investigation*, 101(6), pp.1362–1372.
- Mohan, C. et al., 1999. Genetic dissection of Sle pathogenesis: Sle3 on murine chromosome 7 impacts T cell activation, differentiation, and cell death. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(11), pp.6492–6502.
- Mohan, C. et al., 1997. Genetic dissection of systemic lupus erythematosus pathogenesis: Sle2 on murine chromosome 4 leads to B cell hyperactivity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 159(1), pp.454–465.
- Moore, P.A. et al., 1999. BlyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science*, 285(5425), pp.260–263.
- Morel, Laurence, 2010. Genetics of SLE: evidence from mouse models. *Nature reviews. Rheumatology*, 6(6), pp.348–357.
- Morel, L et al., 1994. Polygenic control of susceptibility to murine systemic lupus erythematosus. *Immunity*, 1(3), pp.219–229.
- Morita, M. et al., 2004. Gene-targeted mice lacking the Trex1 (DNase III) 3'→5' DNA exonuclease develop inflammatory myocarditis. *Molecular and cellular biology*, 24(15), pp.6719–6727.
- Murga, M. et al., 2001. Mutation of E2F2 in mice causes enhanced T lymphocyte proliferation, leading to the development of autoimmunity. *Immunity*, 15(6), pp.959–970.
- Musone, S.L. et al., 2008. Multiple polymorphisms in the TNFAIP3 region are independently associated with systemic lupus erythematosus. *Nature genetics*, 40(9), pp.1062–1064.

- Münz, C. et al., 2009. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nature Reviews Immunology*, 9(4), pp.246–258.
- Muñoz, L.E. et al., 2010. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nature reviews. Rheumatology*, 6(5), pp.280–289.
- Nagasawa, T., 2006. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nature Reviews Immunology*, 6(2), pp.107–116.
- Nakano, S. et al., 2007. Down-regulation of CD72 and increased surface IgG on B cells in patients with lupus nephritis. *Autoimmunity*, 40(1), pp.9–15.
- Napirei, M. et al., 2000. Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. *Nature genetics*, 25(2), pp.177–181.
- Naramura, M et al., 1998. Altered thymic positive selection and intracellular signals in Cbl-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), pp.15547–15552.
- Naramura, Mayumi et al., 2002. c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. *Nature Immunology*, 3(12), pp.1192–1199.
- Nath, S.K. et al., 2008. A nonsynonymous functional variant in integrin-alpha(M) (encoded by ITGAM) is associated with systemic lupus erythematosus. *Nature genetics*, 40(2), pp.152–154.
- Navarro, M.N. et al., 2007. Identification of CMS as a cytosolic adaptor of the human pT chain involved in pre-TCR function. *Blood*, 110(13), pp.4331–4340.
- Nemazee, D., 2006. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nature Reviews Immunology*, 6(10), pp.728–740.
- Nemazee, D.A. & Bürki, K., 1989. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature*, 337(6207), pp.562–566.
- Nguyen, C., Limaye, N. & Wakeland, E.K., 2002. Susceptibility genes in the pathogenesis of murine lupus. *Arthritis research*, 4 Suppl 3, pp.S255–63.
- Nikpour, M. et al., 2008. Association of a gene expression profile from whole blood with disease activity in systemic lupus erythaematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 67(8), pp.1069–1075.
- Nimmerjahn, F. & Ravetch, Jeffrey V, 2008. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 8(1), pp.34–47.
- Nishimura, H. et al., 1999. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*, 11(2), pp.141–151.
- Nishioka, K. et al., 1993. Rheumatic manifestation of human leukemia virus infection. *Rheumatic diseases clinics of North America*, 19(2), pp.489–503.

- Nitschke, L., 2009. CD22 and Siglec-G: B-cell inhibitory receptors with distinct functions. *Immunological reviews*, 230(1), pp.128–143.
- NITSCHKE, L. & TSUBATA, T., 2004. Molecular interactions regulate BCR signal inhibition by CD22 and CD72. *Trends in Immunology*, 25(10), pp.543–550.
- Noorchashm, H. et al., 1999. Characterization of anergic anti-DNA B cells: B cell anergy is a T cell-independent and potentially reversible process. *International immunology*, 11(5), pp.765–776.
- O'Keefe, T.L. et al., 1999. Deficiency in CD22, a B cell-specific inhibitory receptor, is sufficient to predispose to development of high affinity autoantibodies. *The Journal of experimental medicine*, 189(8), pp.1307–1313.
- O'Keefe, T.L. et al., 1996. Hyperresponsive B cells in CD22-deficient mice. *Science*, 274(5288), pp.798–801.
- Ohnmacht, C. et al., 2009. Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine*, 206(3), pp.549–559.
- Pan, C., Baumgarth, N. & Parnes, J.R., 1999. CD72-deficient mice reveal nonredundant roles of CD72 in B cell development and activation. *Immunity*, 11(4), pp.495–506.
- Pan, F. et al., 2007. Feedback inhibition of calcineurin and Ras by a dual inhibitory protein Carabin. *Nature*, 445(7126), pp.433–436.
- Pao, L.I. et al., 2007. B Cell-Specific Deletion of Protein-Tyrosine Phosphatase Shp1 Promotes B-1a Cell Development and Causes Systemic Autoimmunity. *Immunity*, 27(1), pp.35–48.
- Patino-Lopez, G. et al., 2008. Rab35 and its GAP EPI64C in T cells regulate receptor recycling and immunological synapse formation. *The Journal of biological chemistry*, 283(26), pp.18323–18330.
- Paul, E. et al., 2002. Anti-DNA autoreactivity in C4-deficient mice. *European journal of immunology*, 32(9), pp.2672–2679.
- Pei, Y. & Tuschl, T., 2006. On the art of identifying effective and specific siRNAs. *Nature Methods*, 3(9), pp.670–676.
- Pelanda, R. & Torres, R.M., 2006. Receptor editing for better or for worse. *Current Opinion in Immunology*, 18(2), pp.184–190.
- Pereira, E. et al., 2004. Immunosuppressive therapy modulates T lymphocyte gene expression in patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology*, 113(1), pp.99–105.
- Perry, D. et al., 2011. Murine Models of Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, pp.1–19.
- Peruzzi, G. et al., 2007. The adaptor molecule CIN85 regulates Syk tyrosine kinase level by activating the ubiquitin-proteasome degradation pathway. *Journal of immunology*

- (*Baltimore, Md. : 1950*), 179(4), pp.2089–2096.
- Peterson, K.S. et al., 2004. Characterization of heterogeneity in the molecular pathogenesis of lupus nephritis from transcriptional profiles of laser-captured glomeruli. *Journal of Clinical Investigation*, 113(12), pp.1722–1733.
- Petrelli, A. et al., 2002. The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature*, 416(6877), pp.187–190.
- Petri, M. et al., 2009. Longitudinal expression of type I interferon responsive genes in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 18(11), pp.980–989.
- Pewzner-Jung, Y. et al., 1998. B cell deletion, anergy, and receptor editing in “knock in” mice targeted with a germline-encoded or somatically mutated anti-DNA heavy chain. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(9), pp.4634–4645.
- Phan, T.G. et al., 2003. B cell receptor-independent stimuli trigger immunoglobulin (Ig) class switch recombination and production of IgG autoantibodies by anergic self-reactive B cells. *The Journal of experimental medicine*, 197(7), pp.845–860.
- Pillai, S. & Cariappa, Annaiah, 2009. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nature Reviews Immunology*, 9(11), pp.767–777.
- Pisitkun, P. et al., 2006. Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science*, 312(5780), pp.1669–1672.
- POLLARD, K., HULTMAN, P. & KONO, D., 2005. Immunology and genetics of induced systemic autoimmunity. *Autoimmunity reviews*, 4(5), pp.282–288.
- Pollard, K.M. & Landberg, G.P., 2001. The in vitro proliferation of murine lymphocytes to mercuric chloride is restricted to mature T cells and is interleukin 1 dependent. *International immunopharmacology*, 1(3), pp.581–593.
- Pollard, K.M. et al., 2000. Proteolytic cleavage of a self-antigen following xenobiotic-induced cell death produces a fragment with novel immunogenic properties. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 165(4), pp.2263–2270.
- Poole, B.D. et al., 2008. Lupus-like autoantibody development in rabbits and mice after immunization with EBNA-1 fragments. *Journal of autoimmunity*, 31(4), pp.362–371.
- Preble, O.T. et al., 1982. Systemic lupus erythematosus: presence in human serum of an unusual acid-labile leukocyte interferon. *Science*, 216(4544), pp.429–431.
- Prokunina, L. et al., 2002. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nature genetics*, 32(4), pp.666–669.
- Qian, Y. et al., 2004. Act1, a negative regulator in CD40- and BAFF-mediated B cell survival. *Immunity*, 21(4), pp.575–587.
- Qian, Y. et al., 2008. Deficiency of Act1, a critical modulator of B cell function, leads to development of Sjögren's syndrome. *European journal of immunology*, 38(8), pp.2219–

- 2228.
- Qu, W.M. et al., 2000. Genetic dissection of vasculitis in MRL/lpr lupus mice: a novel susceptibility locus involving the CD72c allele. *European journal of immunology*, 30(7), pp.2027–2037.
- Rahman, Z.S.M. et al., 2007. Expression of the autoimmune Fcgr2b NZW allele fails to be upregulated in germinal center B cells and is associated with increased IgG production. *Genes and immunity*, 8(7), pp.604–612.
- Reap, E.A. et al., 1995. Apoptosis abnormalities of splenic lymphocytes in autoimmune lpr and gld mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 154(2), pp.936–943.
- Reinertsen, J.L. et al., 1978. B-lymphocyte alloantigens associated with systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine*, 299(10), pp.515–518.
- Reininger, L. et al., 1992. Development of autoimmune disease in SCID mice populated with long-term “in vitro” proliferating (NZB x NZW)F1 pre-B cells. *The Journal of experimental medicine*, 176(5), pp.1343–1353.
- Reininger, L. et al., 1996. Intrinsic B cell defects in NZB and NZW mice contribute to systemic lupus erythematosus in (NZB x NZW)F1 mice. *The Journal of experimental medicine*, 184(3), pp.853–861.
- Remmers, E.F. et al., 2007. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine*, 357(10), pp.977–986.
- Richards, H.B. et al., 1998. Interleukin 6 dependence of anti-DNA antibody production: evidence for two pathways of autoantibody formation in pristane-induced lupus. *The Journal of experimental medicine*, 188(5), pp.985–990.
- Richardson, B. et al., 1990. Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 33(11), pp.1665–1673.
- Rider, V. & Abdou, N.I., 2001. Gender differences in autoimmunity: molecular basis for estrogen effects in systemic lupus erythematosus. *International immunopharmacology*, 1(6), pp.1009–1024.
- Roubinian, J.R. et al., 1978. Effect of castration and sex hormone treatment on survival, anti-nucleic acid antibodies, and glomerulonephritis in NZB/NZW F1 mice. *The Journal of experimental medicine*, 147(6), pp.1568–1583.
- Rui, L. et al., 2003. Resistance to CpG DNA-induced autoimmunity through tolerogenic B cell antigen receptor ERK signaling. *Nature Immunology*, 4(6), pp.594–600.
- Rus, V. et al., 2002. Expression of cytokine- and chemokine-related genes in peripheral blood mononuclear cells from lupus patients by cDNA array. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 102(3), pp.283–290.
- Rus, V. et al., 2004. Gene expression profiling in peripheral blood mononuclear cells from lupus patients with active and inactive disease. *Clinical Immunology*, 112(3), pp.231–234.

- Russell, D.M. et al., 1991. Peripheral deletion of self-reactive B cells. *Nature*, 354(6351), pp.308–311.
- Sadlack, B. et al., 1995. Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells. *European journal of immunology*, 25(11), pp.3053–3059.
- Salvador, J.M. et al., 2002. Mice lacking the p53-effector gene Gadd45a develop a lupus-like syndrome. *Immunity*, 16(4), pp.499–508.
- Santiago-Raber, M.-L. et al., 2007. Characterization of reciprocal Lmb1-4 interval MRL-Faslpr and C57BL/6-Faslpr congenic mice reveals significant effects from Lmb3. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(12), pp.8195–8202.
- Satoh, M. & Reeves, W.H., 1994. Induction of lupus-associated autoantibodies in BALB/c mice by intraperitoneal injection of pristane. *The Journal of experimental medicine*, 180(6), pp.2341–2346.
- Satoh, M. et al., 2000. Widespread susceptibility among inbred mouse strains to the induction of lupus autoantibodies by pristane. *Clinical and experimental immunology*, 121(2), pp.399–405.
- Sawalha, A.H., 2009. Xq28 and lupus: IRAK1 or MECP2? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(24), pp.E62; author reply E63.
- Sawalha, A.H. et al., 2008. Common variants within MECP2 confer risk of systemic lupus erythematosus. *PLoS ONE*, 3(3), p.e1727.
- Seery, J.P. et al., 1997. Antinuclear autoantibodies and lupus nephritis in transgenic mice expressing interferon gamma in the epidermis. *The Journal of experimental medicine*, 186(9), pp.1451–1459.
- Sekiguchi, D.R. et al., 2006. Development and selection of edited B cells in B6.56R mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(11), pp.6879–6887.
- Seshasayee, D. et al., 2003. Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLYS receptor. *Immunity*, 18(2), pp.279–288.
- Shen, N. et al., 2010. Sex-specific association of X-linked Toll-like receptor 7 (TLR7) with male systemic lupus erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(36), pp.15838–15843.
- Shimokawa, N. et al., 2010. CIN85 regulates dopamine receptor endocytosis and governs behaviour in mice. *The EMBO Journal*, pp.1–12.
- Shivakumar, S., Tsokos, G.C. & Datta, S.K., 1989. T cell receptor alpha/beta expressing double-negative (CD4-/CD8-) and CD4+ T helper cells in humans augment the production of pathogenic anti-DNA autoantibodies associated with lupus nephritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 143(1), pp.103–112.
- Shlomchik, Mark J, 2008. Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation.

- Immunity*, 28(1), pp.18–28.
- Shlomchik, M J, Craft, J.E. & Mamula, M.J., 2001. From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nature Reviews Immunology*, 1(2), pp.147–153.
- Shlomchik, M J et al., 1994. The role of B cells in lpr/lpr-induced autoimmunity. *The Journal of experimental medicine*, 180(4), pp.1295–1306.
- Shultz, L.D., 1988. Pleiotropic effects of deleterious alleles at the “motheaten” locus. *Current topics in microbiology and immunology*, 137, pp.216–222.
- Smith, D.L. et al., 2007. A female preponderance for chemically induced lupus in SJL/J mice. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 122(1), pp.101–107.
- Smith-Bouvier, D.L. et al., 2008. A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease. *Journal of Experimental Medicine*, 205(5), pp.1099–1108.
- Sommers, C.L. et al., 2002. A LAT mutation that inhibits T cell development yet induces lymphoproliferation. *Science*, 296(5575), pp.2040–2043.
- Soubeyran, P. et al., 2002. Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature*, 416(6877), pp.183–187.
- Soulas, P, 2005. Autoantigen, innate immunity, and T cells cooperate to break B cell tolerance during bacterial infection. *Journal of Clinical Investigation*, 115(8), pp.2257–2267.
- Soulas, Pauline et al., 2002. A role for membrane IgD in the tolerance of pathological human rheumatoid factor B cells. *European journal of immunology*, 32(9), pp.2623–2634.
- Soulas-Sprauel, P. et al., 2007. Role for DNA repair factor XRCC4 in immunoglobulin class switch recombination. *The Journal of experimental medicine*, 204(7), pp.1717–1727.
- Steinberg, B.J. et al., 1982. Ability of the xid gene to prevent autoimmunity in (NZB X NZW)F1 mice during the course of their natural history, after polyclonal stimulation, or following immunization with DNA. *Journal of Clinical Investigation*, 70(3), pp.587–597.
- Steinberg, E.B. et al., 1983. Studies of congenic MRL-Ipr/Ipr.xid mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 131(6), pp.2789–2795.
- Stetson, D.B. et al., 2008. Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell*, 134(4), pp.587–598.
- Strachan, D.P., 1989. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ (Clinical research ed.)*, 299(6710), pp.1259–1260.
- Strasser, Andreas & Bouillet, Philippe, 2003. The control of apoptosis in lymphocyte selection. *Immunological reviews*, 193, pp.82–92.
- Strasser, A et al., 1991. Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America*, 88(19), pp.8661–8665.
- Stüber, E. & Strober, W., 1996. The T cell-B cell interaction via OX40-OX40L is necessary for the T cell-dependent humoral immune response. *The Journal of experimental medicine*, 183(3), pp.979–989.
- Subramanian, S. et al., 2006. A Tlr7 translocation accelerates systemic autoimmunity in murine lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(26), pp.9970–9975.
- Sun, H. et al., 2001. Defective T cell activation and autoimmune disorder in Stra13-deficient mice. *Nature Immunology*, 2(11), pp.1040–1047.
- Suzuki, H. et al., 1995. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science*, 268(5216), pp.1472–1476.
- Takahashi, T. et al., 1994. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell*, 76(6), pp.969–976.
- Take, H. et al., 2000. Cloning and characterization of a novel adaptor protein, CIN85, that interacts with c-Cbl. *Biochemical and biophysical research communications*, 268(2), pp.321–328.
- Tavares, R.M. et al., 2010. The ubiquitin modifying enzyme A20 restricts B cell survival and prevents autoimmunity. *Immunity*, 33(2), pp.181–191.
- Taylor, G.A. et al., 1996. A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency. *Immunity*, 4(5), pp.445–454.
- Taylor, K.E. et al., 2008. Specificity of the STAT4 genetic association for severe disease manifestations of systemic lupus erythematosus. *PLoS Genetics*, 4(5), p.e1000084.
- Teachey, D.T., Seif, A.E. & Grupp, S.A., 2010. Advances in the management and understanding of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *British journal of haematology*, 148(2), pp.205–216.
- Tedder, T.F., Inaoki, M. & Sato, S., 1997. The CD19-CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity*, 6(2), pp.107–118.
- Theofilopoulos, A.N. & Dixon, F.J., 1985. Murine models of systemic lupus erythematosus. *Advances in immunology*, 37, pp.269–390.
- Tiegs, S.L., Russell, D.M. & Nemazee, D., 1993. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *The Journal of experimental medicine*, 177(4), pp.1009–1020.
- Tiscornia, G., 2003. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), pp.1844–1848.
- Tivol, E.A. et al., 1997. CTLA4Ig prevents lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue

- destruction in CTLA-4-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 158(11), pp.5091–5094.
- Tivol, E.A. et al., 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*, 3(5), pp.541–547.
- Tretter, T., 2003. Mimicry of Pre-B Cell Receptor Signaling by Activation of the Tyrosine Kinase Blk. *Journal of Experimental Medicine*, 198(12), pp.1863–1873.
- Trevisan, G.L. et al., 2006. Using cDNA microarrays to identify human CD19(+) B cell gene products (ESTs) originated from systemic lupus erythematosus susceptibility loci. *Autoimmunity reviews*, 5(5), pp.319–323.
- Truedsson, L., Bengtsson, A.A. & Sturfelt, G., 2007. Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*, 40(8), pp.560–566.
- Tuohy, V.K. et al., 1997. Diversity and plasticity of self recognition during the development of multiple sclerosis. *Journal of Clinical Investigation*, 99(7), pp.1682–1690.
- Urbonaviciute, V. et al., 2008. Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *Journal of Experimental Medicine*, 205(13), pp.3007–3018.
- Vang, T. et al., 2005. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nature genetics*, 37(12), pp.1317–1319.
- Vereecke, L., Beyaert, R. & van Loo, G., 2009. The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology. *Trends in Immunology*, 30(8), pp.383–391.
- Vidal, S., Kono, D.H. & Theofilopoulos, A.N., 1998. Loci predisposing to autoimmunity in MRL-Fas lpr and C57BL/6-Faslpr mice. *Journal of Clinical Investigation*, 101(3), pp.696–702.
- Viglianti, G.A. et al., 2003. Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity*, 19(6), pp.837–847.
- Vinuesa, C.G. et al., 2005. A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature*, 435(7041), pp.452–458.
- Walker, L.S.K. & Abbas, A.K., 2002. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nature Reviews Immunology*, 2(1), pp.11–19.
- Walport, M.J., Davies, K.A. & Botto, M., 1998. C1q and systemic lupus erythematosus. *Immunobiology*, 199(2), pp.265–285.
- Wang, J. et al., 2001. The regulation of T cell homeostasis and autoimmunity by T cell-derived LIGHT. *Journal of Clinical Investigation*, 108(12), pp.1771–1780.
- Wang, J.H. et al., 1998. Aiolos regulates B cell activation and maturation to effector state. *Immunity*, 9(4), pp.543–553.

- Wardemann, H., 2003. Predominant Autoantibody Production by Early Human B Cell Precursors. *Science*, 301(5638), pp.1374–1377.
- Watanabe, S., 2000. Characterization of the CIN85 Adaptor Protein and Identification of Components Involved in CIN85 Complexes. *Biochemical and biophysical research communications*, 278(1), pp.167–174.
- Watanabe, S. et al., 2000. Characterization of the CIN85 adaptor protein and identification of components involved in CIN85 complexes. *Biochemical and biophysical research communications*, 278(1), pp.167–174.
- Waterhouse, P. et al., 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science*, 270(5238), pp.985–988.
- Welner, R.S., Pelayo, R. & Kincade, P.W., 2008. Evolving views on the genealogy of B cells. *Nature Reviews Immunology*, 8(2), pp.95–106.
- Wen, L. et al., 2008. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*, 455(7216), pp.1109–1113.
- Wilkinson, R. et al., 2002. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) acts as a regulator of B-cell development, B-cell antigen receptor (BCR)-mediated activation, and autoimmune disease. *Blood*, 100(1), pp.184–193.
- Willerford, D.M. et al., 1995. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity*, 3(4), pp.521–530.
- Wither, J. & Vukusic, B., 1998. Autoimmunity develops in lupus-prone NZB mice despite normal T cell tolerance. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(9), pp.4555–4562.
- Wofsy, D. & Seaman, W.E., 1987. Reversal of advanced murine lupus in NZB/NZW F1 mice by treatment with monoclonal antibody to L3T4. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 138(10), pp.3247–3253.
- Xu, L. et al., 2004. Human lupus T cells resist inactivation and escape death by upregulating COX-2. *Nature Medicine*, 10(4), pp.411–415.
- Xue, D. et al., 2003. A lupus-like syndrome develops in mice lacking the Ro 60-kDa protein, a major lupus autoantigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13), pp.7503–7508.
- Yachimovich-Cohen, N. et al., 2003. Autoimmune NZB/NZW F1 mice utilize B cell receptor editing for generating high-affinity anti-dsDNA autoantibodies from low-affinity precursors. *European journal of immunology*, 33(9), pp.2469–2478.
- Yajima, K. et al., 2003. FcγRIIB deficiency with Fas mutation is sufficient for the development of systemic autoimmune disease. *European journal of immunology*, 33(4), pp.1020–1029.
- Yang, J. et al., 2011. ELF1 is associated with systemic lupus erythematosus in Asian populations. *Human molecular genetics*, 20(3), pp.601–607.

- Yang, W. et al., 2010. Genome-Wide Association Study in Asian Populations Identifies Variants in ETS1 and WDFY4 Associated with Systemic Lupus Erythematosus J. Flint, ed. *PLoS Genetics*, 6(2), p.e1000841.
- Yoh, K. et al., 2001. Nrf2-deficient female mice develop lupus-like autoimmune nephritis. *Kidney international*, 60(4), pp.1343–1353.
- Yokoyama, K. et al., 2002. BANK regulates BCR-induced calcium mobilization by promoting tyrosine phosphorylation of IP(3) receptor. *The EMBO Journal*, 21(1-2), pp.83–92.
- Zaccone, P. et al., 2003. Schistosoma mansoni antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. *European journal of immunology*, 33(5), pp.1439–1449.
- Zenewicz, L.A. et al., 2010. Unraveling the genetics of autoimmunity. *Cell*, 140(6), pp.791–797.
- Zennou, V. et al., 2000. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell*, 101(2), pp.173–185.
- Zhang, J. et al., 2001. Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(1), pp.6–10.
- Zhang, L. et al., 1995. An immunological renal disease in transgenic mice that overexpress Fli-1, a member of the ets family of transcription factor genes. *Molecular and cellular biology*, 15(12), pp.6961–6970.
- Zhang, Y. et al., 2002. Impaired apoptosis, extended duration of immune responses, and a lupus-like autoimmune disease in IEX-1-transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(2), pp.878–883.
- Zipris, D. et al., 2005. TLR activation synergizes with Kilham rat virus infection to induce diabetes in BBDR rats. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(1), pp.131–142.

Systemic lupus erythematosus and underexpression of *Carabin* and *Sh3kbp1* : functional genomic approach.

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease which is characterized by the production of autoantibodies leading to multiorgan damages. B lymphocytes appear central to the pathogeny of the disease. Looking for intrinsic B cell abnormalities during lupus, our large scale B cell microarray analysis in patients during a quiescent phase of the disease pointed to the downexpression of *TBC1D10C* (*Carabin*) and *SH3KBP1*. The aim of this thesis project was to precise the consequences of Carabin and Sh3kbp1 underexpression in B cell function and in the development of autoimmunity. To address those issues, we produced: 1/ Carabin and Sh3kbp1 knock-down (KD) B cells and studied their phenotype; 2) a knock-out (KO) and conditional KO of Carabin in B cells or in mature B or T cells. Our results show that Carabin deficiency leads to an increase in T and B cell activation after TCR and BCR stimulation, respectively. Moreover Carabin KO mice and B cell conditional KO mice shows an accelerated T-dependant and T-independent antigen-specific B cell response *in vivo*. Finally, Carabin KO mice develop signs of autoimmunity after CpG treatment characterized by sustained production of anti-DNA IgG as well as an important deposition of IgG in renal glomeruli. Altogether these results define a new role for Carabin as a negative regulator of B cell signaling that points out a new defective biological pathway in autoimmunity. For Sh3kbp1, we show an acceleration of Erk and Akt phosphorylation in Sh3kbp1 KD B cells after BCR engagement, showing a role for Sh3kbp1 as a negative regulator of B cell receptor signaling.

In conclusion, we have identified two genes that are deregulated in B cells during SLE. A deficiency in one of these two genes speed up the B cells response and predispose for the development of autoimmunity *in vivo*. Further experiments could potentially identify these two genes as new susceptibility genes in SLE.

Keywords: Autoimmunity, Systemic lupus erythematosus, B cells, Carabin, Sh3kbp1.

Lupus érythémateux disséminé et sous-expression de *Carabin* et *Sh3kbp1* : étude par génomique fonctionnelle.

Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie auto-immune sévère, caractérisée par la production d'autoanticorps responsables de lésions multiviscérales, et dont l'étiologie est en partie génétique. Les lymphocytes B (LB) jouent un rôle central dans la maladie. Notre analyse du transcriptome des LB de patients lupiques quiescents, en comparaison à des contrôles, a permis d'établir une liste de gènes candidats sous-exprimés ou surexprimés, sur des critères biologiques ou statistiques. Ce projet de thèse propose d'explorer, en utilisant une approche de génomique fonctionnelle, les effets de la sous-expression de deux de ces gènes candidats (*Carabin* et *Sh3kbp1*) sur la fonction des LB et le développement d'une autoimmunité chez la souris. Pour cela nous avons produit une lignée de LB et des modèles murins sous-exprimant *Carabin* ou *Sh3kbp1* et étudié leur phénotype.

Nos résultats mettent en évidence que *Carabin* joue le rôle de régulateur négatif des lymphocytes B, et que sa sous-expression (ou son abolition totale) provoque une hypersensibilité du lymphocyte B, qui se caractérise notamment par une accélération de la phosphorylation de Erk après stimulation de la voie du BCR. De plus, *Carabin* contrôle la cinétique de la réponse lymphocytaire B après immunisation *in vivo* : en effet, cette réponse est accélérée en absence de *Carabin*, après immunisation avec un antigène T-dépendant ou T-indépendant. Enfin, *Carabin* semble jouer un rôle important dans le maintien de la tolérance des lymphocytes B dans le cas d'une stimulation simultanée des voies du BCR et du TLR9. Ceci est illustré par le fait que les souris *Carabin* KO développent des signes d'autoimmunité après immunisation avec de l'ADN hypométhylé de type CpG. Le deuxième gène étudié est *Sh3kbp1*. Nous avons montré, dans des cellules B A20 *sh3kbp1* knock down, que l'activation du BCR conduit à une accélération des voies Erk et Akt. Ainsi, il semble que les voies de signalisation du BCR soient finement régulées par *Sh3kbp1*.

Ce projet de thèse a permis d'identifier deux gènes dont la sous-expression a une conséquence directe sur la fonction des LB, et peut favoriser l'émergence d'une autoimmunité (dans le cas de *Carabin*). Ces résultats ouvrent des perspectives très intéressantes quant à l'étude de ces deux gènes en tant que nouveaux gènes de susceptibilité du LED.

Mots clés : autoimmunité, lupus érythémateux disséminé, lymphocytes B, *Carabin*, *Sh3kbp1*.