

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ (ED414)

CNRS UPR 3572

THÈSE

présentée par :

Matthieu SAWAF

soutenue le : 26 Avril 2018

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

Discipline/ Spécialité : **Sciences de la Vie et de la Santé / Immunologie**

**LE RECEPTEUR CO-INHIBITEUR BTLA AU
COURS DU LED :
ASPECTS FONDAMENTAUX ET IMPLICATIONS
THERAPEUTIQUES**

THÈSE dirigée par :

Madame le Docteur Fanny MONNEAUX

CNRS UPR 3572 – Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire – Strasbourg

Directrice de Thèse

RAPPORTEURS :

Monsieur le Professeur Daniel OLIVE

INSERM IMU1068 – Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille – Institut Paoli-Calmettes – Marseille

Rapporteur externe

Monsieur le Professeur Patrick BLANCO

CNRS UMR 5164 – Laboratoire d'Immunologie et Immunogénétique – CHU de Bordeaux

Rapporteur externe

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Madame le Docteur Mei LI

UMR7104 INSERM U964 – Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire – Illkirch-Graffenstaden

Examineur interne

MEMBRE INVITE :

Madame le Docteur Hélène DUMORTIER

CNRS UPR 3572 – Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire – Strasbourg

Membre invité

Je tenais à remercier dans un premier temps les membres du jury, le *Pr. Daniel Olive*, le *Pr. Patrick Blanco* et le *Dr. Mei Li*, pour avoir accepté d'évaluer mon manuscrit de thèse et de juger mon travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement le *Dr. Fanny Monneaux*. *Fanny*, tu as pris le risque il y a quelques années de changer vos habitudes en accueillant pour la première fois un garçon dans l'équipe et je t'en remercie. Ton soutien, ta disponibilité, ton investissement et ta gentillesse ont été très précieux pour moi durant ces 4 années et demi. Merci d'avoir été patiente avec moi (surtout pour la correction du manuscrit, quelle efficacité !). Je pense avoir, grâce à toi, progressé scientifiquement, humainement et, je l'espère avec tout le mal que tu t'es donné, dans ma façon de m'exprimer à l'oral et à l'écrit. Donc, merci encore pour ces années passées et je te souhaite toute la réussite et le bonheur possible au labo et en dehors.

Un très grand merci aussi au *Dr. Hélène Dumortier*. *Hélène*, travailler dans ton équipe a été un réel plaisir. Malgré ton emploi du temps plus que chargé, tu es toujours à l'écoute, disponible et bienveillante, et ces qualités sont extrêmement précieuses. Je te remercie d'avoir contribué à la belle ambiance qui règne au sein de notre équipe. Je finirai en te disant que je suis vraiment content d'avoir assisté au changement de direction qui a opéré dans l'Unité (et qu'il soit toujours possible de t'appeler *Hélène* et non « Madame » ou « Chef » !). Félicitations et bonne continuation pour les projets de l'Unité et de l'équipe.

L'équipe justement ! La présence des membres de notre équipe a été un réel moteur durant ma thèse. Chronologiquement, je commencerai par remercier *Carole* (*Dr. Carole Le Coz, pardon*). Tu m'as accueilli dans l'équipe, appris beaucoup scientifiquement et je te souhaite le meilleur pour la suite parce que tu le mérites. Merci à *Cécile*, car tu m'as rapidement mis à l'aise, tu m'as beaucoup aidé (notamment en biomol !) et tu m'as montré comment mêler cytométrie et Disney le vendredi soir ! Il est difficile de citer tout le monde mais, *Jacques-Eric, Romain, Sophia* (je reviens vers toi après) les « M2 médecins » : *Renaud*, que je remercie pour ton investissement pour le recrutement des patients (et encore toutes mes félicitations Papa), *Flora, Pierre-Marie*, mais aussi *Marie-Charlotte* et *Cerise*, vous avez tous contribué à l'ambiance très familiale qui règne dans notre équipe et c'est avec un très grand plaisir que j'ai passé ces années à vos côtés. *Lucie*, tu as la lourde responsabilité de reprendre ce joli projet ! Je te souhaite toute la réussite possible pour le concours et pour ta future thèse où je suis sûr que tu vas assurer. A notre équipe, je rajoute également *Jean-Daniel*, qui m'a énormément aidé pour la microscopie, et qui a toujours été disponible pour parler avec moi, de science ou de snow ! Pour finir, je terminerai par toi, *Hayet*, qui même avant de rejoindre notre équipe, a toujours été d'une gentillesse incroyable avec moi. Ton soutien et ta présence, en particulier ces derniers mois, ont été extrêmement précieux.

Je tenais également à remercier tous les membres, actuels ou passés, de l'UPR 3572. Difficile de vous remercier tous un par un sans oublier quelqu'un, donc je vous remercie dans l'ensemble pour l'excellente ambiance de travail qui règne dans cette Unité, pour les nombreux repas de Noël ou barbecue et pour votre gentillesse à mon égard. En parlant de ces repas d'Unité, je tiens à remercier *Isabelle*, avec qui j'ai passé pas mal de temps à organiser ces soirées mais aussi à parler de tout et de rien ! Une mention spéciale aux étudiants qui sont passés par le bureau 136, *Cristina, Isabella, Quyen, Matteo, Amalia, Chloé* notamment, qui ont eu la force de me supporter durant toutes ces années !!

Même si j'étais un « étudiant du 1^{er} étage », j'ai toujours été très bien accueilli par « les mouches » au 2^{ème} étage. Je vous remercie tous pour tous ces repas, fous rires, bières, discussions et autres cafés que nous avons partagés ensemble. Je tenais à remercier plus particulièrement *Adrien*, avec qui j'ai partagé de nombreuses heures à parler de science, de cinéma, de ping-pong, de Chartres et de choses plus secrètes ;) . Merci à toute la DF team, principalement *Miri* (la reine du swag), *Cath* (ma binôme de choc), *Bech* (le roi du chat), *Simone* (Karrriiiiim), mais aussi *Matthieu, Gaetgaet, Jenny*, et tous ceux passés dans cette équipe. *Loic, Carine, Aurélie* (SRC fan n°1), *Francesco, Alice*, je voulais également vous remercier, j'ai eu la chance de partager beaucoup de très bons moments au labo et en dehors avec vous. Je remercie aussi *Alexis*, qui sera resté un ami fidèle depuis le master !

Si je n'ai jamais trainé les pieds pour venir au labo le matin, c'est grâce à certaines personnes (« les Jbabs ») qui m'ont accompagné durant ces années et avec qui j'ai partagé tous les hauts et les bas qu'on peut rencontrer durant la thèse. Bien s'entendre avec ses collègues, c'est super, travailler avec des amis c'est encore mieux. *Adriano*, mon voisin de toujours, avoir un pote comme toi à côté de moi, capable de parler de tout, de rien, avec tout le monde et même quand il n'y a personne, a été une vraie chance. Merci pour tout, bon courage en Belgique et on se donne rdv dans 2ans où tu sais ;) (et puis en attendant, Paris-Bruxelles c'est pas loin !). Ma chère *Diane*, la grande sœur de la famille, merci de m'avoir supporté, et merci pour toute ta gentillesse, ta compassion et ton humour, ils ont été essentiels. Merci à toi aussi *Ben*, mon fragile préféré, pour tous ces moments partagés, de la montée du Racing en L1, aux soirées chez toi en passant par les « Fifa nights » ! A toi et à ma *Popo*, ma partenaire de danse « Keblack », je vous souhaite tout le bonheur que vous méritez et quoiqu'il arrive, vous savez que vous pourrez toujours compter sur moi ! Merci à *Zaz*, avec qui j'ai partagé la salle humain pendant de longs mois, et qui m'a permis de savoir qu'on ne pouvait pas casser 3 pattes ET un canard. Je remercie également *Flora*, qui est arrivée dans notre groupe et qu'on n'a plus jamais laissé repartir ! Merci au futur président *Fafa*, je n'avais jamais rencontré quelqu'un comme toi, ne change jamais ! Merci également à toi, *Janinschen*, merci pour ton sourire, pour ta gentillesse et pour les cours d'allemand ! Même si vous êtes arrivés plus récemment dans notre groupe, merci à vous *Giacomo, Chloé, Amandine, Cristina* pour votre bonne humeur et votre gentillesse. Pour finir, je tenais à

remercier *Sophia*, ma grande-petite sœur. C'est une vraie chance de t'avoir rencontrée, ta gentillesse, ta franchise et ton amitié ont été très important pour moi durant cette thèse. Pas besoin de dire que tu pourras toujours compter sur moi, pour parler, pour rire, ou pour partager un bon verre de vin.

Pour tenir le coup ces dernières années j'ai toujours pu compter sur mes frères d'armes, mon équipe de water-polo. Les gars, merci, vous avez toujours été ma soupape, vous m'avez permis de décompresser et c'était un plaisir de passer toutes ces heures à faire les entraînements, les matchs et les déplacements, avec les « strasbourgeois », *Guigui, Flo, Doudou, Cycy* et avec tous les autres (désolé *Lucky* pour toutes les spéciales que je t'ai mis). Merci aussi à *Raph*, mon coach, qui m'a recherché quand j'avais prévu d'arrêter, et pour m'avoir fait confiance en tant que capitaine pendant toutes ces années. Je remercie également *Arnaud* et *Julie*, mes amis « colmariens », toujours à mes côtés depuis de nombreuses années !

Merci à toi aussi, *Souhail*, de m'avoir permis de réaliser les 6 derniers mois de la thèse, pour ton soutien quotidien.

Je tiens également à adresser un énorme merci à ma famille qui m'apporte un équilibre et un soutien inconditionnel, dans les bons et les mauvais moments. Gros gros merci à mes parents, *Nathalie* et *Khaldoun*, à mon petit frère *Yann*, et à ma grand-mère *Marie-Claude*, c'est toujours un plaisir de rentrer à la maison, de passer du temps avec vous et de sentir votre soutien. Un très gros merci également à ma famille d'adoption, *Françoise* et *Bernard*. Vous m'avez accueilli comme votre fils, vous êtes toujours attentionnés et au petit soin pour moi, je vous en serai toujours reconnaissant. Enfin, *Loulou*, mon *Bingo, Ninie, Nala* et mes petites *Mimie* et *Lols*, je vous adore.

Pour finir, *Laurie*, tu es probablement la personne la plus dure à remercier, car j'ai du mal à trouver les mots pour te dire à quel point tu es importante pour moi. Depuis le temps qu'on avance ensemble, tu connais mes forces, mes faiblesses, tu me rends meilleur et me comprends mieux que quiconque. J'ai hâte de vivre à tes côtés les prochaines aventures qui nous attendent. A nous la vie parisienne maintenant ! Je suis vraiment fier de toi, de ce que tu as accompli durant ta thèse, et je veux que tu saches que tu pourras toujours te reposer sur moi.

INTRODUCTION	1
A. LE LUPUS ERYTHEMATEUX DISSEMINÉ	2
I. Caractérisation du LED	2
II. Epidémiologie du LED	3
III. Les symptômes lupiques	3
IV. L'étiologie du lupus	4
1. Facteurs génétiques	4
2. Les facteurs environnementaux.....	8
V. Les manifestations biologiques et immunologiques du lupus	12
1. Le défaut de clairance apoptotique : un point de départ ?	12
2. Rôle de l'immunité innée	12
3. Rôle du système immunitaire adaptatif.....	16
VI. Les traitements du lupus	22
1. Les traitements actuels	22
2. Les futurs traitements du lupus	25
B. L'INTERACTION T-B : au cœur du développement du LED	28
I. Mise en évidence du rôle des LT CD4⁺ dans la différenciation des LB : un peu d'histoire.	28
II. Les cellules T folliculaires auxiliaires (T_{FH})	29
1. Découverte des T _{FH}	29
2. Phénotype des cellules T _{FH}	29
3. Génération des cellules T _{FH}	30
4. Régulation des cellules T _{FH}	35
5. Implication des cellules T _{FH} dans le LED	38
6. Les T _{FH} : cible thérapeutique dans le LED ?.....	42
III. Les acteurs cellulaires régulant les interactions T-B	44
1. Les cellules T régulatrices	44
2. Les cellules T CD8 ⁺ suppressives.....	45
3. Les cellules B régulatrices (Bregs)	46
4. Les plasmocytes.....	46
IV. Les acteurs moléculaires régulant les interactions T-B	47
1. Les molécules co-activatrices dans la régulation de l'interaction T-B	48
2. Les molécules co-inhibitrices dans la régulation de l'interaction T-B	49
3. Implication des molécules de co-stimulation dans la pathogénèse du LED	51

C. LE RECEPTEUR CO-INHIBITEUR BTLA	54
I. Structure / Interaction	54
1. Structure de BTLA.....	54
2. L'interaction non-canonique entre BTLA et HVEM	55
3. HVEM : un récepteur pivot aux multiples interactions	55
4. Compétition entre BTLA et une protéine virale : UL144	56
II. Expression de BTLA	57
1. Sur les populations lymphoïdes	57
2. Sur les populations myéloïdes.....	59
3. Expression de BTLA après activation	59
III. Expression de HVEM	59
IV. Mécanisme d'action de BTLA	60
V. Rôle de BTLA dans la réponse immunitaire	62
1. Rôle dans l'immunité innée.....	62
2. Rôle dans la tolérance périphérique	63
3. Rôle dans la réponse immunitaire adaptative	64
VI. Rôle de BTLA dans les pathologies	66
1. BTLA et cancer	66
2. BTLA et infections.....	67
3. BTLA dans les transplantations et le rejet de greffe	69
4. BTLA dans les hypersensibilités : Allergies et asthme.....	70
VII. Rôle de BTLA dans l'autoimmunité	71
D. HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS	73
RESULTATS	75
CHAPITRE I : IMPLICATION DES CELLULES T_{FH} DANS LE LED	76
I. Avant-propos	77
II. PUBLICATION N°1 : Follicular Helper T Cells in Systemic Lupus Erythematosus: Why Should They Be Considered as Interesting Therapeutic Targets ?	79
III. Résultats complémentaires	80
1. Caractérisation des sous-populations de T _{FH} chez l'Homme	80
2. Caractérisation des sous-populations de T _{FH} chez la souris.....	87

CHAPITRE II : LE RECEPTEUR CO-INHIBITEUR BTLA AU COURS DU LED : ASPECTS FONDAMENTAUX ET IMPLICATIONS THERAPEUTIQUES	98
I. Avant-propos	99
II. Rôle de BTLA dans l'inhibition de l'activation des LT de patients lupiques	100
III. Commentaires et résultats complémentaires	142
1. Expression de BTLA par les Tregs	142
2. Expression d'HVEM.....	144
3. Expression de BTLA sur les LB de patients lupiques	147
DISCUSSION.....	156
BIBLIOGRAPHIE.....	168
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ORALES	205

ABBREVIATIONS

Ac	Anticorps
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
Ag	Antigène
ARN	Acide RiboNucléique
Auto-Ac	Auto-anticorps
BAFF	<i>B-cell activating factor</i>
BCR	Récepteur spécifique des Cellules B
Bregs	Cellules B régulatrices
BTLA	<i>B and T Lymphocyte Attenuator</i>
CCR	C-C chemokine Receptor
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CG	Centre Germinatif
CRD	<i>Cysteine-Rich Domain</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4</i>
Ctrl	Contrôle
CXCL	C-X-C chemokine Ligand
CXCR	C-X-C chemokine Receptor
DCs	Cellules dendritiques
EAE	<i>Experimental Autoimmune Encephalomyelitis</i>
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>
hCMV	CytoMégaloVirus humain
HVEM	<i>HerpesVirus Entry Mediator</i>
ICOS	<i>Inducible T Cell COStimulator</i>
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobulines
IL	Interleukine
ITAM	<i>ImmunoTyrosine based Activation Motifs</i>
ITIM	<i>ImmunoTyrosine based Inhibitory Motifs</i>
LB mémoires DN	Lymphocytes B mémoires Double Négatifs
LB	Lymphocytes B
LED	Lupus Erythémateux Disséminé
LIGHT	<i>homologous to Lymphotoxin, exhibits Inducible expression and competes with HSV Glycoprotein D for binding to Herpesvirus entry mediator, a receptor expressed on T lymphocytes</i>
LT	Lymphocytes T
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
miRNAs / miR	Micro-ARNs
NETs	<i>Neutrophils Extracellular Traps</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NZB/W	(NZBxNZW)F1
OLS	Organes Lymphoïdes Secondaires
PBMCs	Cellules mononuclées du sang (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)

PD-1	<i>Programmed Death receptor-1</i>
pDCs	Cellules Dendritiques plasmacytoïdes
PI3K	PhosphoInositide 3-Kinase
PR	Polyarthrite Rhumatoïde
PTEN	<i>Phosphatase and TENsin homolog</i>
SHP	<i>Src Homology Phosphatase</i>
SLEDAI	<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i>
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
TCR	Récepteur spécifique des Cellules T
T_{FH}	Lymphocyte T folliculaire auxiliaire (<i>T follicular helper cells</i>)
T_{FR}	Lymphocyte T folliculaire régulateur (<i>T follicular regulatory cells</i>)
T_H	Lymphocyte T auxiliaire (<i>T helper cells</i>)
TLRs	<i>Toll-Like Receptors</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
Tregs	Lymphocytes T CD4 ⁺ régulateurs
UV	Ultraviolets

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableau 1. Critères de l'ACR pour le diagnostic du LED.....	2
Tableau 2. Indice d'activité du LED, méthode de calcul du SLEDAI.....	4
Tableau 3. Marqueurs pour l'identification des T _{FH} chez l'Homme et la souris.....	30
Figure 1. Les gènes de susceptibilité du LED.....	5
Figure 2. Le LED, une maladie multifactorielle.....	11
Figure 3. Le rôle de l'immunité innée dans le développement du LED.....	14
Figure 4. La voie de signalisation du TCR est altérée chez les patients lupiques.....	20
Figure 5. Pathogénèse du LED.....	23
Figure 6. Thérapies ciblées du LED.....	27
Figure 7. La régulation complexe de l'expression de Bcl-6.....	32
Figure 8. Génération des T _{FH} au sein des OLS.....	34
Figure 9. La régulation moléculaire et cellulaire des T _{FH}	36
Figure 10. Les différentes sous-populations de cellules T _{FH} circulantes chez l'homme.....	40
Figure 11. Traitement du LED ciblant des molécules associées aux T _{FH}	43
Figure 12. Les acteurs cellulaires régulant les interactions T-B.....	47
Figure 13. Les molécules de costimulation impliquées dans le développement du LED.....	53
Figure 14. Structure de BTLA.....	54
Figure 15. Interaction HVEM / BTLA.....	55
Figure 16. Le réseau BTLA / HVEM.....	57
Figure 17. Le mécanisme d'action de BTLA dans les LT.....	61
Figure 18. L'engagement de BTLA présente un effet bénéfique ou négatif selon les pathologies.....	71
Figure 19. La distribution des sous-populations de T _{FH} est altérée chez les patients lupiques présentant un score d'activité de la maladie élevé.....	78
Figure 20. Expression des récepteurs co-inhibiteurs PD-1 et BTLA par les sous-populations de cT _{FH} d'individus sains.....	81
Figure 21. Comparaison de l'expression de PD-1 et de BTLA sur les différentes sous-populations de cT _{FH} chez les individus sains et les patients lupiques	82
Figure 22. Comparaison de l'expression FoxP3 sur les sous-populations de cT _{FH} chez l'Homme.....	83
Figure 23. Analyse transcriptomique de FoxP3 sur les sous-populations de cT _{FH} triées au FACS.....	84
Figure 24. Test de suppression de la prolifération des LT effecteurs par les différentes sous-populations de T _{FH} circulantes.....	85
Figure 25. Comparaison de l'expression de CXCR3 et CCR6 à la surface des cT _{FH} chez l'Homme et chez la souris.....	87
Figure 26. Expression de CXCR3 et CCR6 à la surface des cT _{FH} de souris BALB/c.....	88
Figure 27. Expression de CXCR3 et CCR6 à la surface des T _{FH} spléniques de souris BALB/c.....	88
Figure 28. Expression de CXCR3 et CCR6 à la surface des T _{FH} circulants et spléniques de souris lupiques NZB/W.....	89
Figure 29. Comparaison de l'expression de CXCR3 et CCR6 à la surface des T _{FH} circulants et spléniques de souris BALB/c et NZB/W.....	90
Figure 30. Production d'IFN- γ , d'IL-4 et IL-17 par les différentes sous-populations de T _{FH} spléniques de souris.....	91

Figure 31. Comparaison de la production d'IFN- γ , d'IL-4 et IL-17 par les différentes sous-populations de T _{FH} spléniques de souris identifiées par l'expression de CXCR3 et CCR6.....	92
Figure 32. Expression de CXCR3 et CCR6 selon la production de cytokines par les T _{FH} spléniques murines.....	93
Figure 33. Expression de différents facteurs de transcription par les cellules T _{FH} spléniques.....	94
Figure 34. Expression de CXCR3 par les cellules T _{FH} circulantes et spléniques de souris contrôles BALB/c et NZB/W.....	95
Figure 35. Expression de CXCR3 dans les reins de souris lupiques NZB/W.....	96
Figure 36. Modèle proposé de la migration des cellules T _{FH} CXCR3 ⁺ dans un contexte physiologique et dans un contexte inflammatoire.....	97
Figure 37. Interaction entre HVEM et BTLA dans les fonctions suppressives des Tregs en condition physiologique.....	134
Figure 38. BTLA est faiblement exprimé à la surface des LT CD4 ⁺ régulateurs d'individus sains.....	135
Figure 39. Le niveau d'expression de BTLA est augmenté à la surface des Tregs de patients lupiques par rapport aux individus sains.....	135
Figure 40. Le niveau d'expression d'HVEM est comparable à la surface des sous-populations d'individus sains et de patients lupiques.....	136
Figure 41. Interaction entre HVEM et BTLA dans les fonctions suppressives des Tregs chez les patients lupiques.....	137
Figure 42. Le niveau d'expression d'HVEM est diminué à la surface des monocytes de patients lupiques par rapport aux individus sains.....	137
Figure 43. Dans les LT CD4 ⁺ de plusieurs patients lupiques, BTLA semble retenu dans des compartiments intracellulaires après activation.....	138
Figure 44. Expression de BTLA parmi les PBMCs d'individus sains.....	139
Figure 45. Expression de BTLA à la surface des différentes sous-populations de LB d'individus sains.....	140
Figure 46. Le niveau d'expression de BTLA est diminué à la surface des LB mémoires DN de patients lupiques.....	141
Figure 47. La distribution des sous-populations de LB périphériques est modifiée chez les patients lupiques par rapport aux individus.....	142
Figure 48. Description de la population BTLA ^{neg} parmi les LB mémoires DN de patients lupiques..	143
Figure 49. La population BTLA ^{neg} parmi les LB mémoires DN est principalement retrouvée chez les patients lupiques présentant des anomalies liées aux LB.....	144
Figure 50. BTLA semble être retenu dans les compartiments intracellulaires des LB mémoires DN de patients lupiques.....	145
Figure 51. Modèle proposant l'implication de BTLA dans le contrôle de la réponse humorale chez les individus sains et les patients lupiques.....	147
Figure 52. La régulation cellulaire et moléculaire de la réponse B chez les individus sains et les patients lupiques.....	153

INTRODUCTION

A. LE LUPUS ERYTHEMATEUX DISSEMINÉ

Le Lupus Erythémateux Disséminé (LED) est une maladie auto-immune systémique, caractérisée par la production d'auto-anticorps (auto-Ac) dirigés contre des antigènes (Ag) du soi essentiellement nucléaires, mais également cytoplasmiques ou membranaires. Ces auto-Ac forment des complexes immuns qui peuvent se déposer au niveau d'organes cibles et ainsi déclencher une inflammation et des dommages tissulaires. Les symptômes les plus fréquemment observés sont des lésions cutanées, une dysfonction rénale ou des arthrites, cependant d'autres organes tels que le cerveau ou les poumons peuvent également être atteints.

I. Caractérisation du LED

Le LED est une maladie polymorphe et multifactorielle, qui se traduit par une grande diversité des symptômes. La difficulté à établir un diagnostic a mené l'American College of Rheumatology (ACR) à proposer en 1992, une liste (révisée en 1997) de critères biologiques et cliniques de caractérisation du lupus (**Hochberg, 1997**). La présence de quatre critères parmi les onze décrits par l'ACR permet de classer la pathologie en tant que LED (*Tableau 1*).

Critères	Description
Eruptions malaires	Eruptions sur le nez, les joues, en forme de papillon
Eruptions discoïdes	Eruptions sous forme de plaques rouges en relief, en forme de disque
Photosensibilité	Réaction à la lumière du soleil suivie d'éruptions cutanées
Ulcérations orales	Présence de plaies au niveau de la bouche
Arthrites	Douleurs articulaires, gonflement d'au moins 2 articulations
Sérites	Inflammation des membranes tapissant les parois des cavités thoraciques et cardiaques, accompagnée de douleurs thoraciques
Atteinte rénale	Présence persistante de protéines dans les urines
Atteinte neurologique	Convulsions ou psychose
Atteinte hématologique	Anémie, leucopénie, lymphopénie, thrombopénie
Désordre immunologique	Présence d'Ac anti-ADNdb, anti-Sm ou anti-phospholipides
Anticorps anti-nucléaires	Présence d'Ac anti-nucléaires à des taux anormaux

Tableau 1. Critères de l'ACR pour le diagnostic du LED.

Ac anti-ADNdb : Anticorps anti-ADN double brin; Ac anti-Sm : Anticorps anti-Smith

II. Epidémiologie du LED

Le LED est considérée comme une maladie rare en France. En effet, sa prévalence en 2010 était de 47 cas pour 100 000 habitants et son incidence de 3.32 cas pour 100 000 habitants par an. Parmi les patients atteints de LED en France, 88% sont des femmes, le plus souvent en âge de procréer, à savoir entre 15 et 40 ans (**Arnaud et al., 2014**). L'incidence et la prévalence varient également selon les populations étudiées. En effet, les populations afro-américaines et caribéennes ont une prévalence importante (jusqu'à 150 cas pour 100 000 habitants) alors que les populations asiatiques présentent une prévalence plus faible (20 cas pour 100 000 habitants en Chine) (**Borchers et al., 2010**).

III. Les symptômes lupiques

Le LED étant une pathologie systémique, le spectre de manifestations cliniques est très large. L'atteinte rénale est l'une des plus sérieuses complications observée chez les patients lupiques. En effet, la présence de néphrites, retrouvée chez environ 40% des patients lupiques, aboutit très souvent à une dysfonction totale du rein (**Hanly et al., 2016**). Les atteintes les plus fréquemment observées sont les atteintes cutanées, sous forme de plaques rouges sur la peau, au niveau des zones exposées au soleil comme le visage, les bras ou le cuir chevelu. Les patients atteints d'un LED souffrent également régulièrement d'arthrites, se traduisant par une raideur et un gonflement au niveau des articulations, provoquant de vives douleurs. Les différentes atteintes pulmonaires, du système digestif, du cœur ou du système nerveux central observées chez les patients lupiques traduisent bien l'hétérogénéité de cette pathologie (**La Paglia et al., 2017**).

De plus, le LED est une pathologie chronique, caractérisée par l'alternance de phases de crises, où les manifestations cliniques sont les plus importantes, et de phases de quiescence, qui sont asymptomatiques. Afin d'évaluer l'intensité de la maladie, les cliniciens utilisent un score d'activité appelé SLEDAI (« Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index »). Chaque symptôme observé chez le patient lupique correspond à une valeur, allant de 1 à 8 selon la gravité du symptôme. Le SLEDAI est alors calculé en cumulant l'ensemble des différentes valeurs relevées le jour de la consultation (**Bombardier et al., 1992**) (*Tableau 2*). Les patients présentant une forte activité, atteignant un score supérieur ou égal à 6 peuvent ainsi être discriminés des patients présentant une faible activité, dont le score est inférieur à 6. Par ailleurs, d'autres scores d'activité sont utilisés en clinique afin de définir la sévérité (SLAM), l'activité en fonction des traitements (BILAG) ou la chronicité de la maladie (SLICC).

Les variations d'incidences et la diversité des manifestations cliniques du LED peuvent s'expliquer par la variété de facteurs génétiques, environnementaux, sociodémographiques et socioculturels impliqués dans le développement de la pathologie.

VALEUR	MANIFESTATIONS
8	Convulsion
8	Psychose
8	Atteinte cérébrale
8	Troubles visuels
8	Nerfs crâniens
8	Céphalées
8	Arrêt Vasculaire Cérébral
8	Vascularite
4	Arthrites
4	Myosite
4	Cylindres urinaires
4	Hématurie
4	Protéinurie
4	Pyurie
2	Alopécie
2	Ulcères muqueux
2	Pleurésie
2	Péricardite
2	Complément
2	Ac anti-ADN
1	Fièvre
1	Thrombopénie
1	Leucopénie

Tableau 2. Indice d'activité du LED, méthode de calcul du SLEDAI.

Lors du diagnostic, le calcul du SLEDAI (« Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index ») permet d'évaluer l'activité de la maladie lupique. Les manifestations décrites sont prises en compte si elles sont présentes le jour de la consultation ou dans les 10 jours précédents. Les scores peuvent varier de 0 à 105, les patients étant considérés comme présentant un lupus actif lorsque le score dépasse 6.

IV. L'étiologie du lupus

1. Facteurs génétiques

La forte prévalence féminine décrite dans le LED suggère que l'initiation et le développement de cette pathologie sont soumis à des prédispositions hormonales et génétiques. Cette hypothèse est soutenue par la forte prévalence familiale qui est observée, avec une héritabilité estimée à 44%. Le risque de développer le LED ainsi que d'autres maladies auto-immunes est augmenté dans les familles possédant un membre atteint de lupus (**Kuo et al., 2015**). Cette observation est confirmée par l'augmentation de ces risques entre jumeaux monozygotes (24-56%) contre 2-5% pour des jumeaux dizygotes (**Deapen et al., 1992**). Bien que dans l'ensemble, le LED soit décrit comme une maladie multigénique, un défaut dans un seul gène peut, dans de rares cas, être à l'origine du développement de la pathologie (**Lo, 2016**). Récemment, des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (TREX1), dans la détection de l'ADN (STING), dans l'apoptose (FASLG), ou dans la clairance de l'ADN (DNASE1L3) se sont ajoutés à la liste des désordres monogéniques associés au LED, liste parmi laquelle on retrouve de nombreux composants de la voie du complément (C1q, C4...) (**Tsokos and Kammer, 2000**). Toutefois, le

développement de la pathologie résulte le plus souvent d'une combinaison de modifications affectant plusieurs gènes, appelés gènes de susceptibilité (*Figure 1*). Grâce à l'émergence des techniques de séquençage à haut débit et aux études d'association à l'échelle du génome, un nombre important de gènes de susceptibilité du lupus ont été mis en évidence. En effet, ces études permettent d'identifier des mutations ponctuelles appelées polymorphismes nucléotidiques (SNPs), correspondant à la modification d'un nucléotide entre le génome d'un individu sain et celui d'une personne malade. La majorité de ces polymorphismes sont retrouvés dans des régions non codantes régulant l'expression de gènes impliqués dans des fonctions du système immunitaire très variables. Parmi ces gènes, nous retrouvons des gènes clés des voies de signalisation des interférons (IFN) (IRF5, IRF7, STAT4), des gènes codant pour les « Toll-like receptors » (TLR7, TLR8, TLR9), des gènes engagés dans la fonctionnalité des lymphocytes T (LT) (PTPN22, Interleukine- (IL)-10, CD3 ζ), des lymphocytes B (LB) (BLK, LYN) ainsi que de nombreux autres gènes, soulignant ainsi le rôle du système immunitaire inné et adaptatif dans le développement de cette pathologie (**Moulton et al., 2017; Teruel and Alarcón-Riquelme, 2016**).

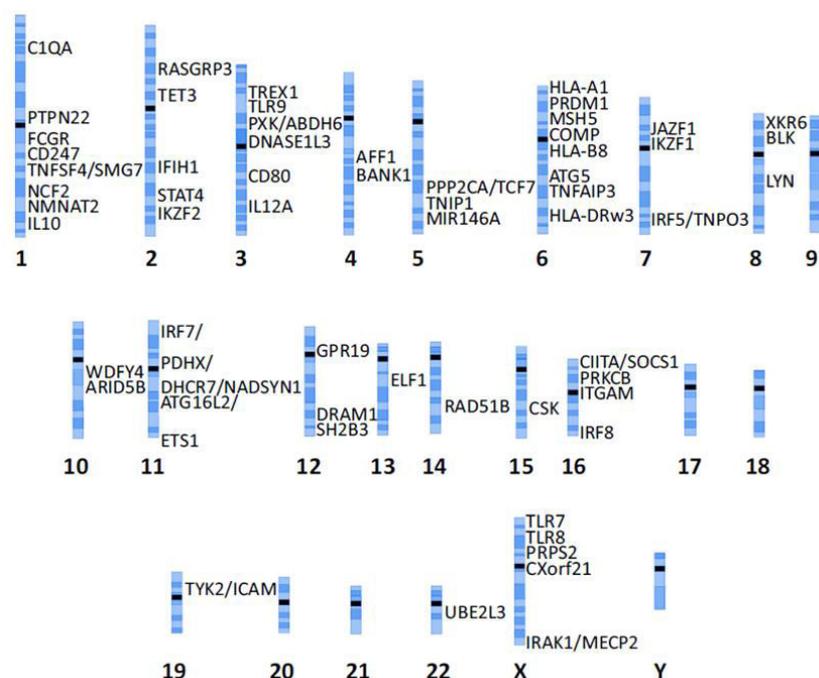


Figure 1. Les gènes de susceptibilité du LED (d'après Moulton et al. *Trends in Mol Med*, 2017)
Cartographie schématique des principaux gènes de susceptibilité impliqués dans le développement du lupus.

La compréhension de l'influence génétique sur le développement du LED est en constante progression. En effet, avec l'arrivée de nouvelles technologies comme le séquençage nouvelle génération, également appelé séquençage aléatoire du génome entier ou « RNA-seq », de nouveaux locis associés au lupus ont été mis en lumière (**Odhams et al., 2017**). Ces nouveaux systèmes d'analyse ont permis

l'identification de nouveaux gènes de susceptibilités tels NADSYN1 (codant pour la « Nicotinamide Adenine Dinucleotide SYNthétase ») ou TCF7 (codant pour un membre de la famille des « T-Cell Factor/lymphoid enhancer-binding factor family of high mobility group (HMG) box transcriptional activators »), et de protéines tronquées, résultats d'épissage alternatif, comme le facteur de transcription IKZF2, spécifique des cellules T régulatrices (Tregs), par exemple. Ces nouvelles technologies permettent d'améliorer la compréhension de l'influence génétique sur le développement du LED et donne l'espoir de développer des traitements adaptés à chaque patient, selon son profil génétique.

Comme énoncé précédemment, le LED touche particulièrement les femmes (dans 90% des cas). Ceci peut s'expliquer en partie par l'influence importante du chromosome X dans cette pathologie. En effet, de nombreux gènes contribuant à la pathogénèse du LED se trouvent sur le chromosome X, comme CD40 ou les gènes codant pour les TLR 7 et 8. En 1977, Kast *et al.* ont été les premiers à suggérer que le phénomène appelé inactivation du chromosome X peut jouer un rôle dans la forte prévalence féminine dans le LED (**Kast, 1977**). Ce phénomène permet aux individus de sexe féminin, présentant deux copies du chromosome X, de n'exprimer qu'une moitié de leurs gènes. En 1998, il est proposé que des jumeaux monozygotes ne développent pas la maladie de manière similaire car le mécanisme d'inactivation du chromosome X diffère entre les deux individus (**Stewart, 1998**). Cependant, les preuves directes d'un défaut d'inactivation du chromosome X chez les patientes lupiques restent à démontrer. L'hypothèse de l'importance du chromosome X dans la pathogénèse du lupus est cependant soutenue par une étude dans laquelle des souris mâles manipulées génétiquement pour exprimer les versions chromosomiques XX, X0, ou XXY présentent une augmentation de la sévérité de la pathologie lupique (**Smith-Bouvier et al., 2008**).

Bien que le nombre de gènes de susceptibilité associés au LED soit important, la génétique ne peut être considérée comme seule responsable du développement de cette pathologie. La méthylation de l'ADN, des modifications post-traductionnelles au niveau des histones ou certains ARN non codants sont autant de processus épigénétiques associés au LED. Les phénomènes de méthylation et de déméthylation de l'ADN sont des mécanismes permettant de réguler la transcription des gènes. Il a été décrit que des gènes associés au LED sont spontanément hypométhylés dans les LT CD4⁺ et LB de patients lupiques, aboutissant à une surexpression de gènes tels que CD70, CD40L, ou CD11A (**Zhang et al., 2013**). Concernant ce dernier gène, codant pour LFA-1 (« Lymphocyte Function-Associated antigen-1 »), il a été démontré qu'une déméthylation de son promoteur est à l'origine de la surexpression de cette intégrine, et que cette expression est corrélée avec l'activité de la maladie (**Lu et al., 2002**). Récemment, des analyses de méthylation de l'ADN à l'échelle du génome ont mis en lumière une hypométhylation de plusieurs gènes régulés par les interférons chez les patients lupiques,

expliquant la surexpression d'IRF7 par exemple (**Absher et al., 2013; Coit et al., 2013**). Ces études démontrent que l'hypométhylation de l'ADN est un mécanisme impliqué dans la pathogénèse du LED et représente donc une potentielle cible thérapeutique.

Certaines modifications des histones peuvent également être associées au lupus. En effet, une hypoacétylation des histones H3 et H4 a été décrite dans des cellules spléniques de souris lupiques $MRL^{lpr/lpr}$ (**Garcia et al., 2005**) et dans des LT CD4⁺ de patients (**Hu et al., 2008**). De plus, un exemple de l'importance de ces modifications sur le développement du lupus concerne le défaut fonctionnel de CREM α , le facteur de transcription responsable du recrutement de HDAC-1 (Histone Deacetylase 1) au niveau du promoteur du gène codant pour l'IL-17, dans les LT CD4⁺ de patients lupiques. Cette altération conduit à une augmentation de l'expression de cette cytokine, associée au développement de la pathologie (**Rauen et al., 2011**).

D'autre part, l'expression de gènes peut être régulée au niveau post-transcriptionnel par des petits ARN non codants appelés micro-ARNs (miRNAs). Une expression altérée de certains miRNAs a été reportée chez les patients lupiques. Par exemple, il a été décrit que l'expression de miR-155 est réduite dans les PBMCs de patients lupiques juvéniles (**Lashine et al., 2015**). Il est important de noter que miR-155 est impliqué dans la régulation de la différenciation et la fonction de nombreuses cellules immunitaires, notamment en régulant positivement PP2A, phosphatase inhibitrice de la production d'IL-2. Il a été montré que l'expression de miR-155 est corrélée négativement avec le score d'activité de la maladie lupique. Par ailleurs, la diminution de l'expression de miR-155 dans les PBMCs est responsable d'une augmentation de l'expression de PP2A et d'une réduction de la production d'IL-2 (**Lashine et al., 2015**). L'expression d'un autre miRNA, miR-146a, qui régule négativement l'expression des IFN α et β , est également inversement corrélée au score d'activité de la maladie, et participe à la « signature interféron » observée chez les patients lupiques (**Tang et al., 2009**).

Ces exemples montrent l'importance des modifications épigénétiques dans le LED et sont autant de pistes à suivre dans l'élaboration future de stratégies thérapeutiques.

En résumé, ces données soulignent l'importance des prédispositions génétiques dans le développement de la maladie lupique. Cependant, les modifications épigénétiques, étant bien souvent influencées par des facteurs environnementaux, prouvent que ce n'est qu'avec la contribution d'autres facteurs que cette empreinte génétique va contribuer au déclenchement de la pathologie.

2. Les facteurs environnementaux

En 2010, des experts du NIEHS (« National Institute of Environmental Health Sciences ») ont été chargés de définir une liste des facteurs environnementaux impliqués dans les maladies auto-immunes **(Miller et al., 2012)**. Ceux dont le rôle est établi dans le LED sont présentés ci-après.

a. Régime alimentaire

Quelques études ont fait état d'une influence du régime alimentaire sur l'auto-immunité et particulièrement sur le phénomène inflammatoire observé chez les patients lupiques. Il a été montré qu'un régime relativement faible en protéines mais riche en vitamines, en antioxydants et en acides gras insaturés confère un effet protecteur contre la dégradation tissulaire et l'activité inflammatoire **(Klack et al., 2012)**. Ces études suggèrent que ces recommandations concernant le régime alimentaire permettraient d'offrir une meilleure qualité de vie aux patients atteints d'un LED. De plus, il est désormais établi que le régime alimentaire induit des modifications épigénétiques. Strickland *et al.* ont confirmé dans un modèle murin que certains nutriments affectent la méthylation de l'ADN, modulant ainsi la pathologie lupique et la sévérité de ses symptômes **(Strickland et al., 2013)**.

b. Exposition à la silice

Plusieurs études ont décrit une association positive entre le développement du LED et l'exposition à la silice dans des populations européennes et nord-américaines **(Cooper et al., 2010; Finckh et al., 2006)**. L'exposition à des particules de silice touche le plus souvent des personnes habitant des régions minières ou d'extraction de matières premières. Il a été démontré que les facteurs de risque augmentent lors d'exposition prolongée à la silice. En effet, un ratio de risque a été établi par le NIEHS et celui-ci passe de 1.6 dans des populations non exposées à la silice, à plus de 10 lorsque les populations sont en contact permanent avec la silice **(Miller et al., 2012)**.

c. Fumée de cigarette

Les évidences liant le tabagisme et le développement du LED sont multiples. En effet, le risque de développer la maladie est légèrement augmenté chez les fumeurs par rapport aux non-fumeurs **(Costenbader et al., 2004)**. De plus, ce phénomène semble être maintenu dans le temps, car même après l'arrêt de la cigarette, les risques sont plus importants par rapport aux personnes n'ayant jamais fumé **(Ekblom-Kullberg et al., 2013)**. Le tabagisme semble également jouer un rôle sur les symptômes de la maladie lupique. En effet, les patients fumeurs développent des atteintes cutanées particulièrement sévères telles que des rashes discoïdes ou une photosensibilité importante, par rapport aux non-fumeurs **(Bourré-Tessier et al., 2013)**. Différents mécanismes peuvent expliquer le lien entre tabac et lupus. Les radicaux libres présents dans la fumée, par exemple, interagissent avec

l'ADN, entraînant des mutations et des modifications épigénétiques. D'autre part, certains produits contenus dans le tabac favorisent le développement des LB auto-réactifs, la production d'IgE ainsi que la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (**Arnson et al., 2010**). De plus, une étude menée sur une population japonaise a démontré que l'exposition aux espèces réactives de l'oxygène induite par la cigarette, associée à certains polymorphismes, contribue au développement de la pathologie lupique (**Kiyohara et al., 2012**).

d. Les infections virales

Bien qu'il n'existe pas de preuves directes, de nombreux arguments supportent l'hypothèse d'un développement du LED suite à une infection virale (**Caza et al., 2014**). L'agent infectieux le plus souvent associé au lupus est le virus d'Epstein-Barr (EBV). En effet, il est décrit que des patients infectés à plusieurs reprises par EBV présentent un risque élevé de développer un lupus (**Parks et al., 2005**). Le mécanisme proposé pour expliquer ce lien est la forte homologie de structure entre EBNA-1 (« EBV-nuclear antigen 1 ») et l'antigène Ro, et plus particulièrement sa sous-unité p60. La protéine Ro contient de nombreux épitopes reconnus fréquemment par les auto-Ac chez les patients lupiques (40% des patients sont séropositifs pour les auto-Ac anti-Ro). Par mimétisme moléculaire, les anticorps générés contre EBNA-1 lors d'une infection peuvent alors reconnaître la sous-unité p60 de Ro (**McClain et al., 2005**). De plus, de nombreux gènes de susceptibilité associés au lupus jouent un rôle dans la réplication d'EBV et dans sa capacité à échapper au système immunitaire. Cette observation souligne l'importance de l'interaction entre facteurs environnementaux et génétiques dans le développement du LED (**Vaughn et al., 2012**).

e. Pollution

Certains agents polluants tels que les pesticides ou les polluants organiques persistants sont suspectés comme étant des facteurs de risques pour le LED. En effet, des souris (NZBxNZW)F1 ou « NZB/W », développant spontanément un lupus, qui ont été exposées aux pesticides présentent une aggravation de la maladie (**Wang et al., 2007a**). Cependant, malgré une augmentation de la mortalité des patients atteints d'une maladie auto-immune systémique parmi les agriculteurs (**Gold et al., 2007**), les évidences liant directement l'exposition aux pesticides et le LED sont insuffisantes chez l'Homme. Les polluants organiques deviennent de plus en plus communs dans l'environnement et leurs effets sur l'Homme et le système immunitaire restent encore à définir. Toutefois, il a été décrit que des molécules synthétiques appelées polychlorobiphényles (PCBs), ont été retrouvées dans de l'huile de riz contaminée à Taiwan. Au sein de cette population, la mortalité associée au lupus est augmentée chez les personnes ayant été contaminées aux PCBs (**Tsai et al., 2007**).

f. Exposition aux ultraviolets

Les ultraviolets (UV) sont connus comme étant un facteur environnemental contribuant à l'aggravation de la maladie lupique. Il est même suggéré que l'exposition aux UV serait un des facteurs principaux dans le déclenchement de la pathologie. Les rayons UV jouent un rôle important dans le LED, en agissant via plusieurs mécanismes. En effet, une exposition aux UV est à l'origine de nombreuses modifications moléculaires en stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6 ou le TNF α (**Wlaschek et al., 1994; Zandman-Goddard et al., 2012**). Par ailleurs, les UV-B ont été décrits comme des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN, favorisant ainsi une augmentation de l'activité de la maladie lupique chez l'Homme (**Wang et al., 2009**). Enfin, l'exposition aux UV se retrouve à l'origine de la production de la vitamine D. Le rôle de la vitamine D dans le lupus est controversé. Plusieurs études ont démontré que le niveau de vitamine D est plus faible chez les patients lupiques (**Amital et al., 2010; Kamen et al., 2006**), cependant les faibles taux de vitamine D chez les patients ne sont pas associés à l'activité de la maladie (**Kim et al., 2011; Müller et al., 1995**). Il semble à l'heure actuelle difficile de définir si la diminution de la production de vitamine D représente une cause ou une conséquence du LED.

g. Médicaments

Le procainamide, un anti-arythmique utilisé dans le traitement médical des arythmies cardiaques, et l'hydralazine, un relaxant musculaire traitant l'hypertension artérielle, ont été identifiés comme étant des acteurs favorisant le développement du LED (**Yung et al., 1997**). En effet, ces molécules induisent une augmentation de l'expression de LFA-1 (« Lymphocyte Function-Associated Antigen 1 »), favorisant l'auto-réactivité des cellules T. Plus récemment il a été décrit que d'autres molécules, comme les inhibiteurs du TNF α ou la minocycline, un antibiotique à spectre large, sont capables d'induire le développement du LED. Le lupus induit par les médicaments diffère du LED dans ses manifestations cliniques. En effet, les lésions au niveau des organes sont moins sévères, les reins et le système nerveux central sont en général peu affectés. Il n'y a que dans le cas des inhibiteurs du TNF α que l'on peut observer une atteinte rénale. Les symptômes les plus fréquemment retrouvés sont des atteintes cutanées telles que le purpura et des érythèmes (**Ho et Chauhan, 2017**).

h. Hormones

Le ratio impressionnant de femmes affectées par un lupus par rapport aux hommes (ratio de 9 femmes pour 1 homme) démontre l'importance du genre dans la pathologie. De plus, la prévalence est maximale pour les femmes en âge de procréer, suggérant un rôle crucial des hormones féminines et principalement des œstrogènes, mais également de la progestérone ou des prolactines. Afin de confirmer ces observations, des ovariectomies ont été réalisées chez des souris développant le LED.

L'absence d'ovaires chez ces souris a pour conséquence de limiter le développement de la pathologie (**McCombe et al., 2009**). A l'inverse, l'administration d'œstrogènes à des souris mâles NZB/W induit la production d'auto-Ac et le développement de néphrites (**González et al., 2010**). Mais comment les œstrogènes peuvent influencer le développement des pathologies auto-immunes, en particulier le LED ? Il a été proposé que les œstrogènes protègent les progéniteurs des LB dans la moelle osseuse en les prévenant de l'apoptose et favorisent la survie des LB en périphérie (**Grimaldi et al., 2002**). De plus, cette hormone oriente la réponse immunitaire vers la réponse humorale (**Beagley et Gockel, 2003**), favorise l'activation polyclonale des LB et induit la production d'auto-Ac (**Kanda et al., 1999**).

Le LED représente donc un modèle de maladie multifactorielle où la concomitance de prédispositions génétiques et de facteurs environnementaux entrent en jeu pour définir la sévérité de la pathologie chez un individu donné (*Figure 2*).

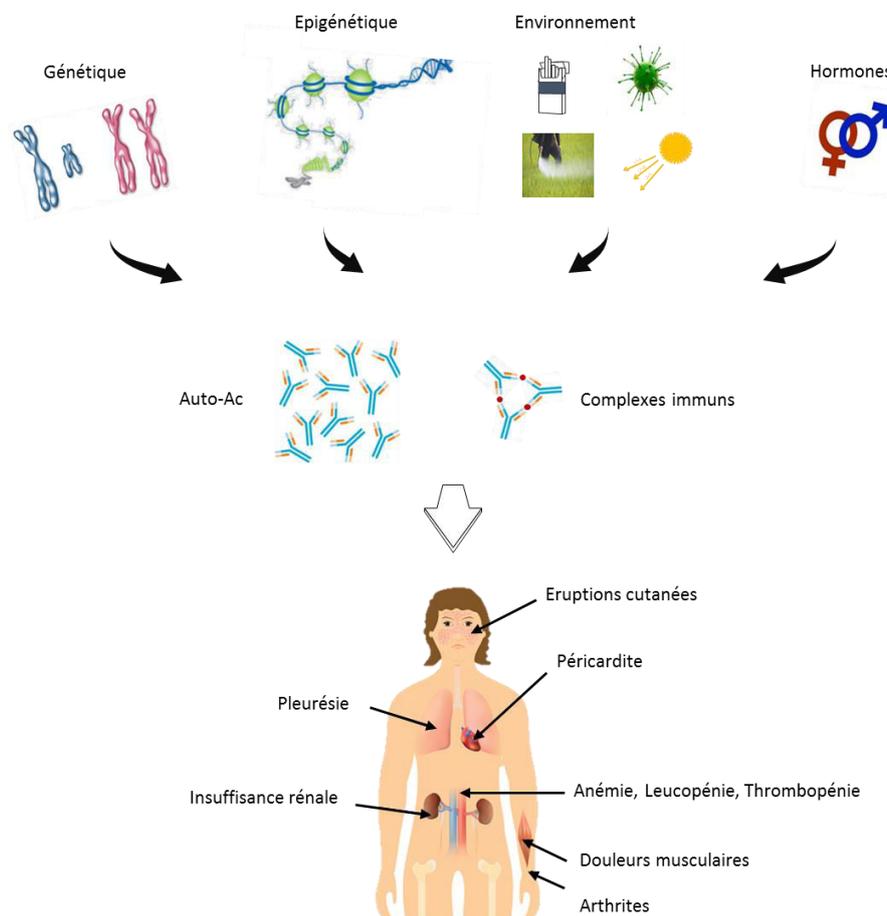


Figure 2. Le LED, une maladie multifactorielle.

Une combinaison de facteurs génétiques, épigénétiques, environnementaux et hormonaux se retrouvent à l'origine de la rupture de tolérance centrale et périphérique dans le LED. L'hyperactivation du système immunitaire qui en découle conduit à la production d'auto-Ac dont le dépôt sous forme de complexes immuns dans les organes cibles, déclenche une inflammation et provoque des lésions tissulaires. Les principaux symptômes observés sont une insuffisance rénale, traduite par la présence de protéines dans les urines, la présence d'éruptions cutanées et le développement d'arthrites.

V. Les manifestations biologiques et immunologiques du lupus

Outre les facteurs cités précédemment, la composante essentielle à la mise en place du LED est bien évidemment immunologique.

1. Le défaut de clairance apoptotique : un point de départ ?

Le LED est caractérisé par une rupture de tolérance conduisant à la production d'auto-Ac. L'un des processus central associé au développement de la pathologie est un défaut de clairance apoptotique. En effet, lors de l'apoptose, les antigènes nucléaires, normalement inaccessibles au système immunitaire, sont exposés dans les corps apoptotiques. Cette étape se retrouve à l'origine de la libération de molécules nucléaires endogènes, telles que l'ADN, les molécules du complexe du spliceosome ou les composants ribosomiques... L'ensemble de ces phénomènes va finalement aboutir à une activation anormale du système immunitaire adaptatif dirigée contre des composants du soi, caractérisée par la production d'auto-Ac pathogènes. Cette description démontre que les systèmes immunitaires inné et adaptatif collaborent et participent en synergie à la pathogénèse du lupus.

2. Rôle de l'immunité innée

a. L'apoptose

L'apoptose est un phénomène de mort cellulaire programmée, participant à l'homéostasie tissulaire. Dans tout organisme vivant, plusieurs millions de cellules meurent quotidiennement et il est important que les débris, ainsi que les cellules endommagées ou mortes soient rapidement éliminées. En réponse à un signal déclenchant l'apoptose, des enzymes appelées caspases sont activées et vont enclencher le processus en provoquant dans un premier temps une condensation des organelles au sein des cellules sous forme de bourgeons. Ces bourgeonnements de membrane contiennent du matériel intracellulaire, notamment nucléaire. Ceci conduit dans un second temps à la formation de corps apoptotiques phagocytibles (**Elmore, 2007**). En condition physiologique, ces débris apoptotiques sont rapidement et efficacement éliminés par le système immunitaire. C'est lors de cette étape-clé que les différents facteurs génétiques et environnementaux entrent en jeu chez les patients lupiques. En effet, les rayons UV, les infections ou la fumée de cigarette par exemple, favorisent la mort cellulaire et participent au maintien de ces débris apoptotiques dans les tissus. Cette persistance des corps apoptotiques stimule la réponse inflammatoire, activant notamment les récepteurs de l'immunité innée comme les TLRs, et induit une forte production d'IFN de type I (*Figure 3*).

Les évidences suggérant un défaut de clairance apoptotique dans le LED sont nombreuses. En effet, il a été reporté que l'activité phagocytaire des macrophages de patients lupiques est réduite (**Herrmann et al., 1998; Svensson, 1975**). De plus, les cellules souches hématopoïétiques de patients lupiques

présentent une faible capacité à se différencier en macrophages **(Muñoz et al., 2010)**. Enfin, le défaut de clairance apoptotique serait à l'origine d'une accumulation de matériel nucléaire dans les centres germinatifs (CG), d'où il est absent en condition physiologique, et de potentiels auto-Ag dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS) de patients lupiques **(Baumann et al., 2002)**, favorisant ainsi la génération de LB auto-réactifs et le développement de la pathologie.

b. La NETose

Les neutrophiles sont les principaux et les plus nombreux acteurs du système immunitaire inné. Ils s'accumulent rapidement dans les tissus afin de prévenir l'invasion d'agents pathogènes tels que les bactéries ou les champignons. De plus, les neutrophiles possèdent une capacité à phagocyter, à produire des cytokines ainsi qu'à former des NETs (« Neutrophils Extracellular Traps »). Ces NETs, découverts en 1996, sont des projections de matériel nucléaire (ADN, chromatine) relâchés suite à la décondensation de la chromatine **(Takei et al., 1996)**. Ce phénomène conduit à une forme de mort cellulaire appelée NETose **(Delgado-Rizo et al., 2017)**. L'exposition extracellulaire d'Ag nucléaire a rapidement indiqué la NETose, comme une potentielle source d'auto-Ag dans les maladies auto-immunes. Dans le LED, il a été démontré que des neutrophiles infiltrent les tissus inflammés comme la peau ou les reins de patients lupiques, et favorisent la rupture de tolérance en mourant par le phénomène de NETose **(Smith and Kaplan, 2015)**. De plus, les neutrophiles sont très sensibles aux forts taux d'IFN- α , produits par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) de patients lupiques activées par la présence de complexes immuns **(Blanco et al., 2001)**. De manière identique à l'apoptose, à la suite de la NETose, l'élimination des débris cellulaires est mise en place en condition physiologique. Pour ce faire, la DNase I, enzyme présente dans le sérum, est nécessaire afin d'éliminer efficacement les NETs. Une étude a démontré que ce mécanisme de clairance est défectueux chez les patients lupiques. En effet, certains patients présentent un taux sérique anormalement élevé d'inhibiteurs de DNase I, alors que pour un autre groupe de patients, la présence d'auto-Ac protège les NETs de la dégradation par la DNase I **(Hakkim et al., 2010)**.

En résumé, les NETs et les corps apoptotiques, en cas d'élimination défectueuse constituent des sources d'auto-Ag, favorisant ainsi la rupture de tolérance et l'activation de LB auto-réactifs **(Figure 3)**.

c. La signature IFN- α

L'IFN- α est une cytokine produite en réponse à un nombre important d'infections virales. Cette molécule est principalement produite par les pDCs **(Siegal et al., 1999)**. Des taux élevés d'IFN- α dans le sérum de patients lupiques ont été mis en évidence pour la première fois en 1982 par Preble *et al.* **(Preble et al., 1982)**. Par la suite, il a été décrit que la présence de complexes immuns active les pDCs, et induit une production excessive d'IFN- α par ces dernières **(Lövgren et al., 2004)**. La preuve de

l'implication de l'IFN- α dans le développement de la pathologie a été démontrée dans un modèle murin spontané de lupus, la souris NZB/W. En effet, des souris NZB/W traitées avec de l'IFN- α produisent rapidement (10 jours après le traitement) des auto-Ac anti-ADN et la survie de ces souris est fortement réduite, de par des glomérulonéphrites importantes notamment, par rapport aux souris NZB/W non traitées (**Mathian et al., 2005**). A l'inverse, des souris lupiques déficientes pour le récepteur aux IFN de type I vivent plus longtemps et présentent une réduction des marqueurs biologiques et cliniques de la maladie (**Santiago-Raber et al., 2003**). Chez l'Homme, des analyses comparatives du génome entier ont mis en évidence que sur 47 variants génétiques associés au LED, 27 d'entre eux sont directement liés à la production ou à la signalisation de l'IFN- α (**Bronson et al., 2012**). De plus, il a été constaté que des patients atteints de certaines tumeurs ou présentant des infections hépatiques traités à l'aide d'IFN- α recombinant présentent un risque important de développer un LED (**Crow and Kirou, 2004**).

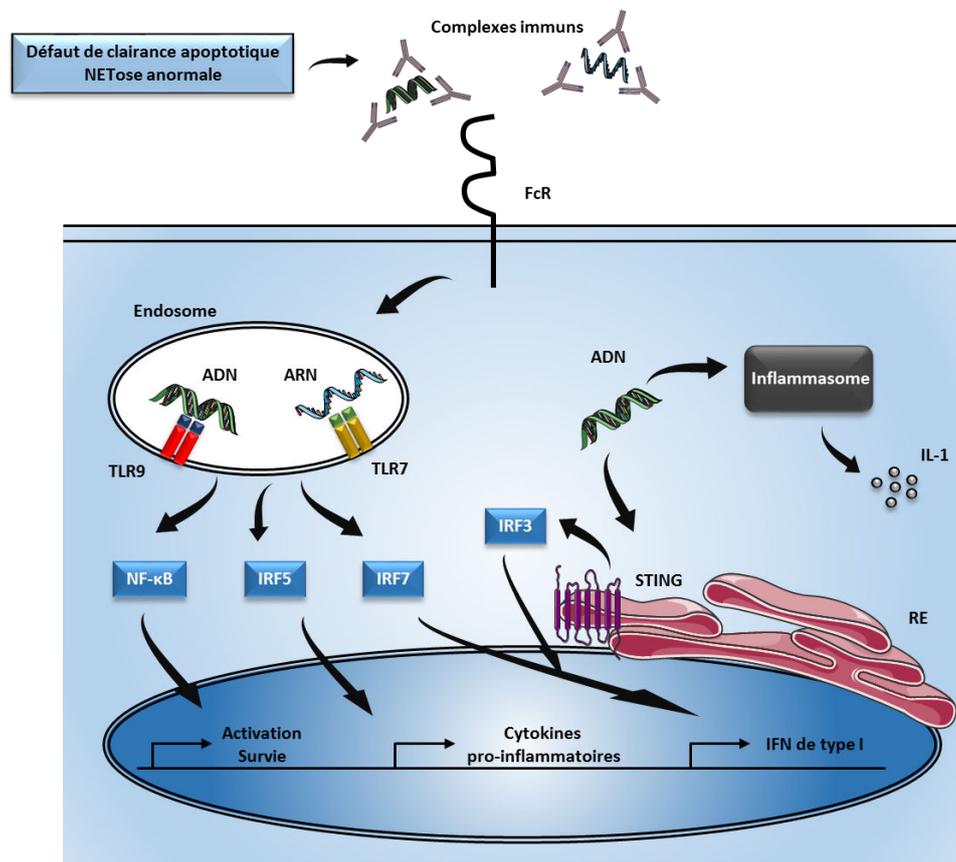


Figure 3. Le rôle de l'immunité innée dans le développement du LED (adapté de Liu *et al.*, 2012).

La reconnaissance d'acides nucléiques par les cellules du système immunitaire inné (pDCs principalement) est médiée par différents mécanismes. Le défaut de clairance des corps apoptotiques et des NETs contribue à la reconnaissance du matériel nucléaire par les auto-Ac. Les complexes immuns sont alors reconnus par les cellules du système inné exprimant les récepteurs au Fc des Ig (FcR). Les complexes immuns, ainsi que les débris apoptotiques phagocytés vont être reconnus par différentes molécules dont les TLRs, ou le complexe de l'inflammasome. Tous ces mécanismes favorisent la mise en place de la « signature IFN- α » observée dans le LED, ainsi qu'à la production de cytokines pro-inflammatoires. L'immunité innée initie les phénomènes inflammatoires et contribue également à activer le système immunitaire adaptatif.

Toutes ces observations confirment que des taux anormalement élevés d'IFN- α peuvent participer à une rupture de tolérance périphérique, et jouer un rôle important dans la génération d'auto-Ac pathogènes.

d. Les Toll-Like Receptors

Les TLRs sont des récepteurs, membranaires ou intracellulaires, appartenant au système immunitaire inné, reconnaissant des motifs particuliers présents à la surface de nombreux pathogènes, les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns). De par leur capacité à reconnaître des acides nucléiques endogènes, il a été démontré que les TLRs jouent un rôle important dans le développement du LED, aussi bien chez l'Homme (**Lech and Anders, 2013**) que dans des modèles murins (**Patole et al., 2007**) (*Figure 3*).

L'internalisation de complexes immuns contenant de l'ADN et de l'ARN activent respectivement la voie du TLR9 et du TLR7, se retrouvant ainsi à l'origine de la sécrétion d'IFN- α par les pDCs qui expriment ces deux récepteurs (**Sasai et al., 2010 ; Lau et al., 2005**). Cette observation est confirmée par l'augmentation de l'expression d'ARNm de TLR7 et TLR9 dans le sérum de patients lupiques par rapport aux individus sains, corrélée positivement à l'expression d'IFN- α chez ces patients (**Lyn-Cook et al., 2014**). L'implication du TLR7 dans le développement de la pathologie a été démontrée dans des souris lupiques BXSB possédant la mutation *Yaa* (« Y-linked autoimmune acceleration »). Ces souris possèdent plusieurs copies d'un nombre important de gènes, incluant le gène codant TLR7. La surexpression de TLR7 est d'ailleurs à l'origine du phénotype auto-immun observé chez ces souris (**Subramanian et al., 2006**), et une inhibition de la signalisation de TLR7 chez ces souris diminue la production d'auto-Ac (**Kono et al., 2009**). Cette observation a été confirmée dans d'autres modèles murins. En effet, des souris lupiques MRL^{lpr/lpr} déficientes pour le TLR7 présentent une amélioration des symptômes lupiques, une diminution de la production d'auto-Ac ainsi qu'une plus faible activation lymphocytaire (**Christensen et al., 2006**). Par ailleurs, la production d'IFN- α est dépendante du TLR7 dans un modèle de lupus induit par le pristane (**Lee et al., 2008**). Les données concernant l'implication du TLR9 sont plus controversées. En effet, bien que le TLR9 semble indispensable à la génération d'auto-Ac (**Christensen et al., 2005**), la délétion du TLR9 dans des modèles murins de lupus ne diminue pas le développement de la pathologie comme attendu, mais au contraire, accentue les symptômes (**Christensen et al., 2006**). Ces résultats suggèrent un rôle protecteur du TLR9 chez la souris. Un des mécanismes pouvant expliquer cet effet concerne la capacité du TLR9 à réduire la production d'auto-Ac anti-ARN dépendante du TLR7 (**Desnues et al., 2014; Nickerson et al., 2010**). Chez l'homme, les niveaux d'expression de TLR9 sont élevés sur de nombreux types cellulaires chez les patients lupiques, et corrélerent avec la production d'auto-Ac anti-ADN (**Papadimitraki et al., 2006**). Cependant, les LB et

les cellules dendritiques (DCs) de patients lupiques présentant une pathologie active sont hyposensibles à la stimulation du TLR9 via son ligand CpG-ODN (**Zorro et al., 2009**). Ces résultats démontrent que de plus amples études sont nécessaires afin de comprendre le rôle précis de TLR9 dans le développement du LED. Il est intéressant de noter que l'hydroxychloroquine, molécule très largement utilisée dans le traitement du lupus est un antagoniste des TLR7, 8 et 9, expliquant en partie l'efficacité de ce traitement sur l'amélioration des symptômes. TLR7 et TLR9 ne sont cependant pas les seuls TLRs à avoir été décrit pour leur implication dans le LED. En effet, les TLR 2, 3, 4, 5 et 8 jouent également un rôle dans la pathogénèse lupique, de manière directe comme le TLR8 reconnaissant les molécules d'ARN ou de manière indirecte, les autres TLRs étant impliqués dans la signature IFN- α via leur association avec la protéine adaptatrice MyD88 (**Wu et al., 2015**).

Au regard de ces études, il apparaît évident que le système immunitaire inné n'est pas uniquement à l'origine de l'inflammation décrite dans le LED, mais participe continuellement à l'activation du système immunitaire adaptatif, système parmi lequel on retrouve les effecteurs principaux de la pathologie.

3. Rôle du système immunitaire adaptatif

a. Le lupus : une maladie B

Les modèles murins de lupus et les patients lupiques présentent de profondes et sévères anomalies des LB, parmi lesquelles on retrouve une lymphopénie paradoxalement associée à une hyperactivité de ces cellules. Il est admis que les LB se retrouvent au centre de la pathogénèse du lupus de par leur capacité à produire des auto-Ac. En effet, la suppression des LB de souris NZB/W protège ces souris du développement du lupus (**Cerny et al., 1987**). De plus, le transfert de cellules B de souris NZB/W à des souris immunodéficientes SCID (« Severe Combined ImmunoDeficiency »), génère un syndrome lupique dans ce modèle (**Reininger et al., 1992**). Si les LB sont considérés comme essentiels dans le développement du LED, c'est par leur capacité à reconnaître des Ag du soi, via leur BCR. En condition physiologique, les LB auto-réactifs sont éliminés par différents processus, appelés mécanismes de tolérance. Deux phénomènes de tolérance au soi sont à distinguer : la tolérance centrale, prenant place dans la moelle osseuse et la tolérance périphérique, dans les OLS, plus particulièrement dans la rate. Dans la moelle osseuse, les cellules B immatures possédant une forte affinité pour les Ag du soi sont éliminées par délétion clonale, par anergie, ou en subissant un réarrangement de leur BCR (**Halverson et al., 2004**). Dans la rate, une sélection négative similaire à celle opérée dans la moelle osseuse permet d'éliminer les LB auto-réactifs ayant échappé à la tolérance centrale. Cette sélection est réalisée sur des cellules B au stade transitionnel (**Carsetti et al., 1995**). Dans la moelle osseuse, le principal mécanisme de tolérance est un réarrangement du BCR également appelé « editing ». Il a été

décrit que chez la souris MRL^{lpr/lpr}, cette capacité à réarranger le BCR des cellules B auto-réactives est réduite, favorisant la fuite des LB auto-réactifs en périphérie chez ces souris (**Lamoureux et al., 2007**).

Nous avons vu précédemment que de nombreux gènes de susceptibilité sont associés au LED. Parmi eux, sont retrouvés des allèles associés à la signalisation du BCR comme par exemple, BLK (« B Lymphocyte Kinase »), CSK (« C-terminal Src Kinase ») ou PTPN22 (« Protein Tyrosine Phosphatase N22 ») (**Suurmond et al., 2016**). Un défaut d'expression de ces gènes, à l'exception de PTPN22, conduit à une hypersensibilité du BCR ainsi qu'à une activation anormale des LB. Une altération de la signalisation de PTPN22, une tyrosine phosphatase, favorise la déphosphorylation des voies de signalisation associées au BCR, diminuant ainsi la tolérance centrale des LB immatures (**Arechiga et al., 2009**). Par ailleurs, il a été démontré que les kinases Syk et Btk, responsable de l'activation des voies de signalisation du BCR ainsi que des voies JAK/STAT, possèdent une activité anormalement élevée dans les LB de patients lupiques par rapport aux individus sains, contribuant ainsi à leur hyperactivation (**Iwata and Tanaka, 2016**). Récemment, il a été démontré qu'une régulation altérée de PTEN (« Phosphatase and TENsin homolog »), protéine régulant le BCR en inhibant son activité PI3K (« PhosphoInositide 3-Kinase »), contribue à l'hypersensibilité des LB chez les patients lupiques (**Wu et al., 2014**). Dans cette étude, l'équipe de Peter Lipsky a démontré que la régulation anormale de PTEN est due à une surexpression de microARNs comme le miR-7 chez les patients lupiques. Il en résulte une diminution de l'expression de PTEN, ce qui favorise l'activation des voies du BCR.

Le défaut de tolérance centrale devrait, en condition physiologique, être compensé par les mécanismes de tolérance périphérique. Cependant, chez les patients lupiques, une accumulation de LB auto-réactifs entre l'état transitionnel et l'état mature est observée par rapport aux individus sains (**Yurasov et al., 2005**). L'une des explications à ce maintien de LB auto-réactifs chez les patients est la présence anormalement élevée d'une cytokine de survie appelée BAFF ou B-Lys (« B-cell activating factor » ou « B Lymphocyte Stimulator »). Cette cytokine, de la famille des TNF, est spécialisée dans le maintien des LB périphériques lors du passage du stade transitionnel au stade mature. L'interaction de BAFF avec ses différents récepteurs, présents à la surface des LB, induit directement la phosphorylation de Syk et de ce fait, l'activation des voies associées au BCR (**Schweighoffer et al., 2013**). Toutefois, la production excessive de BAFF décrite chez les patients lupiques, n'est pas seulement à l'origine du maintien des LB périphériques. En effet, il a été démontré que cet événement favorise également la génération d'organes lymphoïdes tertiaires au sein de tissus tel que le rein, contribuant ainsi au développement de néphrites lupiques (**Kang et al., 2017**). Chez les patients lupiques, le profil d'expression de BAFF et de ses récepteurs est associé aux différentes classes de néphrites lupiques. En effet, de forts taux de BAFF sont mesurés au sein des glomérules de patients présentant des néphrites dans lesquelles on observe une forte prolifération (classes III et IV), alors que

son niveau d'expression est faible dans les néphrites de classe II (**Suso et al., 2017**). Tous ces résultats démontrent que BAFF joue un rôle crucial dans la tolérance périphérique, et qu'une surexpression de BAFF contribue au développement de l'auto-immunité. Un autre mécanisme de sélection a lieu en périphérie, sélection positive cette fois-ci. Dans les CG des OLS, les LB de faible affinité sont éliminés par apoptose. Chez les patients lupiques, de nombreuses cellules B auto-réactives sont retrouvées au sein des centres germinatifs, alors qu'elles sont exclues de ces structures chez les individus sains (**Cappione et al., 2005**). Il est important de noter que la sélection positive des LB est le dernier mécanisme de tolérance périphérique précédant la différenciation des LB en plasmocytes, cellules capables de produire les auto-Ac.

Un des paradoxes de la pathologie lupique est que les LB sont au centre de la pathologie, bien que leur fréquence soit fortement diminuée. En effet, la lymphopénie des LB est un phénomène fréquemment observé chez les patients lupiques, et ce, même en absence de traitements. De plus, les patients atteints d'une pathologie active présentent une profonde modification de la distribution des différentes sous-populations de LB. En effet, il a été décrit une augmentation de la fréquence des LB transitionnels ($CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$), mémoires switchés ($CD19^+CD27^+IgD^-$), mémoires double négatifs ($CD19^+CD27^-IgD^-$), des plasmablastes ($CD19^+CD27^{hi}IgD^{hi}$) et des plasmocytes ($CD19^{dim}CD27^{hi}CD138^+CD20^-$) (**Odendahl et al., 2000; Wei et al., 2007**). De plus, il a été décrit que certains LB transitionnels sécrétant de l'IL-10 présentent un défaut fonctionnel et n'exercent plus leurs fonctions régulatrices (**Blair et al., 2010**). La reconnaissance excessive des cellules apoptotiques, phénomène participant à la rupture de tolérance initiale, est principalement due à la présence dans le sérum de patients lupiques, d'Ac spécifiques de la pathologie, à savoir les Ac monoclonaux d'idiotype 9G4. Il a été démontré que la fréquence de LB 9G4⁺ est élevée chez les patients lupiques et corrèle avec l'activité de la maladie (**Isenberg et al., 1998**). Ces modifications associées à une hyperactivation des LB sont à l'origine de la production anormale d'auto-Ac par les LB auto-réactifs.

Les auto-Ac, produits par les plasmocytes, sont les principaux effecteurs de la pathologie lupique. En effet, ces molécules vont interagir avec les auto-Ag et former des complexes immuns. Ces complexes immuns peuvent se déposer dans les différents tissus et recruter les molécules du complément. Ces phénomènes vont alors promouvoir la mise en place d'un contexte inflammatoire et favoriser les lésions tissulaires observées dans différents organes (**Diamond et al., 2011**). Il est acquis que les auto-Ac sont principalement dirigés contre le matériel nucléaire dans le LED, cependant, leur spécificité est variée. Les auto-Ac dirigés contre l'ADN sont les Ac les plus fréquemment retrouvés chez les patients. En effet, 50 à 70% des patients lupiques possèdent des Ac anti-ADN double brin en circulation. La présence de ces Ac constitue même l'un des marqueurs les plus communément recherchés pour le diagnostic du LED (**Pisetsky, 2000**). D'autres auto-Ac ciblant la protéine Smith (Ac anti-Sm), les

ribonucléoprotéines (Ac anti-RNP), les protéines Ro et La (Ac anti-SSA ou –SSB) ou bien dirigés contre la protéine C1q du complément sont également caractéristiques de la pathologie (**Maddison et al., 1979; Mannik et al., 2003**). Il est intéressant de noter que tous les auto-Ac ne sont pas impliqués dans la mise en place d'un contexte inflammatoire. En effet, les auto-Ac ciblant la cardiolipine prédisposent les patients à la thrombose alors que certains auto-Ac anti-Ro participent à la mise en place du lupus néo-natal (**Tomer et al., 1993**).

L'ensemble de ces résultats décrivent un rôle central des LB dans le développement de la pathologie lupique, de la rupture de tolérance initiale à la production d'auto-Ac pathogènes.

b. Importance des LT dans la pathogénèse du lupus

La maladie lupique est souvent – à juste titre – considérée comme une « maladie B », de par la forte pathogénicité des auto-Ac. Cependant, un nombre important d'études ont prouvé que les LT jouent également un rôle prépondérant dans la pathologie, notamment en apportant l'aide nécessaire aux LB.

En déplaçant les LT totaux d'un modèle de souris lupique NZB/W, *Wofsy et al.* ont montré une amélioration de plusieurs symptômes cliniques et un prolongement de leur durée de vie (**Wofsy and Seaman, 1987**). De plus, par rapport aux individus sains, les LT isolés de patients lupiques présentent un phénotype anormal et une fonctionnalité altérée. En effet, le récepteur spécifique des LT, les voies de signalisation, la distribution des différentes sous-populations et leur réponse à la stimulation présentent des altérations chez les patients lupiques en comparaison des individus sains.

Le TCR est un complexe reconnaissant l'Ag présenté par le CMH présent à la surface de cellules présentatrices d'Ag. Le TCR est lui-même associé à la molécule CD3, qui contient une série de séquences pouvant être phosphorylées, permettant la transduction du signal après reconnaissance de l'Ag (**Bentley and Mariuzza, 1996**). La phosphorylation de ces séquences, appelées ITAM (« ImmunoTyrosine based Activation Motifs »), quelques instants après l'interaction TCR-peptide-CMH, active d'autres molécules considérées comme les premiers messagers de la voie du TCR telles que la chaîne ζ du TCR et ZAP-70 (« Zeta-chain-Associated Protein 70 ») (**Weiss and Littman, 1994**). Il existe un autre acteur essentiel dans l'activation du TCR suite à la reconnaissance de l'Ag par la cellule T : les radeaux lipidiques. Ce sont des microdomaines membranaires, riches en sphingolipides et en cholestérol, associés à de nombreuses molécules de signalisation telles que Lck (« Src family Lymphocyte kinase »), qui active la chaîne ζ du TCR, mais aussi LAT (« Linker of Activation in T cells »), qui active les voies de signalisation associées au TCR ou encore de nombreuses molécules de co-stimulation comme CTLA-4 (**Kabouridis and Jury, 2008; Krishnan et al., 2004**). Par ces différents mécanismes, la reconnaissance de l'Ag par le TCR active trois voies de signalisation distinctes : la voie

des MAP kinases qui a pour finalité d'activer le facteur de transcription AP-1, la voie NF- κ B et la voie calcique qui conduit à l'activation de NFAT (« Nuclear Factor of Activated T cells »). La résultante finale est la production d'IL-2 par les LT et leur activation en réponse à la reconnaissance de l'Ag (Figure 4).

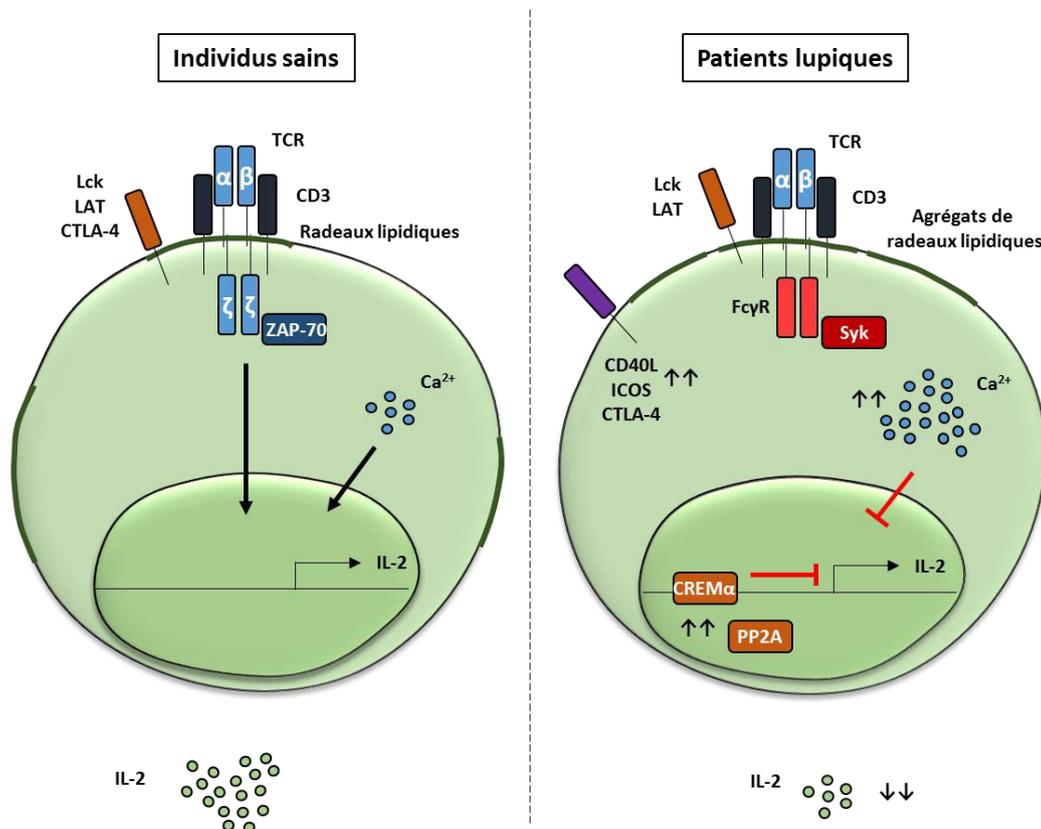


Figure 4. La voie de signalisation du TCR est altérée chez les patients lupiques (inspiré de Moulton *et al. Arthritis Research & Therapy*, 2011).

Lors d'une activation du TCR, les molécules activatrices telles que Lck et LAT, présentes dans les radeaux lipidiques sont recrutées à proximité du TCR. Ce recrutement déclenche la cascade de signalisation du TCR représentée par la chaîne ζ du TCR et ZAP-70. Cette activation accompagnée d'une augmentation des flux calciques intracellulaires activent différents facteurs de transcription conduisant à la production finale d'IL-2. Chez les patients lupiques, de nombreux mécanismes sont défectueux. Les radeaux lipidiques sont pré-agrégés, une expression anormale du Fc γ R induit le recrutement de Syk au TCR et les flux calciques sont augmentés. De plus, une dérégulation de l'expression de CREM α , facteur de transcription réprimant l'expression d'IL-2 est observée chez les patients lupiques. Tous ces mécanismes altérés contribuent à l'hyperactivation des LT, associée à une faible production d'IL-2.

Il a été décrit que les LT de patients lupiques présentent des modifications structurelles et fonctionnelles de leur TCR et des voies de signalisation associées à ce récepteur par rapport aux individus sains. La modification majeure est un remplacement de la chaîne ζ du TCR par son homologue, la chaîne γ du récepteur au Fc (Fc γ R) conduisant au recrutement de Syk (« Spleen Tyrosine Kinase ») à la place de ZAP-70. L'affinité de l'interaction Fc γ R-Syk est 100x plus forte que celle de la chaîne ζ du TCR-ZAP-70, augmentant l'intensité des signaux intracellulaires (Nambiar *et al.*, 2003a). Il en résulte un accroissement des flux calciques et une diminution de la production d'IL-2 par les LT

lipiques (**Nambiar et al., 2003b**). De plus, il a été décrit chez l'Homme et dans un modèle murin de lupus, que les radeaux lipidiques de patients atteints d'un LED sont pré-clusterisés, indiquant que les cellules T sont « préparées » à l'activation (**Deng and Tsokos, 2008; Jury et al., 2004**). De manière intéressante, il a été montré que CTLA-4, un récepteur co-inhibiteur contrôlant la formation des microdomaines, est exclu de ces entités et est de ce fait incapable d'assurer leur dissociation (**Jury et al., 2010**). Les agrégats de radeaux lipidiques jouent un rôle important dans l'état d'activation anormal observé dans les LT de patients lupiques. En effet, des LT cultivés *ex vivo* en présence de drogues dissociant les radeaux lipidiques (atorvastatine ou miglustat), présentent un profil d'activation comparable à celui observé chez les individus sains (**Jury et al., 2006; McDonald et al., 2014**). Enfin, l'expression de plusieurs molécules co-activatrices telles que CD40L et ICOS (« Inducible T Cell COStimulator ») est augmentée à la surface des LT CD4⁺ de patients lupiques par rapport aux individus sains, favorisant ainsi l'hyperactivation de ces cellules (**Kow and Mak, 2013; Kyttaris et al., 2007**) (*Figure 4*).

Il est important de noter qu'en plus d'une forte perturbation des propriétés intrinsèques des LT de patients lupiques, la distribution des différentes sous-populations de LT CD4⁺ peut également se retrouver profondément modifiée. En effet, on retrouve chez les patients présentant un lupus actif une augmentation de la fréquence des T_H17 qui est associée à une diminution de la fréquence des Tregs (**Koga et al., 2017**). Cette altération de la balance T_H17/Tregs peut expliquer l'augmentation de la production d'IL-17 par les cellules T_H17, production inversement corrélée à la production d'IL-2 (**Laurence et al., 2007**). Cette faible production d'IL-2 chez les patients contribue à la diminution de la fréquence et de l'activité suppressive des Tregs chez les patients lupiques. Deux études ont récemment apporté plus de précisions sur la dérégulation de la balance T_H17-Tregs. En effet, il a été décrit dans un modèle murin de lupus qu'une diminution de l'expression de miR-200a-3p est impliquée dans la diminution de la production d'IL-2 en ciblant CtBP2 (« C-terminal Binding Protein 2 ») (**Katsuyama et al., 2017**). Chez l'Homme, il a été démontré que l'activité de la serine/thréonine phosphatase PP2A est fortement augmentée au sein des LT de patients lupiques, augmentant ainsi l'expression de CREM α (« cAMP Response Element Modulator-alpha »), qui limite la production d'IL-2 et favorise la production d'IL-17 (**Kyttaris et al., 2006; Sharabi et al., 2017**).

Bien qu'il existe plusieurs études décrivant l'implication des Tregs dans des modèles murins (Chavele Ehrenstein 2011 FEBS Letter), les données disponibles pour l'Homme sont plus réduites. Dans un premier temps, plusieurs équipes ont démontré une diminution du nombre de Tregs chez l'Homme par rapport aux individus sains (**Lyssuk et al., 2007; Scalapino et al., 2006**). Cependant, l'analyse de la fonctionnalité des Tregs dans le LED a démontré des résultats contradictoires. L'implication des Tregs dans le développement du LED sera discutée dans la *partie B. III. 1*.

D'autres populations de LT présentent une modification de leurs fonctions chez les patients lupiques. Les cellules T folliculaires auxiliaires (T_{FH}), en aidant les LB à se différencier, semblent jouer un rôle dans le développement de la pathologie (cf. *Partie B*). Par ailleurs, plusieurs études ont étudié l'implication des LT CD8⁺ chez les patients lupiques. Il apparaît que la fréquence des LT CD8⁺ activés est augmentée chez les patients lupiques et corrèle avec l'activité de la maladie (**Blanco et al., 2005**). Cette augmentation concerne principalement les LT CD8⁺ mémoires exprimant faiblement le récepteur à l'IL-7 (**Kim et al., 2012**). Une population particulière de LT CD8⁺, possédant des fonctions suppressives (cf. *Partie B*), appelés LT CD8⁺ régulateurs, possèdent également des capacités inhibitrices réduites chez les patients lupiques (**Filaci et al., 2001**). Cette altération des fonctions suppressives chez les patients lupiques a été confirmée par une étude qui met en évidence des LT CD8⁺ régulateurs n'exprimant pas CD28, sécrétant du TGF-β et de l'IL-10. Ces cellules possèdent une capacité réduite à inhiber l'activation des T_H, ce qui favorise leur hyperactivation (**Tulunay et al., 2008**).

En résumé, les combinaisons extrêmement complexes des facteurs prédisposant à la mise en place du processus pathologique associées à des anomalies phénotypiques et fonctionnelles du système immunitaire, inné et adaptatif, participent en synergie au développement du LED (*Figure 5*).

VI. Les traitements du lupus

L'hétérogénéité de la pathologie du LED rend cette maladie particulièrement compliquée à traiter. La recherche de traitements spécifiques et l'amélioration de la qualité de vie des patients représentent des challenges particulièrement excitants.

1. Les traitements actuels

La première ligne de traitement du LED est une phase de prévention. En effet, en diminuant les facteurs de risque, comme le tabac par exemple, il est possible de prévenir les risques de déclencher une poussée de symptômes lupiques. Afin de traiter le lupus, historiquement, les cliniciens utilisent des molécules réduisant l'inflammation et des traitements immunosuppresseurs. Ces thérapies sont peu spécifiques et leur large spectre d'action est à l'origine de nombreux effets secondaires (**Davis and Reimold, 2017**). Parmi ces traitements sont retrouvés des traitements anti-inflammatoires (stéroïdiens ou non), des immunosuppresseurs, des immunomodulateurs et depuis quelques années, des biothérapies :

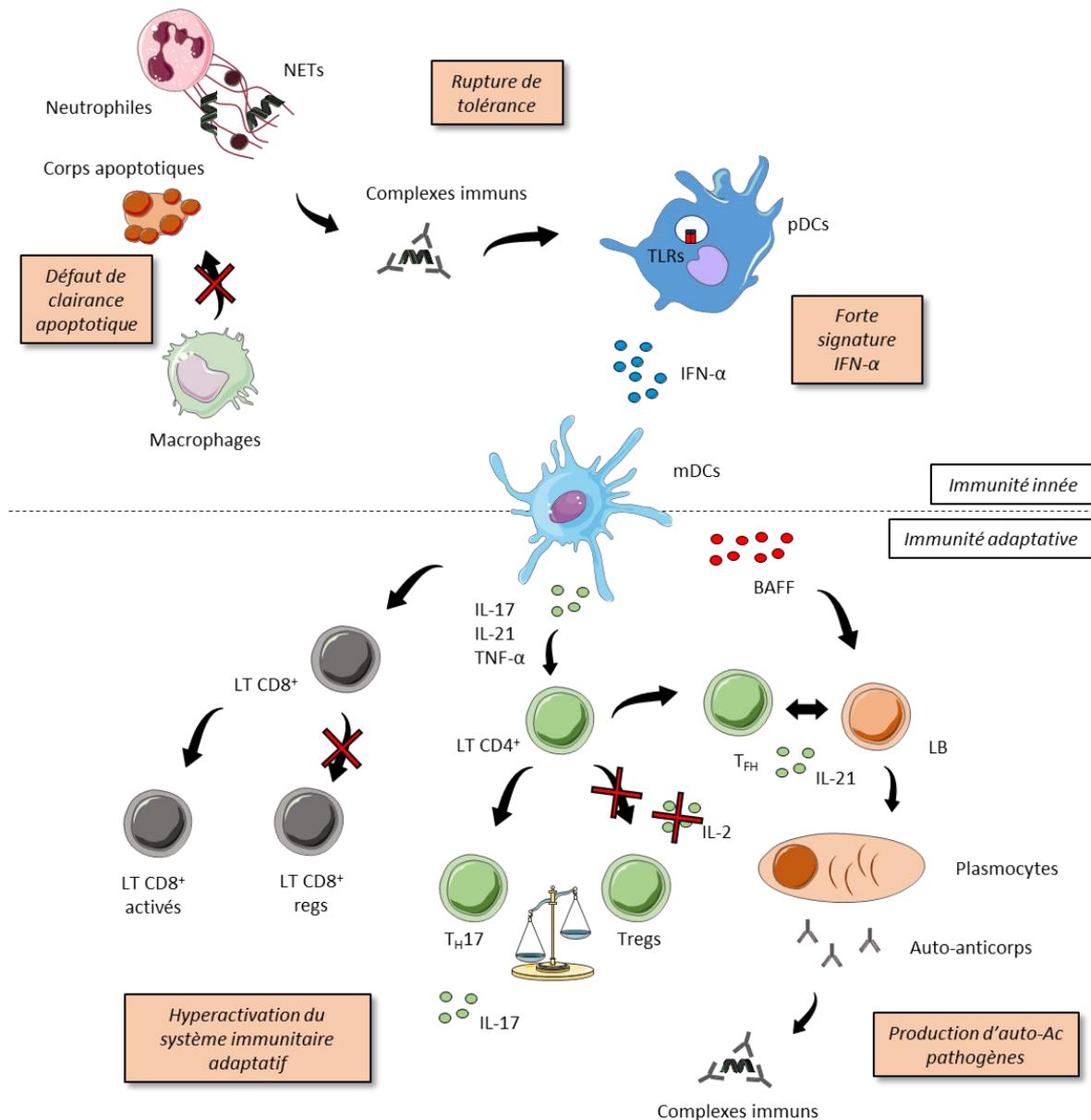


Figure 5. Pathogénèse du LED.

Un défaut de clairance apoptotique associé à un excès de NETose se retrouve à l'origine de la rupture de tolérance au soi. Les auto-Ac reconnaissent le matériel nucléaire, et forment des complexes immuns qui vont favoriser l'activation des pDCs et du système immunitaire inné. Une production anormalement élevée d'IFN de type I va alors contribuer à générer la « signature IFN- α », créant un environnement favorable à l'activation des DCs. Une fois activées, ces cellules vont produire de nombreuses cytokines parmi lesquelles BAFF, qui va favoriser la survie des LB auto-réactifs, l'IL-21, cytokine permettant la génération des T_{FH} ou l'IL-17, qui va orienter la balance T_H17/Tregs en faveur des T_H17. L'ensemble de ces phénomènes favorise la différenciation des LB en plasmocytes, cellules sécrétrices d'auto-Ac. Ces auto-Ac vont former des complexes immuns, initiant ainsi le cycle de pathogénèse lupique.

- *Traitements anti-inflammatoires :*

Anti-inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS): Ce traitement peut soulager la douleur, bien qu'il soit souvent insuffisant. Des effets secondaires, au niveau rénal notamment, contre-indiquent bien souvent l'utilisation des AINS (notamment de l'ibuprofène) dans le traitement du LED.

Corticostéroïdes (CS) : L'utilisation des CS (« Cortancyl ») dont le nombre de cibles est important est le traitement le plus communément utilisé. En effet, les CS diminuent la production de cytokines pro-inflammatoires et réduisent le nombre et l'activation des LT, des monocytes et des macrophages. Ce traitement réduit également l'inflammation en diminuant la perméabilité endothéliale et la production de molécules d'adhésion. Cependant, le mode d'action des CS dépend du dosage donné aux patients, dosages devant régulièrement être réajustés (**Kasturi and Sammaritano, 2016**).

- *Anti-paludéens de synthèse (Hydroxychloroquine (HCQ, « Plaquénil »), chloroquine, nivaquine) :*

Les traitements anti-paludéens ont prouvé leur efficacité dans le LED. Ils possèdent différents modes d'action. En effet, ce sont des traitements immunomodulateurs, anti-thrombotiques et hypolipémiants. Ces drogues modifient le pH endosomal, diminuant ainsi la présentation antigénique. Ils sont également capables de réduire l'expression de certains TLRs tel que le TLR9. Comme les CS, le dosage de ce traitement est important pour obtenir une efficacité maximale (**Sibilia and Pasquali, 2008**).

- *Traitements immunosuppresseurs :*

Cyclophosphamide (« Cytoxan »): Le cyclophosphamide est un traitement immunosuppresseur qui diminue la synthèse d'ADN et donc bloque la prolifération cellulaire. Comme pour tous les traitements immunosuppresseurs, l'utilisation du cyclophosphamide se retrouve à l'origine de nombreux effets secondaires tels que les infections, lymphomes et nausées.

Azathioprine (AZA « Imuran ») : L'utilisation de ce traitement immunosuppresseur est préconisée pour les patients lupiques avec des atteintes rénales. De plus, ce traitement permet la réduction des doses de CS administrées aux patients. Cependant, les premiers effets positifs sont observés entre 6 et 12 semaines après le début du traitement, accompagnés de certains effets secondaires tels que des nausées, des douleurs abdominales et son utilisation sur le long terme augmente les risques de développer un cancer.

Mycophénolate Mofétil (MMF, « Cellcept »): Le MMF est une drogue immunosuppressive fréquemment utilisée lors de transplantation d'organes chez l'Homme. L'utilisation de cette molécule inhibe la prolifération des LT et des LB en inhibant la synthèse de guanosines *de novo*, étape essentielle de la synthèse d'ADN dans les lymphocytes.

Cyclosporine (« Neoral »): L'administration de ce traitement réduit l'inflammation en ciblant principalement les LT. Ce traitement est utilisé en dernier recours en cas d'échec des autres

traitements immunosuppresseurs tels que le MMF, car l'administration de cyclosporine peut conduire à une forte toxicité hépatique.

- *Traitements immunomodulateurs :*

Méthotrexate (MTX, « Rheumatrex): Le MTX est un antagoniste de l'acide folique utilisé dans d'autres pathologies telles que la polyarthrite rhumatoïde (PR) ou les vascularites. Son mode d'action consiste à inhiber la synthèse d'ADN et d'ARN et ce traitement est fréquemment utilisé en cas de résistance au traitement par les CS.

- *Biothérapies :*

Rituximab : Ac monoclonal chimérique souris/humain dirigé contre un Ag spécifique des LB, CD20. Chez l'Homme, bien que la déplétion des LB en périphérie soit réelle, leur persistance dans les tissus est également décrite. De plus, CD20 n'étant pas exprimé sur les plasmocytes, les taux d'Ig ne sont pas suffisamment réduits. D'autres Ac ciblant les LB ont été utilisés, soit ciblant également CD20 (Ocrelizumab et Ofatumumab), soit ciblant CD22 comme l'Epratuzumab. Cependant, ces différents traitements favorisent le développement d'infections et d'autres stratégies sont désormais à l'étude afin d'identifier un traitement spécifiques des cellules délétères dans le LED.

Belimumab : Ac monoclonal humain ciblant BLys (BAFF), est le premier traitement immunomodulateur spécifique du LED possédant une autorisation de mise sur le marché (AMM) en Europe et aux Etats-Unis. En effet, le challenge du traitement du lupus est de moduler spécifiquement le système immunitaire sans le supprimer totalement. Le ciblage de BAFF inhibe son interaction avec ses récepteurs et réduit la survie et la prolifération des LB auto-réactifs. Le Belimumab est bien toléré et présente l'avantage de réduire les doses de CS données aux patients lupiques. Cependant, il est peu efficace chez les patients noir-américains, et chez les patients présentant une activité de la maladie faible ou modérée. D'autres stratégies autour de BAFF sont à l'étude comme l'Atacicept, molécule chimérique qui cible TACI (« Transmembrane Activator and Calcium-modulator and cyclophilin ligand Interactor ») et qui réduit significativement la fréquence des plasmocytes et la production d'Ig. Cependant, son efficacité modérée et sa forte immunosuppression posent des questions sur son avenir thérapeutique (**Kyttaris, 2017**).

2. Les futurs traitements du lupus

Une autre stratégie thérapeutique consiste à cibler les cytokines, messagers du système immunitaire. En effet, bon nombre de fonctions effectrices des cellules immunitaires sont médiées par les cytokines, dont la production est souvent dérégulée chez les patients lupiques. Dans ce contexte, le ciblage des interférons de type I, cytokines bien souvent à l'origine du déclenchement de la pathologie apparaît comme une évidence. Différentes immunothérapies ciblant l'IFN- α sont actuellement en phase clinique, les plus avancées étant le Sifalimumab et le Rontalizumab, respectivement en phase III et en

phase II d'essais cliniques. L'utilisation du Sifalimumab montre des résultats prometteurs sur les patients lupiques à activité modérée ayant une forte signature interféron (**Khamashta et al., 2016**), alors que l'administration de Rontalizumab n'a pas eu l'effet escompté, bien qu'améliorant le score d'activité chez les patients présentant une faible signature interféron (**Kalunian et al., 2016**). Une troisième étude cible non pas la cytokine, mais son récepteur. En effet, l'Anifrolumab cible le récepteur aux interférons de type I (IFNAR 1) et présente des résultats intéressants à faible dose en phase II (**Furie et al., 2017**). L'ensemble de ces données indique que le blocage de la voie de l'IFN- α semble être une stratégie prometteuse. D'autres traitements ciblant le récepteur de l'IL-6 (Tocilizumab, Sirukumab), l'IL-23 (Ustekinumab) ou le TNF- α (Etanercept, Infliximab) ont été testés avec un succès relatif (**Davis and Reimold, 2017; Kyttaris, 2017**).

Récemment, l'administration de faibles doses d'IL-2 a montré d'excellents résultats et semble être une des thérapies les plus prometteuses actuellement à l'étude. En effet, He *et al.* ont administré de faibles doses d'IL-2 à 38 patients, quotidiennement, pendant 2 semaines. Ce traitement a eu pour effet de restaurer la fonction des Tregs et 12 semaines après le début du traitement, 90% des patients ont démontré une amélioration significative des symptômes de la pathologie (**He et al., 2016**). Ces résultats impressionnants doivent être confirmés sur un plus grand nombre de patients, mais offre un nouvel espoir dans le traitement du LED.

Au sein de notre laboratoire a été découvert un traitement prometteur, actuellement en phase III d'essais cliniques. Le Lupuzor est un peptide de 21 nucléotides provenant de la ribonucléoprotéine U1-70K, phosphorylée à la position Ser140 (**Monneaux et al., 2003**). Le Lupuzor montre un effet intéressant sur le modèle murin MRL^{lpr/lpr} et sur les PBMCs de patients lupiques *ex vivo*, en exerçant un effet tolérogénique et immunomodulateur conduisant à l'inhibition de la réactivité des LT CD4⁺ avec le CMH présentant des peptides du soi (**Zimmer et al., 2013**).

La réponse immunitaire adaptative, anormalement excessive chez les patients lupiques, dépend en grande partie de l'interaction entre les CPA, les LT et les LB via l'interaction de molécules de surface, qui stabilise la synapse immunologique et influence l'intensité de la réaction immunitaire. C'est pourquoi le ciblage de certaines molécules de co-stimulation présentes à la surface des LT, particulièrement des T_{FH} (CD40L, ICOS), est une stratégie séduisante (*cf. Partie B.*). Dans ce contexte, l'Abatacept, une protéine de fusion entre le domaine extracellulaire de CTLA-4 et le domaine Fc d'IgG1 possède un potentiel thérapeutique intéressant. CTLA-4 est une molécule co-inhibitrice, interagissant avec les molécules de la famille B7, CD80 et CD86. Cette interaction prodigue des signaux négatifs à la cellule T activée et interfère avec les signaux positifs provenant de CD28. L'Abatacept va, dans ce contexte, interagir avec les molécules CD80/86 et, de ce fait, favoriser les signaux négatifs apportés aux LT (**Pimentel-Quiroz et al., 2016**). Ce traitement possède une AMM pour la polyarthrite

rhumatoïde et montre des effets prometteurs dans le traitement des patients lupiques, particulièrement ceux présentant des glomérulonéphrites (Furie et al., 2014) (Figure 6).

Cette revue non-exhaustive démontre que malgré le nombre important de traitements actuellement disponibles ou en essai pour le traitement du lupus, le développement d'une thérapie ciblant spécifiquement les acteurs de la pathologie lupique représente un objectif exaltant pour les années futures.

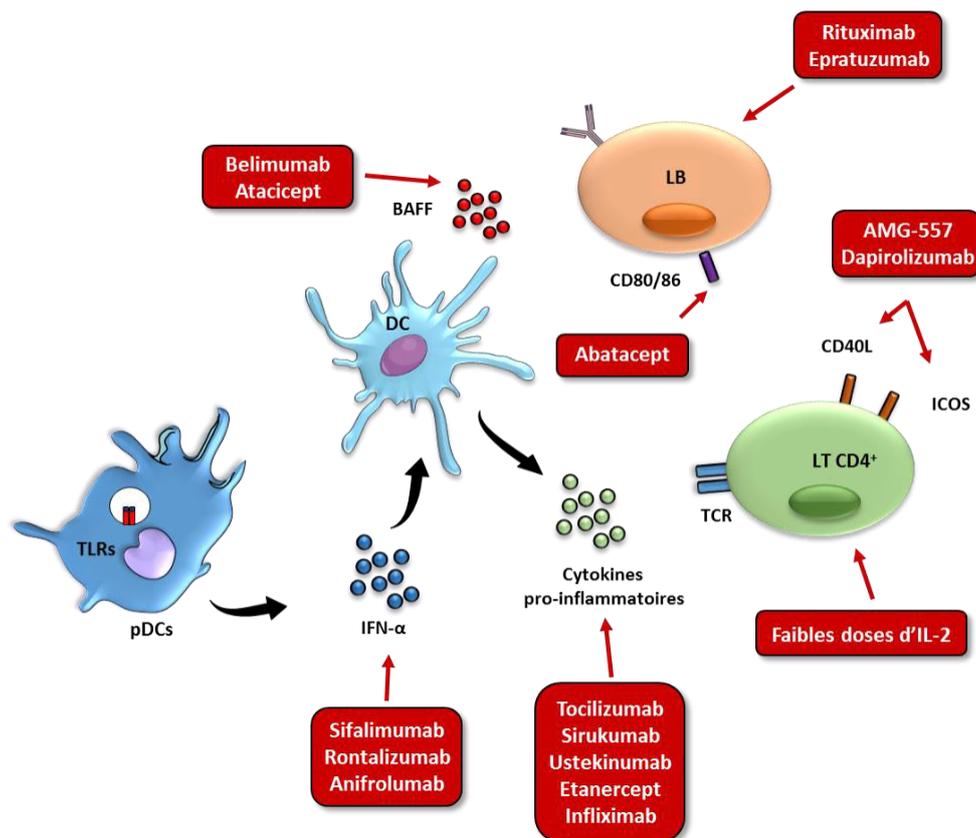


Figure 6. Thérapies ciblées du LED.

Différents traitements ciblant spécifiquement les cellules ou les molécules impliquées dans la pathogénèse du LED sont actuellement sur le marché (Belimumab, Rituximab) ou en essais cliniques. Certaines thérapies vont cibler l'origine de la signature IFN en inhibant la production d'IFN- α ou en bloquant son récepteur. D'autres traitements visent à inhiber l'interaction T-B en bloquant les molécules de co-stimulation telles que la voie CD40/CD40L, CD80/86 ou ICOS. L'ensemble de ces traitements ont pour objectif de moduler le système immunitaire, dans le but de prévenir son hyperactivation.

B. L'INTERACTION T-B : au cœur du développement du LED

Comme décrit précédemment (*Introduction partie A*), les auto-Ac, produits par les plasmocytes, sont les principaux effecteurs du développement de la pathologie lupique. La fréquence des plasmocytes et leur production d'auto-Ac est exacerbée chez les patients lupiques. En effet, il a été démontré que la fréquence des précurseurs de plasmocytes circulants est augmentée chez les enfants présentant un LED (**Arce et al., 2001**). De plus, une expansion de la population de plasmocytes CD27^{high} circulants a été mise en évidence chez les patients lupiques, corrélant avec l'activité de la pathologie. Bien que le rôle des LB dans le LED soit évident, il est admis que ce ne sont pas les seuls acteurs du développement de cette pathologie. En effet, la différenciation des LB en plasmocytes se retrouve régulée, positivement et négativement par les LT, soulignant le rôle crucial de l'interaction entre LT et LB dans la production d'Ac. Dans cette partie, nous verrons les mécanismes d'aide aux LB apportés par les LT, et les différents procédés régulant les interactions cellulaires et moléculaires entre les LT et les LB.

I. Mise en évidence du rôle des LT CD4⁺ dans la différenciation des LB : un peu d'histoire.

C'est à la fin des années 1960 que les premières indications concernant l'aide des LT apportées aux LB furent apportées. En effet, à cette époque, Miller et Mitchell ont décrit que le co-transfert de cellules provenant du thymus et de la moelle osseuse dans des souris irradiées est nécessaire à la production d'Ac. (**Miller and Mitchell, 1968; Mitchell and Miller, 1968; Nossal et al., 1968**). Quelques années plus tard, il a été mis en évidence que certains facteurs solubles sont nécessaires à cette communication entre cellules thymiques et médullaires. En effet, en 1982, l'IL-4 a été identifiée comme la première cytokine spécifique de l'aide apportée aux LB (**Howard et al., 1982**). Vers la fin des années 80, le paradigme de la réponse T_H1/T_H2 se développe, définissant à cette époque des LT CD4⁺ T_H2 en tant que cellules apportant l'aide aux LB. Cependant, en éliminant les cellules T_H2 ou la production d'IL-4 dans des modèles murins, les CG et la production d'Ac *in vivo* demeurent (**Grusby, 1997; Kopf et al., 1995**). L'ensemble de ces études démontrent qu'à l'époque, bien que l'importance de l'aide apportée par les LT CD4⁺ aux LB soit évidente, les mécanismes précis impliqués dans leur interaction restent inconnus. La découverte de CD40 et de son ligand CD154 (ou CD40L) fut un élément déclencheur dans la compréhension de la communication T-B. CD40L, fortement exprimé à la surface des LT CD4⁺, protège les LB de l'apoptose et fournit à ces cellules l'aide nécessaire à leur prolifération (**Armitage et al., 1992**). De plus, les individus présentant une mutation dans le gène codant pour CD40L, développent un syndrome hyper-IgM lié au chromosome X, caractérisé par une absence de CG dans les OLS (**Allen et al., 1993; DiSanto et al., 1993**). Plusieurs années plus tard, il a été démontré que l'IL-21, une cytokine clonée quelques années auparavant, se retrouve à l'origine de la maturation des LB

et de leur différenciation en cellules sécrétrices d'Ig (**Ozaki et al., 2002**). Toutefois, même si les hypothèses convergeaient vers les LT CD4⁺, la source de la production de cette cytokine demeurerait à l'époque relativement peu connue. Des études ont démontré que le contact cellulaire entre LT et LB est indispensable à la production d'Ac, suggérant qu'une ou plusieurs molécules de surface sont importantes pour la communication T-B. C'est dans ce contexte que SAP (« Slam-Associated Protein ») et ICOS, exprimés par les LT, ont été décrits comme essentiels à la génération d'Ig (**Crotty et al., 2003; Dong et al., 2001**). Une déficience de l'une de ces deux molécules est critique pour la maturation des LB et pour la formation des CG. L'ensemble de ces résultats démontrent que les LT CD4⁺ par la production de cytokines (IL-4 et IL-21 notamment), et par l'expression de certaines molécules (CD40L, SAP et ICOS) représentent des acteurs cellulaires indispensables à la différenciation des LB en cellules sécrétrices d'Ac.

La meilleure caractérisation des sous-populations de LT CD4⁺ durant les années 2000 a mené à la découverte d'une population, spécialisée dans l'aide aux LB, appelée les lymphocytes T folliculaires auxiliaires (T_{FH}).

II. Les cellules T folliculaires auxiliaires (T_{FH})

1. Découverte des T_{FH}

Bien que l'hypothèse d'une population de LT CD4⁺ spécialisée dans l'aide aux LB existe depuis le début des années 2000 (**Breitfeld et al., 2000**), ce n'est qu'en 2009, avec l'identification du facteur de transcription Bcl-6 que les T_{FH} furent décrites pour la première fois par la communauté scientifique (**Johnston et al., 2009; Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009**). Ces travaux ont mis évidence que l'expression de Bcl-6 est nécessaire au développement des CG et à la mise en place de la réponse humorale. A la suite de la découverte de Bcl-6 et de la caractérisation des T_{FH}, le nombre d'études concernant ces cellules a grandi exponentiellement (146 articles scientifiques de 2000 à 2010 et plus de 1000 articles de 2010 à nos jours). Les T_{FH} tiennent leur nom de LT « folliculaires » de leur localisation au sein des follicules des OLS. La description de leur génération, de leur signalisation, de leur régulation et de l'implication de ces cellules dans la production d'Ig améliorent considérablement nos connaissances sur la mise en place de la réponse humorale.

2. Phénotype des cellules T_{FH}

La production d'Ac peut provenir d'une réponse humorale extrafolliculaire ou bien du CG. La réponse extrafolliculaire permet à la production de plasmablastes à courte durée de vie, qui ne subissent pas le processus de maturation d'affinité, prenant place dans les CG. Au sein des CG, se développe une intense collaboration entre les LB du CG et les T_{FH}, conduisant à la différenciation des LB en plasmocytes à longue durée de vie, cellules productrices d'Ac à forte affinité. Les cellules T_{FH} expriment

fortement le récepteur aux chimiokines CXCR5 (« C-X-C chemokine Receptor type 5 »). L'expression de CXCR5 favorise la migration des cellules T_{FH} au sein des follicules des OLS. Par ailleurs, les T_{FH} expriment fortement ICOS et PD-1 (« Programmed Death-1 »). Cependant, le marqueur le plus spécifique de ces cellules demeure le facteur de transcription régulateur Bcl-6 (**Crotty, 2011**). Enfin, ces cellules produisent de forts taux d'IL-21, cytokine jouant un rôle primordial dans l'aide apportée aux LB (*Tableau 3*).

	Humain		Souris	
	cT _{FH}	T _{FH} du CG	cT _{FH}	T _{FH} du CG
Bcl6	+	++	+	++
CXCR5	+	++	+	++
PD-1	+	++	+	++
ICOS	low	++	+	++
BTLA	low	high	high	high
SAP	+	high	+	high
SLAM	/	/	+	+
IL-21	+	++	+	++
CCR7	low	low	low	low
CD200	low	+	+	+
OX40	+	++	+	++

Tableau 3. Marqueurs pour l'identification des T_{FH} chez l'Homme et la souris (inspiré de Crotty et al., 2011).

cT_{FH} = cellules T_{FH} circulantes, CG = centre germinatif

3. Génération des cellules T_{FH}

Les T_{FH} sont générées lors d'une immunisation ou d'une infection, à la suite d'une interaction entre les LT CD4⁺ naïfs et les DCs prenant place dans la zone T des OLS. Les signaux apportés par les DCs induisent l'expression d'un nombre important de protéines (facteurs de transcription, molécules de surface et cytokines) essentielles à la génération des T_{FH}, à leur migration ainsi qu'à leur fonction. La différenciation des cellules T_{FH} est un procédé pouvant être séparé en plusieurs étapes : (i) les LT CD4⁺ naïfs sont activés par les DCs via l'interaction CMH/peptide/TCR dans la zone T des OLS et deviennent à ce stade, des T_{FH} immatures (pré-T_{FH}) (**Fazilleau et al., 2009**). (ii) Ces pré-T_{FH} migrent à l'interaction entre la zone T et la zone B, également appelée zone inter-folliculaire, où leur premier contact avec les cellules B apporte des signaux de maturation permettant le passage à la dernière étape de la différenciation. (iii) Les cellules T_{FH} migrent alors au sein des CG des OLS, où elles vont interagir avec les LB du CG, favorisant la commutation de classe, les hypermutations somatiques et la maturation

d'affinité de ces LB (*Figure 8*). Lors de ces étapes, nous verrons que de nombreuses molécules, récepteurs membranaires et cytokines, sont impliqués.

a. La génération des pré-T_{FH} : rôle crucial des DCs

L'activation initiale des LT CD4⁺ naïfs requiert des interactions entre le TCR et le CMH, associés à des signaux de co-stimulation délivrés par les DCs par l'intermédiaire de CD40, CD80/86, ICOSL et OX40L. CD28, qui interagit avec CD80/86 est essentiel au développement des T_{FH}, comme le prouve l'incapacité des LT CD4⁺ de souris CD28^{-/-} à exprimer CXCR5 et OX40, associée à une formation des CG réduite (**Walker et al., 1999**). Par ailleurs, l'expression CD40-dépendante d'OX40L par les DCs favorise l'expression de CXCR5 par les LT CD4⁺OX40⁺ (**Fillatreau and Gray, 2003**). De plus, la signalisation associée à ICOS conduit à l'expression de Bcl-6 et d'Ascl2 («Achaete-scute homologue-2»). Ce dernier favorise l'expression de CXCR5 en inhibant celle de CCR7 (C-C chemokine Receptor 7), chimiokine responsable de l'évasion des cellules depuis les CG vers la circulation, exprimée à la surface des LT CD4⁺ activés. Ces cellules deviennent à ce stade, des cellules T_{FH} immatures (**Choi et al., 2011; Liu et al., 2014**). L'expression de Bcl-6 permet d'augmenter l'expression de molécules de surfaces telles que PD-1, ICOS, CD40L et SAP, récepteurs indispensables à la différenciation des T_{FH}. De plus, les cytokines sécrétées par les DCs jouent un rôle crucial dans le développement des T_{FH}. L'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire, a été décrite comme le principal facteur soluble impliqué dans la différenciation des T_{FH} chez la souris (**Eddahri et al., 2009**), alors que chez l'Homme, c'est principalement l'IL-12 qui semble jouer ce rôle (**Ma et al., 2009; Schmitt et al., 2009**). Chez l'Homme, les travaux initiaux n'ont pas décrit l'IL-6 comme une cytokine favorisant la différenciation des T_{FH}. De récentes études suggèrent toutefois que les plasmablastes produisant de l'IL-6, sont responsables de la différenciation des LT CD4⁺ naïfs en LT CXCR5⁺ICOS⁺Bcl-6⁺IL-21⁺, cellules capables de fournir des signaux aidant les LB à se différencier en plasmablastes (**Chavele et al., 2015**). Par ailleurs, l'IL-21 est non seulement nécessaire à la fonction des cellules T_{FH}, mais participe aussi activement à la génération de ces cellules (**Nurieva et al., 2008**). De manière intéressante, l'IL-6 et l'IL-12 produites par les DCs induisent la production d'IL-21 par les LT CD4⁺ respectivement chez la souris (**Dienz et al., 2009**) et chez l'homme (**Schmitt et al., 2009**). L'IL-21 est une cytokine autocrine et son rôle précis dans la génération des pré-T_{FH} reste à démontrer. L'une des pistes mène à sa voie de signalisation. En effet, l'interaction de la cytokine avec son récepteur induit l'activation de la voie de signalisation Jak /STAT (« Janus Kinase » / « Signal Transducer and Activator of Transcription »). Parmi ces molécules, STAT3 est une molécule de signalisation majeure activée lors d'interactions de l'IL-6 et l'IL-21 avec leurs récepteurs respectifs (**Heinrich et al., 2003; Spolski and Leonard, 2008**), alors que l'IL-12 active STAT4. Toutefois, un défaut fonctionnel de STAT3 chez certains patients a pour conséquence une altération de leur production d'IL-21 dépendante de l'IL-12, suggérant que la capacité de l'IL-12 à promouvoir l'expression d'IL-21 par les LT CD4⁺ est

dépendante de STAT3 (Ma et al., 2012). De plus, ces patients présentent un nombre réduit de cellules T_{FH} circulantes, confirmant que la voie de signalisation associée à STAT3 est importante dans la différenciation des T_{FH} (Mazerolles et al., 2013). Durant cette première étape de différenciation, les interactions de surface et les cytokines sont nécessaires à l'induction de l'expression de Bcl-6. Bcl-6 est le régulateur principal des cellules T_{FH} , car son expression inhibe simultanément la différenciation des $LT CD4^+$ en T_{H1} , T_{H2} et T_{H17} (Yu et al., 2009). L'expression de Bcl-6 est influencée par l'IL-6 et l'IL-21 via la signalisation de STAT1 et de STAT3, ainsi que par la signalisation PI3K, dépendante d'ICOS. De nombreux acteurs vont influencer l'expression de Bcl-6. En effet, l'expression de Bcl-6 est contrôlée par un réseau extrêmement complexe de facteurs d'activation tels que BATF (« Basic leucine zipper transcriptional factor ATF like »), LEF-1 (« Lymphoid Enhancer binding Factor-1 ») ou Bob1 (« B cell Oct-Binding protein 1 »), alors que FOXO1 (« Forkhead bOX protein O1 ») régule négativement l'expression de Bcl-6 (Betz et al., 2010; Choi et al., 2015b; Stauss et al., 2016; Stone et al., 2015) L'ensemble des facteurs participant à la régulation de l'expression de Bcl-6 est résumé dans la Figure 7.

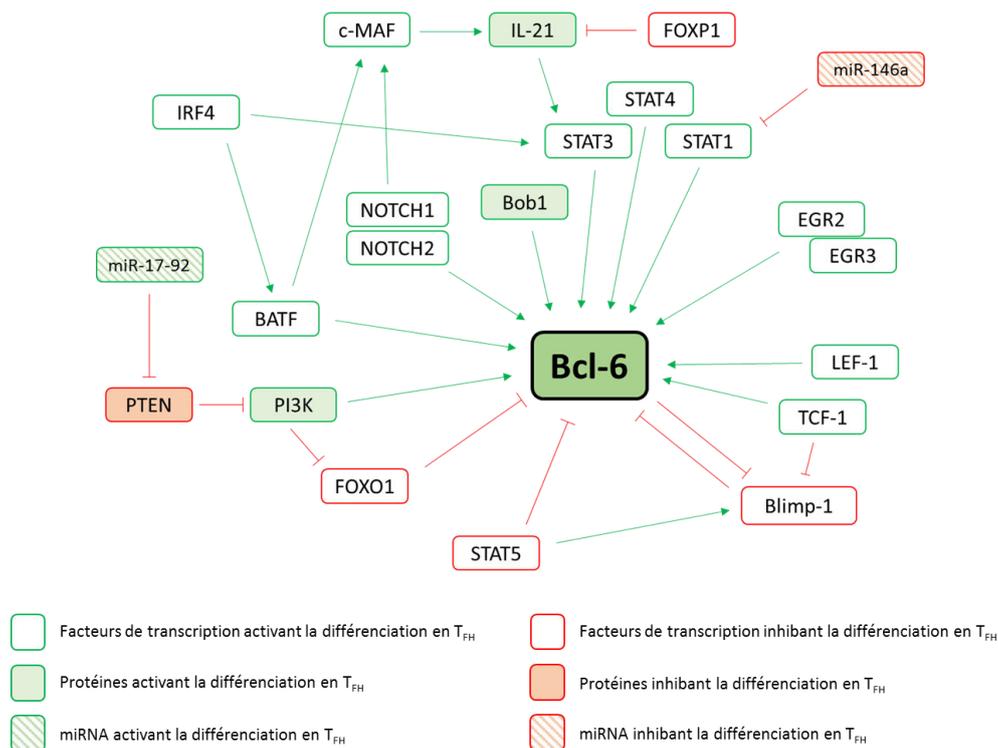


Figure 7. La régulation complexe de l'expression de Bcl-6.

L'expression du facteur de transcription répresseur Bcl-6 est le fruit d'un réseau complexe de signaux régulateurs positifs (en vert) et négatifs (en rouge). Un nombre important de facteurs de transcription, de protéines et de microARNs influencent l'expression de Bcl-6, soit directement, soit par l'intermédiaire d'autres facteurs, favorisant ou non la différenciation des $LT CD4^+$ naïfs en T_{FH} .

b. Migration et maturation des pré-T_{FH} à l'interface T-B

Grâce à l'expression de CXCR5 et à la diminution de l'expression de CCR7, les pré-T_{FH} migrent vers la zone B, en réponse à un gradient de CXCL13 (« C-X-C chemokine Ligand 13 »), où ces cellules vont rencontrer les LB à l'interface de la zone T et de la zone B. Cette interaction T-B est essentielle pour le maintien des T_{FH}, comme le prouve l'absence de T_{FH} dans un modèle murin déplété en LB (**Johnston et al., 2009**). A ce stade, les LB agissent comme des cellules présentatrices d'Ag pour les pré-T_{FH}, qui vont par la suite se différencier en T_{FH} du CG. En effet, seules les T_{FH} et les LB ayant formé des conjugués stables migrent ensemble au sein des follicules pour former les CG (**Kerfoot et al., 2011**). La formation d'un conjugué stable T-B nécessite d'une part, l'interaction entre ICOS sur les T_{FH} et ICOSL à la surface des LB, et d'autre part des interactions de type SLAM (« Signaling Lymphocytic Activation Molecule »). Les molécules SLAM sont des récepteurs transmembranaires exprimés à la surface des T_{FH} et des LB. SAP, qui est la protéine de signalisation associée aux molécules SLAM, est indispensable à la stabilisation de l'interaction T-B. En effet, les LT CD4⁺ déficientes pour SAP se caractérisent par une incapacité à interagir de façon stable avec les LB, conduisant à une absence d'expansion clonale des LB (**Qi et al., 2008**). De plus, les patients possédant des mutations dans le gène SH2D1A, codant pour SAP, qui développent un syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X (XLP, « X-Linked Lymphoproliferative disease »), présentent un nombre réduit de T_{FH} associé à une hypogammaglobulinémie (**Ma et al., 2005**). Pour résumer, lors de cette étape, les LB jouent un rôle majeur dans la maturation des T_{FH}, en agissant comme cellules présentatrices d'Ag et en stabilisant l'interaction T-B par l'intermédiaire d'ICOSL et de SLAM (*Figure 8*).

c. Maturation finale des T_{FH} au sein des CG

La fonction principale des T_{FH} est d'induire la formation d'Ac à forte affinité par les LB. Au sein des follicules, l'interaction T_{FH}-LB du CG implique différentes molécules parmi lesquelles sont retrouvées PD-1, CD40L, l'IL-21 et BAFF. Le signal délivré par l'interaction entre PD-1 à la surface des T_{FH} et son ligand PD-L1, exprimé par les LB du CG est nécessaire à la survie de ces derniers (**Riella et al., 2012**). Par ailleurs, la production d'IL-21 par les T_{FH} régule directement la prolifération des LB ainsi que le phénomène de commutation isotypique. De plus, la signalisation associée à l'IL-21 est directement impliquée dans la mise en place de la réponse B mémoire, car les souris déficientes pour l'expression du récepteur à l'IL-21 ne peuvent générer de réponse IgG spécifique de l'Ag (**Rankin et al., 2011**). BAFF est une cytokine produite par les cellules stromales présentes dans les OLS, et est impliquée dans le développement des CG en régulant positivement l'expression d'ICOSL à la surface des LB. L'interaction entre ICOSL sur les LB et ICOS sur les LT dans le CG permet en retour de favoriser l'expansion des T_{FH}

médiée par les LB du CG (Ou et al., 2012). Les cellules T_{FH} possèdent également la capacité de produire BAFF, cytokine primordiale pour la survie des clones de LB de forte affinité (Goenka et al., 2014).

En résumé, la génération de T_{FH} est un processus qui se déroule en plusieurs étapes et qui est régulé par de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires. Certains acteurs sont nécessaires à la migration des T_{FH} depuis la zone T vers les CG, d'autres sont requis pour le développement et la fonctionnalité de ces cellules et finalement certaines molécules assurent le maintien et la survie des T_{FH} au sein des OLS (Figure 8).

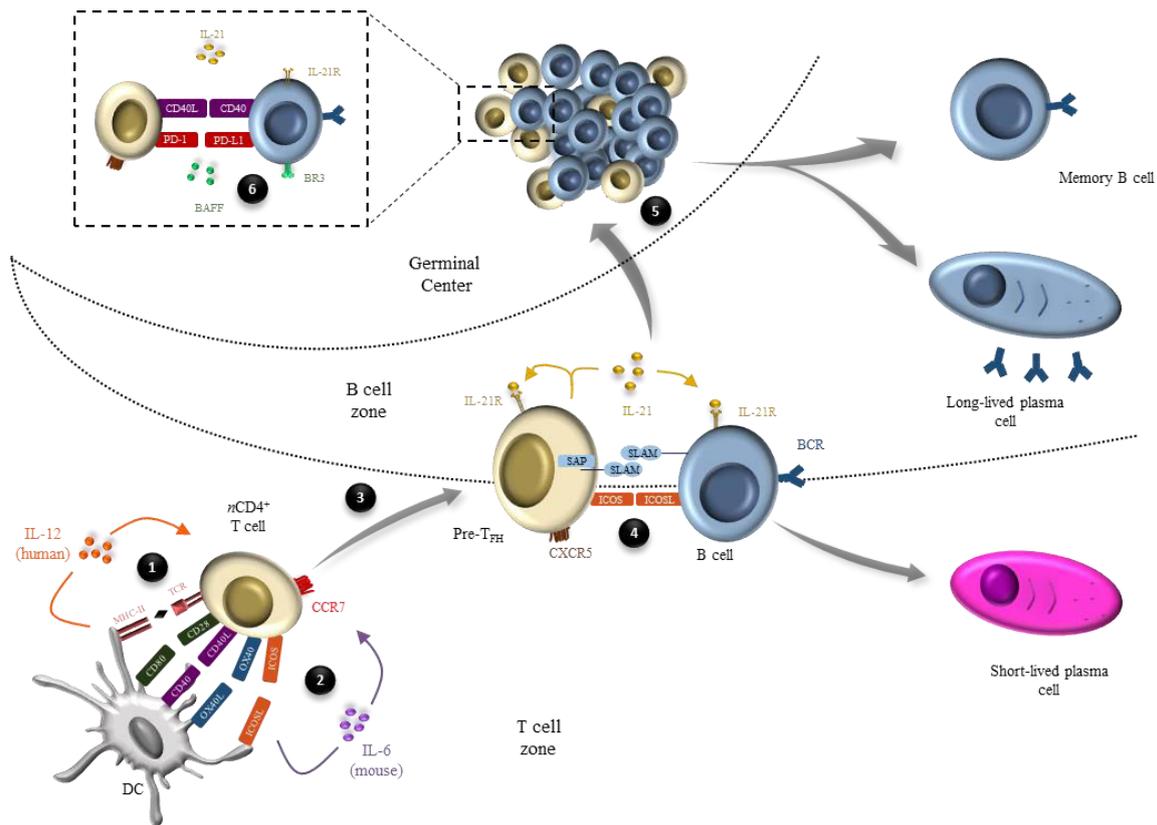


Figure 8. Génération des T_{FH} au sein des OLS (Sawaf et al. *Journal of Immunology Research*, 2016). La différenciation des T_{FH} au sein des OLS se déroule en plusieurs étapes : (1) Les LT CD4⁺ naïfs localisés dans la zone T sont activés par les DCs via l'interaction CMH-II/peptide/TCR. (2) A la suite de cette activation, les LT CD4⁺ expriment des molécules de costimulation telles que CD40L, OX40 ou ICOS, favorisant ainsi la communication avec les DCs. Ces interactions moléculaires associées à la production de cytokines par les DCs (IL-6 chez la souris, IL-12 chez l'homme), dirige la différenciation des LT activées en cellules pré-T_{FH}. (3) La surexpression de CXCR5 combinée à la diminution de l'expression de CCR7 permet l'attraction des pré-T_{FH} à la jonction entre les zones T et B où CXCL13 est exprimé. (4) Les LB exprimant ICOSL et les pré-T_{FH} interagissent dans la zone T-B, et ce contact est stabilisé par l'interaction des molécules SLAM, afin de finaliser la différenciation des pré-T_{FH} en cellules T_{FH} matures. (5) Finalement, les cellules T_{FH} matures migrent vers les CG où elles procurent l'aide nécessaire aux LB. L'interaction T_{FH}-LB au sein des CG induit la différenciation des LB en LB mémoires et en plasmocytes. Ce processus est régulé par l'IL-21, les interactions PD-1/PD-L1 et CD40/CD40L, et la survie des LB est assurée par l'interaction de BAFF avec ses récepteurs, notamment BR3 (6).

4. Régulation des cellules T_{FH}

Au regard du rôle majeur des T_{FH} dans la réponse humorale, une balance entre signaux activateurs et inhibiteurs est essentielle à leur homéostasie. Bien que les mécanismes nécessaires à leur développement soient bien définis, les connaissances concernant leur régulation sont plus restreintes.

a. Les microARNs

Plusieurs études ont mis en évidence l'importance des microARNs dans le développement, la différenciation et la fonction des T_{FH}. Bcl-6 étant une protéine clé dans la génération des T_{FH}, il est rapidement apparu que les microARNs contrôlant l'expression de ce facteur de transcription pouvaient participer à la régulation des T_{FH}. miR-10a représente l'un des microARNs impliqué dans la régulation des T_{FH} en ciblant directement la séquence 3'-UTR du transcrite codant pour Bcl-6 (**Takahashi et al., 2012**). Le cluster polycistronique miR-17-92, quant à lui, favorise la différenciation en T_{FH} en réprimant l'expression de PTEN, de ROR α (« Retinoic acid-related Orphan Receptor α »), ainsi que de PHLPP2 (« Pleckstrin Homology domain and Leucine-rich repeat Protein Phosphatase »), une phosphatase inhibant l'expression de Bcl-6 en interférant avec la voie de signalisation PI3K (**Baumjohann et al., 2013; Kang et al., 2013**) (*Figure 7*). miR-146a est un petit ARN non-codant fortement exprimé par les T_{FH}, impliqué dans la régulation négative de ces cellules. En effet, miR-146a réprime directement l'expression d'ICOS, comme le prouve l'accumulation de T_{FH} et de LB exprimant respectivement ICOS et ICOSL à des niveaux très élevés dans les CG de souris miR-146a^{-/-} (**Pratama et al., 2015**). miR-155, un médiateur de l'inflammation et de l'immunité contrôlant l'activation des LT, LB et des macrophages (**Rodriguez et al., 2007**), est également suspecté de participer à la régulation des T_{FH}. En effet, les souris miR-155^{-/-} possèdent des CG peu fonctionnels et une réponse spécifique de l'Ag altérée. Deux cibles de miR-155 sont spécifiques des cellules T_{FH}: FOSL2 (« Fos-like antigen 2 ») et PELI1 (« PELLINO E3 ubiquitin protein Ligase 1 »), possédant toutes les deux un effet inhibiteur sur l'expression de BATF et IRF4 (**Hu et al., 2014**). Récemment, la possibilité d'une régulation des T_{FH} chez l'Homme par les microARNs a été suggérée. En effet, miR-346, ciblant Bcl-6, est retrouvé fortement exprimé par les T_{FH} circulants de patients atteints d'une maladie auto-immune endocrinienne appelée maladie de Basedow (**Chen et al., 2015**). De plus, des polymorphismes de miR-346, mais également de miR-146a ont été associés à une augmentation du risque de développer une polyarthrite rhumatoïde (**Chatzikiyiakidou et al., 2012**). Par ailleurs, les cellules T_{FH} circulantes étant divisées en différentes sous-populations (*cf. Partie II. II.4*), l'expression de microARNs régulant l'expression de diverses molécules telles que CCR6 ou CXCR3 pourrait être associée à la différence de polarisation des T_{FH} observées dans diverses pathologies.

b. Les molécules de co-stimulation

Chez la souris, quelques études ont démontré l'importance des molécules de co-stimulation dans la régulation des T_{FH} . En premier lieu, l'interaction entre PD-1 et PD-L1 fournit des signaux inhibiteurs aux T_{FH} afin de limiter leur expansion et par conséquent, contrôler la réponse humorale (Hams et al., 2011). Par ailleurs, BTLA, un autre récepteur inhibiteur limite le développement des LB du CG et la production d'IgG en inhibant la production d'IL-21 par les cellules T_{FH} (Kashiwakuma et al., 2010). De plus, CTLA-4, molécule apportant également des signaux inhibiteurs, joue un rôle crucial dans la fonction des T_{FH} . Deux études ont décrit la même année que CTLA-4, exprimée sur les Tregs, contrôle l'activation des T_{FH} et le développement des CG (Sage et al., 2014a; Wing et al., 2014). En résumé, les molécules de co-stimulation régulent la génération et à la fonction des T_{FH} , en fournissant à ces cellules des signaux activateurs, via ICOS ou CD28 et inhibiteurs par l'intermédiaire de PD-1 ou BTLA (Figure 9).

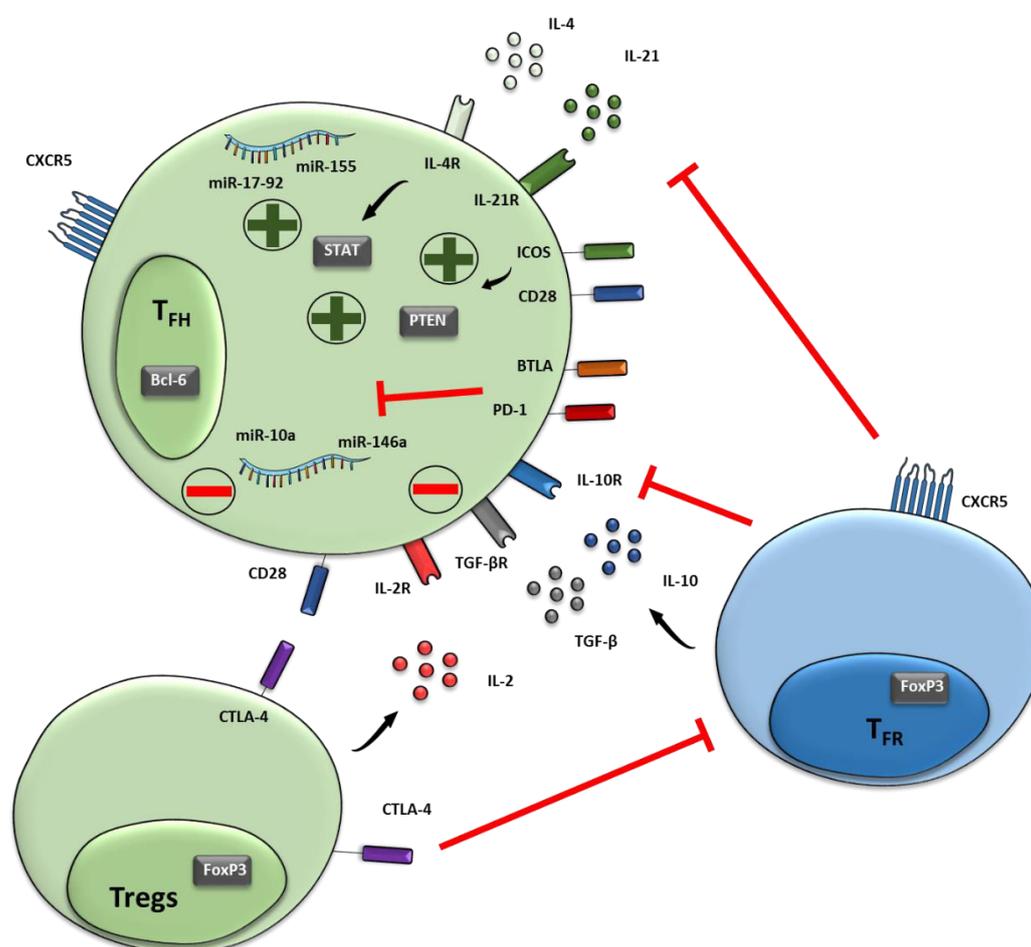


Figure 9. La régulation moléculaire et cellulaire des T_{FH} .

La régulation du nombre et de la fonction des T_{FH} est assurée par un ensemble de molécules de co-stimulation, de cytokines, de microARNs et de cellules régulatrices. Les signaux positifs assurés par ICOS, qui active la voie PI3K/PTEN, par la sécrétion de cytokines telles que l'IL-21 et l'IL-4 ou par l'expression de certains microARNs (miR-155 ou miR-17-92) sont contrebalancés par les molécules inhibitrices, et la production de cytokines telles que l'IL-10 et le TGF- β par les T_{FR} .

c. Les cytokines

L'IL-2 et sa voie de signalisation représentent un mécanisme important dans la régulation de la différenciation des T_{FH} . En effet, la liaison de l'IL-2 à son récepteur induit l'expression de PRDM1 (« PR Domain zinc finger protein 1 »), également appelé Blimp-1, par une voie de signalisation dépendante de STAT5. Blimp-1 agit en réprimant l'expression de Bcl-6 (**Ballesteros-Tato et al., 2012**) (*Figure 7*). De plus, une forte production d'IL-2 favorise la polarisation des LT $CD4^+$ naïfs en T_{H1} en induisant l'expression de T-bet, facteur de transcription répresseur de Bcl-6. A l'inverse, l'IL-4 et l'IL-21, comme indiqué précédemment, induisent la différenciation des LT $CD4^+$ en T_{FH} , en activant les voies de signalisation dépendantes de STAT3 et STAT4 et en favorisant l'activation de BATF notamment.

d. Les cellules T folliculaires régulatrices (T_{FR})

En 2011, Linterman *et al.* ont décrit une population de cellules T régulatrices exprimant conjointement des marqueurs spécifiques des T_{FH} (Bcl-6, CXCR5, ICOS, PD-1) et des marqueurs de Tregs (CD25, FoxP3). Ces cellules, d'origine thymique, se situent dans les CG et possèdent des capacités suppressives (**Linterman et al., 2011**). En effet, en absence de T_{FR} , une augmentation du nombre total de T_{FH} et de LB du CG ainsi qu'une augmentation de la production d'Ig a été observée. De plus, les T_{FR} possèdent la capacité d'inhiber la production d'IL-4 et d'IL-21 par les T_{FH} , réduisant ainsi leur nombre, ainsi que la production d'Ac et la commutation isotypique par les LB (**Sage et al., 2016**). D'autre part, le nombre et la fonction des T_{FR} sont influencés par l'expression de CTLA-4 à la surface des Tregs. En effet, alors que l'absence de ce récepteur co-inhibiteur à la surface des Tregs induit une augmentation du nombre de T_{FR} , ces cellules présentent des capacités suppressives réduites (**Sage et al., 2014a; Wing et al., 2014**) (*Figure 9*).

De manière analogue aux Tregs, les T_{FR} produisent des cytokines régulatrices telles que l'IL-10 et le TGF- β , régulant la formation des CG et la fonctionnalité des T_{FH} (**McCarron and Marie, 2014; Sage and Sharpe, 2015**). Cependant, une étude a mis en évidence en réalisant des co-cultures T_{FH} -LB du CG en présence ou non de T_{FR} , que de forts taux d'IL-10 sont détectés dans les surnageants de co-cultures dépourvues de T_{FR} par rapport aux cultures en présence de T_{FR} . Les auteurs décrivent alors que les T_{FR} inhibent la production d'IL-10, résultat contradictoire avec les fonctions connues de ces cellules. Afin d'expliquer ces résultats, les auteurs suggèrent que l'IL-10 produite par les T_{FH} peut contribuer à la survie et à la prolifération des LB, les T_{FR} supprimant de ce fait les signaux favorables aux LB (**Levy and Brouet, 1994**).

Chez l'Homme, une population de cellules exprimant simultanément FoxP3, Bcl-6 et CXCR5 a été mise en évidence dans les amygdales (**Chung et al., 2011**). Comme chez la souris, les T_{FR} humaines exercent leur fonction au sein des follicules des OLS. L'accès restreint aux OLS chez l'Homme a conduit à

intensifier les recherches de ces cellules dans la circulation. Il a été rapidement décrit que certaines Tregs expriment CXCR5 en périphérie chez l'Homme (**Lim et al., 2006**). Les LT CD4⁺ CXCR5⁺FoxP3⁺ ont alors été identifiés par plusieurs groupes, en tant que T_{FR} circulants (**Dhaeze et al., 2015; Wang et al., 2013; Wen et al., 2016**). Cependant, comme chez la souris, ces cellules possèdent des capacités inhibitrices atténuées par rapport à leurs homologues tissulaires (**Sage et al., 2014b, 2016**). Récemment, une étude a décrit que les T_{FR} circulantes présentent un phénotype naïf par rapport aux T_{FR} retrouvées dans les OLS. Dans cette étude, les auteurs considèrent les T_{FR} circulantes comme des cellules immatures, générées dans les OLS avant l'interaction T-B et possédant des fonctions régulatrices de la réponse humorale limitée (**Fonseca et al., 2017**).

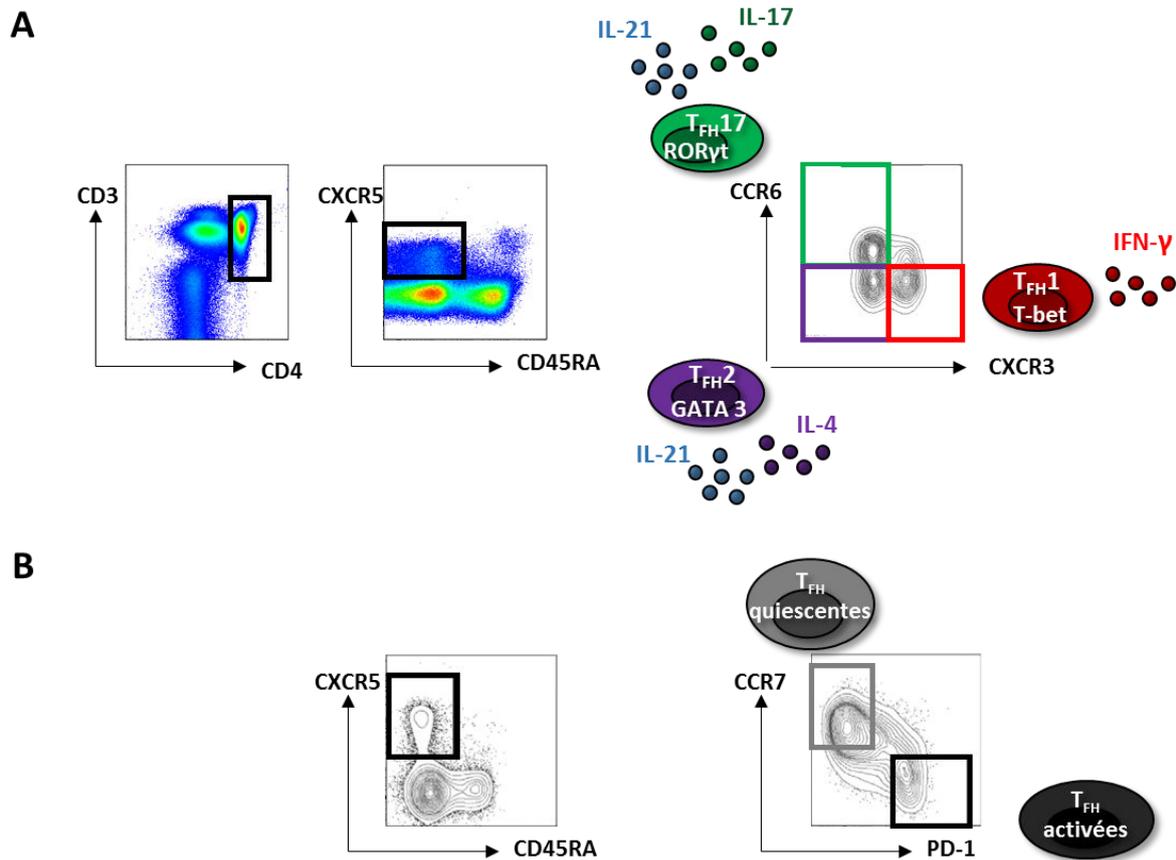
5. Implication des cellules T_{FH} dans le LED

La fonction principale des T_{FH} consiste à réguler la sélection clonale des LB du CG et à fournir aux LB, l'aide nécessaire à la production d'Ig de haute affinité. Dans les maladies auto-immunes telles que le LED, une activation anormale des LB et une production élevée d'auto-Ac sont observées. C'est pourquoi des défauts de différenciation, de fonction et de régulation des cellules T_{FH} sont suspectés de jouer un rôle dans la pathogénèse lupique. Les premières analyses menées sur le rôle des T_{FH} dans le développement du lupus sont basées sur les études de souris déficientes pour Roquin, une ubiquitine ligase régulant négativement la stabilité de l'ARNm d'ICOS. Ces souris présentent un nombre anormalement élevé de T_{FH}, phénomène associé à une réponse humorale excessive, à une production importante d'IL-21 et au développement d'un phénotype « lupus-like » (**Linterman et al., 2009; Vinuesa et al., 2005**). Par ailleurs, il a été décrit que l'IL-21, principale cytokine produite par les T_{FH}, est présente à des taux élevés dans les modèles de souris lupiques. En effet, des niveaux importants d'ARNm d'IL-21 ainsi qu'un fort taux d'IL-21 sérique ont été détectés chez des souris BXS^B.Yaa, développant une pathologie similaire au LED (**Ozaki et al., 2004**). De plus, les LT CD4⁺ activés de souris lupiques MRL^{lpr/lpr} produisent 10 fois plus d'IL-21 que ceux de souris contrôles (**Herber et al., 2007**). De manière intéressante, une amélioration de la maladie lupique développée par les MRL^{lpr/lpr} est observée lors du blocage du récepteur à l'IL-21 à l'aide d'une protéine de fusion IL-21R-Fc ou chez les souris MRL^{lpr/lpr} IL-21R^{-/-} (**Herber et al., 2007; Rankin et al., 2012**). Par ailleurs, dans les OLS de souris BXS^B.Yaa et MRL^{lpr/lpr}, un nombre important de cellules T_{FH} sont localisées en périphérie des CG, où elles favorisent la différenciation de LB extrafolliculaires et de plasmablastes (**Bubier et al., 2007; Odegard et al., 2008**). Ce mécanisme de production d'Ig par les LB extrafolliculaires a été décrit comme crucial dans la génération d'auto-Ac à haute affinité chez les souris MRL^{lpr/lpr} (**William et al., 2002**). Chez l'Homme, les taux sériques d'IL-21 se retrouvent particulièrement élevés chez les patients atteints de LED, plus particulièrement chez les patients présentant des néphrites lupiques (**Le Coz et al., 2013; Wang et al., 2007b**). De plus, une augmentation du transcrit de l'IL-21 a été décrite dans des

biopsies de peau provenant de 3 patients lupiques par rapport à des individus contrôles (**Caruso et al., 2009**). Ces observations sont confirmées par l'augmentation significative du pourcentage de LT CD4⁺ produisant de l'IL-21 en circulation chez les patients lupiques (**Dolff et al., 2011**). Enfin, certains polymorphismes observés dans les gènes codant pour l'IL-21 et son récepteur augmentent le risque de développer un LED. L'un de ces SNPs, nommé rs3093301, correspondant à une mutation ponctuelle dans l'IL-21R, est associé au lupus dans deux cohortes indépendantes (**Webb et al., 2009**). Deux SNPs localisés dans les régions introniques du gène de l'IL-21 ont également été associés au LED (**Sawalha et al., 2008**), ainsi qu'un variant allélique de l'IL-21 (rs2055979A), qui contribue à une augmentation de la production d'IL-21 (**Lan et al., 2014**).

Les cellules T_{FH} sont par définition localisées dans les OLS, rendant leur étude complexe chez l'Homme, où les tissus lymphoïdes sont difficilement accessibles. Les premières études menées chez l'Homme ont mis en évidence l'existence de cellules CD4⁺CXCR5⁺ dans le sang. Ces cellules en circulation sont appelées T_{FH} circulants ou cT_{FH}. Simpson *et al.* ont décrit une augmentation de la fréquence des cT_{FH} chez les patients lupiques par rapport aux individus sains (**Simpson et al., 2010**). De plus ces cT_{FH} de patients lupiques présentent un phénotype particulier, où l'expression de PD-1 et d'ICOS est fortement augmentée par rapport aux contrôles. Plusieurs études ont confirmé par la suite que la fréquence de ces cellules en périphérie est positivement corrélée à l'activité de la maladie (**Choi et al., 2015a; Feng et al., 2012; Szabó et al., 2016; Zhang et al., 2015b**). En 2011, les cT_{FH} ont été plus précisément caractérisés par Morita *et al.* Dans cette étude, les auteurs ont démontré que les cT_{FH} possèdent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles proches des T_{FH} du CG, cellules qu'ils ont nommé cellules « T_{FH}-like » (**Morita et al., 2011**). De plus, les auteurs ont identifié trois sous-populations de cT_{FH}, les T_{FH}1, T_{FH}2 et T_{FH}17, selon l'expression de deux récepteurs aux chimiokines, CXCR3 et CCR6. Ces trois sous-populations expriment des facteurs de transcription et produisent chacune des cytokines qui lui sont propres. Les T_{FH}1 (CXCR3⁺CCR6⁻), expriment T-bet et produisent de l'IFN- γ . Les T_{FH}2 (CXCR3⁻CCR6⁻), expriment GATA3⁺ et sécrètent de l'IL-4. Les T_{FH}17 (CXCR3⁻CCR6⁺), quant à elles, expriment le facteur de transcription ROR γ t et produisent de l'IL-17. L'expression de ces différents facteurs de transcription est associée à une faible expression du facteur de transcription répresseur Bcl-6. Les T_{FH}2 et T_{FH}17 ont été identifiées en tant que cellules apportant l'aide nécessaire aux LB, par l'intermédiaire de leur production importante d'IL-21, et favorisent la production d'IgM et d'IgG par les LB. A l'inverse, les T_{FH}1 semblent produire de plus faibles quantités d'IL-21 et présentent des capacités limitées à aider les LB à se différencier en cellules sécrétrices d'Ac. Chez l'individu sain, la proportion de ces cellules est équilibrée, à savoir que la fréquence de chacune de ces trois populations représente environ 30% des cellules T_{FH} circulantes totales (**Figure 10**). Les auteurs ont confirmé que chez l'Homme, l'aide apportée aux LB par les T_{FH} est dépendante d'ICOS et de la production d'IL-21. Ce travail démontre par ailleurs que seules les cellules CXCR3⁻ (T_{FH}2 et T_{FH}17) aident les LB et pas les cellules CXCR3⁺ (T_{FH}1). Cependant,

une étude a montré 2 ans plus tard que des cT_{FH} $CXCR3^+$ exprimant ICOS aident les LB mémoires (et pas les LB naïfs) à produire des Ac à la suite d'une vaccination contre l'Influenza virus, soulignant tout de même un potentiel d'aide aux LB par ces cellules (Bentebibel et al., 2013).



La contribution des différentes sous-populations de T_{FH} dans le développement de maladies auto-immunes chez l'homme a été décrite pour la première fois par l'étude de Morita *et al.*, qui a décrit une augmentation de la fréquence des T_{FH2} et T_{FH17} au profit des T_{FH1} chez des patients atteints de dermatomyosite juvénile. Cette dérégulation de la balance $T_{FH1}/T_{FH2\text{-}17}$ est plus prononcée chez les

patients présentant un score d'activité de la maladie élevé (**Morita et al., 2011**). Au sein de notre laboratoire, nous avons utilisé la même stratégie afin d'étudier la balance T_{FH1}/T_{FH2-17} chez les patients lupiques. Il a été décrit que la fréquence de la population de T_{FH2} , favorisant la maturation et la différenciation des LB, est augmentée chez les patients lupiques présentant une pathologie active, phénomène associé à une diminution de la fréquence des T_{FH1} (**Le Coz et al., 2013**). De manière intéressante, il apparaît que les patients pour lesquels la fréquence des T_{FH2} en circulation est la plus importante présentent des taux sériques élevés d'IgE, Ig spécifiquement induite par les T_{FH2} . A côté de CXCR3 et CCR6, l'expression de PD-1, ICOS et CCR7, offre une approche supplémentaire pour l'identification des cellules T_{FH} circulantes. En effet, une analyse phénotypique et fonctionnelle en fonction de ces récepteurs a permis de distinguer des cellules T_{FH} activées ($ICOS^+PD1^{high}CCR7^{low}$) et des T_{FH} quiescentes ($ICOS^-PD1^+CCR7^{int}$ et $ICOS^-PD1^-CCR7^{high}$) (**He et al., 2013; Locci et al., 2013**). Chez les patients lupiques, la fréquence des $LT\ CD4^+CXCR5^+ICOS^+PD1^{high}CCR7^{low}$, à savoir les T_{FH} activés est significativement plus élevée que chez les individus sains. Cette augmentation de la fréquence des T_{FH} activés est associée à une forte production d'auto-Ac et à une forte activité de la maladie (**He et al., 2013**). Récemment, il a été suggéré qu'un défaut de régulation des cT_{FH} existe chez les patients lupiques. En effet, la fréquence des T_{FR} , décrits ici en tant que $CD4^+CD25^+CD127^{low-int}CXCR5^+$, est réduite chez les patients lupiques par rapport aux individus sains (**Xu et al., 2017**), alors qu'aucune différence de la fréquence en T_{FH} n'a été observée. L'augmentation du ratio T_{FH}/T_{FR} se retrouve principalement chez les patients présentant un score d'activité élevé, et corrèle avec la production d'auto-Ac anti-ADN double brin. Dans cette étude, les auteurs suggèrent que la fréquence des T_{FR} pourrait être considérée comme un biomarqueur de la maladie lupique. Enfin, une diminution de l'expression de miR-146a, inhibiteur du développement des T_{FH} , a été décrite dans les PBMCs de patients lupiques (**Tang et al., 2009**). Le rôle de ce microARN dans le LED a été confirmé par l'implication d'un variant allélique (rs2431697), décrit dans une région intergénique situé en amont du gène codant miR-146a, dans la diminution de l'expression de miR-146a, et dans la susceptibilité de développer un LED (**Löfgren et al., 2012**).

L'ensemble de ces données démontrent que les T_{FH} , ainsi que leur régulation, participent au développement et à l'aggravation du LED.

6. Les T_{FH} : cible thérapeutique dans le LED ?

a. Evidences chez la souris

Les données obtenues sur différents modèles murins ont mis en évidence que l'inhibition des mécanismes impliqués dans la génération des T_{FH} contribue à l'amélioration de la maladie.

L'inhibition d'ICOSL chez des souris lupiques NZB/W ralentit le développement des T_{FH}, contribuant ainsi à la diminution de la production d'auto-Ac et empêchant le développement de glomérulonéphrites **(Hu et al., 2009)**. Des résultats similaires ont été obtenus chez des souris MRL^{lpr/lpr} déficientes pour ICOS **(Odegard et al., 2008)**. L'inhibition de la voie de signalisation CD40/CD40L, impliquée dans la génération des T_{FH}, conduit également à l'atténuation des symptômes lupiques, comme observé dans différents modèles murins de lupus **(Daikh et al., 1997; Ma et al., 1996)**.

En considérant l'importance de certaines cytokines, comme l'IL-6, l'IL-21 ou BAFF dans le développement et la survie des T_{FH}, cibler ces molécules est considéré comme une stratégie prometteuse dans le traitement du LED. Des souris lupiques MRL^{lpr/lpr}, traitées avec un Ac neutralisant le récepteur à l'IL-6, présentent une amélioration de leur fonction rénale et une diminution de la production d'auto-Ac **(Kiberd, 1993)**. Cette étude a été confirmée plus tard sur un autre modèle murin de lupus, la souris NZB/W. En effet, l'administration chronique d'Ac dirigés contre l'IL-6 ou son récepteur réduisent significativement l'inflammation et de ce fait, diminue la protéinurie, la production d'auto-Ac et améliore la survie de ces animaux **(Finck et al., 1994a; Mihara et al., 1998)**. Par ailleurs, l'inhibition de l'IL-21 à l'aide d'IL-21R-Fc améliore les signes clinique et biologique du lupus chez des souris lupiques MRL^{lpr/lpr} et BXSB.Yaa **(Bubier et al., 2007; Herber et al., 2007)**. Des résultats comparables ont été obtenus en ciblant le récepteur à l'IL-21 à l'aide d'Ac monoclonaux. En effet, l'inhibition de l'IL-21R réduit la production d'auto-Ac, empêche le développement de néphrites et stoppe la progression de la maladie dans différents modèles murins du lupus **(Vugmeyster et al., 2010; Zhang et al., 2015a)**.

D'autre part, en utilisant des particules virales du bactériophage MS2, Pan *et al.* ont restauré l'expression de miR-146a dans des souris BXSB.Yaa, diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires, la production d'Ig et ralentissant la progression du lupus **(Pan et al., 2012b)**. Enfin, une autre stratégie utilisée pour inhiber les T_{FH} est de cibler STAT3, facteur de transcription pivot dans la génération des T_{FH}. L'utilisation d'un inhibiteur de la fonctionnalité de STAT3 (petite molécule appelée « Stattic ») améliore les fonctions rénales et réduit la production d'auto-Ac chez des souris MRL^{lpr/lpr} **(Edwards et al., 2015)**.

b. Ciblage des T_{FH} chez l'homme

Chez l'Homme, plusieurs thérapies existantes ou actuellement en essais cliniques, ciblent indirectement les T_{FH}, et améliorent les symptômes lupiques.

Le Tocilizumab, Ac monoclonal bloquant la chaîne α du récepteur à l'IL-6, a été testé comme traitement du LED et montre des résultats encourageants (Illei et al., 2010). Ce traitement semble prometteur pour les patients lupiques car son efficacité sur le nombre de T_{FH} et sur la production d'IL-21 a été prouvée chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Chavele et al., 2015). Le Belimumab, inhibant l'interaction de BAFF avec ses récepteurs est à l'heure actuelle, le seul traitement spécifique possédant une AMM dans le traitement du LED (cf. Partie I. VI. 2).

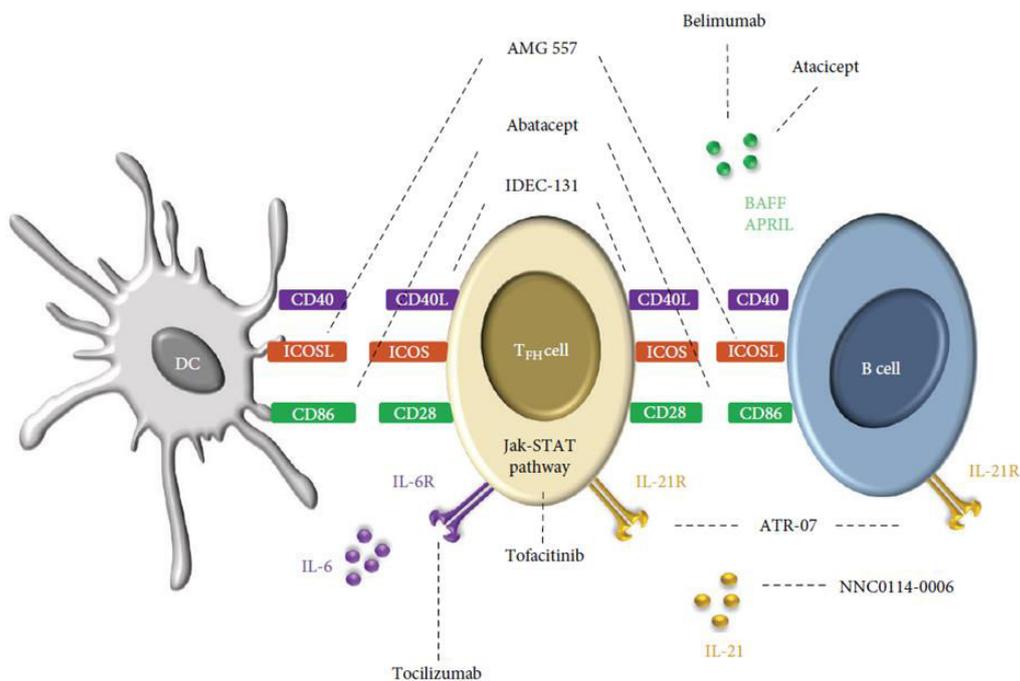


Figure 11. Traitement du LED ciblant des molécules associées aux T_{FH} (Sawaf et al., 2016).

La fonction et la différenciation des T_{FH} peuvent être affectées par différentes molécules, déjà utilisées ou actuellement en essais cliniques dans le traitement du LED. Le Belimumab, l'Atacicept et le NNC0114-0006 sont des anticorps monoclonaux ciblant respectivement les cytokines BAFF, APRIL et IL-21. Par ailleurs, l'inhibition de molécules de co-stimulation à l'aide d'AMG-557 (anti-ICOSL), et IDEC-131 (anti-CD40L) semble limiter la différenciation des T_{FH} en régulant l'interaction T-B. Enfin, une stratégie prometteuse consiste à inhiber les T_{FH} en bloquant les voies de signalisation impliquées dans leur différenciation, soit directement à l'aide du Tofacitinib (inhibiteur de Jak-STAT), soit indirectement en bloquant les récepteurs aux cytokines IL-6 et IL-21 (respectivement le Tocilizumab et ATR-07).

La régulation de l'interaction T-B dans le LED fait l'objet de nombreuses études cliniques. Parmi elles, sont retrouvées le ciblage de molécules de co-stimulation telles CD40L (IDEC-131), d'ICOSL (AMG-557) et de CTLA-4 (Abatacept), de cytokines telles que l'IL-21 (ATR-07 et NNC0114-0006), TACI (Atacicept) ou en inhibant la voie de signalisation Jak/STAT (Tofacitinib) et présentent des résultats plus ou moins prometteurs (*cf. Introduction partie A*) (Figure 11).

L'implication des T_{FH} dans le développement du LED et dans la production d'auto-Ac décrivent ces cellules comme des cibles intéressantes, soit en régulant leur nombre, soit en modulant leurs fonctions. (*Publication 1 : Sawaf et al. Journal of Immunology Research, 2016*).

III. Les acteurs cellulaires régulant les interactions T-B

Afin d'assurer la régulation de la production d'Ig par les LB, le système immunitaire met en jeu différents acteurs cellulaires, contrôlant l'interaction T-B, et empêchant le développement d'anomalies telles que les pathologies auto-immunes.

1. Les cellules T régulatrices

Les Tregs sont des LT CD4⁺ dont les cibles principales sont les cellules T effectrices. Cependant, certaines études ont décrit un effet suppresseur des Tregs sur d'autres types cellulaires tels que les DCs, les mastocytes ou les LB (**Lan et al., 2012; Su et al., 2012; Zhao et al., 2006**). Concernant les LB, il est compliqué de définir si l'inhibition des LB est directe, ou passe indirectement par la régulation des LT CD4⁺. L'effet des Tregs sur les LB (direct ou indirect) a été mis en évidence lors d'un transfert de Tregs dans des modèles murins d'auto-immunité, ce qui a pour conséquence d'atténuer la réponse humorale et de diminuer la production d'auto-Ac (**Seo et al., 2002**). De plus, les patients atteints du syndrome IPEX (« Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked »), présentant des mutations dans le gène codant pour FoxP3, possèdent des taux élevés d'auto-Ac dans leur sérum, suggérant un rôle des Tregs dans la régulation des LB auto-réactifs (**Tsuda et al., 2010**). Il apparaît que les Tregs participent à maintenir la tolérance périphérique chez l'Homme, car ces patients IPEX présentent une accumulation de clones auto-réactifs de LB mature naïfs (**Kinnunen et al., 2013**). De manière intéressante, il est décrit dans cette étude que les LT des patients IPEX surexpriment CD40L, PD-1 et ICOS par rapport aux individus sains, suggérant que l'action des Tregs sur les LB est probablement indirecte et passe par une inhibition des LT. Finalement, Lim *et al.* ont décrit un effet direct des Tregs sur les LB, indépendant de la présence de LT, où les Tregs inhibent l'activation, la prolifération et la production d'Ig des LB (**Lim et al., 2005**). Il a été décrit par la suite, dans un modèle de souris transgénique, que cette suppression directe est dépendante de l'expression de PD-1 à la surface des LB auto-réactifs et de celle de PD-L1 à la surface des Tregs (**Gotot et al., 2012**).

Plusieurs études ont décrit qu'une diminution du nombre de Tregs contribue au développement du LED (**Crispin et al., 2003; Liu et al., 2004; Miyara et al., 2005**), cependant, les données sur leurs capacités suppressives chez les patients lupiques sont contradictoires. En effet, deux études décrivent des capacités inhibitrices réduites des Tregs de patients lupiques (**Bonelli et al., 2008; Valencia et al., 2007**), alors que la fonction suppressive des Tregs ne semble pas être altérée pour d'autres groupes. D'une part, chez l'Homme, une diminution d'expression du facteur de transcription FoxP3 (« Forkhead box P3 ») a été associée à une altération des fonctions suppressives des Tregs (**Lyssuk et al., 2007; Valencia et al., 2007**). Cependant, il apparaît qu'une activation de ces cellules *in vitro* permet restaurer les capacités inhibitrices des Tregs. A l'inverse, Miyara *et al.* ont révélé que bien que la fréquence de ces cellules soit diminuée, l'activité suppressive des Tregs n'est pas altérée, mais ces cellules sont plus sensibles à l'apoptose dépendante de Fas (**Miyara et al., 2005**). De plus, les LT effecteurs semblent être moins sensibles à la suppression par les Tregs chez les patients lupiques (**Venigalla et al., 2008**). Comment expliquer ces différentes observations ? Tout d'abord, il ne faut pas sous-estimer l'hétérogénéité de la maladie lupique, ainsi que l'influence des différents traitements pouvant interagir avec ces différentes populations cellulaires. En effet, une forte dose de méthylprednisone, un corticostéroïde, augmente la fréquence des Tregs chez les patients lupiques (**Mathian et al., 2015**). Ensuite, la caractérisation et l'identification des Tregs est un sujet de débat important. C'est en 2009 que chez l'Homme, trois sous-populations de cellules ont été identifiées, exprimant toutes FoxP3, mais possédant des capacités suppressives différentes (**Miyara et al., 2009**). Au cours de cette étude, l'expression de l'isoforme du CD45, CD45RA et de FoxP3 a permis d'identifier trois populations dont une qui ne possède pas de fonctions suppressives (rTregs : CD4⁺CD45RA⁺FoxP3^{int}). Miyara *et al.* décrivent une diminution des LT CD4⁺ régulateurs possédant les plus fortes capacités suppressives (aTregs : CD4⁺CD45RA⁺FoxP3^{high}), alors que la fréquence des deux autres populations est augmentée chez les patients lupiques présentant une forte activité. Toutefois, quelques années plus tard, il a été décrit qu'un défaut fonctionnel des cellules Tregs naïves CD45RA⁺FoxP3^{low} est associé au développement du LED (**Pan et al., 2012a**).

Alors que leur effet sur les LT de patients lupiques demeure controversé, il a été décrit que chez les patients atteints de LED, les Tregs limitent le développement de la pathologie en éliminant directement les LB auto-réactifs, à l'aide de la libération de perforine et de granzyme B (**Iikuni et al., 2009**).

2. Les cellules T CD8⁺ suppressives

En plus des LT CD4⁺ régulateurs, les cellules T CD8⁺ suppressives représentent une autre population de cellules T régulatrices. Bien qu'elles soient moins précisément caractérisées, ces cellules expriment FOXP3 et présentent des fonctions suppressives. Les premières observations ont décrit une population de LT CD8⁺ supprimant l'aide des LT aux LB (**Noble et al., 1998**). Ces cellules possèdent la capacité de

cibler Qa-1 (HLA-E chez l'Homme), une molécule analogue au CMH, interagissant avec leur TCR. De manière intéressante, Qa-1 est préférentiellement exprimé à la surface des T_{FH} par rapport aux LT CD4⁺ non-T_{FH} (**Kim et al., 2010**). L'inhibition de l'interaction T_{FH}-LT CD8⁺ suppressives induit une rupture de tolérance, à l'origine du développement d'une maladie « lupus-like » caractérisée par la production d'auto-Ac anti-ADN. De manière analogue aux Tregs conventionnelles, les LT CD8⁺ suppressives sont sensibles à l'IL-2. En effet, un traitement à faible dose d'IL-2 induit une expansion de ces cellules, supérieure à celle observée pour les Tregs (**Kim et al., 2010**). Chez l'Homme, la fréquence de ces cellules en périphérie est faible, et leur fonction demeure peu connue. Cependant, il a été décrit que les LT CD8⁺ suppressives de primates non-humains possèdent des capacités inhibitrices similaires aux Tregs (**Aoyama et al., 2012**), soulignant l'intérêt de considérer le rôle des LT CD8⁺ suppressives dans la régulation de la réponse humorale et dans le maintien de la tolérance au soi en périphérie.

3. Les cellules B régulatrices (Bregs)

Chez l'individu sain, le contrôle des processus inflammatoires est principalement assuré par la libération de cytokines anti-inflammatoires, cytokines parmi lesquelles l'IL-10 est considéré comme l'acteur principal de ces mécanismes régulateurs. Depuis le début des années 2000, une population de LB, sécrétant de l'IL-10, et capable d'inhiber l'inflammation et le développement de l'auto-immunité a été décrite (**Fillatreau et al., 2002; Mauri and Bosma, 2012**). Bien que les Bregs soient principalement caractérisées par la production d'IL-10, de nombreuses sous-populations de Bregs, supprimant l'activation de différents types cellulaires tels que les LT, les cellules NK ou les neutrophiles ont été décrites (**Rosser and Mauri, 2015**). Chez l'Homme, des cellules CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} produisant de l'IL-10 sont retrouvées en circulation et sont recrutées aux sites d'inflammation. Ces cellules suppriment l'activation des T_{H1} et des T_{H17}, contribuent à l'homéostasie des cellules NKT invariantes et inhibent la réponse CD8⁺ spécifique lors d'infections virales. Par ailleurs, il existe des mécanismes inhibiteurs des Bregs indépendants de l'IL-10. En effet, les Bregs favorisent l'expression de PD-1 sur les Tregs, produisent de l'IL-35, une autre cytokine régulatrice et induisent l'apoptose des LT via l'interaction Fas/FasL (**Ray and Dittel, 2017**). De manière intéressante, les Bregs CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} présentent un défaut fonctionnel chez les patients lupiques, où leur sensibilité au signal CD40L se retrouve diminuée, ainsi que leur capacité à produire de l'IL-10 (**Blair et al., 2010**).

4. Les plasmocytes

Les plasmocytes, cellules sécrétrices d'Ac possèdent la capacité de réguler la réponse humorale. Ce rôle peu conventionnel a été mis en évidence chez des souris déplétées de plasmocytes, qui présentent une activité T_{FH} défectueuse, suggérant l'existence d'un rétrocontrôle négatif (**Pelletier et al., 2010**). Les fonctions suppressives des plasmocytes proviennent de leur capacité à présenter l'antigène,

réduisant l'expression de Bcl-6 et la production d'IL-21 par les T_{FH} au sein des CG. En effet, les plasmocytes entrent en compétition avec les autres CPA et limiteraient l'expansion des cellules T_{FH} (Pelletier et al., 2010). La fonction régulatrice des plasmocytes a été confirmée récemment, suggérant que les plasmocytes à longue durée de vie, accumulés dans les CG de souris développant des syndromes auto-immuns, contribuent à la différenciation des T_{FH} , et à la persistance d'une réponse humorale excessive dans un contexte auto-immun (Jang et al., 2016).

L'ensemble de ces données démontrent que l'interaction T-B se retrouve sous le contrôle de nombreux mécanismes de régulation, portés par différents effecteurs cellulaires (Figure 12). Ces cellules, parmi lesquelles sont retrouvées les T_{FR} et les Tregs, limitent l'expansion non contrôlée des LT et des LB, notamment en produisant des facteurs solubles tels que les cytokines. Cependant, bien que ces facteurs solubles semblent indispensables à la régulation de la réponse humorale, des interactions cellule-cellule demeurent également essentielle à ce mécanisme.

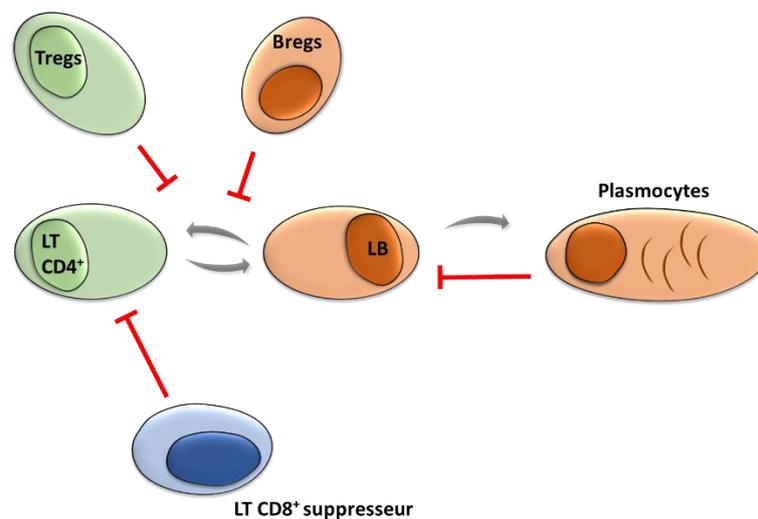


Figure 12. Les acteurs cellulaires régulant les interactions T-B.

Les plasmocytes, les Tregs, les cellules T_{CD8^+} suppressives et B régulatrices participent à la régulation de la réponse humorale en contrôlant l'homéostasie des T_{FH} et leur interaction avec les LB.

IV. Les acteurs moléculaires régulant les interactions T-B

La reconnaissance spécifique d'un Ag présenté par le CMH déclenche l'activation du TCR et des voies de signalisation associées. Un mécanisme similaire est observé pour les LB, où la reconnaissance des Ag, dépendante ou non des LT, déclenche une cascade d'activation au sein de ces cellules. Cependant, un ensemble de molécules co-stimulatrices et co-inhibitrices déterminent le devenir de ces cellules, en régulant, positivement ou négativement, l'activation des LT et des LB.

1. Les molécules co-activatrices dans la régulation de l'interaction T-B

Deux grandes familles de molécules co-stimulatrices participent à la régulation de l'intensité et de la durée de la réponse immunitaire : la superfamille des Ig et la famille des TNF. Au sein de la famille des Ig, sont retrouvées un nombre important de molécules activatrices telles que CD28 ou ICOS, alors que CD40 et ses ligands ainsi que OX40 ou HVEM sont des représentants de la famille des TNF. L'absence de molécules co-activatrices limite la transcription de gènes, rendant les cellules anergiques à long terme.

CD28 : CD28, une molécule exprimée à la surface des LT fournit des signaux positifs renforçant le signal du TCR (**Coyle and Gutierrez-Ramos, 2001**). L'interaction de CD28 avec CD80 ou CD86, exprimées à la surface des LB et des autres CPA, active différentes voies de signalisation telles que les voies AP-1, NFAT et NF- κ B et favorise l'augmentation des flux calciques intracellulaires (**Acuto and Michel, 2003**). L'activation de CD28 est requise pour la génération des Tregs, bien qu'elle ne soit pas nécessaire à leur fonction (**Salomon et al., 2000**). L'importance de l'interaction CD28-CD80/86 dans la communication T-B a été définie par le phénotype des souris CD28^{-/-} présentant une incapacité à former des CG (**Walker et al., 1999**). De plus, l'interaction entre CD80 à la surface des LB des CG et CD28 sur les LT est essentielle au maintien et à la fonction des T_{FH} à la suite d'une infection (**Salek-Ardakani et al., 2011**).

ICOS : ICOS, une molécule présente à la surface des LT, interagit avec son ligand ICOSL à la surface des cellules présentatrices d'Ag. Alors que CD28 fournit des signaux activateurs aux cellules naïves ou quiescentes, ICOS exerce ces fonctions sur les cellules activées (**Wallin et al., 2001**). Ce phénomène s'explique par l'expression différentielle de CD28, exprimé de manière constitutive à la surface des LT, comparée à ICOS, exprimé suite à une activation des cellules T. Le rôle d'ICOS dans la régulation de la communication T-B a déjà été discuté (*Partie B. II.*). ICOS apporte les signaux indispensables à la génération des T_{FH}, induisant notamment l'expression de Bcl-6, stabilisant l'interaction entre pré-T_{FH} et LB, et finalement en participant au maintien des T_{FH} dans les CG. La signalisation par la PI3K, associée à CD28 et à ICOS est responsable de l'activation des LT, et dans les OLS, oriente la différenciation des pré-T_{FH} en T_{FH} (*Figure 7-8*).

CD40 : Afin d'induire la maturation des LB en cellules sécrétrices d'Ac, l'interaction CD40/CD40L demeure la voie de costimulation majeure (**Hasbold et al., 1998**). Cette liaison est bidirectionnelle. En effet, l'expression de CD40 à la surface des LB induit l'activation des cellules T, favorisant ainsi la différenciation des LT naïfs en LT mémoires (**Hoffman et al., 2016**). De plus, comme les autres molécules de la famille des TNFR, l'interaction CD40/CD40L permet la survie cellulaire, favorise la prolifération cellulaire et induit la production cytokinique (**Croft, 2009**). A l'opposé, l'expression de

CD40L par les T_{FH} fournit aux LB des signaux déclenchant les processus de différenciation et de commutation isotypique (**Ueno et al., 2015**).

OX40 : OX40, un autre membre de la famille des TNFR, joue un rôle crucial dans la différenciation des LT en T_{FH} . En effet, l'interaction entre OX40L à la surface des cellules présentatrices d'Ag, et OX40 à la surface des LT, induit l'expression de nombreuses molécules associées aux T_{FH} par les LT $CD4^+$ naïfs et mémoires, cellules possédant alors la capacité d'aider les LB à se différencier (**Jacquemin et al., 2015**).

Le grand nombre de récepteurs de co-stimulation régulant positivement l'interaction T-B et contribuant au bon fonctionnement de la réponse humorale requiert un autre niveau de régulation, négative cette fois-ci, afin de prévenir une activation exacerbée.

2. Les molécules co-inhibitrices dans la régulation de l'interaction T-B

CTLA-4 : Le plus étudié des récepteurs inhibiteurs est CTLA-4. Comme CD28, CTLA-4 une molécule pouvant interagir avec CD80 et CD86 à la surface des CPA myéloïdes et des LB. De plus, l'affinité de CTLA-4 pour ces deux récepteurs est significativement plus forte que celle de CD28. L'expression de CTLA-4 est restreinte aux cellules T activées, agissant ainsi comme un mécanisme de régulation de ces cellules, en exerçant un rétrocontrôle de l'activation des LT $CD4^+$. L'engagement de la voie de signalisation de CTLA-4 inhibe la production d'IL-2 et la prolifération cellulaire en réponse à une stimulation du TCR, et il a été décrit que le blocage de CTLA-4 augmente la réponse des T_H *in vitro* et *in vivo* (**Thompson and Allison, 1997**). L'engagement de CTLA-4 déclenche le recrutement des phosphatases SHP-2 et PP2A, exerçant une action opposée aux kinases associées au TCR et à CD28. Ce recrutement a pour effet d'inhiber la phosphorylation de diverses voies de signalisation telles que JNK ou ERK pour SHP-2 et AKT pour PP2A. Cet effet inhibiteur semble toutefois indépendant de ZAP-70 et de la chaîne ζ du TCR, mais dépendant de LAT (**Calvo et al., 1997; Nakaseko et al., 1999**). Ce contrôle de l'activation des LT $CD4^+$ a pour effet de réduire la communication entre ces cellules et les LB. En effet, l'expression de CTLA-4 permet de contrôler la génération et l'expansion des T_{FH} et régule la formation des CG en interagissant avec CD80 et CD86 (**Sage et al., 2014a; Wing et al., 2014**).

PD-1 : PD-1 est un autre récepteur co-inhibiteur interagissant avec deux ligands, PD-L1 et PD-L2 (**Freeman et al., 2000; Latchman et al., 2001**). L'engagement de PD-1, exprimé à la surface des LT et LB activés, inhibe la prolifération et l'activation des T_H à la suite d'une stimulation TCR dépendante. Contrairement à CTLA-4, PD-1 possède dans sa partie cytoplasmique un motif tyrosine inhibiteur appelé ITIM et un motif ITSM, permettant le recrutement de SHP-1 et SHP-2. A la suite d'une activation, PD-1 se retrouve localisé au niveau des microclusters de TCR, et déphosphoryle les premiers messagers du TCR tel que ZAP-70 (**Sheppard et al., 2004**). L'expression de PD-1 est nécessaire à la régulation de la réponse humorale comme en atteste le fort taux d'Ac et d'auto-Ac produits par les LB

de souris déficientes pour PD-1 (**Nishimura et al., 1999**). Par ailleurs la délétion génétique de PD-1 ou d'un de ses ligands chez la souris démontre que la signalisation de PD-1 régule la survie et la sélection des LB dans les CG, contrôlant le nombre de plasmocytes à longue durée de vie (**Good-Jacobson et al., 2010**). De plus, chez l'Homme PD-1 régule l'activation des LB, grâce à son recrutement au niveau du BCR à la suite d'une activation du TLR9, et en inhibant la cascade d'activation, comme ce qui a été décrit pour les LT (**Thibult et al., 2013a**).

LAG-3, TIM-3, TIGIT : Bien que d'autres molécules co-inhibitrices existent à la surface des LT et des LB, leur implication dans le contrôle de l'interaction T-B n'a pas été clairement établie. LAG-3 (« Lymphocyte-Activated Gene 3 »), TIM-3 (« T-cell Immunoglobulin and Mucin-containing protein 3 ») et TIGIT (« T cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains ») limitent l'activation et la différenciation des T_H, leur effet sur la réponse humorale étant cependant peu décrit. LAG-3 est un récepteur exprimé à la surface des LT CD4⁺ et des cellules NK, qui possède un effet inhibiteur agissant en synergie avec PD-1/PD-L1. Ce récepteur interagit avec le CMH-II et régule négativement la prolifération cellulaire, l'activation et l'homéostasie des T_H. De plus, il semble jouer un rôle dans les fonctions suppressives des Tregs (**Sega et al., 2014**). Enfin, une étude a démontré que LAG-3 est exprimé à la surface des LB, à la suite d'une activation dépendante des LT (**Kisielow et al., 2005**). Alors que TIM-3 semble être impliqué dans la régulation de la réponse cytotoxique (**Le Mercier et al., 2015**), l'expression de TIGIT à la surface des T_{FH} semble favoriser l'aide apportée aux LB par ces cellules (**Godefroy et al., 2015**). En effet, les cT_{FH} TIGIT⁺ expriment fortement ICOS, CD40L et produisent une quantité importante d'IL-21 par rapport aux cT_{FH} TIGIT⁻. De plus ces cT_{FH} TIGIT⁺ induisent fortement la différenciation des LB en plasmablastes, suggérant que ces cellules représentent une sous-population de T_{FH} possédant de grandes fonctions d'aide aux LB.

BTLA : BTLA est un récepteur co-inhibiteur exprimé entre autre à la surface des cellules T_H (dont les T_{FH}) et des LB. Comme les autres molécules inhibitrices, BTLA permet de contrôler la réponse humorale. Son rôle précis sera précisément détaillé dans la [partie C. de l'Introduction](#).

Pour conclure, l'activation du système immunitaire est régulée par un ensemble de signaux positifs et négatifs, fournis par des récepteurs co-stimulateurs et co-inhibiteurs, exprimés à la surface des différents effecteurs de la réponse humorale. Une balance entre les signaux activateurs et répresseurs permet le maintien de la tolérance au soi, prévenant ainsi le développement de maladies auto-immunes. Un déséquilibre de cette balance contribue à la rupture de tolérance et le rôle de ces différentes molécules dans le développement de maladies auto-immunes, notamment dans le LED, a fait l'objet de nombreuses études durant ces dernières années.

3. Implication des molécules de co-stimulation dans la pathogénèse du LED

De nombreuses voies de signalisation associées aux récepteurs de co-stimulation ont été décrites comme impliquées dans le développement du lupus. En effet, l'expression de CD40L à la surface des T_H de patients lupiques se retrouve exacerbée, contribuant à la production d'auto-Ac (**Desai-Mehta et al., 1996; Katsiari et al., 2002**). De plus, l'expression de CD40 est anormalement retrouvée à la surface des LB et des monocytes de patients lupiques. Par ailleurs, l'engagement de CD40 par CD40L à la surface des LT CD4⁺ stimule la production d'IgG par les LB autologues chez les patientes atteintes de LED (**Zhou et al., 2009**). D'autre part, CD28 et ses ligands jouent un rôle important dans la pathogénèse lupique. En effet, les souris lupiques MRL^{lpr/lpr} déficientes pour CD28 ou CD86 développent des atteintes rénales moins sévères, et présentent une diminution de la sévérité des arthrites (**Liang et al., 1999; Tada et al., 1999**). Cependant, Liang *et al.* ont décrit un rôle paradoxal des molécules B7. En effet, les souris MRL^{lpr/lpr} CD80^{-/-} développent des glomérulonéphrites plus sévères que les animaux contrôles, suggérant que CD80 possède également une activité inhibitrice. Cet effet peut être attribué à l'interaction de forte affinité entre CD80 et les récepteurs co-inhibiteurs CTLA-4 ou PD-L1 (**Butte et al., 2007**). Grâce à ses propriétés inhibitrices, le ciblage des molécules B7 à l'aide de CTLA-4 est une stratégie thérapeutique envisagée afin de contrôler spécifiquement les LT activés au cours du lupus. En effet, l'injection d'une protéine de fusion CTLA-4-Ig à des souris NZB/W prolonge leur survie, réduit la production d'auto-Ac et réduit l'activation des LB et des LT (**Finck et al., 1994b; Mihara et al., 2000**). L'utilisation de l'Abatacept, protéine de fusion composée du domaine extracellulaire du CTLA-4 humain et du domaine Fc d'une IgG1, est bien tolérée et démontre un effet positif sur le développement de néphrites chez les patients (**Furie et al., 2014**). En 2010, le groupe de Michael Ehrenstein a démontré que chez les patients atteints de lupus, la fonctionnalité de CTLA-4 est altérée. En effet, bien que son expression soit augmentée à la surface des LT CD4⁺ de patients *ex vivo* par rapport aux individus sains, sa capacité à inhiber l'activation de ces cellules est réduite. Par rapport aux individus contrôles, CTLA-4 ne régule plus la prolifération, la formation des microclusters de TCR et n'inhibe plus les voies de signalisation associées au TCR, ni la formation des microdomaines lipidiques chez les patients lupiques (**Jury et al., 2010**). L'ensemble de ces données démontrent que CTLA-4 joue un rôle protecteur dans le LED, et que la restauration de sa fonctionnalité peut être considérée comme une stratégie thérapeutique prometteuse.

Par ailleurs, il a été décrit que le niveau d'expression d'ICOS par les LT CD4⁺ de patients lupiques est augmenté par rapport aux individus contrôles, ce qui contribue à l'augmentation de la fréquence de T_{FH} observée chez les patients (**Hutloff et al., 2004; Yang et al., 2005**). De plus, le niveau d'expression d'ICOS est plus élevé chez les patients développant des néphrites que chez les patients sans atteinte rénale (**Li et al., 2012a**). L'engagement d'ICOS active directement la voie de signalisation PI3K, voie

indispensable à la différenciation et à la fonction des cellules T_{FH} (*Figure 7-8*). Au regard de l'importance d'ICOS dans la pathogénèse et dans l'aggravation des symptômes lupiques, le ciblage d'ICOSL (AMG-557 ; *Figure 11*), actuellement en essais cliniques présente un potentiel thérapeutique intéressant.

Chez les patients lupiques, le niveau d'expression d'OX40 sur les LT CD4⁺ mémoires est augmenté et corrélé avec l'activité de la maladie. De plus, OX40 est fortement exprimé par les LT CD4⁺ présents dans les reins de patients présentant des néphrites (**Patschan et al., 2006**). Par ailleurs, un polymorphisme en amont du gène d'OX40, augmentant le niveau d'expression protéique de ce récepteur a été décrit comme associé au risque de développer un LED (**Cunninghame Graham et al., 2008; Manku et al., 2013**). Enfin, l'interaction entre OX40L, sur les DCs et OX40 sur les LT est cruciale dans le développement des T_{FH} (**Jacquemin et al., 2015**). En effet, dans cette étude, il est décrit que l'axe OX40/OX40L favorise le développement de T_{FH} ICOS⁺, et contribue à la génération d'auto-Ac et de complexes immuns contenant de l'ARN chez les patients lupiques.

Alors qu'une expression aberrante des molécules co-activatrices promeut le développement du LED, les mécanismes co-inhibiteurs sont requis pour limiter la pathogénèse lupique. Des polymorphismes dans PDCD1, gène codant pour PD-1, ont été associés au risque de déclencher un LED (**Okazaki and Honjo, 2007; Prokunina et al., 2002**). L'importance de PD-1 dans le contrôle de l'auto-immunité a été mis en évidence chez la souris où un modèle de souris C57BL6 PD-1^{-/-} développent des symptômes « lupus-like » (**Nishimura et al., 1999**). Cette observation a été confirmée par l'inhibition de PD-L1 chez la souris lupique NZB/W, qui précipite le développement de néphrites lupiques et accroît la mortalité de ces souris (**Kasagi et al., 2010**). A l'inverse, l'inhibition de PD-1 limite le développement de néphrites et améliore les capacités suppressives des LT CD4⁺ et CD8⁺ (**Kasagi et al., 2010; Wong et al., 2010, 2013**). Ces résultats contradictoires conduisent à être prudent dans l'utilisation du ciblage de la voie PD-1/PD-L1 comme stratégie thérapeutique dans le LED. En effet, l'expression de PD-1 sur les LT activés mais également sur les T_{FR} (**Sage et al., 2013**) complique les possibilités thérapeutiques du ciblage de la voie PD-1/PD-L1.

En résumé, les récepteurs spécifiques des lymphocytes T et B (TCR et BCR) sont les principaux acteurs de l'activation lymphocytaire. Cependant, de nombreux signaux secondaires, délivrés par les molécules co-stimulatrices et co-inhibitrices orientent, régulent et participent à l'homéostasie du système immunitaire. En effet, l'activation des LT est finement régulée par des signaux positifs, incluant principalement les récepteurs comme CD28 et ICOS. Ces signaux positifs sont contrebalancés par la présence de récepteurs co-inhibiteurs tels que CTLA-4 et PD-1. Une dérégulation de l'expression ou de la fonction de ces molécules fragilise l'équilibre de la réponse immunitaire et favorise l'émergence d'auto-immunité (*Figure 13*).

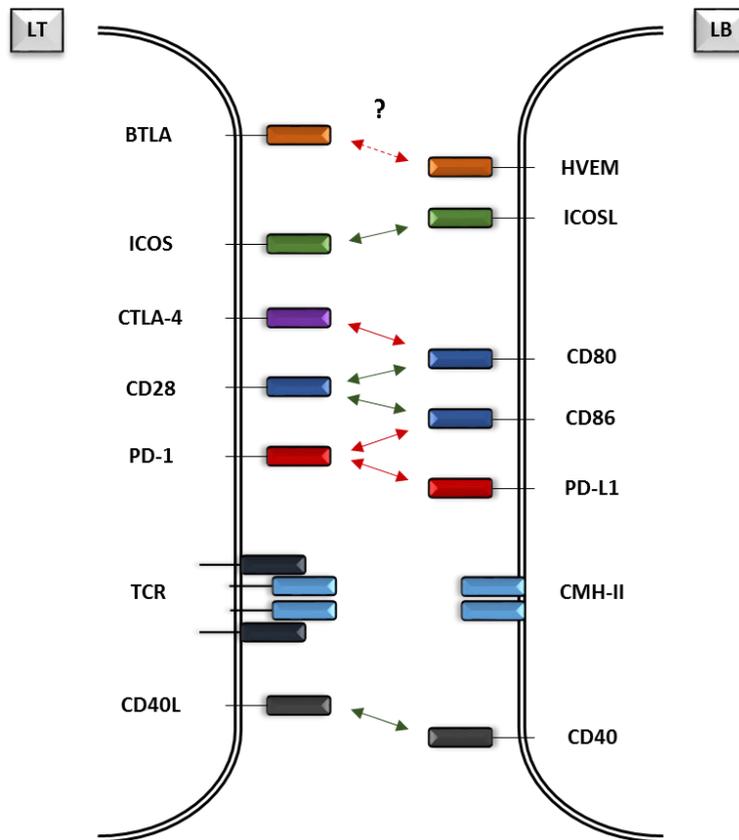


Figure 13. Les molécules de costimulation impliquées dans le développement du LED.

Un défaut d'expression et/ou de fonction d'une ou plusieurs molécules co-activatrices ou co-inhibitrices participe à la rupture de tolérance périphérique observée dans le cadre du LED. Des récepteurs inhibiteurs non-fonctionnels tels que PD-1 ou CTLA-4, et/ou la surexpression de molécules activatrices telles que CD40L ou ICOS participent à l'hyperactivation des LT et des LB, pouvant expliquer la réponse immunitaire exacerbée caractéristique du lupus.

C. LE RECEPTEUR CO-INHIBITEUR BTLA

I. Structure / Interaction

1. Structure de BTLA

B and T Lymphocyte Attenuator (BTLA ou CD272) est une molécule co-inhibitrice, membre de la superfamille des Ig, décrite en 2003 pour la première fois par le groupe de Kenneth Murphy (**Watanabe et al., 2003**). BTLA est une protéine d'environ 300 acides aminés, composée d'un domaine Ig de type I extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'une queue intracellulaire présentant différents motifs contenant des tyrosines pouvant être phosphorylés : deux motifs ITIM (Immuno-receptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) (**Watanabe et al., 2003**) et un site de recrutement Grb-2 (Growth factor receptor-bound protein 2) (**Gavrieli and Murphy, 2006; Han et al., 2004**) (*Figure 14*). Il était précédemment acquis que les molécules de la superfamille des Ig interagissent avec les membres de la famille B7 (**Chen, 2004; Sharpe and Freeman, 2002**). Pourtant, BTLA interagit avec un ligand unique de la famille des TNF récepteurs (TNFR) appelé HerpesVirus Entry Mediator (HVEM ; TNFRSF14 ou CD270).

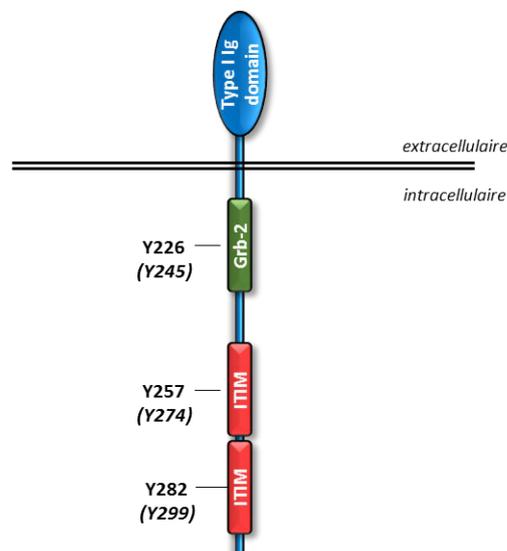


Figure 14. Structure de BTLA.

BTLA est un récepteur membranaire de la superfamille des Ig possédant trois motifs tyrosine dans sa queue intracytoplasmique. Parmi ces motifs, sont retrouvés un site Grb-2, et deux motifs inhibiteurs ITIM permettant le recrutement de phosphatases. Les positions des tyrosines sont indiquées pour la séquence humaine et murine (entre parenthèses).

2. L'interaction non-canonique entre BTLA et HVEM

L'interaction entre BTLA et HVEM est restée une énigme durant plusieurs années. En effet, comment deux protéines à priori structurellement différentes peuvent interagir de manière spécifique ? En 2005, le groupe de K. Murphy a démontré que le domaine CRD1 de HVEM était indispensable à sa liaison avec BTLA (**Sedy et al., 2005**). La même année, Compaan *et al.* ont montré que BTLA interagit avec la partie N-terminale de HVEM, riche en cystéine (**Compaan et al., 2005**) (*Figure 15*). La structure tertiaire de HVEM permet une interaction particulière avec BTLA et différente des autres ligands de HVEM. Cependant, cette étude montre que le domaine extracellulaire de BTLA, de forme monomérique, reconnaît la même surface de HVEM que la glycoprotéine gD de HSV. Ces analyses structurales ont permis de définir une interaction inattendue et inédite entre un TNFR et un récepteur de la superfamille des Ig. Toutefois, BTLA se retrouve en compétition avec de nombreux autres ligands pouvant interagir avec HVEM.

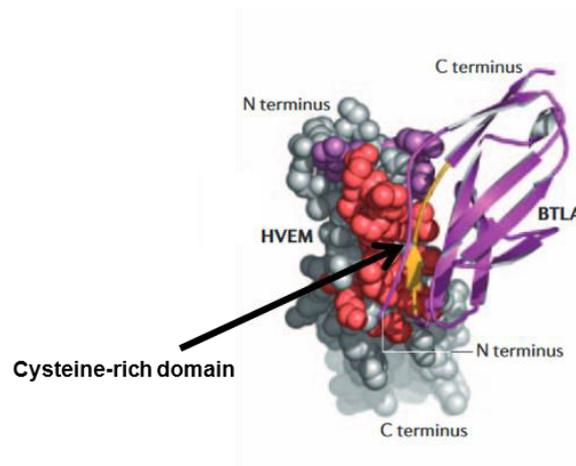


Figure 15. Interaction HVEM / BTLA (d'après Murphy et al., 2006)

Représentation schématique de l'interaction non-canonique entre HVEM et BTLA modélisée d'après les données de structure cristallographique de BTLA (**Compaan et al., 2005**). Cette interaction entre un TNFR et un récepteur de la famille des IgSF dépend de domaines riches en cystéine de BTLA interagissant avec la forme trimérique de HVEM.

3. HVEM : un récepteur pivot aux multiples interactions

En 1996, Montgomery *et al.* ont décrit un récepteur de la famille des TNFR comme un médiateur cellulaire de l'internalisation de nombreuses souches du Herpes Simplex Virus (HSV) dans les lymphocytes T activés (**Montgomery et al., 1996**). L'interaction entre HVEM et la glycoprotéine gD présente à la surface de HSV permet la réaction de fusion membranaire puis l'internalisation des protéines virales, favorisant finalement leur transport au sein du noyau. Avant la découverte de l'interaction entre BTLA et HVEM, de nombreux ligands de ce TNFR ont été identifiés. Les premiers

ligands de HVEM à avoir été décrits furent la lymphotoxine α et LIGHT (« homologous to Lymphotoxin, exhibits Inducible expression and competes with HSV Glycoprotein D for binding to Herpesvirus entry mediator, a receptor expressed on T lymphocytes ») (**Mauri et al., 1998**). La lymphotoxine α est une protéine soluble homotrimerique interagissant également avec les TNFR1, TNFR2 et le récepteur de la lymphotoxine β (LT β R). LIGHT est une protéine membranaire, également organisée en homotrimer (Rooney et al., 2000), se liant elle aussi au LT β R et au récepteur soluble DcR3 (« TNFR decoy receptor 3 ») (**Mauri et al., 1998; Yu et al., 1999**) (Figure 16). L'interaction entre HVEM et ces différents ligands de la famille des TNFs est possible grâce à leur structure trimérique et à la présence de domaines riches en cystéine (CRDs, « cysteine-rich domains ») (**Bodmer et al., 2002**). En 2008, une interaction non-canonique entre HVEM et CD160, une autre molécule de la superfamille des Ig a été décrite (**Cai et al., 2008**). CD160 est une protéine membranaire associée à un glycosylphosphatidylinositol (GPI), exprimé principalement sur les cellules cytolytiques telles les LT CD8⁺ et les cellules NK (**Anumanthan et al., 1998**). Dans un premier temps, il a été décrit que CD160 interagissait avec le CMH de type I, stimulant ainsi l'activité des cellules NK et T cytotoxiques (**Agrawal et al., 1999; Le Bouteiller et al., 2002**). Ce n'est que plusieurs années plus tard que Cai *et al.* ont identifié HVEM comme un ligand de CD160 à la surface des LT CD4⁺ (**Cai et al., 2008**). De par ses ligands nombreux et variés, HVEM semble jouer un rôle pivot et bidirectionnel dans la régulation du système immunitaire.

4. Compétition entre BTLA et une protéine virale : UL144

Par ailleurs, HVEM partage partiellement une séquence avec un homologue viral des TNFR dérivé du virus humain cytomégalovirus (CMV) appelé UL144 (**Benedict et al., 1999**). De nombreux isoformes de UL144, provenant de différents souches de CMV interagissent avec BTLA, bien que l'affinité soit bien plus faible que celle de l'interaction HVEM-BTLA. Toutefois, il existe bel et bien une compétition entre les différents ligands de HVEM. Afin de s'affranchir de cette compétition, Sedy *et al.* ont récemment généré une protéine mutée de HVEM n'interagissant pas avec CD160, ayant une affinité 10 fois supérieure à la forme non tronquée de BTLA (**Šedý et al., 2017**) (Figure 16). De manière intéressante, chez la souris, il a été décrit deux isoformes de BTLA, résultats d'un épissage alternatif, l'un d'eux ne possédant pas de domaine transmembranaire, l'autre ne présentant pas de domaine Ig (**Han et al., 2004; Watanabe et al., 2003**). Cependant, la conséquence de l'expression de ces variants n'a pas été clairement définie à l'heure actuelle.

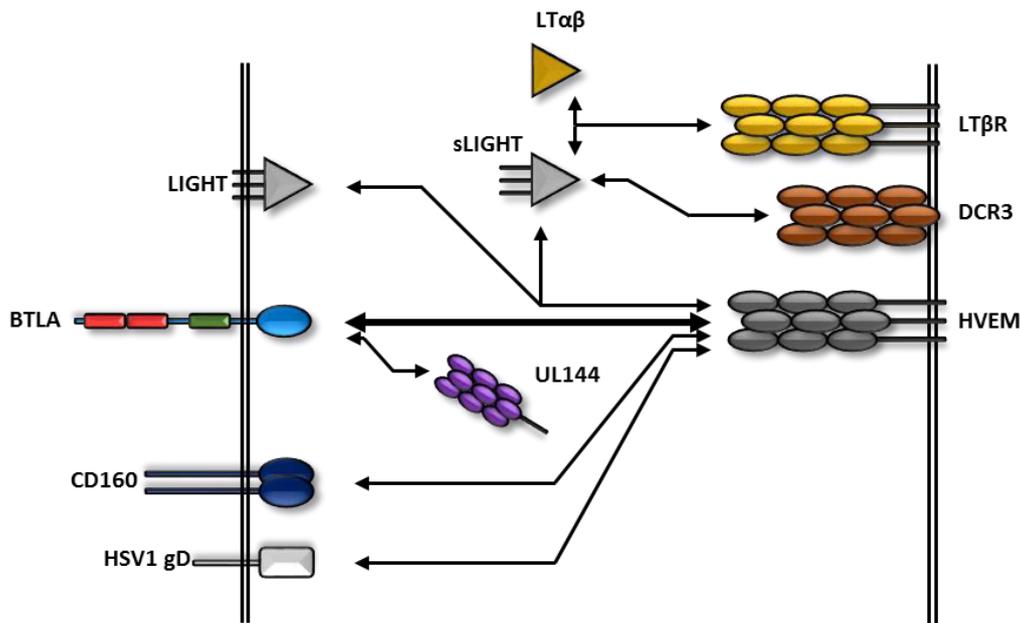


Figure 16. Le réseau BTLA / HVEM (inspiré de Murphy *et al.* *Ann Rev Immunol*, 2010).

BTLA se retrouve au centre d'un réseau complexe d'interactions participant à l'orientation de la réponse immunitaire. BTLA interagit avec HVEM, de la famille des TNFR et à la protéine virale UL144, protéine homologue d'HVEM. HVEM se lie à la glycoprotéine D de l'Herpes Simplex Virus (HSV1 gD), ainsi qu'aux ligands de la famille TNF, $LT\alpha$ et LIGHT. Ce réseau démontre le potentiel bidirectionnel de HVEM dans l'activation ou l'inhibition de la réponse immunitaire.

II. Expression de BTLA

1. Sur les populations lymphoïdes

BTLA est un récepteur membranaire, exprimé à la surface d'une grande majorité de cellules hématopoïétiques aussi bien d'origine lymphoïde que myéloïde. BTLA joue un rôle dans la différenciation des LT et des LB. En effet, ce récepteur est exprimé par les LT dans le thymus lors de la sélection positive (Han *et al.*, 2004; Hurchla *et al.*, 2005). Il joue également un rôle important dans le développement des LB, de par son expression à la surface de celles-ci dans la moelle osseuse durant les stades pro-B et pre-B de maturation des LB (Han *et al.*, 2004; Otsuki *et al.*, 2006). En périphérie, BTLA est fortement exprimé à la surface des LB immatures alors que son niveau d'expression est faible à la surface des DCs immatures $CD11c^+$ (Otsuki *et al.*, 2006).

La distribution de BTLA à la surface des différentes sous-populations de $LT\alpha\beta$ a fait l'objet de plusieurs études. En 2008, Tao *et al.* ont démontré chez la souris que les LT $CD4^+$ régulateurs ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) présentent un faible niveau d'expression par rapport aux autres populations de LT $CD4^+$ (Tao *et al.*, 2008). D'autre part, l'expression de BTLA à la surface des différentes populations de LT $CD4^+$ auxiliaires (T helper, T_H) demeure controversée. En effet, deux équipes ont indépendamment décrit qu'à la surface des LT, BTLA est sélectivement exprimé sur les T_H1 plutôt que sur les cellules T_H2 (Hurchla *et al.*, 2005; Loyet *et al.*, 2005). Toutefois, un troisième groupe a reporté un niveau d'expression de BTLA

équivalent à la surface des lymphocytes T_H1 et T_H2 (**Otsuki et al., 2006**). Par ailleurs, il a été démontré que le niveau d'expression de BTLA est très élevé à la surface de cellules T CD4⁺ anergiques (**Hurchla et al., 2005**). La majorité de ces études ayant été réalisée sur des modèles murins, il apparaît qu'une caractérisation précise de la distribution de l'expression de BTLA à la surface des différentes populations de LT CD4⁺ humains reste à réaliser. L'expression de BTLA sur les cellules T CD8⁺ a été plus largement étudiée. En effet, il a été démontré que BTLA est exprimé à la surface des LT CD8⁺ de souris (**Han et al., 2004**) et humains (**Otsuki et al., 2006**). De manière analogue aux autres populations de LT, le niveau d'expression de BTLA semble être plus faible sur les cellules T CD8⁺ mémoires et effectrices que sur les LT CD8⁺ naïfs (**Derré et al., 2010**).

L'expression de BTLA sur une grande majorité des cellules hématopoïétiques suggère un rôle potentiel de BTLA dans la régulation des cellules lymphoïdes du système immunitaire inné, à savoir les LT $\gamma\delta$ et les ILCs (innate-like cells). Deux études ont récemment confirmé que BTLA est exprimé sur ces différentes populations et, de plus, participe à leur homéostasie. Bekiaris *et al.* ont démontré chez la souris que l'expression de BTLA est réduite sur les cellules T $\gamma\delta$ CD27⁻ par rapport aux CD27⁺ et qu'elle était dépendante de l'expression du facteur de transcription ROR γ t (**Bekiaris et al., 2013**). Chez l'Homme, le niveau d'expression de BTLA à la surface des LT $\gamma\delta$ est comparable à celui observé sur les LT $\alpha\beta$ et est principalement retrouvé à la surface des cellules T $\gamma\delta$ naïves, puis son expression décroît progressivement sur les cellules T $\gamma\delta$ mémoires et effectrices (**Gertner-Dardenne et al., 2013**). Hurchla *et al.* ont démontré que l'expression de BTLA à la surface des lymphocytes NK est dépendante de la lignée murine observée. En effet, ce récepteur est exprimé à la surface des cellules NK de souris C57BL/6, alors qu'il n'est pas retrouvé à la surface des cellules provenant de souris BALB/c. BTLA est une molécule polymorphique, possédant trois différents variants alléliques parmi 23 lignées murines différentes. L'utilisation d'Ac monoclonaux ne reconnaissant que certains variants pourrait expliquer les différences d'expression de BTLA observées entre les souris BALB/c et C57BL/6 (**Hurchla et al., 2005**). Chez l'Homme, BTLA est exprimé faiblement, aussi bien à la surface des cellules NK^{dim} que des cellules NK^{bright} (**Šedý et al., 2013**).

D'autre part, plusieurs groupes se sont intéressés à l'expression de BTLA à la surface des LB. Le niveau d'expression de BTLA à la surface des LB périphériques est environ 10 fois supérieur à celui observé sur les LT (**Han et al., 2004**). Chez l'Homme, il a été démontré que son niveau d'expression est augmenté à la surface des LB mémoires non-switchés (CD19⁺IgM⁺IgD⁺CD27⁺), des plasmablastes (CD19⁺CD27^{high}CD38^{high}) et des LB transitionnels (CD27⁻IgD⁺CD24^{high} and CD38^{high}) par rapport aux LB naïfs (CD19⁺IgM⁺IgD⁺CD27⁻) et mémoires switchés (CD19⁺IgM⁻IgD⁻CD27⁺) (**Llinàs et al., 2011; Thibult et al., 2013b**). De plus, il a récemment été mis en évidence que le niveau d'expression de BTLA diminue à la surface des LB de personnes âgées (**Kannan et al., 2015**). En résumé, BTLA est exprimé sur toutes

les populations lymphoïdes, les lymphocytes B périphériques présentant le niveau d'expression le plus élevé.

2. Sur les populations myéloïdes

En 2004, Han *et al.* ont suggéré que les cellules myéloïdes expriment BTLA en démontrant la présence de cette protéine à la surface des cellules spléniques TCR⁻B220⁻CMHII⁺ de diverses lignées murines (**Han et al., 2004**). En effet, il a été démontré par la suite que BTLA est exprimé sur les cellules d'origine myéloïdes, exprimant CD11c et CD11b, à savoir les DCs, les macrophages, les monocytes et les neutrophiles (**Hurchla et al., 2005**). L'importance de l'expression de BTLA à la surface des DCs a très récemment été mise en évidence par Jones *et al.* Cette étude démontre que les DCs CD8⁺DEC205⁺BTLA⁺ dirigent la différenciation des cellules Tregs périphériques, alors que les DCs CD11c⁺ BTLA⁻ sont incapables d'induire cette polarisation des cellules T CD4⁺ en Tregs tolérogènes (**Jones et al., 2016**).

3. Expression de BTLA après activation

En 2005, le groupe de Kenneth Murphy a montré qu'une activation des LT via le TCR augmente le niveau d'expression de BTLA à leur surface (**Hurchla et al., 2005**). De plus, il a été décrit chez la souris qu'après activation des LT, BTLA s'accumule au niveau de la synapse immunologique et que ce phénomène est régulé par le TCR et par l'interaction de BTLA avec HVEM (**Owada et al., 2010**). Chez l'Homme, le niveau d'expression de BTLA est rapidement augmenté après activation, puis diminue progressivement pour revenir au niveau basal (**Otsuki et al., 2006**). Il a été démontré également que le niveau d'expression de BTLA peut être régulé par certains TLRs. En effet, une stimulation des LB par un agoniste du TLR9, ainsi qu'une stimulation des DCs par du LPS induit une augmentation de l'expression de BTLA à la surface de ces cellules (**Han et al., 2004; Thibult et al., 2013b**). Cependant, l'expression de BTLA est diminuée sur les LB de souris C57BL/6 mais pas de souris BALB/c à la suite d'une stimulation au LPS (**Han et al., 2004**).

III. Expression de HVEM

Comme BTLA, HVEM est exprimé par un nombre important de populations hématopoïétiques et myéloïdes. Cependant, ce TNFR se retrouve différemment exprimé selon les types cellulaires. En effet, le niveau d'expression de HVEM est plus important sur les cellules T quiescentes ou naïves que sur les LT activés (**Morel et al., 2000**). Il a été suggéré que cette diminution est dépendante de l'interaction HVEM/LIGHT lors de l'activation des LT. Chez la souris, il a été montré que le niveau d'expression de HVEM est élevé à la surface des cellules CD4⁺ FoxP3⁺, et qu'il est augmenté spécifiquement sur ces Tregs après une stimulation via le TCR (**Tao et al., 2008**). Les LB provenant de modèles murins

expriment très faiblement HVEM alors que le niveau d'expression de ce TNFR est élevé à la surface des LB naïfs et mémoires périphériques chez l'Homme (**Thibult et al., 2013b**). Chez l'Homme, l'expression d'HVEM à la surface des LB est détectée en périphérie et dans les amygdales alors que son expression est relativement faible dans les CG des OLS (**Duhen et al., 2004**). Il est intéressant de noter qu'une diminution de l'expression de HVEM est observée sur les cellules B humaines ou sur les DCs immatures lors d'une interaction avec LIGHT (**Morel et al., 2001**). En résumé, le rôle bidirectionnel d'HVEM est probablement influencé par la régulation de son expression suite aux interactions avec ses différents ligands.

IV. Mécanisme d'action de BTLA

BTLA est un récepteur co-inhibiteur, ce qui signifie que l'interaction avec son ligand HVEM induit des signaux inhibiteurs au sein de la cellule exprimant BTLA. En effet, dans sa partie cytoplasmique, BTLA possède 3 motifs contenant des tyrosines, conservés au cours de l'évolution chez les souris, les rats, les chiens, les primates et l'Homme (**Gavrieli and Murphy, 2006**). Le site proximal est un site de recrutement pour Grb-2 (Tyr245 chez la souris BALB/c). Les deux autres sites (Tyr274 et Tyr299 chez la souris BALB/c) sont des sites ITIMs (**Gavrieli et al., 2003**). Chez l'Homme, ces tyrosines se retrouvent respectivement en position Tyr226, Tyr257 et Tyr282. Chacune de ces tyrosines peut être phosphorylée suite à l'interaction de BTLA avec son ligand. Suite à la phosphorylation des deux sites distaux, les tyrosines phosphatases SHP-1 et SHP-2 (Src Homology Phosphatase-1 et -2) sont recrutées. Aussi bien chez la souris que chez l'homme, une mutation dans un des deux motifs ITIM abroge complètement l'association de BTLA avec SHP-1 et SHP-2, contrairement à ce qui a été observé pour PD-1 où un seul motif ITIM fonctionnel est nécessaire au recrutement des phosphatases (**Chemnitz et al., 2004**). Par ailleurs, une mutation dans le site Grb-2 n'a pas d'impact sur l'interaction BTLA-SHP (**Gavrieli et al., 2003**). Concernant le site Grb-2, les preuves directes de recrutement de cette protéine adaptatrice au niveau du motif contenant la tyrosine sont peu convaincantes. L'hypothèse d'un recrutement de Grb-2 provient de l'analogie existante entre le motif présent dans la queue cytoplasmique de BTLA et le motif présent dans la partie cytoplasmique de CD28 et de CTLA-4 (Tyr-Met-Asn-Met). Après activation de ces molécules de la famille B7, la sous-unité p85 de la PI3K (**Pagès et al., 1994; Prasad et al., 1994**) et Grb-2 (**Schneider et al., 1995**) sont recrutés au niveau du site Grb-2. Le rôle précis de ce motif tyrosine est resté longtemps relativement peu connu, mais une étude publiée en 2017 a prouvé que la sécrétion d'IL-2 par les LT CD8⁺ après la stimulation du TCR est une fonction dépendante du motif Grb-2 présent dans la partie cytoplasmique de BTLA (**Ritthipichai et al., 2017**). Les interactions entre BTLA et HVEM sont régies par des contacts cellule-cellule, sous-entendant que la signalisation est bidirectionnelle. En effet, HVEM étant un TNFR, sa liaison à un ligand de la famille des TNFs permet le recrutement des facteurs associés aux TNFR (TRAFs, TNF receptor-

associated factors) au niveau de son domaine cytoplasmique. Lors de sa caractérisation, il a été montré que l'engagement d'HVEM induit l'activation de NF- κ B, de JNK ainsi qu'AP-1 au sein de la cellule (**Marsters et al., 1997**) et il a été confirmé quelques années plus tard que l'interaction non-canonique entre BTLA et HVEM active la voie de signalisation NF- κ B dans les cellules exprimant HVEM (**Cheung et al., 2009a**) (*Figure 17*).

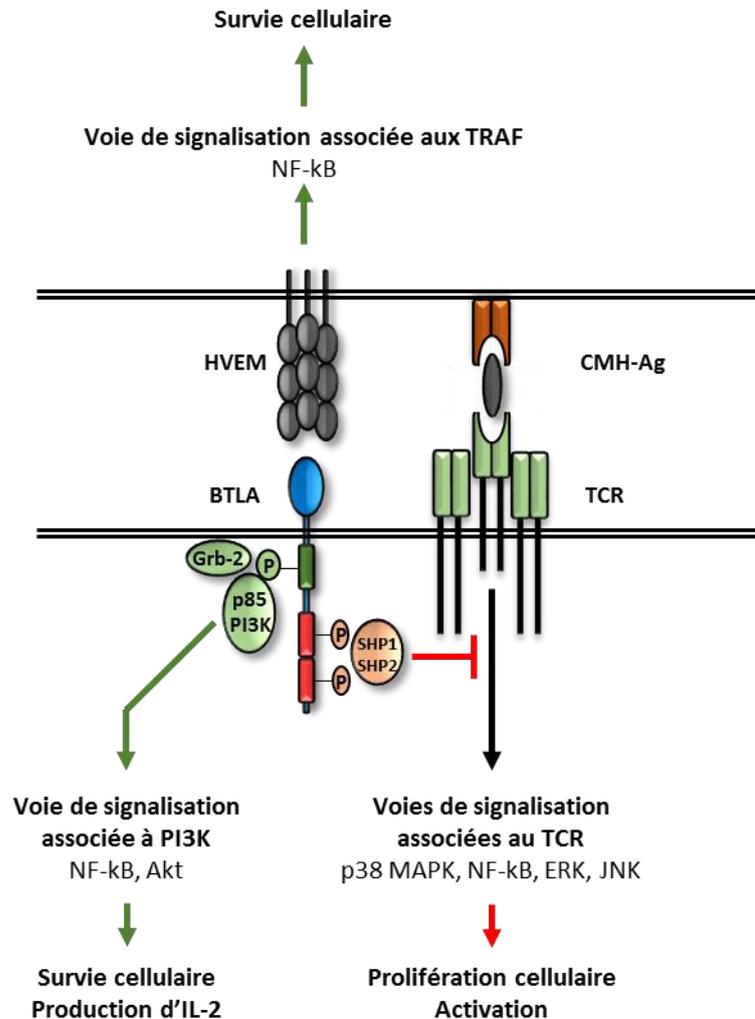


Figure 17. Le mécanisme d'action de BTLA dans les LT.

BTLA est un récepteur co-inhibiteur interagissant avec HVEM. A la suite d'une activation du TCR, BTLA est recruté à proximité de la synapse immunologique, et son engagement aboutit à la phosphorylation de sa queue cytoplasmique. Les phosphatases SHP-1 et SHP-2 sont alors recrutées et déphosphorylent les premiers messagers associés au TCR (ZAP-70, TCR ζ). Cette inhibition régule négativement les voies de signalisation AP-1, NF- κ B et MAPK, contrôlant la prolifération et l'activation des LT. Le recrutement de Grb-2 semble favoriser la survie des LT et la production d'IL-2 par les LT. L'interaction BTLA/HVEM est bidirectionnelle et apporte des signaux de survie à la cellule portant HVEM, en activant la voie NF- κ B.

V. Rôle de BTLA dans la réponse immunitaire

1. Rôle dans l'immunité innée

Diverses études menées chez la souris et chez l'Homme ont mis en évidence le rôle de BTLA dans la réponse immunitaire innée. L'implication de BTLA dans la lutte contre l'infection par *Listeria Monocytogenes* a été récemment démontrée par l'utilisation de souris déficientes pour BTLA croisées avec des souris possédant un fond génétique déficient pour RAG. Ces souris sont moins sensibles à l'infection par *L. Monocytogenes* que les souris compétentes pour BTLA (Yang et al., 2014). Dans cette étude, les auteurs démontrent que les souris BTLA^{-/-} sont plus résistantes à l'infection que les souris BTLA^{+/+} mais présentent une réponse primaire et mémoire des LT CD8⁺ contre *Listeria* réduite. Pour expliquer ce paradoxe, les auteurs ont décrit une stratégie, mise en place par les LT et dépendante de BTLA. L'engagement de BTLA limiterait alors la suppression rapide de *Listeria* par les DC CD8α⁺ via Fas/FasL, ce qui maintiendrait l'exposition des Ag de *Listeria* au système immunitaire et favoriserait une réponse T plus efficace sur le long terme. Cette étude démontre un rôle direct de BTLA sur la régulation des DCs dans le cas d'infections. Par ailleurs, BTLA joue un rôle important dans le processus inflammatoire. En effet, dans un modèle murin induit de colites, l'interaction entre HVEM et BTLA est cruciale dans la prévention de l'inflammation. Les maladies intestinales inflammatoires peuvent être modélisées en transférant des cellules LT CD4⁺CD45RB^{high} par voie intraveineuse dans des souris RAG^{-/-}, souris ne possédant pas de système immunitaire adaptatif. Les auteurs ont transféré des cellules CD4⁺CD45RB^{high}HVEM^{-/-} dans ces souris receveuses et ont observé une accélération du développement de la pathologie, démontrant que HVEM régule le développement des colites grâce à son interaction avec BTLA, exprimé par les cellules du système immunitaire inné (Steinberg et al., 2008). Considérant que le transfert de cellules T CD4⁺CD45RB^{high}BTLA^{-/-} n'a pas eu d'impact sur le développement des colites, il semble que BTLA et HVEM peuvent jouer un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire, en dehors de l'interaction LT – CPA conventionnelles.

Le rôle de BTLA dans la fonction des LTγδ a fait l'objet de deux études publiées en 2013. La première a montré l'importance de BTLA dans l'homéostasie et la fonction de ces cellules. En effet, les LTγδ sont des cellules fortement dépendantes de la production d'IL-7 et cette cytokine induit par la suite, l'augmentation de l'expression de BTLA à la surface des LTγδ. Ceci a pour effet de diminuer leur expansion et de réguler négativement la production d'IL-17 par ces cellules (Bekiaris et al., 2013). Dans cette étude, les auteurs ont également montré que l'utilisation d'un Ac agoniste anti-BTLA réduit l'inflammation et le développement de dermatites induites chez ces souris. La deuxième étude s'est quant à elle intéressée à une population de LTγδ impliquée dans l'immunosurveillance des tumeurs chez l'Homme, les LT Vγ9Vγ2. Dans cet article, les auteurs décrivent un rôle inhibiteur de BTLA dans la prolifération de ces cellules en induisant un arrêt partiel du cycle cellulaire en phase S (Gertner-

Dardenne et al., 2013). En bloquant l'interaction entre HVEM et BTLA, ils ont observé une amélioration de la réponse des LT V γ 9V γ 2 dépendante du TCR et ont rétabli leur capacité à interagir avec les cellules tumorales. Cette étude décrit un potentiel rôle de BTLA dans l'échappement du système immunitaire par les cellules tumorales.

L'activation des cellules NK est régulée par une large variété de récepteurs inhibiteurs, prévenant ainsi la lyse cellulaire et l'inflammation. Il a été décrit que BTLA est capable d'inhiber les fonctions effectrices des cellules NK, notamment la capacité de ces cellules à détruire des cellules infectées par un virus (**Šedý et al., 2013**). Le rôle pivot de HVEM est ici clairement établi, car son interaction avec CD160 accroît l'activation des cellules NK alors que sa liaison à BTLA réduit leurs fonctions cytolytiques. Il est intéressant de noter que lors d'une infection par CMV, UL144, un orthologue de HVEM est capable de se lier à BTLA, réduisant ainsi l'activation des cellules NK. La voie de signalisation de BTLA représente dans ce cas précis, un mécanisme utilisé par le virus pour échapper à la surveillance du système immunitaire.

2. Rôle dans la tolérance périphérique

Les évidences décrivant BTLA comme un acteur important de la tolérance périphérique sont nombreuses. En effet, dès sa caractérisation, il a été démontré que les souris déficientes pour BTLA sont plus susceptibles de développer l'EAE (« Experimental Autoimmune Encephalomyelitis »), modèle murin de sclérose en plaque, suite à une exposition à un peptide auto-antigénique, le MOG (« Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein ») (**Watanabe et al., 2003**). Par la suite, une étude a établi qu'en vieillissant, les souris BTLA^{-/-} produisent des auto-Ac anti-nucléaires et présentent une activation et une prolifération anormalement élevée des LT en périphérie. De plus, un nombre important d'organes possèdent des infiltrats de cellules inflammatoires, aboutissant au développement spontané d'hépatites auto-immunes et à la diminution de la survie de ces souris (Oya et al., 2008a). Cela a été confirmé l'année suivante dans un autre modèle murin, où il a été mis en évidence que des souris déficientes pour BTLA sont résistantes à l'induction de la tolérance périphérique par un antigène administré par voie orale, ou par des doses élevées d'Ag injectés par voie intraveineuse (**Liu et al., 2009**). A l'inverse, l'activation de la voie de signalisation de BTLA conduit à une induction de la tolérance. En effet, l'utilisation d'un Ac agoniste anti-BTLA permet de prolonger la survie d'une allogreffe en supprimant la réponse allo-réactive des LT et en induisant la production d'IL-10 par les cellules Tregs (**Uchiyama et al., 2014**). De plus, engager la voie de signalisation de BTLA semble être une solution efficace pour lutter contre le développement d'une maladie du greffon contre l'hôte si l'Ac agoniste anti-BTLA est administré au moment de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (**Albring et al., 2010**). Dans ces études, il est suggéré qu'induire la voie de

signalisation de BTLA permet d'influencer la balance entre cellules Tregs et T effectrices en favorisant l'expansion des Tregs.

3. Rôle dans la réponse immunitaire adaptative

a. BTLA à la surface des LT

Bien que BTLA soit exprimé sur un grand nombre de type cellulaire, son implication dans la régulation négative des LT a été la plus étudiée. Chez la souris, il a été démontré que les LT déficients pour BTLA présentent une prolifération accrue en réponse à une stimulation du TCR (**Watanabe et al., 2003**). Des résultats similaires ont été observés en bloquant BTLA sur les LT CD4⁺ et CD8⁺ à l'aide d'un Ac antagoniste anti-BTLA (**Krieg et al., 2005**), où la prolifération des LT CD4⁺ en réponse à une stimulation avec un Ac anti-CD3 ou lors d'une stimulation Ag-spécifique est fortement augmentée. Dans cette étude, les auteurs montrent également que les LT CD8⁺ sont moins sensibles à l'utilisation de cet Ac bloquant que les LT CD4⁺. De plus, l'utilisation d'un Ac agoniste anti-BTLA ou d'une protéine de fusion HVEM-Fc supprime la production d'IL-2, la prolifération et l'activation des LT (**Gonzalez et al., 2005; Krieg et al., 2005**). Plus précisément, ces différentes études s'accordent à dire que la fonction inhibitrice de BTLA est exercée en réponse à une activation TCR-dépendante des LT, et se retrouve moins efficace sur les voies de signalisation associées aux molécules de costimulation telles que CD28 ou ICOS, aussi bien chez l'Homme que dans différents modèles murins (**Han et al., 2004; Krieg et al., 2005; Otsuki et al., 2006; Watanabe et al., 2003**). Dans l'ensemble, ces études démontrent l'importance de BTLA dans le contrôle de l'homéostasie des LT.

b. BTLA à la surface des LB

Jusqu'à présent, relativement peu de données sur le rôle de BTLA dans l'homéostasie des LB ont été publiés. En 2009, Vendel *et al.* ont démontré que l'interaction HVEM/BTLA induit une association de BTLA avec le BCR, recrutant ainsi la phosphatase SHP-1, afin de réduire l'activation des voies de signalisation associées au BCR (**Vendel et al., 2009**). En effet, sur une lignée de LB humains, les auteurs ont montré une diminution de la phosphorylation des « tyrosine kinase » Syk et BLNK, diminution associée à une atténuation de l'activation des LB. Chez l'Homme, la capacité de BTLA à réguler négativement les fonctions de LB a été démontrée sur des lignées cellulaires humaines (**Vendel et al., 2009**) et sur des cellules primaires par le groupe de D. Olive. En effet, sur des LB fraîchement isolés de la circulation sanguine, l'engagement de BTLA inhibe la prolifération, la production de cytokines et l'expression de marqueurs d'activation en réponse à une activation des cellules B avec le CpG, un agoniste du TLR9 (**Thibult et al., 2013b**). Jusqu'à présent, chez la souris, aucune étude n'a démontré le rôle de BTLA spécifiquement dans les LB. Toutefois, les souris déficientes pour BTLA présentent une réponse Ac excessivement élevée, et sont fortement susceptibles de développer des syndromes auto-

immuns, suggérant un rôle important de BTLA dans le contrôle direct ou indirect de l'activation des LB. Bien que les études sur le rôle fondamental de BTLA dans l'homéostasie des LB demeurent peu nombreuses, il est acquis que ce récepteur représente, comme pour les LT, un important régulateur négatif des LB.

c. Rôle bidirectionnel de BTLA

Bien que BTLA soit décrit comme un récepteur inhibiteur, il peut agir également comme un ligand et, de ce fait, induire une action réciproque positive par son interaction avec HVEM. Sur plusieurs modèles murins, il a été démontré que BTLA est impliqué dans la survie de cellules T exprimant HVEM (**Deppong et al., 2008; Flynn et al., 2013; Steinberg et al., 2008**). Il est important de noter que les LT expriment HVEM et BTLA simultanément et il apparaît que l'expression de BTLA est cruciale pour la survie de ces cellules (**Hurchla et al., 2007**). Cette hypothèse est renforcée par l'étude expliquant que sur un modèle murin de maladie du greffon contre l'hôte, les cellules T déficientes pour BTLA survivent moins bien que les cellules exprimant BTLA (**Sakoda et al., 2011**). De manière intéressante, la survie des LT déficients pour BTLA est restaurée suite à l'expression du domaine extracellulaire de BTLA ou à l'utilisation d'une protéine de fusion BTLA-Fc (**Cheung et al., 2009a; Sakoda et al., 2011**). L'amélioration de la survie des LT BTLA^{-/-} observée provient de l'interaction entre BTLA et HVEM qui induit l'activation de NF- κ B (**Cheung et al., 2009a**). Dans ces études, c'est l'interaction HVEM-BTLA en *trans* qui est mise en évidence, confirmant l'importance de l'interaction cellule-cellule dans le rôle bidirectionnel de ces deux protéines. Cependant, une étude a démontré que l'interaction HVEM-BTLA en *cis* existe également. Ces conjugués HVEM-BTLA formés en *cis* entrent en compétition avec les différents ligands de HVEM exprimés dans le microenvironnement, participant au maintien des cellules dans un état quiescent (**Cheung et al., 2009b**).

La présence de BTLA contribue également à l'homéostasie des DCs (**De Trez et al., 2008**). En effet, la voie de signalisation de BTLA entre en compétition avec la voie Lymphotoxine $\alpha\beta$ - Lymphotoxine β R afin de réduire l'expansion des DCs dépendante du récepteur de la Lymphotoxine β (**De Trez and Ware, 2008; De Trez et al., 2008**).

L'ensemble de ces études démontrent le rôle critique de BTLA dans l'homéostasie du système immunitaire, et suggèrent qu'un défaut d'expression et/ou fonctionnel de ce récepteur pourrait participer à la dérégulation de la réponse immunitaire, et au développement de diverses pathologies.

VI. Rôle de BTLA dans les pathologies

1. BTLA et cancer

Plusieurs études ont fait état d'un rôle de régulateur négatif de BTLA sur l'immunité anti-tumorale. En effet, de nombreuses lignées cellulaires provenant de mélanomes expriment le ligand de BTLA, HVEM (**Derré et al., 2010**). De plus, une majorité des cellules métastatiques provenant de patients touchés par un mélanome expriment HVEM, parfois à des niveaux très élevés (**Fourcade et al., 2012**). En parallèle, les cellules T CD8⁺ spécifiques de la tumeur expriment BTLA et il a été démontré que ces cellules ne présentent pas une fonctionnalité optimale (**Derré et al., 2010; Fourcade et al., 2012**). Ce défaut fonctionnel participe à la suppression de la production de cytokines par les LT CD8⁺ spécifiques, favorisant le développement local de la tumeur. De manière intéressante, un blocage de BTLA par l'utilisation d'Ac antagoniste, associé à un blocage de PD-1 et TIM-3, promeut la prolifération et la production de cytokines par les LT spécifiques de la tumeur *in vitro* (**Fourcade et al., 2012**). Deux études indépendantes menées dans différents modèles murins développant des tumeurs, ont démontré que l'inhibition de l'interaction HVEM/BTLA associée à une vaccinothérapie spécifique permet une amélioration de l'immunité anti-tumorale, et une régression significative du développement du cancer (**Han et al., 2009; Lasaro et al., 2011**). Un nouveau rôle de BTLA dans la réponse anti-tumorale a été très récemment mis en évidence par une équipe américaine. Après avoir lysé les cellules tumorales, les LT CD8⁺ sont sensibles à un phénomène de mort cellulaire appelé, « activation-induced cell death » (AICD), détruisant les LT cytotoxiques activés qui surexpriment le récepteur de mort Fas (**Green et al., 2003**). De manière intéressante, les LT CD8⁺ infiltrant les tumeurs exprimant BTLA présentent une meilleure survie que les LT CD8⁺ BTLA^{neg} infiltrant les tumeurs après la lyse des cellules tumorales. Les auteurs de cette étude ont montré que cette fonction était assurée par le domaine Grb-2 de BTLA, favorisant la sécrétion d'IL-2 et la résistance à l'AICD, restaurant finalement l'immunité anti-tumorale dirigée par les LT cytotoxiques (**Haymaker et al., 2013, 2015; Ritthipichai et al., 2017**).

Il a également été démontré que BTLA est surexprimé à la surface des cellules T_{FH} et des LB de patients affectés par une leucémie lymphoïde chronique / lymphome à petits lymphocytes (LCL/LPL). Son niveau d'expression, particulièrement élevé comparé à d'autres lymphomes B suggère que BTLA pourrait représenter un potentiel outil de diagnostic de cette pathologie, et une base pour le développement de futures immunothérapies (**M'Hidi et al., 2009**). Comme pour les autres types de tumeurs, les cellules B de patients avec un LCL/LPL utilisent la voie BTLA/HVEM afin d'inhiber la réponse cytotoxique et de favoriser leur survie. De plus, comme dit précédemment, cette stratégie serait également utilisée par les cellules tumorales pour échapper à la reconnaissance par les LT $\gamma\delta$ (**Gertner-Dardenne et al., 2013**), confirmant l'intérêt de bloquer l'interaction HVEM/BTLA pour restaurer une immunité anti-tumorale efficace. Dans ce contexte, de nombreuses approches ciblant

BTLA ont été proposées par le groupe de D. Olive (**Pasero et al., 2012**). En effet, en bloquant BTLA, à l'aide d'Ac antagoniste, ou seul ou combiné avec des Ac bloquant PD-1 dans les lymphocytes spécifiques de la tumeur, réduirait le potentiel immunosuppresseur du microenvironnement tumoral. Une autre possibilité est de cibler le domaine d'interaction de BTLA et HVEM, partagé avec CD160, afin de stimuler la réponse anti-tumorale dans sa totalité. L'un des effets découlant de ces inhibitions serait de favoriser l'interaction HVEM/LIGHT, participant à l'immunité anti-tumorale en pré-activant les LT et les cellules NK (**Fan et al., 2006; Yu et al., 2004**).

2. BTLA et infections

a. Rôle de BTLA dans le choc septique

En réponse à une infection bactérienne, il arrive que certains patients présentent une immunosuppression rapide et sévère, correspondant au choc septique. Il a été démontré par Shubin *et al.* que l'expression de BTLA sur les LT CD4⁺ est corrélée avec le taux de mortalité dans un modèle murin de choc septique (**Shubin et al., 2012**). Le même groupe a par la suite confirmé ces observations chez des patients en état de choc septique, et démontré que ces patients étaient particulièrement sensibles au développement de maladies nosocomiales (**Shubin et al., 2013**). Il est proposé dans ces études que BTLA est impliqué dans la mort des LT CD4⁺ par apoptose suite au choc septique. De manière intéressante, HVEM est retrouvé *post-mortem* dans le parenchyme de poumons de patients décédés suite à un choc septique (**Boomer et al., 2011**). Une étude a récemment démontré que l'utilisation d'un Ac anti-BTLA potentialisant la fonction de BTLA augmente la production de cytokines, de chimiokines et diminue le recrutement de cellules pro-inflammatoires dans la cavité péritonéale (**Cheng et al., 2016**). Il est d'ailleurs suggéré que BTLA contribue à l'apoptose des LT induite lors d'un choc septique. L'ensemble de ces résultats s'accordent à décrire BTLA comme un acteur principal de la dysfonction des LT durant cette pathologie et se retrouve être un bon candidat en tant que biomarqueur du choc septique (**Sherwood and Hotchkiss, 2013**).

b. Rôle de BTLA dans les infections virales

Le rôle de BTLA dans la réponse antivirale a fait l'objet de plusieurs études :

Cas du Cytomégalo virus humain (hCMV) : Comme mentionné précédemment, l'homologie d'une protéine du virus hCMV avec HVEM confère à cette protéine, UL144, la capacité de se lier à BTLA. Lors d'une infection par CMV, l'interaction UL144-BTLA induit une inhibition de la prolifération des LT CD4⁺ exprimant BTLA (**Benedict et al., 1999b**). De plus, BTLA se retrouve fortement exprimé à la surface des LT CD8⁺ spécifiques de ce virus, son inhibition ayant pour conséquence d'améliorer la prolifération de ces cellules *in vitro* (**Serriari et al., 2010**). Nous avons également abordé précédemment le rôle inhibiteur de BTLA dans la régulation des cellules NK. De manière intéressante, UL144 ne peut interagir

avec CD160, molécule activatrice à la surface des cellules NK, favorisant ainsi l'interaction entre BTLA et CD160 (**Šedý et al., 2013**). Ces observations suggèrent une évolution du virus hCMV, lui permettant de cibler spécifiquement ce mécanisme d'inhibition et de réduire ainsi la réponse immunitaire antivirale.

Cas du Virus d'Immunodéficience Humaine (VIH) : Le rôle des récepteurs co-inhibiteurs dans la réponse contre le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) a été largement mis en évidence, en particulier l'implication de PD-1, à tel point que l'inhibition de ces molécules est envisagée comme traitement des personnes infectées par ce virus. Concernant BTLA, diverses études contradictoires ont été publiées. En effet, il a été démontré qu'une infection par le VIH induit une diminution de l'expression de BTLA à la surface des LT CD4⁺ et CD8⁺ provenant de patients infectés (**Xu et al., 2009; Zhang et al., 2011**), alors que deux études rapportent qu'*in vitro*, aucune différence d'expression de BTLA à la surface de LT n'est observée à la suite d'une infection par HIV-1 (**Che et al., 2012; Shankar et al., 2011**). Il est intéressant de noter que la diminution de l'expression de BTLA est dépendante de l'IFN- α et contribue à l'hyperactivation des LT (**Zhang et al., 2011**). Par la suite, il a été décrit que l'expression de BTLA est diminuée à la surface des LB de patients infectés par rapport au individus sains (**Boliar et al., 2012**). Très récemment, il a été indiqué que l'utilisation d'Ac bloquant simultanément BTLA et PD-1 contribue à l'amélioration de la prolifération des LT CD8⁺ et de la réponse T déficiente en cas d'infection (**Grabmeier-Pfistershammer et al., 2017**). Bien que l'implication de BTLA dans l'immunodéficience observée lors d'une infection par le virus VIH soit établie, sa fonction doit être plus précisément caractérisée dans ce mécanisme.

Cas des Hépatites : Contrairement à d'autres récepteurs co-inhibiteurs tels PD-1 et CTLA-4, le niveau d'expression de BTLA n'est pas modifié suite à une exposition à des peptides provenant du virus de l'hépatite C (**Barathan et al., 2017**). A l'inverse, les patients présentant une infection chronique au virus de l'hépatite B possèdent une population de LT CD8⁺ spécifiques des peptides viraux exprimant fortement BTLA (**Wang et al., 2017**). Cette population produit de très faibles proportions d'IFN- γ et de manière plus surprenante, sécrète de fortes quantités d'IL-10. Cette étude démontre que les LT CD8⁺BTLA⁺ sont des cellules régulatrices infiltrant le foie de patients présentant une infection chronique à HBV, contrôlant ainsi la réponse T CD8⁺ effectrice. Ces données démontrent que la régulation positive ou négative de l'expression de BTLA est un mécanisme d'échappement au système immunitaire mis en place par les virus. Par ailleurs, lors d'infection virale, BTLA, exprimé à la surface des DCs CD8 α ⁺, agit comme un ligand et délivre des signaux positifs aux cellules T exprimant HVEM, favorisant l'activation de la réponse anti-virale (**Flynn et al., 2013**).

c. BTLA dans la réponse anti-parasitaire

Une étude a récemment montré que les nématodes *Strongyloides ratti*, parasites intestinaux, induisent l'augmentation de l'expression de BTLA à la surface des LT CD4⁺ et de cellules du système immunitaire inné (telles que les cellules NK, par exemple). Ce phénomène permet au parasite d'inhiber la réponse immunitaire intestinale et d'envahir l'intestin de l'hôte (**Breloer et al., 2015**).

3. BTLA dans les transplantations et le rejet de greffe

L'un des objectifs majeurs lors d'une transplantation de cellules souches hématopoïétiques allogéniques est de prévenir la maladie du greffon contre l'hôte tout en maintenant la réponse du greffon contre le lymphome ou la leucémie affectant le patient. Ces deux réponses sont dépendantes des LT donneurs et il n'est pas aisé de les contrôler séparément. Dans un modèle murin, le transfert de LT donneurs BTLA^{-/-} diminue fortement la réponse dirigée contre l'hôte. Dans ce contexte, Albring *et al.* ont démontré que l'administration unique d'Ac agoniste anti-BTLA, en même temps que la transplantation de cellules souches hématopoïétiques, inhibe la réponse du greffon contre l'hôte tout en maintenant la réponse du greffon contre la tumeur (**Albring et al., 2010**). Une autre équipe a confirmé ce travail et a démontré que les signaux inhibiteurs étaient délivrés spécifiquement aux LT donneurs et pas aux cellules non-T donneurs, ni aux cellules receveuses (T ou non-T) (**Sakoda et al., 2011**). Ces résultats suggèrent que l'engagement de la voie de signalisation de BTLA à l'aide d'Ac agoniste rééquilibre la balance entre cellules T effectrices et régulatrices lors de la transplantation, en inhibant préférentiellement les LT effecteurs plutôt que les Tregs. Cette hypothèse a été renforcée quelques années plus tard, dans une étude démontrant que l'utilisation d'Ac agoniste anti-BTLA induit la génération de Tregs, sécrétant de l'IL-10 et prolongeant la greffe cardiaque chez des souris CBA (**Uchiyama et al., 2014**). De plus, le blocage d'HVEM ou de BTLA permet d'inhiber la cytotoxicité des cellules T alloréactives donneurs contre l'hôte, protégeant ainsi la phase aiguë de réaction du greffon contre l'hôte (**Del Rio et al., 2011, 2012**). Ces résultats démontrent que la signalisation HVEM/BTLA est fortement impliquée dans la réponse du greffon contre l'hôte, et que moduler la fonction de BTLA permet de prolonger la survie du greffon et de diminuer la réaction de rejet.

Lors d'une transplantation d'un organe solide, l'un des problèmes majeurs rencontré est le rejet chronique de la greffe, dû entre autre à la présence d'Ac dirigés contre le greffon. Il a très récemment été mis en évidence que l'interaction HVEM/BTLA n'intervient pas dans la réponse humorale de l'hôte mise en place lors d'une réaction de rejet du greffon, et ne contribue pas non plus à l'expansion des cellules T_{FH} spécifiques du donneur (**Rodriguez-Barbosa et al., 2017**). Toutefois, BTLA et HVEM semblent bien jouer un rôle important dans le rejet de greffe. En effet, leur expression est significativement augmentée dans un groupe de patient greffés du rein ayant rejeté le greffon,

comparé au groupe avec un greffon toléré (**Tian et al., 2013**). Dans l'ensemble, ces résultats prouvent que la modulation de la réponse contre l'hôte par les récepteurs de costimulation est un challenge prometteur, en ciblant directement BTLA, HVEM ou comme il a été récemment démontré dans un modèle de greffe de peau, en ciblant CD160 (**Del Rio et al., 2017**).

4. BTLA dans les hypersensibilités : Allergies et asthme

Bien que l'implication de BTLA dans la régulation de l'inflammation allergique fût envisagée depuis sa découverte, ce n'est qu'en 2006 que son rôle a été clairement établi. En effet, il a été démontré que BTLA agit, en synergie avec PD-1, en limitant la durée et l'importance de l'inflammation dans un modèle murin de développement d'allergies des voies respiratoires (**Deppong et al., 2006**). Par la suite, il a été démontré que BTLA joue un rôle protecteur dans la réaction allergique, en inhibant le recrutement d'éosinophiles au niveau des voies respiratoires (**Tamachi et al., 2007**), et en régulant l'inflammation *in vivo*, en réponse à un allergène inhalé (**Deppong et al., 2008, 2010**). Dans le cadre d'hypersensibilité également, BTLA semble être une potentielle cible thérapeutique. En effet, la stimulation de BTLA à l'aide d'un Ac agoniste présente un effet bénéfique dans la prévention du développement d'hypersensibilité de contact (**Nakagomi et al., 2013**).

En conclusion, BTLA est l'un des « checkpoints » négatifs, comme CTLA-4 ou PD-1, qui contribuent à l'homéostasie et à la régulation de la réponse immunitaire. La modulation de l'expression, de la fonction ou des interactions de BTLA fait actuellement l'objet de nombreuses études. En effet, il semble attractif de bloquer ce récepteur dans certaines pathologies utilisant BTLA comme une stratégie d'échappement au système immunitaire, alors qu'engager la voie de signalisation associée à BTLA semble être une piste à suivre afin de réduire la réponse excessive du système immunitaire à un antigène. (*Figure 18*)

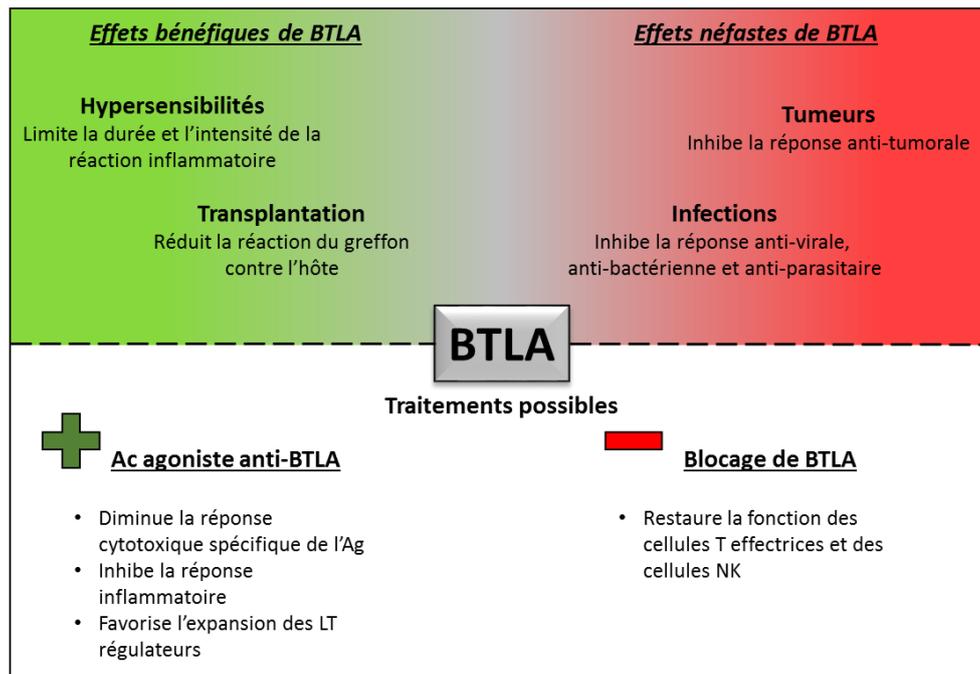


Figure 18. L'engagement de BTLA présente un effet bénéfique ou négatif selon les pathologies.

Le potentiel inhibiteur de BTLA est bénéfique dans de nombreuses pathologies. En effet, ce récepteur permet de contrôler l'activation du système immunitaire, limitant le phénomène inflammatoire et réduisant la réponse de l'hôte contre les greffons. Cependant, l'engagement de BTLA est un moyen utilisé par différents agents infectieux afin d'échapper au système immunitaire, mécanisme aussi utilisé par les cellules cancéreuses afin de contrôler l'immunité anti-tumorale. Le ciblage de BTLA, soit en le bloquant, soit en l'engageant, représente alors une stratégie thérapeutique prometteuse mais doit être bien contrôlée afin de prévenir le développement d'effets secondaires.

VII. Rôle de BTLA dans l'autoimmunité

L'importance de BTLA dans la régulation de la réponse immunitaire a été évaluée par la sévérité du phénotype des souris $BTLA^{-/-}$. En effet, ces souris présentent une prolifération anormalement excessive des LT et LB. De plus, ces souris sont plus sensibles à une exposition au MOG, peptide antigénique utilisé afin de déclencher l'EAE, modèle murin de sclérose en plaque (**Watanabe et al., 2003**). Cependant, au moment de cette découverte, il était peu évident qu'une déficience de BTLA était directement liée au développement des symptômes auto-immuns. Ce n'est que quelques années plus tard, qu'Oya *et al.* ont mis en évidence que les souris $BTLA^{-/-}$ développent progressivement des symptômes auto-immuns caractérisés par la production d'auto-Ac et une augmentation de l'activation des LT $CD4^{+}$. De plus ces souris présentent des infiltrations de cellules lymphoïdes dans de nombreux organes, à l'origine du développement d'une hépatite auto-immune (**Oya et al., 2008**). Ces résultats démontrent que BTLA participe au maintien de la tolérance périphérique. Ceci, associé à la fonction de ce récepteur inhibiteur dans la régulation de l'inflammation, suggèrent que BTLA peut jouer un rôle dans le développement des pathologies auto-immunes, caractérisées par une rupture de tolérance,

une inflammation exacerbée et une hyperactivation du système immunitaire. Récemment, il a été mis en évidence dans un modèle d'EAE, que les cellules B régulatrices produisant de l'IL-10 interagissent avec les cellules Tregs, les activent et restaurent leurs fonctions inhibitrices. Les auteurs ont démontré que ce mécanisme est dépendant de BTLA, qui se retrouve très fortement exprimé sur les cellules B régulatrices lors de l'induction de l'EAE dans ce modèle murin.

L'implication de BTLA dans le développement du LED a été démontrée dans un modèle murin développant spontanément des symptômes lupiques. Dans cette étude, les auteurs ont démontré que des souris MRL^{lpr/lpr} BTLA^{-/-} développent d'importants infiltrats lymphocytaires dans de nombreux organes par rapport aux souris compétentes pour BTLA. De plus, les souris KO présentent une augmentation de la production d'auto-Ac, une dysfonction hépatique et une diminution de la survie par rapport aux souris MRL^{lpr/lpr} BTLA^{+/+}, suggérant un rôle protecteur de BTLA dans les maladies auto-immunes (**Oya et al., 2011**).

Chez l'Homme, le rôle de BTLA dans le développement de pathologies auto-immunes reste cependant très peu défini. Deux études ont évalué l'impact de modifications génétiques de BTLA sur les pathologies auto-immunes. Dans un premier temps, Lin *et al.* ont montré qu'une mutation ponctuelle dans l'exon 5 du gène de BTLA (C800T) est associée à une augmentation du risque de développer une polyarthrite rhumatoïde dans une population taiwanaise (**Lin et al., 2006**). Une étude d'association à l'échelle du génome au sein d'une population chinoise a établi que la mutation ponctuelle 590C dans l'exon 4 du gène de BTLA, codant pour la région intra-cytoplasmique du récepteur, est associée à une prédisposition au développement de la polyarthrite rhumatoïde, mais pas du LED ou du syndrome de Sjögren (**Oki et al., 2011**). En effet, les patients atteints de PR présentant cette mutation développent la pathologie significativement plus tôt que les patients ne portant pas la mutation 590C. De manière intéressante, les auteurs ont généré une lignée de cellules Jurkat exprimant une version de BTLA avec la mutation 590C, et dans ces cellules, les capacités inhibitrices de BTLA sont réduites. L'ensemble de ces résultats suggèrent, comme chez la souris, un rôle protecteur de BTLA dans le développement de syndromes auto-immuns chez l'Homme.

Au regard de ces observations, le ciblage de BTLA dans le traitement de maladies auto-immunes a été envisagé, en premier lieu dans des modèles murins. Dans un premier temps, une protéine de fusion HVEM-Ig a été utilisée dans le traitement de la PR dans un modèle d'arthrites induites par injection de collagène. Les auteurs souhaitaient à l'origine bloquer l'interaction HVEM-LIGHT. Il s'avère que HVEM-Ig interagit préférentiellement avec BTLA, et bloque son action inhibitrice, favorisant de ce fait le développement d'arthrites (**Pierer et al., 2009**). L'utilisation d'Ac ciblant BTLA se révèle être une stratégie prometteuse mais complexe, comme le montre l'étude de l'effet du blocage de BTLA dans

les souris modèles de diabète NOD. Dans cette étude, les auteurs évaluent l'effet d'un co-traitement anti-BTLA et anti-PD-1 sur le développement de la pathologie. Il a été montré au préalable qu'un traitement anti-PD-1 seul induit une accélération de la maladie. En bloquant BTLA, le développement du diabète médié par le traitement anti-PD-1 se retrouve fortement réduit (**Truong et al., 2009**). Comme dans leur précédent article (**Truong et al., 2007**), les auteurs ont démontré que l'utilisation du clone 6F7 anti-BTLA élimine spécifiquement les cellules T autoréactives activées, exprimant fortement BTLA, limitant ainsi le développement de la pathologie. Cependant, ce n'est pas la seule conséquence du traitement. En effet, l'utilisation de cet Ac favorise également l'accumulation des Tregs au sein des ilots, protégeant ainsi l'apparition du diabète chez ces souris.

En résumé, l'implication de BTLA dans la tolérance périphérique, dans le contrôle de la réponse immunitaire mais également dans la stratégie d'échappement mis en place par les tumeurs ou certains virus décrit ce récepteur comme un élément central du système immunitaire. Les pistes thérapeutiques ciblant BTLA se multiplient dans diverses pathologies. A l'heure actuelle, il reste toutefois encore de nombreuses inconnues, notamment concernant son rôle dans l'auto-immunité.

D. HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

Comme décrit précédemment (*cf. Introduction*), le LED est caractérisé par une activation anormale du système immunitaire, conduisant à la production d'auto-Ac et finalement à des lésions tissulaires. Dans ce contexte, un défaut de régulation de la réponse B par des acteurs cellulaires, tels que les T_{FH} , ou moléculaires, tels que les molécules de co-stimulation, peut contribuer au développement de la pathologie lupique. Une meilleure compréhension des phénomènes immunologiques et cellulaires qui régissent la réponse auto-immune devrait nous permettre d'envisager des perspectives intéressantes d'immunorégulation au cours du lupus, et c'est dans cet objectif que se situe mon projet de thèse.

Les T_{FH} sont des LT $CD4^+$ dont la fonction principale consiste à apporter les signaux nécessaires à la maturation et à la différenciation des LB en cellules sécrétrices d'Ac. Un fonctionnement « normal » de ces cellules permet d'assurer une production d'Ac efficace contre les Ag pathogènes, comme lors d'infections, par exemple. Une altération du nombre ou de la fonction des cellules T_{FH} pourrait cependant contribuer à une réponse humorale anormale, comme ce qui est observé dans le LED.

Par ailleurs, le devenir de la réponse immunitaire est finement régulé par un ensemble de récepteurs co-activateurs et co-inhibiteurs. Ces récepteurs déterminent l'orientation de la réponse immunitaire en apportant des signaux positifs ou négatifs à la suite d'une activation. Il a été démontré qu'un défaut d'expression ou de fonctionnalité de ces récepteurs contribue à l'apparition de désordres immunologiques et, de ce fait, au développement de certaines pathologies. Comme décrit

précédemment, BTLA est un récepteur co-inhibiteur impliqué dans le contrôle de l'activation lymphocytaire. Les données obtenues sur des modèles murins indiquent qu'un défaut fonctionnel de BTLA pourrait contribuer à la rupture de tolérance périphérique et au développement de pathologies auto-immunes telles que le LED. Le rôle de ce récepteur chez l'Homme n'a toutefois pas encore été élucidé

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à certains acteurs, qu'ils soient inducteurs (T_{FH}) ou régulateurs (BTLA) de la différenciation lymphocytaire B.

Les objectifs de mon travail de thèse étaient donc de répondre aux questions suivantes :

- 1. Quelles sont les causes et les conséquences de la dérégulation de la distribution des sous-populations de cT_{FH} chez les patients lupiques ? (Chapitre 1)**
- 2. Quel est le rôle du récepteur co-inhibiteur BTLA dans la pathogénèse du LED chez l'Homme ? (Chapitre 2)**

RESULTATS

CHAPITRE I : IMPLICATION DES CELLULES T_{FH} DANS LE LED

I. Avant-propos

De par leur capacité à réguler la production d'Ac, et la réponse humorale dans son ensemble, les cT_{FH} sont suspectées de jouer un rôle dans le développement du LED. En effet, les T_{FH} apportent les signaux nécessaires aux LB pour assurer leur maturation, et leur différenciation en cellules sécrétrices d'Ac.

Il a été démontré que les souris sanroque, invalidées pour le gène Roquin (un régulateur négatif de ICOS), possèdent un nombre excessif de T_{FH} , produisent des niveaux importants d'IL-21 et présentent un phénotype lupique (**Vinuesa et al., 2005**). Par ailleurs, les taux d'IL-21, principale cytokine produite par les T_{FH} , sont particulièrement élevés dans le sérum de souris lupiques BXSB.Yaa (**Ozaki et al., 2004**). De plus, en neutralisant le récepteur à l'IL-21 chez ces souris, mais également chez des souris MRL^{lpr/lpr}, une diminution de la progression de la maladie est observée (**Bubier et al., 2007; Rankin et al., 2012**), suggérant que les T_{FH} participent à la pathogénèse du LED. Dans l'ensemble, de nombreuses molécules associées aux cellules T_{FH} sont également impliquées dans le développement de la pathologie lupique. L'ensemble de ces études ont mises en évidence que le ciblage de certaines de ces molécules pourrait contribuer à une amélioration des symptômes lupiques. Toutes ces données sont décrites dans la publication n°1.

Ces cellules T_{FH} sont, par définition, retrouvées dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS), expliquant les difficultés rencontrées pour accéder à ces cellules chez l'homme. L'étude des T_{FH} chez l'Homme a été rendu possible en analysant une population de LT $CD4^+$ mémoires présentes dans la circulation sanguine. Ces cellules, expriment le récepteur aux chimiokines spécifique des T_{FH} , CXCR5. Elles possèdent des similarités phénotypiques et fonctionnelles avec les cellules T_{FH} retrouvées dans les CG des OLS. De manière intéressante, il est possible d'identifier trois sous-populations de cellules T_{FH} circulantes chez l'homme selon l'expression de deux autres récepteurs aux chimiokines CXCR3 et CCR6 : les cellules T_{FH1} ($CXCR3^+CCR6^-$), les cellules T_{FH2} ($CXCR3^-CCR6^-$) et les cellules T_{FH17} ($CXCR3^-CCR6^+$) (*cf. Introduction Partie B.*) (**Morita et al., 2011**). En périphérie, les T_{FH} circulantes produisent de l'IL-21 alors que le facteur de transcription régulateur Bcl-6 se retrouve faiblement exprimé, permettant l'expression des facteurs de transcription spécifiques (T_{FH1} : T-bet ; T_{FH2} : GATA-3 ; T_{FH17} : ROR γ t) et la sécrétion de cytokines spécifiques (T_{FH1} : IFN- γ ; T_{FH2} : IL-4 ; T_{FH17} : IL-17). Cependant, il apparait que seules les cellules T_{FH2} et T_{FH17} sont susceptibles d'aider les LB à se différencier en plasmocytes et à produire des Ig (*Figure 19A*). Dans plusieurs pathologies auto-immunes, comme la dermatomyosite juvénile et le syndrome de Sjögren, il a été décrit un déséquilibre du ratio T_{FH2-17}/T_{FH1} en faveur des cellules $T_{FH} 2$ et 17 (**Morita et al., 2011; Li et al., 2012b**). Dans notre laboratoire, le même déséquilibre a été décrit dans les PBMCs de patients lupiques atteints d'un lupus, plus particulièrement chez les patients présentant une pathologie active (**Le Coz et al., 2013**) (*Figure 19B*).

La diminution des T_{FH1} au profit des T_{FH2} et 17 est corrélée au niveau d'activité de la maladie et est associée à une production anormale d'auto-Ac.

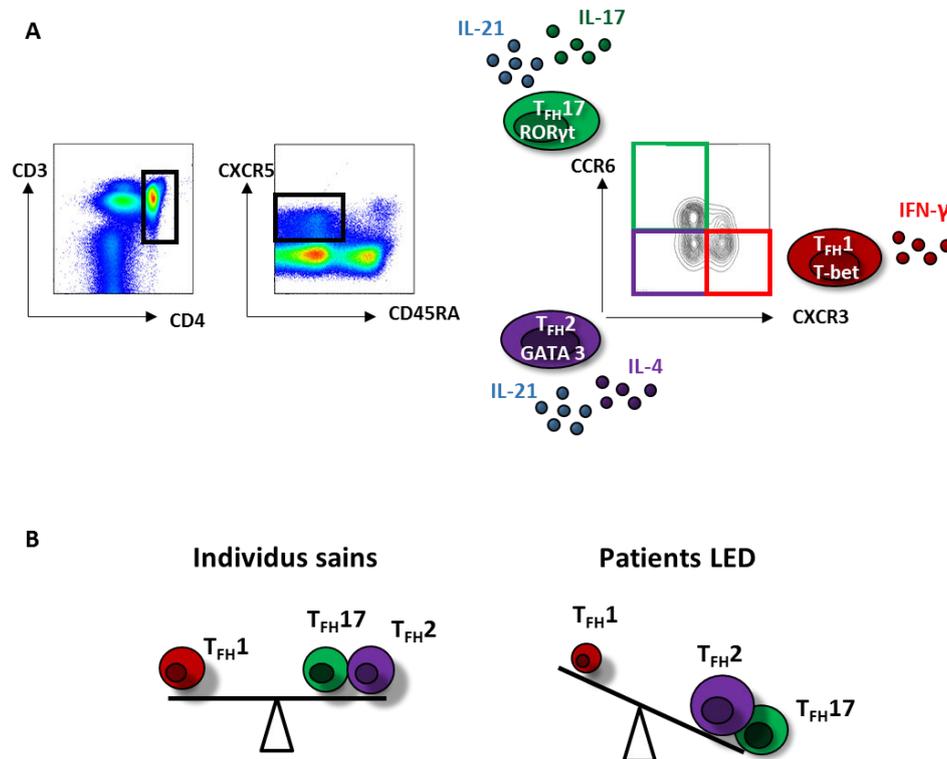


Figure 19. La distribution des sous-populations de T_{FH} est altérée chez les patients lupiques présentant un score d'activité de la maladie élevé.

A. Les cellules T_{FH} circulantes (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺) sont séparées en cellules T_{FH1} (CXCR3⁺CCR6⁻ T-bet⁺ IFN-γ⁺), T_{FH2} (CXCR3⁺CCR6⁻ GATA-3⁺ IL-4⁺) et T_{FH17} (CXCR3⁻CCR6⁺ RORγt⁺ IL-17⁺). Les T_{FH2} et T_{FH17} possèdent des capacités d'aide aux LB, notamment par la production d'IL-21. **B.** Chez les individus sains, le ratio T_{FH1} / T_{FH2-17} est équilibré, chaque sous-population représentant approximativement 30% des cellules T_{FH} circulantes totales. Chez les patients lupiques, il existe un déséquilibre de ce ratio en faveur des T_{FH2-17} (Le Coz et al., 2013).

Cependant, une question demeure : La diminution de la fréquence des cellules T_{FH1} observée en périphérie chez les patients lupiques traduit-elle d'une migration de ces cellules au sein des organes inflammés ? L'objectif de cette étude est de répondre à cette question, d'une part en caractérisant plus précisément ces différentes populations de T_{FH} chez l'Homme, puis en analysant la distribution de ces cellules T_{FH} dans différents modèles murins.

II. **PUBLICATION N°1 : Follicular Helper T Cells in Systemic Lupus Erythematosus: Why Should They Be Considered as Interesting Therapeutic Targets ?**

Matthieu Sawaf¹, Hélène Dumortier¹ et Fanny Monneaux¹

*¹CNRS, Immunopathologie et Chimie Thérapeutique/Laboratory of Excellence MEDALIS,
Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 67084 Strasbourg, France*

Received 4 May 2016; Revised 6 July 2016; Accepted 17 July 2016

Academic Editor: Takashi MaruYama

Copyright    2016 Matthieu Sawaf et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Review Article

Follicular Helper T Cells in Systemic Lupus Erythematosus: Why Should They Be Considered as Interesting Therapeutic Targets?

Matthieu Sawaf, Hélène Dumortier, and Fanny Monneaux

*CNRS, Immunopathologie et Chimie Th erapeutique/Laboratory of Excellence MEDALIS,
Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 67084 Strasbourg, France*

Correspondence should be addressed to Fanny Monneaux; f.monneaux@unistra.fr

Received 4 May 2016; Revised 6 July 2016; Accepted 17 July 2016

Academic Editor: Takashi MaruYama

Copyright   2016 Matthieu Sawaf et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune disease characterized by B cell hyperactivity leading to the production of autoantibodies, some of which having a deleterious effect. Reducing autoantibody production thus represents a way of controlling lupus pathogenesis, and a better understanding of the molecular and cellular factors involved in the differentiation of B cells into plasma cells could allow identifying new therapeutic targets. Follicular helper T cells (T_{FH}) represent a distinct subset of $CD4^+$ T cells specialized in providing help to B cells. They are required for the formation of germinal centers and the generation of long-lived serological memory and, as such, are suspected to play a central role in SLE. Recent advances in the field of T_{FH} biology have allowed the identification of important molecular factors involved in T_{FH} differentiation, regulation, and function. Interestingly, some of these T_{FH} -related molecules have been described to be dysregulated in lupus patients. In the present review, we give an overview of the aberrant expression and/or function of such key players in lupus, and we highlight their potential as therapeutic targets.

1. Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a severe systemic autoimmune disease and, as such, is characterized by a loss of self-tolerance. The etiology of SLE is not well defined, but genetic, hormonal, and environmental factors, as well as immune disorders, are likely implicated. During SLE, inflammation leads to damage of various tissues, including the joints, skin, kidneys, heart, lungs, blood vessels, and brain. Dysregulation of various components of the immune system can be observed at different stages of disease development, but hyperactivity of B cells, leading to excessive production of multiple autoantibodies (autoAb), is one of the major immunological stigmata of SLE. Indeed, SLE is characterized by the production of antinuclear autoAb (e.g., autoAb specific for chromatin) and by the formation of immune complexes, which contribute to tissue damage. Deposits of immune complexes in organs such as kidneys lead to subsequent inflammation through the activation of the complement system and the recruitment of inflammatory cells. The presence of autoAb is an absolute prerequisite for the development of

lupus nephritis [1] and, interestingly, we demonstrated that pathogenic autoAb can be locally produced by plasma cells, which have homed to inflamed kidneys of lupus mice [2]. B cells and derivatives (plasma cells) are thus considered at the center of SLE pathogenesis and this is supported by the observation of a high frequency of plasma cell precursors in the blood of children with SLE [3]. Furthermore, an increase of circulating plasma cells in lupus patients is correlated with disease activity [4].

The generation of Ab can occur via the extrafollicular or the germinal center (GC) responses. The extrafollicular response leads to short-lived plasma cells, which do not go through the affinity maturation process. In contrast, the GC is the theater of intense cell collaboration between GC B cells and follicular helper T cells (T_{FH}) leading to the differentiation of long-lived plasma cells harboring high antigen-specificity. Interestingly, lupus autoAb are high affinity, somatically mutated, and class-switched immunoglobulin (Ig)G [5] indicating T and B cell collaboration [6] and intense GC activity. Therefore, it is likely that a dysfunction in B cell differentiation mechanisms occurs in lupus, leading to

excessive numbers of autoreactive plasma cells. It is particularly attracting and plausible to envisage that a dysregulation of T_{FH} could be the underlying key factor.

In this review, we succinctly expose recent understanding in T_{FH} biology (described in detail elsewhere; see [7] for review), in order to introduce important molecular factors involved in T_{FH} differentiation, regulation, and function. We then give an overview of the aberrant expression and/or function of such key players in lupus patients, and we highlight their potential as therapeutic targets.

2. T_{FH} Cells: From Their Generation to Their Regulation

The generation of high affinity Ab requires T/B interactions that mainly occur in GC. T_{FH} cells represent a distinct subset of $CD4^+$ T cells involved in GC formation and specialized in providing help to B cells to differentiate into plasma cells or memory B cells [8]. T_{FH} express high levels of CXC chemokine receptor type 5 (CXCR5), PD-1 (Programmed Death-1), ICOS (Inducible T cell CO-Stimulator), and the regulator transcription factor Bcl6 (B cell lymphoma 6), which provide excellent markers for their identification. Moreover, secretion of high levels of IL-21 is a critical characteristic of T_{FH} cells.

T_{FH} are generated after immunization or infection following the interaction of naive $CD4^+$ T cells with dendritic cells (DC) within the T cell zone of secondary lymphoid organs (SLO). Signals provided by DC induce the expression of a myriad of proteins (transcription factors, surface molecules, and cytokines) that are essential for T_{FH} generation, migration, and function. In fact, T_{FH} differentiation is a multistage process (Figure 1), which can be sequentially defined as follows: (i) naive $CD4^+$ T cells are activated by DC (thanks to the MHC-peptide complex/TCR interaction) in the T cell zone and become immature T_{FH} (also called pre- T_{FH}) [9]; (ii) newly generated pre- T_{FH} then migrate to the interfollicular zone, where cognate interactions with B cells allow the final maturation step; (iii) these mature T_{FH} reach the GC in which T_{FH} -GC B cell interactions will favor isotype class switch, somatic hypermutations, and affinity maturation.

2.1. Pre- T_{FH} Generation: DC as the Stage Director. The initial priming of $CD4^+$ T cells requires cognate interactions and costimulatory signals delivered by DC through CD40, CD80/86, ICOSL, and OX40L (Table 1). CD28 (that binds CD80/86) was shown to be essential to T_{FH} development as mice deficient for CD28 display $CD4^+$ T cells that fail to upregulate CXCR5 and OX40, leading to disrupted GC formation [10]. In addition, upregulation of OX40L on DC following CD40-induced maturation allows CXCR5 expression by $OX40^+$ T cells [11]. Moreover, ICOS signaling leads to an increased expression of the transcription factors Bcl6 and Ascl2 (achaete-scute homologue-2). The latter promote both the reciprocal CXCR5 upregulation and CCR7 downregulation on activated $CD4^+$ T cells, which then become pre- T_{FH} [12, 13]. In turn, Bcl6 induces the expression of ICOS, PD1,

CD40L, and SAP (SLAM- (Signaling Lymphocytic Activation Molecule-) Associated Protein; critical for T-B interaction).

Cytokines secreted by DC also play a pivotal role in pre- T_{FH} development (Table 1). IL-6, a DC-derived proinflammatory cytokine, has been demonstrated to be the main soluble factor driving T_{FH} differentiation in mice [14]. In humans, IL-12 has been shown to be the key cytokine that promotes T_{FH} -like cell differentiation [15, 16]. If, in the initial work, neither IL-6 nor IL-21 were described as being able to promote T_{FH} differentiation [15], a recent study suggests that human plasmablasts produce IL-6, which is responsible for the subsequent differentiation of naive $CD4^+$ T cells into B cell helpers $CXCR5^+ICOS^+Bcl6^+IL-21^+$ T cells [17]. IL-21 is required for T_{FH} function but it is also an important factor for T_{FH} generation [18] and, interestingly, both IL-6 and IL-12 are potent inducers of IL-21 expression in mice [19] and humans, respectively [15]. As IL-21 is an autocrine cytokine for pre- T_{FH} generation, further studies are required to better clarify individual cytokine contributions. Cytokine signaling involves the subsequent activation of Janus kinase-STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) signaling pathway. STAT3 is a major signaling molecule for IL-6 and IL-21 [20, 21], whereas IL-12 signaling occurs through STAT4 activation. However, IL-12-induced expression of IL-21 by human $CD4^+$ T cells is compromised in patients with functional STAT3 deficiency, suggesting that IL-12 ability to promote IL-21-producing $CD4^+$ T cells is predominantly STAT3 dependent [22]. Moreover, STAT3-deficient patients have reduced numbers of circulating T_{FH} -like cells [23]. Altogether, these data suggest that the STAT3 signaling pathway plays an important role in T_{FH} differentiation and subsequent B cell help.

During this first step of the T_{FH} differentiation process, both cell surface interactions and cytokine signaling play a crucial role in Bcl6 induction. Bcl6 requirement for T_{FH} development was reported in 2009 by 3 independent groups [24–26]. Indeed, Bcl6 is a master regulator for T_{FH} lineage commitment as its expression can inhibit Th1, Th2, and Th17 differentiation [26]. Bcl6 expression is influenced by IL-6 and IL-21 via STAT1 and STAT3 signaling and by ICOS-PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) signaling. Moreover, Bcl6 expression is controlled by a complex regulatory network of activating factors (see [7] for detailed review) such as basic leucine zipper transcriptional factor ATF like (BATF; [27]), transcription factor 1 (TCF-1; [28]), lymphoid enhancer-binding factor (LEF-1; [28]), and B cell Oct-binding protein 1 (Bob1; [29]), while forkhead box protein O1 (FOXO1; [30]) negatively regulates Bcl6 expression.

2.2. Pre- T_{FH} Migration to the T-B Border and T_{FH} Maturation: B Cells Enter the Scene. Thanks to CXCR5 expression enhancement and CCR7 downregulation (Table 2), pre- T_{FH} cells migrate to the B cell follicle in response to a CXCL13 gradient and their interaction with antigen-specific B cells at the T-B border contributes to final T_{FH} differentiation. Indeed, the lower frequency of T_{FH} cells in B cell-deficient mice suggests that B cells are also important for the generation of T_{FH} cells [24]. At this stage, B cells act

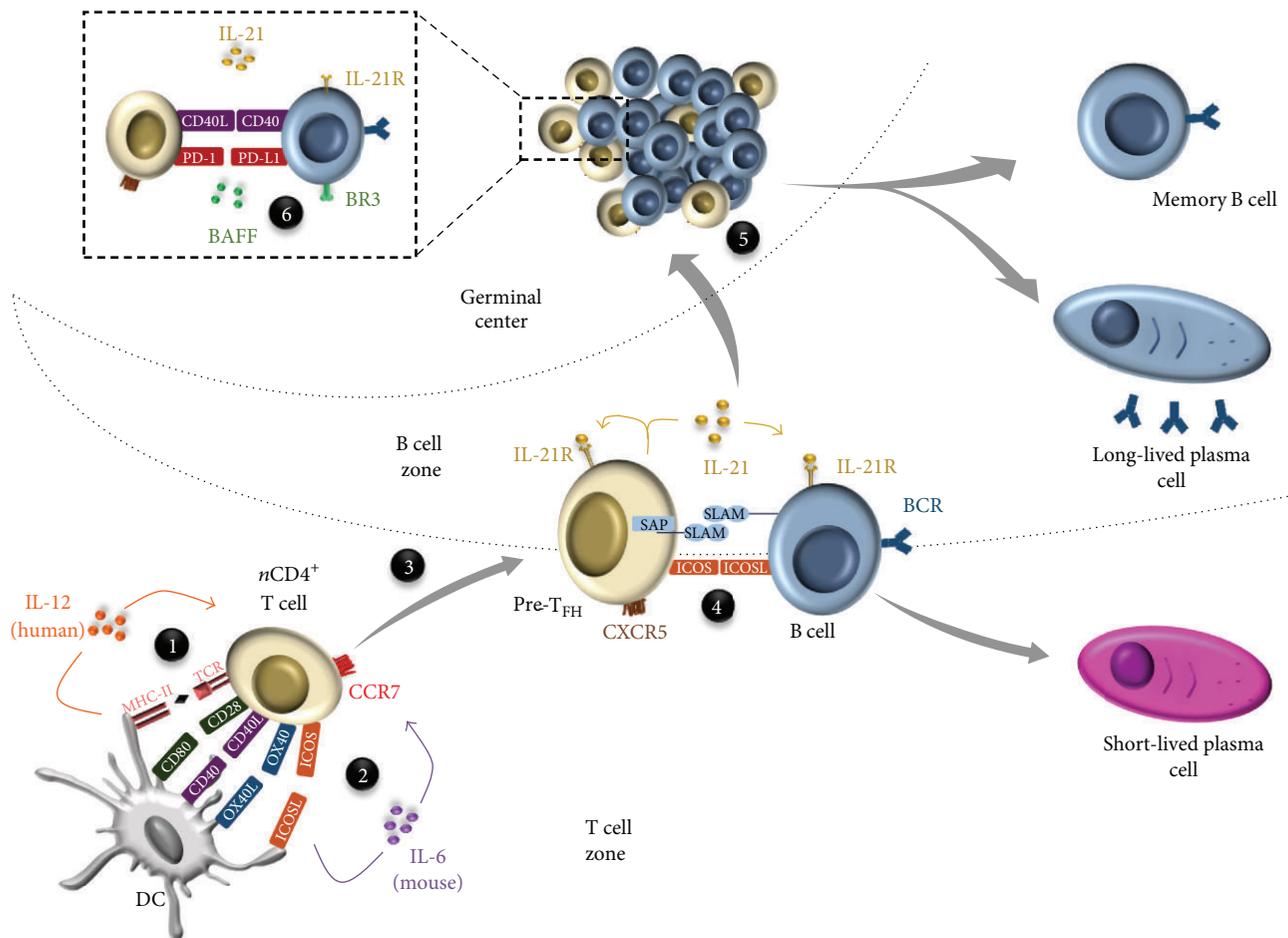


FIGURE 1: T_{FH} differentiation in secondary lymphoid organs is a multistep process required to establish a high affinity antibody response. (1) Naive $CD4^+$ T cells localized in the T cell zone are first primed by DC thanks to MHCII-peptide-TCR interactions. (2) Once activated, $CD4^+$ T cells upregulate costimulatory molecules such as CD40L, OX40, and ICOS, favoring their crosstalk with DC. Combined with this interaction DC-derived cytokines (IL-6 in mice and IL-12 in humans) drive differentiation of activated T cell into pre- T_{FH} cells. (3) Thanks to CXCR5 upregulation and CCR7 downregulation, pre- T_{FH} cells are attracted to the T-B border by a CXCL13 gradient. (4) A SAP/SLAM-stabilized interaction between ICOSL-expressing B cells and pre- T_{FH} cells occurs at the T-B border, finalizing T_{FH} cell differentiation. (5) Finally, mature T_{FH} cells migrate toward the GC, where they provide help to B cells. This crosstalk induces both B cell differentiation in plasma cells and memory B cells, thanks to IL-21/IL-21R and CD40/CD40L signals, and B cell survival via BAFF/BR3 and PD1/PD-L1 interactions (6).

as the major antigen-presenting cells (APC) for primed- T_{FH} that will then fully differentiate into GC T_{FH} cells. Mature T_{FH} and B cells that have formed stable T-B conjugates move together into the follicle to form GC [31]. Stable T-B conjugate formation requires interaction between ICOS on T_{FH} and ICOSL expressed by B cells, as well as SLAM interactions (Table 2). SLAM are transmembrane receptors expressed on both T_{FH} and B cells. SAP, which is the adaptor signaling protein downstream of SLAM, was demonstrated to be important for stabilizing cognate T-B interactions. Indeed, SAP-deficient $CD4^+$ T cells have an impaired capacity to stably interact with cognate B cells, resulting in a failure to induce B cell clonal expansion [32]. Moreover, patients with X-linked Lymphoproliferative disease (XLP), an immunodeficiency resulting from mutations in the SH2D1A gene

which encodes SAP, harbor humoral defects characterized by hypogammaglobulinemia and reduced numbers of T_{FH} [33]. B cells thus play a key role in the T_{FH} maturation step by both acting as APC and stabilizing T_{FH} -GC B cell interactions through ICOSL and SLAM.

2.3. T_{FH} Function: The Final Act of the Story. The major function of T_{FH} is to enhance high affinity memory Ab responses following migration to GC. In the follicles, T_{FH} -GC B cell crosstalk involves CD40L, IL-21, PD-1, and BAFF (B cell Activating Factor) (Table 3). The signal delivered through interaction between PD-1 on T_{FH} and PD-L1 expressed by GC B cells is crucial for GC B cell survival [34]. IL-21 production by T_{FH} directly regulates B cell proliferation and class-switch, and the IL-21 pathway has been identified as a critical

TABLE 1: Function of T_{FH}-related molecules during T_{FH} differentiation.

T cell molecule	Ligand	Function in mice	Function in humans
CD28	CD80/86	CD28 ^{-/-} mice fail to form GC [10]	ND
CD40L	CD40	T cell accumulation in B cell follicles relies on CD40-dependent maturation of DC [11]	ND
OX40	OX40L	T cells do not migrate to B cell follicles in immunized OX40 ^{-/-} mice [11] OX40L instructs CD4 ⁺ T cells to express CXCR5 [130] CD28 ^{-/-} T cells fail to upregulate OX40 [10] OX40-OX40L interaction allows CD4 ⁺ T cells to accumulate in B cell follicles [131]	OX40 signal promotes CD4 ⁺ T cells to express T _{FH} molecules and to become functional B cell helpers [84]
ICOS	ICOSL	ICOS provides a critical early signal to induce Bcl6 [12] Generation of T _{FH} depends on the PI3K signaling initiated by ICOS [132]	LOF mutations in ICOS reduce cT _{FH} frequencies [133]
IL6R	IL-6	IL-6 promotes the differentiation of naive T cells in helper B cells [14] IL-6 ^{-/-} mice harbor reduced Bcl6 expression and T _{FH} differentiation [134]	Plasmablasts-derived IL-6 induces T _{FH} differentiation [17]
IL-12R	IL-12	ND	IL-12 induces CD4 ⁺ T cells to become IL-21-producing T _{FH} -like cells [15] IL-12 induces naive CD4 ⁺ T cells to acquire T _{FH} characteristics and the ability to provide B cell help [16]
IL-21R	IL-21	T cells activated by IL-21 acquire T _{FH} gene expression and function [18] IL-21 ^{-/-} mice have reduced T _{FH} differentiation and GC formation [134]	LOF mutations in IL-21R skewed T _{FH} differentiation toward an IFN γ ⁺ PD1 ⁺ phenotype [133]

GC: germinal center; DC: dendritic cells; ND: not determined; LOF: loss of function; cT_{FH}: circulating T_{FH}; PC: plasma cells.

TABLE 2: Function of T_{FH}-related molecules during T_{FH} migration and interaction at the T/B border.

T cell molecule	Ligand	Function in mice	Function in humans
CXCR5	CXCL13	CXCR5 induction is necessary for T cell homing to the follicles [135]	T cells localized into B cell follicles express CXCR5 and provide B cell help [136, 137]
CCR7	CCL19/CCL20	Maintenance of CCR7 expression impedes the entry of T cells on the follicles [135]	CXCR5 ⁺ CD4 ⁺ T cells lose CCR7 expression in SLO [136, 137]
ICOS	ICOSL	CD4 ⁺ T cells fail to develop in T _{FH} and to promote optimal GC responses when follicular B cells do not express ICOSL [75]	ND
SAP	SLAM	CD4 ⁺ T cells from SAP ^{-/-} mice are unable to stably interact with cognate B cells [32]	XLP patients display reduced T _{FH} numbers and no mem B cells [33]

GC: germinal center; SLO; second lymphoid organs; XLP: X-linked lymphoproliferative disease; ND: not determined; mem B cells: memory B cells.

component of the memory B cell response as secondary antigen-specific IgG responses are impaired in IL-21R-knockout mice [35]. BAFF is a cytokine that belongs to the Tumor Necrosis Factor (TNF) ligand family and its receptors are BCMA (B cell maturation antigen), TACI (Transmembrane Activator and Calcium modulator and Cyclophilin ligand Interactor), and BAFF Receptor 3 (BR3). BAFF is produced by stromal cells in the SLO and involved during GC development by influencing ICOSL expression on B cells

and thus regulating the ability of GC B cells to promote T_{FH} expansion [36]. Moreover, BAFF production by T_{FH} is critical for the survival of high affinity B cell clones [37].

In summary, molecules that have been described to play a key role in T_{FH} biology do not display equivalent functions. Some are necessary for T_{FH} migration from the T cell zone to the GC, others are absolutely required for their development or function, and finally some of them are essential for T_{FH} maintenance and survival (Tables 1–3).

TABLE 3: Function of T_{FH} -related molecules during B cell help, T_{FH} maintenance, and regulation.

T cell molecule	Ligand	Function in mice	Function in humans
CD40L	CD40	The formation of GC and the generation of mem B cells is inhibited in the absence of CD40L [138]	CD40-CD40L interaction is required for the survival of GC B cells [71]
ICOS	ICOSL	T_{FH} are lost in the absence of B cells [12]	Patients with LOF mutation in ICOS have reduced numbers of mem B cells [133]
CD28	CD80	CD80 expression on follicular B cells and its interaction with CD28 on T cells is essential for maintenance of the T_{FH} phenotype [139]	ND
IL-21	IL-21R	IL-21 promotes the differentiation of B cells to mem B cells and PC [52] Mem B cells and PC fail to expand following immunization in IL21 ^{-/-} mice [35]	B cell differentiation by tonsillar CXCR5 ⁺ T cells is mediated by IL-21 [140]
IL-4	IL-4R	GC T_{FH} cells produce IL-4, which is required for optimal B cell help [141, 142]	ND
BAFF	BR3/TACI/BCMA	TACI ^{-/-} mice have reduced numbers of PC due to a failure in downregulating Bim [36] GC T_{FH} produce BAFF and T-cell restricted BAFF deficiency impairs affinity maturation [37]	ND
PD-1	PD-L1/PD-L2	GC B cell survival is decreased in the absence of PD-1 [143]	CXCR5 ⁺ PD-1 ^{high} T cells promote antibody responses [67]
BTLA	HVEM	Numbers of IL-21-producing T_{FH} -like cells are increased in BTLA ^{-/-} mice [39]	ND
SAP	SLAM	IL-4 production by SLAM ^{-/-} T_{FH} cells is markedly reduced [142]	ND

GC: germinal center; ND: not determined; LOF: loss of function; mem B cells: memory B cells; PC: plasma cells.

2.4. T_{FH} Regulation. Considering the important role of T_{FH} cells in humoral immunity, a balance between stimulatory and inhibitory mechanisms regulating their function is required for immune homeostasis. However, while signals important for T_{FH} development are clearly defined nowadays, little is known about mechanisms involved in their regulation. The coinhibitory PD-1/PD-L1 pathway can limit T_{FH} expansion and consequently the humoral Ig response [38]. Similarly, it was demonstrated that the inhibitory receptor B and T Lymphocyte Attenuator (BTLA) suppresses GC B cell development and subsequent IgG responses by inhibiting IL-21 production by T_{FH} cells [39] (Table 3). Recently, the existence of regulatory T cells (Treg) able to inhibit GC responses was described. This subset of regulatory T cells of thymic origin was first identified in mice [40] and named T_{FR} (follicular regulatory T cells). They express typical markers of both T_{FH} cells (Bcl6, CXCR5, PD-1, and ICOS) and classical Treg (Foxp3); they localize in the GC and possess suppressive activity. A CD4⁺ T cell population coexpressing Foxp3, Bcl6, and CXCR5 was also visualized in human tonsils [41].

Moreover, microRNA have recently emerged as potent regulators of T_{FH} differentiation. Indeed, the miR-17~92 cluster was shown to promote T_{FH} differentiation by repressing PTEN (Phosphatase and TEnsin homolg), PHLPP2 (Pleckstrin Homology domain and Leucine-rich repeat Protein Phosphatase) (phosphatases that inhibit Bcl6 expression through interfering with PI3K signaling), and ROR α

(Retinoic acid-related Orphan Receptor α) expression [42, 43]. On the other hand, miR-10a negatively regulates T_{FH} differentiation by directly inhibiting Bcl6 expression [44]. Similarly, miR-146a, a microRNA that is highly expressed in T_{FH} cells, was recently described as a negative regulator of T_{FH} cell numbers [45]. miR-146a deficiency leads to accumulation of both T_{FH} and GC B cells, likely due to enhanced ICOSL and ICOS expression on GC B cells and T_{FH} cells, respectively [45].

Finally, IL-2 signaling is also an important negative regulator of T_{FH} differentiation by inducing STAT5-dependent expression of Blimp1, a Bcl6 repressor [46–48]. Moreover, high IL-2 production by Th1 cells induces T-bet, which in turn inhibits Bcl6 expression and T_{FH} differentiation [49].

3. Evidences Supporting the Involvement of T_{FH} in Systemic Lupus Erythematosus (SLE)

The main function of T_{FH} cells consists in regulating the clonal selection of GC B cells and providing B cells with signals for Ig production, isotype switching, and somatic hypermutations. As abnormal activation of B cells and autoAb production are central to autoimmune diseases, such as lupus, altered T_{FH} differentiation, function, and regulation were suspected to play a role in lupus pathogenesis. First hypotheses regarding the role of T_{FH} cells in SLE development are based on studies using mice deficient for Roquin1 (a negative regulator of ICOS mRNA stability) in which an

excessive number of T_{FH} cells and GC reactions and high levels of IL-21 are associated with a lupus-like phenotype [50, 51]. Other evidences come from studies on IL-21, the main cytokine produced by T_{FH} , in lupus mice. High IL-21 mRNA as well as elevated IL-21 serum levels were described in BXS $B.Yaa$ mice, which develop an SLE-like disease [52]. The use of a fusion protein consisting in the IL-21R linked to the Fc domain of a mouse IgG2a (IL-21R.Fc, which therefore binds to IL-21 and prevents activation of its receptor) revealed a complex biphasic role of IL-21 in this mouse model as it increases or diminishes the disease severity depending of the stage of the disease at the time of IL-21 neutralization (at early or late stages). This could be related to the action of IL-21 on B cells but also on T cell responses [53]. In lupus MRL/ lpr mice, activated $CD4^+$ T cells secrete 10 times more IL-21 than control mice [54] and IL-21R deficiency leads to reduced numbers of T_{FH} cells [55]. In addition, abundant T_{FH} -like cells are located outside the GC where they support extrafollicular B cell differentiation and plasmablast maturation in BXS $B.Yaa$ and MRL-Fas lpr lupus mice [56, 57]. In the latter and contrary to what was expected, the extrafollicular pathway was shown to be the most important way to generate hypermutated autoAbs [58]. However, there is no evidence to date supporting the involvement of such extrafollicular response in human SLE.

T_{FH} cells are located in SLO; therefore the major problem encountered in studies of human T_{FH} is that lymphoid tissues of lupus patients cannot be easily accessed, making it difficult to identify T_{FH} cells and to determine whether the generation or function of these cells is dysregulated. First studies were based on the enumeration of $CD4^+CXCR5^+$ in peripheral blood as GC T_{FH} counterparts. Using this strategy, it was shown in human SLE that circulating T_{FH} cells (cT_{FH}) defined as $CD4^+CXCR5^+PD-1^{+}/high$ and/or $ICOS^+$ T lymphocytes are expanded in lupus patients and their presence correlates with a more severe disease phenotype [59–64]. Recent studies have more rigorously characterized peripheral $CD4^+CXCR5^+$ T cells. Morita et al. have described a circulating population in healthy donors that shares common phenotypic and functional characteristics with T_{FH} cells from GC [65]. The authors named it T_{FH} -like cells. Moreover, they distinguished three subclasses, that is, T_{FH1} , T_{FH2} , and T_{FH1} , defined according to the expression of the CCR6 and CXCR3 chemokine receptors: T_{FH1} cells are $CXCR3^-CCR6^+$ cells whereas T_{FH2} cells are $CXCR3^-CCR6^-$ cells and T_{FH1} cells are $CXCR3^+CCR6^-$ cells. T_{FH1} and T_{FH2} cells were identified as able to provide help to B cells via IL-21 production, resulting in IgM and IgG secretion, whereas T_{FH1} have limited helper functions. However, ICOS expressing T_{FH1} are able to help memory B cells (but not naive B cells) to produce Ab following influenza vaccination [66]. Moreover, Morita and colleagues showed that patients with juvenile dermatomyositis displayed a profound skewing of cT_{FH} cells towards T_{FH2} and T_{FH1} cells that correlated with disease activity, suggesting that an altered balance of T_{FH} subtypes contributes to human autoimmunity [65]. Recently, the differential expression of ICOS, PD-1, and CCR7 interestingly allowed distinguishing three memory cT_{FH} subsets defined

as activated cells ($ICOS^+PD1^{hi}CCR7^{lo}$) or quiescent cells ($ICOS^-PD1^+CCR7^{int}$ and $ICOS^-PD1^-CCR7^{hi}$) [67, 68]. In SLE patients, the frequency of $CCR7^{lo}PD1^{hi}CXCR5^+CD4^+$ T cells is significantly higher than in healthy individuals [67]. The $CCR7^{lo}PD1^{hi}$ subset is indicative of active T_{FH} differentiation and its overrepresentation is associated with elevated autoAb titers and high disease activity [67]. By analyzing CXCR3 and CCR6 expression, we also interestingly described an altered phenotype of cT_{FH} cells characterized by the enhanced frequency of B cell helper T_{FH2} -like $CXCR3^-CCR6^-$ cells and a decreased frequency of $CXCR3^+CCR6^-T_{FH1}$ -like cells (not able to provide B cell help) in lupus patients with an active disease [69].

4. Molecules and/or Cytokines Involved in T_{FH} Generation/Regulation Are Associated with Lupus Pathogenesis

Aberrant expression and/or function of T_{FH} -related molecules are associated with lupus-like disease in mice [54, 70]. Similarly, in lupus patients, numbers of molecules involved in T_{FH} generation and/or regulation have been described to be dysregulated.

4.1. Surface Molecules. CD40/CD40L pathway plays an essential role in the initial phase of T_{FH} development (T-DC interaction in the T cell zone; Figure 1, [11]) and function (T_{FH} -GC B cell crosstalk in the GC; [71]). Interestingly, CD40L was found to be constitutively expressed at abnormally high levels on T cells (but also on B cells and monocytes) from lupus patients [72, 73]. Furthermore, $CD4^+$ T cells from female lupus patients, which overexpressed CD40L mRNA, were able to promote autologous B cell stimulation and autoAb production [74].

ICOS-mediated PI3K signaling is absolutely required for T_{FH} differentiation, for T_{FH} migration into the follicle [75], and also for T_{FH} maintenance [76]. PTEN acts as a negative regulator of the PI3K signaling pathway, leading to the inhibition of Bcl6 expression and T_{FH} differentiation. Interestingly, PTEN expression is significantly decreased in SLE B cells [77]; however, to the best of our knowledge, its expression in lupus $CD4^+$ T cells (especially T_{FH}) has not been investigated yet. ICOS expression has been found to be enhanced in $CD4^+$ T cells from lupus patients compared to healthy donors [78, 79] and ICOS levels were higher in patients with nephritis than in those without nephritis [80]. Moreover, infiltrated ICOS $^+$ T cells were shown to be in close contact with B cells in lupus kidneys [79].

Interaction between OX40L (on DC) and OX40 (on activated $CD4^+$ T cells) is also important for T_{FH} development. OX40 expression by lupus peripheral blood cells was found to be predominantly restricted to memory $CD45RO^+CD4^+$ T cells and its levels correlated with disease activity [81]. Moreover, OX40 has also been found to be highly expressed in kidneys of patients with lupus nephritis [82]. Importantly, the upstream region of the OX40 gene contains a single risk haplotype for SLE, which is correlated with increased expression of OX40 mRNA and protein [83]. Finally, it was

recently shown that OX40 signal promotes, *ex vivo*, the generation of T_{FH} -like cells that are functional B cell helpers [84].

4.2. Cytokines. Cytokine signals are absolutely required for T_{FH} differentiation. Elevated levels of IL-6 have been found in the serum and in the urine of active SLE patients [85–87]. The increased frequency of IL-6-producing peripheral blood mononuclear cells (PBMC) correlates with disease severity/activity and treatment response [88]. Raised expression of gp130 (one of the two subunits of the IL-6 receptor) has been found on $CD4^+$ T cells and B cells from patients with active SLE, while an important reduction in the gp130 expression by B lymphocytes was observed upon immunosuppressive treatment leading to milder disease activity [89]. Factors responsible for the constitutive expression of IL-6 in SLE have not been elucidated yet.

Serum IL-21 levels were found to be elevated in patients with SLE [69, 90], especially in patients with lupus nephritis, and to correlate with disease severity [90]. The real-time PCR analysis of skin biopsies taken from 3 lupus patients also revealed that IL-21 transcripts were significantly increased compared to control individuals [91]. Furthermore, the percentages of $CD4^+$ T cells producing IL-21 are significantly enhanced in lupus patients [92]. Finally, polymorphisms within the IL-21R and the IL-21 genes have been reported and may confer risk for SLE: a polymorphism in IL-21R (namely, rs3093301) was found to associate with lupus in 2 independent cohorts [93], a genetic association of two SNPs located in intronic regions of the IL-21 gene (rs2221903 and rs907715) was described [94], and the variant allele rs2055979A of the IL-21 gene was recently found to be associated with increased IL-21 levels [95].

Regarding BAFF, lupus sera have been shown to contain elevated levels of this cytokine and those levels correlate with both anti-dsDNA titers [96–98] and disease activity [99]. Finally, it has been reported that IL-2 production (which inhibits T_{FH} differentiation) upon TCR stimulation is impaired in SLE T lymphocytes [100, 101]. This lower IL-2 production could be explained by imbalanced expression between the transcription factors cAMP response element (CRE) binding protein (CREB) and the CRE-modulator (CREM), which, respectively, enhance and suppress the IL-2 gene transcription [102].

4.3. Transcription Factors, miRNA, and Regulatory T Cells. STAT3, which is activated by cytokines such as IL-6 and IL-21, binds to the Bcl6 promoter leading to high levels of Bcl6 expression and is thus important for T_{FH} differentiation. T cells from patients with SLE display increased levels of total and phosphorylated STAT3 [103, 104].

Reduced expression of miR-146a (a negative regulator of T_{FH} development) has been reported in PBMC from SLE patients [105] and seems to correlate with disease activity [105]. Moreover, a genome-wide association study has highlighted a variant, that is, rs2431697, in an intergenic region between PTTG1 (Pituitary Tumor-Transforming 1) and miR-146a, associated with lupus susceptibility [106]. Interestingly,

the risk allele of this SNP correlates with a diminution of miR-146a levels [107].

To date, the analysis of frequency and/or functionality of T_{FR} cells in an autoimmune context has not been reported. However, although there may be some discrepancies due to variations in phenotype analysis, peripheral regulatory T cells ($CD4^+CD25^+$ T cells) seem to play a role in human lupus pathogenesis. Several studies reported that a decreased number of Treg might contribute to the pathogenesis [108–111], but there were conflicting data regarding Treg function in lupus patients. The *in vitro* suppressive activity of these cells was found to be defective in some reports [111, 112] but other studies showed that the suppressive activity of highly purified Treg from lupus patients is not altered. It has been proposed that defective suppression in lupus could be attributed either to a higher sensitivity of Treg to Fas-mediated apoptosis in an SLE context [108] or to a lower susceptibility of effector T cells to Treg suppression [113]. Finally, it has been shown that IFN- α production by lupus APCs might be responsible for altered Treg functionality [114].

5. Targeting T_{FH} : From Lupus Mice to Lupus Patients

Data obtained from various lupus mouse models have already highlighted how blockade of signaling pathways involved in T_{FH} generation could lead to disease improvement. The administration of a blocking ICOS-L specific monoclonal Ab (mAb) to lupus NZB/W mice interrupted T_{FH} cell development leading to a decrease of autoAb levels and glomerulonephritis [115, 116]. Similar results were obtained in MRL/lpr lupus mice displaying a genetic deletion of ICOS [57].

Blockade of the CD40L-CD40 signaling pathway also led to the reduction of lupus symptoms in different mouse models [117, 118]. Treatment of MRL/lpr lupus mice with a neutralizing anti-IL-6R mAb has favorable effects on renal function and leads to a reduction of anti-dsDNA Ab levels [119]. In NZB/W mice, chronic administration of anti-IL-6 or anti-IL-6R mAb improves survival and reduces the progression of proteinuria and anti-dsDNA levels [120, 121]. In lupus-prone NZB/W and MRL/lpr mice, raised levels of BAFF are detected at the onset of the disease [122] and treatment with either TACI-Ig or BR3-Ig is effective at preventing clinical disease and ameliorating renal injury [123]. Regarding IL-21, its neutralization using IL-21R.Fc showed an improvement of biological and clinical signs of the disease in MRL/lpr lupus mice and BXSB-*Yaa* mice [53, 54]. Moreover, the administration of Ab specific for the IL-21R to MRL/lpr mice significantly reduced anti-dsDNA Ab titers and IgG deposits in the kidneys when compared to control mice [124]. In NZB/W mice, such IL-21R blocking even allowed reversing nephritis and halting disease progression in mice with preexisting lupus [125]. By using a miRNA-delivery approach via bacteriophage MS2 virus-like particles, Pan and colleagues recently showed that restoring the loss of miR-146a was effective in abolishing autoAb production and delaying SLE progression in lupus-prone mice [126]. Interestingly

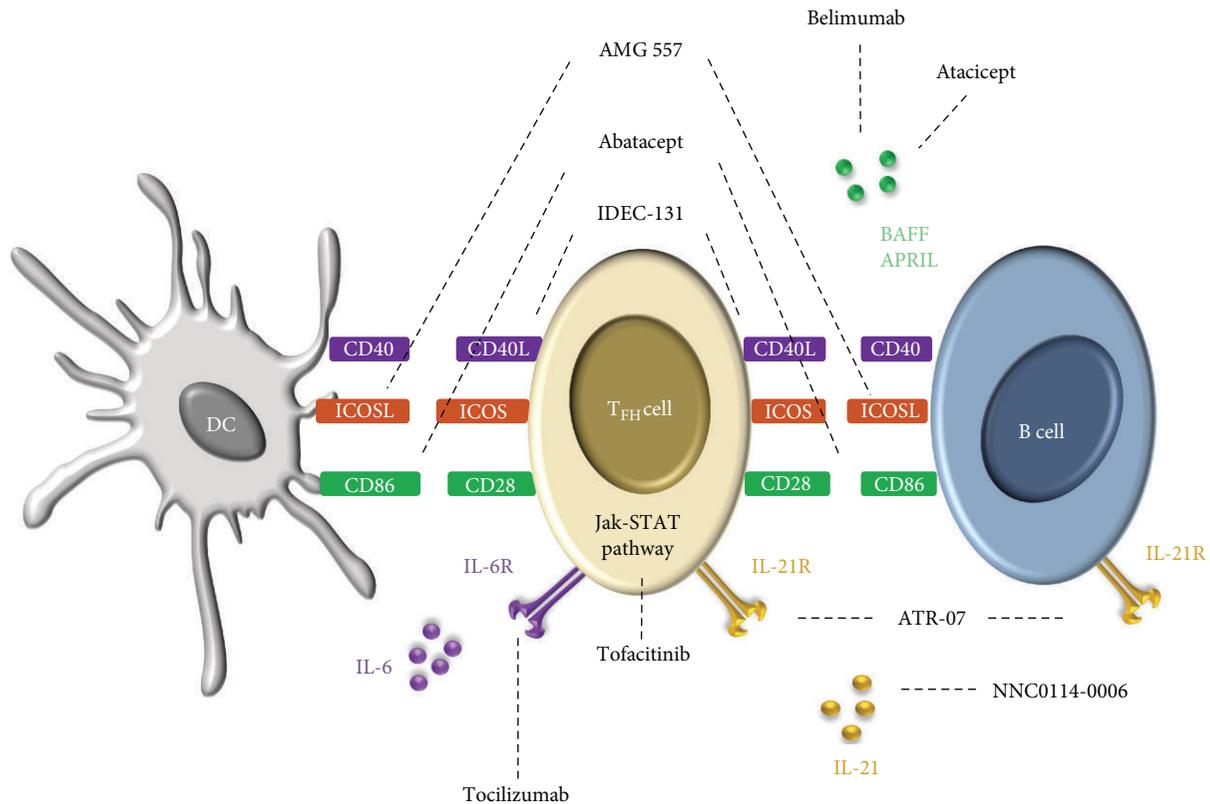


FIGURE 2: Therapeutic T_{FH} -related targets in SLE: present and future. T_{FH} function and differentiation can be affected by several biological drugs already used in SLE therapies or currently in clinical trials. Belimumab, Atacept, and NNC0114-0006 are mAbs targeting the soluble molecules BAFF, APRIL, and IL-21, respectively. Moreover, the blocking of T cell costimulatory molecules with AMG-557 (ICOSL), Abatacept (CD28), and IDEC-131 (CD40L) could modulate T_{FH} differentiation by decreasing the strength of T-B interactions. Finally, promising therapies could consist in inhibiting T_{FH} differentiation by blocking their signaling pathways either directly with the Jak-STAT inhibitor Tofacitinib or indirectly by the blockade of cytokine receptors such as IL-6R (Tocilizumab) or IL-21R (ATR-07).

also, treatment with the small molecule called Stattic (an inhibitor initially reported to block the phosphorylation, dimerization, and nuclear translocation of STAT3 in tumor cells) delayed the onset of proteinuria and reduced both anti-dsDNA autoAb and inflammatory cytokine levels in MRL/lpr lupus mice [127].

There is growing evidence of T_{FH} involvement in the pathogenesis of human SLE. Several therapeutic tools targeting T_{FH} biology already exist and even if their direct effect on T_{FH} development has not been evaluated, some of them were shown to improve the disease. Tocilizumab, a humanized mAb specific for the α -chain of the IL-6 receptor (which prevents IL-6 from binding to membrane bound and soluble IL-6 receptors), has been recently tested in SLE patients with promising results [128]. Interestingly, Tocilizumab therapy in rheumatoid arthritis patients leads to a significant reduction in circulating T_{FH} cell numbers and IL-21 production [17]. Belimumab, a human mAb that binds soluble BAFF, therefore inhibiting recognition by BAFF specific receptors has been tested in patients and results from phase III clinical trials have demonstrated the safety profile and efficacy in controlling lupus in a broad range of patients [129]. Belimumab is the first biologic to meet its primary endpoint in a phase III clinical trial for lupus patients and it was approved by

the US Food and Drug Administration in 2011. Among other potential therapeutic candidates, are those targeting T-B interactions, such as IDEC-131 (anti-CD40L Ab), AMG 557 (anti-ICOSL Ab), Abatacept (CTLA4-Ig), or targeting cytokines such as ATR-07 (anti-IL-21R Ab), NNC0114-0006 (anti-IL-21 Ab), Atacept (TACI-Ig), and small molecules inhibiting cytokine signaling pathways (Tofacitinib, a Jak-STAT inhibitor) (Figure 2).

6. Concluding Remarks

Although prognosis in SLE has improved markedly in the last 40 years, a better knowledge of the disease remains of prime importance to develop more potent and specific treatments. New targeted therapies designed to block pathways involved in disease pathogenesis are on the horizon. One promising option could be to specifically target factors involved in the generation of plasma cells responsible for the production of pathogenic autoAb in lupus. T_{FH} play a critical role in B cell activation and differentiation, and recent data have evidenced their involvement in lupus pathogenesis. Signals required for T_{FH} development may thus represent interesting targets in order to reduce T_{FH} numbers (and/or to correct the altered proportion of T_{FH} subsets) or to qualitatively

and/or quantitatively modulate their function. Another exciting therapeutic option consists in enhancing the negative molecular and cellular regulators of T_{FH} , such as miRNA or T_{FR} .

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

This study was supported by the French Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and by a grant from the Fondation Arthritis-Courtin.

References

- [1] M. R. Arbuckle, M. T. McClain, M. V. Rubertone et al., "Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus," *The New England Journal of Medicine*, vol. 349, no. 16, pp. 1526–1533, 2003.
- [2] S. Lacotte, H. Dumortier, M. Décossas, J.-P. Briand, and S. Muller, "Identification of new pathogenic players in lupus: autoantibody-secreting cells are present in nephritic kidneys of (NZBxNZW)F1 mice," *The Journal of Immunology*, vol. 184, no. 7, pp. 3937–3945, 2010.
- [3] E. Arce, D. G. Jackson, M. A. Gill, L. B. Bennett, J. Banchemereau, and V. Pascual, "Increased frequency of pre-germinal center B cells and plasma cell precursors in the blood of children with systemic lupus erythematosus," *The Journal of Immunology*, vol. 167, no. 4, pp. 2361–2369, 2001.
- [4] A. M. Jacobi, M. Odendahl, K. Reiter et al., "Correlation between circulating CD27^{high} plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 48, no. 5, pp. 1332–1342, 2003.
- [5] C. T. Ravirajan, M. A. Rahman, L. Papadaki et al., "Genetic, structural and functional properties of an IgG DNA-binding monoclonal antibody from a lupus patient with nephritis," *European Journal of Immunology*, vol. 28, no. 1, pp. 339–350, 1998.
- [6] A. C. Grammer, R. Slota, R. Fischer et al., "Abnormal germinal center reactions in systemic lupus erythematosus demonstrated by blockade of CD154-CD40 interactions," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 112, no. 10, pp. 1506–1520, 2003.
- [7] C. G. Vinuesa, M. A. Linterman, D. Yu, and I. C. M. MacLennan, "Follicular helper T cells," *Annual Review of Immunology*, vol. 34, pp. 335–368, 2016.
- [8] S. Crotty, "Follicular helper CD4 T cells (TFH)," *Annual Review of Immunology*, vol. 29, pp. 621–663, 2011.
- [9] N. Fazilleau, L. J. McHeyzer-Williams, H. Rosen, and M. G. McHeyzer-Williams, "The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding," *Nature Immunology*, vol. 10, no. 4, pp. 375–384, 2009.
- [10] L. S. K. Walker, A. Gulbranson-Judge, S. Flynn et al., "Compromised OX40 function in CD28-deficient mice is linked with failure to develop CXC chemokine receptor 5-positive CD4 cells and germinal centers," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 190, no. 8, pp. 1115–1122, 1999.
- [11] S. Fillatreau and D. Gray, "T cell accumulation in B cell follicles is regulated by dendritic cells and is independent of B cell activation," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 197, no. 2, pp. 195–206, 2003.
- [12] Y. S. Choi, R. Kageyama, D. Eto et al., "ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6," *Immunity*, vol. 34, no. 6, pp. 932–946, 2011.
- [13] X. Liu, X. Chen, B. Zhong et al., "Transcription factor achaete-scute homologue 2 initiates follicular T-helper-cell development," *Nature*, vol. 507, no. 7493, pp. 513–518, 2014.
- [14] F. Eddahri, S. Denanglaire, F. Bureau et al., "Interleukin-6/STAT3 signaling regulates the ability of naive T cells to acquire B-cell help capacities," *Blood*, vol. 113, no. 11, pp. 2426–2433, 2009.
- [15] N. Schmitt, R. Morita, L. Bourdery et al., "Human dendritic cells induce the differentiation of interleukin-21-producing T follicular helper-like cells through interleukin-12," *Immunity*, vol. 31, no. 1, pp. 158–169, 2009.
- [16] C. S. Ma, S. Suryani, D. T. Avery et al., "Early commitment of naïve human CD4⁺ T cells to the T follicular helper (T_{FH}) cell lineage is induced by IL-12," *Immunology and Cell Biology*, vol. 87, no. 8, pp. 590–600, 2009.
- [17] K.-M. Chavele, E. Merry, and M. R. Ehrenstein, "Circulating plasmablasts induce the differentiation of human T follicular helper cells via IL-6 production," *Journal of Immunology*, vol. 194, no. 6, pp. 2482–2485, 2015.
- [18] R. I. Nurieva, Y. Chung, D. Hwang et al., "Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages," *Immunity*, vol. 29, no. 1, pp. 138–149, 2008.
- [19] O. Dienz, S. M. Eaton, J. P. Bond et al., "The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4⁺ T cells," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 206, no. 1, pp. 69–78, 2009.
- [20] R. Spolski and W. J. Leonard, "Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity," *Annual Review of Immunology*, vol. 26, pp. 57–79, 2008.
- [21] P. C. Heinrich, I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Müller-Newen, and F. Schaper, "Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation," *Biochemical Journal*, vol. 374, no. 1, pp. 1–20, 2003.
- [22] C. S. Ma, D. T. Avery, A. Chan et al., "Functional STAT3 deficiency compromises the generation of human T follicular helper cells," *Blood*, vol. 119, no. 17, pp. 3997–4008, 2012.
- [23] F. Mazerolles, C. Picard, S. Kracker, A. Fischer, and A. Durandy, "Blood CD4⁺CD45RO⁺CXCR5⁺ T cells are decreased but partially functional in signal transducer and activator of transcription 3 deficiency," *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 131, no. 4, pp. 1146–1156, 2013.
- [24] R. J. Johnston, A. C. Poholek, D. DiToro et al., "Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation," *Science*, vol. 325, no. 5943, pp. 1006–1010, 2009.
- [25] R. I. Nurieva, Y. Chung, G. J. Martinez et al., "Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells," *Science*, vol. 325, no. 5943, pp. 1001–1005, 2009.
- [26] D. Yu, S. Rao, L. M. Tsai et al., "The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment," *Immunity*, vol. 31, no. 3, pp. 457–468, 2009.
- [27] B. C. Betz, K. L. Jordan-Williams, C. Wang et al., "Batf coordinates multiple aspects of B and T cell function required for normal antibody responses," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 207, no. 5, pp. 933–942, 2010.

- [28] Y. S. Choi, J. A. Gullicksrud, S. Xing et al., "LEF-1 and TCF-1 orchestrate T(HF) differentiation by regulating differentiation circuits upstream of the transcriptional repressor Bcl6," *Nature Immunology*, vol. 16, no. 9, pp. 980–990, 2015.
- [29] D. Stauss, C. Brunner, F. Berberich-Siebelt, U. E. Ho pken, M. Lipp, and G. Mu ller, "The transcriptional coactivator Bob1 promotes the development of follicular T helper cells via Bcl6," *The EMBO Journal*, vol. 35, no. 8, pp. 881–898, 2016.
- [30] E. L. Stone, M. Pepper, C. D. Katayama et al., "ICOS coreceptor signaling inactivates the transcription factor FOXO1 to promote Tfh cell differentiation," *Immunity*, vol. 42, no. 2, pp. 239–251, 2015.
- [31] S. M. Kerfoot, G. Yaari, J. R. Patel et al., "Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone," *Immunity*, vol. 34, no. 6, pp. 947–960, 2011.
- [32] H. Qi, J. L. Cannons, F. Klauschen, P. L. Schwartzberg, and R. N. Germain, "SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation," *Nature*, vol. 455, no. 7214, pp. 764–769, 2008.
- [33] C. S. Ma, N. J. Hare, K. E. Nichols et al., "Impaired humoral immunity in X-linked lymphoproliferative disease is associated with defective IL-10 production by CD4+ T cells," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 115, no. 4, pp. 1049–1059, 2005.
- [34] L. V. Riella, A. M. Paterson, A. H. Sharpe, and A. Chandraker, "Role of the PD-1 pathway in the immune response," *American Journal of Transplantation*, vol. 12, no. 10, pp. 2575–2587, 2012.
- [35] A. L. Rankin, H. MacLeod, S. Keegan et al., "IL-21 receptor is critical for the development of memory B cell responses," *Journal of Immunology*, vol. 186, no. 2, pp. 667–674, 2011.
- [36] X. Ou, S. Xu, and K.-P. Lam, "Deficiency in TNFRSF13B (TACI) expands T-follicular helper and germinal center B cells via increased ICOS-ligand expression but impairs plasma cell survival," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 38, pp. 15401–15406, 2012.
- [37] R. Goenka, A. H. Matthews, B. Zhang et al., "Local BlyS production by T follicular cells mediates retention of high affinity B cells during affinity maturation," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 211, no. 1, pp. 45–56, 2014.
- [38] E. Hams, M. J. McCarron, S. Amu et al., "Blockade of B7-H1 (programmed death ligand 1) enhances humoral immunity by positively regulating the generation of T follicular helper cells," *The Journal of Immunology*, vol. 186, no. 10, pp. 5648–5655, 2011.
- [39] D. Kashiwakuma, A. Suto, Y. Hiramatsu et al., "B and T lymphocyte attenuator suppresses IL-21 production from follicular Th cells and subsequent humoral immune responses," *The Journal of Immunology*, vol. 185, no. 5, pp. 2730–2736, 2010.
- [40] M. A. Linterman, W. Pierson, S. K. Lee et al., "Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response," *Nature Medicine*, vol. 17, no. 8, pp. 975–982, 2011.
- [41] Y. Chung, S. Tanaka, F. Chu et al., "Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions," *Nature Medicine*, vol. 17, no. 8, pp. 983–988, 2011.
- [42] S. G. Kang, W.-H. Liu, P. Lu et al., "MicroRNAs of the miR-17~92 family are critical regulators of TFH differentiation," *Nature Immunology*, vol. 14, no. 8, pp. 849–857, 2013.
- [43] D. Baumjohann, R. Kageyama, J. M. Clingan et al., "The microRNA cluster miR-17~92 promotes TFH cell differentiation and represses subset-inappropriate gene expression," *Nature Immunology*, vol. 14, no. 8, pp. 840–848, 2013.
- [44] H. Takahashi, T. Kanno, S. Nakayamada et al., "TGF- β and retinoic acid induce the microRNA miR-10a, which targets Bcl-6 and constrains the plasticity of helper T cells," *Nature Immunology*, vol. 13, no. 6, pp. 587–595, 2012.
- [45] A. Pratama, M. Srivastava, N. J. Williams et al., "MicroRNA-146a regulates ICOS-ICOSL signalling to limit accumulation of T follicular helper cells and germinal centres," *Nature Communications*, vol. 6, article 6436, 2015.
- [46] A. Ballesteros-Tato, B. León, B. A. Graf et al., "Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation," *Immunity*, vol. 36, no. 5, pp. 847–856, 2012.
- [47] R. J. Johnston, Y. S. Choi, J. A. Diamond, J. A. Yang, and S. Crotty, "STAT5 is a potent negative regulator of TFH cell differentiation," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 209, no. 2, pp. 243–250, 2012.
- [48] R. I. Nurieva, A. Podd, Y. Chen et al., "STAT5 protein negatively regulates T follicular helper (Tfh) cell generation and function," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 14, pp. 11234–11239, 2012.
- [49] K. J. Oestreich, S. E. Mohn, and A. S. Weinmann, "Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in T_H1 cells to regulate flexibility with a T_{FH}-like gene profile," *Nature Immunology*, vol. 13, no. 4, pp. 405–411, 2012.
- [50] C. G. Vinuesa, M. C. Cook, C. Angelucci et al., "A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity," *Nature*, vol. 435, no. 7041, pp. 452–458, 2005.
- [51] M. A. Linterman, R. J. Rigby, R. K. Wong et al., "Follicular helper T cells are required for systemic autoimmunity," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 206, no. 3, pp. 561–576, 2009.
- [52] K. Ozaki, R. Spolski, R. Ettinger et al., "Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6," *The Journal of Immunology*, vol. 173, no. 9, pp. 5361–5371, 2004.
- [53] J. A. Bubier, S. M. Bennett, T. J. Sproule et al., "Treatment of BXSB-Yaa mice with IL-21R-Fc fusion protein minimally attenuates systemic lupus erythematosus," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1110, pp. 590–601, 2007.
- [54] D. Herber, T. P. Brown, S. Liang, D. A. Young, M. Collins, and K. Dunussi-Joannopoulos, "IL-21 has a pathogenic role in a lupus-prone mouse model and its blockade with IL-21R.Fc reduces disease progression," *The Journal of Immunology*, vol. 178, no. 6, pp. 3822–3830, 2007.
- [55] A. L. Rankin, H. Guay, D. Herber et al., "IL-21 receptor is required for the systemic accumulation of activated B and T lymphocytes in MRL/MpJ-Fas lpr/lpr/J mice," *Journal of Immunology*, vol. 188, no. 4, pp. 1656–1667, 2012.
- [56] J. A. Bubier, T. J. Sproule, O. Foreman et al., "A critical role for IL-21 receptor signaling in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus in BXSB-Yaa mice," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 5, pp. 1518–1523, 2009.
- [57] J. M. Odegard, B. R. Marks, L. D. Diplacido et al., "ICOS-dependent extrafollicular helper T cells elicit IgG production via IL-21 in systemic autoimmunity," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 205, no. 12, pp. 2873–2886, 2008.
- [58] J. William, C. Euler, S. Christensen, and M. J. Shlomchik, "Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers," *Science*, vol. 297, no. 5589, pp. 2066–2070, 2002.
- [59] N. Simpson, P. A. Gatenby, A. Wilson et al., "Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed

- phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus,” *Arthritis and Rheumatism*, vol. 62, no. 1, pp. 234–244, 2010.
- [60] J.-Y. Choi, J. H.-E. Ho, S. G. Pasoto et al., “Circulating follicular helper-like T cells in systemic lupus erythematosus: association with disease activity,” *Arthritis and Rheumatology*, vol. 67, no. 4, pp. 988–999, 2015.
- [61] X. Feng, D. Wang, J. Chen et al., “Inhibition of aberrant circulating Tfh cell proportions by corticosteroids in patients with systemic lupus erythematosus,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 12, Article ID e51982, 2012.
- [62] X. Zhang, E. Lindwall, C. Gauthier et al., “Circulating CXCR5⁺CD4⁺ helper T cells in systemic lupus erythematosus patients share phenotypic properties with germinal center follicular helper T cells and promote antibody production,” *Lupus*, vol. 24, no. 9, pp. 909–917, 2015.
- [63] H. Xu, J. Liu, X. Cui et al., “Increased frequency of circulating follicular helper T cells in lupus patients is associated with autoantibody production in a CD40L-dependent manner,” *Cellular Immunology*, vol. 295, no. 1, pp. 46–51, 2015.
- [64] K. Szabó, G. Papp, A. Szántó, T. Tarr, and M. Zeher, “A comprehensive investigation on the distribution of circulating follicular T helper cells and B cell subsets in primary Sjögren’s syndrome and systemic lupus erythematosus,” *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 183, no. 1, pp. 76–89, 2016.
- [65] R. Morita, N. Schmitt, S.-E. Bentebibel et al., “Human blood CXCR5⁺CD4⁺ T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion,” *Immunity*, vol. 34, no. 1, pp. 108–121, 2011.
- [66] S. E. Bentebibel, S. Lopez, G. Obermoser et al., “Induction of ICOS⁺CXCR3⁺CXCR5⁺ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination,” *Science Translational Medicine*, vol. 5, no. 7, Article ID 176ra32, 2013.
- [67] J. He, L. M. Tsai, Y. Leong et al., “Circulating precursor CCR7loPD-1hi CXCR5⁺ CD4⁺ T cells indicate tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure,” *Immunity*, vol. 39, no. 4, pp. 770–781, 2013.
- [68] M. Locci, C. Havenar-Daughton, E. Landais et al., “Human circulating PD-1⁺CXCR3⁺CXCR5⁺ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses,” *Immunity*, vol. 39, no. 4, pp. 758–769, 2013.
- [69] C. Le Coz, A. Joubin, J.-L. Pasquali, A.-S. Korganow, H. Dumortier, and F. Monneaux, “Circulating TFH subset distribution is strongly affected in lupus patients with an active disease,” *PLoS ONE*, vol. 8, no. 9, Article ID e75319, 2013.
- [70] G. C. Zeller, J. Hirahashi, A. Schwarting, A. H. Sharpe, and V. R. Kelley, “Inducible co-stimulator null MRL-Faslpr mice: uncoupling of autoantibodies and T cell responses in lupus,” *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 17, no. 1, pp. 122–130, 2006.
- [71] Y.-J. Liu, D. E. Joshua, G. T. Williams, C. A. Smith, J. Gordon, and I. C. M. MacLennan, “Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres,” *Nature*, vol. 342, no. 6252, pp. 929–931, 1989.
- [72] A. Desai-Mehta, L. Lu, R. Ramsey-Goldman, and S. K. Datta, “Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 97, no. 9, pp. 2063–2073, 1996.
- [73] C. G. Katsiari, S.-N. C. Liou, A. M. Dimopoulos, D. V. Charalambopoulos, M. Mavrikakis, and P. P. Sfikakis, “CD40L overexpression on T cells and monocytes from patients with systemic lupus erythematosus is resistant to calcineurin inhibition,” *Lupus*, vol. 11, no. 6, pp. 370–378, 2002.
- [74] Y. Zhou, J. Yuan, Y. Pan et al., “T cell CD40LG gene expression and the production of IgG by autologous B cells in systemic lupus erythematosus,” *Clinical Immunology*, vol. 132, no. 3, pp. 362–370, 2009.
- [75] H. Xu, X. Li, D. Liu et al., “Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility,” *Nature*, vol. 496, no. 7446, pp. 523–527, 2013.
- [76] D. Liu, H. Xu, C. Shih et al., “T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction,” *Nature*, vol. 517, no. 7533, pp. 214–218, 2015.
- [77] X.-N. Wu, Y.-X. Ye, J.-W. Niu et al., “Defective PTEN regulation contributes to B cell hyperresponsiveness in systemic lupus erythematosus,” *Science Translational Medicine*, vol. 6, no. 246, Article ID 246ra99, 2014.
- [78] J.-H. Yang, J. Zhang, Q. Cai et al., “Expression and function of inducible costimulator on peripheral blood T cells in patients with systemic lupus erythematosus,” *Rheumatology*, vol. 44, no. 10, pp. 1245–1254, 2005.
- [79] A. Hutloff, K. Büchner, K. Reiter et al., “Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus,” *Arthritis and Rheumatism*, vol. 50, no. 10, pp. 3211–3220, 2004.
- [80] W.-X. Li, H.-F. Pan, G.-P. Chen, J.-H. Tao, X.-P. Li, and D.-Q. Ye, “Expression of inducible co-stimulator on peripheral blood T lymphocytes in patients with lupus nephritis,” *Rheumatology International*, vol. 32, no. 7, pp. 2051–2055, 2012.
- [81] S. Patschan, S. Dolff, A. Kribben et al., “CD134 expression on CD4⁺ T cells is associated with nephritis and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus,” *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 145, no. 2, pp. 235–242, 2006.
- [82] J. Aten, A. Roos, N. Claessen, E. J. M. Schilder-Tol, I. J. M. Ten Berge, and J. J. Weening, “Strong and selective glomerular localization of CD134 ligand and TNF receptor-1 in proliferative lupus nephritis,” *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 11, no. 8, pp. 1426–1438, 2000.
- [83] D. S. C. Graham, R. R. Graham, H. Manku et al., “Polymorphism at the TNF superfamily gene TNFSF4 confers susceptibility to systemic lupus erythematosus,” *Nature Genetics*, vol. 40, no. 1, pp. 83–89, 2008.
- [84] C. Jacquemin, N. Schmitt, C. Contin-Bordes et al., “OX40 ligand contributes to human lupus pathogenesis by promoting T follicular helper response,” *Immunity*, vol. 42, no. 6, pp. 1159–1170, 2015.
- [85] H.-Y. Chun, J.-W. Chung, H.-A. Kim et al., “Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus,” *Journal of Clinical Immunology*, vol. 27, no. 5, pp. 461–466, 2007.
- [86] G. Gröndal, I. Gunnarsson, J. Rönnelid, S. Rogberg, L. Klareskog, and I. Lundberg, “Cytokine production, serum levels and disease activity in systemic lupus erythematosus,” *Clinical and Experimental Rheumatology*, vol. 18, no. 5, pp. 565–570, 2000.
- [87] Y. Horii, M. Iwano, E. Hirata et al., “Role of interleukin-6 in the progression of mesangial proliferative glomerulonephritis,” *Kidney International*, vol. 39, pp. S71–S75, 1993.
- [88] P. Esposito, M. M. Balletta, A. Procino, L. Postiglione, and B. Memoli, “Interleukin-6 release from peripheral mononuclear cells is associated to disease activity and treatment response in patients with lupus nephritis,” *Lupus*, vol. 18, no. 14, pp. 1329–1330, 2009.

- [89] M. De La Torre, J. M. Urra, and J. Blanco, "Raised expression of cytokine receptor gp130 subunit on peripheral lymphocytes of patients with active lupus. A useful tool for monitoring the disease activity?" *Lupus*, vol. 18, no. 3, pp. 216–222, 2009.
- [90] X.-F. Wang, S.-L. Yuan, L. Jiang et al., "Changes of serum BAFF and IL-21 levels in patients with systemic lupus erythematosus and their clinical significance," *Xi Bao Yu Fen Mian Yi Xue Za Zhi*, vol. 23, no. 11, pp. 1041–1042, 2007.
- [91] R. Caruso, E. Botti, M. Sarra et al., "Involvement of interleukin-21 in the epidermal hyperplasia of psoriasis," *Nature Medicine*, vol. 15, no. 9, pp. 1013–1015, 2009.
- [92] S. Dörfel, W. H. Abdulahad, J. Westra et al., "Increase in IL-21 producing T-cells in patients with systemic lupus erythematosus," *Arthritis Research & Therapy*, vol. 13, no. 5, article R157, 2011.
- [93] R. Webb, J. T. Merrill, J. A. Kelly et al., "A polymorphism within IL21R confers risk for systemic lupus erythematosus," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 60, no. 8, pp. 2402–2407, 2009.
- [94] A. H. Sawalha, K. M. Kaufman, J. A. Kelly et al., "Genetic association of interleukin-21 polymorphisms with systemic lupus erythematosus," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 67, no. 4, pp. 458–461, 2008.
- [95] Y. Lan, B. Luo, J.-L. Wang, Y.-W. Jiang, and Y.-S. Wei, "The association of interleukin-21 polymorphisms with interleukin-21 serum levels and risk of systemic lupus erythematosus," *Gene*, vol. 538, no. 1, pp. 94–98, 2014.
- [96] J. Zhang, V. Roschke, K. P. Baker et al., "Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus," *The Journal of Immunology*, vol. 166, no. 1, pp. 6–10, 2001.
- [97] G. S. Cheema, V. Roschke, D. M. Hilbert, and W. Stohl, "Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 44, no. 6, pp. 1313–1319, 2001.
- [98] W. Stohl, S. Metyas, S.-M. Tan et al., "B lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus: longitudinal observations," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 48, no. 12, pp. 3475–3486, 2003.
- [99] M. Petri, W. Stohl, W. Chatham et al., "Association of plasma B lymphocyte stimulator levels and disease activity in systemic lupus erythematosus," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 58, no. 8, pp. 2453–2459, 2008.
- [100] M. Linker-Israeli, A. C. Bakke, R. C. Kitridou, S. Gendler, S. Gillis, and D. A. Horwitz, "Defective production of interleukin 1 and interleukin 2 in patients with systemic lupus erythematosus (SLE)," *Journal of Immunology*, vol. 130, no. 6, pp. 2651–2655, 1983.
- [101] L. A. Lieberman and G. C. Tsokos, "The IL-2 defect in systemic lupus erythematosus disease has an expansive effect on host immunity," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2010, Article ID 740619, 6 pages, 2010.
- [102] E. E. Solomou, Y.-T. Juang, M. F. Gourley, G. M. Kammer, and G. C. Tsokos, "Molecular basis of deficient IL-2 production in T cells from patients with systemic lupus erythematosus," *The Journal of Immunology*, vol. 166, no. 6, pp. 4216–4222, 2001.
- [103] T. Harada, V. Kyttaris, Y. Li, Y.-T. Juang, Y. Wang, and G. C. Tsokos, "Increased expression of STAT3 in SLE T cells contributes to enhanced chemokine-mediated cell migration," *Autoimmunity*, vol. 40, no. 1, pp. 1–8, 2007.
- [104] C. M. Hedrich, T. Rauen, S. A. Apostolidis et al., "Stat3 promotes IL-10 expression in lupus T cells through trans-activation and chromatin remodeling," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 111, no. 37, pp. 13457–13462, 2014.
- [105] Y. Tang, X. Luo, H. Cui et al., "MicroRNA-146a contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 60, no. 4, pp. 1065–1075, 2009.
- [106] J. B. Harley, M. E. Alarcón-Riquelme, L. A. Criswell et al., "Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXX1, KIAA1542 and other loci," *Nature Genetics*, vol. 40, no. 2, pp. 204–210, 2008.
- [107] S. E. Löfgren, J. Frostegård, L. Truedsson et al., "Genetic association of miRNA-146a with systemic lupus erythematosus in Europeans through decreased expression of the gene," *Genes & Immunity*, vol. 13, no. 3, pp. 268–274, 2012.
- [108] M. Miyara, Z. Amoura, C. Parizot et al., "Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus," *The Journal of Immunology*, vol. 175, no. 12, pp. 8392–8400, 2005.
- [109] M.-F. Liu, C.-R. Wang, L.-L. Fung, and C.-R. Wu, "Decreased CD4⁺CD25⁺ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus," *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 59, no. 2, pp. 198–202, 2004.
- [110] J. C. Crispin, A. Martínez, and J. Alcocer-Varela, "Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus," *Journal of Autoimmunity*, vol. 21, no. 3, pp. 273–276, 2003.
- [111] M. Bonelli, A. Savitskaya, K. von Dalwigk et al., "Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE)," *International Immunology*, vol. 20, no. 7, pp. 861–868, 2008.
- [112] X. Valencia, C. Yarboro, G. Illei, and P. E. Lipsky, "Deficient CD4⁺CD25^{high} T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus," *Journal of Immunology*, vol. 178, no. 4, pp. 2579–2588, 2007.
- [113] R. K. C. Venigalla, T. Tretter, S. Krienke et al., "Reduced CD4⁺CD25⁺ T cell sensitivity to the suppressive function of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} regulatory T cells in patients with active systemic lupus erythematosus," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 58, no. 7, pp. 2120–2130, 2008.
- [114] B. Yan, S. Ye, G. Chen, M. Kuang, N. Shen, and S. Chen, "Dysfunctional CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in untreated active systemic lupus erythematosus secondary to interferon- α -producing antigen-presenting cells," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 58, no. 3, pp. 801–812, 2008.
- [115] H. Iwai, M. Abe, S. Hirose et al., "Involvement of inducible costimulator-B7 homologous protein costimulatory pathway in murine lupus nephritis," *Journal of Immunology*, vol. 171, no. 6, pp. 2848–2854, 2003.
- [116] Y.-L. Hu, D. P. Metz, J. Chung, G. Siu, and M. Zhang, "B7RP-1 blockade ameliorates autoimmunity through regulation of follicular helper T cells," *The Journal of Immunology*, vol. 182, no. 3, pp. 1421–1428, 2009.
- [117] J. Ma, J. Xu, M. P. Madaio et al., "Autoimmune lpr/lpr mice deficient in CD40 ligand: spontaneous Ig class switching with dichotomy of autoantibody responses," *Journal of Immunology*, vol. 157, no. 1, pp. 417–426, 1996.
- [118] D. I. Daikh, B. K. Finck, P. S. Linsley, D. Hollenbaugh, and D. Wofsy, "Long-term inhibition of murine lupus by brief simultaneous blockade of the B7/CD28 and CD40/gp39 costimulation pathways," *The Journal of Immunology*, vol. 159, no. 7, pp. 3104–3108, 1997.
- [119] B. A. Kiberd, "Interleukin-6 receptor blockage ameliorates murine lupus nephritis," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 4, no. 1, pp. 58–61, 1993.

- [120] B. K. Finck, B. Chan, and D. Wofsy, "Interleukin 6 promotes murine lupus in NZB/NZW F1 mice," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 94, no. 2, pp. 585–591, 1994.
- [121] M. Mihara, N. Takagi, Y. Takeda, and Y. Ohsugi, "IL-6 receptor blockade inhibits the onset of autoimmune kidney disease in NZB/W F₁ mice," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 112, no. 3, pp. 397–402, 1998.
- [122] J. A. Gross, J. Johnston, S. Mudri et al., "TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease," *Nature*, vol. 404, no. 6781, pp. 995–999, 2000.
- [123] M. Ramanujam, R. Bethunaickan, W. Huang, H. Tao, M. P. Madaio, and A. Davidson, "Selective blockade of BAFF for the prevention and treatment of systemic lupus erythematosus nephritis in NZM2410 mice," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 62, no. 5, pp. 1457–1468, 2010.
- [124] Y. Vugmeyster, H. Guay, P. Szklut et al., "In vitro potency, pharmacokinetic profiles, and pharmacological activity of optimized anti-IL-21R antibodies in a mouse model of lupus," *mAbs*, vol. 2, no. 3, pp. 335–346, 2010.
- [125] M. Zhang, G. Yu, B. Chan et al., "Interleukin-21 receptor blockade inhibits secondary humoral responses and halts the progression of preestablished disease in the (NZB × NZW)F1 systemic lupus erythematosus model," *Arthritis & Rheumatology*, vol. 67, no. 10, pp. 2723–2731, 2015.
- [126] Y. Pan, T. Jia, Y. Zhang et al., "MS2 VLP-based delivery of microRNA-146a inhibits autoantibody production in lupus-prone mice," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 7, pp. 5957–5967, 2012.
- [127] L. J. Edwards, M. Mizui, and V. Kyttaris, "Signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 inhibition delays the onset of lupus nephritis in MRL/lpr mice," *Clinical Immunology*, vol. 158, no. 2, pp. 221–230, 2015.
- [128] G. G. Illei, Y. Shirota, C. H. Yarboro et al., "Tocilizumab in systemic lupus erythematosus: data on safety, preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells from an open-label phase I dosage-escalation study," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 62, no. 2, pp. 542–552, 2010.
- [129] S. V. Navarra, R. M. Guzmán, A. E. Gallacher et al., "Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial," *The Lancet*, vol. 377, no. 9767, pp. 721–731, 2011.
- [130] S. Flynn, K.-M. Toellner, C. Raykundalia, M. Goodall, and P. Lane, "CD4 T cell cytokine differentiation: the B cell activation molecule, OX40 ligand, instructs CD4 T cells to express interleukin 4 and upregulates expression of the chemokine receptor, Blr-1," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 188, no. 2, pp. 297–304, 1998.
- [131] T. Brocker, A. Gulbranson-Judge, S. Flynn, M. Riedinger, C. Raykundalia, and P. Lane, "CD4 T cell traffic control: in vivo evidence that ligation of OX40 on CD4 T cells by OX40-ligand expressed on dendritic cells leads to the accumulation of CD4 T cells in B follicles," *European Journal of Immunology*, vol. 29, no. 5, pp. 1610–1616, 1999.
- [132] M. Gigoux, J. Shang, Y. Pak et al., "Inducible costimulator promotes helper T-cell differentiation through phosphoinositide 3-kinase," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 48, pp. 20371–20376, 2009.
- [133] C. S. Ma, N. Wong, G. Rao et al., "Monogenic mutations differentially affect the quantity and quality of T follicular helper cells in patients with human primary immunodeficiencies," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 136, no. 4, pp. 993–1006, 2015.
- [134] D. Eto, C. Lao, D. DiToro et al., "IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (T_{fh}) differentiation," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 3, Article ID e17739, 2011.
- [135] N. M. Haynes, C. D. C. Allen, R. Lesley, K. M. Ansel, N. Killeen, and J. G. Cyster, "Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1^{High} germinal center-associated subpopulation," *Journal of Immunology*, vol. 179, no. 8, pp. 5099–5108, 2007.
- [136] D. Breitfeld, L. Ohl, E. Kremmer et al., "Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 192, no. 11, pp. 1545–1551, 2000.
- [137] P. Schaerli, K. Willmann, A. B. Lang, M. Lipp, P. Loetscher, and B. Moser, "CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 192, no. 11, pp. 1553–1562, 2000.
- [138] T. M. Foy, J. D. Laman, J. A. Ledbetter, A. Aruffo, E. Claassen, and R. J. Noelle, "gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 180, no. 1, pp. 157–163, 1994.
- [139] S. Salek-Ardakani, Y. S. Choi, M. R.-E. Benhnia et al., "B cell-specific expression of B7-2 is required for follicular Th cell function in response to vaccinia virus," *The Journal of Immunology*, vol. 186, no. 9, pp. 5294–5303, 2011.
- [140] V. L. Bryant, C. S. Ma, D. T. Avery et al., "Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5⁺ T follicular helper cells," *Journal of Immunology*, vol. 179, no. 12, pp. 8180–8190, 2007.
- [141] R. L. Reinhardt, H.-E. Liang, and R. M. Locksley, "Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire," *Nature Immunology*, vol. 10, no. 4, pp. 385–393, 2009.
- [142] I. Yusuf, R. Kageyama, L. Monticelli et al., "Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150)," *Journal of Immunology*, vol. 185, no. 1, pp. 190–202, 2010.
- [143] K. L. Good-Jacobson, C. G. Szumilas, L. Chen, A. H. Sharpe, M. M. Tomayko, and M. J. Shlomchik, "PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells," *Nature Immunology*, vol. 11, no. 6, pp. 535–542, 2010.

III. Résultats complémentaires

1. Caractérisation des sous-populations de T_{FH} chez l'Homme

Afin d'appréhender les conséquences d'une diminution de la fréquence des T_{FH1} en circulation (**Le Coz et al., 2013**), une meilleure compréhension de la fonction de ces cellules est nécessaire. Morita *et al.* ont démontré que cette population sécrète des taux importants d'IFN- γ , et que ses capacités à apporter l'aide nécessaire à la différenciation des LB, notamment par la production d'IL-21, sont réduites par rapport aux autres sous-populations de cT_{FH} (**Morita et al., 2011**). Il est connu que l'IFN- γ est une cytokine impliquée dans la mise en place d'un contexte inflammatoire. Dans notre laboratoire, il a été mis en évidence que la fréquence de cette population est diminuée, et que cette diminution est corrélée à l'activité de la pathologie lupique. Ces observations amènent la question suivante : Les cellules T_{FH1} jouent-elles un rôle inhibiteur de l'activation et de la différenciation des lymphocytes B ? Il a été démontré dans un modèle murin que les cellules T_{FR}, caractérisées par l'expression conjointe du facteur de transcription FoxP3 et du récepteur aux chimiokines CXCR5, expriment plus fortement le récepteur inhibiteur PD-1 que les cellules T_{FH} FoxP3⁻ (**Sage et al., 2013**). Ces cellules T_{FR} sont retrouvées dans la circulation sanguine et migrent au sein d'OLS tels que les ganglions lymphatiques afin d'inhiber la réponse humorale médiée par les cT_{FH}. Chez l'homme, deux études ont démontré que la forte expression de PD-1 est restreinte aux populations de cellules T_{FH} exprimant CXCR3 (**He et al., 2013; Locci et al., 2013**). C'est pourquoi, nous avons dans un premier temps évalué le niveau d'expression de PD-1 sur les populations de cT_{FH}. Nous avons confirmé que le niveau d'expression de PD-1 est plus élevé à la surface des cellules CXCR3⁺ (T_{FH1} et T_{FH1-17}) par rapport aux cellules T_{FH2} et T_{FH17} chez l'individu sain (MFI = 7000 pour les T_{FH1}, 7200 pour les T_{FH1-17} vs. 4800 et 5000 pour les T_{FH2} et T_{FH17} respectivement) (*Figure 20A*). De plus, la stimulation de PBMCs *in vitro* à l'aide d'Ac anti-CD3 et anti-CD28 induit une augmentation du niveau d'expression de PD-1 à la surface des cellules cT_{FH}. Cette augmentation est particulièrement plus importante à la surface des T_{FH} CXCR3⁺ que sur les deux autres sous-populations CXCR3⁻ (*Figure 20B*). Par ailleurs, les cellules cT_{FH} expriment d'autres molécules de costimulation comme BTLA. Aucune différence d'expression de BTLA n'a été observée à la surface des T_{FH1}, T_{FH2} et T_{FH17} (respectivement MFI = 7010, 7020, 7600). Nous avons toutefois constaté que le niveau d'expression de BTLA est augmenté à la surface des cellules T_{FH} CXCR3⁺CCR6⁺ (MFI = 9300), également appelée T_{FH1-17}, cellules possédant des caractéristiques communes aux T_{FH1} et des T_{FH17} (*Figure 20C*).

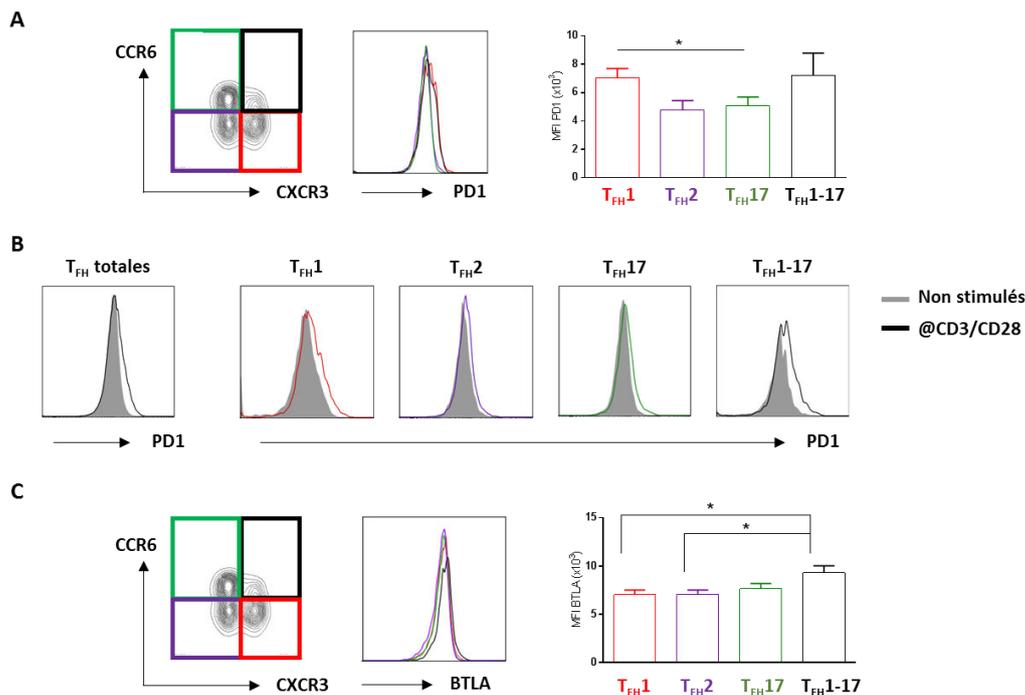


Figure 20. Expression des récepteurs co-inhibiteurs PD-1 et BTLA par les sous-populations de cT_{FH} d'individus sains.

A. Le niveau d'expression de PD-1 à la surface des sous-populations de cT_{FH} d'individus sains (n=15) a été évalué *ex vivo* par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en moyenne de MFI +/- SEM. (* = p<0,05, One-Way ANOVA, Tukey comparison). **B.** Exemple d'expression de PD-1 à la surface des cellules cT_{FH} d'individus sains cultivées pendant 48h en présence ou en absence (pic gris) de stimulation à l'aide d'Ac anti-CD3 et anti-CD28. **C.** Le niveau d'expression de BTLA à la surface des sous-populations de T_{FH} circulantes d'individus sains (n=21) a été évalué *ex vivo* par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en moyenne de MFI +/- SEM. (* = p<0,05, One-Way ANOVA, Tukey comparison).

Il a récemment été décrit que le niveau d'expression de PD-1 à la surface des cellules cT_{FH} est augmenté chez les patients lupiques, et que cette augmentation est corrélée avec l'activité de la maladie (**Choi et al., 2015a**). Nous avons confirmé ces résultats en comparant le niveau d'expression de PD-1 à la surface des cT_{FH} totales (MFI = 3740 pour les individus contrôles vs. 6550 pour les patients lupiques) (**Figure 21A**). Nous avons démontré que l'expression de PD-1 est augmentée à la surface des T_{FH}1 et 2 de patients lupiques par rapport aux individus sains (**Figure 21A**). De plus, il faut noter que, comme pour les individus sains, le niveau d'expression de PD-1 est plus élevé à la surface des T_{FH}1 qu'à la surface des T_{FH}2 et 17 de patients lupiques (MFI = 9800 pour les T_{FH}1 vs. 7050 et 6950 pour les T_{FH}2 et T_{FH}17 ; * : p<0,05). Concernant BTLA, aucune différence d'expression n'a été observée entre individus sains et patients lupiques, aussi bien sur les cT_{FH} totales qu'à la surface des différentes sous-populations de cT_{FH} (**Figure 21B**).

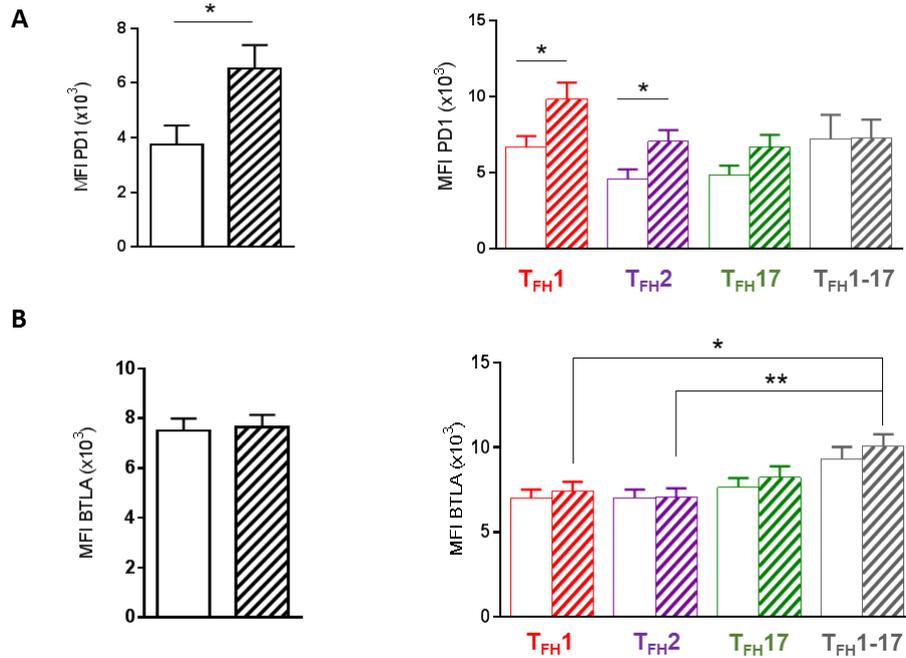


Figure 21. Comparaison de l'expression de PD-1 et de BTLA sur les différentes sous-populations de cTFH chez les individus sains et les patients lupiques.

Le niveau d'expression de PD-1 (**A**) et de BTLA (**B**) a été évalué à la surface des cellules cTFH totales (à gauche) et des sous-populations de T_{FH} (à droite) d'individus sains (barres blanches ; n=15-21) et de patients lupiques (barres hachurées ; n=10-26) par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en moyenne de MFI +/- SEM. (* = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; Mann-Whitney ou One-Way ANOVA, Tukey comparison).

Le niveau d'expression de PD-1 étant élevé à la surface des cellules T_{FH}1, exprimant CXCR3, chez l'Homme, nous avons cherché à définir si parmi ces cellules sont retrouvées les T_{FR}. Notre hypothèse était que la diminution en T_{FH}1 observée chez les patients lupiques pourrait correspondre à une diminution des cellules T_{FR}. En effet, comme indiqué précédemment, chez la souris, les cellules T_{FH} FoxP3⁺ expriment plus fortement PD-1 que les cellules T_{FH} FoxP3⁻ (Locci et al., 2013). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des marquages intracellulaires du facteur de transcription spécifique des LT régulateurs, FoxP3, au sein des différentes sous-populations de T_{FH}, que nous avons analysé par cytométrie en flux. Il apparaît que contrairement à notre hypothèse initiale, la fréquence de cellules FoxP3⁺ est plus élevée parmi les cellules n'exprimant pas CXCR3, qu'à la surface des cellules CXCR3⁺ (2,1% vs. 7.2%) (Figure 22A). Cette fréquence est notamment plus élevée à la surface des cellules T_{FH}2 qu'à la surface des T_{FH}17 (4% vs. 3,2%) (Figure 22B). Ces observations ont été confirmées en démontrant que par rapport aux T_{FH} (CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺FoxP3⁻) exprimant CXCR3 et CCR6, les T_{FR} (CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺FoxP3⁺) sont majoritairement négatives pour l'expression de ces deux récepteurs aux chimiokines (Figure 22C).

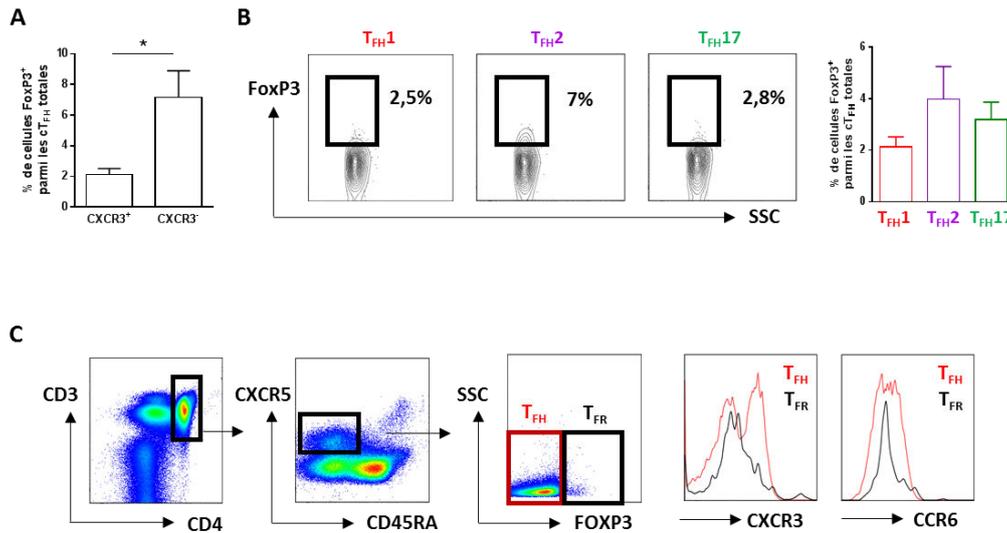


Figure 22. Comparaison de l'expression FoxP3 sur les sous-populations de cT_{FH} chez l'homme.

A. Comparaison du pourcentage de cellules FoxP3⁺ parmi les cellules T_{FH} exprimant ou non le récepteur aux chimiokines CXCR3. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM. (* = p<0,05, Mann-Whitney ou One-Way ANOVA, comparaison multiple de Tukey). **B.** Exemple d'expression de FoxP3 par les différentes sous-populations de cT_{FH} et comparaison du pourcentage de cellules FoxP3⁺ parmi ces sous-populations (n=7). Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM. **C.** Comparaison de l'expression de CXCR3 et CCR6 sur les cellules T_{FH} (rouge ; CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺FoxP3⁺) et T_{FR} (noir ; CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺FoxP3⁻).

Nous avons par la suite souhaité confirmer ces résultats par une analyse transcriptomique de FoxP3 au sein des différentes sous populations de T_{FH}. Pour cela, nous avons dans un premier temps isolé cinq populations cellulaires à l'aide d'un BD FACSria Fusion grâce aux marqueurs suivants : CD4, CD45RA, CXCR5, CD25, CXCR3 et CCR6. Les populations triées ont été identifiées en tant que T_{FH1} (CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺CXCR3⁺CCR6⁻), T_{FH2} (CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺CXCR3⁻CCR6⁻), T_{FH17} (CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺CXCR3⁻CCR6⁺), Tregs (CD4⁺CD45RA⁻CD25^{high}) et Teffs (CD4⁺CD25^{low}) (Figure 23A). La pureté du tri est évaluée afin de vérifier que les populations triées sont bien celles souhaitées initialement (Figure 23B). Le niveau d'expression d'ARNm de FoxP3 a par la suite été mesuré, à partir d'extraits d'ARN total de chacune de ces cinq populations, par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR). Par rapport aux cellules T effectrices, l'ARNm de FoxP3 est fortement exprimé par les LT régulateurs (ratio = 59 par rapport aux Teffs). Concernant les sous-populations de T_{FH}, FoxP3 semble plus fortement exprimé par les T_{FH2} (ratio = 5,7) que par les T_{FH1} (ratio = 2,5) et les T_{FH17} (ratio = 2,7) (Figure 23C). Ces résultats semblent confirmer la tendance que nous avons observée au niveau protéique par cytométrie en flux. Toutefois, il est nécessaire de prendre en considération que seules 5 à 10% des cellules T_{FH2} expriment FoxP3 (Figure 22B), ce qui peut expliquer que bien que le niveau d'expression de l'ARNm de FoxP3 soit plus élevé sur les T_{FH2} que sur les T_{FH1} (5,7 vs 2,5), ce niveau est très inférieur à ce qui est observé pour les cellules Tregs (ratio = 59).

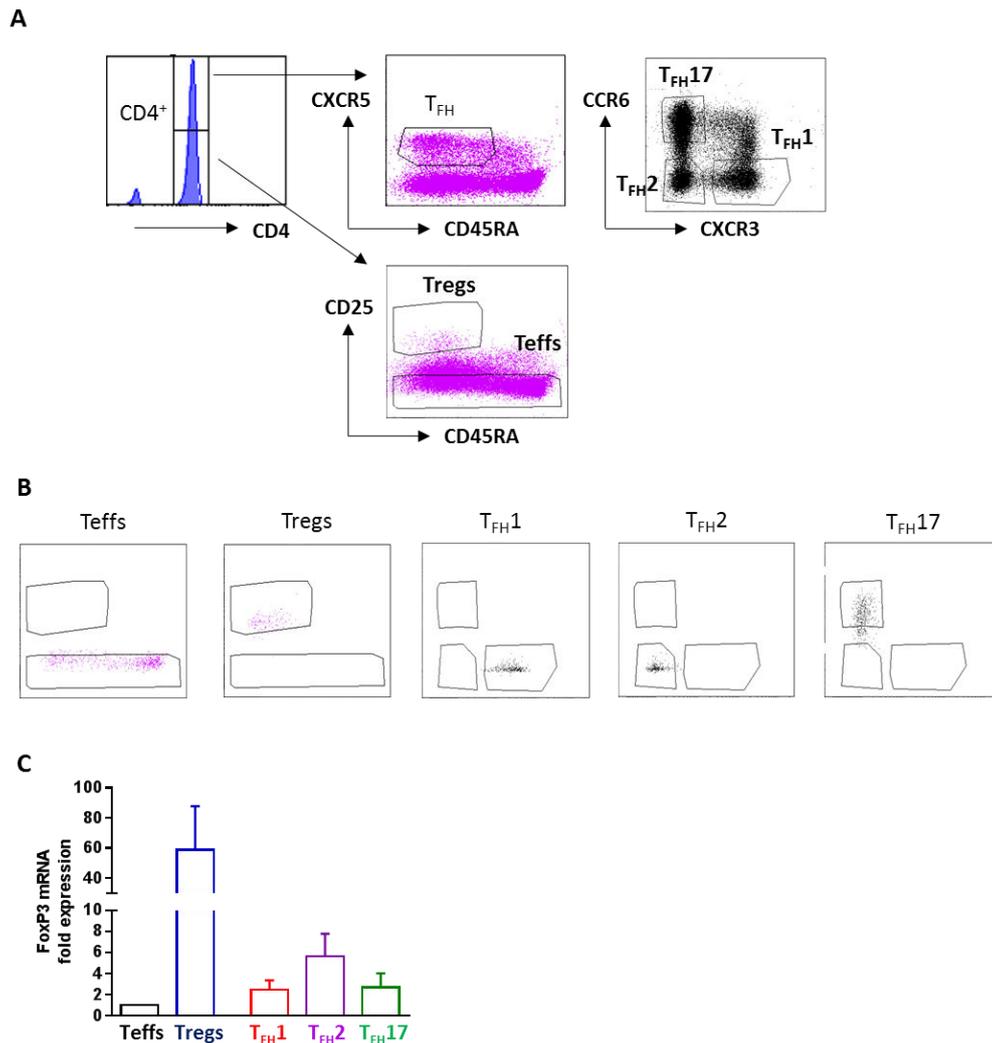


Figure 23. Analyse transcriptomique de FoxP3 sur les sous-populations de cT_{FH} triées au FACS.

A. Stratégie d'isolation des T_{FH1} (CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺CXCR3⁺CCR6⁻), T_{FH2} (CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺CXCR3⁻CCR6⁻), T_{FH17} (CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺CXCR3⁻CCR6⁺), Tregs (CD4⁺CD45RA⁻CD25^{high}) et Teffs (CD4⁺CD25^{low}) par FACS. **B.** Vérification après tri de la pureté des sous-populations isolées par cytométrie en flux. **C.** Niveau d'expression de l'ARNm de FoxP3 dans les sous-populations de T_{FH} d'individus sains purifiées. Les résultats sont exprimés en ratio d'expression par rapport au niveau d'expression de FoxP3 parmi les cellules T effectrices (CD4⁺CD25^{low}) +/- SEM.

Bien que le niveau d'expression de FoxP3 (d'ARNm et protéique) par les T_{FH2} soit plus faible que pour les Tregs, nous avons souhaité évaluer la fonction suppressive de ces cellules. Pour cela, nous avons réalisé un test de suppression où les différentes sous-populations de cT_{FH} sont co-cultivées avec des cellules T effectrices (Teffs) afin de déterminer leur capacité à inhiber ou non la prolifération de ces dernières. Les cellules T effectrices sont préalablement marquées à l'aide d'un marqueur de prolifération fluorescent (Cell Trace Violet), stimulées à l'aide d'Ac agoniste anti-CD3 et cultivées en

présence des différentes sous-populations de cT_{FH} ou de Tregs. Les co-cultures sont réalisées en présence de PBMCs autologues préalablement traitées à la mitomycine C (*Figure 24A*). Lors de la co-culture de LT effecteurs en présence de Tregs, nous avons observé près de 50% d'inhibition de la prolifération (22,1% de cellules en prolifération dans la condition Teffs seules vs. 12,2% en présence de Tregs). Cette observation confirme que les Tregs réduisent efficacement la prolifération des Teffs dans nos conditions expérimentales. La co-culture entre sous-populations de cT_{FH} et Teffs indique, dans un premier temps, que les cT_{FH} que nous avons isolées présentent des capacités suppressives réduites. Toutefois, bien que l'inhibition de la prolifération des cellules T effectrices soit faible, ce n'est qu'en présence des T_{FH2} que celle-ci est observée (7% d'inhibition ; 20,6% de cellules en prolifération vs. 22,1%) (*Figure 24B*).

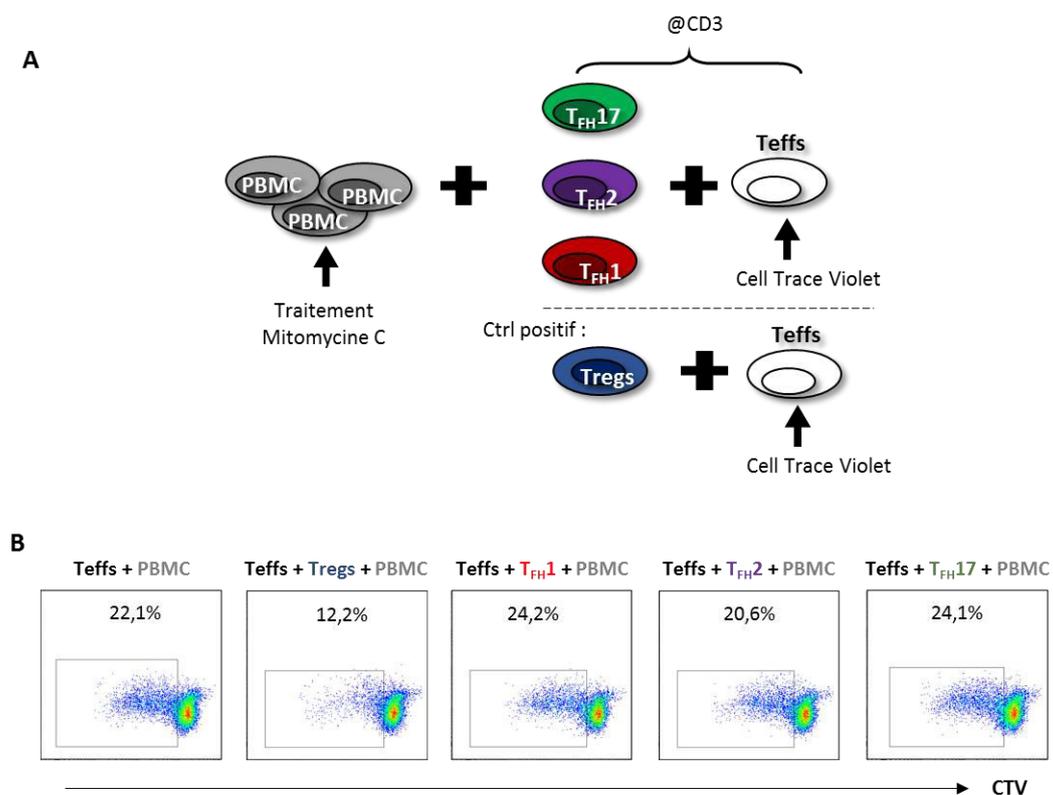


Figure 24. Test de suppression de la prolifération des LT effecteurs par les différentes sous-populations de T_{FH} circulantes.

A. Les cellules T effectrices (10^4 cellules/puits), préalablement marquées par le marqueur de prolifération fluorescent « CellTrace Violet », sont cultivées en présence de cellules T_{FH} (10^4 cellules/puits) et de PBMCs (10^5 cellules/puits) traitées à la mitomycine C (50ng/ml). Les cellules sont stimulées pendant 4 jours en présence d'Ac anti-CD3 adsorbé au fond des puits (1 μ g/ml) **B.** La prolifération des cellules T effectrices est analysée par dilution du CellTrace Violet par cytométrie en flux. La fréquence des cellules présentes dans le cadre, correspondant aux cellules ayant proliféré pendant les 4 jours de culture, est indiquée.

A l'aide de ces résultats, nous confirmons plusieurs de nos précédentes observations. En effet, parmi les sous-populations de cT_{FH} , seules les T_{FH2} , qui expriment des taux plus élevés de FoxP3 que les deux autres sous-populations de cT_{FH} , semble posséder des capacités suppressives (7% d'inhibition de la prolifération). Cette inhibition de la prolifération est faible, mais il est intéressant de noter que seules 5 à 10% des T_{FH2} expriment FoxP3, ce qui implique que le ratio entre cellules régulatrices et cellules effectrices est bien inférieur au ratio 1:1 nécessaire à la réalisation d'un test de suppression efficace.

A partir de nos observations, nous pouvons exclure l'hypothèse que la diminution de la fréquence des T_{FH1} observée dans la circulation des patients lupiques présentant une pathologie active correspond à une diminution de la fréquence en cellules T_{FH} régulatrices. Ceci soulève une question : La diminution de la fréquence en cellules T_{FH1} observée en périphérie chez les patients lupiques actifs est-elle le reflet d'une migration anormale de ces cellules ? La réponse la plus évidente provient du phénotype de ces cellules. En effet, les T_{FH1} expriment le récepteur aux chimiokines CXCR3, ligand des chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11. Ces chimiokines ne sont pas constitutivement exprimées mais sont produites spécifiquement dans un contexte pro-inflammatoire. Leur fonction principale consiste à recruter les cellules du système immunitaire au sein des sites d'inflammation (**Lacotte et al., 2009**). Une étude réalisée au laboratoire a permis de mettre en évidence une augmentation de ces chimiokines dans les reins de souris lupiques NZB/W, favorisant l'attraction des cellules exprimant CXCR3 (**Lacotte et al., 2013**). Le déséquilibre de la balance T_{FH2-17}/T_{FH1} observé chez les patients lupiques pourrait donc être le reflet d'une migration des cellules T_{FH1} au sein des organes présentant une inflammation (les reins ou la peau, par exemple).

En sachant qu'il est particulièrement complexe d'obtenir de tels tissus chez l'Homme, nous avons choisi d'analyser les cellules T_{FH} sur des modèles murins afin d'étudier la potentielle migration des cellules T_{FH} vers les sites d'inflammation.

2. Caractérisation des sous-populations de T_{FH} chez la souris

Afin d'analyser la migration des cellules T_{FH}1 chez la souris, nous avons dans un premier temps souhaité confirmer l'existence des différentes sous-populations de T_{FH} décrites chez l'Homme dans des modèles murins. Les cellules cT_{FH} chez l'Homme sont des LT CD4⁺ mémoires exprimant le récepteur aux chimiokines CXCR5. Par analogie, nous avons analysé dans le sang de différents modèles murins, l'expression de CXCR3 et CCR6 à la surface de cellules CD4⁺CD44⁺CXCR5⁺ par cytométrie en flux (Figure 25). Nous avons constaté que les cellules T_{FH} circulantes chez la souris expriment également les récepteurs CXCR3 et CCR6, permettant l'identification de 4 sous-populations de T_{FH} différentes.

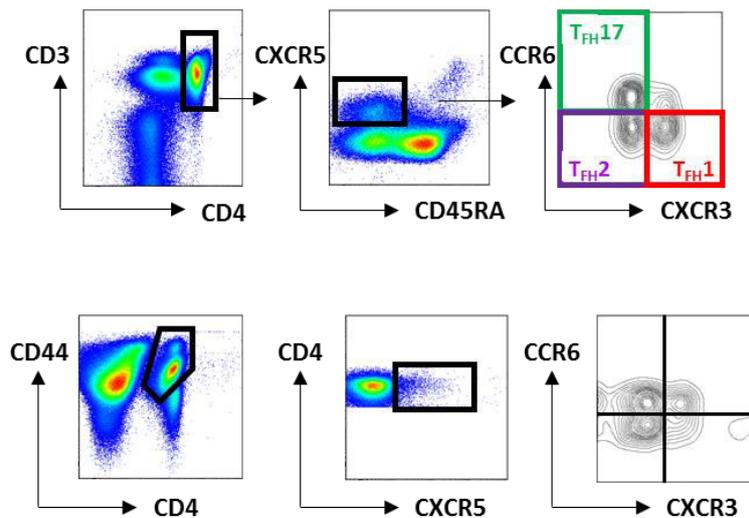


Figure 25. Comparaison de l'expression de CXCR3 et CCR6 à la surface des cT_{FH} chez l'Homme (en haut) et chez la souris (en bas).

Expression de CXCR3 et CCR6 à la surface des T_{FH} humaines (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺) et murines (CD4⁺CD44⁺CXCR5⁺) par cytométrie en flux.

De manière intéressante, contrairement à ce qui est observé chez l'homme, où sa fréquence est relativement faible (moins de 10% parmi les cT_{FH} totales d'individus sains ; **Morita et al., 2011** et notre étude), la population de T_{FH} exprimant conjointement CXCR3 et CCR6 est plus fortement représentée chez la souris (Figure 25). Nous avons dans un premier temps comparé la fréquence de chacune de ces sous-populations chez les souris saines BALB/c. La sous-population de cellules T_{FH} circulantes la plus représentée dans ce modèle semble être la population de cellules T_{FH} CXCR3⁻CCR6⁺ (moyenne = 63% vs. <15% pour les autres sous-populations) (Figure 26).

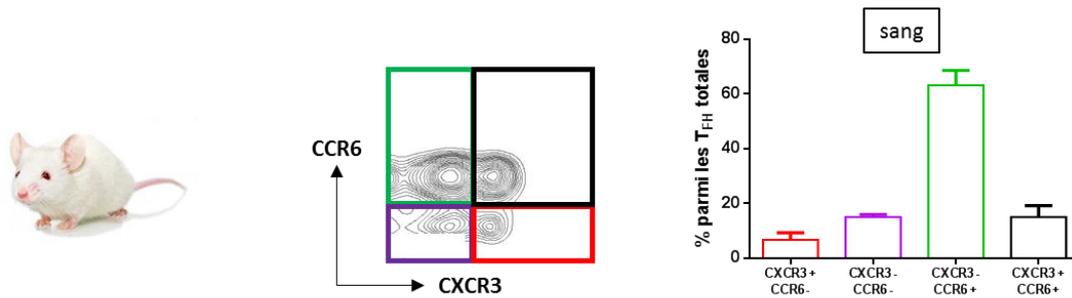


Figure 26. Expression de CXCR3 et CCR6 à la surface des cT_{FH} de souris BALB/c.

Analyse de l'expression de CXCR3 et CCR6 à la surface des cellules T_{FH} circulantes de souris contrôles BALB/c (n=6). La moyenne +/- sem des fréquences des populations CXCR3⁺CCR6⁻ (rouge), CXCR3⁺CCR6⁺ (noir), CXCR3⁻CCR6⁺ (vert), CXCR3⁻CCR6⁻ (violet) est représentée.

Nous avons appliqué une stratégie de marquage identique afin d'évaluer la fréquence de ces différentes sous-populations au sein d'un OLS, la rate. Sur les splénocytes isolés de souris BALB/c, la distribution de ces sous-populations est différente de celle observée en périphérie. En effet, dans la rate, la fréquence des T_{FH} CXCR3⁺CCR6⁺ est augmentée (moyenne = 40%), alors que les autres sous-populations représentent 20% des T_{FH} totales spléniques (Figure 27).

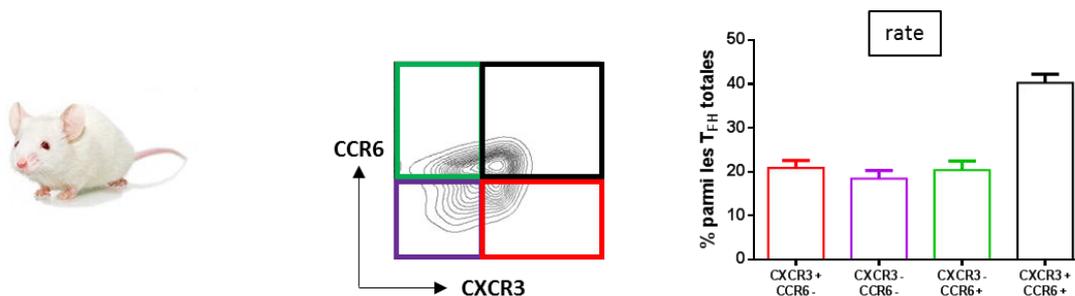


Figure 27. Expression de CXCR3 et CCR6 à la surface des T_{FH} spléniques de souris BALB/c.

Analyse de l'expression de CXCR3 et CCR6 à la surface des cellules T_{FH} spléniques de souris contrôles BALB/c (n=13). La moyenne +/- sem des fréquences des populations CXCR3⁺CCR6⁻ (rouge), CXCR3⁺CCR6⁺ (noir), CXCR3⁻CCR6⁺ (vert), CXCR3⁻CCR6⁻ (violet) est représentée.

Afin d'étudier la distribution de ces sous-populations de cellules T_{FH} dans un contexte lupique, nous avons évalué leur fréquence dans un modèle murin de lupus, la souris NZB/W. Ces souris présentent des symptômes lupiques assimilables à la pathologie humaine. Ces symptômes, comme l'atteinte rénale, se développent à l'âge de 30-35 semaines environ. Les souris NZB/W étudiées sont toutes des femelles âgées de 32 semaines ou plus, et présentent toutes une atteinte rénale importante (forte protéinurie mesurée). Chez la souris NZB/W, en périphérie, la distribution des différentes sous-populations est plus équilibrée entre les différentes sous-populations que chez la souris BALB/c (moyenne d'environ 20% pour les T_{FH} CXCR3⁺CCR6⁻ et CXCR3⁻CCR6⁻, environ 30% pour les T_{FH} CXCR3⁻

CCR6⁺ et CXCR3⁺CCR6⁺) (Figure 28). Dans la rate, nous observons une légère augmentation de la fréquence des cellules T_{FH} CXCR3⁻CCR6⁻ et CXCR3⁺CCR6⁺ (moyenne de 30% des cellules T_{FH} totales) par rapport aux deux autres populations (environ 20% en moyenne).

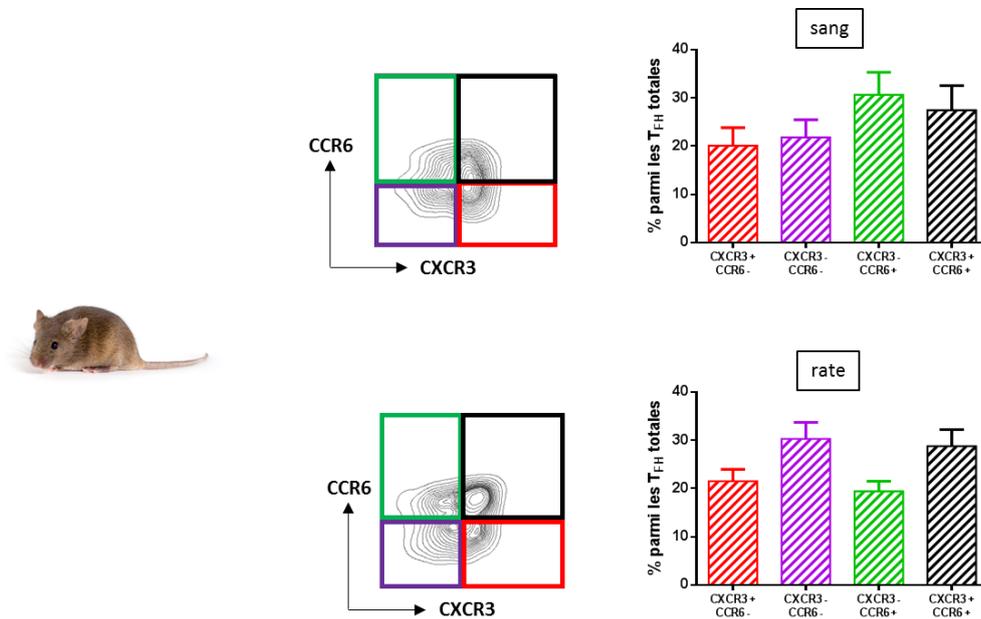


Figure 28. Expression de CXCR3 et CCR6 à la surface des T_{FH} circulants (en haut) et spléniques (en bas) de souris lupiques NZB/W.

Analyse de l'expression de CXCR3 et CCR6 à la surface des cellules T_{FH} circulantes (n=9) et spléniques (n=13) de souris lupiques NZB/W. La moyenne +/- sem des fréquences des populations CXCR3⁺CCR6⁻ (rouge), CXCR3⁺CCR6⁺ (noir), CXCR3⁻CCR6⁺ (vert), CXCR3⁻CCR6⁻ (violet) est représentée.

Nous avons par la suite comparé la fréquence des sous-populations de T_{FH} entre souris sauvages BALB/c et lupiques NZB/W. D'une part, comme attendu, nous avons constaté une augmentation de la fréquence des cellules mémoires CD4⁺CD44⁺ ainsi que des cellules CD4⁺CD44⁺CXCR5⁺ chez les souris lupiques NZB/W par rapport aux souris contrôles, aussi bien dans la rate qu'en périphérie. D'autre part, en périphérie, nous avons observé une forte diminution de la fréquence de la population CXCR3⁻CCR6⁺ chez les souris NZB/W par rapport aux souris contrôles (moyenne = 30% pour la souris NZB/W vs. 63% pour la souris BALB/c), alors que les cellules exprimant CXCR3 sont augmentées (moyenne = 47% pour la souris NZB/W vs. 21% pour la souris BALB/c). Dans la rate, nous avons mis en évidence une augmentation de la fréquence de la sous-population de T_{FH} CXCR3⁻CCR6⁻ (moyenne = 29% pour la souris NZB/W vs. 18,5% pour la souris BALB/c) et une diminution de la fréquence des T_{FH} CXCR3⁺CCR6⁺ (moyenne = 28% pour la souris NZB/W vs. 40% pour la souris BALB/c) (Figure 29).

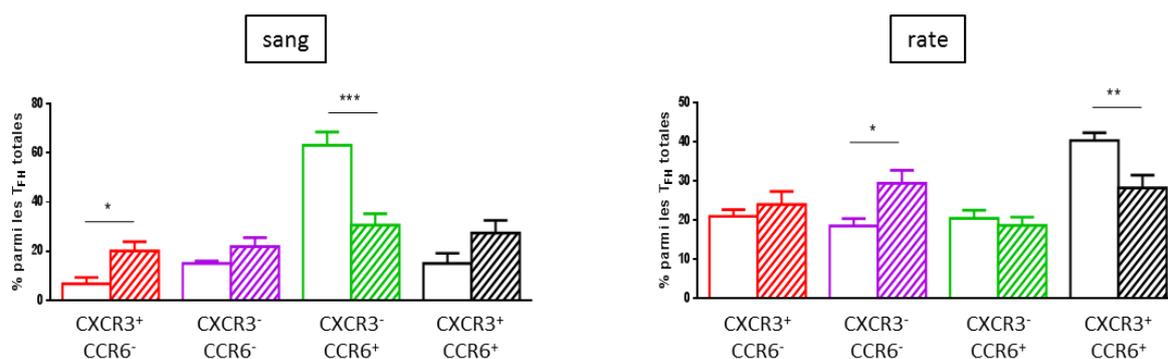


Figure 29. Comparaison de l'expression de CXCR3 et CCR6 à la surface des T_{FH} circulants et spléniques de souris BALB/c et NZB/W.

Comparaison de l'expression de CXCR3 et CCR6 à la surface des cellules T_{FH} circulantes et spléniques de souris contrôles BALB/c et de souris lupiques NZB/W. La moyenne +/- sem des fréquences des populations CXCR3⁺CCR6⁻ (rouge), CXCR3⁺CCR6⁺ (noir), CXCR3⁻CCR6⁺ (vert), CXCR3⁻CCR6⁻ (violet) est représentée. (* = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** = p<0,001 ; Mann-Whitney)

L'ensemble de ces résultats démontrent que nous avons la possibilité d'identifier plusieurs sous-populations de cellules T_{FH} selon l'expression de CXCR3 et de CCR6, aussi bien en périphérie qu'au sein d'un OLS tel que la rate. De plus, certaines modifications dans la distribution de ces sous-populations ont été mises en évidence entre la circulation et les OLS, nous permettant d'établir une certaine dynamique des cellules T_{FH} chez la souris. Finalement, nous avons observé des différences de fréquence des T_{FH} exprimant différenciellement CXCR3 et CCR6 entre souris sauvages BALB/c et lupiques NZB/W, ce qui suggère un potentiel effet du contexte lupique sur leur distribution. Au regard de ces résultats, nous avons souhaité définir si CXCR3 et CCR6 permettent de discriminer les sous-populations de cellules T_{FH} fonctionnellement.

- a. Les récepteurs CXCR3 et CCR6 permettent-ils de définir les T_{FH}1, T_{FH}2 et T_{FH}17 dans les modèles murins ?

Chez l'Homme, l'expression de CXCR3 et CCR6 permet d'identifier des populations sécrétant spécifiquement l'IFN- γ pour les T_{FH}1, l'IL-4 pour les T_{FH}2 et l'IL-17 pour les cellules T_{FH}17. Nous avons analysé la production de ces trois cytokines par les populations de T_{FH} spléniques définies selon l'expression de ces deux récepteurs aux chimiokines chez la souris (Figure 30).

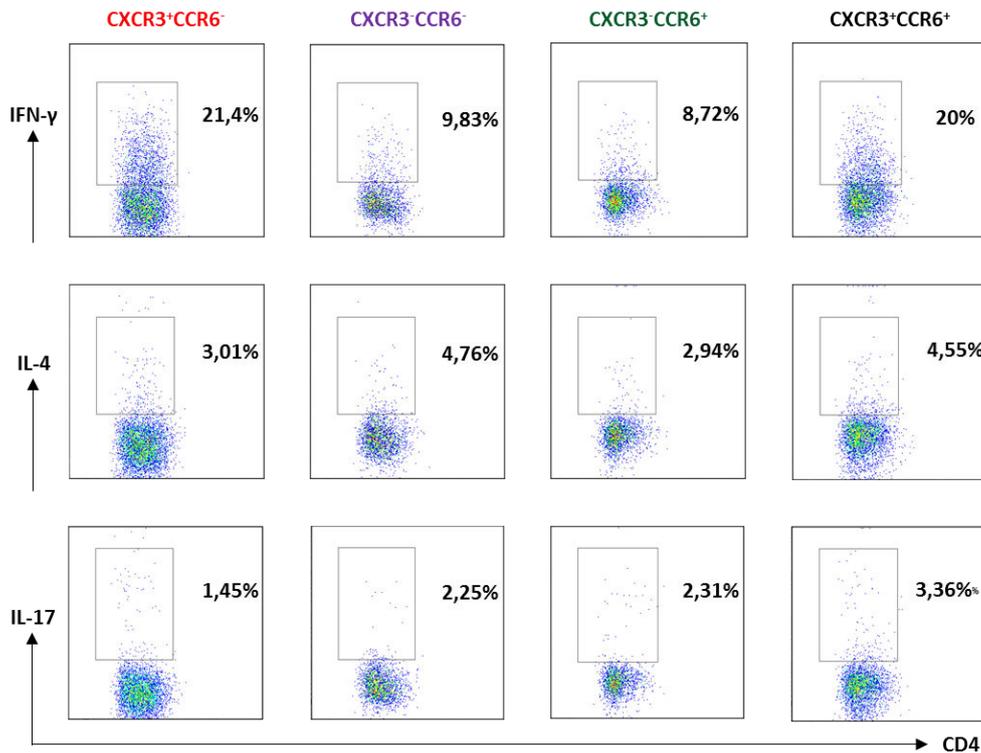


Figure 30. Production d'IFN- γ , d'IL-4 et IL-17 par les différentes sous-populations de T_{FH} spléniques de souris.

Production d'IFN- γ , d'IL-4 et d'IL-17 par les populations de T_{FH} CXCR3⁺CCR6⁻ (rouge), CXCR3⁺CCR6⁺ (noir), CXCR3⁻CCR6⁻ (violet) de souris analysée par cytométrie en flux.

La comparaison de la production de cytokines par les différentes sous-populations de cellules T_{FH} a révélé dans un premier temps que les cellules CXCR3⁺ sont capables de produire des niveaux plus élevés d'IFN- γ que les sous-populations de T_{FH} CXCR3⁻ (moyenne = 13% pour les CXCR3⁺CCR6⁻ et 12,8% pour les cellules CXCR3⁺CCR6⁺ vs. 7% pour les cellules CXCR3⁻). D'autre part, l'IL-4 et l'IL-17 semblent être sécrétés à des niveaux équivalents par les différentes sous-populations de T_{FH} (Figure 31A). En analysant la production de cytokines par les différentes sous-populations, nous avons confirmé que les différentes sous-populations produisent bien les trois types de cytokines et qu'il est compliqué d'associer spécifiquement la production d'un type de cytokines à une population identifiée par l'expression de CXCR3 et CCR6 (Figure 31B). Ces résultats suggèrent que bien que nous ayons la capacité d'identifier différentes sous-populations de T_{FH} exprimant CXCR3 et CCR6 chez la souris, nous ne pouvons pas faire d'analogie fonctionnelle avec les sous-populations de T_{FH} circulantes observées chez l'Homme.

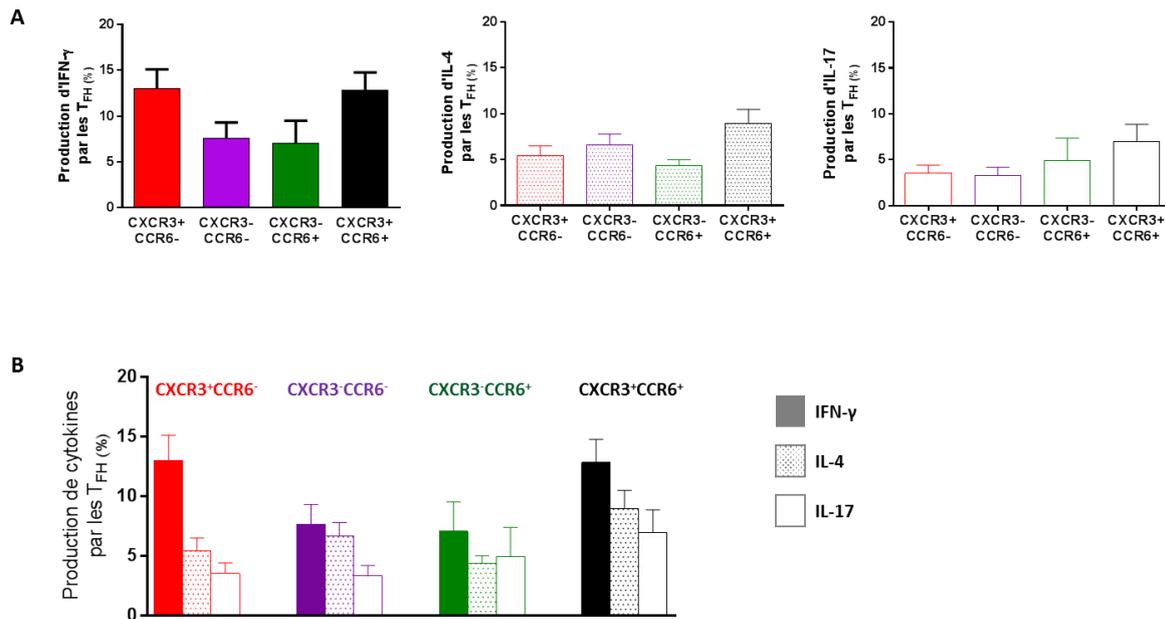


Figure 31. Comparaison de la production d'IFN- γ , d'IL-4 et IL-17 par les différentes sous-populations de T_{FH} spléniques de souris identifiées par l'expression de CXCR3 et CCR6.

A-B. Analyse de la production d'IFN- γ (barres pleines), d'IL-4 (barres ponctuées) et d'IL-17 (barres vides) par les populations de T_{FH} CXCR3⁺CCR6⁻ (rouge), CXCR3⁺CCR6⁺ (noir), CXCR3⁻CCR6⁺ (vert), CXCR3⁻CCR6⁻ (violet) de souris analysée par cytométrie en flux (n=9). Les résultats sont exprimés en moyenne +/- sem.

Concernant l'IL-4, nous n'avons pas constaté de différences significatives dans la production de cette cytokine par les différentes sous-populations de cellules T_{FH} murines. Cependant, les cellules T_{FH} CXCR3⁻CCR6⁻ produisent moins d'IFN- γ que les populations CXCR3⁺, indiquant un ratio entre cellules produisant de l'IFN- γ et de l'IL-4 plus faible que pour les autres sous-populations. Le constat est identique pour la production d'IL-17 par la population de T_{FH} CXCR3⁻CCR6⁺. Ces résultats suggèrent tout de même que, bien que les cellules CXCR3⁻CCR6⁻ et CXCR3⁻CCR6⁺ ne sécrètent pas spécifiquement respectivement de l'IL-4 et de l'IL-17, elles semblent légèrement « polarisées ».

A l'inverse, nous avons analysé l'expression de CXCR3 et de CCR6 à la surface des cellules T_{FH} produisant ou non de l'IFN- γ , de l'IL-4 et de l'IL-17 (Figure 32). Ceci nous a permis de confirmer que les cellules T_{FH} IFN- γ ⁺ expriment bien toutes CXCR3. Cependant, nous retrouvons également des T_{FH} exprimant CXCR3 parmi les cellules T_{FH} IFN- γ , alors que l'expression de CCR6 est retrouvée aussi bien parmi les cellules T_{FH} IFN- γ ⁺ que IFN- γ ⁻. Par ailleurs, le niveau d'expression de CCR6 ou de CXCR3 ne semble pas varier entre les cellules T_{FH} produisant ou non de l'IL-4 ou de l'IL-17. De cette manière, nous confirmons que les sous-populations de T_{FH} identifiées selon l'expression de CXCR3 et CCR6 ne produisent pas spécifiquement un seul type de cytokine comme c'est le cas pour les cT_{FH} chez l'homme.

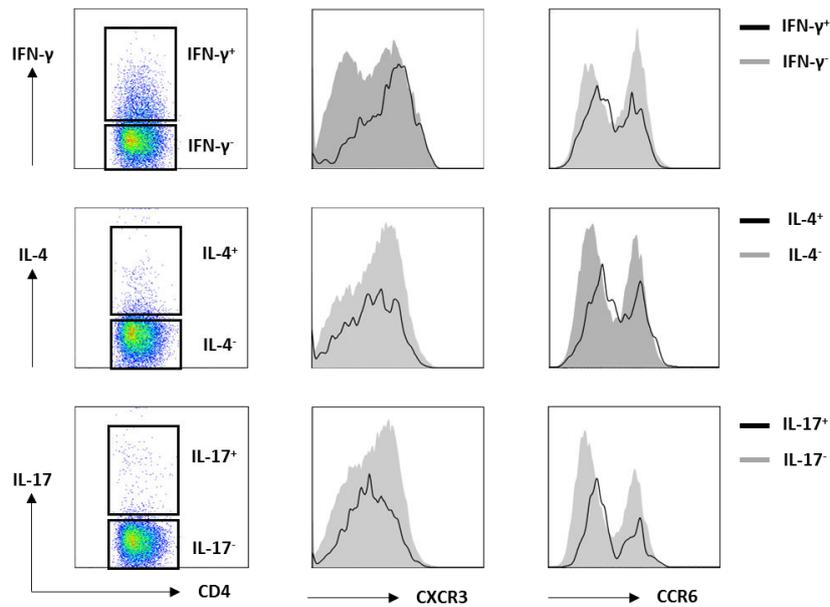


Figure 32. Expression de CXCR3 et CCR6 selon la production de cytokines par les T_{FH} spléniques murines. L'expression de CXCR3 et CCR6 est analysée par cytométrie en flux à la surface de cellules T_{FH} spléniques sécrétant (noir) ou non (gris) de l'IFN- γ , de l'IL-4 ou de l'IL-17.

Comme décrit précédemment, la présence de Bcl-6 réprime l'expression d'autres facteurs de transcription tels que T-bet, GATA-3 ou ROR γ t (*cf. publication 1*). Toutefois, il a été récemment mis en évidence que des cellules T_{FH} peuvent co-exprimer Bcl-6 et certains autres facteurs de transcription. En effet, T-bet semble être exprimé par les cellules T_{FH} Bcl-6⁺ à la suite d'une infection par LCMV et son expression est importante pour la fonction des cellules T_{FH} (Weinstein et al., 2017). Nous avons alors souhaité analyser l'expression de T-bet, GATA-3 et ROR γ t par les différentes sous-populations de T_{FH} selon l'expression de CXCR3 et CCR6. D'une part, nous avons noté que nous étions capables d'observer l'expression de facteurs de transcription par les cellules T_{FH} spléniques de souris. De manière intéressante, l'expression de T-bet semble être restreinte aux populations CXCR3⁺, alors que GATA-3 et ROR γ t semblent être exprimés de manière similaire par toutes les sous-populations de T_{FH} (Figure 33).

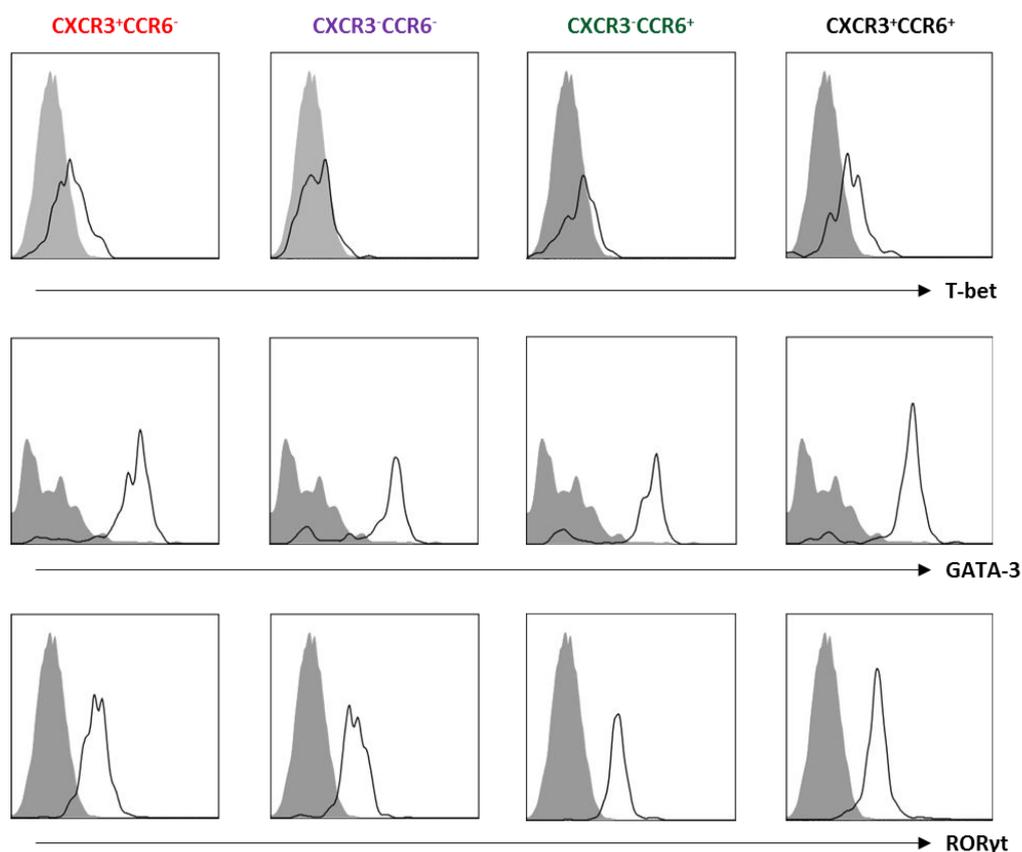


Figure 33. Expression de différents facteurs de transcription par les cellules T_{FH} spléniques.

Expression de T-bet, GATA-3 et RORγt par les populations de cellules T_{FH} CXCR3⁺CCR6⁻ (rouge), CXCR3⁺CCR6⁺ (noir), CXCR3⁻CCR6⁺ (vert), CXCR3⁻CCR6⁻ (violet), analysée par cytométrie en flux (n=9). Le pic gris représente le contrôle isotypique.

Comme pour la production de cytokines, nous avons constaté que l'expression de CXCR3 et de CCR6 par les cellules T_{FH} ne permet pas d'identifier de populations exprimant des facteurs de transcription spécifiques.

En résumé, l'ensemble de ces résultats démontrent qu'il est possible d'identifier différentes sous-populations de cellules T_{FH} à l'aide de l'expression de CXCR3 et CCR6, mais que contrairement aux populations de T_{FH} circulantes chez l'Homme, l'expression différentielle de ces récepteurs aux chimiokines ne correspond pas à des spécificités phénotypiques et fonctionnelles. Ces deux récepteurs ne semblent donc pas représenter des bons marqueurs pour la caractérisation des cellules T_{FH} dans les modèles murins. Toutefois, il apparaît que les cellules exprimant T-bet et sécrétant de l'IFN-γ expriment toutes CXCR3, comme chez l'Homme. Grâce à cette observation, nous avons souhaité étudier la migration des cellules T_{FH} CXCR3⁺ au sein des organes présentant une inflammation chez la souris lupique NZB/W.

- b. Observe-t-on une migration des cellules $CD4^+ CXCR5^+ CXCR3^+$ de la périphérie vers les organes inflammés chez la souris NZB/W ?

Les souris lupiques NZB/W développent à l'âge de 30-35 semaines une atteinte rénale, se traduisant par une forte inflammation du rein, à l'origine des lésions tissulaires. De nombreux infiltrats de leucocytes ont été mis en évidence, par notre équipe, dans les reins de souris NZB/W âgées par rapport aux souris contrôles et à des souris NZB/W plus jeunes n'ayant pas développé la pathologie. Ces infiltrats sont organisés, structurés et fonctionnels, ce qui leur confèrent le nom d'organes lymphoïdes tertiaires (OLT). Au sein de ces structures, des cellules T_{FH} sont identifiables et participent à la production locale d'(auto-)Ac (**Le Coz et al., en préparation**).

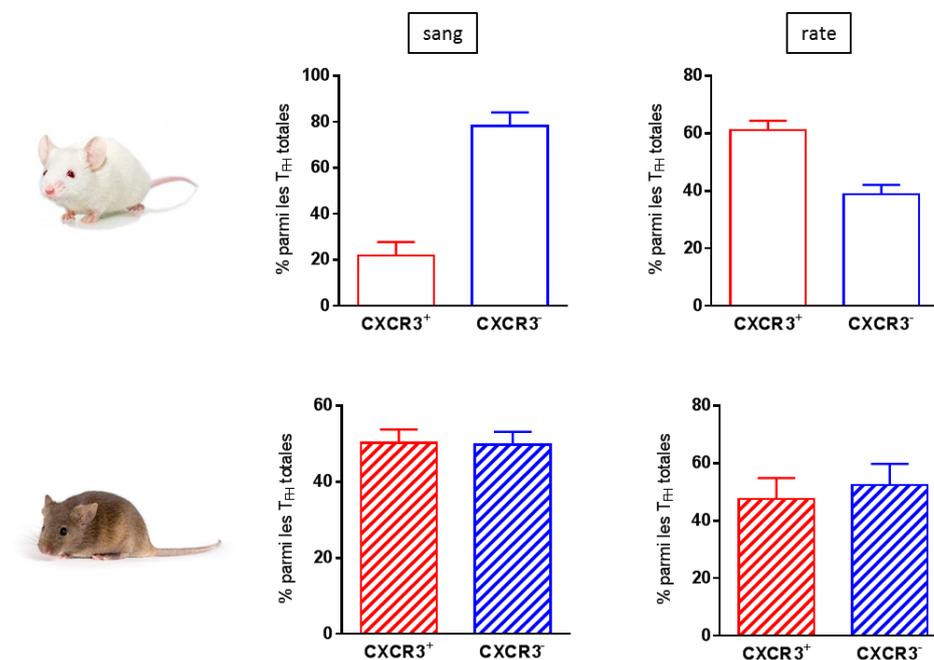


Figure 34. Expression de CXCR3 par les cellules T_{FH} circulantes (à gauche) et spléniques (à droite) de souris contrôles BALB/c et NZB/W.

Comparaison de la fréquence des cellules T_{FH} $CXCR3^+$ (rouge) et $CXCR3^-$ (bleu) parmi les T_{FH} circulantes et spléniques de souris contrôles BALB/c ($n=6-13$; barres vides) et lupiques NZB/W ($n=9-13$; barres hachurées). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sem.

Dans un premier temps, nous avons analysé la distribution des cellules T_{FH} selon l'expression de CXCR3 dans les compartiments sanguins et spléniques dans des souris contrôles BALB/c et lupiques NZB/W. Ainsi, nous avons constaté que chez les souris contrôles, les cellules $CXCR3^+$ sont principalement retrouvées dans la rate (63% des T_{FH} totales) et faiblement en périphérie (seulement 22% des T_{FH} totales). Chez la souris NZB/W, nous observons que la fréquence des cellules T_{FH} $CXCR3^+$ diminue dans la rate et augmente en circulation par rapport aux animaux contrôles (50% dans la rate, 47% en circulation) (*Figure 34*).

Ces modifications suggèrent une potentielle évasion des cellules T_{FH} CXCR3⁺ depuis les OLS vers la circulation sanguine chez la souris lupique NZB/W par rapport aux animaux contrôles.

Par la suite, nous avons analysé l'expression de CXCR3 à la surface des cellules T_{FH} présentes dans les infiltrats rénaux de souris lupiques NZB/W. Nous ne pouvons malheureusement pas les comparer à des animaux contrôles, de par l'absence de cellules immunitaires au sein des reins de souris saines. Dans les reins de souris NZB/W âgées, nous avons mis en évidence que la majorité des cellules T_{FH} expriment CXCR3 (65% des cellules T_{FH} totales). Ces résultats démontrent qu'au sein des reins, organes sièges d'une inflammation importante chez la souris NZB/W, sont retrouvés principalement des cellules T_{FH} exprimant le récepteur aux chimiokines inflammatoires CXCR3 (*Figure 35A*).

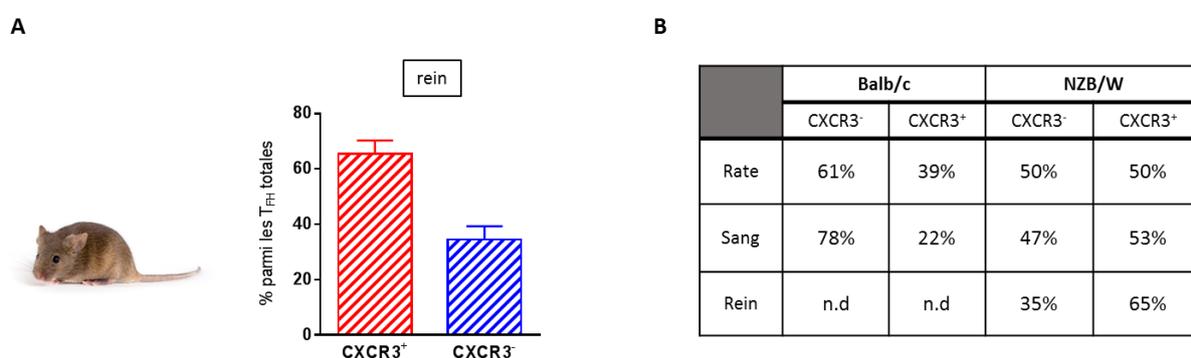


Figure 35. Expression de CXCR3 dans les reins de souris lupiques NZB/W.

A. Fréquence des T_{FH} CXCR3⁺ (rouge) et CXCR3⁻ (bleu) parmi les T_{FH} totales isolées de reins de souris lupiques NZB/W (n=8). Les résultats sont exprimés en moyenne +/- sem. **B.** Tableau récapitulatif des fréquences des populations de T_{FH} CXCR3⁺ et CXCR3⁻ parmi les T_{FH} totales des compartiments spléniques, sanguins et rénaux de souris BALB/c et NZB/W (n.d = non détectable).

Au regard de nos résultats et de ce qui a été décrit dans notre laboratoire, à savoir que des taux importants de CXCL9, 10 et 11, chimiokines responsables de l'attraction des cellules CXCR3⁺, ont été détectés dans les reins de souris NZB/W malades (**Lacotte et al., 2009**), nous avons émis l'hypothèse qu'en condition physiologique, les cellules T_{FH} CXCR3⁺ se trouvent principalement au sein des OLS. Lors d'une inflammation, ces cellules s'échappent des OLS, transitent par la circulation pour rejoindre les organes inflammés où la concentration de chimiokines CXCL9, 10 et 11 est la plus forte. Bien que ce modèle soit hypothétique, il permettrait d'expliquer les fréquences de cellules T_{FH} CXCR3⁺ observées dans les différents compartiments de souris contrôles et lupiques (*Figure 35B-36*).

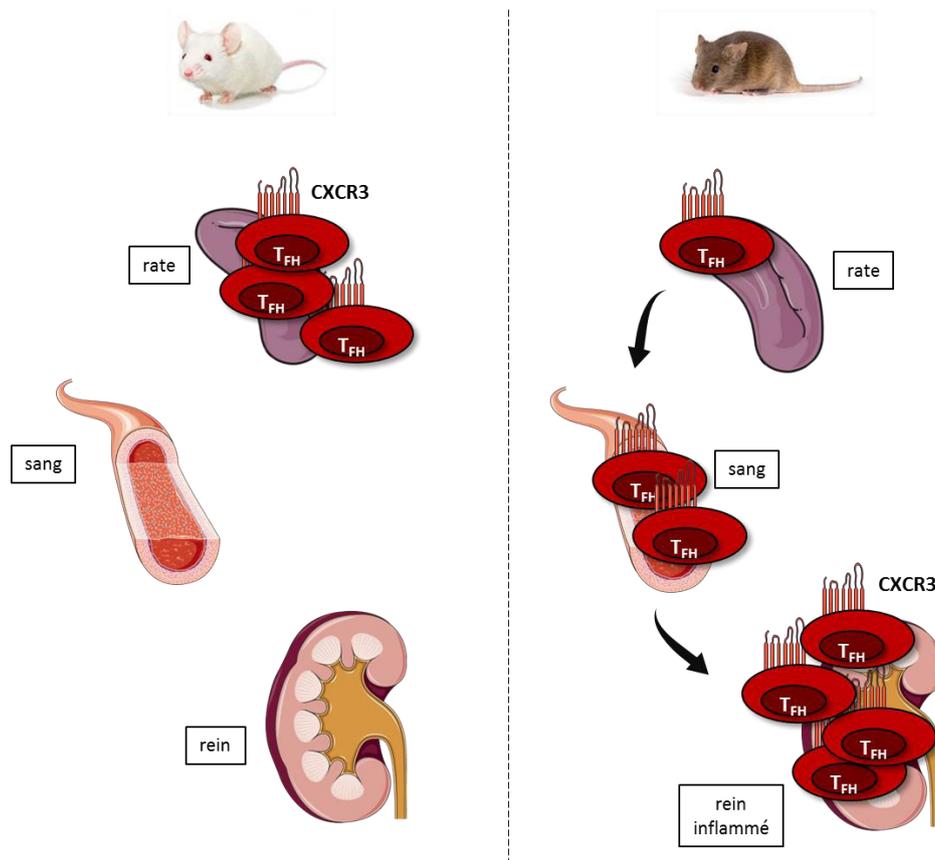


Figure 36. Modèle proposé de la migration des cellules T_{FH} CXCR3⁺ dans un contexte physiologique (à gauche) et dans un contexte inflammatoire (à droite).

En condition physiologique, les cellules T_{FH} CXCR3⁺ se trouvent principalement dans les OLS tels que la rate par exemple. Lors d'une inflammation au sein d'un organe comme le rein, les cellules T_{FH} CXCR3⁺ sont attirés par un gradient de chimiokines inflammatoires (CXCL9, 10, 11), ce qui pourrait expliquer leur augmentation en circulation et la forte fréquence de ces cellules dans les reins de souris NZB/W malades.

En résumé, nous avons souhaité utiliser le modèle murin pour déterminer si, dans un contexte lupique, la diminution de la fréquence des cellules circulantes T_{FH}1 observée chez les patients lupiques correspond à une migration de ces cellules vers les organes inflammés tels que les reins. Malheureusement, l'expression de CXCR3 et CCR6 ne permet pas d'identifier des sous-populations de T_{FH} fonctionnellement séparées. Toutefois, plusieurs résultats semblent indiquer que les cellules T_{FH} exprimant CXCR3 migrent depuis les OLS vers les sites d'inflammation tels que les reins chez la souris.

**CHAPITRE II : LE RECEPTEUR CO-INHIBITEUR BTLA
AU COURS DU LED : ASPECTS FONDAMENTAUX
ET IMPLICATIONS THERAPEUTIQUES**

I. Avant-propos

La capacité du système immunitaire à discriminer le soi et le non-soi est un mécanisme essentiel afin de générer une réponse immunitaire contre les pathogènes, tout en maintenant une tolérance aux auto-Ag. L'établissement de la tolérance représente de ce fait un élément crucial dans la prévention de l'auto-immunité. La délétion clonale des LT auto-réactifs effectuée au sein du thymus correspond à la première ligne de tolérance mise en place par l'organisme. Dans le thymus, une sélection positive, dans un premier temps, permet l'élimination des LT ne reconnaissant pas le complexe CMH-peptide ne reçoivent pas de signaux de survie et meurent. Ainsi, seuls les LT capables d'interagir avec le CMH pourront atteindre la deuxième sélection, négative celle-ci, où les cellules T reconnaissant des peptides antigéniques tissulaires du soi sont éliminés. A la suite de cette étape, une grande majorité de LT auto-réactifs sont éliminés. Toutefois, ce mécanisme n'étant pas infaillible, la mise en place d'une seconde ligne de tolérance, en périphérie, permet de contrôler le développement de pathologies auto-immunes. Ce mécanisme de tolérance périphérique est crucial dans la prévention de l'auto-immunité car l'échappement de cellules T auto-réactives contribue à l'inflammation et apporte l'aide nécessaire aux LB auto-réactifs, aboutissant à la production d'auto-Ac. Parmi les nombreux mécanismes de tolérance périphérique, la balance entre les signaux co-stimulateurs et co-inhibiteurs délivrés aux LT joue un rôle important dans l'auto-immunité mais également dans les maladies infectieuses ou les cancers. L'implication de ces molécules dans le développement de pathologies auto-immunes telles que le LED, a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années (*cf. Introduction*). Parmi les molécules de co-stimulation, sont retrouvés des récepteurs apportant des signaux inhibiteurs dont les représentants les plus connus sont CTLA-4 et PD-1. Le ciblage de ces molécules a fait l'objet de plusieurs études cliniques présentant des résultats encourageants.

BTLA est un autre récepteur inhibiteur régulant négativement la réponse immunitaire (*cf. Introduction Partie C.*). L'implication de BTLA dans le maintien de la tolérance périphérique, ainsi que le phénotype des souris BTLA^{-/-}, suggèrent un rôle protecteur de BTLA dans le développement de pathologies auto-immunes telles que le LED. A l'heure actuelle, aucune étude n'a fait état du rôle de BTLA dans la pathogénèse du LED chez l'homme. C'est pourquoi, durant cette étude, nous souhaitons déterminer si une altération de l'expression ou de la fonction de BTLA peut contribuer à un défaut de régulation de la réponse immunitaire et ainsi favoriser le développement du LED.

Durant ma thèse, nous avons alors mené une étude compréhensive de l'expression de BTLA sur les sous-populations de LT et de LB de patients lupiques par rapport aux individus sains. L'ensemble des résultats obtenus à partir des LT CD4⁺ de patients lupiques est résumé dans la *Publication n°2*.

II. Rôle de BTLA dans l'inhibition de l'activation des LT de patients lupiques

PUBLICATION N°2* : Defective BTLA functionality is rescued by restoring lipid metabolism in lupus CD4⁺ T cells

**Matthieu Sawaf¹, Jean-Daniel Fauny¹, Renaud Felten^{1,2}, Flora Sagez^{1,2}, Jacques-Eric Gottenberg^{1,2},
Hélène Dumortier¹, Fanny Monneaux^{1*}**

¹CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Immunopathologie et Chimie Thérapeutique/Laboratory of excellence MEDALIS, Strasbourg, France.

² Rheumatology Department, Strasbourg University Hospital, National Reference Center for Autoimmune Diseases, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.

*Corresponding author : Fanny Monneaux, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UPR3572/Laboratory of excellence MEDALIS, 15 rue René Descartes, 67000 Strasbourg, France.

**soumis à « Journal of Clinical Investigation Insight » le 09 Janvier 2018, actuellement en révision*

Defective BTLA functionality is rescued by restoring lipid metabolism in lupus CD4⁺ T cells

Matthieu Sawaf¹, Jean-Daniel Fauny¹, Renaud Felten^{1,2}, Flora Sagez^{1,2}, Jacques-Eric Gottenberg^{1,2}, Hélène Dumortier¹, Fanny Monneaux^{1*}

¹CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Immunologie, Immunopathologie et Chimie Thérapeutique, Strasbourg, France. ² Rheumatology Department, Strasbourg University Hospital, National Reference Center for Autoimmune Diseases, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.

*Corresponding author : Fanny Monneaux, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UPR3572/Laboratory of excellence MEDALIS, 15 rue René Descartes, 67000 Strasbourg, France. Tel +33 388 41 70 27; Fax: +33 388 61 06 80 ; e-mail : f.monneaux@ibmc-cnrs.unistra.fr

Conflict of interest: the authors have declared that no conflict of interest exists.

Abstract:

Co-inhibitory receptors play an important role for the prevention of autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE) by limiting T-cell activation. B and T lymphocyte attenuator (BTLA) is an inhibitory receptor, like cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) and Programmed Death 1 (PD1), that negatively regulates the immune response. The role of BTLA in the pathogenesis of autoimmune diseases in humans and more specifically in SLE is largely unknown. We investigated BTLA expression on various T cell subsets and we did not observe significant variations of BTLA expression between lupus patients and healthy controls. However, the enhancement of BTLA expression after activation is significantly lower in SLE patients compared to healthy controls. Furthermore, we evidenced an impaired capacity of BTLA to inhibit T cell activation in SLE, due to a poor BTLA recruitment to the immunological synapse following T cell stimulation. Finally, we demonstrated that defective BTLA function can be corrected by restoring intracellular trafficking and by normalizing the lipid metabolism in lupus CD4⁺ T cells. Collectively, our results evidence that the BTLA signaling pathway is altered in SLE T cells and highlight the interest of targeting this pathway for the development of new therapeutic strategies in lupus.

INTRODUCTION

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a severe systemic autoimmune disease characterized by the production of high-affinity autoantibodies (autoAbs) directed against self-structures (especially nuclear antigens). The deposition of subsequent immune complexes in target organs, leads to tissue inflammation, contributing to the development of multi-organ damages such as glomerulonephritis, which remains the most common severe manifestation in lupus (1). In that context, it was demonstrated in our laboratory, that pathogenic autoAb can be locally produced by plasma cells, which have homed to inflamed kidneys of lupus mice (2, 3). Moreover, we recently described an altered phenotype of circulating follicular helper T (T_{FH}) cells characterized by the enhanced frequency of B-cell helpers $CXCR3^-CCR6^-T_{FH2}$ -like cells and decreased frequency of $CXCR3^+CCR6^-T_{FH1}$ -like cells (unable to provide B cell help) in lupus patients (4). Altogether, it suggests that a dysfunction in plasma cell differentiation mechanism may occur in SLE leading to an increase of autoAb production. B cell differentiation into Ab-producing cells is mediated by $CD4^+$ helper T cells, highlighting the importance of the T-B crosstalk in secondary lymphoid organs. Several mechanisms are involved in the regulation of this crosstalk, one of these being the balance between costimulatory and coinhibitory molecules expressed on the T and B cell surface (5). There are growing numbers of inhibitory receptors described, including cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) and programmed cell death 1 (PD-1) that have been most extensively studied. In the oncology field, encouraging clinical findings have been reported for mAbs specific to CTLA-4 and PD-1 and promising results were obtained with the use of Abatacept, a CTLA4-Ig fusion protein, in various autoimmune diseases (6, 7).

B and T Lymphocyte Attenuator (BTLA) is another inhibitory receptor of the Ig superfamily that negatively regulates the immune response in synergy with the CTLA-4/B7 and PD-1/PDL1 inhibitory pathways (8). BTLA is expressed on T cells (both $CD4^+$ and $CD8^+$ T

cells), B cells, but also a wide range of other hematopoietic cells including natural killer (NK) cells, NKT cells, macrophages and dendritic cells (DC) (9). The ligand for BTLA is HerpesVirus-Entry Mediator (HVEM; TNFR14) (10), a TNF receptor family protein found on DC, T, B and NK cells. The ligation of BTLA by HVEM attenuates T-cell activation, leading to decreased cell proliferation, cytokine production and cell cycle progression. Consistent with an inhibitory role for BTLA, BTLA deficient mice exhibit enhanced specific antibody responses and sensitivity to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (8). BTLA deficiency also causes the breakdown of self-tolerance, resulting in the development of an autoimmune hepatitis-like disease and lymphocytic infiltration in multiple organs (11). Interestingly, BTLA is expressed by T_{FH} cells and it was recently demonstrated that BTLA suppresses germinal center B cell development and subsequent IgG responses by inhibiting interleukin-21 (IL-21) production by T_{FH} cells (12). Moreover, the lupus disease is exacerbated in MRL/lpr lupus mice deficient for BTLA (13) suggesting a protective role of BTLA in lupus.

Data regarding BTLA function on human cells are more limited. BTLA signaling inhibits both proliferation and cytokine secretion of CD4⁺ T cells (14, 15) and HVEM interaction with BTLA negatively regulates the proliferation of $\gamma\delta$ T cells (16). Regarding B cells, BTLA reduces the phosphorylation of the B cell receptor (BCR)-associated molecules leading to BCR signaling inhibition (17). Furthermore, BTLA is upregulated and recruited to the BCR in CpG-activated B cells and, as in T cells, its triggering by HVEM leads to the inhibition of human B cell proliferation, upregulation of costimulatory molecules and cytokine production (18). As a newly described immune checkpoint, BTLA was also investigated in pathological situations. It has been demonstrated that type I IFN produced by plasmacytoid DCs is responsible for BTLA downregulation on CD4⁺ T cells during chronic HIV-1 infection, which further results in impaired BTLA-mediated inhibition (19). On the contrary, BTLA expression is enhanced on CMV-specific T cells during the acute phase of CMV infection (15).

In cancer, several studies have highlighted an upregulation of BTLA in tumors. Indeed, BTLA is highly expressed on B cells from chronic lymphocytic leukemia (CLL) (20), however, the function of BTLA on CLL cells remains to be elucidated. Moreover, whereas BTLA expression is normally down regulated during human CD8⁺ T cell differentiation to effector cytotoxic T cells, melanoma tumor antigen-specific effector CD8⁺ T cells appear to persistently express BTLA (21) and are thus still susceptible to inhibition through HVEM ligation. Finally, BTLA gene polymorphisms may be linked to the development of malignant breast cancer (22).

The role of BTLA in the pathogenesis of autoimmune diseases in humans is still largely unknown and to date, there is no available data on BTLA in lupus patients. This observation, associated with the few data regarding BTLA in lupus mice, led us to investigate in detail BTLA expression and function on CD4⁺ T cells isolated from SLE patients. Indeed, altered BTLA expression and/or functionality could result in defective regulation of the immune response leading to the emergence of autoimmunity.

RESULTS

Defective upregulation of BTLA expression upon activation on lupus T cells

We monitored the expression of BTLA on total CD3⁺ T cells, CD4⁻ T cells (corresponding mainly to CD8⁺ T cells), naive (CD45RA⁺) and memory (CD45RA⁻) CD4⁺ T cells (Figure 1A). As previously described, BTLA is constitutively expressed on CD3⁺ T cells of freshly isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). In healthy controls (HCs), BTLA is more highly expressed on CD3⁺CD4⁺ T cells than on CD3⁺CD4⁻ T cells (mean fluorescence intensity (MFI) 9300±610 vs 6300±560, p<0.01; Figure 1B-C) and there is no significant difference in BTLA expression among naive and memory CD4⁺ T cells. We next compared BTLA expression between lupus patients and HCs and did not observe significant variations of BTLA expression in any T cell subset. The heterogeneous expression level of BTLA is not due to variability between SLE patients, as we did not observe any correlation between BTLA expression in T cell subsets and disease activity (supplemental figure 1).

It was reported that the membrane level of BTLA is increased upon activation of T cells in HCs (23, 24), thus allowing this co-inhibitory receptor to further regulate lymphocyte activation. Indeed, stimulation of purified CD4⁺ T cells for 2 days with agonistic anti-CD3 and anti-CD28 mAbs, induced a twofold enhancement of BTLA expression on CD4⁺ T cells from HCs, on average (Figure 2A-B). Interestingly, the enhancement of BTLA expression after activation is significantly lower in CD4⁺ T cells SLE patients compared to HCs (Figure 2A-B, mean 1.7, p<0.01). The lower BTLA fold enhancement is not due to a defective activation of lupus CD4⁺ T cells (Figure 2C) and does not correlate with disease activity (Figure 2D).

Impaired capacity of BTLA to inhibit CD4⁺ T cell activation in lupus

BTLA engagement leads to the dephosphorylation of early T-cell receptor (TCR) signals (e.g. ZAP-70, Erk1/2), thus inhibiting T-cell proliferation and activation. To investigate

BTLA function, we compared the proliferation, the activation state, and the Erk phosphorylation status, of blood-derived CD4⁺ T cells upon TCR activation associated either with BTLA cross-linking (thanks to an agonistic mAb) or not (corresponding isotype control) (supplemental figure 2). As HVEM, the natural ligand for BTLA, also binds LIGHT (also known as TNFS14) which is expressed by T cells, we decided to use an anti-BTLA mAb and not recombinant HVEM in our experiments, in order to specifically delineate the involvement of the BTLA pathway in lupus. We confirmed that when the TCR and BTLA are co-engaged, the CD4⁺ T cell proliferation is inhibited by around 45% in HCs (45±5%; Figure 3A, white bars). Accordingly, upregulation of the activation marker CD25 (51±4% inhibition; Figure 3B) as well as the Erk phosphorylation (29±5% inhibition; Figure 3C) are inhibited in the presence of the agonistic anti-BTLA mAb in CD4⁺ T cells from HCs. In contrast, we showed that in lupus CD4⁺ T cells, there is a significant decrease in the capacity of BTLA to inhibit proliferation compared to HCs (only 25±6% inhibition; p<0.01; Figure 3A, hatched bars). Moreover, we observed an impaired capacity of BTLA to inhibit CD25 upregulation by lupus CD4⁺ T cells (31±4% inhibition vs 51% in HCs, p<0.01; Figure 3B), and to dephosphorylate Erk (less than 10% inhibition vs 29% in HCs, p<0.01; Figure 3C). The impaired capacity of BTLA to inhibit CD4⁺ T cell activation in lupus patients is not due to defective activation of CD4⁺ T cells (induction of activation is quantitatively similar in CD4⁺ T cells from HCs and SLE patients; Figure 2C) nor to an altered representation of particular CD4⁺ subsets in lupus settings (supplemental figure 3A). Indeed, even if the frequency of Tregs (defined as CD4⁺CD45RA⁻CD25^{hi} T cells, supplemental figure 3A; 25) tends to be diminished in lupus patients, there is no correlation between Treg frequency and the inhibition of the proliferation (supplemental figure 3B). Moreover, when we depleted Tregs (CD25^{hi} cells, supplemental figure 4A), BTLA signaling is similarly able to inhibit CD4⁺ T cell activation (20% inhibition for CD25 expression and 16% inhibition for CD69 expression in the presence or in the absence

of Tregs; supplemental figure 4B-C) indicating that Tregs are not involved in the BTLA-dependent T cell inhibition we measure in our experimental conditions.

Finally, we observed that the BTLA capacity to inhibit CD4⁺ T cell proliferation correlates with the fold enhancement of BTLA expression (Figure 3D; $p < 0.05$). In lupus patients, the lowest BTLA fold enhancement is found in CD4⁺ T cells displaying strong defective BTLA function (mean 1.6 in lupus CD4⁺ T cells harboring less than 20% inhibition *vs* 2 in HCs, $p < 0.01$; supplemental figure 5A), and in the same way, lupus CD4⁺ T cells with the most highly reduced BTLA function are those with the lowest BTLA fold enhancement (16% in lupus CD4⁺ T cells with BTLA fold enhancement below 1.7 *vs* 42% in HCs, $p < 0.01$; supplemental figure 5B).

Defective BTLA function in lupus CD4⁺ T cells correlates with disease activity

The capacity of BTLA engagement to inhibit CD4⁺ T cell proliferation inversely correlates with disease activity ($p < 0.05$; Figure 4A) and when patients were classified according to their disease status (mild SLE when SLEDAI < 6 or severe SLE when SLEDAI ≥ 6), the impaired BTLA functionality was found to be statistically significant only in patients with severe SLE ($p < 0.05$; Figure 4B). Interestingly, we noticed that the functional BTLA deficiency on CD4⁺ T cells is more pronounced in patients having severe biological and/or clinical manifestations, such as high anti-DNA auto-Ab levels (43 \pm 9% inhibition in patients without anti-DNA Abs *vs* 10 \pm 4% in patients with anti-DNA Abs, $p < 0.001$; Figure 4C) or proteinuria (32 \pm 6% inhibition in patients without proteinuria *vs* 2 \pm 2% in patients with proteinuria; $p < 0.05$; Figure 4D). Moreover, we observed that the capacity of BTLA to inhibit CD4⁺ T cell proliferation inversely correlates with the frequency of circulating plasmablasts ($p < 0.05$; Figure 4E). Altogether, our results suggest that defects in BTLA function in lupus CD4⁺ T cells are associated with disease activity through B-cell abnormalities.

BTLA is not correctly recruited to TCR clusters in lupus CD4⁺ T cells

Upon activation, TCR clusterize and are recruited into Ganglioside M1 (GM1) rich microdomains (26). It was demonstrated in mice, that upon T-cell stimulation, and in the absence of BTLA engagement, BTLA is recruited to TCR clusters (27). The co-clustering of BTLA and TCR on activated CD4⁺ T cells thus allows the inhibition of T cell activation following BTLA ligation (27). To define mechanisms behind impaired BTLA functionality in SLE, we analyzed BTLA and TCR co-clustering by confocal microscopy. In HCs and in the absence of TCR stimulation, TCR (in green) and BTLA (in red) are localized all around the plasma membrane (Figure 5A, upper panel). Following 5 minutes of activation with an anti-CD3 mAb, we observed TCR clustering and confirmed that, in absence of BTLA ligation and as it was demonstrated in mice, BTLA colocalizes in these TCR clusters (Figure 5A; lower panel). Moreover, we used CTB staining to visualize GM1, and we observed that BTLA colocalized with GM1-enriched clusters following TCR activation in HCs (Figure 5B). To quantify the percentage of BTLA recruitment to TCR clusters, we evaluated the ratio of specific fluorescence intensity (FI) for BTLA staining to the specific FI for TCR staining. We defined that a ratio higher than 0.5 reflects BTLA recruitment to TCR clusters (see Materials and Methods section for details). By analyzing 30 cells per individual, we found that this recruitment is significantly lower in SLE patients compared to HCs (61±7% in SLE vs 87±4% in HCs, p<0.01; Figure 5C). To go further, we used another approach consisting in measuring the percentage of colocalized BTLA-TCR clusters over the total number of clusters for each cell and defined 4 types of BTLA recruitment (supplemental figure 6). Thanks to this method, we observed that whereas the total BTLA recruitment to the TCR synapse occurs in about 70% of the CD4⁺ T cells analyzed in HCs, only 38% of BTLA is totally recruited to TCR clusters in lupus patients (Figure 5D, p<0.01). Altogether, these results indicate that following T cell

activation, BTLA is not efficiently recruited to TCR clusters in lupus CD4⁺ T cells. We next wondered whether defective BTLA recruitment to TCR clusters could underlie impaired BTLA functionality in CD4⁺ T cells. Interestingly, we found a positive correlation between BTLA recruitment to TCR clusters and BTLA capacity to inhibit CD4⁺ T cell activation ($p < 0.05$; Figure 5E).

BTLA is excluded from pre-clustered TCR in lupus CD4⁺ T cells

It has been described that lupus T cells display increased expression of GM1 (28, 29) and the high GM1 expression in unstimulated SLE T cells was proposed to affect localization and movement of signaling molecules at the plasma membrane (29). Moreover, GM1-rich microdomains containing the TCR/CD3 complex and associated signaling molecules, appeared to be abnormally pre-clustered in freshly isolated lupus T cells (28). In the present study, we also observed the existence of pre-clustered TCR in the absence of any extra stimulation in CD4⁺ T cells from SLE patients (Figure 6A). It should be noted that BTLA was only rarely associated to this pre-clustered TCR (less than 10% of BTLA staining colocalized with TCR staining; Fig 6A). Co-inhibitory receptors, such as CTLA-4, are not only able to negatively regulate TCR signaling, but also to inhibit GM1 expression following activation (30). Interestingly, CTLA-4 was shown to be excluded from membrane microdomains and thus unable to inhibit their clustering in lupus T cells (31). We thus wondered whether, similarly to CTLA-4, BTLA could regulate GM1-rich microdomains. In CD4⁺ T cells from HCs, we observed by flow cytometry that the enhancement of GM1 expression following CD3/CD28 stimulation was inhibited by BTLA cross-linking ($8 \pm 1\%$ of CD4⁺GM1⁺ cells with CD3/CD28 stimulation vs $3 \pm 1\%$ in the presence of anti-BTLA mAb, < 0.05 ; Figure 6B and C). More importantly, we showed that BTLA engagement failed to efficiently inhibit GM1 expression in

lupus CD4⁺ T cells (59±7 % inhibition in HCs vs 31±8 % in SLE patients, p<0.05; Figure 6B and D).

Defective BTLA function can be corrected by restoring lipid metabolism in lupus T cells

Targeting membrane lipids by using statins (which reduce cholesterol biosynthesis) was shown to reverse signaling defects in lupus T cells, including normalization of membrane GM1 expression (32). N-butyldeoxynojirimycin (NB-DNJ), a glucosylceramide synthase inhibitor, was also recently demonstrated to restore intracellular trafficking and to normalize lipid metabolism in CD4⁺ T cells from SLE patients (33). We wondered whether this pharmacological drug could have a positive impact on the defective BTLA function in lupus CD4⁺ T cells. As shown above, BTLA signaling inhibits the expression of CD25 in CD4⁺ T cells from HCs (63±6% inhibition; Figure 7A) but not as effectively in CD4⁺ T cells from SLE patients (24±6 % inhibition). NB-DNJ treatment did not increase the BTLA capacity to inhibit CD25 expression in HCs. However, very interestingly, the incubation of CD4⁺ T cells isolated from SLE patients with NB-DNJ significantly improved the inhibition of CD25 expression induced by BTLA engagement (55±4% vs 24±6% in the absence of NB-DNJ; p<0.01, Figure 7A). Taken as a whole, we observed that BTLA capacity to inhibit the expression of CD25 on lupus CD4⁺ T cells was restored with the NB-DNJ treatment (Figure 7B) with a percentage of inhibition reaching the one obtained with CD4⁺ T cells from HCs. Interestingly, the BTLA recruitment to TCR clusters is also enhanced in CD4⁺ T cells from SLE patients following NB-DNJ treatment (88±3% vs 63±10% in the absence of NB-DNJ, p<0.05 Figure 7C). Moreover, in presence of this drug, BTLA-mediated inhibition of GM1 expression is also recovered in lupus CD4⁺ T cells (52±7% vs 31±8% in the absence of NB-DNJ, p<0.05; Figure 7D). Accordingly, we observed that the enhancement of BTLA expression on activated lupus CD4⁺ T cells was slightly but significantly increased following NB-DNJ treatment (p<0.05; Figure

7E). These results show that NB-DNJ treatment restores BTLA functionality in lupus CD4⁺ T cells.

DISCUSSION

The balance between co-stimulatory and co-inhibitory receptors determines the fate of immune responses. These immune checkpoints are thus likely to play important roles in pathological situations such as autoimmunity, infectious diseases, malignancies as well as in homeostasis. Data showing functional mutations in co-inhibitory receptors, as well as polymorphisms of the corresponding genes associated with susceptibility to autoimmunity, highlight the key role of co-inhibitory molecules in preventing autoimmune diseases. Other evidences come from the successful use of blocking mAbs targeting inhibitory receptors such as CTLA-4 (ipilimumab) and PD-1 (nivolumab) to treat malignancies. Indeed, the therapeutic targeting of immune checkpoints in this context is frequently associated with the development of autoimmunity-related adverse events(34). As a newly described inhibitory receptor, BTLA signaling pathway was investigated in pathological situations such as infections and cancers, but despite of these progresses, we are still far from a thorough understanding of the contribution of BTLA signaling in autoimmunity. Accumulating *in vivo* evidence suggested that the absence of BTLA signaling leads to inflammatory responses and autoimmune diseases. Several co-inhibitory pathways are suspected to participate in lupus pathogenesis. Indeed, polymorphisms in the PD-1 gene or in the CTLA-4 promoter have been reported to be associated with lupus susceptibility and CTLA-4 was shown to be unable to regulate the proliferation of effector lupus T cells (5, 31). However, whether altered BTLA signaling pathway plays a role in the lupus disease is still unknown. The aim of our study was thus to delineate the involvement of the newly described BTLA co-inhibitory receptor in lupus pathogenesis.

We first demonstrated a decreased BTLA expression in activated effector T cells from lupus patients. In addition, we identified a functional defect of BTLA in lupus CD4⁺ T cells that correlates with disease activity. Moreover, it is associated with proteinuria, with the presence

of anti-dsDNA Abs (having a clearly pathogenic validated role in SLE) and with plasmablast frequency. B cells are considered as key cellular players in SLE; however, numerous studies have highlighted the major contribution of CD4⁺ T cells to Ab production and tissue inflammation in lupus. The impaired BTLA functionality we describe in the present study could be responsible for uncontrolled proliferation and activation of lupus CD4⁺ T cells, which in turn will likely drive autoAb production. We propose that this defective BTLA function is due to a poor recruitment of BTLA to the TCR clusters upon activation. BTLA engagement through HVEM binding leads to the phosphorylation of tyrosine domains contained in its cytoplasmic region, to the recruitment of src homology region 2 domain-containing phosphatase-1 (SHP1) and SHP2 phosphatases near the TCR, and subsequently, to the inhibition of TCR signaling (8). BTLA and TCR spatial proximity thus represents a critical parameter for BTLA-mediated T cell inhibition and the lack of BTLA localization close to the TCR could participate to the “hyperactivated” phenotype of human lupus T cells. Indeed, in most lupus patients we analyzed, impaired BTLA capacity to inhibit lupus CD4⁺ T cell activation correlates with defective BTLA recruitment to TCR clusters.

As mentioned above, the enhancement of BTLA expression on CD4⁺ T cells from lupus patients following activation is lower compared to cells from HCs. The subcellular localization of BTLA as well as its release to the cell surface is not defined in human T cells. In mice, BTLA was found to be located mainly in the Golgi apparatus and in secretory lysosomes in resting CD4⁺ T cells (24), as it is also the case for CTLA-4 in human T cells (35). Following activation, CTLA-4 is translocated from the *trans* Golgi network to the cell surface at the immunological synapse thanks to a dynamic process, which is mediated by chaperone proteins such as T cell Receptor Interacting Molecule (TRIM). Indeed, the transmembrane adaptator TRIM, which is expressed in human T cells, was shown to bind CTLA-4 and to enhance surface CTLA-4 expression in human peripheral blood cells (36). It is plausible that as CTLA-4, BTLA is

translocated from the *trans* Golgi network to the surface following T cell activation, and any alteration in this process could explain, at least partly, the failure of BTLA to inhibit T cell activation lupus CD4⁺ T cells.

What are the consequences of defective BTLA localization to TCR clusters? The most obvious answer, confirmed by our data, is its inability to efficiently regulate TCR signaling. However, interestingly, we also demonstrated that BTLA is able to inhibit GM1 expression following CD4⁺ T cell activation, as it was shown for CTLA-4 (30, 37). This result highlights a previously unknown described role for BTLA, as a negative regulator of GM1-enriched microdomain formation and reveals a vicious pathogenic circle: the existence of preclustered TCRs in lupus CD4⁺ T cells limits the recruitment of BTLA to TCR microdomains. In turn, the absence of BTLA into TCR clusters prevents their dissociation. The next question we then should answer is how can we explain BTLA exclusion of preclustered TCRs? GM1-positive plasma membranes from CD4⁺ T cells of elderly people are characterized by higher levels of GM1 and cholesterol (38) and by an altered recruitment of signaling molecules (39). Moreover, overloading cholesterol in T cells from HCs reduces membrane fluidity (40). The high GM1 (33) and cholesterol levels (41) in lupus CD4⁺ T cells suggest a reduced lateral mobility of receptors and signaling molecules such as CTLA-4 and BTLA. Accordingly, we demonstrated that the use of the NB-DNJ inhibitor, known to normalize lipid metabolism, is sufficient to restore BTLA function in lupus CD4⁺ T cells. Interestingly, it was also previously shown that in vitro treatment with atorvastatin, which inhibits cholesterol biosynthesis, restores the lipid raft-associated signaling abnormalities in lupus T cells (32). Taken as a whole, our results suggest that dissociation of preclustered TCR using NB-DNJ, allows BTLA recruitment to TCR clusters. As a consequence, BTLA location near the TCR and in the GM1-rich domain results

in both the inhibition of TCR clustering and of TCR signaling, and finally leads to reduced T cell activation.

Unlike CTLA-4 and PD-1, BTLA is not only expressed by T cells, but also by B cells. In B cells, the role and function of BTLA are still poorly understood, but recent data suggest that BTLA and HVEM interaction results in the inhibition of B cell function (17). We are currently investigating BTLA expression and function in lupus B cells, and our preliminary results reveal an altered expression of BTLA on lupus B cells ex vivo compared to B cells from HCs (unpublished data). Interestingly, abnormal expression of lipid rafts in lupus B cells was recently described (42), and one can speculate that, as we described for CD4⁺ T cells, these lipid raft abnormalities in lupus B cells could contribute to defective BTLA recruitment to BCR clusters and to impaired BTLA functionality.

Enhancing BTLA function may represent an alternative therapeutic strategy for overcoming the unwanted activation of T cells in autoimmunity or transplantation. Indeed, Uchiyama et al. showed that the administration of an agonistic anti-BTLA mAb in a model of murine cardiac allograft, induces the suppression of alloreactive T cells; this suppression is associated with a decreased IL-2 and IFN- γ production but an increase in IL-10, leading to the generation of CD4⁺ Tregs and long-term survival (43). In the present study, we evidenced a defective BTLA functionality in lupus CD4⁺ T cells, thus limiting its direct therapeutic targeting. However, we demonstrated that restoring membrane trafficking is sufficient to correct BTLA function, allowing us to envisage the concomitant use of molecules such as NB-DNJ and agonistic anti-BTLA mAb, for the development of new therapeutic strategies.

In summary, this study deepens our knowledge regarding the expression and function of BTLA in CD4⁺ T cells, not only in SLE but also in healthy conditions. Indeed, we provide evidences that BTLA engagement could potently block the induction of GM1-enriched microdomains following TCR activation, which was never described in humans before. More

importantly, we demonstrate that BTLA signaling is deeply altered in lupus effector CD4⁺ T cells. Additional future work is now required to precisely delineate BTLA involvement in lupus pathogenesis. With the better understanding of immune abnormalities, targeted therapies will hopefully emerge and allow the development of ‘personalized medicine’.

METHODS

Patients and controls

A total of 48 SLE patients (43 females and 5 males aged from 17 to 82) attending at University Hospital (Strasbourg, France) and Pasteur Hospital (Colmar, France) and 26 age and sex-matched HCs were enrolled in this study. All patients met the American College of Rheumatology criteria for classification of SLE (44) and disease activity was assessed by the SLE disease activity index (SLEDAI). To avoid the effect of immunosuppressive agents on BTLA expression and function, all patients who received prolonged and heavy suppressive treatment or biologics were excluded from the study. Included patients were untreated or treated with methotrexate, hydroxychloroquine and/or low doses steroids (<20mg/day). All samples were collected from SLE patients undergoing routine evaluation of their disease and from volunteers during routine clinical (diagnosis/prognostic/therapeutic) procedures. Written informed consent was obtained from each individual in agreement with the Helsinki declaration and French legislation (article L1221-8-1), under which no approval by an ethical committee was required in this case. Characteristics of SLE patients are listed in Table S1.

Peripheral blood mononuclear cell isolation and CD4⁺ T cell purification and cell culture

PBMCs were isolated by Ficoll density gradient centrifugation (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich). CD4⁺ T cells were negatively selected using the RosetteSep Human T CD4⁺ cell Enrichment Cocktail (StemCell Technologies Inc.) according to manufacturer's instructions. The purity of the CD4⁺ population was typically $\geq 90\%$. For Treg depletion, CD4⁺ T cells were incubated with CD25 microbeads and isolated by negative selection following separation over a MACS column (Miltenyi). Purified CD4⁺ T cells were cultured in complete medium (RPMI 1640 containing 10% FCS, 10 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin and 10 mM HEPES) at 1×10^6 cells/ml in 96-well plates at 37°C.

Flow cytometry analysis

PBMCs or CD4⁺ T cells were stained for 20min at 4°C in staining buffer (2% FCS in PBS) with the following conjugated mAbs or isotype-matched controls: anti-CD3-Alexa Fluor 700 (clone UCHT-1, mouse IgG1κ, BD Pharmingen); anti-CD4-allophycocyanin (APC) Violet-770 (clone M-T466, Miltenyi); anti-CD25-APC (clone 4E3, Miltenyi); anti-CD45RA-phycoerythrin (PE) Violet-615 (clone REA562, Miltenyi); anti-BTLA-PE (clone MIH26, Biolegend). To assess GM1 expression, a FITC-conjugated Cholera Toxin B Subunit (CTB, Sigma-Aldrich) staining was performed. For phosphorylated-Erk 1/2 detection, cells were fixed in IntraCellular (IC) Fixation Buffer (eBioscience) for 30min and permeabilized in cold methanol 90% for 20min on ice. Permeabilized cells were washed in staining buffer before being stained with Alexa Fluor 488-conjugated anti-phospho-Erk 1/2 (pT202/pY204) (clone 20A, BD Pharmingen). Cell acquisition was performed using 10-colours Flow Cytometer Gallios-Navios (Beckman-Coulter). Data were analyzed using FlowJo 7.6.5 software (TreeStar).

BTLA functional analysis

Ab-coated beads (Dynabeads M-450 Epoxy, Invitrogen; 200µg of total Abs for 4.10⁸ beads) were used to stimulate purified CD4⁺ T cells. The cells were either stimulated with anti-CD3 (10% OKT3, eBioscience) / anti-CD28 (5% clone CD28.2, BD Pharmingen) coated-beads, with anti-CD3 (10%) / anti-CD28 (5%) / anti-BTLA (85% MIH26, Biolegend) coated-beads, or with anti-CD3 (10%) / anti-CD28 (5%) / mouse IgG2a,κ (85% clone MG2a-53, Biolegend) coated-beads (ratio bead/cell = 1:2). Flow cytometric analysis of CD25, BTLA and GM1 expression was performed after 48 hours of culture. To measure cell proliferation, ³H-thymidine (1µCi per wells; specific activity 6.7 Ci/mmol, Perkin Elmer) was added after 48 hours of culture, cells were harvested 16-18 hours later on a filter with an automatic cell-harvesting device (Packard), and thymidine incorporation was assessed by using a Matrix 9600 direct beta counter (Packard).

To normalize intracellular lipid metabolism, cells were cultured for 48h in complete medium supplemented with 10 μ M of N-Butyldeoxynojirimycin (NB-DNJ, Sigma-Aldrich) and analyzed for CD25, BTLA and GM1 expression by flow cytometry.

Analysis of Erk phosphorylation

Freshly isolated or NB-DNT-treated CD4⁺ T cells (1x10⁶ cells/ml in PBS) were incubated with anti-CD3 mAb (OKT3, 5 μ g/ml) in the presence or not of the agonistic anti-BTLA mAb (MIH26, 10 μ g/ml) for 20min on ice. Abs were then crosslinked with a secondary polyclonal Ab (AffiniPure Goat anti-Mouse IgG + IgM (H+L), Jackson ImmunoResearch, 20 μ g/ml) for 15min on ice. Cells were then incubated in a 37°C-water bath for 5min. The reaction was stopped by transferring the cells in IC Fixation Buffer (v/v) for 30min at room temperature and intracellularly stained with relevant mAb as mentioned previously.

Immunofluorescence and quantification of BTLA recruitment to TCR clusters

Freshly isolated CD4⁺ T cells were incubated on ice with anti-CD3 mAb (OKT3, 5 μ g/ml) for 5min and activated as mentioned in the previous paragraph. The reaction was stopped by transferring cells in IC Fixation Buffer (v/v) for 30min at room temperature in poly-L-lysine-coated (Sigma Aldrich) Chambered Cell Culture Slides (Falcon™). After a blocking step in Tris Buffer Saline (TBS)-2% Bovine Serum Albumine (BSA) (Sigma Aldrich), cells were incubated with primary Ab (anti-TCR $\alpha\beta$ Alexa Fluor 488, clone IP26 and anti-BTLA Alexa Fluor 647, clone MIH26) in TBS-0,5% BSA overnight at 4°C in the dark. For GM1 staining, cells were intensively washed in cold PBS to remove residual BSA, and then incubated with FITC-CTB (Sigma) for 30min on ice. After washing in cold PBS, cells were stained with anti-BTLA Alexa Fluor 647 (clone MIH26) in TBS-0,5% BSA overnight at 4°C in the dark. Cells were washed in TBS and stained with 500 ng/ml of 4',6-diamino-2-phenyl-indole (DAPI). Stained CD4⁺ T cells were mounted in Mounting Fluorescence Medium (Dako), observed on an LSM 780 Carl Zeiss confocal microscope Axio Observer Z1 with a 63x Plan-Apochromat

objective and acquired using an electronic zoom of 7x. For each individual, 30 CD4⁺ T cells were imaged individually. Analysis of the co-localization was carried out with ImageJ software (NIH). We set up the imaging parameters in order to avoid saturation of the signals and kept these settings for all our analyses. To quantify BTLA recruitment to TCR clusters, an approach was developed in our laboratory using ImageJ software. In TCR (green) and BTLA (red) corresponding channels, 2 different regions of interest (ROI) were manually determined: a “membrane” region and a “cluster” region corresponding to each cluster of TCR. The mean FI in both green and red colors were measured with the ImageJ software in each of these ROIs. To observe specific BTLA recruitment to TCR clusters, the FI of BTLA was divided by the TCR intensity allowing us to calculate an intensity ratio according to this equation : $(FI \text{ “cluster” BTLA} - FI \text{ “membrane” BTLA}) / (FI \text{ “cluster” TCR} - FI \text{ “membrane” TCR})$. According to our imaging settings, a ratio of 0.5 was determined for which we consider that BTLA is recruited to TCR clusters if the ratio is over 0.5, and not recruited if the ratio is less than 0.5. The ratio is calculated for each TCR spot in 30 cells per individual allowing us to determine the percentage of TCR clusters colocalized with BTLA for each cell. Four different cell profiles of BTLA recruitment were identified: Total recruitment (100% of TCR clusters colocalized with BTLA), partial recruitment (50-99%), poor recruitment (<1-49%) and no recruitment (0%).

Statistical analysis

Data were analyzed using Graph Prism version 5 (Graphpad software Inc). Differences between SLE patients and healthy individuals were determined with a two-tailed unpaired Student’s test or Mann-Whitney test as appropriate. Differences following NB-DNJ treatment were analyzed with a non-parametric Wilcoxon’s paired *t-test*. The significance of differences between groups was determined using a One-Way ANOVA test, with Tukey multiple comparisons. Relationship between two variables was evaluated using the Spearman’s correlation coefficient.

Data are expressed as mean \pm SEM and differences at $p < 0.05$ or less were considered to be statistically significant.

Study approval

The ethical approval is not required for these types of studies under French legislation. An approval is needed and delivered by the French committee named “CCP” for research defined as “recherches biomédicales”. This approval is not required if no additional procedures are performed, as it is the case in our study: all samples were obtained from volunteers attending the Rheumatology Clinic of Strasbourg University Hospitals and were collected during routine clinical (diagnostic/prognostic/therapeutic) procedures prescribed. All patients provided written informed consent prior to their participation in the study.

Author contributions: FM designed the study. MS performed the experiments and analyzed the data. JDF assisted with microscopy and reviewed the article. MS and FM wrote the manuscript. RF, FS and JEG participated in sample collection and clinical analysis and reviewed the article. HD participated to discussions and reviewed the article.

Competing interests: The author declare that they have no competing interests.

Acknowledgments: We thank the Department of Rheumatology, Hautepierre hospital (Strasbourg), the Department of Clinical Immunology and Internal Medicine, Strasbourg hospital, Dr G. Blaison from the Pasteur hospital in Colmar, and the patients for participating in the study. We thank Pr D. Olive for carefully reading the manuscript.

This work was supported by the French Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Fondation Arthritis-Courtin (grant to FM) and the French “Ministère de l’Enseignement et de la Recherche” and ELIA Medical (fellowship to MS).

Figure legends

Figure 1: Expression of BTLA by T cells in SLE patients compared to HCs. (A) The gating strategy of different T cell subsets defined by CD3, CD4 and CD45RA by flow cytometry is shown. (B) Flow cytometry analysis of BTLA expression on human T cell subsets. Data from a representative HC are shown as example. MFI values are indicated. (C) Comparison of BTLA expression on T cell subsets in HCs (white dots) and SLE patients (black dots). Results are expressed as Δ MFI, corresponding to BTLA MFI - isotype MFI. Horizontal lines represent the mean BTLA expression for HCs ($n=14-21$) and SLE patients ($n=21-30$). (** $p<0.01$; unpaired t-test).

Figure 2: The upregulation of BTLA expression upon activation is defective in lupus CD4⁺ T cells compared to HCs. (A) Flow cytometry analysis of BTLA expression on CD4⁺ T cells with (black lines) or without stimulation (grey peaks) in representative HC and SLE patient. (B) Comparison of BTLA MFI (left) and BTLA fold enhancement (right; expressed as a ratio of BTLA MFI following activation/BTLA MFI in the absence of activation) on CD4⁺ T cells from HCs ($n=14$; white bars) and SLE patients ($n=22$ hatched bars). (C) Comparison of CD25 expression following T cell activation (with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs) in CD4⁺ T cells from HCs (white bars, $n=15$) and SLE patients (hatched bars, $n=24$). (D) Correlation between BTLA fold enhancement and the disease activity defined by SLEDAI ($n=22$). Results are expressed as mean \pm SEM and each dot represents one individual. (** $p<0.01$, Mann-Whitney; r =Spearman correlation coefficient).

Figure 3: BTLA functionality is defective in SLE patients compared to HC. (A-B) CD4⁺ T cells were stimulated with anti-CD3/anti-CD28 mAbs \pm the agonistic anti-BTLA mAb or its isotype control. (A) CD4⁺ T cells were cultured for 3 days and [³H] thymidine was added during the last 16-18h of culture. The percentage of inhibition of the proliferation was calculated as

follows: $[1 - (\text{cpm in the presence of BTLA} / \text{cpm in the presence of isotype control})] \times 100$ for HCs (white bars, $n=15$) and SLE patients (hatched bars, $n=23$). **(B)** CD25 expression on CD4⁺ T cells was analyzed after 2 days by flow cytometry and the percentage of inhibition of CD25 expression was calculated for HCs (white bars, $n=9$) and SLE patients ($n=17$). **(C)** CD4⁺ T cells from HCs ($n=8$) and SLE patients ($n=8$) were stimulated for 5 min with an anti-CD3 mAb in the presence or not of the agonistic anti-BTLA mAb. Erk phosphorylation was determined intracellularly by flow cytometry and the percentage of inhibition of Erk phosphorylation was calculated. **(D)** Correlation between BTLA fold enhancement and the percentage of inhibition of the proliferation ($n=26$). Results are expressed as raw data (**A-C**; left) and as mean of inhibition \pm SEM (**A-C**; right) and each dot represents one individual. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, Mann-Whitney; r =Spearman correlation coefficient).

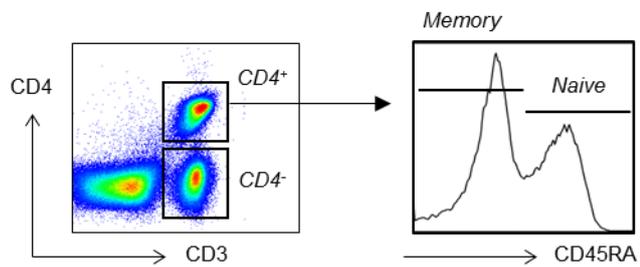
Figure 4: Relationship between impaired capacity of BTLA to inhibit lupus CD4⁺ T cell proliferation and biological and clinical manifestations of SLE. **(A)** Correlation between the percentage of inhibition of the proliferation (defined by comparing the proliferation in the presence or not of the agonistic anti-BTLA mAb) and the SLEDAI score ($n=29$). **(B-D)** Inhibition of the CD4⁺ T cell proliferation in SLE patients classified according **(B)** to their SLEDAI in mild (SLEDAI < 6 ; $n=17$) and severe SLE patients (SLEDAI ≥ 6 ; $n=15$) **(C)** to the presence or not of circulating anti-dsDNA Abs (SLE anti-DNA⁻; $n=10$, SLE anti-DNA⁺; $n=15$) **(D)** to the presence or not of proteinuria (SLE prot⁻; $n=21$, SLE prot⁺; $n=6$). ϵ Correlation between the percentage of inhibition of the proliferation and the frequency of circulating plasmablasts defined as CD19⁺CD27^{hi}CD38^{hi} cells ($n=24$). Results are expressed as mean \pm SEM and each dot represents one individual. (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, One way ANOVA/Tukey comparison; r =Spearman correlation coefficient).

Figure 5: BTLA is poorly recruited to TCR clusters upon activation in lupus CD4⁺ T cells compared to HCs. (A-B) Purified CD4⁺ T cells were stained with anti-TCR $\alpha\beta$ mAb (in green; **A**) or CTB (in green; **B**) and anti-BTLA mAb (in red), before (upper images) and after 5 minutes of TCR stimulation using an anti-CD3 mAb. Colocalized staining appears in yellow in the merge images. White bar=10 μ m. (C) Comparison of BTLA recruitment to TCR clusters in HCs ($n=9$; white bar) and SLE patients ($n=13$; hatched bar). 30 cells per individual were analyzed. (D) Comparison of BTLA recruitment to TCR clusters cell by cell. Results are expressed as the percentage of each profile of BTLA recruitment (as defined in Fig. S6) in HCs ($n=9$) and SLE patients ($n=13$). (E) Correlation between BTLA recruitment to TCR clusters and the percentage of inhibition of CD25 expression ($n=15$). Results are expressed as mean \pm SEM and each dot represents one individual. (* $p<0.05$; ** $p<0.01$, Mann-Whitney; r =Spearman correlation coefficient).

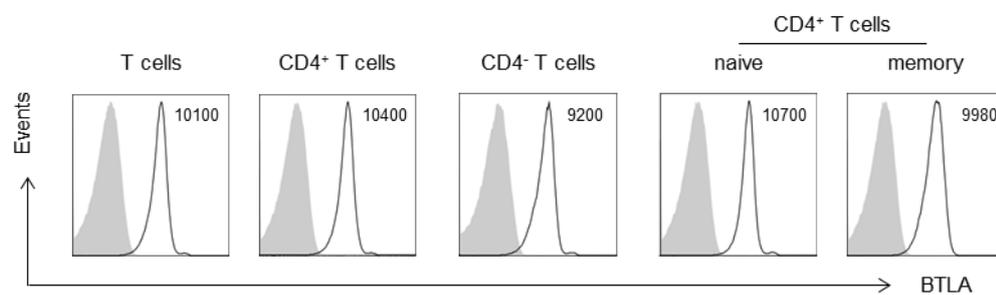
Figure 6: BTLA regulates GM1 expression in activated T cells. (A) Unstimulated lupus CD4⁺ T cells were stained for TCR (in green) and BTLA (in red) and analyzed by confocal microscopy. Pre-clustered TCRs are evidenced by white arrows. White bar=10 μ m. (B) Purified CD4⁺ T cells were cultured for 48h with or without TCR stimulation (anti-CD3/anti-CD28 mAbs) in the presence of the agonistic anti-BTLA mAb or its isotype control (IgG2a). GM1 expression was measured by flow cytometry thanks to CTB staining. Data obtained with CD4⁺ T cells from one representative HC (upper panel) and one representative SLE patient (lower panel) are shown. (C) Percentage of GM1⁺ cells among CD4⁺ T cells from HCs ($n=6$) is represented. (D) Comparison of the percentage of inhibition of GM1 expression in HCs ($n=6$; white bar) and SLE patients ($n=11$; hatched bar). Results are expressed as mean \pm SEM and each dot represents one individual. (* $p<0.05$; ANOVA/Tukey comparison (C) and Mann-Whitney (D)).

Figure 7: Normalizing lipid metabolism restores BTLA functionality in lupus CD4⁺ T cells. (A) CD4⁺ T cells were cultured for 2 days in the presence or not of NB-DNJ (10 μ M) and the percentage of CD25⁺ among CD4⁺ T cells was assessed by flow cytometry in HCs (white bars; $n=5$) and in SLE patients (hatched bars; $n=12$). (B) Percentages of inhibition of CD25 expression following TCR stimulation (48h) and upon BTLA engagement were calculated for lupus CD4⁺ T cells incubated or not with NB-DNJ (10 μ M). (C) Percentages of BTLA recruitment to TCR clusters following TCR stimulation (48h) and upon BTLA engagement were calculated for lupus CD4⁺ T cells ($n=7$) incubated or not with NB-DNJ (10 μ M). (D) Percentages of inhibition of GM1 expression following TCR stimulation (48h) and upon BTLA engagement were calculated for lupus CD4⁺ T cells ($n=11$) incubated or not with NB-DNJ (10 μ M). (E) Comparison of the fold enhancement of BTLA expression following 48h of TCR stimulation of CD4⁺ T cells incubated or not with NB-DNJ (10 μ M) is represented in HCs (white bars; $n=5$) and in SLE patients (hatched bars; $n=11$). The results are expressed as mean \pm SEM and each dot represents one individual. (ns: not significant, * $p<0.05$; ** $p<0.01$; **** $p<0.0001$; Mann-Whitney, Wilcoxon paired t-test or One way ANOVA/Tukey comparison).

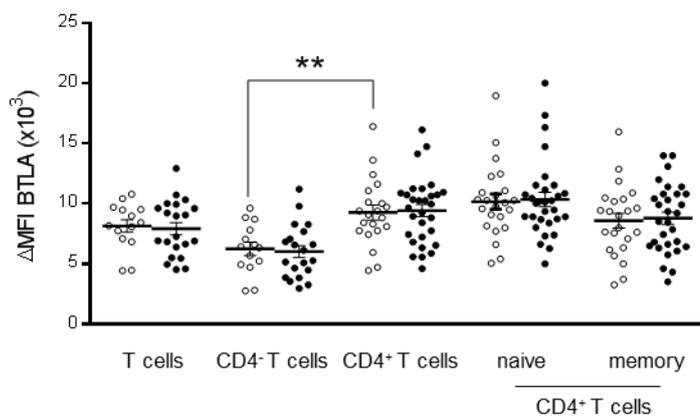
A

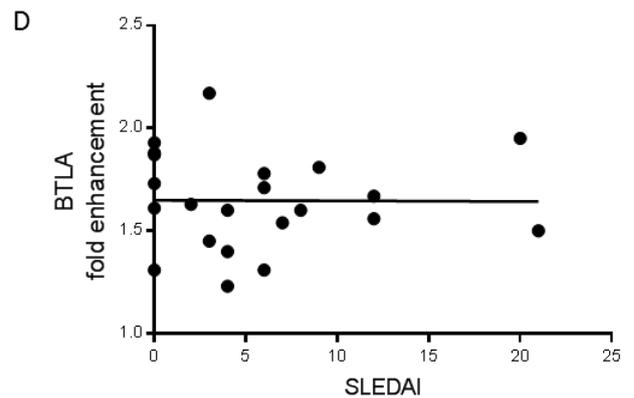
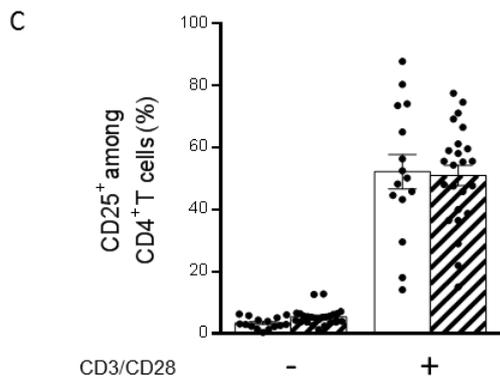
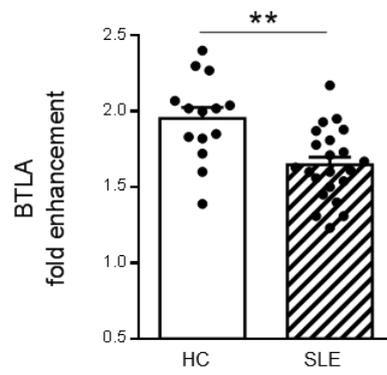
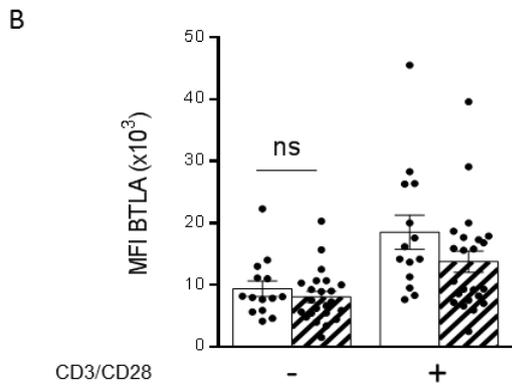
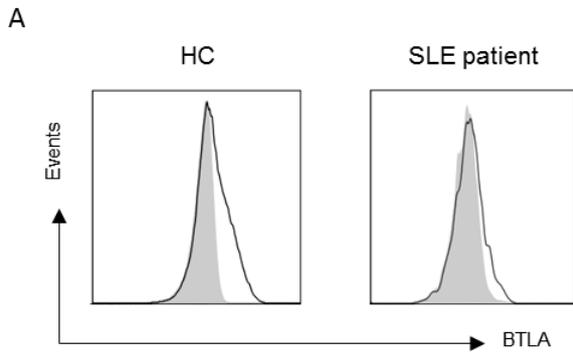


B

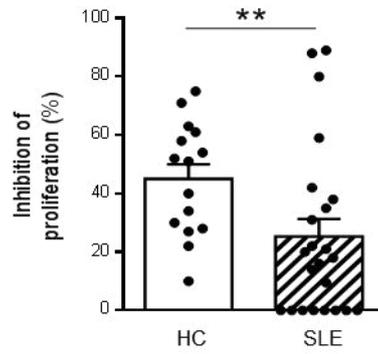
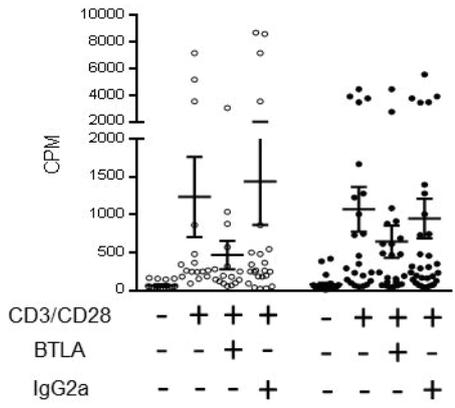


C

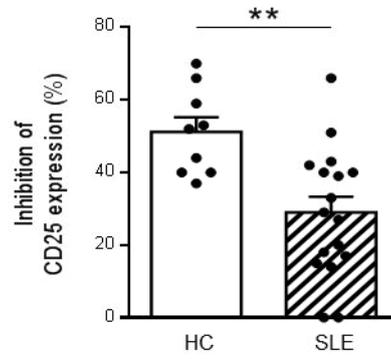
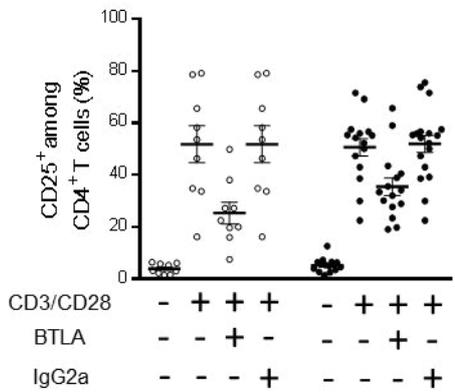




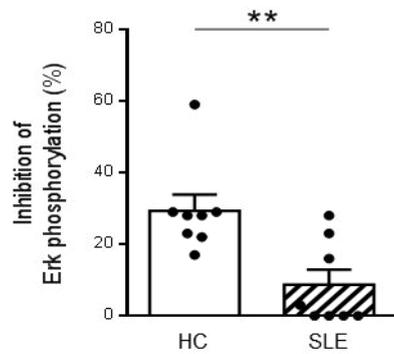
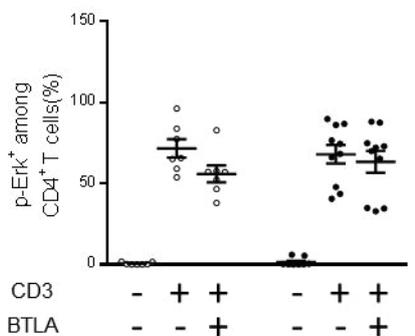
A



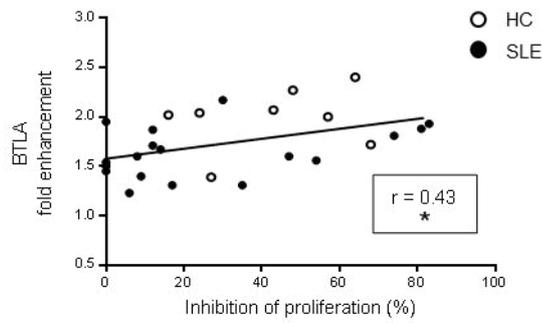
B

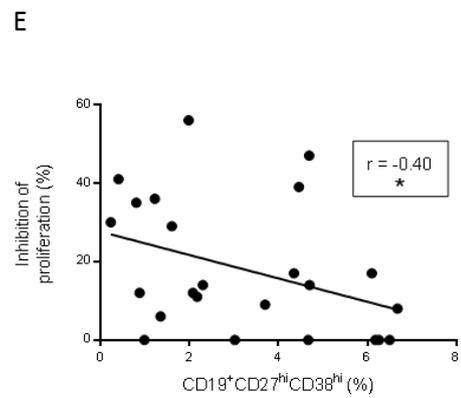
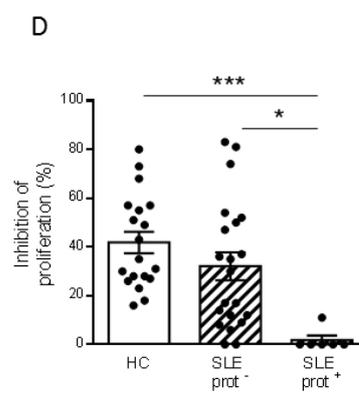
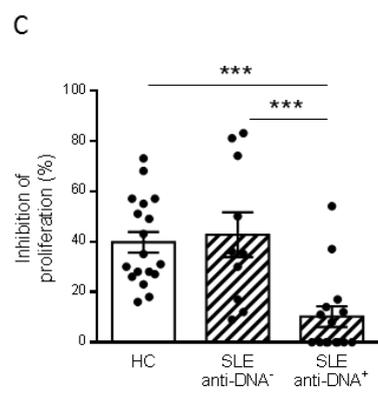
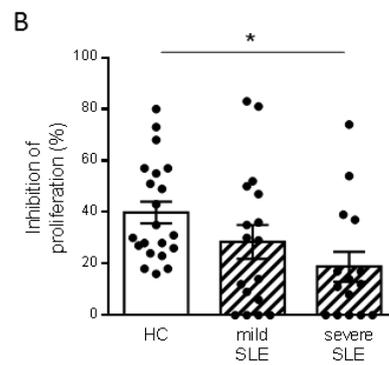
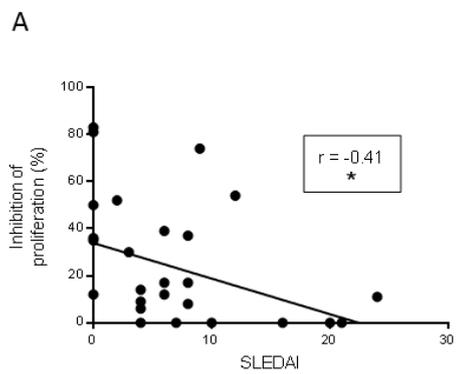


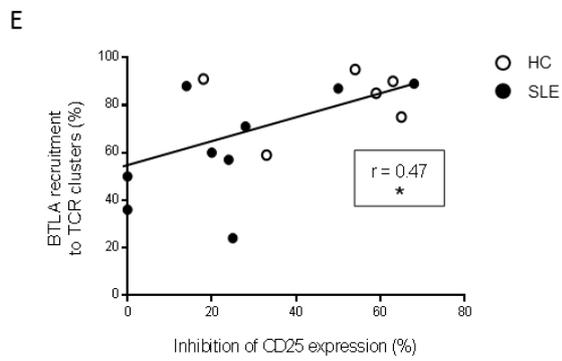
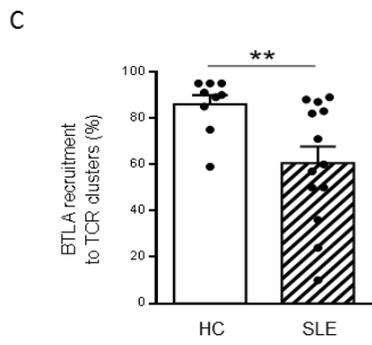
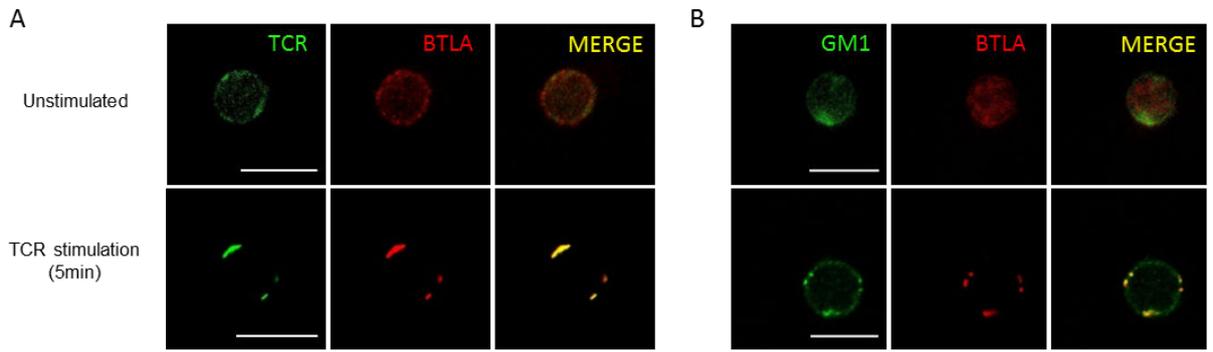
C

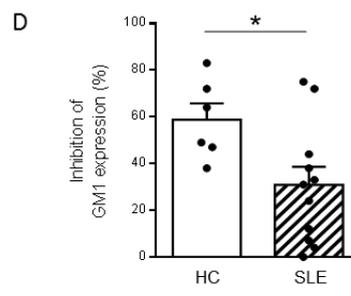
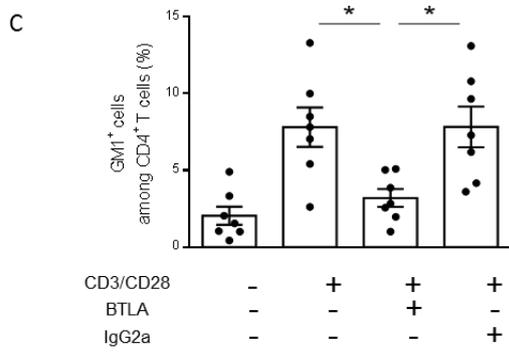
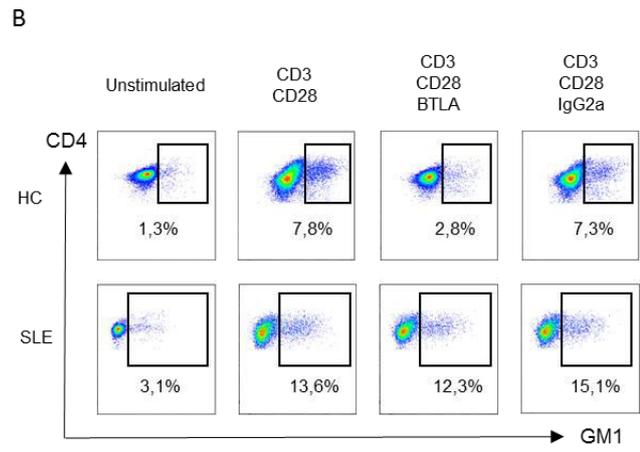
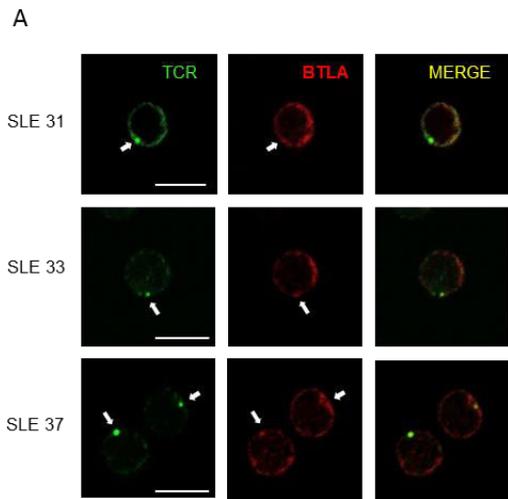


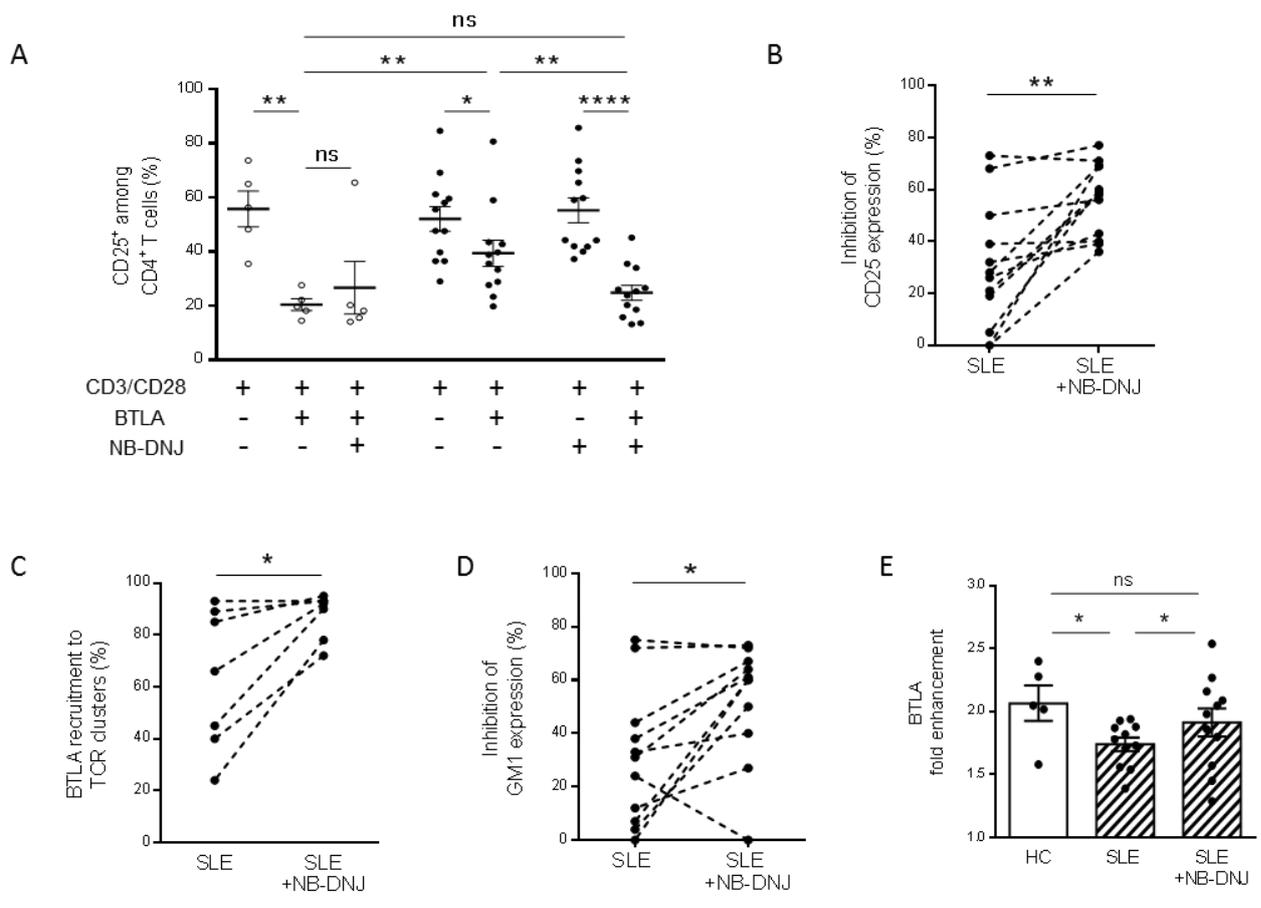
D









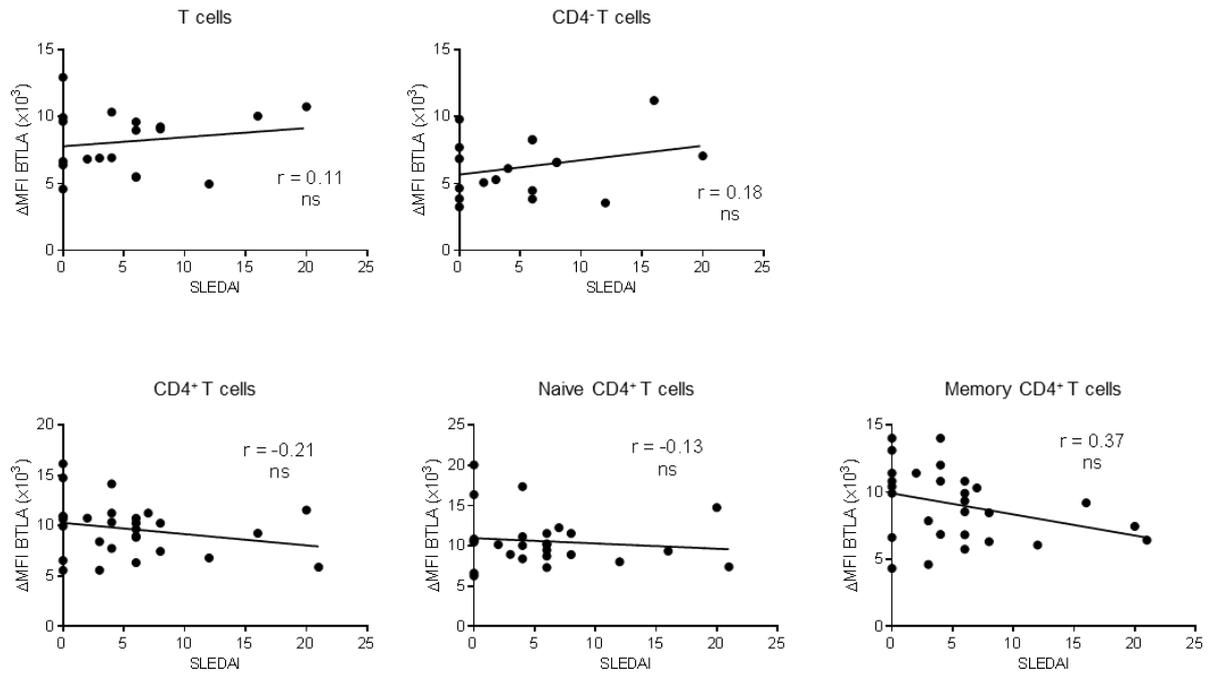


Supplemental Table 1: Clinical and biological characteristics of SLE patients.

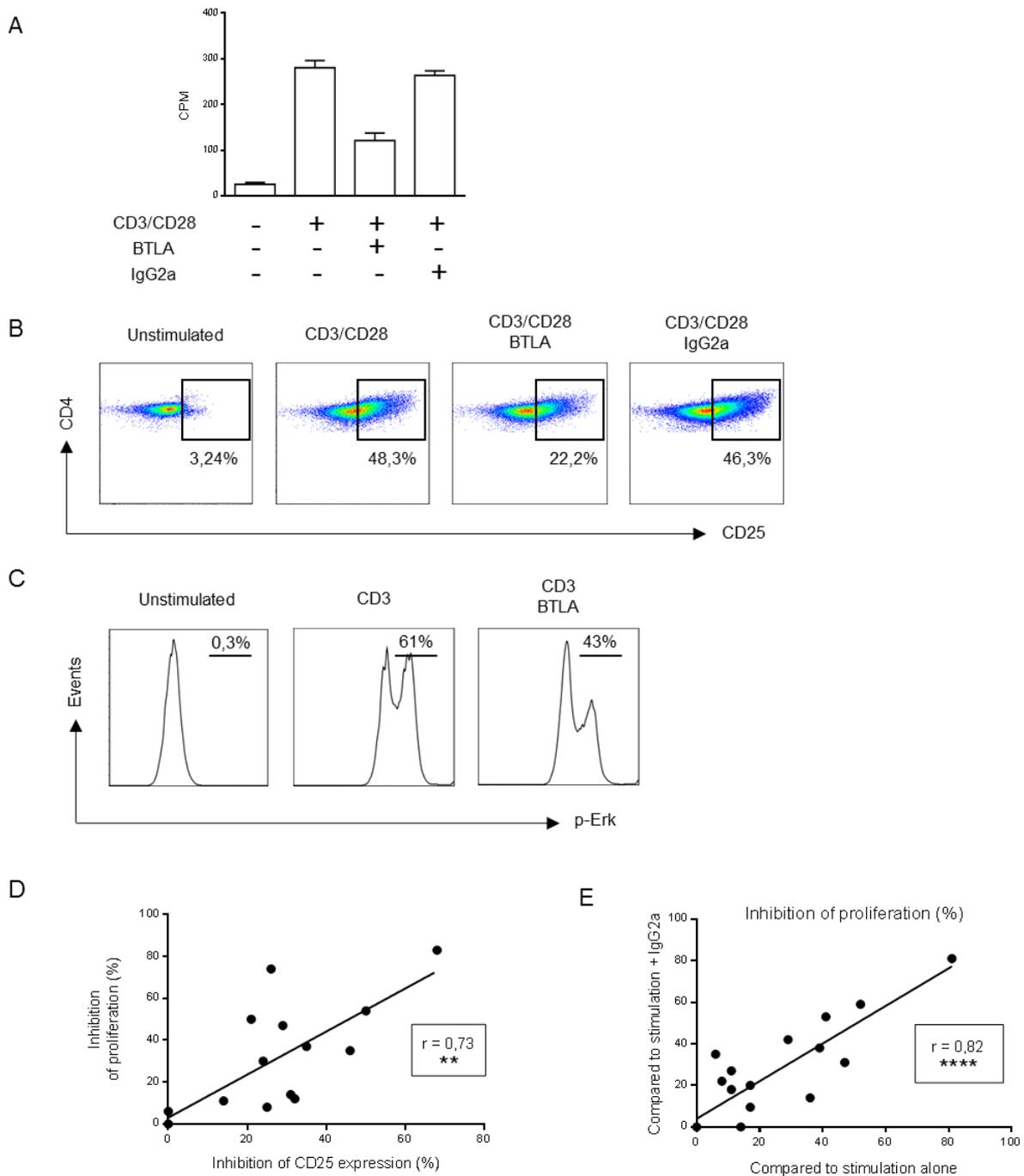
	SLE patients (<i>n</i> =48)
Sex (F/M)	43/5
Age (years), median (range)	46 (17-82)
SLEDAI, median (range)	4 (0-24)
Clinical manifestations*	
Fever	4
Rash	12
Mucosal ulcers	1
Alopecia	1
Arthritis	18
Pleurisy	3
Pericarditis	2
Nephritis	5
Biological features	
Anti-dsDNA**	25
Anemia	10
Lymphopenia	11
Leucopenia	5
Thrombocytopenia	5
Hematuria	4
Low complements	19
Proteinuria	7
Treatment; median (range)	
None	10
CS < 10mg/day; 5 (2-7.5)	11
CS ≥ 10mg/day; 10 (10-20)	10
HCQ (mg/day); 400 (200-400)	22
MTX (mg/week); 17.5 (10-20)	6

F, female; M, male; SLEDAI, SLE disease activity index; CS, corticosteroids; HCQ, hydroxychloroquine; MTX, methotrexate.

* at the time of blood drawn ** considered positive when the titer was ≥50 IU/ml as measured by ELISA.

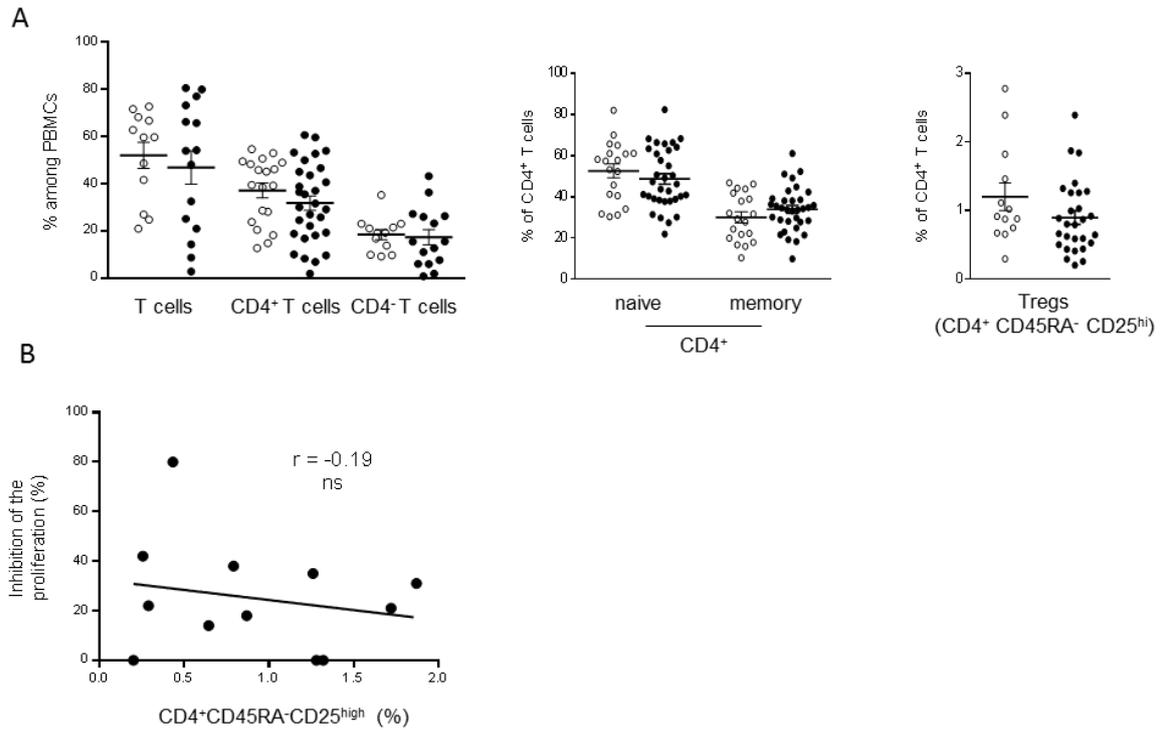


Supplemental Figure 1: Relationship between BTLA expression on various T cell subsets and SLEDAI score. Correlation between BTLA expression and the disease activity defined by the SLEDAI ($n=17-25$). Each dot represents one individual. r =Spearman correlation coefficient. ns=not significant.

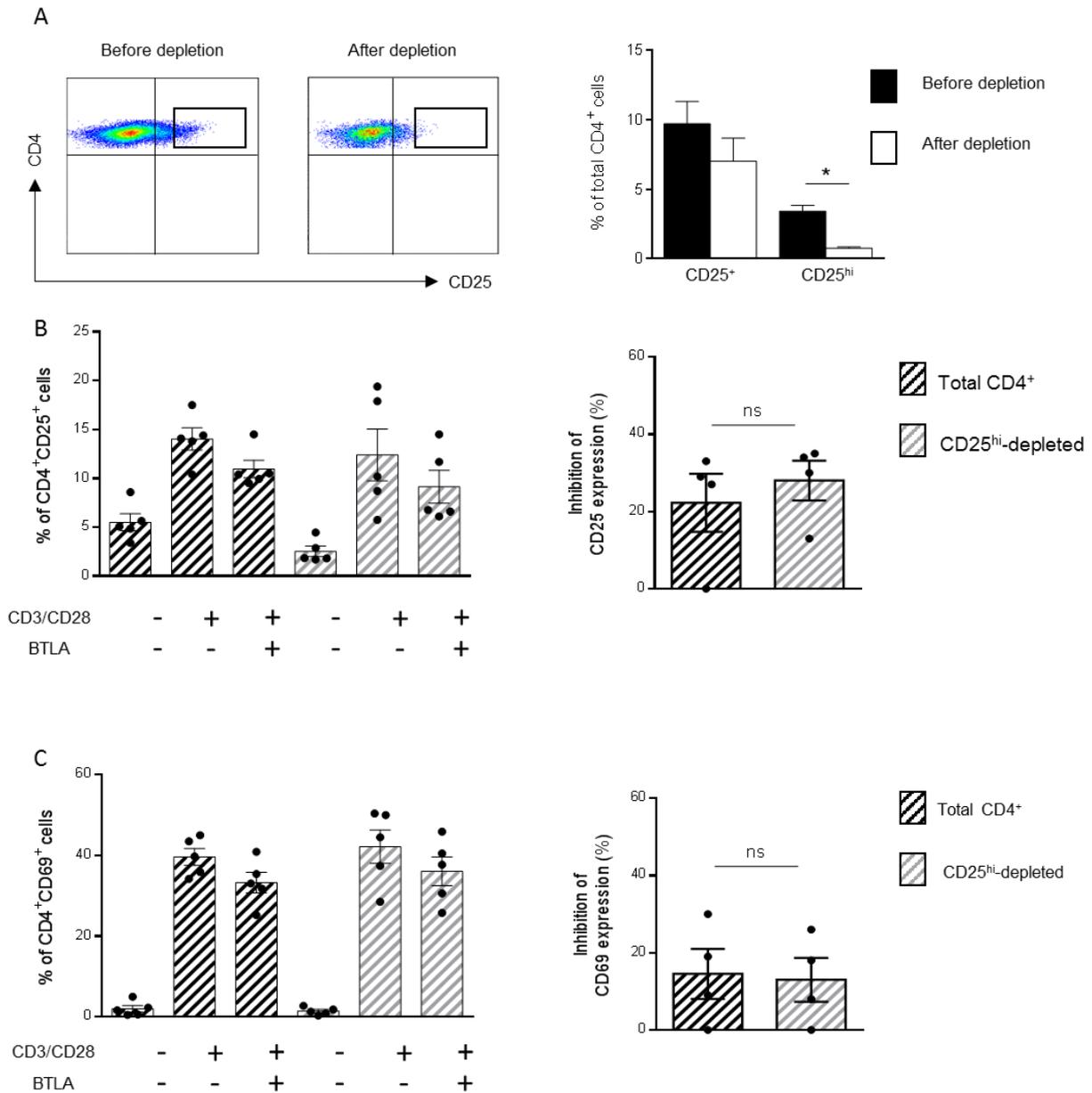


Supplemental Figure 2: Evaluation of BTLA functionality in CD4⁺ T cells from HCs.

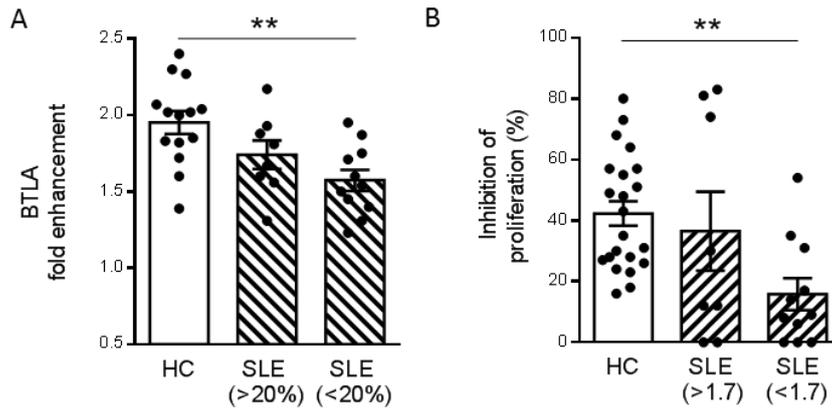
Purified CD4⁺ T cells were cultured for 48h in presence or not of TCR stimulation (anti-CD3/CD28 mAbs) ± the agonistic anti-BTLA mAb or its isotype control (IgG2a). Representative data obtained with CD4⁺ T cells from one HC are shown. **(A)** CD4⁺ T cells were cultured for 3 days and [³H] thymidine was added during the last 16-18h. Results are expressed as cpm ± SEM. **(B)** CD25 expression was assessed by flow cytometry on stimulated CD4⁺ T cells following 2 days of culture. **(C)** Erk phosphorylation was determined by flow cytometry on purified CD4⁺ T cells stimulated for 5 minutes with anti-CD3 mAb in presence or not of the agonistic anti-BTLA mAb. **(D-E)** Correlations between the inhibition of proliferation and CD25 expression **(D)** and between the inhibition of proliferation in the presence or not of the isotype control **(E)** were calculated with Spearman's correlation and r represents the Spearman's correlation coefficient; **p<0.01; ****: p<0.0001.



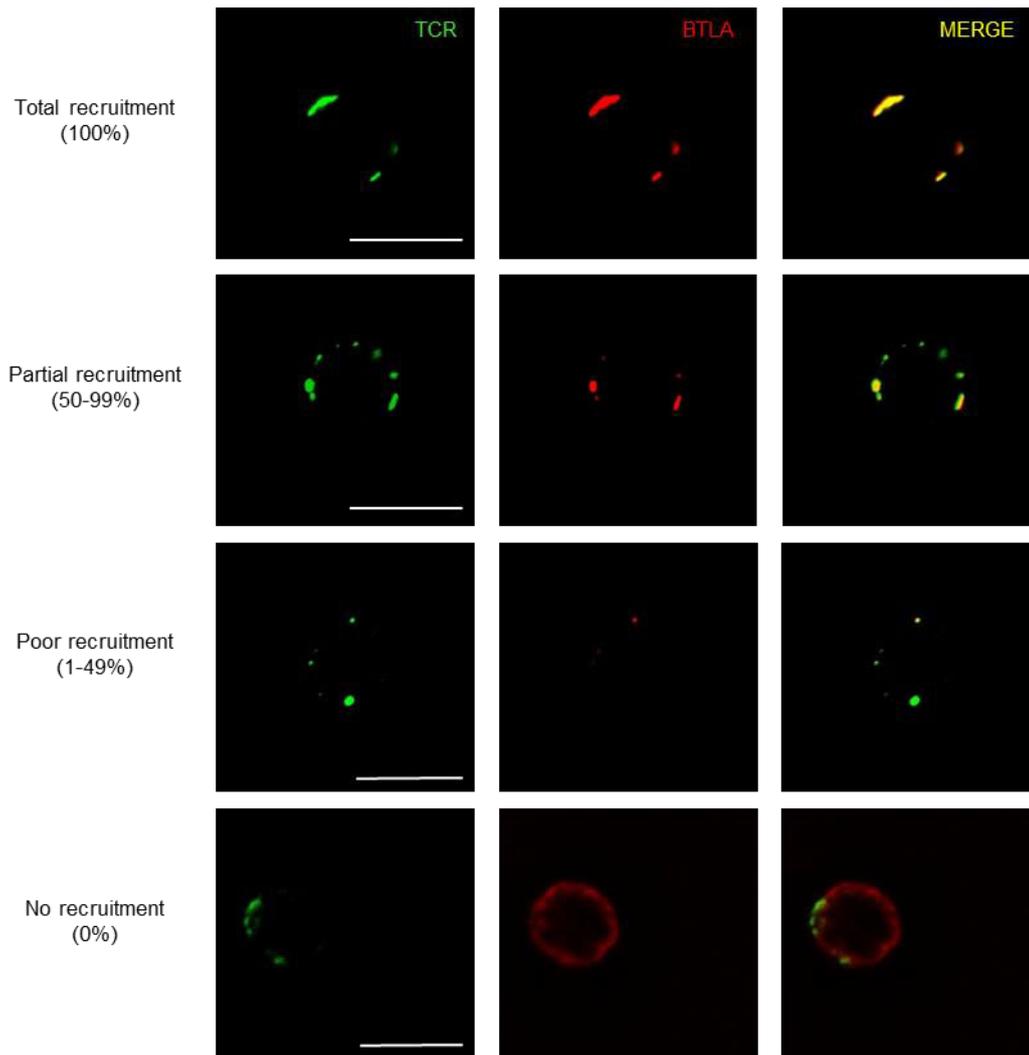
Supplemental Figure 3: Frequency of human T cell subsets in HCs and SLE patients. (A) Comparison of the frequency of total T cells (CD3⁺), CD4⁺ T cells (CD3⁺CD4⁺) and CD8⁺ T cells (CD3⁺CD4⁻) among total PBMCs from HCs (white bars, $n=10-21$) and SLE patients (hatched bars, $n=21-30$). (B-C) Comparison of the frequency of naive (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺) and memory (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻) CD4⁺ T cells (B) and aTregs (C: CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD25^{hi}) among total CD4⁺ T cells from HCs (white bars) and SLE patients (hatched bars). (D) Correlation between aTreg frequency and the inhibition of proliferation (%; $n=12$) Results are expressed as mean \pm SEM and each dot represents one individual. r =Spearman correlation coefficient. ns=not significant.



Supplemental Figure 4: Absence of Treg impact on the analysis of BTLA functionality. (A) Example of CD25 staining following Treg depletion. (B-C) CD4⁺ T cells and CD25^{hi}-depleted CD4⁺ T cells were stimulated with anti-CD3+anti-CD28 mAbs ± the agonistic anti-BTLA mAb or its isotype control. CD25 and CD69 expression were analyzed after 2 days by flow cytometry and the inhibition of CD25 expression (B) and of CD69 expression (C) were compared in total and in CD25^{hi}-depleted CD4⁺ T cells from SLE patients (*n*=4). Results are expressed as mean ± SEM. (ns: not significant, **p*<0.05; Mann-Whitney).



Supplemental Figure 5: Low BTLA fold enhancement is associated with high BTLA functional deficiency. (A) BTLA fold enhancement was compared between HCs and SLE patients harboring either more than 20% inhibition of CD4⁺ T cell proliferation (SLE>20%; $n=11$) or less than 20% inhibition (SLE<20%; $n=8$). **(B)** Percentage of inhibition of the proliferation was compared between HC and SLE patients whose CD4⁺ T cells harbor a fold enhancement of BTLA expression higher than 1.7 (SLE>1.7; $n=8$) or lower than 1.7 (SLE<1.7; $n=11$). Results are expressed as mean \pm SEM. (** $p<0.01$, One way ANOVA/Tukey comparison).



Supplemental Figure 6: Profiles of BTLA recruitment to TCR clusters. To quantify BTLA (in red) recruitment to TCR (in green) clusters cell by cell, we measured the percentage of TCR/BTLA-colocalized clusters over the total number of clusters for each cell. Four different profiles of recruitment are defined: total recruitment (100% of colocalized clusters); partial recruitment (50-99%); poor recruitment (1-49%) and no recruitment (0% of colocalized clusters). White bar=10 μ m.

III. Commentaires et résultats complémentaires

1. Expression de BTLA par les Tregs

L'objectif de notre étude était de définir l'implication du récepteur co-inhibiteur BTLA dans la pathogénèse du LED chez l'homme. Bien que nous n'ayons pas observé de différences d'expression à la surface des LT CD4⁺ totaux de patients lupiques et d'individus sains *ex vivo*, l'analyse de certaines sous-populations de LT a révélé quelques anomalies. En effet, nous avons évalué le niveau d'expression de BTLA à la surface de deux populations LT CD4⁺ régulateurs : aTregs (« activated regulatory T cells » ; CD4⁺CD45RA⁻CD25^{hi}) et rTregs (« resting regulatory T cells » ; CD4⁺CD45RA⁺CD25⁺) (Miyara et al., 2009) (cf. *Partie B. Introduction*). Le rôle de BTLA à la surface des LT régulateurs reste peu décrit à l'heure actuelle. Chez la souris, il a été mis en évidence que les Tregs exercent leur fonction suppressive via une augmentation de l'expression de HVEM. Ainsi, HVEM sur les Tregs interagit avec BTLA exprimé à la surface des cellules T effectrices, principalement à la surface des LT activés (Tao et al., 2008) (Figure 37).

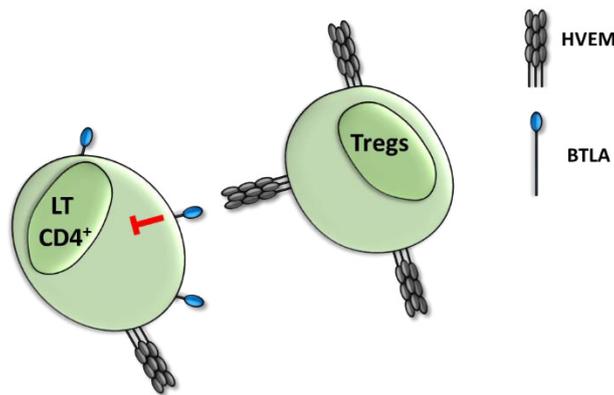


Figure 37. Interaction entre HVEM et BTLA dans les fonctions suppressives des Tregs en condition physiologique.

L'interaction entre HVEM à la surface des Tregs et BTLA sur les cellules T effectrices représente un des mécanismes de suppression utilisé par les Tregs pour exercer ses fonctions inhibitrices.

Cette interaction est favorisée par la faible expression de BTLA à la surface des Tregs, ce qui réduit la compétition entre HVEM exprimé à la surface des Tregs et à la surface des LT effecteurs. Nos analyses ont dans un premier temps démontré que l'expression est diminuée à la surface des Tregs d'individus sains, principalement sur les aTregs (MFI = 2500 pour aTregs ; MFI = 6000 pour les rTregs) par rapport aux autres sous-populations de LT CD4⁺ (MFI = 10500 pour les CD4⁺ naïfs) (Figure 38). Ces résultats démontrent que, comme chez la souris, l'expression de BTLA est faible à la surface des Tregs humaines. Par la suite, nous avons constaté qu'à la surface des Tregs de patients lupiques, le niveau d'expression de BTLA est significativement augmenté par rapport aux individus sains (Figure 39A ; aTregs : MFI = 4350 vs. 2500 ; rTregs : MFI = 7250 vs. 6000).

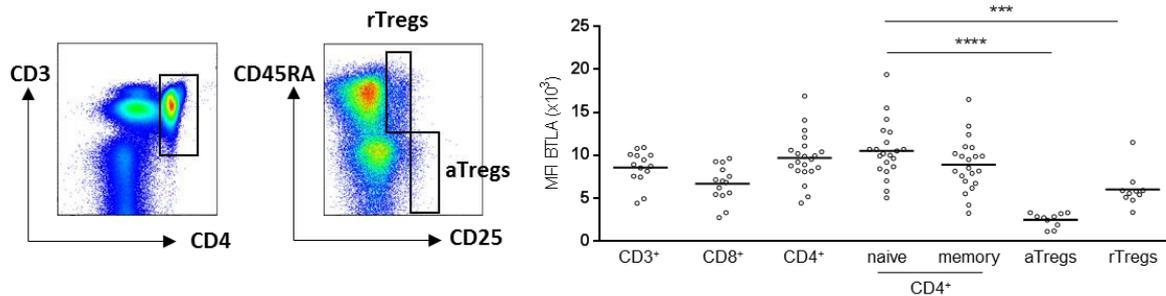


Figure 38. BTLA est faiblement exprimé à la surface des LT CD4⁺ régulateurs d'individus sains.

Le niveau d'expression de BTLA à la surface des cellules aTregs (CD3⁺CD4⁺CD45RA^{lo}CD25^{hi}) et rTregs (CD3⁺CD4⁺CD45RA^{hi}CD25⁺) a été comparé au niveau d'expression sur les autres sous-populations de LT (n=10-21) (***) = p<0,001, **** = p<0,0001, Mann-Whitney).

Cette augmentation est particulièrement importante à la surface des aTregs de patients lupiques présentant une pathologie active, alors qu'aucune différence n'a été observée concernant l'expression de BTLA à la surface des rTregs selon l'activité de la maladie (Figure 39B). De manière intéressante, il a été décrit, et nous avons confirmé ce résultat, que la fréquence des aTregs est significativement réduite chez les patients lupiques actifs (Miyara et al., 2009) (Figure 39C). Cette population exprime fortement le facteur de transcription FoxP3 et de ce fait possède de plus fortes capacités suppressives que les rTregs.

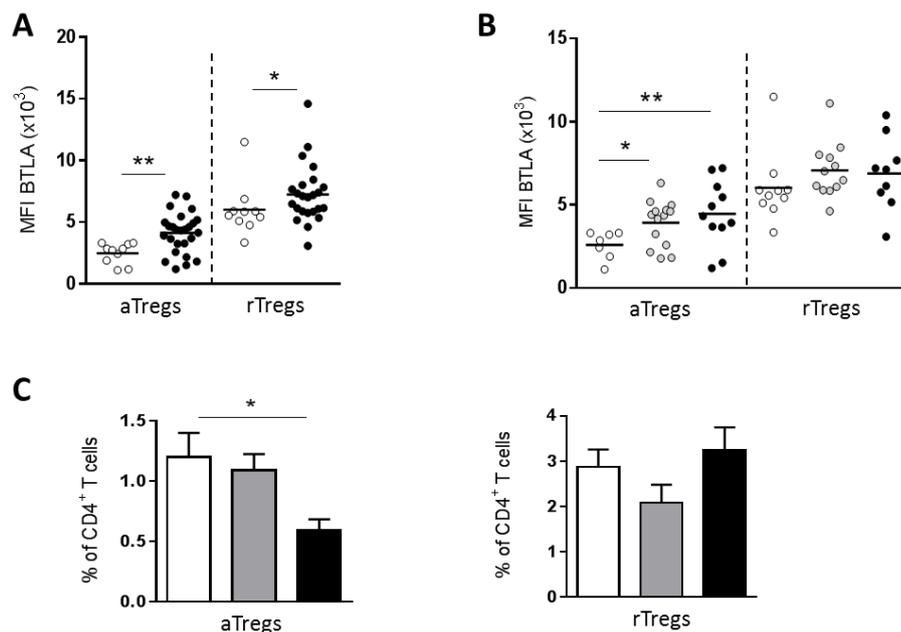


Figure 39. Le niveau d'expression de BTLA est augmenté à la surface des Tregs de patients lupiques par rapport aux individus sains.

A. Le niveau d'expression de BTLA à la surface des aTregs et des rTregs d'individus sains (n=10, ronds blancs) et de patients lupiques (n=26, ronds noirs) a été analysé par cytométrie en flux. **B.** Le niveau d'expression de BTLA à la surface des aTregs et des rTregs d'individus sains (n=10, ronds blancs), de patients lupiques inactifs (n=15, ronds gris) et de patients lupiques actifs (n=15, ronds noirs) a été analysé par cytométrie en flux. **C.** Fréquence des aTregs et des rTregs parmi les LT CD4⁺ totaux d'individus sains (blanc), de patients lupiques inactifs (gris) et actifs (noir). Les résultats sont exprimés en fréquence moyenne +/- SEM. (* = p<0,05, ** = p<0,01, Mann-Whitney ou One-Way ANOVA, Tukey comparison).

D'après la littérature, il semblerait que bien que leurs capacités suppressives soient conservées, la diminution de la fréquence des aTregs contribue à la rupture de tolérance périphérique et à l'hyperactivation lymphocytaire chez les patients lupiques. L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'une surexpression de BTLA pourrait avoir un impact sur la prolifération et donc sur la fréquence des aTregs chez les patients lupiques. C'est pourquoi, cette étude phénotypique devra être complétée par des analyses fonctionnelles, afin de définir quel est l'impact de l'augmentation de l'expression de BTLA à la surface des aTregs de patients lupiques sur leur nombre et leur fonction. Par ailleurs, il sera intéressant de définir les raisons de l'augmentation de BTLA spécifiquement dans les Tregs et non dans les autres populations de LT CD4⁺ de patients lupiques.

2. Expression d'HVEM

En parallèle de l'analyse de l'expression de BTLA, nous avons évalué le niveau d'expression de son ligand, HVEM. Chez l'individu sain, contrairement à ce que nous avons observé pour BTLA, le niveau d'expression de HVEM est similaire à la surface des différentes sous-populations de LT (*Figure 40A*). De plus, aucune différence d'expression d'HVEM n'a été constatée entre individus sains et patients lupiques, y compris à la surface des Tregs (*Figure 40B*).

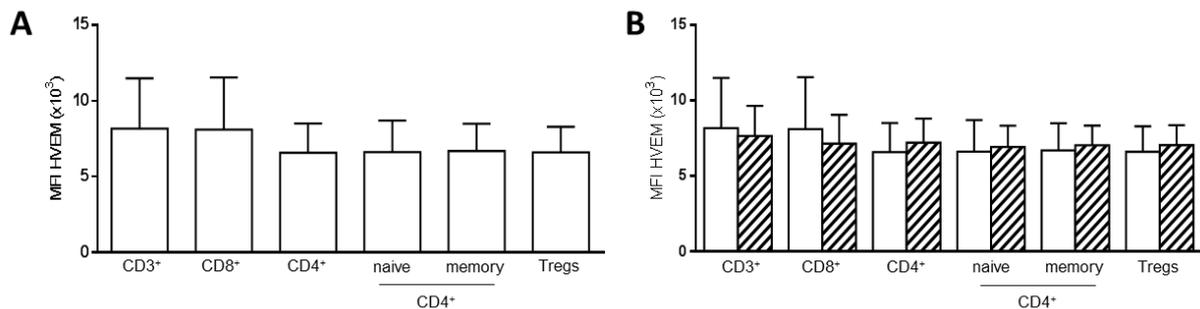


Figure 40. Le niveau d'expression d'HVEM est comparable à la surface des sous-populations d'individus sains et de patients lupiques.

A. Le niveau d'expression d'HVEM a été comparé à la surface des sous-populations de LT d'individus sains (n=5-9). **B.** Le niveau d'expression d'HVEM à la surface des différentes sous-populations de LT d'individus sains (n=5-9, barres blanches) et de patients lupiques (n=11-19, barres hachurées) a été analysé par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en MFI moyenne +/- SEM.

Au regard de ces résultats, nous pouvons imaginer que l'interaction entre HVEM à la surface des LT effecteurs et BTLA à la surface des Tregs est augmentée chez les patients lupiques par rapport aux individus sains. Cette interaction HVEM-BTLA pourrait favoriser l'inhibition des Tregs et la survie des LT activés, interaction limitée par la faible expression de BTLA à la surface des Tregs chez les individus sains (*Figure 41*).

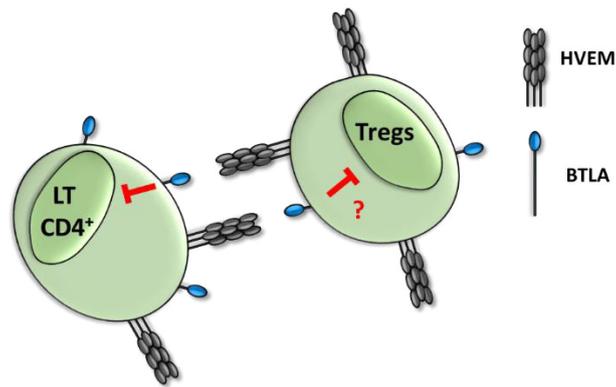


Figure 41. Interaction entre HVEM et BTLA dans les fonctions suppressives des Tregs chez les patients lupiques.

L'augmentation de l'expression de BTLA à la surface des Tregs pourrait expliquer la diminution de la fréquence des Tregs observée chez les patients lupiques.

Il a été décrit que la forte expression d'HVEM à la surface des monocytes régule l'activation lymphocytaire via son interaction avec LIGHT à la surface des LT (Heo et al., 2006). Comme ce qui a été précédemment décrit par d'autres, nous avons observé que le niveau d'expression d'HVEM à la surface des monocytes (CD3⁻CD14⁺) est élevé par rapport aux autres populations lymphocytaires (MFI = 24300 pour les monocytes vs. 17500 pour les LB et 8200 pour les LT). La comparaison entre patients lupiques et individus sains a mis en évidence que l'expression d'HVEM est réduite à la surface des monocytes de patients lupiques (Figure 42A), alors qu'aucune différence n'a été observée concernant l'expression de BTLA (Figure 42B).

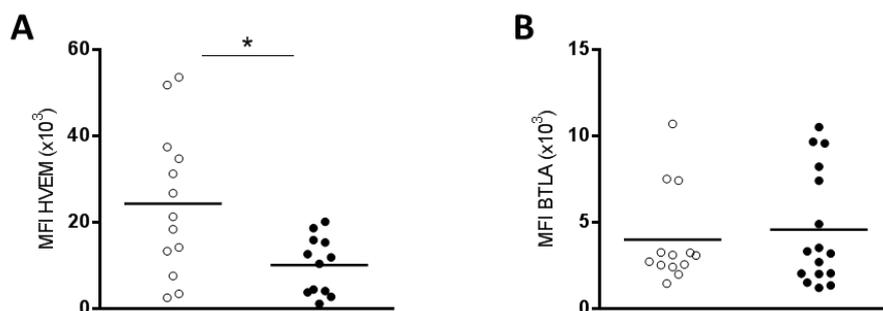


Figure 42. Le niveau d'expression d'HVEM est diminué à la surface des monocytes de patients lupiques par rapport aux individus sains.

Les niveaux d'expression d'HVEM (A.) et de BTLA (B.) ont été comparés à la surface des monocytes (CD3⁻CD14⁺) d'individus sains (n=12-13, ronds blancs) et de patients lupiques (n=13-16, ronds noirs) par cytométrie en flux. (* p<0,05, Mann-Whitney).

Cette diminution de l'expression d'HVEM, associée au défaut d'augmentation de l'expression de BTLA sur les LT activés, pourraient être des phénomènes liés. En effet, Owada *et al.* ont mis en évidence chez la souris que l'augmentation de l'expression de BTLA après activation, ainsi que sa présence dans les radeaux lipidiques est accrue en présence d'HVEM (Owada *et al.*, 2010). Une faible expression du ligand de BTLA à la surface des monocytes pourrait participer au défaut d'expression de ce récepteur après activation observé sur les LT CD4⁺ de patients lupiques. Bien que l'impact de l'interaction entre HVEM sur les monocytes et BTLA sur les LT n'ait pas été décrit chez l'Homme, il serait intéressant de réaliser des co-cultures entre ces cellules, en bloquant l'expression d'HVEM sur les monocytes.

Au cours de notre étude nous avons mis en évidence que de manière analogue à ce qui a été observé dans les LT $\gamma\delta$ et les LB, BTLA est recruté à proximité du TCR à la suite d'une activation des LT CD4⁺ avec un Ac agoniste anti-CD3. De manière intéressante, nous avons décrit une diminution du recrutement de BTLA au TCR au sein des LT CD4⁺ de patients lupiques, diminution associée à un défaut fonctionnel de BTLA. En normalisant le métabolisme lipidique de ces cellules, nous avons réussi à restaurer la fonctionnalité de BTLA. Au regard de ces résultats, nous nous sommes interrogés sur le bon adressage de BTLA depuis les compartiments intracellulaires vers la membrane. De manière intéressante, contrairement à ce qui a été observé en majorité chez les individus sains (Figure 43A), après activation, BTLA n'est pas exclusivement membranaire chez plusieurs patients lupiques (Figure 43B).

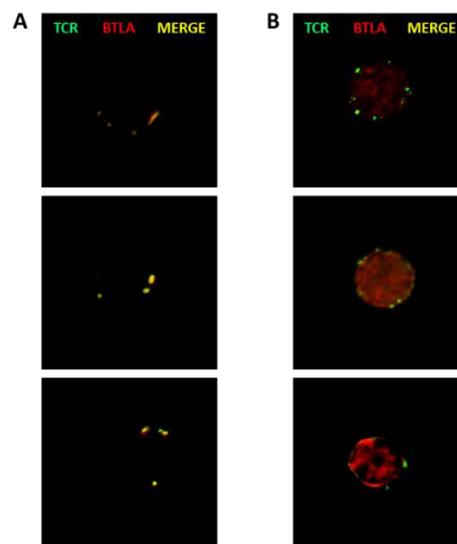


Figure 43. Dans les LT CD4⁺ de plusieurs patients lupiques, BTLA semble retenu dans des compartiments intracellulaires après activation.

A. Images représentatives d'un bon recrutement de BTLA (rouge) au niveau des clusters de TCR (vert) après une activation des LT CD4⁺ pendant 5min à l'aide d'Ac agoniste anti-CD3, obtenues par microscopie confocale. Les cellules ont été stimulées, fixées puis perméabilisées afin de visualiser l'expression membranaire et intracellulaire du TCR et de BTLA. **B.** Images représentatives du maintien de BTLA dans les compartiments intracellulaires après activation, observées chez 5 patients lupiques sur 16 analysés par microscopie confocale.

Cette localisation intracellulaire de BTLA après activation a été retrouvée chez 31% des patients lupiques analysés (5/16). Ces observations suggèrent que BTLA est retenu dans les compartiments intracellulaires, et cette rétention pourrait être liée à un métabolisme lipidique excessivement actif. Il sera intéressant par la suite d'établir le mécanisme précis d'adressage de BTLA depuis les compartiments intracellulaires jusqu'au TCR, ainsi que sa possible interaction avec des molécules chaperonnes.

3. Expression de BTLA sur les LB de patients lupiques

Au cours de notre étude, nous avons mis en évidence un défaut fonctionnel de BTLA au sein des LT CD4⁺ de patients lupiques. Cependant, l'expression de BTLA n'est pas restreinte aux LT. En effet, BTLA est exprimé à la surface des LB, et régule directement leur activation et leur maturation (**Thibult et al., 2013b**). L'engagement de BTLA à la surface des LB conduit à la déphosphorylation des kinases Syk et Blnk, inhibant finalement l'activation, la prolifération et la production de cytokines par les LB chez l'Homme (**Thibult et al., 2013b; Vendel et al., 2009**). Au cours de notre étude, nous avons évalué l'expression de BTLA sur les différentes sous-populations de LB humains.

Il a été décrit que le niveau d'expression de BTLA à la surface des LB périphériques est élevé par rapport aux autres populations présentes dans la circulation. En effet, nous avons confirmé que le niveau d'expression de BTLA à la surface des LB totaux est élevé par rapport aux LT et aux monocytes (*Figure 44A-B*).

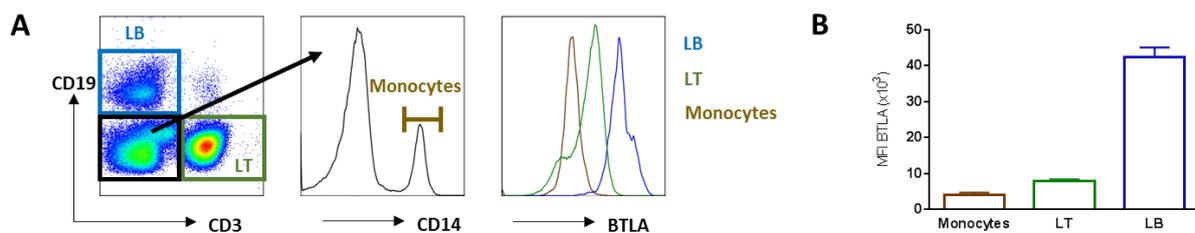


Figure 44. Expression de BTLA parmi les PBMCs d'individus sains.

A. Expression de BTLA à la surface des LT (CD3⁺, vert), des LB (CD19⁺, bleu) et des monocytes (CD3⁻CD19⁻CD14⁺, brun), analysé par cytométrie en flux. **B.** Comparaison de l'expression de BTLA à la surface des LT, de LB et de monocytes d'individus sains (n=13-21). Les résultats sont exprimés en MFI moyenne +/- SEM.

A l'aide de trois marqueurs membranaires, IgD, CD27 et CD38, nous avons identifié cinq populations de LB périphériques différentes par cytométrie en flux : les cellules B matures naïves (Naïve ; CD19⁺IgD⁺CD27⁻), les LB mémoires non-switchés (NSM ; CD19⁺IgD⁺CD27⁺), les LB mémoires switchés (SM ; CD19⁺IgD⁻CD27⁺), les LB mémoires doubles négatifs (DN ; CD19⁺IgD⁻CD27⁻) et les plasmablastes (PL ; CD19⁺CD38^{hi}CD27^{hi}) (*Figure 45A*).

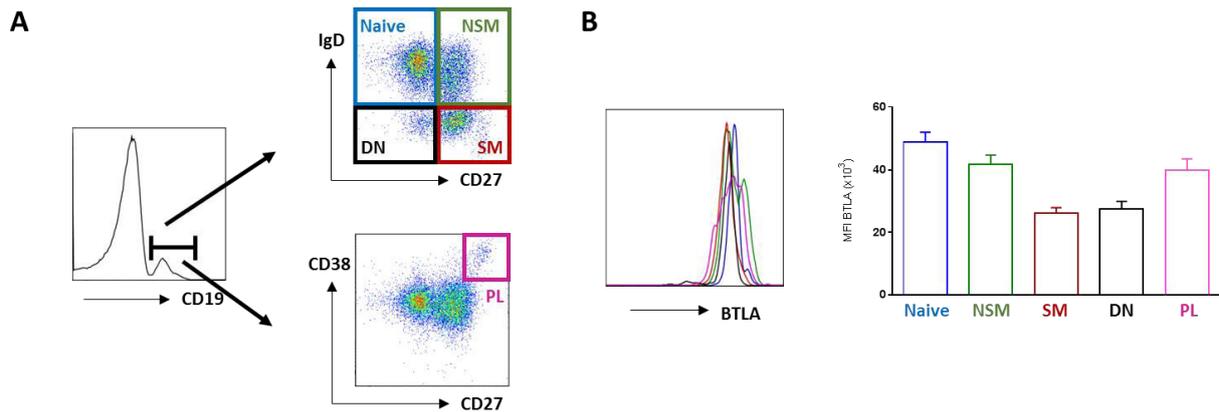


Figure 45. Expression de BTLA à la surface des différentes sous-populations de LB d'individus sains.

A. Exemple d'expression de BTLA à la surface des différentes sous-populations de LB périphériques : LB matures naïves (Naïve ; CD19⁺IgD⁺CD27⁻), LB mémoires non-switchés (NSM ; CD19⁺IgD⁺CD27⁺), LB mémoires switchés (SM ; CD19⁺IgD⁻CD27⁺), LB mémoires doubles négatifs (DN ; CD19⁺IgD⁻CD27⁻) et plasmablastes (PL ; CD19⁺CD38^{hi}CD27^{hi}), analysée par cytométrie en flux. **B.** Comparaison de l'expression de BTLA à la surface des sous-populations d'individus sains (n=21). Les résultats sont exprimés en MFI moyenne +/- SEM.

Nous avons évalué le niveau d'expression de BTLA sur ces différentes sous-populations par cytométrie en flux. Par analogie avec ce qui a été précédemment décrit pour les populations de LT, nous avons constaté que le niveau d'expression de BTLA est plus élevé à la surface des cellules naïves (MFI = 49000) et son expression diminue progressivement à la surface des cellules mémoires non-switchées (MFI = 41750) et mémoires switchées (MFI = 26200). L'expression de BTLA à la surface des LB mémoires DN est comparable à celle des LB SM (MFI = 27500). A la surface des plasmablastes, LB ayant pourtant subi de nombreuses étapes de différenciation, le niveau d'expression de BTLA se retrouve relativement élevé (MFI = 40000) (*Figure 45B*).

La comparaison de l'expression de BTLA sur les LB de patients lupiques et d'individus sains révèle que le niveau d'expression de BTLA est réduit à la surface des LB totaux de patients lupiques par rapport aux individus sains (MFI = 42500 pour les HC vs. 33200 pour les SLE) (*Figure 46A*). La diminution de l'expression de BTLA est retrouvée aussi bien sur les LB de patients lupiques présentant une pathologie inactive ou active (inactifs = 34200 ; actifs = 32000) (*Figure 46B*). De plus, l'analyse phénotypique de BTLA sur les différentes sous-populations a démontré que la diminution de l'expression de BTLA concerne spécifiquement la population de LB mémoires DN (MFI ctrl = 27500 vs. MFI LED = 16500) (*Figure 46C*). La diminution de l'expression de BTLA sur les LB mémoires DN de patients lupiques est encore plus marquée lorsque la pathologie est considérée comme active (MFI = 12450 pour les patients actifs vs. 19500 pour les patients inactifs) (*Figure 46D*).

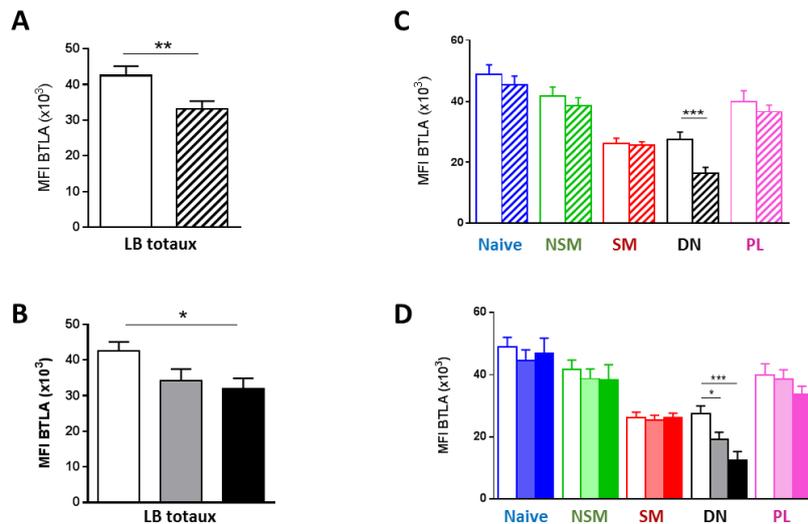


Figure 46. Le niveau d'expression de BTLA est diminué à la surface des LB mémoires DN de patients lupiques.

A-C. Le niveau d'expression de BTLA à la surface des LB totaux (**A.**) et des différentes sous-populations de LB (**C.**) d'individus sains (n=21, barres blanches) et de patients lupiques (n=32, barres hachurées) a été comparé par cytométrie en flux. **B-D.** Le niveau d'expression de BTLA à la surface des LB totaux et des différentes sous-populations de LB d'individus sains (n=21, barres blanches), de patients lupiques inactifs (n=17, barres teintées) et actifs (n=15, barres pleines) a été analysée par cytométrie en flux. (* = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001, Mann-Whitney ou One-Way ANOVA, Tukey comparison)

Les LB de patients atteints de LED présentent une profonde modification de la distribution de leurs sous-populations. En effet, il a été décrit une augmentation de la fréquence des LB transitionnels (CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}), mémoires switchés (CD19⁺CD27⁺IgD⁻), mémoires double négatifs (CD19⁺CD27⁻IgD⁻), des plasmablastes (CD19⁺CD27^{hi}IgD^{hi}) et des plasmocytes (CD19^{dim}CD27^{hi}CD138⁺CD20⁻) (**Odendahl et al., 2000; Wei et al., 2007**). De manière intéressante, la fréquence des LB mémoires DN se retrouve fortement augmentée chez les patients lupiques présentant une pathologie active par rapport aux individus sains et aux patients lupiques inactifs (**Wei et al., 2007**). Dans cette étude, nous avons confirmé une augmentation des fréquences des LB mémoires DN (3,6% vs. 10,9%) et SM (18% vs. 22,9%) alors que la fréquence des LB NSM est diminuée (23,8% vs. 15,7%) (**Figure 47A-B**). De plus, ces modifications sont particulièrement plus accentuées chez les patients lupiques à forte activité (**Figure 46C**).

La population de LB mémoires DN en périphérie est une population faiblement représentée chez les individus sains. Ces cellules sont des cellules mémoires ayant subi le mécanisme de commutation isotypique mais n'exprimant plus le récepteur de la famille TNF, CD27 (**Figure 45A**). CD27 est exprimé lorsque les cellules B subissent le phénomène d'hypermutation somatique, mécanisme participant à la mise en place d'un répertoire Ac de haute affinité, décrivant ce récepteur comme un marqueur des LB mémoires. CD27 interagit avec CD70, exprimé à la surface des LT activés, et contribue à l'expansion

clonale des LB, ainsi qu'à leur différenciation (**Kobata et al., 1995**). Par ailleurs, les LB mémoires DN expriment des IgG et des IgA à leur surface, mais présentent cependant de faibles fréquences de mutations, comparables aux fréquences observées pour les LB NSM (**Fecteau et al., 2006; Wei et al., 2007**). Comme les LB mémoires CD27⁺, les LB mémoires CD27⁻ prolifèrent à la suite d'une stimulation du TLR9 par CpG, mais elles se démarquent par l'absence d'expression de FcRH4, molécule immunorégulatrice homologue aux Fc récepteurs (**Wei et al., 2007**). Une étude de séquençage et de clonalité, réalisée en 2011 a déterminé que les LB mémoires DN peuvent devenir des LB SM et réciproquement, les LB mémoires CD27⁺ ont la capacité de perdre l'expression de CD27 (**Wu et al., 2011**). Toutefois, malgré de nombreuses similarités entre les LB mémoires CD27⁺ et CD27⁻, elles sont différenciées par leur répertoire CDR-H3 (« Complementarity-Determining Region-Heavy 3 »), à savoir une partie de la région variable de la chaîne lourde des Ig. Pour finir, il est important de noter que l'étiologie précise des LB mémoires DN reste à définir.

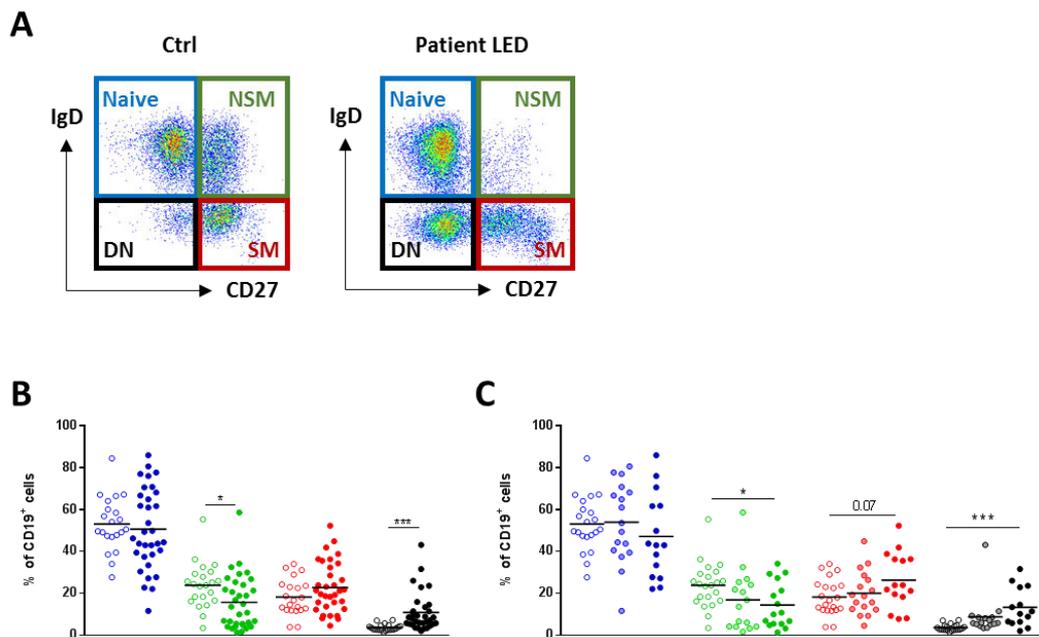


Figure 47. La distribution des sous-populations de LB périphériques est modifiée chez les patients lupiques par rapport aux individus.

A. Exemple de la distribution des sous-populations de LB d'individus sains et de patients lupiques analysé par cytométrie en flux. NSM = LB mémoires non-switchés, SM = LB mémoires switchés, DN = LB mémoires double négatifs. **B.** Comparaison de la fréquence des différentes sous-populations de LB d'individus sains (n=21, ronds vides) et de patients lupiques (n=32, ronds pleins) parmi les LB totaux. (* = p<0,05, *** = p<0,001, Mann-Whitney) **C.** Comparaison de la fréquence des différentes sous-populations de LB d'individus sains (n=21, ronds vides), de patients lupiques inactifs (n=17, ronds teintés) et de patients lupiques actifs (n=15, ronds pleins) parmi les LB totaux. (* = p<0,05, *** = p<0,001, One-Way ANOVA, Tukey comparison).

BTLA est un récepteur co-inhibiteur impliqué dans la régulation de l'activation et de la prolifération des LB. Il est intéressant de noter que l'expression de BTLA se retrouve fortement diminuée à la surface de cellules dont la fréquence est fortement augmentée chez les patients lupiques, à savoir les LB mémoires DN. Nous proposons que l'absence d'inhibition de la prolifération par BTLA représente une des hypothèses expliquant l'augmentation de la fréquence des LB mémoires DN chez les patients lupiques. Cette hypothèse est indirectement confirmée par l'analyse de corrélation qui démontre que le niveau d'expression de BTLA est le plus faible chez les patients où la fréquence des LB mémoires DN est la plus élevée ($p=0,0003$; $r = -0,73$) (Figure 48A). Comment expliquer la diminution de l'expression de BTLA à la surface de cette population ? Nous avons mis en évidence, spécifiquement à la surface de cette population, l'existence d'une population n'exprimant pas BTLA (Figure 48B). Cette population $BTLA^{neg}$ parmi les LB mémoires DN, dont la fréquence est faible chez les individus sains (6,5% en moyenne), est particulièrement retrouvée chez les patients lupiques (27,4%) (Figure 48C).

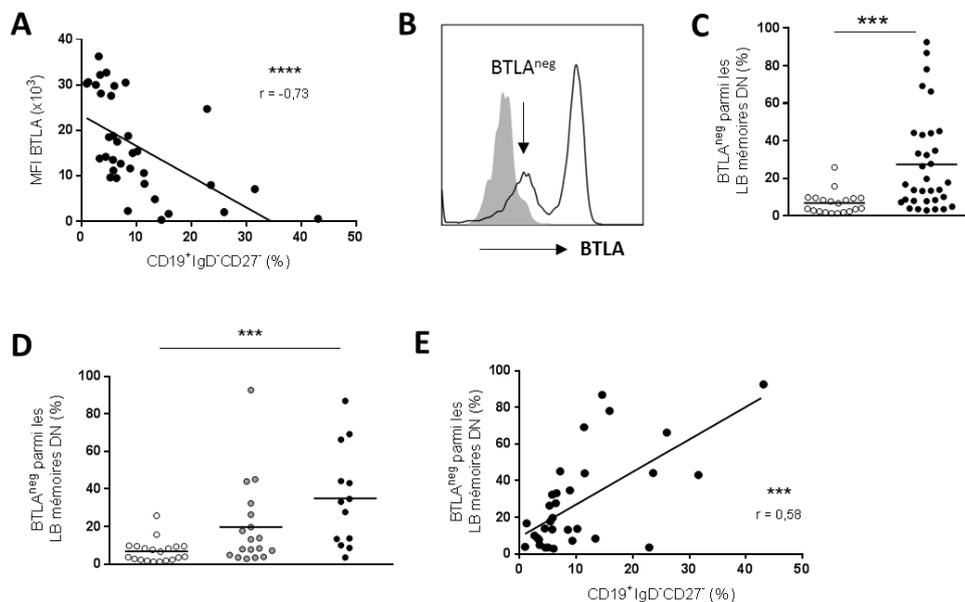


Figure 48. Description de la population $BTLA^{neg}$ parmi les LB mémoires DN de patients lupiques.

A. Corrélation du niveau d'expression de BTLA en fonction de la fréquence des LB mémoires DN de patients lupiques. **B.** Exemple d'identification de la population $BTLA^{neg}$ parmi les LB mémoires DN de patients lupiques par cytométrie en flux (pic gris = contrôle isotypique). **C.** Fréquence de la population $BTLA^{neg}$ parmi les LB mémoires DN d'individus sains (ronds blancs, $n=21$) et de patients lupiques (ronds noirs, $n=32$). **D.** Fréquence de la population $BTLA^{neg}$ parmi les LB mémoires DN d'individus sains (ronds blancs, $n=21$), de patients lupiques inactifs (ronds gris, $n=17$) et de patients lupiques actifs (ronds noirs, $n=15$). **E.** Corrélation de la fréquence de la population $BTLA^{neg}$ en fonction de la fréquence des LB mémoires DN de patients lupiques. (r = coefficient de corrélation de Spearman, Mann-Whitney ou One-Way ANOVA, Tukey comparison *** = $p<0,001$, **** = $p<0,0001$).

De plus, la fréquence des LB mémoires DN BTLA^{neg} est particulièrement élevée chez les patients présentant un lupus actif (35% pour les patients actifs vs. 19,7% pour les patients lupiques inactifs) (Figure 48D). Il est intéressant de noter que la fréquence de la population BTLA^{neg} est corrélée à la fréquence des LB mémoires DN ($p=0,0004$; $r = 0,58$) (Figure 48E). Ce résultat suggère que la perte de l'expression de BTLA à la surface de ces cellules pourrait favoriser leur prolifération.

Par la suite, nous avons évalué l'effet de cette absence d'expression sur les anomalies spécifiques des LB chez les patients lupiques. Nos résultats démontrent que le défaut d'expression de BTLA parmi les LB mémoires DN est particulièrement retrouvé chez les patients présentant des auto-Ac anti-ADN double brin circulants (25,2% pour les @-ADN⁻ vs. 37,3% pour les @-ADN⁺) (Figure 49A) et des protéines dans les urines (25,1% pour les protéinurie⁻ vs. 37% pour les protéinurie⁺) (Figure 49B).

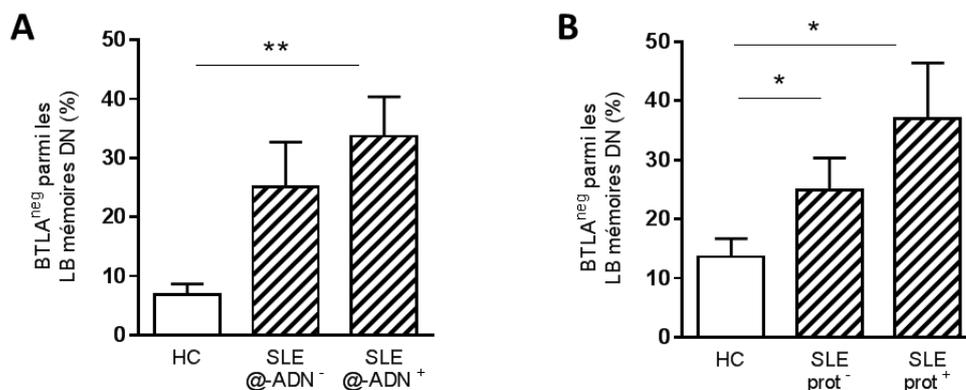


Figure 49. La population BTLA^{neg} parmi les LB mémoires DN est principalement retrouvée chez les patients lupiques présentant des anomalies liées aux LB.

A. Comparaison de la fréquence de la population BTLA^{neg} parmi les LB mémoires DN d'individus sains ($n=21$), de patients possédant ou non des Ac anti-ADN double brin circulants (@-ADN⁺, $n=14$; @ADN⁻, $n=15$). **B.** Comparaison de la fréquence de la population BTLA^{neg} parmi les LB mémoires DN d'individus sains ($n=21$), de patients présentant ou non des protéines dans les urines (protéinurie⁺, $n=6$; protéinurie⁻, $n=23$) (* = $p<0,05$, ** = $p<0,01$, One-Way ANOVA, Tukey comparison).

En résumé, nous avons mis en évidence la présence d'une population de LB n'exprimant pas BTLA chez les patients lupiques. Ces cellules BTLA^{neg} sont retrouvées parmi les LB mémoires DN, population dont la fréquence est augmentée chez les patients lupiques présentant une pathologie active. Ce défaut d'expression est présent principalement chez les patients présentant des anomalies liées aux LB telles que la présence d'auto-Ac circulants et le développement de protéinuries. Cette découverte soulève plusieurs interrogations.

La première question à laquelle nous souhaitons répondre concerne la régulation de BTLA. En effet, plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'absence d'expression de BTLA à la surface des LB mémoires DN. Un défaut génétique pourrait être à l'origine d'une mauvaise synthèse protéique de BTLA, se

traduisant par une diminution de l'expression de BTLA. Cependant, l'absence de BTLA semble spécifique à la population de LB mémoires DN, rendant cette hypothèse peu probable. Un défaut de régulation post-transcriptionnelle pourrait alors initier la perte d'expression de BTLA (*cf. Discussion*). Par ailleurs, au regard des résultats que nous avons obtenu dans les LT, nous avons émis l'hypothèse que l'absence d'expression de BTLA pourrait être liée à un défaut d'expression membranaire. Dans ce contexte, ce récepteur serait retenu dans des vésicules intracellulaires, et son transport jusqu'à la membrane serait altéré. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des marquages intracellulaires de BTLA parmi les sous-populations de LB, que nous avons analysés par cytométrie en flux. Ceci nous permet de comparer le niveau d'expression membranaire de BTLA (mBTLA) et le niveau d'expression total de BTLA (tBTLA, membranaire + intracellulaire). Les résultats préliminaires que nous avons obtenus décrivent que la population BTLA^{neg} parmi les LB mémoires DN est observée uniquement lors du marquage de surface, suggérant que BTLA est retrouvé dans des vésicules intracellulaires, et ne serait alors pas correctement adressé à la membrane (*Figure 50A*). Sur les 5 patients lupiques analysés jusqu'à présent, 3 patients présentent une population BTLA^{neg} parmi les LB mémoires DN (de 16% à 45%, moyenne = 18%). Après marquage intracellulaire, nous avons constaté que la population n'exprimant pas BTLA n'est plus observée (*Figure 50B*).

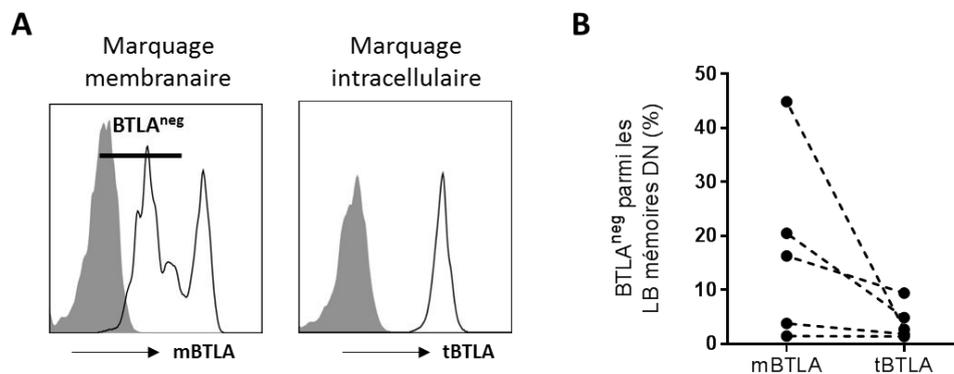


Figure 50. BTLA semble être retenu dans les compartiments intracellulaires des LB mémoires DN de patients lupiques.

A. Exemple de marquage membranaire (mBTLA) ou intracellulaire (tBTLA) de BTLA parmi les LB mémoires DN de patients lupiques, analysés par cytométrie en flux (gris = contrôle isotypique). **B.** Fréquence de la population BTLA^{neg} suite à un marquage membranaire ou intracellulaire parmi les LB mémoires DN.

Ces résultats préliminaires nous indiquent que BTLA pourrait être retenu dans des compartiments intracellulaires. La prochaine étape consistera à visualiser dans quel compartiment est retenu BTLA. De manière analogue aux LT, nous souhaitons analyser par microscopie confocale la localisation de BTLA au sein de différentes structures intracellulaires (appareil de Golgi, endosomes, lysosomes). Une meilleure compréhension du transport intracellulaire de BTLA nous permettra, à l'avenir, de confirmer que BTLA est retenu dans des compartiments intracellulaires parmi les LB mémoires DN purifiées de patients lupiques.

Pour résumer, notre étude a mis en évidence pour la première fois l'implication de BTLA dans le lupus chez l'homme. Cette étude confirme les données de la littérature signifiant l'implication d'une dérégulation des récepteurs co-inhibiteurs dans le développement de pathologies auto-immunes. De manière intéressante, chez des patients atteints de cancers où les voies de signalisation des récepteurs inhibiteurs sont bloquées, le développement de symptômes auto-immuns tels que des colites ou des thyroïdites correspond à des effets secondaires fréquemment observés (**Corsello et al., 2013; Ryder et al., 2014**).

Dans ce contexte, nos résultats démontrent que le récepteur co-inhibiteur BTLA joue un rôle important dans le contrôle de l'activation des LT CD4⁺ et que ses capacités inhibitrices sont réduites chez les patients lupiques. Ce défaut fonctionnel corrèle avec une augmentation des anomalies liées aux LB, telles que la protéinurie ou la production d'auto-Ac. De plus, nous avons observé des différences d'expression de BTLA à la surface des LB et des Tregs de patients lupiques. En effet, l'expression de BTLA est augmentée à la surface des LT CD4⁺ régulateurs de patients lupiques par rapport aux individus sains. Il sera intéressant de vérifier si l'augmentation de l'expression de BTLA à la surface contribue à la diminution des capacités régulatrices de ces cellules décrites chez les patients lupiques. Nous avons également décrit une absence d'expression de BTLA à la surface des LB mémoires DN de patients lupiques. Cette population, dont la fréquence est particulièrement élevée chez les patients lupiques à pathologie active, possède la capacité de produire des auto-Ac. Il sera nécessaire de comprendre les raisons de cette absence d'expression et, finalement de définir si ce phénomène a un impact sur l'activation des LB de patients lupiques ainsi que sur l'augmentation de la fréquence des LB mémoires DN (*Figure 51*). L'ensemble de ces résultats démontrent pour la première fois qu'un défaut d'expression ou de fonction de BTLA contribue à la pathogénèse du LED et conforte ce récepteur comme un acteur majeur du maintien de la tolérance périphérique chez l'Homme.

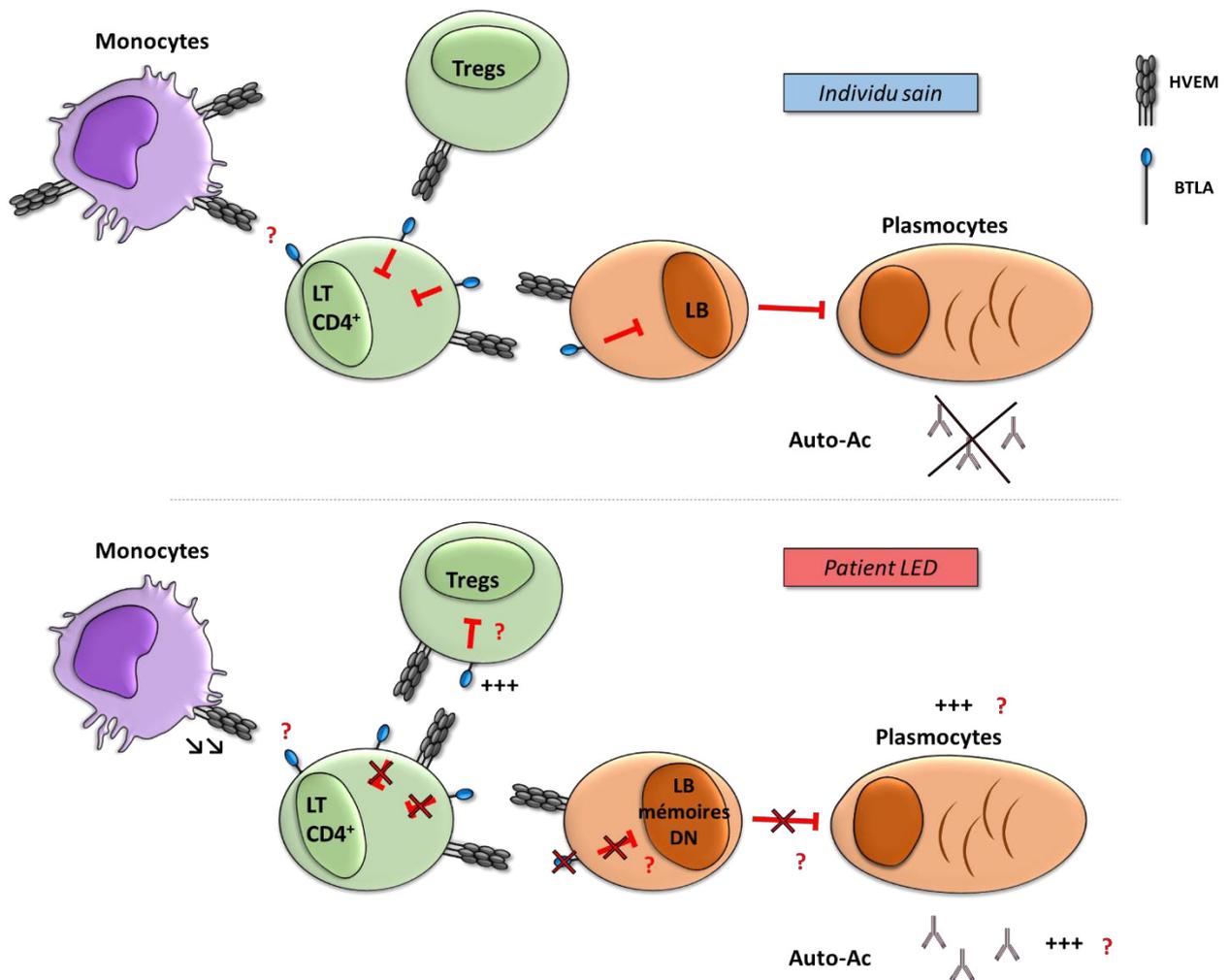


Figure 51. Modèle proposant l'implication de BTLA dans le contrôle de la réponse humorale chez les individus sains (en haut) et les patients lupiques (en bas).

BTLA est un récepteur co-inhibiteur régulant la prolifération et l'activation des lymphocytes T et B. Son engagement via son ligand, HVEM, apporte des signaux inhibiteurs contrôlant la maturation des LB et par conséquent, la production d'Ac. Chez les patients lupiques, la fonctionnalité de BTLA est altérée dans les LT CD4⁺, alors que son niveau d'expression est augmenté à la surface des Tregs. Ces phénomènes pourraient contribuer à l'hyperactivation des LT observée chez les patients atteints d'un LED. De plus, l'expression de BTLA est diminuée, voire perdue à la surface des LB mémoires DN. Cette diminution de l'expression de BTLA pourrait favoriser l'activation et la prolifération des LB auto-réactifs, et de ce fait, la production d'auto-Ac. Par ailleurs, il faudra déterminer l'importance de l'interaction entre HVEM à la surface des monocytes et BTLA à la surface des LT CD4⁺ pour définir les conséquences de la diminution de l'expression d'HVEM à la surface des monocytes de patients lupiques.

DISCUSSION

Les objectifs de ma thèse étaient d'étudier différents acteurs de la régulation de la réponse B dans le contexte d'une maladie auto-immune chez l'Homme, le LED. Cette pathologie est caractérisée par une production anormale d'auto-Ac, molécules produites suite à la différenciation des LB auto-réactifs en plasmocytes. Notre équipe s'intéresse aux mécanismes impliqués dans le développement et la régulation de maladies auto-immunes, principalement du LED. Au cours de mon travail, nous avons abordé deux différents aspects de cette régulation afin de comprendre les origines d'une réponse B anormale, responsable de la production d'auto-Ac. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la communication entre les LT et les LB. En effet, la différenciation des LB est un phénomène régulé par un ensemble d'acteurs, cellulaires et moléculaires, parmi lesquels sont retrouvées les cellules T. Parmi les populations de LT, les cellules T_{FH} régulent positivement la maturation des LB grâce à leur production d'IL-21 et par les nombreuses molécules de co-stimulation qu'elles expriment. Durant ma thèse, j'ai également eu l'opportunité d'étudier un autre mécanisme régulant, négativement cette fois-ci, le dialogue entre les LT et LB : le récepteur co-inhibiteur BTLA. L'engagement de la voie de signalisation de ce récepteur permet de contrôler la prolifération et l'activation lymphocytaire. Les données concernant son implication dans l'auto-immunité chez l'Homme sont limitées, son rôle dans le LED demeurant inconnu. Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis d'améliorer les connaissances sur les populations de cellules T_{FH} chez l'Homme et de mettre en évidence un défaut fonctionnel de BTLA dans les LT $CD4^+$ de patients lupiques.

Avant mon arrivée au laboratoire, notre équipe a mis en évidence l'existence d'une dérégulation de la distribution des sous-populations de cellules cT_{FH} chez l'Homme. En effet, chez les patients lupiques présentant une forte activité de la maladie, une diminution de la fréquence des cellules T_{FH1} ($CXCR3^+CCR6^-$) et une augmentation de la fréquence des T_{FH2} ($CXCR3^-CCR6^+$) a été décrite (**Le Coz et al., 2013**) (*Figure 52*). L'un des objectifs de ma thèse était d'une part, d'étudier les différences fonctionnelles et phénotypiques des trois sous-populations de cT_{FH} chez l'Homme, et d'autre part, de déterminer les causes de la contraction des cellules T_{FH1} au profit des T_{FH2} et T_{FH17} observée chez les patients atteints d'un LED. Notre hypothèse de départ, était que la sous population de cellules T_{FH1} contient les cellules régulatrices et que leur diminution corrèlerait avec une baisse des cellules T_{FR} . Cette hypothèse a été infirmée par l'étude du niveau d'expression de FoxP3 sur ces différentes sous-populations, ainsi que par l'analyse de leurs capacités inhibitrices. En effet, il semble que les cellules T_{FH} FoxP3⁺ chez l'Homme sont retrouvées principalement parmi les cellules T_{FH2} . Les expériences de co-cultures réalisées en présence de cellules T_{FH2} suggèrent que cette population présente des capacités suppressives, bien que l'inhibition observée ne soit pas optimale, en comparaison aux Tregs conventionnelles. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que seules 5 à 10% de ces cellules T_{FH2} expriment FoxP3. Il est intéressant de noter qu'une étude réalisée à l'aide de la technique de

cytométrie de masse, a récemment mis en évidence que les cellules Tregs et T_{H2} partagent un nombre important de marqueurs phénotypiques alors que ce n'est pas le cas entre les Tregs et les T_{H1} ou T_{H17} (**Kunicki et al., 2018**). Nos résultats semblent cohérents avec les conclusions de cette étude, car nous décrivons qu'au sein de la population de cellules T_{FH2} (présentant de nombreuses similarités avec les T_{H2}), sont retrouvées les cellules T_{FR}. Afin de caractériser au mieux le phénotype des cT_{FH} humaines, il serait intéressant à l'avenir, de réaliser une analyse transcriptomique complète et comparative de ces trois sous-populations. Cette analyse permettrait de mettre en évidence les divergences et les similitudes entre ces sous-populations, ce qui pourrait améliorer la caractérisation et la compréhension du rôle de ces différents acteurs cellulaires.

Au regard du rôle important des Tregs et des T_{FR} dans la régulation du LED (*cf. Introduction partie B.*), notre hypothèse initiale, proposant que les T_{FR} sont retrouvées parmi la sous-population de cellules T_{FH1}, semblait logique dans le contexte du LED. En effet, dans cette pathologie où une régulation altérée de la réponse immunitaire est observée, nous pouvions nous attendre à une diminution de la fréquence de cellules régulatrices telles que les T_{FR}. Récemment, il a été mis en évidence, contrairement à ce que l'on aurait pu supposer, une augmentation des cellules CXCR5⁺FoxP3⁺ circulantes chez les patients lupiques par rapport aux individus contrôles (**Liu et al., 2018**). Cette étude semble finalement, appuyer nos observations définissant la population de cellules T_{FR} parmi les cellules T_{FH2}, sous-population dont la fréquence est augmentée chez les patients lupiques (**Le Coz et al., 2013**). Par ailleurs, il est également possible que la diminution de la fréquence des cellules T_{FH1} chez les patients atteints d'un lupus sévère soit le résultat d'une augmentation de la fréquence des cellules T_{FH2} en périphérie. En effet, les analyses que nous avons réalisées correspondent à l'étude de la fréquence des différentes sous-populations de cT_{FH} parmi les cT_{FH} totales mais ne tiennent pas compte du nombre absolu de cellules. La question que nous pouvons nous poser consiste à déterminer l'origine d'une augmentation de la fréquence des cellules T_{FH2} en périphérie. Les facteurs à l'origine de la polarisation des LT CD4⁺ naïfs en T_{FH1} ou T_{FH2} demeurent inconnus à l'heure actuelle. L'hypothèse d'un environnement cytokinique et/ou moléculaire favorisant le déséquilibre de la balance T_{FH2}-17/T_{FH1} observée dans un contexte lupique est attrayante. En effet, il a déjà été démontré que la signalisation entre OX40L et OX40 induit la différenciation de LT CD4⁺ naïfs en cellules mémoires présentant des marqueurs phénotypique des T_{FH} et ces cellules présentent la capacité d'aider les LB à se différencier. De plus, il a été décrit que les niveaux d'OX40L dans le sang et dans les tissus inflammés sont élevés à la surface des CPA myéloïdes (mais pas des LB) chez les patients lupiques (**Jacquemin et al., 2015**). C'est pourquoi, il serait intéressant d'évaluer le rôle de la voie OX40/OX40L dans la polarisation des cT_{FH} chez l'Homme. Par ailleurs, il est possible que certaines cytokines influencent la polarisation des cT_{FH} en T_{FH2}. Parmi elles, l'IL-6 représente un des acteurs pouvant être impliqué dans ce mécanisme.

En effet, dans la PR, il a été décrit que l'IL-6 produite par les plasmocytes favorise la différenciation des LT CD4⁺ en T_{FH} (**Chavele et al., 2015**). De plus, le ciblage spécifique du récepteur à l'IL-6, à l'aide du Tocilizumab, réduit considérablement le nombre de cT_{FH} chez les patients atteints d'une PR. De manière intéressante, l'administration de ce traitement diminue également la fréquence des LB mémoires DN chez ces patients *in vivo* (**Mahmood et al., 2015; Moura et al., 2017**). Or, dans notre équipe, nous avons démontré que la fréquence des T_{FH2} et la fréquence des LB mémoires DN sont positivement corrélées chez les patients lupiques (**Le Coz et al., 2013**). Au regard de ces données, nous pouvons émettre l'hypothèse que les LB mémoires DN favorisent la polarisation des cT_{FH} en T_{FH2}, potentiellement par l'intermédiaire de leur production d'IL-6. Il sera intéressant d'évaluer la production d'IL-6 par les LB mémoires DN, et leur potentielle capacité à favoriser la polarisation en cellules T_{FH2}. Par ailleurs, plusieurs autres cytokines sont connues pour favoriser la mise en place d'un contexte T_{H2}. Parmi elles sont retrouvées l'IL-4, l'IL-33, l'IL-25 ou TSLP (« Thymic Stromal Lymphopoietin »). De manière intéressante, TSLP a récemment été décrit comme un régulateur clé de l'initiation de la réponse T_{H2}. En effet, la production de cette cytokine par les kératinocytes induit l'expression d'Ox40L par les DCs, et de ce fait induit la différenciation des LT CD4⁺ naïfs en cellules T CD4⁺ produisant de l'IL-4 (**Leyva-Castillo et al., 2013**). Alors que l'implication de TSLP dans certaines pathologies inflammatoires telles que la dermatite atopique ou les allergies a été clairement établie, son rôle dans le LED reste à déterminer. Nous pouvons imaginer qu'une augmentation de la production de TSLP pourrait favoriser l'expression d'Ox40L par les CPA et favoriser ainsi la polarisation des cT_{FH} en T_{FH2}. La compréhension du rôle de la sous-population T_{FH2} dans le lupus représente un challenge intéressant. En effet, Morita *et al.* ont démontré que les T_{FH2} sont plus efficaces que les T_{FH17} pour aider les LB mémoires à produire des Ig, alors que les deux sous-populations sont capables d'induire les LB naïfs à produire des taux comparables d'IgG (**Morita et al., 2011**). Comme il a été démontré que la fréquence et l'activation des LB mémoires sont élevées chez les patients lupiques, nous suggérons que les cellules B mémoires (dont les LB mémoires DN) pourraient être capables de se différencier rapidement en cellules productrices d'auto-Ac en présence de T_{FH2}.

Par ailleurs, nous avons suggéré que la diminution de la fréquence des T_{FH1} pourrait être la conséquence d'une migration de ces cellules vers les zones d'inflammation. En effet, le récepteur CXCR3 permet l'attraction de ces cellules vers des tissus où sont exprimées les chimiokines CXCL9, 10 et 11, chimiokines pro-inflammatoires (**Lacotte et al., 2009**). Bien que dans les modèles murins, les récepteurs CXCR3 et CCR6 ne permettent pas d'identifier fonctionnellement les mêmes sous-populations de T_{FH} que chez l'Homme (*Chapitre I*), nous avons mis en évidence que les cellules T_{FH} retrouvées dans les reins de souris lupiques NZB/W malades expriment majoritairement le récepteur CXCR3.

Ces résultats obtenus dans un modèle de souris lupique pourraient être complétés par l'analyse des cellules T_{FH} présentes dans des biopsies rénales de patients lupiques. L'identification de ces cellules par microscopie pourrait permettre de déterminer si elles expriment CXCR3, comme cela semble être le cas pour les T_{FH} infiltrant les reins des souris lupiques NZB/W. Bien que ces prélèvements soient peu évidents à obtenir, il serait intéressant d'établir, s'il existe chez l'Homme, une corrélation entre la distribution des sous-populations de T_{FH} en périphérie et dans les reins. Cette analyse pourrait nous permettre de mettre en évidence une potentielle diminution des T_{FH} CXCR3⁺ en périphérie associée à une augmentation de la fréquence de ces cellules dans les reins. Toutefois la difficulté d'obtenir des biopsies rénales nous motive à utiliser le modèle murin pour répondre à cette question. Dans un premier temps, il serait intéressant de transférer des cellules T exprimant CXCR3 en périphérie dans des souris lupiques et d'observer leur migration ou non vers les zones d'inflammation. Dans un second temps, il a été démontré que des souris MRL^{lpr/lpr} déficientes pour CXCR3 présentent une diminution de l'infiltration lymphocytaire dans les reins, ce qui réduit le développement de néphrites et la protéinurie (**Steinmetz et al., 2009**). Ces données appuient notre hypothèse définissant les T_{FH1} comme des cellules pathogènes, et suggèrent qu'elles présentent la capacité de migrer vers les organes présentant une inflammation, expliquant ainsi la diminution de la fréquence de ces cellules observées en périphérie chez les patients lupiques (*Figure 52*). De plus, cette étude suggère un potentiel intérêt thérapeutique du ciblage de CXCR3 afin de réduire l'infiltration de cellules immunitaires pro-inflammatoires au sein de tissus tels que le rein. Le rôle de CXCR3 dans les modèles murins de lupus fait l'objet d'un projet de thèse au sein de notre équipe (**Thèse de R. Veber**). Le ciblage de CXCR3 chez l'Homme pourrait être une stratégie envisageable, afin de réduire l'inflammation tissulaire observée chez les patients lupiques. Cependant, il faudra déterminer si la suppression des cellules CXCR3⁺ (dont les T_{FH1}), ne favorise pas l'expansion des T_{FH2} et T_{FH17} , cellules favorisant la différenciation et la maturation des LB. Si tel est le cas, une stratégie visant à empêcher la migration de ces cellules depuis la périphérie vers les organes inflammés, en inhibant les différentes chimiokines inflammatoires, pourrait s'avérer plus pertinente.

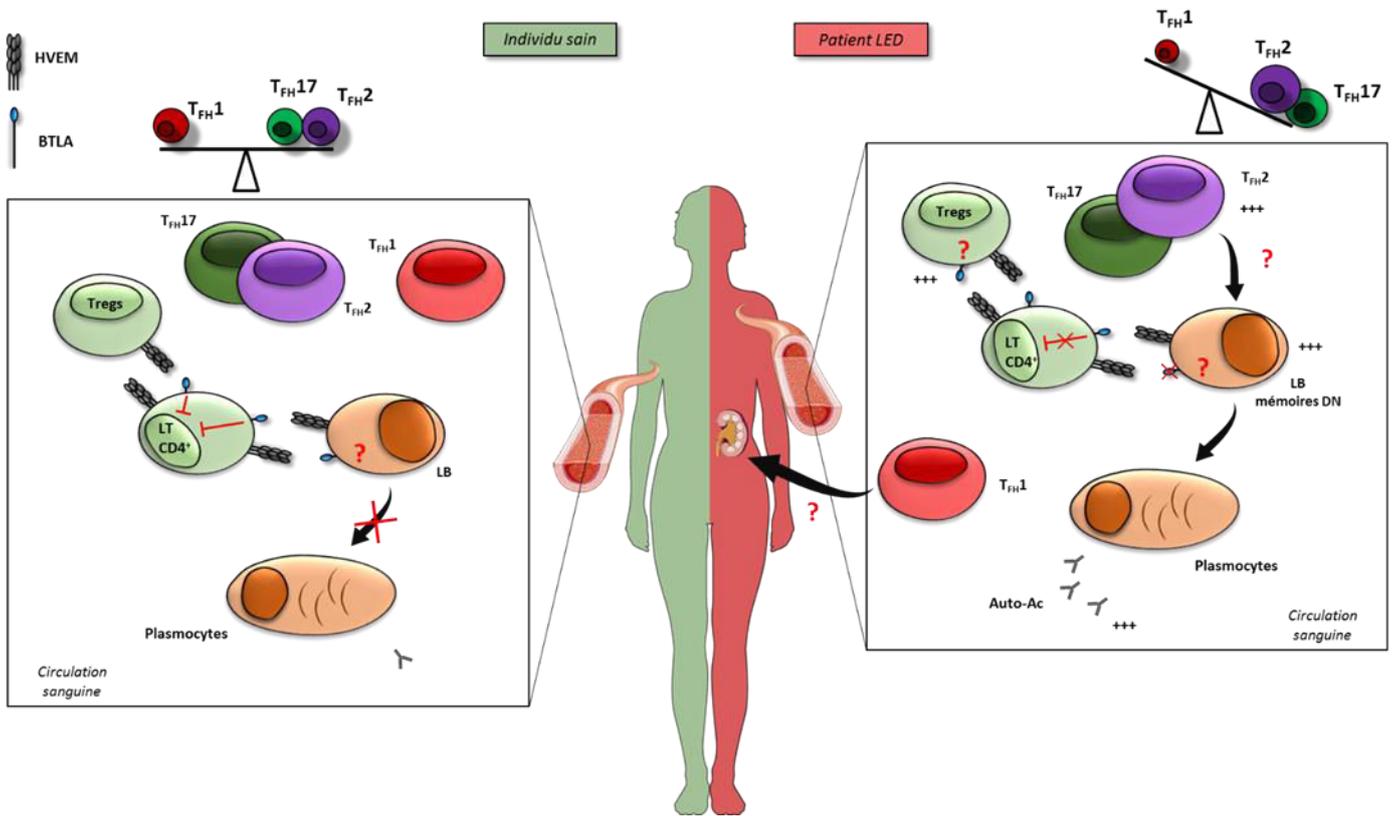


Figure 52. La régulation cellulaire et moléculaire de la réponse B chez les individus sains et les patients lupiques.

Schéma récapitulatif des résultats obtenus au cours de notre étude. Chez l'individu sain, l'engagement du récepteur co-inhibiteur BTLA à la surface des LT CD4⁺ permet une inhibition de la prolifération et de l'activation de ces cellules par celles exprimant HVEM (Tregs, LB). Ce contrôle permet de réguler les interactions entre LT et LB, régulant ainsi également la production d'Ac. Les cellules T_{FH} représentent d'autres acteurs de la régulation de la réponse humorale. Il existe une balance entre T_{FH1} exprimant CXCR3 et T_{FH2}-17 ne l'exprimant pas, en périphérie chez les individus sains. Parmi les T_{FH2} sont retrouvées une proportion de cellules possédant des capacités suppressives et correspondant potentiellement à des T_{FR}. Chez les patients lupiques, nous avons mis en évidence un défaut fonctionnel de BTLA sur les LT CD4⁺, se traduisant par une altération de ses capacités inhibitrices. De plus, l'expression de BTLA est modifiée à la surface des Tregs et des LB mémoires DN (respectivement augmentée et diminuée) de patients atteints d'un LED. L'ensemble de ces données suggèrent que BTLA participe au désordre immunologique observé chez les patients lupiques. Par ailleurs, nous avons observé une diminution de la fréquence des T_{FH1} au profit des T_{FH2} chez les patients. Cette contraction des T_{FH1} pourrait être le reflet d'une migration de ces cellules vers les organes présentant une inflammation tels que les reins.

La majeure partie de ma thèse a consisté à déterminer le rôle du récepteur co-inhibiteur BTLA dans le LED chez l'Homme. Une étude phénotypique et fonctionnelle de BTLA a permis de mettre en évidence, dans les LT CD4⁺ de patients lupiques, une capacité réduite de ce récepteur à inhiber la prolifération et l'activation cellulaire. Ce défaut fonctionnel est plus prononcé chez les patients lupiques présentant un score d'activité de la maladie élevé et se retrouve corrélé à une augmentation des anomalies liées aux LB telles que l'insuffisance rénale ou la production d'auto-Ac (*Figure 52*). De plus, nous avons démontré qu'en normalisant le métabolisme lipidique des LT CD4⁺ de patients, nous restaurons la fonctionnalité de ce récepteur en rétablissant sa capacité à dissocier les radeaux lipidiques. La capacité de BTLA à réguler la formation des microdomaines membranaires lipidiques, qui était jusqu'alors inconnue, suggère que le transport intracellulaire et membranaire de BTLA et des glycosphingolipides agissent en synergie pour réguler l'activité du TCR à la suite d'une stimulation spécifique de ce récepteur. En effet, il semble qu'un défaut de trafic intracellulaire de BTLA dans les LT CD4⁺ de certains patients lupiques, contribue au défaut fonctionnel de ce récepteur, ce qui se traduit par une rétention de BTLA dans des compartiments intracellulaires après activation (*Chapitre II*). Par ailleurs, nous avons mis en évidence un défaut d'expression de BTLA au sein des LB mémoires DN de patients lupiques, cellules dans lesquelles BTLA semble à nouveau être retenu dans des vésicules intracellulaires. A l'heure actuelle, la localisation précise de BTLA à l'intérieur des compartiments intracellulaires des LT et LB n'est pas connue chez l'Homme, et il sera nécessaire de déterminer ce point par microscopie confocale dans ces cellules, avant activation. Par la suite, nous souhaitons analyser le trafic de BTLA depuis ces compartiments vers la membrane à la suite d'une activation du récepteur spécifique, TCR ou BCR. En condition physiologique, une activation des LT via le TCR permet le transport de nombreuses molécules clés pour la transduction du signal du TCR, telles que LAT ou Lck, depuis l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane (**Lou et al., 2016**). Le trafic intracellulaire de BTLA à la suite d'une activation n'est pour l'instant pas clairement défini. Dans des lignées de cellules murines, il a été décrit que BTLA se retrouve au niveau de la membrane et dans l'appareil de Golgi lorsque la cellule est au repos. A la suite d'une activation des LT, BTLA est rapidement adressé à la synapse immunologique et colocalise avec le TCR et les radeaux lipidiques (**Owada et al., 2010**). Par ailleurs, CTLA-4, récepteur analogue à BTLA se retrouve transporté au TCR, grâce à son interaction avec une molécule chaperonne appelée TRIM (« T cell Receptor Interacting Molecule ») (**Rudd et al., 2009; Schneider and Rudd, 2014**). Il sera intéressant de déterminer si le trafic de BTLA est assuré par des molécules chaperonnes, via des interactions avec les lipides ou par un autre mécanisme. Pour cela, nous souhaitons identifier les partenaires protéiques de BTLA par une étude d'interactome dans le but de déterminer les molécules impliquées dans son trafic intracellulaire. Le défaut d'expression membranaire de BTLA a été observé dans les LT CD4⁺ de patients lupiques après activation mais également parmi les LB mémoires DN. Les causes de ce défaut observé spécifiquement dans une sous-population de LB demeurent inconnues.

Est-ce lié à un défaut d'association de BTLA avec une protéine chaperonne ou bien à un état d'activation trop important au sein de ces cellules ? En effet, nous pouvons imaginer qu'un état d'activation trop élevé pourrait perturber le trafic intracellulaire de BTLA et réduire son niveau d'expression membranaire. Nos premiers résultats semblent indiquer que les LB mémoires DN BTLA^{neg} expriment fortement Fas, considéré comme un marqueur d'activation des LB, par rapport aux LB mémoires DN BTLA⁺ (*résultats non montrés*). Il sera intéressant de confirmer ces résultats puis de déterminer si l'état d'activation de ces cellules est une cause ou une conséquence du défaut d'expression membranaire de BTLA. En parallèle de ces analyses phénotypiques, nous souhaitons étudier la fonctionnalité de BTLA sur les LB de patients lupiques. Actuellement, une étudiante en Master 2 dans notre équipe établit les conditions optimales pour cette étude fonctionnelle qui permettra de déterminer si comme pour les LT CD4⁺, un défaut fonctionnel de BTLA sur les LB contribue à l'activation anormale de ces cellules chez l'Homme.

Lors de ma thèse, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de BTLA à la surface des Tregs de patients lupiques par rapport aux individus contrôles. Afin d'évaluer les conséquences de cette augmentation, nous souhaitons dans un premier temps définir le rôle des interactions entre HVEM et BTLA sur la fonctionnalité des Tregs chez l'Homme. En effet, chez l'individu sain, le niveau d'expression de BTLA à la surface des Tregs est faible, suggérant que son rôle inhibiteur est limité sur ces cellules, comme cela est décrit chez la souris (**Tao et al., 2008**). Le rôle précis de BTLA à la surface des Tregs chez l'Homme devra, dans un premier temps, être caractérisé afin de déterminer, par la suite, si une expression aberrante de BTLA sur ces cellules pourrait affecter leurs capacités suppressives ou leur nombre chez les patients lupiques. La réalisation de tests de suppression en inhibant ou non la voie BTLA/HVEM pourrait nous permettre de préciser le rôle de ces récepteurs dans la fonction des Tregs chez l'Homme.

L'ensemble des résultats obtenus concernant l'expression et la fonctionnalité de BTLA sur les LT, les LB et les Tregs soulèvent la question de la régulation de BTLA. En effet, grâce à ses capacités inhibitrices, le niveau d'expression de ce récepteur semble critique dans le contrôle de la réponse immunitaire. Cependant, les facteurs régulant l'expression de BTLA demeurent relativement peu décrits. Nous envisageons d'étudier certaines pistes telles que la régulation transcriptionnelle, la production de cytokines ou bien l'expression du ligand de BTLA, HVEM.

Dans un premier temps, nous suggérons que la régulation de BTLA peut s'opérer à un niveau transcriptionnel. En effet, une modification épigénétique ou une régulation par des microARNs pourraient contrôler l'expression de BTLA. Chez l'Homme, les microARNs ciblant BTLA n'ont, à l'heure actuelle pas été décrit. En croisant les résultats obtenus à l'aide de plusieurs logiciels de prédiction

différents (DIANAmT, miRanda, miRDB, miRWal, RNAhybrid, Targetscan, SUM), nous avons identifié plusieurs microARNs susceptibles de cibler BTLA. Dans un premier temps, nous souhaitons valider les prédictions informatiques par un test biologique utilisant le gène rapporteur luciférase. La luciférase est communément utilisée comme gène rapporteur afin de mesurer une activité transcriptionnelle. Récemment, ce test a été adapté afin d'évaluer la régulation post-transcriptionnelle de certains gènes par les microARNs. Une fois que nous aurons identifié un ou plusieurs microARNs ciblant BTLA chez l'Homme, nous souhaitons évaluer les niveaux d'expression de ces derniers dans les cellules lupiques par rapport aux cellules provenant d'individus sains. Dans le cas où nous observerions une différence, la modulation de leur expression pourrait permettre d'influencer indirectement l'expression de BTLA dans les populations lymphocytaires concernées. En effet, le ciblage spécifique des microARNs qui régule l'expression de BTLA (en utilisant des inhibiteurs ou des mimiques) nous permettra de vérifier si les défauts fonctionnels de BTLA sont associés à un défaut d'expression et/ou de régulation. Par exemple, chez la souris, il a été démontré que miR-155 cible BTLA et régule son expression dans les LT CD4⁺ après activation (**Liu et al., 2016**). Il est intéressant de noter qu'une délétion de miR-155 réduit la production d'auto-Ac chez des souris lupiques Fas^{lpr}, empêchant le développement des symptômes lupiques (**Thai et al., 2013**). De manière intéressante, 5 sites de prédiction informatique sur 6 ont proposé que la séquence de miR-155 peut interagir avec BTLA chez l'Homme. Si nous confirmons ces analyses bio-informatiques, il sera intéressant d'évaluer les niveaux d'expression de ce microARN dans différentes populations cellulaires de patients lupiques, car une expression anormalement élevée de miR-155 dans les LB mémoires DN ou dans les LT CD4⁺ activés de patients lupiques pourrait inhiber la synthèse de BTLA et diminuer son expression protéique. De plus, la comparaison du profil des microARNs dans les LB révèle un profil distinct entre les patients lupiques et les individus sains. Dans la même étude, il a été décrit qu'un profil spécifique de microARNs est retrouvé dans les cellules B CD27⁻ et CD27⁺ de patients lupiques (**Duroux-Richard et al., 2015**). Pour déterminer si la régulation transcriptionnelle de BTLA se retrouve à l'origine du défaut d'expression observé chez les patients lupiques, nous souhaitons, dans un premier temps, isoler les populations de LB mémoires DN d'individus sains et de patients, afin d'évaluer le niveau d'expression de l'ARNm de BTLA.

Par ailleurs, il a été démontré que la production d'IFN- α par les pDCs réduit le niveau d'expression de BTLA sur les LT CD4⁺, diminuant ainsi ses capacités inhibitrices (**Zhang et al., 2011**). Ce résultat est intéressant car la production d'IFN- α par les pDCs est considérée comme un des phénomènes les plus importants dans la pathogénèse du LED (*cf. Introduction partie A.*). Nous souhaitons, en premier lieu, établir, s'il existe, une corrélation entre les niveaux de production d'IFN- α et l'expression de BTLA chez les patients lupiques, puis définir si l'inhibition de la production d'IFN- α peut nous permettre d'améliorer l'expression ou la fonctionnalité de BTLA sur les cellules de patients. Enfin, il sera

intéressant d'évaluer le niveau d'expression de BTLA chez des patients traités avec de l'HCQ, drogue connue pour inhiber la production d'IFN- α par les pDCs.

Enfin, il a été démontré que l'expression de BTLA est régulée par les interactions avec son ligand HVEM. En effet, une activation des LT CD8⁺ par des cellules exprimant HVEM réduit le niveau d'expression de BTLA par ces cellules T. A l'inverse, l'absence d'HVEM favorise l'augmentation de l'expression de BTLA sur des temps de culture plus long (**Derré et al., 2010**). De plus, il a été démontré dans des lignées de cellules murines que l'expression d'HVEM par des CPA est nécessaire à la présence de BTLA dans les radeaux lipidiques de LT CD4⁺. Nous souhaitons compléter nos analyses phénotypiques en étudiant le niveau d'expression d'HVEM sur différentes populations cellulaires de patients lupiques (LT, LB, monocytes) afin de définir si le défaut d'expression de BTLA observé chez les patients est associé à une expression aberrante d'HVEM. De manière intéressante, nous avons mis en évidence une diminution de l'expression d'HVEM à la surface des monocytes de patients lupiques par rapport aux individus contrôles. Bien qu'aucune étude n'ait pour l'instant décrit les conséquences de l'interaction entre HVEM sur les monocytes et BTLA sur les LT, nous pouvons supposer que cette diminution peut avoir une influence sur l'expression de BTLA par les LT. C'est pourquoi, il serait intéressant de réaliser des co-cultures entre monocytes et LT en bloquant ou non la voie HVEM/BTLA. Par ailleurs, il a été démontré que les taux de la forme soluble d'HVEM (sHVEM) sont augmentés dans le sérum de patients présentant des pathologies inflammatoires, notamment chez les patients lupiques (**Jung et al., 2003**). Bien que les effets de sHVEM sur l'expression de BTLA ne soit pas connus à l'heure actuelle, nous souhaitons évaluer les niveaux de sHVEM chez les patients lupiques et déterminer si une augmentation de sHVEM peut contribuer à un des défauts d'expression de BTLA que nous avons mis en évidence.

L'ensemble de ces données suggèrent que la compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression de BTLA représente une perspective importante pour la poursuite de ce projet. En effet, une bonne connaissance de ces mécanismes pourrait nous permettre de moduler l'expression de BTLA de manière plus précise, en limitant au maximum les effets secondaires qu'une surexpression ou une inhibition de BTLA pourrait entraîner.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse concernant le rôle de BTLA dans le LED soulignent un potentiel thérapeutique intéressant du ciblage de BTLA. En effet, engager la voie de signalisation de BTLA à l'aide d'Ac agoniste pourrait réduire l'activation lymphocytaire et de ce fait avoir des conséquences sur la production d'auto-Ac. Cependant, l'utilisation d'un tel traitement soulève certaines interrogations. Nous avons mis en évidence un défaut d'expression de BTLA sur les LT CD4⁺ après activation. L'engagement de BTLA à l'aide d'un Ac agoniste ciblant un récepteur non-fonctionnel n'aurait alors, dans ce contexte, aucun sens. Cependant, nous avons également démontré qu'un

traitement visant à normaliser le métabolisme lipidique dans ces cellules permet de restaurer la fonctionnalité de BTLA. Dans une perspective thérapeutique, nous pouvons imaginer une stratégie en deux étapes : restaurer un métabolisme lipidique « normal » dans un premier temps, puis induire la signalisation de BTLA à l'aide d'Ac agoniste dans un second temps.

BTLA est un récepteur exprimé sur un grand nombre de cellules. Cependant, son expression est réduite à la surface des Tregs en condition physiologique. En ce sens, il a été décrit que l'utilisation d'Ac agoniste anti-BTLA favorise la génération de Tregs car les LT effecteurs sont plus sensibles à ce traitement (**Uchiyama et al., 2014**). Chez les patients lupiques, nous avons démontré que l'expression de BTLA est augmentée à la surface des Tregs. Cela soulève un problème pour l'utilisation d'Ac agoniste anti-BTLA, qui pourrait potentiellement inhiber la fonctionnalité des Tregs de patients. Afin de s'affranchir d'une éventuelle inhibition des Tregs dépendante de BTLA, il serait intéressant d'engager spécifiquement la voie de signalisation de BTLA sur certains types cellulaires. Récemment, Boice *et al.* ont démontré que l'utilisation de cellules T possédant un récepteur chimérique (« CAR-T cells ») permet d'induire l'expression de la forme soluble HVEM localement et spécifiquement à certains types cellulaires (**Boice et al., 2016**). L'utilisation d'une telle stratégie pourrait permettre d'induire spécifiquement la voie de signalisation de BTLA sur les LT CD4⁺ activés dans le cadre du LED, afin de contrôler plus précisément l'activation lymphocytaire sans la supprimer.

Les possibilités thérapeutiques du ciblage de BTLA devront, dans un premier temps, être évaluées dans des modèles murins. Pour ce faire, au laboratoire, nous avons accès à des modèles de souris lupiques tels que la souris NZB/W ou la souris MRL^{lpr/lpr}. A l'heure actuelle, bien qu'il ait été décrit un rôle protecteur de BTLA dans un modèle de souris lupique déficiente pour BTLA (**Oya et al., 2011**), aucune étude n'a évalué l'expression et la fonction de ce récepteur chez la souris NZB/W ou MRL^{lpr/lpr}. Dans un premier temps, le travail consistera à réaliser une analyse phénotype complète ainsi qu'une étude fonctionnelle sur les différentes populations de LT CD4⁺, LB, etc... Si nous mettons en évidence un défaut fonctionnel de BTLA dans des modèles de souris lupiques, nous tenterons dans un second temps de restaurer sa fonctionnalité et d'améliorer les symptômes de la maladie en administrant *in vivo*, un Ac agoniste anti-BTLA. De manière intéressante, il a été décrit chez la souris MRL^{lpr/lpr} que les radeaux lipidiques sont pré-aggrégés, et que les TCR sont pré-clusterisés, comme ce qui a été décrit pour les LT CD4⁺ de patients lupiques (**Deng and Tsokos, 2008**). Ce modèle murin de lupus pourrait nous permettre d'analyser les effets de la thérapie en deux étapes suggérée précédemment. Par ailleurs, l'utilisation des modèles murins pourrait nous permettre d'évaluer le rôle précis de BTLA dans certains types cellulaires. En effet, nous pouvons envisager d'inactiver le gène de BTLA dans diverses sous-populations (LB, Tregs) afin de déterminer, *in vivo*, les effets d'un défaut d'expression de BTLA sur ces cellules. Un croisement entre une souris BTLA^{fl/fl} et des souris exprimant la Cre-recombinase sous le

contrôle de différents promoteurs spécifiques (Lck pour une délétion de BTLA dans les LT, FoxP3 pour les Tregs ou Mb-1 pour les LB) permettrait de supprimer l'expression de ce récepteur spécifiquement dans une population cellulaire et donc, d'évaluer sa fonction. Au laboratoire, nous disposons de différents modèles de souris telles que les souris Lck-cre et Mb-1-cre alors qu'une lignée de souris BTLA^{fl/fl} peut être acquise chez certains fournisseurs tels que « Jackson Laboratory ». Ces expériences de délétion conditionnelle pourraient nous permettre de définir le rôle précis de BTLA et de son ligand HVEM sur la fonction des Tregs, par exemple. Enfin, un nouveau modèle murin de lupus a été décrit récemment. Dans ce modèle, une injection de pristane à des souris immunodéficientes reconstituées avec des cellules immunitaires humaines permet de reproduire un nombre important de symptômes immunologiques et cliniques de la pathologie lupique humaine. De manière intéressante, une expansion des LB mémoires DN est observée en périphérie dans ce modèle de souris humanisées (**Gunawan et al., 2017**). Il serait intéressant d'analyser le niveau d'expression de BTLA dans ce modèle et particulièrement dans les LB mémoires DN. Ces souris humanisées présentent plusieurs avantages. Elles pourraient permettre de réaliser une étude plus approfondie des LB mémoires dans un premier temps. En effet, les marqueurs utilisés pour définir les LB mémoires chez l'Homme ne sont pas transposables aux modèles murins. De ce fait, il est impossible chez la souris d'identifier la population de LB mémoires DN. De plus, dans ce modèle, le développement d'un nombre important de symptômes cliniques observés chez l'Homme est médiée par un système immunitaire humain. Nous suggérons que l'utilisation d'un Ac agoniste anti-BTLA dans ce modèle pourrait réduire les symptômes lupiques dans ces souris. Jusqu'à présent, quelques Ac monoclonaux agonistes ciblant BTLA sont disponibles chez la souris (clones 3C10, BYK.1 et 6A6), mais l'utilisation de ce modèle humanisé nous permettrait de réaliser des études *in vivo* en administrant l'Ac agoniste que nous avons utilisé pour l'ensemble de nos études fonctionnelles chez l'Homme (clone MIH26).

Pour conclure, au cours de ma thèse, nous avons eu l'opportunité d'améliorer les connaissances concernant l'altération de la régulation de la réponse immunitaire observée chez les patients lupiques ([Figure 52](#)). La mise en évidence de l'implication du récepteur co-inhibiteur BTLA dans le LED chez l'Homme ouvre de nouvelles perspectives concernant sa régulation, sa fonction et son potentiel thérapeutique. De plus, la meilleure caractérisation des populations de cT_{FH} pourrait offrir de nouvelles pistes afin de réduire l'inflammation et les lésions observées dans certains tissus chez les patients lupiques.

BIBLIOGRAPHIE

Absher, D.M., Li, X., Waite, L.L., Gibson, A., Roberts, K., Edberg, J., Chatham, W.W., and Kimberly, R.P. (2013). Genome-wide DNA methylation analysis of systemic lupus erythematosus reveals persistent hypomethylation of interferon genes and compositional changes to CD4+ T-cell populations. *PLoS Genet.* 9, e1003678.

Acuto, O., and Michel, F. (2003). CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 939.

Agrawal, S., Marquet, J., Freeman, G.J., Tawab, A., Bouteiller, P.L., Roth, P., Bolton, W., Ogg, G., Boumsell, L., and Bensussan, A. (1999). Cutting edge: MHC class I triggering by a novel cell surface ligand costimulates proliferation of activated human T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 1223–1226.

Albring, J.C., Sandau, M.M., Rapaport, A.S., Edelson, B.T., Satpathy, A., Mashayekhi, M., Lathrop, S.K., Hsieh, C.-S., Stelljes, M., Colonna, M., et al. (2010). Targeting of B and T lymphocyte associated (BTLA) prevents graft-versus-host disease without global immunosuppression. *J. Exp. Med.* 207, 2551–2559.

Allen, R.C., Armitage, R.J., Conley, M.E., Rosenblatt, H., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bedell, M.A., Edelhoff, S., Distech, C.M., and Simoneaux, D.K. (1993). CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* 259, 990–993.

Amital, H., Szekanez, Z., Szücs, G., Dankó, K., Nagy, E., Csépany, T., Kiss, E., Rovensky, J., Tuchynova, A., Kozakova, D., et al. (2010). Serum concentrations of 25-OH vitamin D in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) are inversely related to disease activity: is it time to routinely supplement patients with SLE with vitamin D? *Ann. Rheum. Dis.* 69, 1155–1157.

Anumanthan, A., Bensussan, A., Boumsell, L., Christ, A.D., Blumberg, R.S., Voss, S.D., Patel, A.T., Robertson, M.J., Nadler, L.M., and Freeman, G.J. (1998). Cloning of BY55, a novel Ig superfamily member expressed on NK cells, CTL, and intestinal intraepithelial lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 161, 2780–2790.

Aoyama, A., Klarin, D., Yamada, Y., Boskovic, S., Nadazdin, O., Kawai, K., Schoenfeld, D., Madsen, J.C., Cosimi, A.B., Benichou, G., et al. (2012). Low-dose IL-2 for In vivo expansion of CD4+ and CD8+ regulatory T cells in nonhuman primates. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 12, 2532–2537.

Arce, E., Jackson, D.G., Gill, M.A., Bennett, L.B., Banchereau, J., and Pascual, V. (2001). Increased frequency of pre-germinal center B cells and plasma cell precursors in the blood of children with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 2361–2369.

Arechiga, A.F., Habib, T., He, Y., Zhang, X., Zhang, Z.-Y., Funk, A., and Buckner, J.H. (2009). Cutting edge: the PTPN22 allelic variant associated with autoimmunity impairs B cell signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 3343–3347.

Armitage, R.J., Fanslow, W.C., Strockbine, L., Sato, T.A., Clifford, K.N., Macduff, B.M., Anderson, D.M., Gimpel, S.D., Davis-Smith, T., and Maliszewski, C.R. (1992). Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 357, 80–82.

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

- Arnson, Y., Shoenfeld, Y., and Amital, H. (2010). Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *J. Autoimmun.* *34*, J258-265.
- Ballesteros-Tato, A., León, B., Graf, B.A., Moquin, A., Adams, P.S., Lund, F.E., and Randall, T.D. (2012). Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation. *Immunity* *36*, 847–856.
- Barathan, M., Mohamed, R., Vadivelu, J., Chang, L.Y., Vignesh, R., Krishnan, J., Sigamani, P., Saeidi, A., Ram, M.R., Velu, V., et al. (2017). CD8+ T cells of chronic HCV-infected patients express multiple negative immune checkpoints following stimulation with HCV peptides. *Cell. Immunol.* *313*, 1–9.
- Baumann, I., Kolowos, W., Voll, R.E., Manger, B., Gaipl, U., Neuhuber, W.L., Kirchner, T., Kalden, J.R., and Herrmann, M. (2002). Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *46*, 191–201.
- Baumjohann, D., Kageyama, R., Clingan, J.M., Morar, M.M., Patel, S., de Kouchkovsky, D., Bannard, O., Bluestone, J.A., Matloubian, M., Ansel, K.M., et al. (2013). The microRNA cluster miR-17~92 promotes TFH cell differentiation and represses subset-inappropriate gene expression. *Nat. Immunol.* *14*, 840–848.
- Beagley, K.W., and Gockel, C.M. (2003). Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *38*, 13–22.
- Bekiaris, V., Šedý, J.R., Macauley, M.G., Rhode-Kurnow, A., and Ware, C.F. (2013). The inhibitory receptor BTLA controls $\gamma\delta$ T cell homeostasis and inflammatory responses. *Immunity* *39*, 1082–1094.
- Benedict, C.A., Butrovich, K.D., Lurain, N.S., Corbeil, J., Rooney, I., Schneider, P., Tschopp, J., and Ware, C.F. (1999a). Cutting edge: a novel viral TNF receptor superfamily member in virulent strains of human cytomegalovirus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *162*, 6967–6970.
- Benedict, C.A., Butrovich, K.D., Lurain, N.S., Corbeil, J., Rooney, I., Schneider, P., Tschopp, J., and Ware, C.F. (1999b). Cutting edge: a novel viral TNF receptor superfamily member in virulent strains of human cytomegalovirus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *162*, 6967–6970.
- Bentebibel, S.-E., Lopez, S., Obermoser, G., Schmitt, N., Mueller, C., Harrod, C., Flano, E., Mejias, A., Albrecht, R.A., Blankenship, D., et al. (2013). Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Sci. Transl. Med.* *5*, 176ra32.
- Bentley, G.A., and Mariuzza, R.A. (1996). The structure of the T cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* *14*, 563–590.
- Betz, B.C., Jordan-Williams, K.L., Wang, C., Kang, S.G., Liao, J., Logan, M.R., Kim, C.H., and Taparowsky, E.J. (2010). Batf coordinates multiple aspects of B and T cell function required for normal antibody responses. *J. Exp. Med.* *207*, 933–942.
- Blair, P.A., Noreña, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2010). CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* *32*, 129–140.
- Blanco, P., Palucka, A.K., Gill, M., Pascual, V., and Banchereau, J. (2001). Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science* *294*, 1540–1543.

- Blanco, P., Pitard, V., Viallard, J.-F., Taupin, J.-L., Pellegrin, J.-L., and Moreau, J.-F. (2005). Increase in activated CD8⁺ T lymphocytes expressing perforin and granzyme B correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *52*, 201–211.
- Bodmer, J.-L., Schneider, P., and Tschopp, J. (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem. Sci.* *27*, 19–26.
- Boice, M., Salloum, D., Mourcin, F., Sanghvi, V., Amin, R., Oricchio, E., Jiang, M., Mottok, A., Denis-Lagache, N., Ciriello, G., et al. (2016). Loss of the HVEM Tumor Suppressor in Lymphoma and Restoration by Modified CAR-T Cells. *Cell* *167*, 405–418.e13.
- Boliar, S., Murphy, M.K., Tran, T.C., Carnathan, D.G., Armstrong, W.S., Silvestri, G., and Derdeyn, C.A. (2012). B-lymphocyte dysfunction in chronic HIV-1 infection does not prevent cross-clade neutralization breadth. *J. Virol.* *86*, 8031–8040.
- Bombardier, C., Gladman, D.D., Urowitz, M.B., Caron, D., and Chang, C.H. (1992). Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum.* *35*, 630–640.
- Bonelli, M., Savitskaya, A., von Dalwigk, K., Steiner, C.W., Aletaha, D., Smolen, J.S., and Scheinecker, C. (2008). Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Int. Immunol.* *20*, 861–868.
- Boomer, J.S., To, K., Chang, K.C., Takasu, O., Osborne, D.F., Walton, A.H., Bricker, T.L., Jarman, S.D., Kreisel, D., Krupnick, A.S., et al. (2011). Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* *306*, 2594–2605.
- Borchers, A.T., Naguwa, S.M., Shoenfeld, Y., and Gershwin, M.E. (2010). The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun. Rev.* *9*, A277–287.
- Bourré-Tessier, J., Peschken, C.A., Bernatsky, S., Joseph, L., Clarke, A.E., Fortin, P.R., Hitchon, C., Mittoo, S., Smith, C.D., Zummer, M., et al. (2013). Association of smoking with cutaneous manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res.* *65*, 1275–1280.
- Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., and Förster, R. (2000). Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J. Exp. Med.* *192*, 1545–1552.
- Breloer, M., Hartmann, W., Blankenhaus, B., Eschbach, M.-L., Pfeffer, K., and Jacobs, T. (2015). Cutting Edge: the BTLA-HVEM regulatory pathway interferes with protective immunity to intestinal Helminth infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *194*, 1413–1416.
- Bronson, P.G., Chaivorapol, C., Ortmann, W., Behrens, T.W., and Graham, R.R. (2012). The genetics of type I interferon in systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Immunol.* *24*, 530–537.
- Brown, D.A., and London, E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* *275*, 17221–17224.
- Bubier, J.A., Bennett, S.M., Sproule, T.J., Lyons, B.L., Olland, S., Young, D.A., and Roopenian, D.C. (2007). Treatment of BXS^B-Yaa mice with IL-21R-Fc fusion protein minimally attenuates systemic lupus erythematosus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1110*, 590–601.

- Butte, M.J., Keir, M.E., Phamduy, T.B., Sharpe, A.H., and Freeman, G.J. (2007). Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 27, 111–122.
- Cai, G., Anumanthan, A., Brown, J.A., Greenfield, E.A., Zhu, B., and Freeman, G.J. (2008). CD160 inhibits activation of human CD4+ T cells through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat. Immunol.* 9, 176–185.
- Calvo, C.R., Amsen, D., and Kruisbeek, A.M. (1997). Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) interferes with extracellular signal-regulated kinase (ERK) and Jun NH2-terminal kinase (JNK) activation, but does not affect phosphorylation of T cell receptor zeta and ZAP70. *J. Exp. Med.* 186, 1645–1653.
- Cameron, J.S. (1999). Lupus Nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 413–424.
- Cappione, A., Anolik, J.H., Pugh-Bernard, A., Barnard, J., Dutcher, P., Silverman, G., and Sanz, I. (2005). Germinal center exclusion of autoreactive B cells is defective in human systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 115, 3205–3216.
- Carsetti, R., Köhler, G., and Lamers, M.C. (1995). Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J. Exp. Med.* 181, 2129–2140.
- Caruso, R., Botti, E., Sarra, M., Esposito, M., Stolfi, C., Diluvio, L., Giustizieri, M.L., Pacciani, V., Mazzotta, A., Campione, E., et al. (2009). Involvement of interleukin-21 in the epidermal hyperplasia of psoriasis. *Nat. Med.* 15, 1013–1015.
- Caza, T., Oaks, Z., and Perl, A. (2014). Interplay of infections, autoimmunity, and immunosuppression in systemic lupus erythematosus. *Int. Rev. Immunol.* 33, 330–363.
- Cerny, A., Starobinski, M., Hügin, A.W., Sutter, S., Zinkernagel, R.M., and Izui, S. (1987). Treatment with high doses of anti-IgM prevents, but with lower doses accelerates autoimmune disease in (NZW x BXSb)F1 hybrid mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 138, 4222–4228.
- Chatzikyriakidou, A., Voulgari, P.V., Georgiou, I., and Drosos, A.A. (2012). miRNAs and related polymorphisms in rheumatoid arthritis susceptibility. *Autoimmun. Rev.* 11, 636–641.
- Chavele, K.-M., Merry, E., and Ehrenstein, M.R. (2015). Cutting edge: circulating plasmablasts induce the differentiation of human T follicular helper cells via IL-6 production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 194, 2482–2485.
- Che, K.F., Shankar, E.M., Muthu, S., Zandi, S., Sigvardsson, M., Hinkula, J., Messmer, D., and Larsson, M. (2012). p38 Mitogen-activated protein kinase/signal transducer and activator of transcription-3 pathway signaling regulates expression of inhibitory molecules in T cells activated by HIV-1-exposed dendritic cells. *Mol. Med. Camb. Mass* 18, 1169–1182.
- Chemnitz, J.M., Parry, R.V., Nichols, K.E., June, C.H., and Riley, J.L. (2004). SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *J. Immunol.* 173, 945–954.
- Chen, L. (2004). Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 336–347.

- Chen, J., Tian, J., Tang, X., Rui, K., Ma, J., Mao, C., Liu, Y., Lu, L., Xu, H., and Wang, S. (2015). MiR-346 regulates CD4⁺CXCR5⁺ T cells in the pathogenesis of Graves' disease. *Endocrine* 49, 752–760.
- Cheng, T., Bai, J., Chung, C.-S., Chen, Y., Biron, B.M., and Ayala, A. (2016). Enhanced Innate Inflammation Induced by Anti-BTLA Antibody in Dual Insult Model of Hemorrhagic Shock/Sepsis. *Shock Augusta Ga* 45, 40–49.
- Cheung, T.C., Steinberg, M.W., Osborne, L.M., Macauley, M.G., Fukuyama, S., Sanjo, H., D'Souza, C., Norris, P.S., Pfeffer, K., Murphy, K.M., et al. (2009a). Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 6244–6249.
- Cheung, T.C., Osborne, L.M., Steinberg, M.W., Macauley, M.G., Fukuyama, S., Sanjo, H., D'Souza, C., Norris, P.S., Pfeffer, K., Murphy, K.M., et al. (2009b). T cell intrinsic heterodimeric complexes between HVEM and BTLA determine receptivity to the surrounding microenvironment. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 183, 7286–7296.
- Chikuma, S., Imboden, J.B., and Bluestone, J.A. (2003). Negative Regulation of T Cell Receptor–Lipid Raft Interaction by Cytotoxic T Lymphocyte–associated Antigen 4. *J. Exp. Med.* 197, 129–135.
- Choi, J.-Y., Ho, J.H., Pasoto, S.G., Bunin, V., Kim, S.T., Carrasco, S., Borba, E.F., Gonçalves, C.R., Costa, P.R., Kallas, E.G., et al. (2015a). Circulating follicular helper-like T cells in systemic lupus erythematosus: association with disease activity. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* 67, 988–999.
- Choi, Y.S., Kageyama, R., Eto, D., Escobar, T.C., Johnston, R.J., Monticelli, L., Lao, C., and Crotty, S. (2011). ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity* 34, 932–946.
- Choi, Y.S., Gullicksrud, J.A., Xing, S., Zeng, Z., Shan, Q., Li, F., Love, P.E., Peng, W., Xue, H.-H., and Crotty, S. (2015b). LEF-1 and TCF-1 orchestrate T(FH) differentiation by regulating differentiation circuits upstream of the transcriptional repressor Bcl6. *Nat. Immunol.* 16, 980–990.
- Christensen, S.R., Kashgarian, M., Alexopoulou, L., Flavell, R.A., Akira, S., and Shlomchik, M.J. (2005). Toll-like receptor 9 controls anti-DNA autoantibody production in murine lupus. *J. Exp. Med.* 202, 321–331.
- Christensen, S.R., Shupe, J., Nickerson, K., Kashgarian, M., Flavell, R.A., and Shlomchik, M.J. (2006). Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity* 25, 417–428.
- Chung, Y., Tanaka, S., Chu, F., Nurieva, R.I., Martinez, G.J., Rawal, S., Wang, Y.-H., Lim, H., Reynolds, J.M., Zhou, X., et al. (2011). Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat. Med.* 17, 983–988.
- Coit, P., Jeffries, M., Altorok, N., Dozmorov, M.G., Koelsch, K.A., Wren, J.D., Merrill, J.T., McCune, W.J., and Sawalha, A.H. (2013). Genome-wide DNA methylation study suggests epigenetic accessibility and transcriptional poising of interferon-regulated genes in naïve CD4⁺ T cells from lupus patients. *J. Autoimmun.* 43, 78–84.
- Compaan, D.M., Gonzalez, L.C., Tom, I., Loyet, K.M., Eaton, D., and Hymowitz, S.G. (2005). Attenuating lymphocyte activity: the crystal structure of the BTLA-HVEM complex. *J. Biol. Chem.* 280, 39553–39561.

- Cooper, G.S., Wither, J., Bernatsky, S., Claudio, J.O., Clarke, A., Rioux, J.D., CaNIOS GenES Investigators, and Fortin, P.R. (2010). Occupational and environmental exposures and risk of systemic lupus erythematosus: silica, sunlight, solvents. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *49*, 2172–2180.
- Corseello, S.M., Barnabei, A., Marchetti, P., De Vecchis, L., Salvatori, R., and Torino, F. (2013). Endocrine side effects induced by immune checkpoint inhibitors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *98*, 1361–1375.
- Costenbader, K.H., Kim, D.J., Peerzada, J., Lockman, S., Nobles-Knight, D., Petri, M., and Karlson, E.W. (2004). Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Arthritis Rheum.* *50*, 849–857.
- Coyle, A.J., and Gutierrez-Ramos, J.C. (2001). The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat. Immunol.* *2*, 203–209.
- Crispin, J.C., Martínez, A., and Alcocer-Varela, J. (2003). Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmun.* *21*, 273–276.
- Croft, M. (2009). The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 271–285.
- Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 621–663.
- Crotty, S., Kersh, E.N., Cannons, J., Schwartzberg, P.L., and Ahmed, R. (2003). SAP is required for generating long-term humoral immunity. *Nature* *421*, 282–287.
- Crow, M.K., and Kirou, K.A. (2004). Interferon-alpha in systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Rheumatol.* *16*, 541–547.
- Cunninghame Graham, D.S., Graham, R.R., Manku, H., Wong, A.K., Whittaker, J.C., Gaffney, P.M., Moser, K.L., Rioux, J.D., Altshuler, D., Behrens, T.W., et al. (2008). Polymorphism at the TNF superfamily gene TNFSF4 confers susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* *40*, 83–89.
- Daikh, D.I., Finck, B.K., Linsley, P.S., Hollenbaugh, D., and Wofsy, D. (1997). Long-term inhibition of murine lupus by brief simultaneous blockade of the B7/CD28 and CD40/gp39 costimulation pathways. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *159*, 3104–3108.
- Davis, L.S., and Reimold, A.M. (2017). Research and therapeutics-traditional and emerging therapies in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *56*, i100–i113.
- De Trez, C., and Ware, C.F. (2008). The TNF receptor and Ig superfamily members form an integrated signaling circuit controlling dendritic cell homeostasis. *Cytokine Growth Factor Rev.* *19*, 277–284.
- De Trez, C., Schneider, K., Potter, K., Droin, N., Fulton, J., Norris, P.S., Ha, S., Fu, Y.-X., Murphy, T., Murphy, K.M., et al. (2008). The inhibitory HVEM-BTLA pathway counter regulates lymphotoxin receptor signaling to achieve homeostasis of dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 238–248.
- Deapen, D., Escalante, A., Weinrib, L., Horwitz, D., Bachman, B., Roy-Burman, P., Walker, A., and Mack, T.M. (1992). A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *35*, 311–318.

- Del Rio, M.-L., Bravo Moral, A.M., Fernandez-Renedo, C., Buhler, L., Perez-Simon, J.-A., Chaloin, O., Alvarez Nogal, R., Fernandez-Caso, M., and Rodriguez-Barbosa, J.-I. (2017). Modulation of cytotoxic responses by targeting CD160 prolongs skin graft survival across major histocompatibility class I barrier. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* *181*, 83–95.e3.
- Delgado-Rizo, V., Martínez-Guzmán, M.A., Iñiguez-Gutierrez, L., García-Orozco, A., Alvarado-Navarro, A., and Fafutis-Morris, M. (2017). Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview. *Front. Immunol.* *8*, 81.
- Deng, G.-M., and Tsokos, G.C. (2008). Cholera toxin B accelerates disease progression in lupus-prone mice by promoting lipid raft aggregation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 4019–4026.
- Deppong, C., Juehne, T.I., Hurchla, M., Friend, L.D., Shah, D.D., Rose, C.M., Bricker, T.L., Shornick, L.P., Crouch, E.C., Murphy, T.L., et al. (2006). Cutting Edge: B and T Lymphocyte Attenuator and Programmed Death Receptor-1 Inhibitory Receptors Are Required for Termination of Acute Allergic Airway Inflammation. *J. Immunol.* *176*, 3909–3913.
- Deppong, C., Degnan, J.M., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Green, J.M. (2008). B and T lymphocyte Attenuator, BTLA, Regulates T cell Survival in the Lung1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 2973–2979.
- Deppong, C.M., Parulekar, A., Boomer, J.S., Bricker, T.L., and Green, J.M. (2010). CTLA4-Ig inhibits allergic airway inflammation by a novel CD28-independent, nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Eur. J. Immunol.* *40*, 1985–1994.
- Derré, L., Rivals, J.-P., Jandus, C., Pastor, S., Rimoldi, D., Romero, P., Michielin, O., Olive, D., and Speiser, D.E. (2010a). BTLA mediates inhibition of human tumor-specific CD8+ T cells that can be partially reversed by vaccination. *J. Clin. Invest.* *120*, 157–167.
- Derré, L., Rivals, J.-P., Jandus, C., Pastor, S., Rimoldi, D., Romero, P., Michielin, O., Olive, D., and Speiser, D.E. (2010b). BTLA mediates inhibition of human tumor-specific CD8+ T cells that can be partially reversed by vaccination. *J. Clin. Invest.* *120*, 157–167.
- Desai-Mehta, A., Lu, L., Ramsey-Goldman, R., and Datta, S.K. (1996). Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *J. Clin. Invest.* *97*, 2063–2073.
- Desnues, B., Macedo, A.B., Roussel-Queval, A., Bonnardel, J., Henri, S., Demaria, O., and Alexopoulou, L. (2014). TLR8 on dendritic cells and TLR9 on B cells restrain TLR7-mediated spontaneous autoimmunity in C57BL/6 mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 1497–1502.
- Dhaeze, T., Peelen, E., Hombrouck, A., Peeters, L., Van Wijmeersch, B., Lemkens, N., Lemkens, P., Somers, V., Lucas, S., Broux, B., et al. (2015). Circulating Follicular Regulatory T Cells Are Defective in Multiple Sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *195*, 832–840.
- Diamond, B., Bloom, O., Al Abed, Y., Kowal, C., Huerta, P.T., and Volpe, B.T. (2011). Moving towards a cure: blocking pathogenic antibodies in systemic lupus erythematosus. *J. Intern. Med.* *269*, 36–44.
- Dienz, O., Eaton, S.M., Bond, J.P., Neveu, W., Moquin, D., Noubade, R., Briso, E.M., Charland, C., Leonard, W.J., Ciliberto, G., et al. (2009). The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* *206*, 69–78.

- DiSanto, J.P., Bonnefoy, J.Y., Gauchat, J.F., Fischer, A., and de Saint Basile, G. (1993). CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 361, 541–543.
- Dolff, S., Abdulahad, W.H., Westra, J., Doornbos-van der Meer, B., Limburg, P.C., Kallenberg, C.G.M., and Bijl, M. (2011). Increase in IL-21 producing T-cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 13, R157.
- Dong, C., Temann, U.A., and Flavell, R.A. (2001). Cutting edge: critical role of inducible costimulator in germinal center reactions. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166, 3659–3662.
- Dong, G.F., Zhang, X., He, D.N., Li, L., and Zhang, G.F. (2015). Effect of Leflunomide on the Abnormal Expression of Lipid Rafts and F-Actin in B Lymphocytes from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol. Res.* 2015, 832916.
- Duhon, T., Pasero, C., Mallet, F., Barbarat, B., Olive, D., and Costello, R.T. (2004). LIGHT costimulates CD40 triggering and induces immunoglobulin secretion; a novel key partner in T cell-dependent B cell terminal differentiation. *Eur. J. Immunol.* 34, 3534–3541.
- Duroux-Richard, I., Cuenca, J., Ponsolles, C., Piñeiro, A.B., Gonzalez, F., Roubert, C., Areny, R., Chea, R., Pefaur, J., Pers, Y.-M., et al. (2015). MicroRNA Profiling of B Cell Subsets from Systemic Lupus Erythematosus Patients Reveals Promising Novel Biomarkers. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 16953–16965.
- Eddahri, F., Denanglaire, S., Bureau, F., Spolski, R., Leonard, W.J., Leo, O., and Andris, F. (2009). Interleukin-6/STAT3 signaling regulates the ability of naive T cells to acquire B-cell help capacities. *Blood* 113, 2426–2433.
- Edwards, L.J., Mizui, M., and Kyttaris, V. (2015). Signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 inhibition delays the onset of lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 158, 221–230.
- Eklom-Kullberg, S., Kautiainen, H., Alha, P., Leirisalo-Repo, M., and Julkunen, H. (2013). Smoking and the risk of systemic lupus erythematosus. *Clin. Rheumatol.* 32, 1219–1222.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516.
- Fan, Z., Yu, P., Wang, Y., Wang, Y., Fu, M.L., Liu, W., Sun, Y., and Fu, Y.-X. (2006). NK-cell activation by LIGHT triggers tumor-specific CD8+ T-cell immunity to reject established tumors. *Blood* 107, 1342–1351.
- Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, L.J., Rosen, H., and McHeyzer-Williams, M.G. (2009). The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nat. Immunol.* 10, 375–384.
- Fecteau, J.F., Côté, G., and Néron, S. (2006). A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 3728–3736.
- Feng, X., Wang, D., Chen, J., Lu, L., Hua, B., Li, X., Tsao, B.P., and Sun, L. (2012). Inhibition of aberrant circulating Tfh cell proportions by corticosteroids in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One* 7, e51982.

- Filaci, G., Bacilieri, S., Fravega, M., Monetti, M., Contini, P., Ghio, M., Setti, M., Puppo, F., and Indiveri, F. (2001). Impairment of CD8+ T suppressor cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 6452–6457.
- Fillatreau, S., and Gray, D. (2003). T cell accumulation in B cell follicles is regulated by dendritic cells and is independent of B cell activation. *J. Exp. Med.* *197*, 195–206.
- Fillatreau, S., Sweenie, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., and Anderton, S.M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* *3*, 944–950.
- Finck, B.K., Chan, B., and Wofsy, D. (1994a). Interleukin 6 promotes murine lupus in NZB/NZW F1 mice. *J. Clin. Invest.* *94*, 585–591.
- Finck, B.K., Linsley, P.S., and Wofsy, D. (1994b). Treatment of murine lupus with CTLA4lg. *Science* *265*, 1225–1227.
- Finckh, A., Cooper, G.S., Chibnik, L.B., Costenbader, K.H., Watts, J., Pankey, H., Fraser, P.A., and Karlson, E.W. (2006). Occupational silica and solvent exposures and risk of systemic lupus erythematosus in urban women. *Arthritis Rheum.* *54*, 3648–3654.
- Flynn, R., Hutchinson, T., Murphy, K.M., Ware, C.F., Croft, M., and Salek-Ardakani, S. (2013). CD8 T Cell Memory to a Viral Pathogen Requires Trans Cosignaling between HVEM and BTLA. *PLoS ONE* *8*.
- Fonseca, V.R., Agua-Doce, A., Maceiras, A.R., Pierson, W., Ribeiro, F., Romão, V.C., Pires, A.R., da Silva, S.L., Fonseca, J.E., Sousa, A.E., et al. (2017). Human blood Tfr cells are indicators of ongoing humoral activity not fully licensed with suppressive function. *Sci. Immunol.* *2*.
- Fourcade, J., Sun, Z., Pagliano, O., Guillaume, P., Luescher, I.F., Sander, C., Kirkwood, J.M., Olive, D., Kuchroo, V., and Zarour, H.M. (2012). CD8+ T Cells Specific for Tumor Antigens Can Be Rendered Dysfunctional by the Tumor Microenvironment through Upregulation of the Inhibitory Receptors BTLA and PD-1. *Cancer Res.* *72*, 887–896.
- Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., et al. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* *192*, 1027–1034.
- Fu, Z., Li, D., Jiang, W., Wang, L., Zhang, J., Xu, F., Pang, D., and Li, D. (2010). Association of BTLA gene polymorphisms with the risk of malignant breast cancer in Chinese women of Heilongjiang Province. *Breast Cancer Res. Treat.* *120*, 195–202.
- Furie, R., Nicholls, K., Cheng, T.-T., Houssiau, F., Burgos-Vargas, R., Chen, S.-L., Hillson, J.L., Meadows-Shropshire, S., Kinaszchuk, M., and Merrill, J.T. (2014a). Efficacy and safety of abatacept in lupus nephritis: a twelve-month, randomized, double-blind study. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* *66*, 379–389.
- Furie, R., Nicholls, K., Cheng, T.-T., Houssiau, F., Burgos-Vargas, R., Chen, S.-L., Hillson, J.L., Meadows-Shropshire, S., Kinaszchuk, M., and Merrill, J.T. (2014b). Efficacy and safety of abatacept in lupus nephritis: a twelve-month, randomized, double-blind study. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* *66*, 379–389.

- Furie, R., Khamashta, M., Merrill, J.T., Werth, V.P., Kalunian, K., Brohawn, P., Illei, G.G., Drappa, J., Wang, L., Yoo, S., et al. (2017). Anifrolumab, an Anti-Interferon- α Receptor Monoclonal Antibody, in Moderate-to-Severe Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ *69*, 376–386.
- Garcia, B.A., Busby, S.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Mishra, N. (2005). Resetting the epigenetic histone code in the MRL-lpr/lpr mouse model of lupus by histone deacetylase inhibition. *J. Proteome Res.* *4*, 2032–2042.
- Gavrieli, M., and Murphy, K.M. (2006). Association of Grb-2 and PI3K p85 with phosphotyrosine peptides derived from BTLA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *345*, 1440–1445.
- Gavrieli, M., Watanabe, N., Loftin, S.K., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2003). Characterization of phosphotyrosine binding motifs in the cytoplasmic domain of B and T lymphocyte attenuator required for association with protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *312*, 1236–1243.
- Gertner-Dardenne, J., Fauriat, C., Orlanducci, F., Thibult, M.-L., Pastor, S., Fitzgibbon, J., Bouabdallah, R., Xerri, L., and Olive, D. (2013). The co-receptor BTLA negatively regulates human V γ 9V δ 2 T-cell proliferation: a potential way of immune escape for lymphoma cells. *Blood* *122*, 922–931.
- Godefroy, E., Zhong, H., Pham, P., Friedman, D., and Yazdanbakhsh, K. (2015). TIGIT-positive circulating follicular helper T cells display robust B-cell help functions: potential role in sickle cell alloimmunization. *Haematologica* *100*, 1415–1425.
- Goenka, R., Matthews, A.H., Zhang, B., O’Neill, P.J., Scholz, J.L., Migone, T.-S., Leonard, W.J., Stohl, W., Hershberg, U., and Cancro, M.P. (2014). Local BlyS production by T follicular cells mediates retention of high affinity B cells during affinity maturation. *J. Exp. Med.* *211*, 45–56.
- Gold, L.S., Ward, M.H., Dosemeci, M., and De Roos, A.J. (2007). Systemic autoimmune disease mortality and occupational exposures. *Arthritis Rheum.* *56*, 3189–3201.
- González, D.A., Díaz, B.B., Rodríguez Pérez, M. del C., Hernández, A.G., Chico, B.N.D., and de León, A.C. (2010). Sex hormones and autoimmunity. *Immunol. Lett.* *133*, 6–13.
- Gonzalez, L.C., Loyet, K.M., Calemine-Fenau, J., Chauhan, V., Wranik, B., Ouyang, W., and Eaton, D.L. (2005). A coreceptor interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 1116–1121.
- Good-Jacobson, K.L., Szumilas, C.G., Chen, L., Sharpe, A.H., Tomayko, M.M., and Shlomchik, M.J. (2010). PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat. Immunol.* *11*, 535–542.
- Gotot, J., Gottschalk, C., Leopold, S., Knolle, P.A., Yagita, H., Kurts, C., and Ludwig-Portugall, I. (2012). Regulatory T cells use programmed death 1 ligands to directly suppress autoreactive B cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 10468–10473.
- Grabmeier-Pfistershammer, K., Stecher, C., Zettl, M., Roskopf, S., Rieger, A., Zlabinger, G.J., and Steinberger, P. (2017). Antibodies targeting BTLA or TIM-3 enhance HIV-1 specific T cell responses in combination with PD-1 blockade. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *183*, 167–173.
- Green, D.R., Droin, N., and Pinkoski, M. (2003). Activation-induced cell death in T cells. *Immunol. Rev.* *193*, 70–81.

- Grimaldi, C.M., Cleary, J., Dagtas, A.S., Moussai, D., and Diamond, B. (2002). Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. *J. Clin. Invest.* *109*, 1625–1633.
- Grusby, M.J. (1997). Stat4- and Stat6-deficient mice as models for manipulating T helper cell responses. *Biochem. Soc. Trans.* *25*, 359–360.
- Gunawan, M., Her, Z., Liu, M., Tan, S.Y., Chan, X.Y., Tan, W.W.S., Dharmaraaja, S., Fan, Y., Ong, C.B., Loh, E., et al. (2017). A Novel Human Systemic Lupus Erythematosus Model in Humanised Mice. *Sci. Rep.* *7*, 16642.
- Hakim, A., Fürnrohr, B.G., Amann, K., Laube, B., Abed, U.A., Brinkmann, V., Herrmann, M., Voll, R.E., and Zychlinsky, A. (2010). Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 9813–9818.
- Halverson, R., Torres, R.M., and Pelanda, R. (2004). Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nat. Immunol.* *5*, 645–650.
- Hams, E., McCarron, M.J., Amu, S., Yagita, H., Azuma, M., Chen, L., and Fallon, P.G. (2011). Blockade of B7-H1 (programmed death ligand 1) enhances humoral immunity by positively regulating the generation of T follicular helper cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 5648–5655.
- Han, L., Wang, W., Fang, Y., Feng, Z., Liao, S., Li, W., Li, Y., Li, C., Maitituoheti, M., Dong, H., et al. (2009). Soluble B and T Lymphocyte Attenuator Possesses Antitumor Effects and Facilitates Heat Shock Protein 70 Vaccine-Triggered Antitumor Immunity against a Murine TC-1 Cervical Cancer Model In Vivo. *J. Immunol.* *183*, 7842–7850.
- Han, P., Goularte, O.D., Rufner, K., Wilkinson, B., and Kaye, J. (2004). An Inhibitory Ig Superfamily Protein Expressed by Lymphocytes and APCs Is Also an Early Marker of Thymocyte Positive Selection. *J. Immunol.* *172*, 5931–5939.
- Hanly, J.G., O’Keeffe, A.G., Su, L., Urowitz, M.B., Romero-Diaz, J., Gordon, C., Bae, S.-C., Bernatsky, S., Clarke, A.E., Wallace, D.J., et al. (2016). The frequency and outcome of lupus nephritis: results from an international inception cohort study. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *55*, 252–262.
- Hasbold, J., Lyons, A.B., Kehry, M.R., and Hodgkin, P.D. (1998). Cell division number regulates IgG1 and IgE switching of B cells following stimulation by CD40 ligand and IL-4. *Eur. J. Immunol.* *28*, 1040–1051.
- Haymaker, C., Wu, R., Ritthipichai, K., Bernatchez, C., Forget, M.-A., Chen, J.Q., Liu, H., Wang, E., Marincola, F., Hwu, P., et al. (2013). Uncovering a novel function of BTLA on tumor-infiltrating CD8+ T cells. *J. Immunother. Cancer* *1*, O1.
- Haymaker, C.L., Wu, R.C., Ritthipichai, K., Bernatchez, C., Forget, M.-A., Chen, J.Q., Liu, H., Wang, E., Marincola, F., Hwu, P., et al. (2015). BTLA marks a less-differentiated tumor-infiltrating lymphocyte subset in melanoma with enhanced survival properties. *Oncoimmunology* *4*.
- He, J., Tsai, L.M., Leong, Y.A., Hu, X., Ma, C.S., Chevalier, N., Sun, X., Vandenberg, K., Rockman, S., Ding, Y., et al. (2013). Circulating precursor CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5⁺ CD4⁺ T cells indicate Tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure. *Immunity* *39*, 770–781.
- He, J., Zhang, X., Wei, Y., Sun, X., Chen, Y., Deng, J., Jin, Y., Gan, Y., Hu, X., Jia, R., et al. (2016). Low-dose interleukin-2 treatment selectively modulates CD4(+) T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *Nat. Med.* *22*, 991–993.

- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Müller-Newen, G., and Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* *374*, 1–20.
- Heo, S.-K., Ju, S.-A., Lee, S.-C., Park, S.-M., Choe, S.-Y., Kwon, B., Kwon, B.S., and Kim, B.-S. (2006). LIGHT enhances the bactericidal activity of human monocytes and neutrophils via HVEM. *J. Leukoc. Biol.* *79*, 330–338.
- Herber, D., Brown, T.P., Liang, S., Young, D.A., Collins, M., and Dunussi-Joannopoulos, K. (2007). IL-21 has a pathogenic role in a lupus-prone mouse model and its blockade with IL-21R.Fc reduces disease progression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 3822–3830.
- Herrmann, M., Voll, R.E., Zoller, O.M., Hagenhofer, M., Ponner, B.B., and Kalden, J.R. (1998). Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *41*, 1241–1250.
- Ho, C.H., and Chauhan, K. (2017). Lupus Erythematosus, Drug-Induced. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Hochberg, M.C. (1997a). Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *40*, 1725.
- Hochberg, M.C. (1997b). Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *40*, 1725.
- Hoffman, W., Lakkis, F.G., and Chalasani, G. (2016). B Cells, Antibodies, and More. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* *11*, 137–154.
- Howard, M., Farrar, J., Hilfiker, M., Johnson, B., Takatsu, K., Hamaoka, T., and Paul, W.E. (1982). Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2. *J. Exp. Med.* *155*, 914–923.
- Hu, N., Qiu, X., Luo, Y., Yuan, J., Li, Y., Lei, W., Zhang, G., Zhou, Y., Su, Y., and Lu, Q. (2008). Abnormal histone modification patterns in lupus CD4+ T cells. *J. Rheumatol.* *35*, 804–810.
- Hu, R., Kagele, D.A., Huffaker, T.B., Runtsch, M.C., Alexander, M., Liu, J., Bake, E., Su, W., Williams, M.A., Rao, D.S., et al. (2014). miR-155 promotes T follicular helper cell accumulation during chronic, low-grade inflammation. *Immunity* *41*, 605–619.
- Hu, Y.-L., Metz, D.P., Chung, J., Siu, G., and Zhang, M. (2009). B7RP-1 blockade ameliorates autoimmunity through regulation of follicular helper T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 1421–1428.
- Hurchla, M.A., Sedy, J.R., Gavrielli, M., Drake, C.G., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2005). B and T Lymphocyte Attenuator Exhibits Structural and Expression Polymorphisms and Is Highly Induced in Anergic CD4+ T Cells. *J. Immunol.* *174*, 3377–3385.
- Hurchla, M.A., Sedy, J.R., and Murphy, K.M. (2007). Unexpected role of B and T lymphocyte attenuator in sustaining cell survival during chronic allostimulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 6073–6082.
- Hutloff, A., Büchner, K., Reiter, K., Baelde, H.J., Odendahl, M., Jacobi, A., Dörner, T., and Kroczeck, R.A. (2004). Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *50*, 3211–3220.

Ilkuni, N., Lourenço, E.V., Hahn, B.H., and La Cava, A. (2009). Cutting edge: Regulatory T cells directly suppress B cells in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 1518–1522.

Illei, G.G., Shirota, Y., Yarboro, C.H., Daruwalla, J., Tackey, E., Takada, K., Fleisher, T., Balow, J.E., and Lipsky, P.E. (2010). Tocilizumab in systemic lupus erythematosus: data on safety, preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells from an open-label phase I dosage-escalation study. *Arthritis Rheum.* *62*, 542–552.

Isenberg, D.A., McClure, C., Farewell, V., Spellerberg, M., Williams, W., Cambridge, G., and Stevenson, F. (1998). Correlation of 9G4 idiotope with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* *57*, 566–570.

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

Jacquemin, C., Schmitt, N., Contin-Bordes, C., Liu, Y., Narayanan, P., Seneschal, J., Maurouard, T., Dougall, D., Davizon, E.S., Dumortier, H., et al. (2015). OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. *Immunity* *42*, 1159–1170.

Jang, E., Cho, W.S., Oh, Y.-K., Cho, M.-L., Kim, J.M., Paik, D.-J., and Youn, J. (2016). Splenic Long-Lived Plasma Cells Promote the Development of Follicular Helper T Cells during Autoimmune Responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *196*, 1026–1035.

Johnston, R.J., Poholek, A.C., DiToro, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., Dent, A.L., Craft, J., and Crotty, S. (2009). Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* *325*, 1006–1010.

Jones, A., Bourque, J., Kuehm, L., Opejin, A., Teague, R.M., Gross, C., and Hawiger, D. (2016). Immunomodulatory Functions of BTLA and HVEM Govern Induction of Extrathymic Regulatory T Cells and Tolerance by Dendritic Cells. *Immunity* *45*, 1066–1077.

Jung, H.W., La, S.J., Kim, J.Y., Heo, S.K., Kim, J.Y., Wang, S., Kim, K.K., Lee, K.M., Cho, H.R., Lee, H.W., et al. (2003). High levels of soluble herpes virus entry mediator in sera of patients with allergic and autoimmune diseases. *Exp. Mol. Med.* *35*, 501–508.

Jury, E.C., Kabouridis, P.S., Flores-Borja, F., Mageed, R.A., and Isenberg, D.A. (2004). Altered lipid raft-associated signaling and ganglioside expression in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* *113*, 1176–1187.

Jury, E.C., Isenberg, D.A., Mauri, C., and Ehrenstein, M.R. (2006a). Atorvastatin restores Lck expression and lipid raft-associated signaling in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 7416–7422.

Jury, E.C., Isenberg, D.A., Mauri, C., and Ehrenstein, M.R. (2006b). Atorvastatin restores Lck expression and lipid raft-associated signaling in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 7416–7422.

Jury, E.C., Flores-Borja, F., and Kabouridis, P.S. (2007). Lipid rafts in T cell signalling and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* *18*, 608–615.

Jury, E.C., Flores-Borja, F., Kalsi, H.S., Lazarus, M., Isenberg, D.A., Mauri, C., and Ehrenstein, M.R. (2010a). Abnormal CTLA-4 function in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Immunol.* *40*, 569–578.

- Jury, E.C., Flores-Borja, F., Kalsi, H.S., Lazarus, M., Isenberg, D.A., Mauri, C., and Ehrenstein, M.R. (2010b). Abnormal CTLA-4 function in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Immunol.* *40*, 569–578.
- Kabouridis, P.S., and Jury, E.C. (2008). Lipid rafts and T-lymphocyte function: implications for autoimmunity. *FEBS Lett.* *582*, 3711–3718.
- Kalunian, K.C., Merrill, J.T., Maciuga, R., McBride, J.M., Townsend, M.J., Wei, X., Davis, J.C., and Kennedy, W.P. (2016). A Phase II study of the efficacy and safety of rontalizumab (rhuMAB interferon- α) in patients with systemic lupus erythematosus (ROSE). *Ann. Rheum. Dis.* *75*, 196–202.
- Kamen, D.L., Cooper, G.S., Bouali, H., Shaftman, S.R., Hollis, B.W., and Gilkeson, G.S. (2006). Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun. Rev.* *5*, 114–117.
- Kanda, N., Tsuchida, T., and Tamaki, K. (1999). Estrogen enhancement of anti-double-stranded DNA antibody and immunoglobulin G production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *42*, 328–337.
- Kang, S., Fedoriw, Y., Brenneman, E.K., Truong, Y.K., Kikly, K., and Vilen, B.J. (2017). BAFF Induces Tertiary Lymphoid Structures and Positions T Cells within the Glomeruli during Lupus Nephritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *198*, 2602–2611.
- Kang, S.G., Liu, W.-H., Lu, P., Jin, H.Y., Lim, H.W., Shepherd, J., Fremgen, D., Verdin, E., Oldstone, M.B.A., Qi, H., et al. (2013). MicroRNAs of the miR-17~92 family are critical regulators of T(FH) differentiation. *Nat. Immunol.* *14*, 849–857.
- Kannan, S., Kurupati, R.K., Doyle, S.A., Freeman, G.J., Schmader, K.E., and Ertl, H.C.J. (2015). BTLA expression declines on B cells of the aged and is associated with low responsiveness to the trivalent influenza vaccine. *Oncotarget* *6*, 19445–19455.
- Kasagi, S., Kawano, S., Okazaki, T., Honjo, T., Morinobu, A., Hatachi, S., Shimatani, K., Tanaka, Y., Minato, N., and Kumagai, S. (2010). Anti-programmed cell death 1 antibody reduces CD4+PD-1+ T cells and relieves the lupus-like nephritis of NZB/W F1 mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 2337–2347.
- Kashiwakuma, D., Suto, A., Hiramatsu, Y., Ikeda, K., Takatori, H., Suzuki, K., Kagami, S., Hirose, K., Watanabe, N., Iwamoto, I., et al. (2010a). B and T lymphocyte attenuator suppresses IL-21 production from follicular Th cells and subsequent humoral immune responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 2730–2736.
- Kashiwakuma, D., Suto, A., Hiramatsu, Y., Ikeda, K., Takatori, H., Suzuki, K., Kagami, S., Hirose, K., Watanabe, N., Iwamoto, I., et al. (2010b). B and T Lymphocyte Attenuator Suppresses IL-21 Production from Follicular Th Cells and Subsequent Humoral Immune Responses. *J. Immunol.* *185*, 2730–2736.
- Kast, R.E. (1977). Predominance of autoimmune and rheumatic diseases in females. *J. Rheumatol.* *4*, 288–292.
- Kasturi, S., and Sammaritano, L.R. (2016). Corticosteroids in Lupus. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* *42*, 47–62, viii.

- Katsiari, C.G., Liossis, S.N.C., Dimopoulos, A.M., Charalambopoulo, D.V., Mavrikakis, M., and Sfikakis, P.P. (2002). CD40L overexpression on T cells and monocytes from patients with systemic lupus erythematosus is resistant to calcineurin inhibition. *Lupus* 11, 370–378.
- Katsuyama, E., Yan, M., Watanabe, K.S., Matsushima, S., Yamamura, Y., Hiramatsu, S., Ohashi, K., Watanabe, H., Katsuyama, T., Zeggar, S., et al. (2017). Downregulation of miR-200a-3p, Targeting CtBP2 Complex, Is Involved in the Hypoproduction of IL-2 in Systemic Lupus Erythematosus-Derived T Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 198, 4268–4276.
- Kerfoot, S.M., Yaari, G., Patel, J.R., Johnson, K.L., Gonzalez, D.G., Kleinstein, S.H., and Haberman, A.M. (2011). Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. *Immunity* 34, 947–960.
- Khamashta, M., Merrill, J.T., Werth, V.P., Furie, R., Kalunian, K., Illei, G.G., Drappa, J., Wang, L., Greth, W., and CD1067 study investigators (2016). Sifalimumab, an anti-interferon- α monoclonal antibody, in moderate to severe systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Ann. Rheum. Dis.* 75, 1909–1916.
- Kiberd, B.A. (1993). Interleukin-6 receptor blockage ameliorates murine lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 4, 58–61.
- Kim, H.-A., Sung, J.-M., Jeon, J.-Y., Yoon, J.-M., and Suh, C.-H. (2011). Vitamin D may not be a good marker of disease activity in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol. Int.* 31, 1189–1194.
- Kim, H.-J., Verbinnen, B., Tang, X., Lu, L., and Cantor, H. (2010). Inhibition of follicular T helper cells by CD8+ Treg is essential for self tolerance. *Nature* 467, 328–332.
- Kim, J.-S., Cho, B.-A., Sim, J.H., Shah, K., Woo, C.M., Lee, E.B., Lee, D.-S., Kang, J.S., Lee, W.J., Park, C.-G., et al. (2012). IL-7R α low memory CD8+ T cells are significantly elevated in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 51, 1587–1594.
- Kinnunen, T., Chamberlain, N., Morbach, H., Choi, J., Kim, S., Craft, J., Mayer, L., Cancrini, C., Passerini, L., Bacchetta, R., et al. (2013). Accumulation of peripheral autoreactive B cells in the absence of functional human regulatory T cells. *Blood* 121, 1595–1603.
- Kisielow, M., Kisielow, J., Capoferri-Sollami, G., and Karjalainen, K. (2005). Expression of lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) on B cells is induced by T cells. *Eur. J. Immunol.* 35, 2081–2088.
- Kiyohara, C., Washio, M., Horiuchi, T., Asami, T., Ide, S., Atsumi, T., Kobashi, G., Takahashi, H., Tada, Y., and Kyushu Sapporo SLE (KYSS) Study Group (2012). Risk modification by CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms in the association of cigarette smoking and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Scand. J. Rheumatol.* 41, 103–109.
- Klack, K., Bonfa, E., and Borba Neto, E.F. (2012). Diet and nutritional aspects in systemic lupus erythematosus. *Rev. Bras. Reumatol.* 52, 384–408.
- Kobata, T., Jacquot, S., Kozlowski, S., Agematsu, K., Schlossman, S.F., and Morimoto, C. (1995). CD27-CD70 interactions regulate B-cell activation by T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11249–11253.
- Koga, T., Ichinose, K., and Tsokos, G.C. (2017). T cells and IL-17 in lupus nephritis. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 185, 95–99.

- Kono, D.H., Haraldsson, M.K., Lawson, B.R., Pollard, K.M., Koh, Y.T., Du, X., Arnold, C.N., Baccala, R., Silverman, G.J., Beutler, B.A., et al. (2009). Endosomal TLR signaling is required for anti-nucleic acid and rheumatoid factor autoantibodies in lupus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 12061–12066.
- Kopf, M., Le Gros, G., Coyle, A.J., Kosco-Vilbois, M., and Brombacher, F. (1995). Immune responses of IL-4, IL-5, IL-6 deficient mice. *Immunol. Rev.* *148*, 45–69.
- Kow, N.Y., and Mak, A. (2013). Costimulatory pathways: physiology and potential therapeutic manipulation in systemic lupus erythematosus. *Clin. Dev. Immunol.* *2013*, 245928.
- Krieg, C., Han, P., Stone, R., Goularte, O.D., and Kaye, J. (2005). Functional Analysis of B and T Lymphocyte Attenuator Engagement on CD4+ and CD8+ T Cells. *J. Immunol.* *175*, 6420–6427.
- Krishnan, S., Nambiar, M.P., Warke, V.G., Fisher, C.U., Mitchell, J., Delaney, N., and Tsokos, G.C. (2004a). Alterations in lipid raft composition and dynamics contribute to abnormal T cell responses in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 7821–7831.
- Krishnan, S., Nambiar, M.P., Warke, V.G., Fisher, C.U., Mitchell, J., Delaney, N., and Tsokos, G.C. (2004b). Alterations in Lipid Raft Composition and Dynamics Contribute to Abnormal T Cell Responses in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* *172*, 7821–7831.
- Kunicki, M.A., Amaya Hernandez, L.C., Davis, K.L., Bacchetta, R., and Roncarolo, M.-G. (2018). Identity and Diversity of Human Peripheral Th and T Regulatory Cells Defined by Single-Cell Mass Cytometry. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *200*, 336–346.
- Kuo, C.-F., Grainge, M.J., Valdes, A.M., See, L.-C., Luo, S.-F., Yu, K.-H., Zhang, W., and Doherty, M. (2015). Familial Aggregation of Systemic Lupus Erythematosus and Coaggregation of Autoimmune Diseases in Affected Families. *JAMA Intern. Med.* *175*, 1518–1526.
- Kyttaris, V.C. (2017). Novel Treatments in Lupus. *Curr. Rheumatol. Rep.* *19*, 10.
- Kyttaris, V.C., Wang, Y., Juang, Y.T., Weinstein, A., and Tsokos, G.C. (2006). CAMP response element modulator a expression in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* *15*, 840–844.
- Kyttaris, V.C., Wang, Y., Juang, Y.-T., Weinstein, A., and Tsokos, G.C. (2007). Increased levels of NF-ATc2 differentially regulate CD154 and IL-2 genes in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 1960–1966.
- La Paglia, G.M.C., Leone, M.C., Lepri, G., Vagelli, R., Valentini, E., Alunno, A., and Tani, C. (2017). One year in review 2017: systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Rheumatol.* *35*, 551–561.
- Lacotte, S., Brun, S., Muller, S., and Dumortier, H. (2009). CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1173*, 310–317.
- Lacotte, S., Dumortier, H., Décossas, M., Briand, J.-P., and Muller, S. (2010). Identification of New Pathogenic Players in Lupus: Autoantibody-Secreting Cells Are Present in Nephritic Kidneys of (NZBxNZW)F1 Mice. *J. Immunol.* *184*, 3937–3945.
- Lacotte, S., Decossas, M., Le Coz, C., Brun, S., Muller, S., and Dumortier, H. (2013a). Early differentiated CD138(high) MHCII+ IgG+ plasma cells express CXCR3 and localize into inflamed kidneys of lupus mice. *PLoS One* *8*, e58140.

- Lacotte, S., Decossas, M., Coz, C.L., Brun, S., Muller, S., and Dumortier, H. (2013b). Early Differentiated CD138^{high}MHCII⁺IgG⁺ Plasma Cells Express CXCR3 and Localize into Inflamed Kidneys of Lupus Mice. *PLOS ONE* 8, e58140.
- Lamoureux, J.L., Watson, L.C., Cherrier, M., Skog, P., Nemazee, D., and Feeney, A.J. (2007). Reduced receptor editing in lupus-prone MRL/lpr mice. *J. Exp. Med.* 204, 2853–2864.
- Lan, Q., Zhou, X., Fan, H., Chen, M., Wang, J., Ryffel, B., Brand, D., Ramalingam, R., Kiela, P.R., Horwitz, D.A., et al. (2012). Polyclonal CD4⁺Foxp3⁺ Treg cells induce TGF β -dependent tolerogenic dendritic cells that suppress the murine lupus-like syndrome. *J. Mol. Cell Biol.* 4, 409–419.
- Lan, Y., Luo, B., Wang, J.-L., Jiang, Y.-W., and Wei, Y.-S. (2014). The association of interleukin-21 polymorphisms with interleukin-21 serum levels and risk of systemic lupus erythematosus. *Gene* 538, 94–98.
- Larbi, A., Douziech, N., Dupuis, G., Khalil, A., Pelletier, H., Guerard, K.-P., and Fülöp, T. (2004). Age-associated alterations in the recruitment of signal-transduction proteins to lipid rafts in human T lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 75, 373–381.
- Larbi, A., Dupuis, G., Khalil, A., Douziech, N., Fortin, C., and Fülöp, T. (2006). Differential role of lipid rafts in the functions of CD4⁺ and CD8⁺ human T lymphocytes with aging. *Cell. Signal.* 18, 1017–1030.
- Lasaro, M.O., Sazanovich, M., Giles-Davis, W., Mrass, P., Bunte, R.M., Sewell, D.A., Hussain, S.F., Fu, Y.-X., Weninger, W., Paterson, Y., et al. (2011). Active immunotherapy combined with blockade of a coinhibitory pathway achieves regression of large tumor masses in cancer-prone mice. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 19, 1727–1736.
- Lashine, Y.A., Salah, S., Aboelenein, H.R., and Abdelaziz, A.I. (2015). Correcting the expression of miRNA-155 represses PP2Ac and enhances the release of IL-2 in PBMCs of juvenile SLE patients. *Lupus* 24, 240–247.
- Latchman, Y., Wood, C.R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A.J., Brown, J.A., Nunes, R., et al. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* 2, 261–268.
- Lau, C.M., Broughton, C., Tabor, A.S., Akira, S., Flavell, R.A., Mamula, M.J., Christensen, S.R., Shlomchik, M.J., Viglianti, G.A., Rifkin, I.R., et al. (2005). RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J. Exp. Med.* 202, 1171–1177.
- Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., et al. (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 26, 371–381.
- Le Bouteiller, P., Barakonyi, A., Giustiniani, J., Lenfant, F., Marie-Cardine, A., Aguerre-Girr, M., Rabot, M., Hilgert, I., Mami-Chouaib, F., Tabiasco, J., et al. (2002). Engagement of CD160 receptor by HLA-C is a triggering mechanism used by circulating natural killer (NK) cells to mediate cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 16963–16968.
- Le Coz, C., Joublin, A., Pasquali, J.-L., Korganow, A.-S., Dumortier, H., and Monneaux, F. (2013a). Circulating TFH subset distribution is strongly affected in lupus patients with an active disease. *PloS One* 8, e75319.

- Le Coz, C., Joublin, A., Pasquali, J.-L., Korganow, A.-S., Dumortier, H., and Monneaux, F. (2013b). Circulating TFH Subset Distribution Is Strongly Affected in Lupus Patients with an Active Disease. *PLoS ONE* 8.
- Le Mercier, I., Lines, J.L., and Noelle, R.J. (2015). Beyond CTLA-4 and PD-1, the Generation Z of Negative Checkpoint Regulators. *Front. Immunol.* 6, 418.
- Lech, M., and Anders, H.-J. (2013). The pathogenesis of lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 24, 1357–1366.
- Lee, P.Y., Kumagai, Y., Li, Y., Takeuchi, O., Yoshida, H., Weinstein, J., Kellner, E.S., Nacionales, D., Barker, T., Kelly-Scumpia, K., et al. (2008). TLR7-dependent and FcγR-independent production of type I interferon in experimental mouse lupus. *J. Exp. Med.* 205, 2995–3006.
- Levy, Y., and Brouet, J.C. (1994). Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J. Clin. Invest.* 93, 424–428.
- Leyva-Castillo, J.M., Hener, P., Michea, P., Karasuyama, H., Chan, S., Soumelis, V., and Li, M. (2013). Skin thymic stromal lymphopoietin initiates Th2 responses through an orchestrated immune cascade. *Nat. Commun.* 4, 2847.
- Li, W.-X., Pan, H.-F., Chen, G.-P., Tao, J.-H., Li, X.-P., and Ye, D.-Q. (2012a). Expression of inducible co-stimulator on peripheral blood T lymphocytes in patients with lupus nephritis. *Rheumatol. Int.* 32, 2051–2055.
- Li, X., Wu, Z., Ding, J., Zheng, Z., Li, X., Chen, L., and Zhu, P. (2012b). Role of the frequency of blood CD4(+) CXCR5(+) CCR6(+) T cells in autoimmunity in patients with Sjögren’s syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 422, 238–244.
- Liang, B., Gee, R.J., Kashgarian, M.J., Sharpe, A.H., and Mamula, M.J. (1999). B7 costimulation in the development of lupus: autoimmunity arises either in the absence of B7.1/B7.2 or in the presence of anti-b7.1/B7.2 blocking antibodies. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 163, 2322–2329.
- Lim, H.W., Hillsamer, P., Banham, A.H., and Kim, C.H. (2005). Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 175, 4180–4183.
- Lim, H.W., Broxmeyer, H.E., and Kim, C.H. (2006). Regulation of trafficking receptor expression in human forkhead box P3+ regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 177, 840–851.
- Lin, S.-C., Kuo, C.-C., and Chan, C.-H. (2006). Association of a BTLA gene polymorphism with the risk of rheumatoid arthritis. *J. Biomed. Sci.* 13, 853–860.
- Linterman, M.A., Rigby, R.J., Wong, R.K., Yu, D., Brink, R., Cannons, J.L., Schwartzberg, P.L., Cook, M.C., Walters, G.D., and Vinuesa, C.G. (2009). Follicular helper T cells are required for systemic autoimmunity. *J. Exp. Med.* 206, 561–576.
- Linterman, M.A., Pierson, W., Lee, S.K., Kallies, A., Kawamoto, S., Rayner, T.F., Srivastava, M., Divekar, D.P., Beaton, L., Hogan, J.J., et al. (2011). Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat. Med.* 17, 975–982.
- Liu, C., Wang, D., Song, Y., Lu, S., Zhao, J., and Wang, H. (2018). Increased circulating CD4+CXCR5+FoxP3+follicular regulatory T cells correlated with severity of systemic lupus erythematosus patients. *Int. Immunopharmacol.* 56, 261–268.

- Liu, M.-F., Wang, C.-R., Fung, L.-L., and Wu, C.-R. (2004). Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand. J. Immunol.* *59*, 198–202.
- Liu, X., Alexiou, M., Martin-Orozco, N., Chung, Y., Nurieva, R.I., Ma, L., Tian, Q., Kollias, G., Lu, S., Graf, D., et al. (2009). Cutting Edge: A Critical Role of B and T Lymphocyte Attenuator in Peripheral T Cell Tolerance Induction. *J. Immunol.* *182*, 4516–4520.
- Liu, X., Chen, X., Zhong, B., Wang, A., Wang, X., Chu, F., Nurieva, R.I., Yan, X., Chen, P., van der Flier, L.G., et al. (2014). Transcription factor achaete-scute homologue 2 initiates follicular T-helper-cell development. *Nature* *507*, 513–518.
- Liu, Y., Nie, W., Jin, Y., Zhuo, A., Zang, Y., and Xiu, Q. (2016). B and T Lymphocyte Attenuator is a Target of miR-155 during Naïve CD4+ T Cell Activation. *Iran. J. Immunol. IJI* *13*, 89–99.
- Llinàs, L., Lázaro, A., de Salort, J., Matesanz-Isabel, J., Sintes, J., and Engel, P. (2011). Expression profiles of novel cell surface molecules on B-cell subsets and plasma cells as analyzed by flow cytometry. *Immunol. Lett.* *134*, 113–121.
- Lo, M.S. (2016). Monogenic Lupus. *Curr. Rheumatol. Rep.* *18*, 71.
- Locci, M., Havenar-Daughton, C., Landais, E., Wu, J., Kroenke, M.A., Arlehamn, C.L., Su, L.F., Cubas, R., Davis, M.M., Sette, A., et al. (2013). Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity* *39*, 758–769.
- Löfgren, S.E., Frostegård, J., Truedsson, L., Pons-Estel, B.A., D’Alfonso, S., Witte, T., Lauwerys, B.R., Endreffy, E., Kovács, L., Vasconcelos, C., et al. (2012). Genetic association of miRNA-146a with systemic lupus erythematosus in Europeans through decreased expression of the gene. *Genes Immun.* *13*, 268–274.
- Lou, J., Rossy, J., Deng, Q., Pigeon, S.V., and Gaus, K. (2016). New Insights into How Trafficking Regulates T Cell Receptor Signaling. *Front. Cell Dev. Biol.* *4*, 77.
- Lövgren, T., Eloranta, M.-L., Båve, U., Alm, G.V., and Rönnblom, L. (2004). Induction of interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells by immune complexes containing nucleic acid released by necrotic or late apoptotic cells and lupus IgG. *Arthritis Rheum.* *50*, 1861–1872.
- Loyet, K.M., Ouyang, W., Eaton, D.L., and Stults, J.T. (2005). Proteomic profiling of surface proteins on Th1 and Th2 cells. *J. Proteome Res.* *4*, 400–409.
- Lu, Q., Kaplan, M., Ray, D., Ray, D., Zacharek, S., Gutsch, D., and Richardson, B. (2002). Demethylation of ITGAL (CD11a) regulatory sequences in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *46*, 1282–1291.
- Lyn-Cook, B.D., Xie, C., Oates, J., Treadwell, E., Word, B., Hammons, G., and Wiley, K. (2014). Increased expression of Toll-like receptors (TLRs) 7 and 9 and other cytokines in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: ethnic differences and potential new targets for therapeutic drugs. *Mol. Immunol.* *61*, 38–43.
- Lyssuk, E.Y., Torgashina, A.V., Soloviev, S.K., Nassonov, E.L., and Bykovskaia, S.N. (2007). Reduced number and function of CD4+CD25highFoxP3+ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv. Exp. Med. Biol.* *601*, 113–119.

Ma, C.S., Hare, N.J., Nichols, K.E., Dupré, L., Andolfi, G., Roncarolo, M.-G., Adelstein, S., Hodgkin, P.D., and Tangye, S.G. (2005). Impaired humoral immunity in X-linked lymphoproliferative disease is associated with defective IL-10 production by CD4+ T cells. *J. Clin. Invest.* *115*, 1049–1059.

Ma, C.S., Suryani, S., Avery, D.T., Chan, A., Nanan, R., Santner-Nanan, B., Deenick, E.K., and Tangye, S.G. (2009). Early commitment of naïve human CD4(+) T cells to the T follicular helper (T(FH)) cell lineage is induced by IL-12. *Immunol. Cell Biol.* *87*, 590–600.

Ma, C.S., Avery, D.T., Chan, A., Batten, M., Bustamante, J., Boisson-Dupuis, S., Arkwright, P.D., Kreins, A.Y., Averbuch, D., Engelhard, D., et al. (2012). Functional STAT3 deficiency compromises the generation of human T follicular helper cells. *Blood* *119*, 3997–4008.

Ma, J., Xu, J., Madaio, M.P., Peng, Q., Zhang, J., Grewal, I.S., Flavell, R.A., and Craft, J. (1996). Autoimmune *lpr/lpr* mice deficient in CD40 ligand: spontaneous Ig class switching with dichotomy of autoantibody responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *157*, 417–426.

Maddison, P., Mogavero, H., Provost, T.T., and Reichlin, M. (1979). The clinical significance of autoantibodies to a soluble cytoplasmic antigen in systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases. *J. Rheumatol.* *6*, 189–195.

Mahmood, Z., Muhammad, K., Schmalzing, M., Roll, P., Dörner, T., and Tony, H.-P. (2015). CD27-IgD-memory B cells are modulated by in vivo interleukin-6 receptor (IL-6R) blockade in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* *17*, 61.

Manku, H., Langefeld, C.D., Guerra, S.G., Malik, T.H., Alarcon-Riquelme, M., Anaya, J.-M., Bae, S.-C., Boackle, S.A., Brown, E.E., Criswell, L.A., et al. (2013). Trans-ancestral studies fine map the SLE-susceptibility locus TNFSF4. *PLoS Genet.* *9*, e1003554.

Mannik, M., Merrill, C.E., Stamps, L.D., and Wener, M.H. (2003). Multiple autoantibodies form the glomerular immune deposits in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* *30*, 1495–1504.

Marsters, S.A., Ayres, T.M., Skubatch, M., Gray, C.L., Rothe, M., and Ashkenazi, A. (1997). Herpesvirus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR-associated factor family and activates the transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J. Biol. Chem.* *272*, 14029–14032.

Martin, M., Schneider, H., Azouz, A., and Rudd, C.E. (2001). Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4 and CD28 Modulate Cell Surface Raft Expression in Their Regulation of T Cell Function. *J. Exp. Med.* *194*, 1675–1682.

Mathian, A., Weinberg, A., Gallegos, M., Banchereau, J., and Koutouzov, S. (2005). IFN-alpha induces early lethal lupus in preautoimmune (New Zealand Black x New Zealand White) F1 but not in BALB/c mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 2499–2506.

Mathian, A., Jouenne, R., Chader, D., Cohen-Aubart, F., Haroche, J., Fadlallah, J., Claër, L., Musset, L., Gorochov, G., Amoura, Z., et al. (2015). Regulatory T Cell Responses to High-Dose Methylprednisolone in Active Systemic Lupus Erythematosus. *PLOS ONE* *10*, e0143689.

Mauri, C., and Bosma, A. (2012). Immune regulatory function of B cells. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 221–241.

- Mauri, D.N., Ebner, R., Montgomery, R.I., Kochel, K.D., Cheung, T.C., Yu, G.-L., Ruben, S., Murphy, M., Eisenberg, R.J., Cohen, G.H., et al. (1998). LIGHT, a New Member of the TNF Superfamily, and Lymphotoxin α Are Ligands for Herpesvirus Entry Mediator. *Immunity* 8, 21–30.
- Mazerolles, F., Picard, C., Kracker, S., Fischer, A., and Durandy, A. (2013). Blood CD4+CD45RO+CXCR5+ T cells are decreased but partially functional in signal transducer and activator of transcription 3 deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 1146–1156, 1156.e1-5.
- McCarron, M.J., and Marie, J.C. (2014). TGF- β prevents T follicular helper cell accumulation and B cell autoreactivity. *J. Clin. Invest.* 124, 4375–4386.
- McClain, M.T., Heinlen, L.D., Dennis, G.J., Roebuck, J., Harley, J.B., and James, J.A. (2005). Early events in lupus humoral autoimmunity suggest initiation through molecular mimicry. *Nat. Med.* 11, 85–89.
- McCombe, P.A., Greer, J.M., and Mackay, I.R. (2009). Sexual dimorphism in autoimmune disease. *Curr. Mol. Med.* 9, 1058–1079.
- McDonald, G., Deepak, S., Miguel, L., Hall, C.J., Isenberg, D.A., Magee, A.I., Butters, T., and Jury, E.C. (2014a). Normalizing glycosphingolipids restores function in CD4+ T cells from lupus patients. *J. Clin. Invest.* 124, 712–724.
- McDonald, G., Deepak, S., Miguel, L., Hall, C.J., Isenberg, D.A., Magee, A.I., Butters, T., and Jury, E.C. (2014b). Normalizing glycosphingolipids restores function in CD4+ T cells from lupus patients. *J. Clin. Invest.* 124, 712–724.
- M'Hidi, H., Thibult, M.-L., Chetaille, B., Rey, F., Bouadallah, R., Nicollas, R., Olive, D., and Xerri, L. (2009a). High expression of the inhibitory receptor BTLA in T-follicular helper cells and in B-cell small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.* 132, 589–596.
- M'Hidi, H., Thibult, M.-L., Chetaille, B., Rey, F., Bouadallah, R., Nicollas, R., Olive, D., and Xerri, L. (2009b). High Expression of the Inhibitory Receptor BTLA in T-Follicular Helper Cells and in B-Cell Small Lymphocytic Lymphoma/Chronic Lymphocytic Leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.* 132, 589–596.
- Mihara, M., Takagi, N., Takeda, Y., and Ohsugi, Y. (1998). IL-6 receptor blockage inhibits the onset of autoimmune kidney disease in NZB/W F1 mice. *Clin. Exp. Immunol.* 112, 397–402.
- Mihara, M., Tan, I., Chuzhin, Y., Reddy, B., Budhai, L., Holzer, A., Gu, Y., and Davidson, A. (2000). CTLA4Ig inhibits T cell-dependent B-cell maturation in murine systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 106, 91–101.
- Miller, J.F., and Mitchell, G.F. (1968). Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.* 128, 801–820.
- Miller, F.W., Alfredsson, L., Costenbader, K.H., Kamen, D.L., Nelson, L.M., Norris, J.M., and De Roos, A.J. (2012). Epidemiology of environmental exposures and human autoimmune diseases: findings from a National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop. *J. Autoimmun.* 39, 259–271.
- Mitchell, G.F., and Miller, J.F. (1968). Cell to cell interaction in the immune response. II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.* 128, 821–837.

- Miyara, M., Amoura, Z., Parizot, C., Badoual, C., Dorgham, K., Trad, S., Nochy, D., Debré, P., Piette, J.-C., and Gorochov, G. (2005). Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 8392–8400.
- Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., et al. (2009). Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* *30*, 899–911.
- Monneaux, F., Lozano, J.M., Patarroyo, M.E., Briand, J.-P., and Muller, S. (2003). T cell recognition and therapeutic effect of a phosphorylated synthetic peptide of the 70K snRNP protein administered in MR/lpr mice. *Eur. J. Immunol.* *33*, 287–296.
- Montgomery, R.I., Warner, M.S., Lum, B.J., and Spear, P.G. (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* *87*, 427–436.
- Morel, Y., Schiano de Colella, J.M., Harrop, J., Deen, K.C., Holmes, S.D., Wattam, T.A., Khandekar, S.S., Truneh, A., Sweet, R.W., Gastaut, J.A., et al. (2000). Reciprocal expression of the TNF family receptor herpes virus entry mediator and its ligand LIGHT on activated T cells: LIGHT down-regulates its own receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *165*, 4397–4404.
- Morel, Y., Truneh, A., Sweet, R.W., Olive, D., and Costello, R.T. (2001). The TNF superfamily members LIGHT and CD154 (CD40 ligand) costimulate induction of dendritic cell maturation and elicit specific CTL activity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *167*, 2479–2486.
- Morita, R., Schmitt, N., Bentebibel, S.-E., Ranganathan, R., Bourdery, L., Zurawski, G., Foucat, E., Dullaers, M., Oh, S., Sabzghabaei, N., et al. (2011). Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* *34*, 108–121.
- Moulton, V.R., Suarez-Fueyo, A., Meidan, E., Li, H., Mizui, M., and Tsokos, G.C. (2017). Pathogenesis of Human Systemic Lupus Erythematosus: A Cellular Perspective. *Trends Mol. Med.* *23*, 615–635.
- Moura, R.A., Quaresma, C., Vieira, A.R., Gonçalves, M.J., Polido-Pereira, J., Romão, V.C., Martins, N., Canhão, H., and Fonseca, J.E. (2017). B-cell phenotype and IgD-CD27- memory B cells are affected by TNF-inhibitors and tocilizumab treatment in rheumatoid arthritis. *PLoS One* *12*, e0182927.
- Müller, K., Kriegbaum, N.J., Baslund, B., Sørensen, O.H., Thymann, M., and Bentzen, K. (1995). Vitamin D3 metabolism in patients with rheumatic diseases: low serum levels of 25-hydroxyvitamin D3 in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Rheumatol.* *14*, 397–400.
- Muñoz, L.E., Frey, B., Appelt, U., Janko, C., Sarter, K., Voll, R.E., Kern, P., Herrmann, M., and Gaipl, U.S. (2010). Peripheral Blood Stem Cells of Patients with Systemic Lupus Erythematosus Show Altered Differentiation into Macrophages. *Open Autoimmun. J.* *2*.
- Nakagomi, D., Suzuki, K., Hosokawa, J., Kobayashi, Y., Suto, A., Takatori, H., Watanabe, N., Matsue, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., et al. (2013). Therapeutic potential of B and T lymphocyte attenuator expressed on CD8+ T cells for contact hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* *133*, 702–711.
- Nakaseko, C., Miyatake, S., Iida, T., Hara, S., Abe, R., Ohno, H., Saito, Y., and Saito, T. (1999). Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) engagement delivers an inhibitory signal through the membrane-proximal region in the absence of the tyrosine motif in the cytoplasmic tail. *J. Exp. Med.* *190*, 765–774.

- Nambiar, M.P., Fisher, C.U., Kumar, A., Tsokos, C.G., Warke, V.G., and Tsokos, G.C. (2003a). Forced expression of the Fc receptor gamma-chain renders human T cells hyperresponsive to TCR/CD3 stimulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 2871–2876.
- Nambiar, M.P., Fisher, C.U., Warke, V.G., Krishnan, S., Mitchell, J.P., Delaney, N., and Tsokos, G.C. (2003b). Reconstitution of deficient T cell receptor zeta chain restores T cell signaling and augments T cell receptor/CD3-induced interleukin-2 production in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *48*, 1948–1955.
- Nguyen, D.H., Espinoza, J.C., and Taub, D.D. (2004). Cellular cholesterol enrichment impairs T cell activation and chemotaxis. *Mech. Ageing Dev.* *125*, 641–650.
- Nickerson, K.M., Christensen, S.R., Shupe, J., Kashgarian, M., Kim, D., Elkon, K., and Shlomchik, M.J. (2010). TLR9 regulates TLR7- and MyD88-dependent autoantibody production and disease in a murine model of lupus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 1840–1848.
- Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., and Honjo, T. (1999). Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* *11*, 141–151.
- Noble, A., Zhao, Z.S., and Cantor, H. (1998). Suppression of immune responses by CD8 cells. II. Qa-1 on activated B cells stimulates CD8 cell suppression of T helper 2 responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *160*, 566–571.
- Nossal, G.J., Cunningham, A., Mitchell, G.F., and Miller, J.F. (1968). Cell to cell interaction in the immune response. 3. Chromosomal marker analysis of single antibody-forming cells in reconstituted, irradiated, or thymectomized mice. *J. Exp. Med.* *128*, 839–853.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., et al. (2008). Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* *29*, 138–149.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D., Wang, Y.-H., and Dong, C. (2009). Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* *325*, 1001–1005.
- Odegard, J.M., Marks, B.R., DiPlacido, L.D., Poholek, A.C., Kono, D.H., Dong, C., Flavell, R.A., and Craft, J. (2008). ICOS-dependent extrafollicular helper T cells elicit IgG production via IL-21 in systemic autoimmunity. *J. Exp. Med.* *205*, 2873–2886.
- Odendahl, M., Jacobi, A., Hansen, A., Feist, E., Hiepe, F., Burmester, G.R., Lipsky, P.E., Radbruch, A., and Dörner, T. (2000). Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *165*, 5970–5979.
- Odhams, C.A., Cortini, A., Chen, L., Roberts, A.L., Viñuela, A., Buil, A., Small, K.S., Dermitzakis, E.T., Morris, D.L., Vyse, T.J., et al. (2017). Mapping eQTLs with RNA-seq reveals novel susceptibility genes, non-coding RNAs and alternative-splicing events in systemic lupus erythematosus. *Hum. Mol. Genet.* *26*, 1003–1017.
- Okazaki, T., and Honjo, T. (2007). PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int. Immunol.* *19*, 813–824.

- Oki, M., Watanabe, N., Owada, T., Oya, Y., Ikeda, K., Saito, Y., Matsumura, R., Seto, Y., Iwamoto, I., and Nakajima, H. (2011). A functional polymorphism in B and T lymphocyte attenuator is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis. *Clin. Dev. Immunol.* *2011*, 305656.
- Otsuki, N., Kamimura, Y., Hashiguchi, M., and Azuma, M. (2006). Expression and function of the B and T lymphocyte attenuator (BTLA/CD272) on human T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *344*, 1121–1127.
- Ou, X., Xu, S., and Lam, K.-P. (2012). Deficiency in TNFRSF13B (TACI) expands T-follicular helper and germinal center B cells via increased ICOS-ligand expression but impairs plasma cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 15401–15406.
- Owada, T., Watanabe, N., Oki, M., Oya, Y., Saito, Y., Saito, T., Iwamoto, I., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Nakajima, H. (2010a). Activation-induced accumulation of B and T lymphocyte attenuator at the immunological synapse in CD4+ T cells. *J. Leukoc. Biol.* *87*, 425–432.
- Owada, T., Watanabe, N., Oki, M., Oya, Y., Saito, Y., Saito, T., Iwamoto, I., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Nakajima, H. (2010b). Activation-induced accumulation of B and T lymphocyte attenuator at the immunological synapse in CD4+ T cells. *J. Leukoc. Biol.* *87*, 425–432.
- Oya, Y., Watanabe, N., Owada, T., Oki, M., Hirose, K., Suto, A., Kagami, S., Nakajima, H., Kishimoto, T., Iwamoto, I., et al. (2008a). Development of Autoimmune Hepatitis-like Disease and Autoantibody Production to Nuclear Antigens in Mice Lacking B and T Lymphocyte Attenuator (BTLA). *Arthritis Rheum.* *58*, 2498–2510.
- Oya, Y., Watanabe, N., Owada, T., Oki, M., Hirose, K., Suto, A., Kagami, S., Nakajima, H., Kishimoto, T., Iwamoto, I., et al. (2008b). Development of Autoimmune Hepatitis-like Disease and Autoantibody Production to Nuclear Antigens in Mice Lacking B and T Lymphocyte Attenuator (BTLA). *Arthritis Rheum.* *58*, 2498–2510.
- Oya, Y., Watanabe, N., Kobayashi, Y., Owada, T., Oki, M., Ikeda, K., Suto, A., Kagami, S., Hirose, K., Kishimoto, T., et al. (2011a). Lack of B and T lymphocyte attenuator exacerbates autoimmune disorders and induces Fas-independent liver injury in MRL-lpr/lpr mice. *Int. Immunol.* *23*, 335–344.
- Oya, Y., Watanabe, N., Kobayashi, Y., Owada, T., Oki, M., Ikeda, K., Suto, A., Kagami, S., Hirose, K., Kishimoto, T., et al. (2011b). Lack of B and T lymphocyte attenuator exacerbates autoimmune disorders and induces Fas-independent liver injury in MRL-lpr/lpr mice. *Int. Immunol.* *23*, 335–344.
- Ozaki, K., Spolski, R., Feng, C.G., Qi, C.-F., Cheng, J., Sher, A., Morse, H.C., Liu, C., Schwartzberg, P.L., and Leonard, W.J. (2002). A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* *298*, 1630–1634.
- Ozaki, K., Spolski, R., Ettinger, R., Kim, H.-P., Wang, G., Qi, C.-F., Hwu, P., Shaffer, D.J., Akilesh, S., Roopenian, D.C., et al. (2004). Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 5361–5371.
- Pagès, F., Ragueneau, M., Rottapel, R., Truneh, A., Nunes, J., Imbert, J., and Olive, D. (1994). Binding of phosphatidylinositol-3-OH kinase to CD28 is required for T-cell signalling. *Nature* *369*, 327–329.
- Pan, X., Yuan, X., Zheng, Y., Wang, W., Shan, J., Lin, F., Jiang, G., Yang, Y.H., Wang, D., Xu, D., et al. (2012a). Increased CD45RA+ FoxP3(low) regulatory T cells with impaired suppressive function in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One* *7*, e34662.

- Pan, Y., Jia, T., Zhang, Y., Zhang, K., Zhang, R., Li, J., and Wang, L. (2012b). MS2 VLP-based delivery of microRNA-146a inhibits autoantibody production in lupus-prone mice. *Int. J. Nanomedicine* 7, 5957–5967.
- Papadimitraki, E.D., Choulaki, C., Koutala, E., Bertias, G., Tsatsanis, C., Gergianaki, I., Raptopoulou, A., Kritikos, H.D., Mamalaki, C., Sidiropoulos, P., et al. (2006). Expansion of toll-like receptor 9-expressing B cells in active systemic lupus erythematosus: implications for the induction and maintenance of the autoimmune process. *Arthritis Rheum.* 54, 3601–3611.
- Parks, C.G., Cooper, G.S., Hudson, L.L., Dooley, M.A., Treadwell, E.L., St Clair, E.W., Gilkeson, G.S., and Pandey, J.P. (2005). Association of Epstein-Barr virus with systemic lupus erythematosus: effect modification by race, age, and cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 genotype. *Arthritis Rheum.* 52, 1148–1159.
- Pasero, C., Speiser, D.E., Derré, L., and Olive, D. (2012). The HVEM network: new directions in targeting novel costimulatory/co-inhibitory molecules for cancer therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 478–485.
- Patole, P.S., Pawar, R.D., Lichtnekert, J., Lech, M., Kulkarni, O.P., Ramanjaneyulu, A., Segerer, S., and Anders, H.-J. (2007). Coactivation of Toll-like receptor-3 and -7 in immune complex glomerulonephritis. *J. Autoimmun.* 29, 52–59.
- Patschan, S., Dolff, S., Kribben, A., Dürig, J., Patschan, D., Wilde, B., Specker, C., Philipp, T., and Witzke, O. (2006). CD134 expression on CD4+ T cells is associated with nephritis and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 145, 235–242.
- Pelletier, N., McHeyzer-Williams, L.J., Wong, K.A., Urich, E., Fazilleau, N., and McHeyzer-Williams, M.G. (2010). Plasma cells negatively regulate the follicular helper T cell program. *Nat. Immunol.* 11, 1110–1118.
- Pierer, M., Schulz, A., Rossol, M., Kendzia, E., Kyburz, D., Haentzschel, H., Baerwald, C., and Wagner, U. (2009). Herpesvirus entry mediator-Ig treatment during immunization aggravates rheumatoid arthritis in the collagen-induced arthritis model. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 3139–3145.
- Pimentel-Quiroz, V.R., Ugarte-Gil, M.F., and Alarcón, G.S. (2016). Abatacept for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Expert Opin. Investig. Drugs* 25, 493–499.
- Pisetsky, D.S. (2000). Anti-DNA and autoantibodies. *Curr. Opin. Rheumatol.* 12, 364–368.
- Prasad, K.V., Cai, Y.C., Raab, M., Duckworth, B., Cantley, L., Shoelson, S.E., and Rudd, C.E. (1994). T-cell antigen CD28 interacts with the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase by a cytoplasmic Tyr(P)-Met-Xaa-Met motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 2834–2838.
- Pratama, A., Srivastava, M., Williams, N.J., Papa, I., Lee, S.K., Dinh, X.T., Hutloff, A., Jordan, M.A., Zhao, J.L., Casellas, R., et al. (2015). MicroRNA-146a regulates ICOS-ICOSL signalling to limit accumulation of T follicular helper cells and germinal centres. *Nat. Commun.* 6, 6436.
- Preble, O.T., Black, R.J., Friedman, R.M., Klippel, J.H., and Vilcek, J. (1982). Systemic lupus erythematosus: presence in human serum of an unusual acid-labile leukocyte interferon. *Science* 216, 429–431.

Prokunina, L., Castillejo-López, C., Oberg, F., Gunnarsson, I., Berg, L., Magnusson, V., Brookes, A.J., Tentler, D., Kristjansdóttir, H., Gröndal, G., et al. (2002). A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat. Genet.* 32, 666–669.

Qi, H., Cannons, J.L., Klauschen, F., Schwartzberg, P.L., and Germain, R.N. (2008). SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* 455, 764–769.

Rankin, A.L., MacLeod, H., Keegan, S., Andreyeva, T., Lowe, L., Bloom, L., Collins, M., Nickerson-Nutter, C., Young, D., and Guay, H. (2011). IL-21 receptor is critical for the development of memory B cell responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 667–674.

Rankin, A.L., Guay, H., Herber, D., Bertino, S.A., Duzanski, T.A., Carrier, Y., Keegan, S., Senices, M., Stedman, N., Ryan, M., et al. (2012). IL-21 receptor is required for the systemic accumulation of activated B and T lymphocytes in MRL/MpJ-Fas(lpr/lpr)/J mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 1656–1667.

Rauen, T., Hedrich, C.M., Juang, Y.-T., Tenbrock, K., and Tsokos, G.C. (2011). cAMP-responsive element modulator (CREM) α protein induces interleukin 17A expression and mediates epigenetic alterations at the interleukin-17A gene locus in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Biol. Chem.* 286, 43437–43446.

Ray, A., and Dittel, B.N. (2017). Mechanisms of Regulatory B cell Function in Autoimmune and Inflammatory Diseases beyond IL-10. *J. Clin. Med.* 6.

Reininger, L., Radaszkiewicz, T., Kosco, M., Melchers, F., and Rolink, A.G. (1992). Development of autoimmune disease in SCID mice populated with long-term “in vitro” proliferating (NZB x NZW)F1 pre-B cells. *J. Exp. Med.* 176, 1343–1353.

Riella, L.V., Paterson, A.M., Sharpe, A.H., and Chandraker, A. (2012). Role of the PD-1 pathway in the immune response. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 12, 2575–2587.

del Rio, M.-L., Kurtz, J., Perez-Martinez, C., Ghosh, A., Perez-Simon, J.A., and Rodriguez-Barbosa, J.-I. (2011). B- and T-lymphocyte attenuator targeting protects against the acute phase of graft versus host reaction by inhibiting donor anti-host cytotoxicity. *Transplantation* 92, 1085–1093.

del Rio, M.-L., Jones, N.D., Buhler, L., Norris, P., Shintani, Y., Ware, C.F., and Rodriguez-Barbosa, J.-I. (2012). Selective blockade of herpesvirus entry mediator-B and T lymphocyte attenuator pathway ameliorates acute graft-versus-host reaction. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 4885–4896.

Ritthipichai, K., Haymaker, C.L., Martinez, M., Aschenbrenner, A., Yi, X., Zhang, M., Kale, C., Vence, L.M., Roszik, J., Hailemichael, Y., et al. (2017). Multifaceted Role of BTLA in the Control of CD8+ T-cell Fate after Antigen Encounter. *Clin. Cancer Res.*

Rodriguez, A., Vigorito, E., Clare, S., Warren, M.V., Couttet, P., Soond, D.R., van Dongen, S., Grocock, R.J., Das, P.P., Miska, E.A., et al. (2007). Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 316, 608–611.

Rodriguez-Barbosa, J.-I., Fernandez-Renedo, C., Moral, A.M.B., Bühler, L., and Del Rio, M.-L. (2017). T follicular helper expansion and humoral-mediated rejection are independent of the HVEM/BTLA pathway. *Cell. Mol. Immunol.* 14, 497–510.

- Rooney, I.A., Butrovich, K.D., Glass, A.A., Borboroglu, S., Benedict, C.A., Whitbeck, J.C., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., and Ware, C.F. (2000). The lymphotoxin-beta receptor is necessary and sufficient for LIGHT-mediated apoptosis of tumor cells. *J. Biol. Chem.* *275*, 14307–14315.
- Rosser, E.C., and Mauri, C. (2015). Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity* *42*, 607–612.
- Rudd, C.E., Taylor, A., and Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol. Rev.* *229*, 12–26.
- Ryder, M., Callahan, M., Postow, M.A., Wolchok, J., and Fagin, J.A. (2014). Endocrine-related adverse events following ipilimumab in patients with advanced melanoma: a comprehensive retrospective review from a single institution. *Endocr. Relat. Cancer* *21*, 371–381.
- Sage, P.T., and Sharpe, A.H. (2015). T follicular regulatory cells in the regulation of B cell responses. *Trends Immunol.* *36*, 410–418.
- Sage, P.T., Francisco, L.M., Carman, C.V., and Sharpe, A.H. (2013). The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood. *Nat. Immunol.* *14*, 152–161.
- Sage, P.T., Paterson, A.M., Lovitch, S.B., and Sharpe, A.H. (2014a). The coinhibitory receptor CTLA-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T regulatory cells. *Immunity* *41*, 1026–1039.
- Sage, P.T., Alvarez, D., Godec, J., von Andrian, U.H., and Sharpe, A.H. (2014b). Circulating T follicular regulatory and helper cells have memory-like properties. *J. Clin. Invest.* *124*, 5191–5204.
- Sage, P.T., Ron-Harel, N., Juneja, V.R., Sen, D.R., Maleri, S., Sungnak, W., Kuchroo, V.K., Haining, W.N., Chevrier, N., Haigis, M., et al. (2016). Suppression by TFR cells leads to durable and selective inhibition of B cell effector function. *Nat. Immunol.* *17*, 1436–1446.
- Sakoda, Y., Park, J.-J., Zhao, Y., Kuramasu, A., Geng, D., Liu, Y., Davila, E., and Tamada, K. (2011). Dichotomous regulation of GVHD through bidirectional functions of the BTLA-HVEM pathway. *Blood* *117*, 2506–2514.
- Salek-Ardakani, S., Choi, Y.S., Rafii-El-Idrissi Benhnia, M., Flynn, R., Arens, R., Shoenberger, S., Crotty, S., Croft, M., and Salek-Ardakani, S. (2011). B cell-specific expression of B7-2 is required for follicular Th cell function in response to vaccinia virus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 5294–5303.
- Salomon, B., Lenschow, D.J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A., and Bluestone, J.A. (2000). B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* *12*, 431–440.
- Santiago-Raber, M.-L., Baccala, R., Haraldsson, K.M., Choubey, D., Stewart, T.A., Kono, D.H., and Theofilopoulos, A.N. (2003). Type-I interferon receptor deficiency reduces lupus-like disease in NZB mice. *J. Exp. Med.* *197*, 777–788.
- Sasai, M., Linehan, M.M., and Iwasaki, A. (2010). Bifurcation of Toll-like receptor 9 signaling by adaptor protein 3. *Science* *329*, 1530–1534.
- Sawalha, A.H., Kaufman, K.M., Kelly, J.A., Adler, A.J., Aberle, T., Kilpatrick, J., Wakeland, E.K., Li, Q.-Z., Wandstrat, A.E., Karp, D.R., et al. (2008). Genetic association of interleukin-21 polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* *67*, 458–461.

- Scalapino, K.J., Tang, Q., Bluestone, J.A., Bonyhadi, M.L., and Daikh, D.I. (2006). Suppression of disease in New Zealand Black/New Zealand White lupus-prone mice by adoptive transfer of ex vivo expanded regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 1451–1459.
- Schmitt, N., Morita, R., Bourdery, L., Bentebibel, S.E., Zurawski, S.M., Banchereau, J., and Ueno, H. (2009). Human dendritic cells induce the differentiation of interleukin-21-producing T follicular helper-like cells through interleukin-12. *Immunity* *31*, 158–169.
- Schneider, H., and Rudd, C.E. (2014). Diverse mechanisms regulate the surface expression of immunotherapeutic target *ctla-4*. *Front. Immunol.* *5*, 619.
- Schneider, H., Cai, Y.C., Prasad, K.V., Shoelson, S.E., and Rudd, C.E. (1995). T cell antigen CD28 binds to the GRB-2/SOS complex, regulators of p21ras. *Eur. J. Immunol.* *25*, 1044–1050.
- Schweighoffer, E., Vanes, L., Nys, J., Cantrell, D., McCleary, S., Smithers, N., and Tybulewicz, V.L.J. (2013). The BAFF receptor transduces survival signals by co-opting the B cell receptor signaling pathway. *Immunity* *38*, 475–488.
- Sedy, J.R., Gavrieli, M., Potter, K.G., Hurchla, M.A., Lindsley, R.C., Hildner, K., Scheu, S., Pfeffer, K., Ware, C.F., Murphy, T.L., et al. (2005). B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat. Immunol.* *6*, 90–98.
- Šedý, J.R., Bjordahl, R.L., Bekiaris, V., Macauley, M.G., Ware, B.C., Norris, P.S., Lurain, N.S., Benedict, C.A., and Ware, C.F. (2013). CD160 Activation by Herpesvirus Entry Mediator Augments Inflammatory Cytokine Production and Cytolytic Function by NK Cells. *J. Immunol.* *191*, 828–836.
- Šedý, J.R., Balmert, M.O., Ware, B.C., Smith, W., Nemčovičova, I., Norris, P.S., Miller, B.R., Aivazian, D., and Ware, C.F. (2017). A herpesvirus entry mediator mutein with selective agonist action for the inhibitory receptor B and T lymphocyte attenuator. *J. Biol. Chem.*
- Sega, E.I., Leveson-Gower, D.B., Florek, M., Schneidawind, D., Luong, R.H., and Negrin, R.S. (2014). Role of Lymphocyte Activation Gene-3 (Lag-3) in Conventional and Regulatory T Cell Function in Allogeneic Transplantation. *PLoS ONE* *9*.
- Seo, S., Fields, M.L., Buckler, J.L., Reed, A.J., Mandik-Nayak, L., Nish, S.A., Noelle, R.J., Turka, L.A., Finkelman, F.D., Caton, A.J., et al. (2002). The impact of T helper and T regulatory cells on the regulation of anti-double-stranded DNA B cells. *Immunity* *16*, 535–546.
- Serriari, N.-E., Gondois-Rey, F., Guillaume, Y., Remmerswaal, E.B.M., Pastor, S., Messal, N., Truneh, A., Hirsch, I., Lier, R.A.W. van, and Olive, D. (2010a). B and T Lymphocyte Attenuator Is Highly Expressed on CMV-Specific T Cells during Infection and Regulates Their Function. *J. Immunol.* *185*, 3140–3148.
- Serriari, N.-E., Gondois-Rey, F., Guillaume, Y., Remmerswaal, E.B.M., Pastor, S., Messal, N., Truneh, A., Hirsch, I., Lier, R.A.W. van, and Olive, D. (2010b). B and T Lymphocyte Attenuator Is Highly Expressed on CMV-Specific T Cells during Infection and Regulates Their Function. *J. Immunol.* *185*, 3140–3148.
- Shankar, E.M., Che, K.F., Messmer, D., Lifson, J.D., and Larsson, M. (2011). Expression of a broad array of negative costimulatory molecules and Blimp-1 in T cells following priming by HIV-1 pulsed dendritic cells. *Mol. Med. Camb. Mass* *17*, 229–240.

- Sharabi, A., Kasper, I.R., and Tsokos, G.C. (2017). The serine/threonine protein phosphatase 2A controls autoimmunity. *Clin. Immunol. Orlando Fla.*
- Sharpe, A.H., and Freeman, G.J. (2002). The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 116–126.
- Sheppard, K.-A., Fitz, L.J., Lee, J.M., Benander, C., George, J.A., Wooters, J., Qiu, Y., Jussif, J.M., Carter, L.L., Wood, C.R., et al. (2004). PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett.* 574, 37–41.
- Sherwood, E.R., and Hotchkiss, R.S. (2013). BTLA as a biomarker and mediator of sepsis-induced immunosuppression. *Crit. Care Lond. Engl.* 17, 1022.
- Shubin, N.J., Chung, C.S., Heffernan, D.S., Irwin, L.R., Monaghan, S.F., and Ayala, A. (2012). BTLA expression contributes to septic morbidity and mortality by inducing innate inflammatory cell dysfunction. *J. Leukoc. Biol.* 92, 593–603.
- Shubin, N.J., Monaghan, S.F., Heffernan, D.S., Chung, C.-S., and Ayala, A. (2013). B and T lymphocyte attenuator expression on CD4+ T-cells associates with sepsis and subsequent infections in ICU patients. *Crit. Care Lond. Engl.* 17, R276.
- Sibilia, J., and Pasquali, J.-L. (2008). [Systemic lupus erythematosus: news and therapeutic perspectives]. *Presse Medicale Paris Fr.* 1983 37, 444–459.
- Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835–1837.
- Simpson, N., Gatenby, P.A., Wilson, A., Malik, S., Fulcher, D.A., Tangye, S.G., Manku, H., Vyse, T.J., Roncador, G., Huttley, G.A., et al. (2010). Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 62, 234–244.
- Smith, C.K., and Kaplan, M.J. (2015). The role of neutrophils in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Rheumatol.* 27, 448–453.
- Smith-Bouvier, D.L., Divekar, A.A., Sasidhar, M., Du, S., Tiwari-Woodruff, S.K., King, J.K., Arnold, A.P., Singh, R.R., and Voskuhl, R.R. (2008). A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 205, 1099–1108.
- Spolski, R., and Leonard, W.J. (2008). Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 57–79.
- Stauss, D., Brunner, C., Berberich-Siebelt, F., Höpken, U.E., Lipp, M., and Müller, G. (2016). The transcriptional coactivator Bob1 promotes the development of follicular T helper cells via Bcl6. *EMBO J.* 35, 881–898.
- Steinberg, M.W., Turovskaya, O., Shaikh, R.B., Kim, G., McCole, D.F., Pfeffer, K., Murphy, K.M., Ware, C.F., and Kronenberg, M. (2008). A crucial role for HVEM and BTLA in preventing intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 205, 1463–1476.
- Steinmetz, O.M., Turner, J.-E., Paust, H.-J., Lindner, M., Peters, A., Heiss, K., Velden, J., Hopfer, H., Fehr, S., Krieger, T., et al. (2009). CXCR3 mediates renal Th1 and Th17 immune response in murine lupus nephritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 4693–4704.

Stewart, J.J. (1998). The female X-inactivation mosaic in systemic lupus erythematosus. *Immunol. Today* 19, 352–357.

Stone, E.L., Pepper, M., Katayama, C.D., Kerdiles, Y.M., Lai, C.-Y., Emslie, E., Lin, Y.C., Yang, E., Goldrath, A.W., Li, M.O., et al. (2015). ICOS coreceptor signaling inactivates the transcription factor FOXO1 to promote Tfh cell differentiation. *Immunity* 42, 239–251.

Strickland, F.M., Hewagama, A., Wu, A., Sawalha, A.H., Delaney, C., Hoeltzel, M.F., Yung, R., Johnson, K., Mickelson, B., and Richardson, B.C. (2013). Diet influences expression of autoimmune-associated genes and disease severity by epigenetic mechanisms in a transgenic mouse model of lupus. *Arthritis Rheum.* 65, 1872–1881.

Su, W., Fan, H., Chen, M., Wang, J., Brand, D., He, X., Quesniaux, V., Ryffel, B., Zhu, L., Liang, D., et al. (2012). Induced CD4+ forkhead box protein-positive T cells inhibit mast cell function and established contact hypersensitivity through TGF- β 1. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130, 444–452.e7.

Subramanian, S., Tus, K., Li, Q.-Z., Wang, A., Tian, X.-H., Zhou, J., Liang, C., Bartov, G., McDaniel, L.D., Zhou, X.J., et al. (2006). A Tlr7 translocation accelerates systemic autoimmunity in murine lupus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9970–9975.

Suso, J.P., Posso-Osorio, I., Jiménez, C.A., Naranjo-Escobar, J., Ospina, F.E., Sánchez, A., Cañas, C.A., and Tobón, G.J. (2017). Profile of BAFF and its receptors' expression in lupus nephritis is associated with pathological classes. *Lupus* 961203317739132.

Suurmond, J., Calise, J., Malkiel, S., and Diamond, B. (2016). DNA-reactive B cells in lupus. *Curr. Opin. Immunol.* 43, 1–7.

Svensson, B.O. (1975). Serum factors causing impaired macrophage function in systemic lupus erythematosus. *Scand. J. Immunol.* 4, 145–150.

Szabó, K., Papp, G., Szántó, A., Tarr, T., and Zeher, M. (2016). A comprehensive investigation on the distribution of circulating follicular T helper cells and B cell subsets in primary Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 183, 76–89.

Tada, Y., Nagasawa, K., Ho, A., Morito, F., Koarada, S., Ushiyama, O., Suzuki, N., Ohta, A., and Mak, T.W. (1999). Role of the costimulatory molecule CD28 in the development of lupus in MRL/lpr mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 163, 3153–3159.

Takahashi, H., Kanno, T., Nakayamada, S., Hirahara, K., Sciumè, G., Muljo, S.A., Kuchen, S., Casellas, R., Wei, L., Kanno, Y., et al. (2012). TGF- β and retinoic acid induce the microRNA miR-10a, which targets Bcl-6 and constrains the plasticity of helper T cells. *Nat. Immunol.* 13, 587–595.

Takei, H., Araki, A., Watanabe, H., Ichinose, A., and Sendo, F. (1996). Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J. Leukoc. Biol.* 59, 229–240.

Tamachi, T., Watanabe, N., Oya, Y., Kagami, S.-I., Hirose, K., Saito, Y., Iwamoto, I., and Nakajima, H. (2007). B and T lymphocyte attenuator inhibits antigen-induced eosinophil recruitment into the airways. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 143 Suppl 1, 50–55.

Tang, Y., Luo, X., Cui, H., Ni, X., Yuan, M., Guo, Y., Huang, X., Zhou, H., de Vries, N., Tak, P.P., et al. (2009). MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum.* 60, 1065–1075.

Tao, R., Wang, L., Murphy, K.M., Fraser, C.C., and Hancock, W.W. (2008). Regulatory T Cell Expression of Herpesvirus Entry Mediator Suppresses the Function of B and T Lymphocyte Attenuator-Positive Effector T Cells. *J. Immunol.* *180*, 6649–6655.

Teruel, M., and Alarcón-Riquelme, M.E. (2016). The genetic basis of systemic lupus erythematosus: What are the risk factors and what have we learned. *J. Autoimmun.* *74*, 161–175.

Thai, T.-H., Patterson, H.C., Pham, D.-H., Kis-Toth, K., Kaminski, D.A., and Tsokos, G.C. (2013). Deletion of microRNA-155 reduces autoantibody responses and alleviates lupus-like disease in the Fas(lpr) mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 20194–20199.

Thibult, M.-L., Mamessier, E., Gertner-Dardenne, J., Pastor, S., Just-Landi, S., Xerri, L., Chetaille, B., and Olive, D. (2013a). PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *Int. Immunol.* *25*, 129–137.

Thibult, M.-L., Rivals, J.-P., Mamessier, E., Gertner-Dardenne, J., Pastor, S., Speiser, D.E., Derré, L., and Olive, D. (2013b). CpG-ODN-induced sustained expression of BTLA mediating selective inhibition of human B cells. *J. Mol. Med.* *91*, 195–205.

Thibult, M.-L., Rivals, J.-P., Mamessier, E., Gertner-Dardenne, J., Pastor, S., Speiser, D.E., Derré, L., and Olive, D. (2013c). CpG-ODN-induced sustained expression of BTLA mediating selective inhibition of human B cells. *J. Mol. Med.* *91*, 195–205.

Thompson, C.B., and Allison, J.P. (1997). The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. *Immunity* *7*, 445–450.

Tian, C., Liu, Y.-G., Yan, J.-K., Liu, S.-D., Zhao, S.-T., and Wang, H.-W. (2013). B- and T-lymphocyte attenuator/herpes virus entry mediator as early indicators for acute rejection following kidney transplantation. *Transplant. Proc.* *45*, 157–162.

Tomer, Y., Buskila, D., and Shoenfeld, Y. (1993). Pathogenic significance and diagnostic value of lupus autoantibodies. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *100*, 293–306.

Truong, W., Plester, J.C., Hancock, W.W., Merani, S., Murphy, T.L., Murphy, K.M., Kaye, J., Anderson, C.C., and Shapiro, A.M.J. (2007). Combined coinhibitory and costimulatory modulation with anti-BTLA and CTLA4lg facilitates tolerance in murine islet allografts. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *7*, 2663–2674.

Truong, W., Hancock, W.W., Plester, J.C., Merani, S., Rayner, D.C., Thangavelu, G., Murphy, K.M., Anderson, C.C., and Shapiro, A.M.J. (2009). BTLA targeting modulates lymphocyte phenotype, function, and numbers and attenuates disease in nonobese diabetic mice. *J. Leukoc. Biol.* *86*, 41–51.

Tsai, P.-C., Ko, Y.-C., Huang, W., Liu, H.-S., and Guo, Y.L. (2007). Increased liver and lupus mortalities in 24-year follow-up of the Taiwanese people highly exposed to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans. *Sci. Total Environ.* *374*, 216–222.

Tsokos, G.C., and Kammer, G.M. (2000). Molecular aberrations in human systemic lupus erythematosus. *Mol. Med. Today* *6*, 418–424.

Tsuda, M., Torgerson, T.R., Selmi, C., Gambineri, E., Carneiro-Sampaio, M., Mannurita, S.C., Leung, P.S.C., Norman, G.L., and Gershwin, M.E. (2010). The spectrum of autoantibodies in IPEX syndrome is broad and includes anti-mitochondrial autoantibodies. *J. Autoimmun.* *35*, 265–268.

- Tulunay, A., Yavuz, S., Direskeneli, H., and Eksioglu-Demiralp, E. (2008). CD8+CD28-, suppressive T cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 17, 630–637.
- Uchiyama, M., Jin, X., Matsuda, H., Bashuda, H., Imazuru, T., Shimokawa, T., Yagita, H., and Niimi, M. (2014a). An agonistic anti-BTLA mAb (3C10) induced generation of IL-10-dependent regulatory CD4+ T cells and prolongation of murine cardiac allograft. *Transplantation* 97, 301–309.
- Uchiyama, M., Jin, X., Matsuda, H., Bashuda, H., Imazuru, T., Shimokawa, T., Yagita, H., and Niimi, M. (2014b). An agonistic anti-BTLA mAb (3C10) induced generation of IL-10-dependent regulatory CD4+ T cells and prolongation of murine cardiac allograft. *Transplantation* 97, 301–309.
- Ueno, H., Banchereau, J., and Vinuesa, C.G. (2015). Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. *Nat. Immunol.* 16, 142–152.
- Valencia, X., Yarboro, C., Illei, G., and Lipsky, P.E. (2007). Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 2579–2588.
- Vaughn, S.E., Kottyan, L.C., Munroe, M.E., and Harley, J.B. (2012). Genetic susceptibility to lupus: the biological basis of genetic risk found in B cell signaling pathways. *J. Leukoc. Biol.* 92, 577–591.
- Vendel, A.C., Calemine-Fenaux, J., Izrael-Tomasevic, A., Chauhan, V., Arnott, D., and Eaton, D.L. (2009a). B and T lymphocyte attenuator regulates B cell receptor signaling by targeting Syk and BLNK. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 1509–1517.
- Vendel, A.C., Calemine-Fenaux, J., Izrael-Tomasevic, A., Chauhan, V., Arnott, D., and Eaton, D.L. (2009b). B and T Lymphocyte Attenuator Regulates B Cell Receptor Signaling by Targeting Syk and BLNK. *J. Immunol.* 182, 1509–1517.
- Venigalla, R.K.C., Tretter, T., Krienke, S., Max, R., Eckstein, V., Blank, N., Fiehn, C., Ho, A.D., and Lorenz, H.-M. (2008). Reduced CD4+,CD25- T cell sensitivity to the suppressive function of CD4+,CD25high,CD127 -/low regulatory T cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 58, 2120–2130.
- Vinuesa, C.G., Cook, M.C., Angelucci, C., Athanasopoulos, V., Rui, L., Hill, K.M., Yu, D., Domaschenz, H., Whittle, B., Lambe, T., et al. (2005). A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature* 435, 452–458.
- Vugmeyster, Y., Guay, H., Szklut, P., Qian, M.D., Jin, M., Widom, A., Spaulding, V., Bennett, F., Lowe, L., Andreyeva, T., et al. (2010). In vitro potency, pharmacokinetic profiles, and pharmacological activity of optimized anti-IL-21R antibodies in a mouse model of lupus. *MAbs* 2, 335–346.
- Walker, L.S., Gulbranson-Judge, A., Flynn, S., Brocker, T., Raykundalia, C., Goodall, M., Förster, R., Lipp, M., and Lane, P. (1999). Compromised OX40 function in CD28-deficient mice is linked with failure to develop CXC chemokine receptor 5-positive CD4 cells and germinal centers. *J. Exp. Med.* 190, 1115–1122.
- Wallin, J.J., Liang, L., Bakardjiev, A., and Sha, W.C. (2001). Enhancement of CD8+ T cell responses by ICOS/B7h costimulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 132–139.
- Wang, F., Roberts, S.M., Butfiloski, E.J., Morel, L., and Sobel, E.S. (2007a). Acceleration of autoimmunity by organochlorine pesticides: a comparison of splenic B-cell effects of chlordecone and estradiol in (NZBxNZW)F1 mice. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 99, 141–152.

- Wang, G.S., Zhang, M., Li, X.P., Zhang, H., Chen, W., Kan, M., and Wang, Y.M. (2009). Ultraviolet B exposure of peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus inhibits DNA methylation. *Lupus* 18, 1037–1044.
- Wang, H., Wu, B., Li, L., Hu, L., Lin, J., Jiang, C., Cai, G., and Shen, Q. (2017). Hepatic expansion of virus-specific CD8(+)BTLA(+) T cells with regulatory properties in chronic hepatitis B virus infection. *Cell. Immunol.* 311, 36–45.
- Wang, J., Shan, Y., Jiang, Z., Feng, J., Li, C., Ma, L., and Jiang, Y. (2013). High frequencies of activated B cells and T follicular helper cells are correlated with disease activity in patients with new-onset rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 174, 212–220.
- Wang, X.-F., Yuan, S.-L., Jiang, L., Zhang, X.-L., Li, S.-F., Guo, Y., Wu, C.-L., and Chen, J.-J. (2007b). [Changes of serum BAFF and IL-21 levels in patients with systemic lupus erythematosus and their clinical significance]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi Chin. J. Cell. Mol. Immunol.* 23, 1041–1042.
- Wang, X.-F., Chen, Y.-J., Wang, Q., Ge, Y., Dai, Q., Yang, K.-F., Fang-Xie, null, Zhou, Y.-H., Hu, Y.-M., Mao, Y.-X., et al. (2007c). Distinct expression and inhibitory function of B and T lymphocyte attenuator on human T cells. *Tissue Antigens* 69, 145–153.
- Watanabe, N., and Nakajima, H. (2012). Coinhibitory Molecules in Autoimmune Diseases. *Clin. Dev. Immunol.* 2012.
- Watanabe, N., Gavrieli, M., Sedy, J.R., Yang, J., Fallarino, F., Loftin, S.K., Hurchla, M.A., Zimmerman, N., Sim, J., Zang, X., et al. (2003a). BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat. Immunol.* 4, 670–679.
- Watanabe, N., Gavrieli, M., Sedy, J.R., Yang, J., Fallarino, F., Loftin, S.K., Hurchla, M.A., Zimmerman, N., Sim, J., Zang, X., et al. (2003b). BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat. Immunol.* 4, 670–679.
- Webb, R., Merrill, J.T., Kelly, J.A., Sestak, A., Kaufman, K.M., Langefeld, C.D., Ziegler, J., Kimberly, R.P., Edberg, J.C., Ramsey-Goldman, R., et al. (2009). A polymorphism within IL21R confers risk for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 60, 2402–2407.
- Wei, C., Anolik, J., Cappione, A., Zheng, B., Pugh-Bernard, A., Brooks, J., Lee, E.-H., Milner, E.C.B., and Sanz, I. (2007). A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 6624–6633.
- Weinstein, J.S., Laidlaw, B.J., Lu, Y., Wang, J.K., Schulz, V.P., Li, N., Herman, E.I., Kaech, S.M., Gallagher, P.G., and Craft, J. (2017). STAT4 and T-bet control follicular helper T cell development in viral infections. *J. Exp. Med.* jem.20170457.
- Weiss, A., and Littman, D.R. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76, 263–274.
- Wen, Y., Yang, B., Lu, J., Zhang, J., Yang, H., and Li, J. (2016). Imbalance of circulating CD4(+)CXCR5(+)FOXP3(+) Tfr-like cells and CD4(+)CXCR5(+)FOXP3(-) Tfh-like cells in myasthenia gravis. *Neurosci. Lett.* 630, 176–182.
- William, J., Euler, C., Christensen, S., and Shlomchik, M.J. (2002). Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. *Science* 297, 2066–2070.

- Wing, J.B., Ise, W., Kurosaki, T., and Sakaguchi, S. (2014). Regulatory T cells control antigen-specific expansion of Tfh cell number and humoral immune responses via the coreceptor CTLA-4. *Immunity* 41, 1013–1025.
- Wlaschek, M., Heinen, G., Poswig, A., Schwarz, A., Krieg, T., and Scharffetter-Kochanek, K. (1994). UVA-induced autocrine stimulation of fibroblast-derived collagenase/MMP-1 by interrelated loops of interleukin-1 and interleukin-6. *Photochem. Photobiol.* 59, 550–556.
- Wofsy, D., and Seaman, W.E. (1987). Reversal of advanced murine lupus in NZB/NZW F1 mice by treatment with monoclonal antibody to L3T4. *J. Immunol. Baltim. Md* 138, 3247–3253.
- Wong, M., La Cava, A., Singh, R.P., and Hahn, B.H. (2010). Blockade of programmed death-1 in young (New Zealand black x New Zealand white)F1 mice promotes the activity of suppressive CD8+ T cells that protect from lupus-like disease. *J. Immunol. Baltim. Md* 185, 6563–6571.
- Wong, M., La Cava, A., and Hahn, B.H. (2013). Blockade of programmed death-1 in young (New Zealand Black x New Zealand White)F1 mice promotes the suppressive capacity of CD4+ regulatory T cells protecting from lupus-like disease. *J. Immunol. Baltim. Md* 190, 5402–5410.
- Wu, T.-H., Zhen, Y., Zeng, C., Yi, H.-F., and Zhao, Y. (2007). B and T lymphocyte attenuator interacts with CD3 ζ and inhibits tyrosine phosphorylation of TCR ζ complex during T-cell activation. *Immunol. Cell Biol.* 85, 590–595.
- Wu, X., Ye, Y., Niu, J., Li, Y., Li, X., You, X., Chen, H., Zhao, L., Zeng, X., Zhang, F., et al. (2014). Defective PTEN regulation contributes to B cell hyperresponsiveness in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 6, 246ra99.
- Wu, Y., Tang, W., and Zuo, J. (2015). Toll-like receptors: potential targets for lupus treatment. *Acta Pharmacol. Sin.* 36, 1395.
- Wu, Y.-C.B., Kipling, D., and Dunn-Walters, D.K. (2011). The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood. *Front. Immunol.* 2, 81.
- Xu, B., Wang, S., Zhou, M., Huang, Y., Fu, R., Guo, C., Chen, J., Zhao, J., Gaskin, F., Fu, S.M., et al. (2017). The ratio of circulating follicular T helper cell to follicular T regulatory cell is correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 183, 46–53.
- Xu, X.-S., Zhang, Z., Gu, L.-L., and Wang, F.-S. (2009). [BTLA Characterization and its association with disease progression in patients with chronic HIV-1 infection.]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi Chin. J. Cell. Mol. Immunol.* 25, 1158–1160.
- Yang, J.-H., Zhang, J., Cai, Q., Zhao, D.-B., Wang, J., Guo, P.-E., Liu, L., Han, X.-H., and Shen, Q. (2005). Expression and function of inducible costimulator on peripheral blood T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 44, 1245–1254.
- Yang, X., Zhang, X., Sun, Y., Tu, T., Fu, M.L., Miller, M., and Fu, Y.-X. (2014). A BTLA-mediated bait and switch strategy permits *Listeria* expansion in CD8 α (+) DCs to promote long-term T cell responses. *Cell Host Microbe* 16, 68–80.
- Yu, D., Rao, S., Tsai, L.M., Lee, S.K., He, Y., Sutcliffe, E.L., Srivastava, M., Linterman, M., Zheng, L., Simpson, N., et al. (2009). The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity* 31, 457–468.

- Yu, K.Y., Kwon, B., Ni, J., Zhai, Y., Ebner, R., and Kwon, B.S. (1999). A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* *274*, 13733–13736.
- Yu, P., Lee, Y., Liu, W., Chin, R.K., Wang, J., Wang, Y., Schietinger, A., Philip, M., Schreiber, H., and Fu, Y.-X. (2004). Priming of naive T cells inside tumors leads to eradication of established tumors. *Nat. Immunol.* *5*, 141–149.
- Yung, R., Chang, S., Hemati, N., Johnson, K., and Richardson, B. (1997). Mechanisms of drug-induced lupus. IV. Comparison of procainamide and hydralazine with analogs in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum.* *40*, 1436–1443.
- Yurasov, S., Wardemann, H., Hammersen, J., Tsuiji, M., Meffre, E., Pascual, V., and Nussenzweig, M.C. (2005). Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* *201*, 703–711.
- Zandman-Goddard, G., Solomon, M., Rosman, Z., Peeva, E., and Shoenfeld, Y. (2012). Environment and lupus-related diseases. *Lupus* *21*, 241–250.
- Zhang, Q., and Vignali, D.A.A. (2016). Co-stimulatory and Co-inhibitory Pathways in Autoimmunity. *Immunity* *44*, 1034–1051.
- Zhang, M., Yu, G., Chan, B., Pearson, J.T., Rathanaswami, P., Delaney, J., Ching Lim, A., Babcook, J., Hsu, H., and Gavin, M.A. (2015a). Interleukin-21 receptor blockade inhibits secondary humoral responses and halts the progression of preestablished disease in the (NZB × NZW)F1 systemic lupus erythematosus model. *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ *67*, 2723–2731.
- Zhang, X., Lindwall, E., Gauthier, C., Lyman, J., Spencer, N., Alarakhia, A., Fraser, A., Ing, S., Chen, M., Webb-Debiege, T., et al. (2015b). Circulating CXCR5+CD4+helper T cells in systemic lupus erythematosus patients share phenotypic properties with germinal center follicular helper T cells and promote antibody production. *Lupus* *24*, 909–917.
- Zhang, Y., Zhao, M., Sawalha, A.H., Richardson, B., and Lu, Q. (2013). Impaired DNA methylation and its mechanisms in CD4(+)T cells of systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmun.* *41*, 92–99.
- Zhang, Z., Xu, X., Lu, J., Zhang, S., Gu, L., Fu, J., Jin, L., Li, H., Zhao, M., Zhang, J., et al. (2011a). B and T lymphocyte attenuator down-regulation by HIV-1 depends on type I interferon and contributes to T-cell hyperactivation. *J. Infect. Dis.* *203*, 1668–1678.
- Zhang, Z., Xu, X., Lu, J., Zhang, S., Gu, L., Fu, J., Jin, L., Li, H., Zhao, M., Zhang, J., et al. (2011b). B and T Lymphocyte Attenuator Down-regulation by HIV-1 Depends on Type I Interferon and Contributes to T-Cell Hyperactivation. *J. Infect. Dis.* *203*, 1668–1678.
- Zhao, D.-M., Thornton, A.M., DiPaolo, R.J., and Shevach, E.M. (2006). Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* *107*, 3925–3932.
- Zhou, Y., Yuan, J., Pan, Y., Fei, Y., Qiu, X., Hu, N., Luo, Y., Lei, W., Li, Y., Long, H., et al. (2009). T cell CD40LG gene expression and the production of IgG by autologous B cells in systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.* Orlando Fla *132*, 362–370.
- Zimmer, R., Scherbarth, H.R., Rillo, O.L., Gomez-Reino, J.J., and Muller, S. (2013). Lupuzor/P140 peptide in patients with systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb clinical trial. *Ann. Rheum. Dis.* *72*, 1830–1835.

Zorro, S., Arias, M., Riaño, F., Paris, S., Ramírez, L.A., Uribe, O., García, L.F., and Vásquez, G. (2009). Response to ODN-CpG by B Cells from patients with systemic lupus erythematosus correlates with disease activity. *Lupus* 18, 718–726.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ORALES

1. PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

“Follicular Helper T Cells in Systemic Lupus Erythematosus: Why Should They Be Considered as Interesting Therapeutic Targets?”

Sawaf M., Dumortier H. & Monneaux F. *Journal of Immunology Research*, 2016. 2016:5767106

“Defective BTLA functionality is rescued by restoring lipid metabolism in lupus CD4⁺ T cells”

Sawaf M., Fauny JD., Felten R., Sagez F., Gottenberg JE., Dumortier H., & Monneaux F. *Journal of Clinical Investigation Insight (in revision)*, 2018.

2. COMMUNICATIONS ORALES

Bench and Bed Immunology 2015, Fribourg, Allemagne, 15-16 Janvier 2015

“NK cell deficiency : Genetic advances and new therapeutic approaches “

EULAR Immunology Course, Lisbonne, Portugal, 1-2 Avril 2016

“Role of BTLA in Systemic Lupus Erythematosus.”

Immuno'16 : First Immunology Meeting, Strasbourg, France, 4 Octobre 2016

“Role of BTLA in Systemic Lupus Erythematosus.”

Bench and Bed Immunology 2017, Fribourg, Allemagne, 26-27 Avril 2017

“T_{FH} cells and Rheumatoid arthritis“

Upper Rhine Immunology 2017, Illkirch-Graffenstaden, France, 1 Décembre 2017

“Defective BTLA functionality is rescued by restoring lipid metabolism in lupus CD4⁺ T cells”

World Immune Regulation Meeting 2018, Davos, Suisse, 14-17 Mars 2018

“Defective BTLA functionality is rescued by restoring lipid metabolism in lupus CD4⁺ T cells”

3. POSTERS

Doctoral School Days 2016, University of Strasbourg. Strasbourg, 14 Juin 2016

“Role of BTLA in Systemic Lupus Erythematosus.”

Sawaf M., Fauny JD., Felten R., Blaison G., Gottenberg JE., Dumortier H., & Monneaux F.

Annual European Congress of Rheumatology, EULAR 2016, Londres, Royaume-Uni, 2016

“Therapeutic Interest of Anti-CD3 and Anti-BAFF monoclonal antibodies in the NOD model of Sjögren’s Syndrome”

R. Felten, L. Chatenoud, L. Magne, **M. Sawaf**, C. Seifert, H. Dumortier, F. Monneaux, J. Sibia, P. Schneider, J.-E. Gottenberg. (Poster présenté par R. Felten)

La Revue du Rhumatisme 83S (2016) A163-A304, poster électronique, Novembre 2016.

“Nouveau mécanisme d’action des inhibiteurs de la voie JAK/STAT : l’inhibition de la différenciation et de la fonction des lymphocytes T folliculaires auxiliaires“

F. Sagez; **M. Sawaf**; J. Sibia; H. Dumortier; F. Monneaux; JE. Gottenberg. (Poster réalisé par F. Sagez)

4. RECOMPENSES

Prix du meilleur poster

Doctoral School Days 2016, Strasbourg pour le poster *“Role of BTLA in Systemic Lupus Erythematosus.”*

Matthieu SAWAF

LE RECEPTEUR CO-INHIBITEUR BTLA AU COURS DU LED : ASPECTS FONDAMENTAUX ET IMPLICATIONS THERAPEUTIQUES

Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie auto-immune systémique caractérisée par une inflammation provoquant des lésions dans de nombreux organes tels que les reins, les poumons ou la peau. Dans cette pathologie, une activation excessive du système immunitaire conduit à la production d'auto-anticorps dirigés, le plus souvent, contre du matériel nucléaire. La différenciation des lymphocytes B (LB) en cellules productrices d'anticorps requiert une communication entre les LT et les LB. Ce dialogue est régulé par de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires afin de permettre la mise en place d'une réponse humorale efficace en cas d'infections, mais aussi de prévenir le développement de maladies auto-immunes.

Mon projet de thèse a consisté à étudier l'implication de deux de ces acteurs, l'un favorisant la différenciation des LB en plasmocytes, à savoir, les cellules T folliculaires auxiliaires (T_{FH}) et le second régulant négativement l'activation lymphocytaire, le récepteur co-inhibiteur BTLA (pour B and T Lymphocyte Attenuator) dans le LED chez l'Homme.

Au cours de cette étude, nous avons d'une part amélioré les connaissances concernant les sous-populations de T_{FH} circulantes humaines, en décrivant que parmi les cellules T_{FH} $CXCR3^-CCR6^-$ sont retrouvées des cellules aux propriétés suppressives. De plus, nous avons suggéré que la contraction des T_{FH1} ($CXCR3^+CCR6^-$) au profit des T_{FH2} ($CXCR3^-CCR6^-$), observées chez les patients lupiques, pourrait être le reflet d'une migration des T_{FH1} vers les organes inflammés. D'autre part, nous avons mis en évidence un défaut fonctionnel de BTLA dans les LT $CD4^+$ de patients lupiques. Ce défaut, restauré en normalisant le métabolisme lipidique des LT $CD4^+$, semble associé à la sévérité de la pathologie. En parallèle de ces observations, nous avons démontré un défaut d'expression de BTLA sur les LB et les LT $CD4^+$ régulateurs de patients lupiques.

L'ensemble de nos données sont prometteuses et ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement du LED.

Mots-clés : lupus, cellules T_{FH} , BTLA, communication T-B, régulation de la réponse B

THE CO-INHIBITORY RECEPTOR BTLA IN SLE : FUNDAMENTAL ASPECTS AND THERAPEUTIC IMPLICATIONS

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by lesions in several organs such as kidneys, lungs and skin for instance. In this pathology, an excessive activation of the immune system leads to the production of autoantibodies targeting mainly nuclear antigens. B cell differentiation into antibody-secreting cells requires a close collaboration between T and B cells. This cross-talk is regulated by various cellular and molecular factors in order to mount an efficient humoral response in case of infection, but also to prevent autoimmune disease development.

The aim of my thesis was to study two regulating factors of the B cell response, one promoting the B cell differentiation into plasma cells, i.e the follicular helper T cells (T_{FH}) and the other one inhibiting lymphocyte activation, i.e a co-inhibitory receptor called BTLA (« B and T Lymphocyte Attenuator ») in human SLE.

In this study, we first improved our knowledge concerning human circulating T_{FH} cells, by describing among the $CXCR3^-CCR6^-$ T_{FH} cell subset, a population with suppressive capacities. Moreover, we suggested that the decreased frequency of T_{FH1} in lupus patients' blood could be explained by the migration of these cells into inflamed tissues. We also highlighted a BTLA functional deficiency in lupus $CD4^+$ T cells. This deficiency, which can be restored by normalizing the lipid metabolism, seems to be associated to disease severity. Furthermore, we described an altered expression of BTLA in lupus B cells and regulatory T cells.

Altogether, our data show promising results and suggest new potential therapeutic strategies for lupus treatment.

Keywords : lupus, T_{FH} cells, BTLA, T-B interaction, B-cell response regulation