

*ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES*

*DE LA VIE ET DE LA SANTÉ*

UPR3572-CNRS

**THÈSE** présentée par :

**Christophe MACRI**

soutenue le : 18 septembre 2013

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

Discipline : Sciences du vivant - Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Spécialité : Immunologie

**Mécanisme d'action du phosphopeptide  
P140 dans la modulation de la réponse  
autoimmune du lupus**

**THÈSE dirigée par :**

**Mme MULLER Sylviane**

Professeur, université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**M. FAURE Mathias**

Professeur, université de Lyon

**M. CODOGNO Patrice]**

Docteur, université de Paris

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**M. DE LA SALLE Henri**

Docteur, université de Strasbourg

## REMERCIEMENTS

*Ce travail de thèse a été réalisé dans le laboratoire d'Immunopathologie et Chimie Thérapeutique sous la direction du Pr Sylviane Muller. Je lui suis profondément reconnaissant de m'avoir accueilli dans son équipe, de m'avoir encadré et conseillé avec passion au cours de ces trois années. Je la remercie également pour toute son aide apportée dans la réalisation de ce manuscrit.*

*Je tiens à remercier également le Conseil Régional d'Alsace et l'entreprise ImmuPharma pour le soutien financier apporté à ce projet.*

*J'adresse mes sincères remerciements au Dr Mathias Faure, au Dr Patrice Codogno et au Dr Henri de la Salle pour avoir accepté de lire et de juger ce travail de thèse.*

*Ma gratitude s'adresse aussi au Dr Jean-Paul Briand pour son implication dans le projet et son aide dans la synthèse peptidique. Je tiens également à remercier le Pr Ana Maria Cuervo et son équipe qui nous ont apporté une aide précieuse pour mesurer l'activité CMA. Je n'oublie pas non plus le Dr Alberto Bianco et son équipe de chimistes pour leur collaboration dans le projet « dendrimères-P140 ». Et bien sûr, je remercie Jean Daniel pour ses conseils en microscopie.*

*Une pensée pour mes collègues du bureau 153 pour leur bonne humeur quotidienne : Carole (il va falloir que tu rentres à pied maintenant...), Johan, Nicolas S et Benjamin. Merci aussi à Fred, le roi de l'autophagie, ainsi que Nicolas P avec qui j'ai pu travailler pendant ma première année de thèse.*

*Je n'oublie pas non plus les petits jeunes du 136 avec qui j'ai pu passer de bons moments au labo (et en dehors du labo) : Julie (je t'ai quand même mise dans la catégorie « petits jeunes » ...), Diane (ou Dina B\*\*\*\*), Maxime (merci d'avoir « embelli » mes fonds d'écran), Olga, Cinzia et Alessia.*

*J'exprime aussi mes sincères remerciements à tous les autres membres du laboratoire (et la liste est longue !) pour leur sympathie à mon égard ces trois années : Hayet, François, Hélène, Fanny, Olivier, Chris, Evelyne, Vincent, Cécilia, Monique, Delphine, Fanny B, Astrid, Eijiro, Eri, Floriane, Cécile, Suresh, Maud, Marion Vasiliki et Wojcieck. Je pense également aux membres de l'IPC Pauline, Thierry, Jean-Louis, Anne-Marie, Pierre, Sylvia, Anne, Aurélie, Dana, Léa, Sandra et Sophie (bon courage à toi aussi pour la fin de thèse). Merci aussi à Sylvie P, Isabelle et Christian pour leur gentillesse et leur disponibilité pour régler les problèmes de paperasserie.*

*Enfin, je voudrais remercier ma famille qui m'a toujours soutenu dans mes études et dans mes projets, même les plus ambitieux lorsqu'il s'agit, par exemple, de partir à l'autre bout du monde !*

# TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES ABBREVIATIONS .....</b>	<b>i</b>
<b>LISTE DES PUBLICATIONS.....</b>	<b>v</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1. LE LUPUS ERYTHEMATEUX DISSEMINE.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1. .... Biologie du lupus .....</b>	<b>2</b>
1.1.1. Généralités .....	2
1.1.1.1. Présentation de l'immunité et du lupus.....	2
1.1.1.2. Manifestations cliniques .....	3
1.1.1.3. Epidémiologie .....	6
1.1.1.4. Causes du lupus .....	6
1.1.1.4.1. Facteurs génétiques .....	6
1.1.1.4.2. Facteurs environnementaux.....	10
1.1.2. Pathogénèse du lupus.....	13
1.1.2.1. L'apoptose comme source d'autoantigènes.....	13
1.1.2.2. Activation de l'immunité innée .....	17
1.1.2.3. Activation de l'immunité adaptative.....	21
1.1.2.3.1. Les lymphocytes T dans le lupus .....	21
1.1.2.3.2. Les lymphocytes B dans le lupus.....	27
1.1.2.4. Atteinte systémique des organes provoquée par les autoanticorps.....	34
<b>1.2. Traitements du lupus.....</b>	<b>37</b>
1.2.1. Les molécules immunosuppressives.....	38
1.2.2. Les molécules ciblées .....	39
1.2.2.1. Le Belimumab.....	39
1.2.2.2. Les molécules ciblées en essais cliniques.....	41
1.2.3. Le peptide P140, un immunomodulateur du lupus...	43
1.2.3.1. Présentation.....	43
1.2.3.2. Un ligand peptidique altéré.....	45
1.2.3.3. Un inhibiteur de la chaperonne HSPA8.....	46

<b>2. LA CHAPERONNE HSPA8/HSC70 ET SON ROLE DANS L'IMMUNITE ....</b>	<b>48</b>
<b>2.1. Les protéines de choc thermique.....</b>	<b>48</b>
2.1.1. Généralités .....	48
2.1.2. Les différentes familles de HSP .....	49
2.1.2.1. HSP70 .....	49
2.1.2.2. HSP90 .....	51
<b>2.2. Fonctions moléculaires et cellulaires de HSPA8.....</b>	<b>53</b>
2.2.1. Fonctions moléculaires .....	53
2.2.1.1. Structure et activité .....	53
2.2.1.2. Les co-chaperonnes.....	55
2.2.1.2.1. <i>Les protéines à domaine J</i> .....	55
2.2.1.2.2. <i>Les NEF</i> .....	57
2.2.1.2.3. <i>Hip, Hop et Chip</i> .....	59
2.2.2. Localisation et fonctions cellulaires .....	59
2.2.2.1.1. Localisation cellulaire .....	60
2.2.2.1.2. Fonctions cellulaires .....	60
<b>2.3. Rôle de HSPA8 dans l'immunité.....</b>	<b>64</b>
2.3.1. Fonctions immunitaires de HSPA8 exogène .....	64
2.3.1.1. Activation des cellules immunitaires innées.....	64
2.3.1.2. Présentation antigénique des peptides associés .....	66
2.3.2. Fonctions immunitaires de HSPA8 endogène.....	68
2.3.2.1. Présentation antigénique .....	68
2.3.2.2. Autres fonctions immunitaires.....	69
2.3.3. Implication dans l'autoimmunité.....	70
<b>3. L'AUTOPHAGIE ET SON ROLE DANS L'IMMUNITE .....</b>	<b>72</b>
<b>3.1. Présentation de l'autophagie .....</b>	<b>72</b>
3.1.1. Généralités .....	72

3.1.2.	Mécanisme et fonctions cellulaires.....	74
3.1.2.1.	La macroautophagie.....	74
3.1.2.1.1.	<i>Mécanisme</i> .....	74
3.1.2.1.2.	<i>Régulation</i> .....	79
3.1.2.1.3.	<i>Fonctions cellulaires</i> .....	83
3.1.2.2.	L'autophagie dépendante des chaperonnes.....	86
3.1.2.2.1.	<i>Mécanisme</i> .....	86
3.1.2.2.2.	<i>Régulation</i> .....	89
3.1.2.2.3.	<i>Fonctions cellulaires</i> .....	92
<b>3.2.</b>	<b>Rôle de l'autophagie dans l'immunité .....</b>	<b>93</b>
3.2.1.	Implication dans l'immunité innée .....	93
3.2.1.1.	Dégradation des pathogènes intracellulaires.....	93
3.2.1.2.	Régulation de l'autophagie par l'immunité innée.....	95
3.2.1.3.	Régulation de l'immunité innée par l'autophagie.....	98
3.2.2.	Implication dans l'immunité adaptative .....	99
3.2.2.1.	Rôle dans la présentation antigénique .....	99
3.2.2.2.	Rôle dans la biologie des lymphocytes T .....	103
3.2.2.3.	Rôle dans la biologie des lymphocytes B .....	105
3.2.3.	Implication dans l'autoimmunité.....	106
<b>4.</b>	<b>CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE .....</b>	<b>110</b>
	<b>CHAPITRE 1 : Utilisation de peptides thérapeutiques pour le traitement des maladies autoimmunes .....</b>	<b>112</b>
	<b>1. PUBLICATION N°1 .....</b>	<b>113</b>
	<b>CHAPITRE 2 : HSPA8 et le peptide P140 : conséquences sur l'autophagie dépendante des chaperonnes.....</b>	<b>125</b>
	<b>1. PUBLICATION N°2 .....</b>	<b>126</b>

**2. PUBLICATION N°3 .....175**

**3. COMMENTAIRES ET RESULTATS COMPLEMENTAIRES  
RELATIFS A LA PUBLICATION N°3 .....219**

**1.1. Trafic intracellulaire du peptide P140 dans les  
lymphocytes B et inhibition de l'autophagie dépendante  
des chaperonnes .....219**

**1.2. Site d'interaction du peptide P140 sur HSPA8 .....222**

**CHAPITRE 3 : Etude comparative du répertoire des  
lymphocytes B et des lymphocytes T au cours du lupus et après  
traitement par le peptide P140 .....225**

**1. PUBLICATION N°4 .....226**

**2. COMMENTAIRES RELATIFS A LA PUBLICATION  
N°4.....262**

**CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....265**

**BIBLIOGRAPHIE . .....272**

## LISTE DES ABBREVIATIONS

- **ACD** : « autophagic cell-death »
- **ACR** : « American College of Rheumatology »
- **ADN** : acide désoxyribonucléique
- **AICD** : « activation –induced cell-death »
- **AMPK** : « AMP-activated protein kinase »
- **APL** : ligand peptidique altéré
- **ARN** : acide ribonucléique
- **Atf** : « UV light-activable perfluorophenylazide »
- **Atg** : « autophagy-related gene »
- **ATP** : adénosine triphosphate
- **BAFF** : « B cell-activating factor »
- **BAFF-R** : « B cell-activating factor receptor »
- **BAG** : « Bcl-2-associated athanogene »
- **BCMA** : « B cell maturation antigen »
- **BCR** : « B cell receptor »
- **BILAG** : « British isles lupus activity group »
- **BNIP3L** : « Bcl2/adenovirus E1B 19 kDa protein interacting protein-like »
- **B<sub>reg</sub>** : lymphocyte B régulateur
- **CAMK4** : « calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV »
- **CD** : cluster de différenciation
- **CHIP** : « carboxyterminus of HSC70-interacting protein »
- **CMA** : autophagie dépendante des chaperonnes
- **CMH** : complexe majeur d'histocompatibilité
- **CPA** : cellule présentatrice d'antigène
- **CREM- $\alpha$**  : « cAMP response element modulator  $\alpha$  »
- **CTLA4** : « cytotoxic T lymphocyte antigen 4 »
- **DAMP** : « damage-associated molecular pattern »
- **Db** : double brin
- **DC** : cellule dendritique
- **DSG** : 15-deoxyspergualin
- **EAE** : encéphalite autoimmune expérimentale
- **EBNA1** : « Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 »
- **EBV** : virus d'Epstein Barr
- **EF1 $\alpha$**  : « elongation factor 1  $\alpha$  »
- **eIF2 $\alpha$**  : « eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  »
- **ERK1/2** : « extracellular signal-regulated kinase 1/2 »
- **ESCRT** : « endosomal sorting complexes required for transport »
- **FKBP12** : « FK506-binding protein of 12 kDa »
- **FoxP3** : « forkhead box P3 »

- **GAD65** : « glutamic acid decarboxylase 65 »
- **GAK** : « cycline G-associated kinase »
- **GFAP** : « glial fibrillary acidic protein »
- **GM-CSF** : « granulocyte macrophage colony stimulating factor »
- **GP96** : « glycoprotein 96 »
- **GrpE-like** : « Glucose responsive protein E-like »
- **GTP** : guanosine triphosphate
- **GβL** : « G protein β-subunit-like protein »
- **HCMV** : CytomégaloVirus humain
- **HEL** : « hen egg lysozyme »
- **HERDS** : « heterogeneous ectopic RNP-derived structures »
- **Hip** : « HSC70-interacting protein »
- **HMGB1** : « high mobility group box 1 »
- **Hop** : « HSP70/HSP90-organizing protein »
- **HSE** : « heat shock element »
- **HSF** : « heat shock factor »
- **HSPBP** : « HSP70-binding protein »
- **HSV** : virus de l'herpès
- **ICOS** : « inducible T-cell costimulator-ligand »
- **IFN** : interféron
- **IL-X** : interleukine X
- **IRF** : « interferon-related factor »
- **Irgm1** : « immune-related GTPase M member 1 »
- **IPS-1** : « interferon-beta promoter stimulator 1 »
- **JNK** : « Jun kinase »
- **LAMP** : « lysosome-associated membrane protein »
- **LAP** : « LC3-associated phagocytosis »
- **LB** : lymphocyte B
- **LC3** : « light chain 3 »
- **LED** : lupus érythémateux disséminé
- **LPS** : lipopolysaccharide
- **LT** : lymphocyte T
- **MALDI-TOF** : « matrix-assisted laser desorption ionisation - time of flight »
- **mATG13** : « mammalian Atg13 »
- **MCP-1** : « monocyte chemoattractant protein 1 »
- **MEF2D** : « myocyte enhancer factor 2D »
- **MIIC** : « MHC class II compartment »
- **MIP-1β** : « macrophage inflammatory protein 1β »
- **MP1** : « matrix protein 1 »
- **mTOR** : « mammalian target of rapamycin »
- **MyD88** : « myeloid differentiation primary response 88 »
- **NBD** : « nucleotide-binding domain »
- **NBR-1** : « neighbor of BRCA1 gene 1 »
- **NDP52** : « nuclear dot protein 52 »
- **NEF** : « nucleotide exchange factor »
- **NES** : « nuclear export sequence »

- **NF- $\kappa$ B** : « nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells »
- **NK** : « natural killer »
- **NLR** : « Nod-like receptor »
- **NLS** : « nuclear localisation sequence »
- **NZB** : « New Zealand Black »
- **NZW** : « New Zealand White »
- **PAMP** : « pathogen-associated molecular pattern »
- **Pax2** : « paired box gene 2 »
- **pDC** : cellule dendritique plasmacytoïde
- **PERK** : « protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase »
- **PI3K** : phosphatidylinositol 3-kinase
- **PINK1** : « PTEN-induced putative kinase 1 »
- **PIP3** : phosphatidylinositol-3-phosphate
- **PKR** : « protein kinase regulated by RNA »
- **PRAS40** : « proline-rich Akt substrate of 40 kDa »
- **PROTOR** : « protein observed with rictor »
- **PRR** : « pattern recognition receptor »
- **RAGE** : « receptor for advanced glycation end products »
- **RANTES** : « regulated on activation normal T cell expressed and secreted »
- **Raptor** : « regulatory associated protein of mTOR »
- **RAR $\alpha$**  : récepteur  $\alpha$  à l'acide rétinoïque
- **RE** : réticulum endoplasmique
- **Rheb** : « Ras homolog enriched in brain »
- **Rictor** : « rapamycin-sensitive companion of mTOR »
- **RLR** : « Rig-like receptor »
- **ROCK** : «  $\rho$ -kinase coiled-coil-containing domain protein kinase »
- **Sb** : simple brin
- **SBD** : « substrate-binding domain »
- **SHP2** : « Src homology-2 domain-containing phosphatase 2 »
- **SIN1** : « SAPK-interacting protein-1 »
- **SLCA5** : « solute-linked carrier family A1 member 5 »
- **SLEDAI** : « systemic lupus erythematosus disease activity index »
- **SMA** : « smooth muscle antibody »
- **SNARE** : « soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor »
- **SQSTM1** : « sequestosome-1 »
- **SRI** : « SLE responder index »
- **STAT** : « signal transducer and activator of transcription »
- **SYK** : « spleen tyrosine kinase »
- **TA** : « tail-anchor »
- **TACI** : « transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor »

- **TAP** : « transporter-associated with antigen processing »
- **TCR** : « T cell receptor »
- **TEC** : cellule épithéliale thymique
- **T<sub>fh</sub>** : « follicular helper T cell »
- **TGF- $\beta$**  : « tumor growth factor  $\beta$  »
- **TLR** : « Toll-like receptor »
- **TNF- $\alpha$**  : « tumor necrosis factor  $\alpha$  »
- **Tom70** : « translocase of outer membrane 70 »
- **TOR** : « target of rapamycin »
- **TRAF6** : « tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 »
- **T<sub>reg</sub>** : lymphocyte T régulateur
- **TREX1** : « three prime repair exonuclease 1 »
- **TRIF** : « TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$  »
- **TRP** : « tetratricopeptide repeat »
- **TSC1/2** : « tuberous sclerosis complex 1/2 »
- **U1snRNP** : U1 small nuclear ribonucleoprotein
- **ULK1/2** : « UNC-51-like kinase 1/2 »
- **UPR** : « unfolded protein response »
- **UV** : ultraviolets
- **UVRAG** : « UV-radiation resistance-associated gene »
- **VPS** : (« vacuolar protein sorting »)
- **VSV** : virus de la stomatite vésiculaire
- **WIPI-1** : « WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1 »
- **ZAP70** : « zeta-chain-associated protein kinase 70 »

## LISTE DES PUBLICATIONS

Juillard, F., Bazot, Q., Mure, F., Tafforeau, L., Macri, C., Rabourdin-Combe, C., Lotteau, V., Manet, E., and Gruffat, H. (2012) Epstein-Barr virus protein EB2 stimulates cytoplasmic mRNA accumulation by counteracting the deleterious effects of SRp20 on viral mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 40, 6834-6849 [FI= 8.28]

Schall, N., Page, N., Macri, C., Chaloin, O., Briand, J.-P. and Muller, S. (2012) Peptide-based approaches to treat lupus and other autoimmune diseases (revue). *J. Autoimmunity* 39, 143-153 [FI= 8.15]

Stricher, F., Macri, C., Ruff, M. and Muller, S. HSPA8/HSC70 chaperone protein: structure, function and chemical manipulation (revue). *Autophagy* en révision [FI= 12.04]

Macri, C., Tasset, I., Schall, N., Page, N., Briand, J.-P., Cuervo A.M. and Muller, S. A U1snRNP-derived phosphopeptide homes into lysosomes and hampers selective chaperone-mediated autophagy. A soumettre

Schall, N.\*, Macri, C.\*, Wilhelm, C., Page, N. and Muller, S. Biases in the T- and B-cell repertoire in MRL/lpr lupus-prone mice and correction after peptide-based therapy. A soumettre

# Introduction

# **1. LE LUPUS ERYTHEMATEUX DISSEMINÉ**

## **1.1. Biologie du lupus**

### **1.1.1. Généralités**

#### **1.1.1.1. Présentation de l'immunité et du lupus**

Le système immunitaire est un système biologique complexe constitué d'un ensemble d'acteurs capables de discriminer le soi (molécules de l'organisme) du non-soi (molécules issus d'agents pathogènes). Il est classiquement divisé en deux catégories : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée se caractérise par la reconnaissance des molécules du non-soi avec peu de spécificité et ne génère pas de réponse mémoire. Elle repose sur une grande variété de cellules, incluant les granulocytes (neutrophiles, basophiles, éosinophiles), les cellules NK (« natural killer »), les mastocytes et les phagocytes (monocytes, cellules dendritiques (DC) et macrophages). Ces cellules interviennent rapidement après le début d'une infection. L'immunité adaptative dépend de la reconnaissance spécifique d'un antigène par un récepteur en surface des lymphocytes B (LB) et lymphocytes T (LT). Cette reconnaissance est directe entre le récepteur BCR exprimé par les LB (« B cell receptor ») et l'antigène. En revanche le récepteur des LT TCR (« T cell receptor ») reconnaît un peptide antigénique présenté par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). L'immunité adaptative se développe plus tardivement après une exposition à un antigène et génère une réponse mémoire permettant une intervention plus rapide et plus efficace après une seconde exposition à ce même antigène.

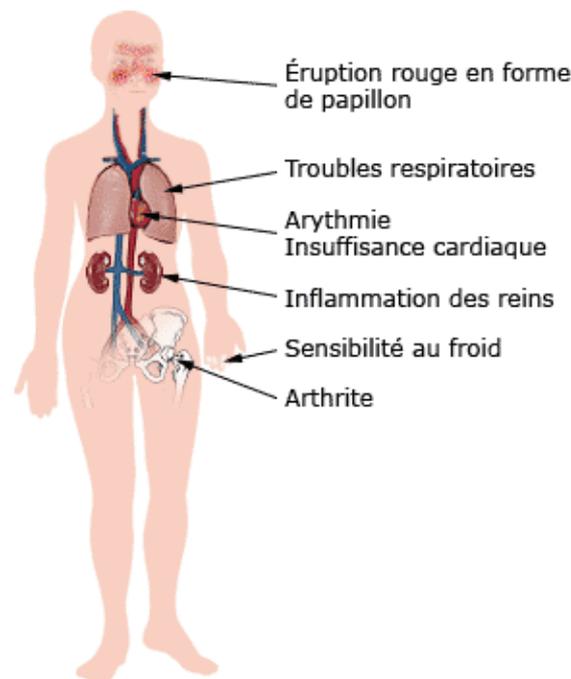
Le BCR et le TCR des LB et des LT sont générés de manière aléatoire. Par conséquent, des cellules dites autoréactives, c'est-à-dire reconnaissant des antigènes du soi, apparaissent continuellement dans l'organisme. Ces cellules potentiellement dangereuses sont normalement éliminées ou inactivées par des mécanismes de tolérance. Une altération de ces mécanismes peut dès lors déclencher une réponse autoimmune, on parle alors d'autoimmunité. Cette dérégulation peut provoquer le développement de maladies autoimmunes qui peuvent être soit spécifiques d'un organe, soit systémiques. Dans le premier

cas, la réaction autoimmune est dirigée contre un constituant d'un organe, c'est le cas par exemple du diabète de type I ou de la sclérose en plaques. Dans les maladies autoimmunes systémiques, la réponse autoimmune atteint différents sites de l'organisme, c'est le cas par exemple du lupus érythémateux disséminé (LED). Ce syndrome multifactoriel se manifeste par de nombreux symptômes très hétérogènes, incluant des éruptions cutanées en « masque de loup », des lésions rénales ainsi que des troubles cardiaques ou neurologiques.

Les premières références au lupus remontent à la Grèce Antique quand Hippocrate fit part dans ses récits d'éruptions cutanées sévères chez ses patients. Le terme de « lupus érythémateux » fut utilisé pour la première fois en 1851 par les médecins français Pierre Cazenave et Henri Schedel. Le mot « lupus » provient du latin « loup » en référence aux lésions cutanées sur le visage prenant souvent la forme de « masque de loup » ou « ailes de papillons ». Le terme « érythémateux » quant à lui provient du grec « erythema » désignant les rougeurs. A cette même période, les médecins autrichiens Ferdinand Von Hebra et Moritz Kaposi notèrent une expansion des symptômes du lupus au-delà de la peau en touchant aussi les organes internes, parlant alors de LED (1). Ces observations furent confirmées au début du XXème siècle par le médecin Sir William Osler dans une série d'articles scientifiques (2). Les connaissances sur la maladie progressèrent rapidement après la Seconde Guerre Mondiale avec la découverte majeure en 1948 par Malcolm Hargraves de la cellule LE (lupus érythémateux) dans des échantillons issus de patients lupiques (3), posant la base des premiers tests biologiques pour le diagnostic du LED. La découverte dans les années 1950 des autoanticorps reconnaissant des éléments nucléaires dans le sang des patients (4) donna naissance à une série de tests immunofluorescents permettant un diagnostic plus rigoureux de la maladie.

#### 1.1.1.2. Manifestations cliniques

Le LED est une maladie polymorphe se traduisant par de multiples symptômes très variables d'un individu à l'autre, mais certains d'entre eux sont fréquents chez une majorité de patients (Figure 1). Afin de faciliter le diagnostic, une liste de critères de classification du LED a été établie par l'ACR (« American College of Rheumatology »). Cette liste, révisée en 1997, regroupe onze critères permettant de classer ou non une pathologie observée chez un



**Figure 1. Quelques symptômes du LED.**

patient en tant que LED (Tableau I) (5). Il est admis que la présence d'au moins quatre de ces critères suffit à classer une maladie en tant que LED.

L'évolution du LED n'est pas homogène puisque cette maladie se manifeste par une alternance de phases de poussées où apparaissent les symptômes et de phases de rémission asymptomatiques. Les phases de poussées sont classées selon la sévérité des symptômes (6) :

- les poussées lupiques légères/modérées. Elles se manifestent par une atteinte cutanée avec l'apparition d'érythèmes faciaux typiques chez 80 à 90 % des patients. De plus, on observe une photosensibilité, des ulcérations orales ainsi qu'une arthrite non érosive et non déformante au niveau des genoux et des mains chez 75 à 100 % des patients.

- les poussées lupiques sévères. Elles se caractérisent par une atteinte des organes pouvant potentiellement mettre en danger la vie du patient. L'atteinte rénale constitue un symptôme majeur lors de ces poussées lupiques sévères, observée chez 50% des patients. Elle est déclenchée par une inflammation localisée au niveau du glomérule et/ou des vaisseaux sanguins du rein et peut évoluer vers une insuffisance rénale. L'atteinte du système nerveux central est moins fréquente, observée chez 35% des patients. Elle se manifeste par des

---

## Critères de l'ACR (révisés en 1997)

---

- Rash malaire
- Lupus discoïde
- Photosensibilité
- Ulcérations orales ou nasopharyngées
- Arthrite destructive touchant au moins 2 articulations périphériques
- Pleurésie ou péricardite
- Atteinte rénale
  - protéinurie > 0,5 g/jour
  - cylindrurie
- Atteinte neurologique
  - comitialité
  - psychose
- Atteinte hématologique
  - anémie hémolytique
  - leucopénie < 4000/mm<sup>3</sup> constatée à 2 reprises
  - lymphopénie < 1500/mm<sup>3</sup> constatée à 2 reprises
  - thrombocytopénie < 100000/mm<sup>3</sup> en absence de médicament cytopénisant
- Désordre immunologique
  - anticorps anti-ADN db
  - anticorps anti-Sm
  - anticorps anti-phospholipides
- Anticorps antinucléaires (en absence de médicament inducteur)

**Tableau 1. Critères de diagnostic du LED définis par l'ACR.** ADN db : acide désoxyribonucléique double brin (5).

douleurs et des troubles émotionnels, ainsi que des myélopathies et des psychoses dans des cas plus rares. Ces épisodes sévères peuvent aussi mener à des troubles cardiovasculaires sous forme de myocardites ou de péricardites. La présence d'anticorps anti-phospholipides chez les patients, appelée syndrome des anti-phospholipides, est souvent à l'origine d'apparition de thromboses (7).

L'activité de la maladie chez les patients est évaluée par le calcul de scores affectant un coefficient à chaque symptôme du LED. Le plus couramment utilisé est le SLEDAI (« systemic lupus erythematosus disease activity index ») (8). Le BILAG (« British isles lupus activity group ») et le SRI (« SLE responder index ») sont aussi fréquemment employés lors d'essais cliniques. Il est important de mentionner qu'il existe aussi d'autres formes de lupus

érythémateux : le lupus discoïde, le lupus néonatal, et le lupus induit. Le lupus discoïde se limite à des manifestations cutanées mais peut évoluer vers un LED. Le lupus néonatal touche les nouveaux-nés lorsque certains autoanticorps d'origine maternelle dirigés contre la protéine Ro passent la barrière du placenta. Dans la plupart des cas, la mère du nouveau-né est atteinte par une maladie autoimmune de type LED ou syndrome de Sjögren, mais elle peut aussi ne présenter aucun symptôme. Le lupus néonatal se manifeste par des éruptions cutanées et des problèmes cardiaques (9). Enfin, le lupus induit ou iatrogène est provoqué par la prise de certains médicaments dont la liste est établie (10).

#### 1.1.1.3. Epidémiologie

Le LED est couramment considéré comme une maladie rare avec une prévalence de 40 cas pour 100 000 individus en France (11). Cependant, de grandes disparités sont observées selon le sexe, l'âge et l'origine ethnique. En effet, le LED touche plutôt les femmes dans environ 9 cas sur 10 bien que ce taux varie selon les études réalisées. De plus, le diagnostic du LED survient généralement à un âge précoce avec une moyenne de 32 ans et plutôt au sein de populations non-caucasiennes, en particulier les populations d'origine afro-américaines et asiatiques (12). Ces disparités reflètent les causes génétiques et environnementales de la pathologie.

#### 1.1.1.4. Causes du lupus

Les causes associées au développement du lupus restent encore mal connues. Cependant, de nombreuses études épidémiologiques et biologiques ont montré que le lupus, comme d'autres pathologies autoimmunes, est une maladie multifactorielle dont l'initiation et la progression dépendent d'une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux.

##### *1.1.1.4.1. Les facteurs génétiques*

De nombreuses observations suggèrent l'implication d'une composante génétique au développement du lupus. En effet, en plus d'une prévalence accrue du lupus dans certaines

populations ethniques et d'un biais selon le sexe évoqué ci-dessus, une forte agrégation familiale est observée, avec une héritabilité du caractère de 66% (13). De plus, le taux de concordance entre jumeaux monozygotes est de 35 % contre 5% pour des jumeaux dizygotes (14). Enfin, l'étude des modèles murins développant spontanément un lupus suggère aussi une composante génétique importante. L'un des premiers modèles murins utilisés est la souris (NZB/W)F1 correspondant à la première génération issue du croisement des souches NZB (« New Zealand Black ») et NZW (« New Zealand White »). Ces souris présentent une pathologie semblable au LED humain avec des autoanticorps, des arthrites et des glomérulonéphrites. La souche MRL/lpr est aussi couramment utilisée. Ces souris possèdent un fond génétique favorable au développement d'un syndrome lupique et la progression de la maladie est accélérée par la mutation *lpr* dans le gène codant pour le récepteur de mort Fas. Le syndrome lupique apparaît à un âge précoce avec une production d'autoanticorps et l'apparition de dermatites, de vasculites et de glomérulonéphrites (15). Les facteurs génétiques favorisant le développement du lupus se divisent en deux catégories : les gènes de susceptibilité et les modifications épigénétiques.

### Gènes de susceptibilité au lupus

Des études génétiques familiales ont permis d'identifier un petit nombre de loci associés au LED. Ce nombre a fortement progressé ces dernières années grâce à des études d'associations pangénomiques génotypant un grand nombre d'individus sur des polymorphismes nucléotidiques. Aujourd'hui, on compte environ 30 gènes associés au LED de façon robuste (Tableau 2) (16). La plupart d'entre eux sont impliqués dans plusieurs voies biologiques participant au développement du lupus qui seront détaillées dans la partie consacrée à la pathogénèse lupique (paragraphe 1.1.2).

Certains de ces gènes jouent un rôle dans la capture de composés extracellulaires par les cellules phagocytaires. C'est le cas par exemple de la famille des récepteurs Fc $\gamma$  qui reconnaissent la partie constante des anticorps et facilitent ainsi la phagocytose des complexes immuns contenant un antigène. Les gènes *FCGR2A*, *FCGR2B* et *FCGR3A* présentent des polymorphismes de type non-sens associés au LED (17). Par ailleurs, un polymorphisme dans le gène *ITGAM* codant pour le récepteur CD11b (cluster de différenciation 11b) a été associé

Gène	Valeur p	Gène	Valeur p
<i>ITGAM</i>	$1,6 \times 10^{-23}$	<i>PTPN22</i>	$3,4 \times 10^{-12}$
<i>FcγR</i>	$< 1 \times 10^{-8} *$	<i>TNFSF4</i>	$2,5 \times 10^{-32}$
<i>PRDM1-ATG5</i>	$5,2 \times 10^{-12}$	<i>HLA-DRB1</i>	$2,0 \times 10^{-60}$
<i>TNFAIP3</i>	$1,4 \times 10^{-17}$	<i>SLC14A4</i>	$3,5 \times 10^{-11}$
<i>TNIP1</i>	$3,8 \times 10^{-13}$	<i>IRF5</i>	$5,8 \times 10^{-24}$
<i>UBE2L3</i>	$1,5 \times 10^{-16}$	<i>IRF7</i>	$3,0 \times 10^{-10}$
<i>ETS1</i>	$1,8 \times 10^{-25}$	<i>IRF8</i>	$1,2 \times 10^{-8}$
<i>IKZF1</i>	$2,8 \times 10^{-23}$	<i>IFIH1</i>	$1,6 \times 10^{-8}$
<i>CD44</i>	$4,0 \times 10^{-12}$	<i>TYK2</i>	$3,9 \times 10^{-8}$
<i>BANK1</i>	$3,7 \times 10^{-10}$	<i>LRRC18-WDFY4</i>	$7,2 \times 10^{-12}$
<i>BLK</i>	$2,1 \times 10^{-24}$	<i>PXK</i>	$7,10 \times 10^{-9}$
<i>LYN</i>	$5,4 \times 10^{-9}$	<i>JAZF1</i>	$1,5 \times 10^{-9}$
<i>RasGRP3</i>	$1,3 \times 10^{-15}$	<i>UHRF1BP1</i>	$2,2 \times 10^{-8}$
<i>NCF2</i>	$2,9 \times 10^{-11}$	<i>XKR6</i>	$2,5 \times 10^{-11}$
<i>STAT4</i>	$5,2 \times 10^{-42}$		

**Tableau 2. Liste des gènes associés au LED de manière robuste.** Les gènes mentionnés ont été identifiés à partir d'études pangénomiques, d'études de réplication et de méta-analyses. Chaque gène est considéré comme significatif pour une valeur statistique p inférieure à  $1 \times 10^{-8}$ ; \* : de multiples variants ont été identifiés avec des valeurs statistiques p différentes, mais toutes inférieures à  $1 \times 10^{-8}$ (16).

au LED (18). Cette protéine transmembranaire reconnaît un produit de clivage iC3b du complément et la mutation observée diminue la phagocytose de particules associées au fragment iC3b (19). D'autres gènes identifiés sont décrits pour intervenir lors de l'immunité innée. Parmi ceux-ci, *IRF5* et *IRF7* et *IRF8* codent pour les facteurs IRF (« interféron-related factor ») impliqués dans la signalisation des interférons de type I (IFN-I). En particulier, le variant du gène *IRF5* lié au LED induit une surexpression du facteur IRF (20). La plus forte association génétique concerne le gène *HLA-DRB1* impliqué dans la présentation antigénique

(21). Enfin, beaucoup de gènes associés au LED régulent les fonctions des LT et des LB de l'immunité adaptative. Par exemple, le gène *IKZF1* code pour le facteur de transcription Ikaros intervenant dans le développement lymphocytaire. Le polymorphisme génétique observé chez les individus lupiques diminue son expression (22). Par ailleurs, le gène *LYN* exprimé par les LB code pour la kinase Lyn inhibant l'activation de ces cellules. Le variant associé au LED réduit son expression, contribuant ainsi à une hyperactivation des LB au cours de la maladie (23).

### Modifications épigénétiques

Les modifications épigénétiques regroupent l'ensemble des mécanismes modifiant l'expression d'un gène sans modifier sa séquence nucléotidique. Des études récentes suggèrent un lien possible entre certaines modifications épigénétiques et des pathologies autoimmunes incluant le LED (24). Ces mécanismes reposent principalement sur la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones.

La méthylation de l'ADN est un processus épigénétique permettant une réduction de l'expression d'un gène. Cette réaction est catalysée par des ADN méthyltransférases principalement au niveau des « îlots CpG » en position 5' des gènes. De nombreuses études ont mis en évidence une hypométhylation de gènes surexprimés par les LT et les LB au cours du lupus, tels que *IL-4*, *IL-10*, *IL-13* et *CD70* (25–27). Ces résultats suggèrent un lien entre l'état de méthylation de l'ADN et des mécanismes immunitaires associés au lupus. De plus, l'inactivation du chromosome X chez les femmes repose sur la méthylation de régions spécifiques. Or, l'hypométhylation de ce chromosome chez les femmes lupiques augmente l'expression de gènes localisés sur celui-ci et impliqués dans la pathologie tels que le gène *CD40L* (28). Ce phénomène pourrait expliquer en partie la prévalence élevée de la pathologie chez les femmes.

Les modifications post-traductionnelles des histones sont aussi des mécanismes épigénétiques influençant le développement du lupus. Ces protéines sont les principaux constituants de la chromatine formant les chromosomes. Elles sont étroitement associées à

l'ADN sous forme de nucléosomes. Chaque nucléosome est constitué de 146 paires de bases d'ADN enroulé autour d'une particule cœur renfermant deux copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4. L'histone H1 extranucléosomique, en interagissant avec l'ADN, relie deux nucléosomes successifs. Toutes ces histones possèdent une queue N-terminale cibles de nombreuses modifications post-traductionnelles. Ces dernières, en induisant un réarrangement des nucléosomes, influencent l'expression génique. Chez les individus lupiques, des études ont rapporté un état hyperacétylé des histones. Par exemple, l'hyperacétylation du promoteur du TNF- $\alpha$  (« tumor necrosis factor  $\alpha$  ») est associée à une maturation accrue des monocytes ainsi qu'à une sécrétion augmentée de la cytokine chez les individus lupiques (29). D'autres études chez la souris MRL/lpr suggèrent cependant une contribution de l'hypoacétylation des histones dans le développement du LED puisque l'administration d'inhibiteurs de déacétylases d'histones réduit la sévérité des symptômes de la maladie (30). Le lien entre l'état d'acétylation des histones et la maladie lupique reste donc sujet à débat. La contribution des modifications post-traductionnelles des histones et celles affectant d'autres autoantigènes vis-à-vis de la pathogénèse lupique est détaillé dans le paragraphe 1.1.2.1.

#### 1.1.1.4.2. Facteurs environnementaux

Malgré l'existence de nombreux facteurs génétiques favorisant l'apparition et le développement d'un lupus, ils sont souvent insuffisants pour déclencher la pathologie. En revanche, la combinaison d'éléments génétique à de multiples facteurs environnementaux augmente fortement le risque de développer la pathologie. Ces facteurs environnementaux incluent l'exposition aux rayons ultraviolets (UV), à certains agents pathogènes, à des hormones et à des molécules chimiques.

#### L'exposition aux UV

La photosensibilité constitue l'un des critères majeurs du lupus et se manifeste par des lésions cutanées exacerbées à la suite d'une exposition aux UV. L'effet nocif des UV a été mis en évidence par l'observation d'une corrélation entre l'exposition à ces rayons et l'apparition de poussées lupiques (31). Ce mécanisme peut s'expliquer par l'énergie libérée par les UV qui pourrait altérer l'ADN et le rendre plus immunogène (32). De plus,

l'exposition à ces rayons induit un transfert d'antigènes nucléaires en surface des kératinocytes du derme ainsi qu'une induction de l'apoptose de ces cellules (33). Ces deux éléments contribuent de façon importante à la pathogénèse lupique. Enfin, le rayonnement UV déclenche la sécrétion par les kératinocytes de la peau de différentes cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et l'interleukine 6 (IL-6) (34). L'ensemble de ces modifications induites par les UV créent ainsi un environnement favorable à une réaction autoimmune.

### Les agents pathogènes

Un rôle possible d'agents pathogènes dans l'étiologie du LED a été suggéré par l'existence d'une corrélation entre la prévalence du lupus et de certaines infections. L'infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV) est la plus étudiée avec la présence d'anticorps d'isotype IgG dirigés contre plusieurs protéines du virus chez 50% des individus lupiques contre 8-17 % des individus sains. D'autres études ont aussi établi une relation avec d'autres agents infectieux tels que le Parvovirus B19 ou le Cytomégalovirus humain (HCMV). Plusieurs mécanismes ont été suggérés afin d'expliquer ce lien.

Tout d'abord, un agent pathogène pourrait favoriser l'émergence du lupus au travers d'un mécanisme de « mimétisme moléculaire ». Cette théorie repose sur une possible réaction croisée entre un antigène issu d'un agent pathogène et un antigène du soi. Par conséquent, l'infection d'un organisme déclencherait la production d'autoanticorps participant au développement de la maladie. Des études suggèrent un mécanisme de ce type lors de l'infection par EBV puisque la protéine virale EBNA1 (« Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 ») possède des épitopes homologues aux autoantigènes SmD et SmB (35). Ce processus peut s'accompagner d'un mécanisme de « diversification des épitopes ». Dans ce cas, la réponse immunitaire des LT et LB initialement déclenchée par un petit nombre d'épitopes va s'étendre à d'autres épitopes situés sur la même protéine (diversification intramoléculaire) ou à d'autres protéines d'un même complexe moléculaire (diversification intermoléculaire) (36). De nombreux autoantigènes connus du lupus tels que la ribonucléoprotéine U1-70K (37) sont concernés par ce mécanisme.

Un second mécanisme expliquant le lien entre infection et lupus implique une « activation de voisinage » des lymphocytes autoréactifs. En effet, la mort cellulaire induite à la suite d'une infection par un agent pathogène pourrait exposer certaines molécules du soi au contact de CPA et favoriser leur présentation à des LT autoréactifs. De plus, l'environnement inflammatoire généré par l'infection pourrait aussi faciliter l'activation des cellules autoréactives bien que les arguments expérimentaux soutenant cette théorie restent rares.

### Les hormones

En plus d'une prévalence accrue du LED chez les femmes, des études chez ces dernières ont aussi rapporté une augmentation de l'incidence après la puberté et une diminution au moment de la ménopause. De plus, on note une variation de la sévérité des symptômes chez les femmes lupiques lors des périodes de grossesse et selon les cycles menstruels (38). Ces observations ont suggéré un rôle possible des hormones sexuelles dans le LED. Parmi les hormones impliquées, les œstrogènes favorisent l'apparition de la maladie. En effet, leur administration à des souris lupiques ainsi qu'à des femmes souffrant de LED lors de thérapies hormonales accélère la progression de la maladie et ceci est corrélé avec la production d'autoanticorps (39). En revanche, l'administration d'androgènes comme la testostérone aux souris MRL/lpr et (NZB/W)F1 diminue la sévérité des symptômes (40). Ces hormones sexuelles influenceraient la pathologie lupique en modifiant directement les fonctions de certaines cellules immunitaires, en particulier des LT auxiliaires vis-à-vis de leur sécrétion de cytokines (41).

### Les agents chimiques

Beaucoup d'agents chimiques sont connus pour augmenter la susceptibilité au lupus. Par exemple, la fumée de cigarette et l'exposition à des agents polluants (pesticides, mercure, ...) sont des facteurs de risque majeurs pour cette pathologie (42, 43). De plus, comme évoqué plus haut, le lupus induit est provoqué par certains médicaments. Les molécules thérapeutiques présentant le risque le plus élevé sont la procainamide et l'hydralazine (10). Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer le lien entre ces molécules et le développement du lupus. Tout d'abord, les métabolites issus de celles-ci pourraient interagir avec une protéine du soi et la rendre immunogène. Par conséquent, ils provoqueraient une

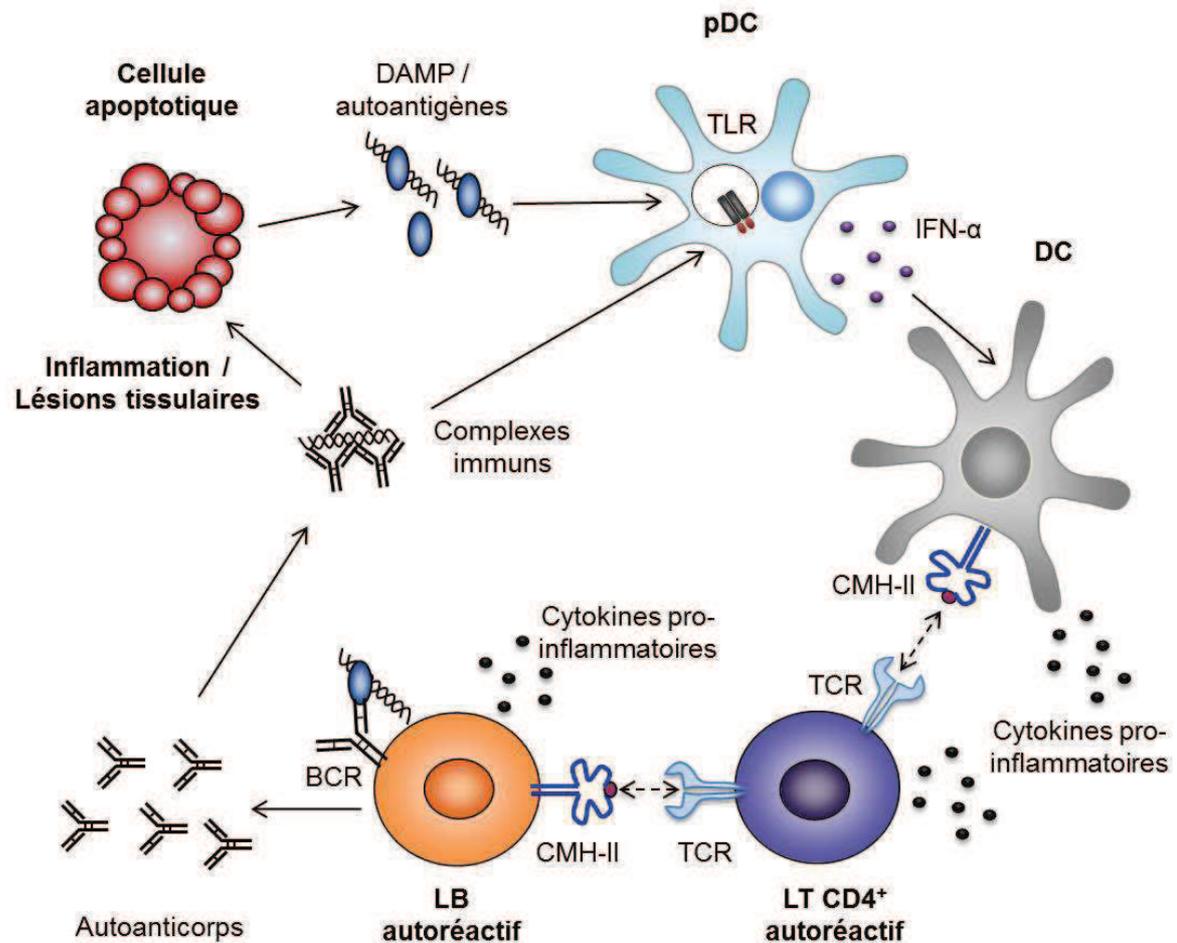
réaction immunitaire dirigée contre cette protéine. De plus, certains métabolites sont cytotoxiques et un excès de mort cellulaire est un contributeur important au développement du lupus (détaillé dans le paragraphe 1.1.2.1). Par ailleurs, l'administration d'un métabolite de la procainamide à des souris sauvages provoque le développement d'un syndrome lupique et cet effet repose sur une altération des mécanismes de tolérance centrale des LT qui permettent normalement l'élimination des cellules autoréactives (44). Enfin, étant donné que l'hydralazine et la procainamide sont deux inhibiteurs des ADN méthyltransférases (45), une déméthylation de l'ADN par ces molécules pourrait favoriser la susceptibilité au lupus.

## 1.1.2. La pathogénèse du lupus

De nombreuses avancées sur la pathogénèse du lupus ont permis l'élaboration d'un modèle d'initiation et de progression de la maladie. Tout d'abord, différents facteurs de prédisposition au LED conduisent à un excès d'apoptose associé à un défaut de clairance des corps apoptotiques. Ces débris activent les cellules immunitaires innées, provoquant une inflammation chronique et la présentation d'autoantigènes dérivés de ces débris par les molécules du CMH. Ce processus permet l'activation de LT autoréactifs et l'activation concomitante des LB autoréactifs permet la production d'autoanticorps. Ces molécules s'associent sous forme de complexes immuns et provoquent des lésions tissulaires dans les organes. De plus, ils amplifient le développement de la pathologie en participant à leur tour à la stimulation des récepteurs de l'immunité innée (Figure 2) (46). L'ensemble de ces mécanismes est développé ci-dessous.

### 1.1.2.1. L'apoptose comme source d'autoantigènes

L'apoptose est une mort cellulaire programmée impliquant l'activation de caspases. Contrairement à d'autres formes de mort cellulaire telles que la nécrose, l'intégrité de la membrane est conservée au cours de ce processus avec la formation de corps apoptotiques. Ces derniers exposent en surface différents signaux de type « eat me », notamment des molécules de phosphatidylsérine qui sont reconnues par une variété de récepteurs « éboueurs » exprimés à la surface des cellules phagocytaires environnantes (macrophages,



**Figure 2. Modèle de pathogénèse du LED.** L'excès d'apoptose associé à un défaut de clairance des débris apoptotiques permet la libération de molécules endogènes pro-inflammatoires nommées DAMP (« damage-associated molecular pattern ») et des autoantigènes. Les DAMP activent les cellules immunitaires innées, en particulier les DC plasmacytoïdes (pDC) permettant la sécrétion d'IFN- $\alpha$  stimulant la maturation des DC. Le système immunitaire adaptatif est activé par la présentation d'autoantigènes aux LT CD4<sup>+</sup> et par l'activation des LB. Ces derniers se différencient en plasmocytes produisant des autoanticorps qui s'assemblent sous forme de complexes immuns circulants. En se déposant dans les organes, les complexes immuns provoquent une inflammation et des lésions tissulaires graves. La libération de nouveaux antigènes par les organes endommagés et la stimulation des TLR (« Toll-like receptors ») endosomaux par les complexes immuns amplifient la progression de la maladie.

DC). Cette interaction favorise leur capture par phagocytose et leur élimination. De plus, la capture de corps apoptotiques par des macrophages induit un profil d'expression de type tolérogène avec une diminution de la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  et une augmentation de la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire TGF- $\beta$  (« tumor growth factor

$\beta$  ») (47). Par conséquent, ce mécanisme empêche l'activation de l'inflammation par les débris cellulaires issus des cellules mortes.

### Excès d'apoptose

Dans le cas du lupus, la plupart des études suggèrent un niveau élevé d'apoptose au sein de l'organisme. En effet, certains facteurs environnementaux évoqués plus haut peuvent provoquer un mort cellulaire importante (UV, agents pathogènes, ...). De plus, les neutrophiles des patients lupiques entrent spontanément en apoptose en réponse au TNF- $\alpha$  et résistent à l'effet anti-apoptotique du GM-CSF (« granulocyte macrophage colony stimulating factor ») (48). En revanche, aucun défaut n'a été détecté dans l'expression du récepteur de mort Fas ou de son ligand Fas-L à la surface des cellules lupiques (49, 50). Il est important de noter néanmoins que les souris MRL/lpr présentent paradoxalement un défaut d'apoptose induit par ce récepteur par une mutation bloquant son expression (15). Dans ce cas, la mort des LT activés par un mécanisme de tolérance appelé AICD (« activation-induced cell death ») est inhibée, ce qui augmente la survie des LT autoréactifs et provoque une accélération de la progression de la pathologie.

L'apoptose constitue une source importante d'autoantigènes, un excès de cette voie pourrait donc être associé au développement d'autoimmunité. En effet, de nombreuses études ont localisé des antigènes nucléaires associés au LED regroupés au sein de structures membranaires appelés « blebs » pendant l'apoptose (51). De plus, ces antigènes sont la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles qui favoriseraient la rupture de tolérance au soi en les rendant plus immunogènes. Par exemple, les histones peuvent subir différentes modifications post-traductionnelles, incluant des acétylations, des méthylations, des citrullinations, des sumoylations, des phosphorylations et des poly-ADP-ribosylations. Des anticorps dirigés contre ces protéines modifiées sont retrouvés dans les séra de patients lupiques (52, 53). Certaines protéines du spliceosome sont aussi concernées par un mécanisme de ce type. Par exemple, les protéines SmD1 et SmD3 appartenant au complexe U1snRNP (« U1 small nuclear ribonucleoprotein ») peuvent subir des méthylations et ces protéines modifiées sont reconnues par les autoanticorps des patients lupiques (54). La protéine U1-70K appartenant au même complexe U1snRNP est la cible de

déphosphorylations et de phosphorylations au cours de l'apoptose. En effet, notre laboratoire a montré qu'au cours de l'apoptose de cellules de lymphome T Jurkat, le résidu sérine 140 d'U1-70K est rapidement phosphorylé alors que le reste de la protéine est globalement déphosphorylé par un mécanisme impliquant la phosphatase PP1. Après modification, la protéine est séquestrée au sein de structures appelées HERDS (« heterogeneous ectopic RNP-derived structures ») qui sont alors exclues dans des corps apoptotiques (55). Étant donné qu'U1-70K renferme des épitopes reconnus par les autoanticorps et les LT CD4<sup>+</sup> autoréactifs au cours du lupus (56), ces modifications post-traductionnelles de la protéine au cours de l'apoptose pourraient jouer un rôle potentiellement délétère dans la progression de la pathologie.

### Défaut de clairance des débris apoptotiques

De nombreuses études ont mis en évidence un défaut de clairance des corps apoptotiques par les cellules phagocytaires chez les individus lupiques en lien étroit avec certaines prédispositions génétiques à la pathologie. Par exemple, un polymorphisme génétique associé au LED est observé dans le gène du complément *C1q* jouant un rôle important dans la clairance des débris apoptotiques. Cette mutation génétique s'accompagne d'une expression réduite de la protéine C1q chez les patients lupiques. Chez la souris, la délétion du gène codant pour ce facteur provoque l'apparition d'un syndrome lupique avec une production d'autoanticorps et l'apparition de glomérulonéphrites (57). Par ailleurs, des expériences réalisées *in vitro* utilisant des macrophages issus d'individus lupiques ont aussi mis en évidence un défaut de reconnaissance et de phagocytose des débris apoptotiques par ces cellules (58). De plus, les biopsies de patients lupiques révèlent une accumulation des cellules apoptotiques à proximité de macrophages dans le centre germinatif ganglionnaire (59). L'ensemble de ces résultats met donc en avant un défaut d'élimination des débris apoptotiques au cours du lupus.

En absence d'élimination rapide des corps apoptotiques, ces composés évoluent vers un stade d'apoptose tardif et de nécrose favorable à l'activation du système immunitaire inné. En effet, cette étape se caractérise par une rupture de la membrane plasmique des corps apoptotiques et la libération de nombreuses molécules endogènes interprétées comme des

« signaux de danger » et induisant un état inflammatoire (développé dans le paragraphe suivant). Parmi celles-ci, la protéine HMGB1 (« high mobility group box 1 ») s'associe et stabilise normalement l'ADN dans les noyaux cellulaires, mais dans certaines conditions, elle peut être activement sécrétée ou passivement libérée dans le milieu extracellulaire. Dans ce cas, elle active l'inflammation en se liant à des récepteurs de l'immunité innée. Des taux élevés de HMGB1 ont ainsi été mesurés dans les séra de patients lupiques (60) et dans les lésions cutanées (61). Cette molécule interprétée comme dangereuse par l'organisme au cours du lupus pourrait donc faciliter la mise en place d'une autoimmunité.

#### 1.1.2.2. Activation de l'immunité innée

Le système immunitaire inné constitue la première ligne de défense de l'organisme à la suite d'une infection par un agent pathogène et comprend de nombreuses cellules, notamment des cellules phagocytaires telles que les macrophages et les DC. Selon la théorie des « signaux de danger » émise par Polly Matzinger, l'activation de ces cellules est basée sur la reconnaissance de molécules interprétées comme dangereuses par les cellules (62). Ces molécules incluent des motifs moléculaires microbiens conservés appelés PAMP (« pathogen-associated molecular pattern »), mais aussi des molécules endogènes présentes dans le milieu extracellulaire à la suite d'un stress cellulaire ou lors de lésions tissulaires appelées DAMP. Ces structures sont reconnues par une série de récepteurs de type PRR (« pattern recognition receptors ») répartis en différentes familles. Les TLR sont des protéines transmembranaires exprimées à la membrane plasmique ou dans les endosomes ; ces récepteurs sont sensibles à différentes molécules issus d'agents pathogènes telles que les polysaccharides bactériens ou certains acides nucléiques viraux. Les NLR (« Nod-like receptors ») sont des PRR cytosoliques dont certains membres appartiennent à l'inflammasome. Ces protéines sont sensibles à de nombreux PAMP d'origine bactérienne et certains DAMP. Enfin, les RLR (« Rig-like receptors ») sont des hélicases cytosoliques stimulées par différents acides nucléiques viraux. Ces trois familles de PRR activent plusieurs voies de signalisation aboutissant à l'expression ou la surexpression des molécules du CMH de classe I (CMH-I) et II (CMH-II), des molécules de costimulation et de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-12 ou le TNF- $\alpha$ . De plus, la stimulation des TLR-3, -4, -7 et -9 et des RLR provoque l'expression des IFN-I et l'activation des membres de l'inflammasome induit spécifiquement la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 (63).

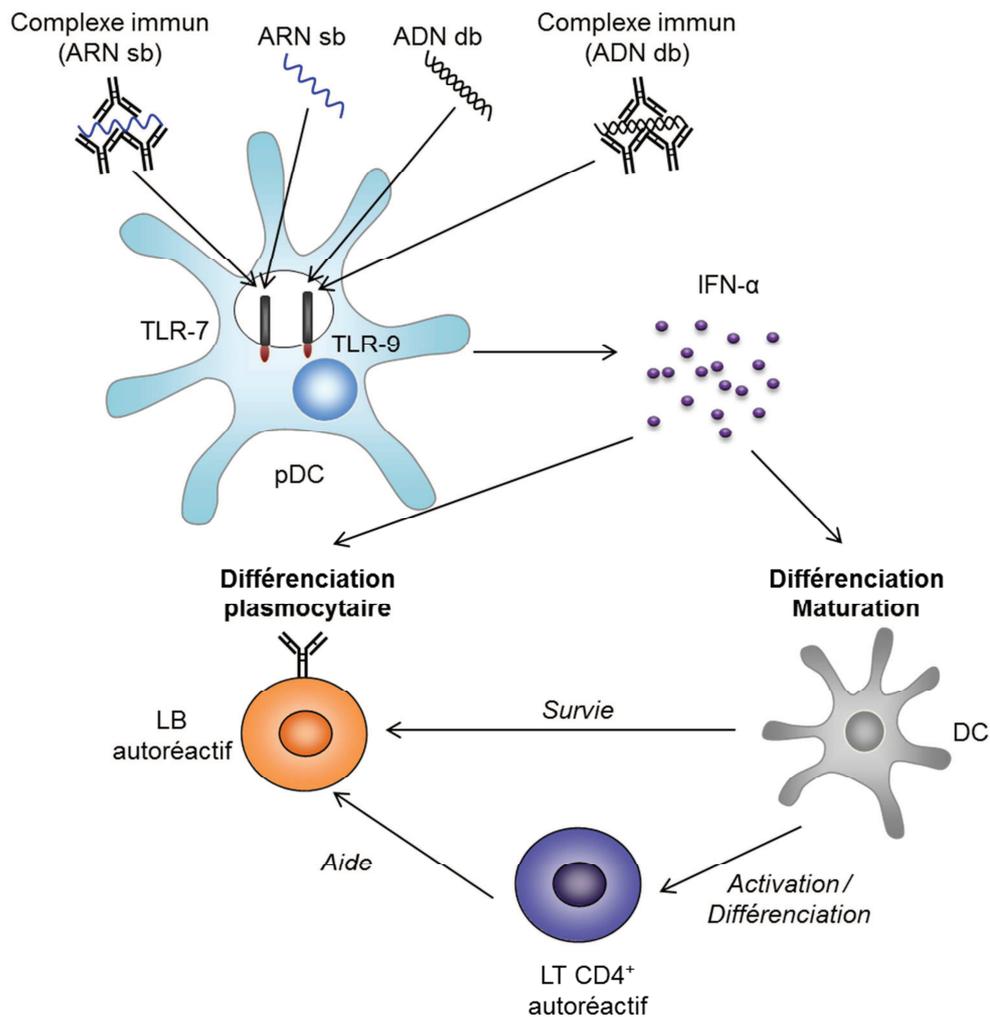
### Stimulation des récepteurs TLR

Deux TLR en particulier, TLR-7 et TLR-9, présentent un grand intérêt dans le développement du lupus. Ces récepteurs sont exprimés dans les endosomes des macrophages, des pDC et des LB et sont activés par l'acide ribonucléique simple brin (ARN sb) pour TLR-7 et l'ADN db méthylé pour TLR-9. Dans un contexte lupique, ces deux récepteurs reconnaissent des acides nucléiques phagocytés issus de cellules apoptotiques et jouant le rôle de DAMP. Des résultats concordants suggèrent une contribution importante de ces TLR dans la réponse autoimmune. En effet, l'augmentation de l'expression des ARN messagers des deux récepteurs est observée chez les patients lupiques (64). De plus, la délétion de TLR-7 chez les souris MRL/lpr ralentit la progression de la maladie. Paradoxalement, la délétion de TLR-9 chez ces mêmes souris provoque une aggravation de la maladie malgré une baisse des autoanticorps (65). Ce résultat inattendu s'expliquerait par un rôle inhibiteur de TLR-9 sur TLR-7. Par conséquent, en absence de TLR-9, la stimulation délétère de TLR-7 est amplifiée chez les souris MRL/lpr. Cette hypothèse est confirmée par le phénotype des souris MRL/lpr TLR-7<sup>-/-</sup> TLR-9<sup>-/-</sup> qui présentent des symptômes plus faibles que les souris TLR-7<sup>-/-</sup> (66). Les deux récepteurs ont par conséquent un rôle délétère dans la pathologie.

D'autres TLR pourraient aussi jouer un rôle dans le développement du lupus. Un rôle de TLR-2 est par exemple envisagé puisque son absence abolit la réponse autoimmune induite par la protéine HMGB1 retrouvée en excès dans les séra de patients lupiques (60). De plus, certains RLR seraient aussi stimulés au cours du lupus. En effet, un polymorphisme du gène codant pour la DNase cytosolique TREX1 (« three prime repair exonuclease 1 ») est associé à la pathologie et les souris déficientes pour ce gène développent une autoimmunité létale. Dans ce cas, un défaut de dégradation des molécules d'ADN cytosoliques provoque une stimulation aberrante de RLR à l'origine d'une réponse autoimmune (67).

### L'IFN- $\alpha$ à la base de l'inflammation du lupus

L'inflammation associée au lupus se caractérise par une production accrue d'IFN-I, essentiellement de type IFN- $\alpha$  qui joue un rôle pathogène au cours de la maladie (Figure 3). Cette cytokine est normalement produite suite à une infection virale et active l'expression de différents gènes antiviraux bloquant certaines étapes du cycle de réplication du virus. De plus,



**Figure 3. Production et rôle pathogène de l'IFN- $\alpha$  au cours du LED.** La stimulation dans les pDC de TLR-7 et TLR-9 par des molécules d'ARN sb et d'ADN db libres ou sous forme de complexes immuns provoque la sécrétion d'IFN- $\alpha$ . Cette cytokine favorise directement la différenciation des LB autoréactifs en plasmocytes. De plus, elle induit aussi la différenciation et la maturation des DC. Ce dernier mécanisme participe indirectement à la progression du LED en augmentant la sécrétion par les DC de la cytokine BAFF (« B cell-activating factor ») impliquée dans la survie des LB. De plus, ce processus amplifie l'activation et la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> qui apporte une aide à la réponse immunitaire des LB.

cette cytokine a une action pléiotrope sur les fonctions d'autres cellules immunitaires. Une concentration élevée en IFN- $\alpha$  est observée chez les patients lupiques et ce taux est corrélé à l'activité de la maladie (68). Les cellules les plus productrices de cette cytokine sont les pDC, qui se distinguent des DC dites conventionnelles par un phénotype et une fonction cellulaire différentes. Chez les patients lupiques, la proportion de pDC circulantes est cependant réduite (69) ce qui serait due à une migration de ces cellules dans les tissus inflammés tels que la peau ou les reins où elles sont présentes en nombre important (70, 71). Ces cellules expriment

une variété de TLR restreinte à TLR-7 et TLR-9. Au cours du lupus, la stimulation de ces deux récepteurs dans les pDC par les molécules d'ARN sb et d'ADN db issus de débris apoptotiques contribue en grande partie à cet excès d'IFN- $\alpha$ . De plus, après l'initiation du lupus, des complexes immuns contenant des autoantigènes associés aux autoanticorps se forment. Ceux renfermant des acides nucléiques, en particulier de l'ARN, induisent efficacement la sécrétion d'IFN- $\alpha$  par les pDC (72). Ce mécanisme dépend de la reconnaissance de la portion constante des anticorps par le récepteur FcRIIA en surface des pDC (73). Par conséquent, il existe une boucle d'amplification de la progression de la maladie : une fois formés, les complexes immuns sont endocytés par les pDC, ce qui a pour effet une stimulation des TLR endosomaux et une augmentation de la sécrétion d'IFN- $\alpha$  pathogène.

Les IFN-I régulent de nombreuses fonctions immunitaires en se liant au récepteur IFNAR (« interferon  $\alpha/\beta$  receptor ») et en stimulant l'expression de nombreux gènes. Chez des patients lupiques l'étude du profil d'expression génique a mis en évidence ce que l'on nomme une « signature IFN » caractérisée par une augmentation de l'expression de nombreux gènes induits par les IFN-I. Cette surexpression est corrélée avec le score de la maladie (74). L'IFN- $\alpha$  a une activité pléiotrope sur une grande variété de cellules immunitaires et son excès au cours du lupus stimule certains mécanismes immunitaires impliqués dans la progression de la pathologie. En effet, les pDC augmentent directement la différenciation des LB en plasmocytes produisant des anticorps par un mécanisme dépendant de l'IFN- $\alpha$  (75). De plus l'excès d'IFN- $\alpha$  présent dans les sera de patients lupiques augmente la différenciation des DC à partir de précurseurs hématopoïétiques ou de monocytes (76, 77). Grâce à ce processus, l'IFN- $\alpha$  favorise indirectement la réponse autoimmune des LB en stimulant la sécrétion par les DC matures de la cytokine BAFF (78) jouant un rôle central dans la survie des LB autoréactifs au cours du lupus. De plus, la maturation des DC induite en réponse à l'IFN- $\alpha$  permet l'activation et la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> qui apportent une aide aux LB. Cette idée est soutenue par l'administration d'IFN- $\alpha$  aux souris (NZB/W)F1 qui aggrave la sévérité de la maladie par un mécanisme dépendant des LT (79). Nous reviendrons en détail sur l'implication de BAFF et des LT dans les paragraphes 1.1.2.3.1 et 1.1.2.3.2.

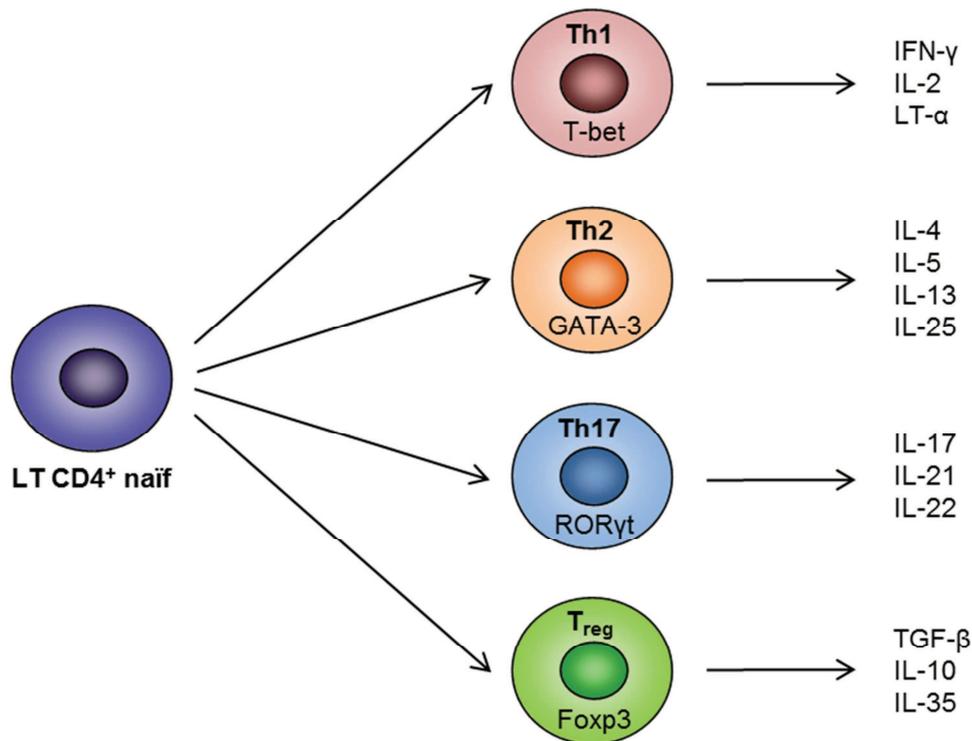
### 1.1.2.3. L'activation de l'immunité adaptative

#### 1.1.2.3.1. Les lymphocytes T dans le lupus

##### Ontogénie des LT en conditions physiologiques

Les LT représentent avec les LB les deux acteurs majeurs de l'immunité adaptative. Les LT dits conventionnels expriment un TCR composé des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  d'une grande variabilité lui permettant de lier un répertoire important d'antigènes.

On distingue deux sous-populations cellulaires  $CD4^+$  et  $CD8^+$  dont le développement a lieu dans le thymus à partir de précurseurs hématopoïétiques issus de la moelle osseuse. Ces cellules sont activées dans les organes lymphoïdes secondaires au contact d'une CPA grâce à la reconnaissance par le TCR d'un peptide antigénique présenté par les molécules du CMH-I pour les LT  $CD8^+$  et du CMH-II pour les LT  $CD4^+$ . Des signaux de costimulation sont apportés par l'engagement du récepteur CD28 par les molécules B7 exprimées par les CPA et par la présence de cytokines pro-inflammatoires. Après activation, les LT prolifèrent et se différencient en LT effecteurs, les LT  $CD8^+$  en LT cytotoxiques capables d'induire la mort de cellules-cibles et les LT  $CD4^+$  en LT auxiliaires qui modulent la fonction des autres cellules immunitaires. On distingue quatre sous-populations principales de LT auxiliaires caractérisées par un profil cytokinique et des fonctions cellulaires différentes. Les cellules Th1 produisent principalement de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-2 et favorisent l'immunité cellulaire. Les cellules Th2, sécrètent surtout de l'IL-4, l'IL-5 et de l'IL-13 et contribuent à l'immunité humorale. Les cellules Th17 ont été découvertes récemment et produisent majoritairement de l'IL-17 aux propriétés pro-inflammatoires (80). Enfin, les LT régulateurs ( $T_{reg}$ ), dites induites lorsqu'elles sont issues de LT  $CD4^+$  naïfs, sécrètent les cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- $\beta$  et contrôlent la réponse d'autres cellules immunitaires en inhibant leurs fonctions (Figure 4). Les proportions de ces différentes populations de LT auxiliaires varient suivant le contexte infectieux et déterminent le type de réponse immunitaire adaptative (81). De plus, lors d'une réponse immunitaire T-dépendante des LB, une partie des LT auxiliaires migrent dans les centres germinatifs folliculaires où elles aident la différenciation des LB en plasmocytes à longue durée de vie ou en LB mémoires. Ces cellules sont appelées  $T_{fh}$  (« follicular helper T cell ») (82).



**Figure 4. Les différentes populations de LT auxiliaires.** Les facteurs de transcription caractéristiques de chaque population de LT auxiliaires et les principales cytokines produites sont indiqués. ROR $\gamma$ t : « retinoic acid orphan receptor  $\gamma$ t » ; Foxp3 ; « forkhead box P3 » ; LT- $\alpha$  : lymphotoxine  $\alpha$ .

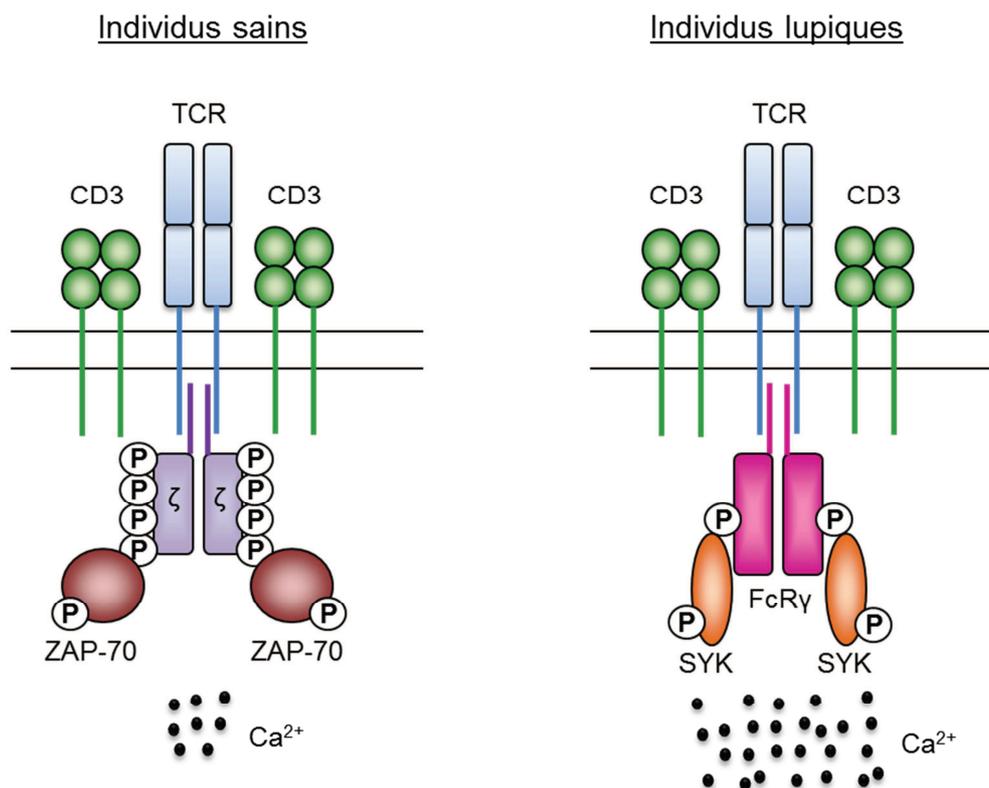
La réactivité des LT vis-à-vis des antigènes est étroitement contrôlée dans l'organisme par des mécanismes de tolérance centraux et périphériques afin d'éliminer ou inactiver les cellules autoréactives. Au niveau du thymus, les mécanismes de tolérance centraux comportent d'abord une étape de sélection positive dans le cortex où les thymocytes double positifs CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> reconnaissant par leur TCR des antigènes du soi, survivent et évoluent en thymocytes simple positifs CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. En revanche, les cellules ne reconnaissant pas ces antigènes meurent en absence de signaux de survie, ce processus est appelé ignorance. Au stade simple positif, les thymocytes subissent ensuite une étape de sélection négative dans la zone médullaire, les cellules reconnaissant un antigène du soi avec une faible affinité survivent et migrent en périphérie. Au contraire, les cellules reconnaissant un antigène du soi avec une forte affinité sont soit éliminées par délétion clonale, ou subissent un processus de réarrangement du récepteur (« receptor editing »), ou bien encore sont inactivés par induction d'anergie. Des études suggèrent aussi un mécanisme de diversion clonale permettant à ces cellules autoréactives de se différencier dans ce cas en T<sub>reg</sub> dites naturelles. En périphérie, il existe aussi des mécanismes de tolérance empêchant le développement d'autoimmunité par

les LT ayant échappé aux processus de tolérance centrale. L'anergie peut aussi être induite à ce stade, en particulier au contact de CPA tolérogènes n'induisant pas de signaux de costimulation. Les cellules T<sub>reg</sub> naturelles ou induites sont aussi impliquées dans le contrôle de la réponse immunitaire des autres types de LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires autoréactifs en inhibant leur activité. Enfin, la stimulation répétée du TCR induit un mécanisme d'AICD. Dans ce cas, l'expression la molécule Fas-L par les LT activés permet l'induction réciproque d'apoptose en engageant le récepteur de mort Fas (83).

### Défaut de tolérance et réactivité accrue de lymphocytes T lupiques

Les LT jouent un rôle critique dans la pathogénèse lupique. Ainsi, l'injection d'un anticorps déplétant les LT chez les souris (NZB/W)F1 réduit fortement la progression de la maladie et prolonge leur durée de vie (84). Un défaut de tolérance essentiellement périphérique des LT et une augmentation de leur sensibilité lors de l'activation par un antigène provoquent une réponse immunitaire autoimmune. En particulier, l'expansion de certaines sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires est un élément important dans le développement de la pathologie.

Les LT issus de patients lupiques sont caractérisés par une hyperréactivité après stimulation du TCR lié à une altération de la voie de signalisation en aval du récepteur (Figure 5). La modification la plus importante se situe dans le complexe TCR-CD3, où la chaîne  $\zeta$  est remplacée par la chaîne  $\gamma$  du récepteur FcR (85), provoquant le recrutement de la kinase SYK (« spleen tyrosine kinase ») au lieu de la kinase ZAP70 (« zeta-chain-associated protein kinase 70 ») après stimulation du TCR. Ce changement induit un flux calcique plus rapide et plus élevé à l'origine d'une diminution du seuil d'activation des cellules (86). En aval, cette voie de signalisation induit la phosphorylation du répresseur transcriptionnel CREM- $\alpha$  (« cAMP response element modulator  $\alpha$  ») par la kinase CAMK4 (« calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV ») et ces deux facteurs sont surexprimés chez les patients lupiques (87, 88). CREM- $\alpha$  bloque l'expression de l'IL-2 et stimule l'expression de l'IL-17 (87). Ce mécanisme explique ainsi en partie le défaut et de l'augmentation de la production respective d'IL-2 et d'IL-17 au cours du lupus. D'autres anomalies sont aussi observées dans ces cellules. Par exemple, une augmentation de la quantité de mitochondries et de leur



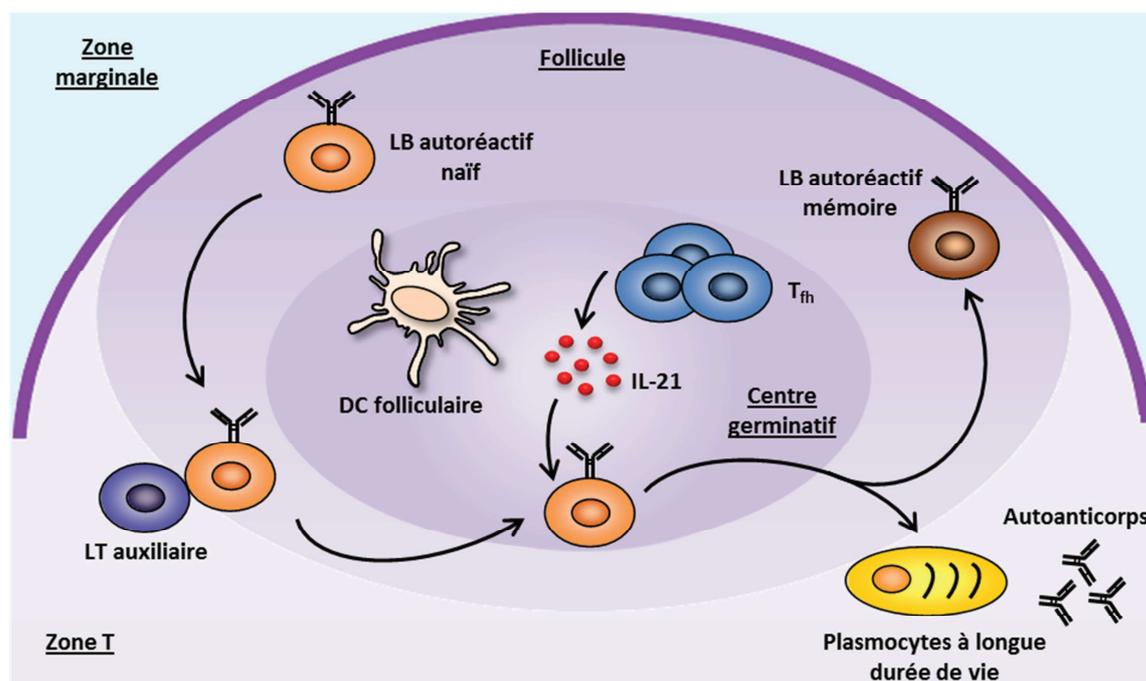
**Figure 5. Comparaison des voies de signalisation du TCR entre les LT d'individus sains et lupiques.** L'engagement du TCR à la surface des LT normaux induit le recrutement de la chaîne  $\zeta$  qui est alors phosphorylée. En conséquence, la kinase ZAP-70 est recrutée et phosphorylée ce qui provoque en aval un flux de calcium cytosolique activant la cellule. Chez les LT d'individus lupiques, la chaîne  $\zeta$  est remplacée par la chaîne  $\gamma$  du récepteur FcR. Sa phosphorylation induit le recrutement de la kinase SYK qui est à son tour phosphorylée. En aval, la voie de signalisation induite provoque un flux calcique plus élevé.

polarisation est à l'origine d'un défaut en adénosine triphosphate (ATP) et d'une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (89). De plus, on observe une surexpression de la molécule de costimulation CD40-L et de la molécule d'adhésion CD44 à la surface des LT CD4<sup>+</sup> lupiques (90, 91). La surexpression de CD40-L, au contact des LB autoréactifs exprimant CD40, permettrait une meilleure costimulation de ces dernières et une augmentation de leur réponse immunitaire. Par ailleurs, CD44 est nécessaire à la migration des LT dans les tissus et sa surexpression chez les patients lupiques jouerait un rôle important dans l'infiltration de ces cellules au niveau des reins inflammés (91). De plus, la stimulation de CD44 active la kinase ROCK (« p-kinase coiled-coil-containing domain protein kinase ») impliquée dans l'expression de l'IL-17 et de l'IL-21. La suractivation de ROCK observée dans les LT CD4<sup>+</sup> des souris MRL/lpr est responsable d'une production accrue de ces deux

cytokines pro-inflammatoires (92). Par conséquent un mécanisme similaire peut être envisagé chez les patients lupiques.

Une autre caractéristique majeure du lupus est une modification des proportions des sous-populations cellulaires de LT, principalement des LT  $CD4^+$  auxiliaires. Les cellules Th17 jouent un rôle important dans l'autoimmunité par leur capacité à sécréter de l'IL-17. Cette cytokine favorise l'inflammation en induisant l'expression locale de cytokines et chimiokines telles que l'IL-6, le TNF- $\alpha$  ou CXCL18 (93). Des taux élevés d'IL-17 ont été détectés dans les séras de patients lupiques (94). Cette sécrétion élevée est le résultat de l'augmentation de la proportion de cellules Th17 (95), mais aussi d'une autre population de LT dite double négative  $CD3^+ CD4^- CD8^-$  (96). Chez la souris MRL/lpr, cette dernière est majoritairement responsable de l'IL-17 produite au cours de la maladie (97). Des résultats récents suggèrent un rôle important de l'IL-17 dans la réponse humorale au cours du LED. En effet, l'IL-17, seule ou en synergie avec la cytokine BAFF aussi surexprimée chez les patients lupiques, favorise la prolifération des LB, leur survie et leur différenciation en plasmocytes (98).

Les cellules  $T_{fh}$  sont une autre population de LT  $CD4^+$  auxiliaires dont la fréquence est fortement modifiée au cours du lupus. Ces cellules sont localisées dans le centre germinatif des organes lymphoïdes secondaires et aident les LB à se différencier en plasmocytes à longue durée de vie et en LB mémoires par un mécanisme reposant en partie sur la production d'IL-21. Les patients atteints de LED sévère présentent une fréquence accrue en cellules  $T_{fh}$  circulants (99). De plus, les taux sériques d'IL-21 chez les patients lupiques sont plus élevés comparés aux sujets sains sans corrélation toutefois avec le SLEDAI (100). Des travaux sur les souris *Sanroque* suggèrent aussi un rôle des cellules  $T_{fh}$  dans le LED. Ces souris possèdent une mutation dans la protéine Roquin provoquant une expansion des cellules  $T_{fh}$ , associée à une production accrue en IL-21. Ces modifications provoquent l'apparition spontanée d'un syndrome lupique chez ces souris avec des taux élevés d'autoanticorps antinucléaires et des glomérulonéphrites (101, 102). L'ensemble de ces résultats soutient l'hypothèse selon laquelle une expansion des cellules  $T_{fh}$  et la production d'IL-21 par ces cellules serait deux éléments importants contribuant à la pathogénèse lupique (Figure 6).



**Figure 6. Rôle des cellules  $T_{fh}$  et de l'IL-21 dans la réponse autoimmune des LB au cours du LED.** La reconnaissance d'un antigène par des LB autoréactifs naïfs du follicule accompagnée d'une aide des LT auxiliaires entraîne une migration d'une partie de ces cellules dans le centre germinatif. Elles subissent alors une expansion clonale, une hypermutation somatique et une commutation de classe. La survie de ces cellules dans le centre germinatif dépend des signaux apportés par les DC folliculaires et les cellules  $T_{fh}$ . Ces dernières sont présentes en proportion importante chez les individus lupiques. De plus, ces cellules produisent de l'IL-21 en excès qui favorise la différenciation plasmocytaire des LB. L'ensemble de ce processus génère des LB autoréactifs mémoires et des plasmocytes à longue durée de vie produisant des autoanticorps.

L'émergence de LT autoréactifs matures est liée à des défauts dans les mécanismes de tolérance centrale et/ou périphérique. Dans le lupus, aucune étude à ce jour n'a mis en évidence un défaut de tolérance centrale des LT. En revanche, plusieurs études ont mis en avant une altération des processus de tolérance périphérique liée en particulier aux  $T_{reg}$ . La plupart des études chez les patients font état d'une diminution de leur fréquence qui est inversement corrélée avec la sévérité de la maladie (103). La proportion de ces cellules est aussi réduite chez les souris (NZB/W)F1 (104). Par ailleurs, des travaux montrent une réduction de leur fonction suppressive. Cet effet proviendrait à la fois d'une diminution de l'expression du facteur de transcription Foxp3 (105) et d'une insensibilité des LT  $CD4^+$  effectrices à l'action de ces cellules (106, 107). Chez la souris MRL/lpr, la surexpression de l'IL-6 par les CPA et la sous-expression des molécules de co-stimulation CD80/86 et CTLA4 (« cytotoxic T lymphocyte antigen 4 ») par les  $T_{reg}$  sont responsables de la réduction de la

fonction suppressive de ces cellules (108). Il existe cependant des désaccords quant au rôle des  $T_{reg}$  dans le lupus, d'autres études font état d'une fréquence et d'une activité normale de ces cellules au cours de la pathologie (109). Enfin, d'autres défauts de tolérance périphérique des LT ont aussi été mis en évidence au cours du lupus, incluant par exemple une résistance à l'anergie et à l'induction d'apoptose par AICD par les LT de patients lupiques. Ce processus repose sur la surexpression de la cyclooxygénase-2 et la présence d'agents inhibant l'activité de cette protéine restaure ces deux mécanismes (110).

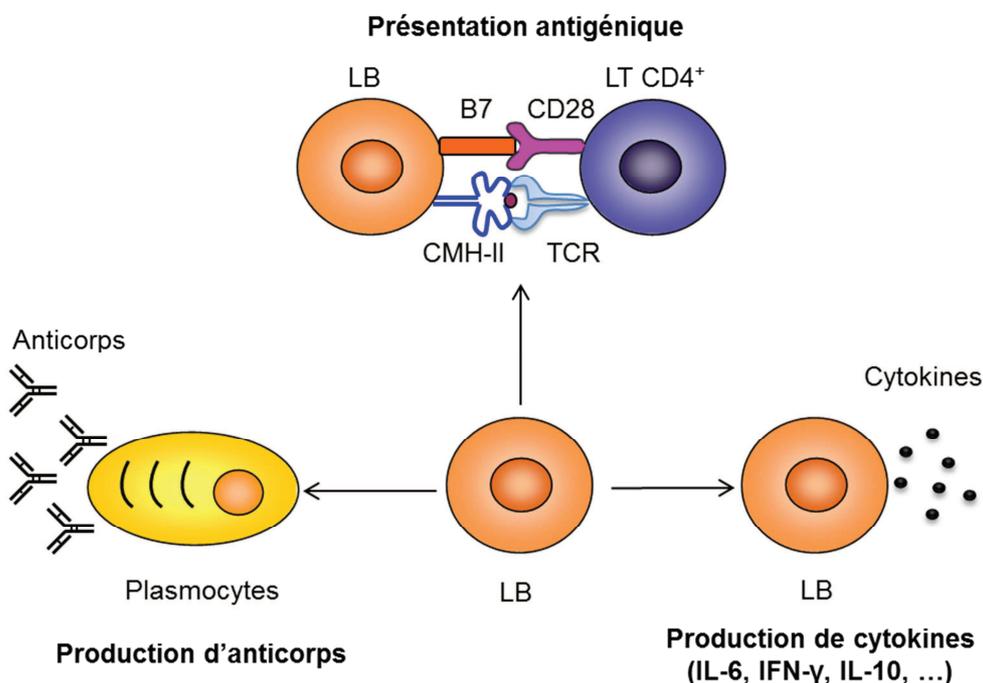
#### *1.1.2.3.2. Les lymphocytes B dans le lupus*

##### Ontogénie des LB en conditions physiologiques

Les LB sont des cellules de l'immunité adaptative exprimant un récepteur (BCR) spécifique d'un antigène. La variabilité élevée du BCR confère à ces cellules la capacité de reconnaître une grande diversité d'antigènes. Elles sont produites dans la moelle osseuse à partir de précurseurs hématopoïétiques, passant d'abord au stade pro-B, puis pré-B et enfin au stade transitionnel. L'ensemble de ces étapes se caractérise par un réarrangement des segments des gènes d'immunoglobulines. Les cellules au stade transitionnel quittent la moelle osseuse et migrent vers la rate où elles subissent l'étape finale de leur développement en passant au stade T1, puis T2 avant de devenir des LB matures de type B-2. Ces cellules comprennent les cellules FO (localisées dans le follicule) et les cellules MZ (localisées dans la zone marginale). Il existe aussi des LB de type B-1 produits pendant la vie fœtale dans le foie et qui se localise dans les cavités péritonéales et pleurales (111).

L'activation des LB matures repose sur l'interaction du BCR avec l'antigène. Cependant, il existe deux types de réponse selon le type d'antigène. Les antigènes T-indépendants activent principalement les LB B-1 et MZ sans nécessité d'action d'un LT  $CD4^+$ . Dans ce cas, les LB activés se différencient rapidement en plasmocytes à courte durée de vie produisant des anticorps en faibles quantités d'isotype IgM. Les antigènes T-dépendants activent principalement les LB FO et génèrent une production d'anticorps spécifiques grâce à l'action des LT auxiliaires. Ces derniers fournissent des signaux de costimulation tels que CD40-L qui se lie au récepteur CD40 exprimé par les LB. Une fois

activés, les LB peuvent soit former un foyer extrafolliculaire et se différencier en plasmocytes à courte durée de vie produisant des anticorps d'isotype IgM (Figure 7), soit participer à la formation d'un centre germinatif dans la zone folliculaire conduisant à leur expansion clonale, l'hypermutation somatique et une commutation de classe. Ces cellules deviennent alors des plasmocytes à longue durée de vie sécrétant des anticorps d'isotypes IgG, IgA ou IgE (Figure 7), ou bien des LB mémoires. Les DC folliculaires situées dans le centre germinatif jouent un rôle important dans la sélection positive des LB ayant subi le processus d'hypermutation somatique. En présentant à leur surface des antigènes au sein de complexes immuns, ces cellules permettent la survie des LB ayant une forte affinité pour l'antigène. De plus, les cellules  $T_{fh}$  présentes dans le centre germinatif fournissent une aide aux LB par l'apport de signaux de costimulation et en sécrétant des cytokines impliquées dans la différenciation plasmocytaire telles que l'IL-21. Les plasmocytes à longue durée de vie générés sont capables de survivre à très long terme dans des niches de survie localisées principalement au niveau de la moelle osseuse (111, 112).



**Figure 7. Fonctions des LB dans la réponse immunitaire.** Les LB participent à la réponse immunitaire par différentes fonctions. Ces cellules peuvent se différencier en plasmocytes sécrétant des anticorps, produire des cytokines influençant la réponse immunitaire et activer les LT CD4<sup>+</sup> grâce à l'expression des molécules du CMH-II et des molécules de costimulation B7.

Les LB naïfs expriment aussi la plupart des TLR et leur stimulation joue un rôle important à la fois dans la réponse T-indépendante en permettant une différenciation rapide en plasmocytes à courte durée de vie, mais aussi dans la réponse T-dépendante en agissant comme un signal de costimulation en synergie avec les signaux induits par l'engagement du BCR et de CD40. Les LB ont aussi des fonctions indépendantes de la production d'anticorps en jouant le rôle de CPA capables de présenter des antigènes par les molécules du CMH-II. L'expression concomitante des molécules de costimulation B7 permet l'activation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs par ces cellules (Figure 7). De plus, les LB produisent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires pouvant agir de façon paracrine sur d'autres cellules immunitaires. En particulier, les LB produisent des cytokines favorisant une réponse Th1 (IL-12, IFN- $\gamma$ ) et Th2 (IL-2, IL-4, IL-13) (111). Il existe une population de LB régulatrices (B<sub>reg</sub>) diminuant la réponse immunitaire en produisant de l'IL-10 (Figure 7). Ces cellules se différencient à partir d'une population progénitrice en présence des signaux induits par l'engagement de CD40 ou de TLR-4 et TLR-9. La production d'IL-10 est déclenchée en présence des ligands de ces TLR (113).

Des mécanismes de tolérance centrale et périphérique sont présents à différents stades de l'ontogénèse des LB afin de supprimer ou d'inactiver les cellules autoréactives. Dans la moelle osseuse, il existe un premier mécanisme de tolérance centrale avec une sélection négative au stade pré-B. Les cellules présentant un pré-BCR avec une forte avidité pour des antigènes du soi meurent par délétion clonale ou subissent un mécanisme de réarrangement du récepteur. Un deuxième mécanisme de tolérance périphérique a lieu dans la rate au stade transitionnel. Les cellules subissent un processus de sélection négative similaire à celui décrit dans la moelle osseuse. De plus, les antigènes du soi ou du non-soi de très faible avidité et de faible avidité induisent respectivement un mécanisme d'ignorance provoquant la mort précoce des cellules et un mécanisme d'anergie inactivant ces cellules et réduisant leur durée de vie. Enfin, un troisième mécanisme de tolérance périphérique a lieu au sein du centre germinatif. Les LB subissant une hypermutation somatique, en plus d'être sélectionnés positivement vis-à-vis de leur affinité pour l'antigène, subissent un mécanisme de sélection positive par compétition pour la reconnaissance de l'antigène exposé par les DC folliculaires et pour l'aide apportée par les cellules T<sub>fh</sub>. En l'absence de signaux de survie apportés par ces cellules, les LB meurent par engagement du récepteur de mort Fas (114).

### Défaut de tolérance et réactivité accrue des LB lupiques

Les LB jouent un rôle central dans la pathogénèse lupique. En effet, le transfert de cellules pré-B dérivées de foie fœtal de souris (NZB/W)F1 à des souris SCID (« severe combined immune deficiency ») ne possédant pas de LB et LT est suffisant pour générer un syndrome lupique (105). De plus, la déplétion des LB chez ces souris bloque le développement de la maladie (115). Des défauts de tolérance centraux et périphériques des LB associés à certains facteurs de susceptibilité génétiques et environnementaux contribuent à une réponse immunitaire des LB vis-à-vis d'autoantigènes et la production d'autoanticorps pathogènes après différenciation en plasmocytes. De plus, les fonctions immunitaires de ces cellules non liées à la production d'anticorps participent aussi au développement de la pathologie.

A l'instar des LT, les LB lupiques présentent une hyperréactivité en réponse à une stimulation du BCR. Cette caractéristique est liée à une modification de la signalisation en aval du récepteur. En effet, le signal induit par le BCR est étroitement régulé par de multiples protéines activatrices et inhibitrices. Or, certains polymorphismes génétiques associés au LED modifient l'expression ou la fonction de certains de ces facteurs. On observe par exemple une diminution de l'expression des protéines inhibitrices Lyn et Fc $\gamma$ RIIB (23, 116). De plus, une mutation dans le récepteur Fc $\gamma$ RIIB associée au LED empêche le recrutement de cette protéine à proximité du BCR lors d'une stimulation du récepteur (117). L'ensemble de ces modifications amplifie le signal induit par le BCR et déclenche un flux calcique plus élevé (118). Par ailleurs, nous avons évoqué précédemment le rôle délétère de TLR-7 et TLR-9 dans le lupus. Ces deux récepteurs sont exprimés par les LB et leur stimulation induit un signal de stimulation ou de costimulation en synergie avec le signal du BCR. Au cours du lupus, la signalisation en aval de ces deux récepteurs peut aussi être amplifiée. La protéine Carabin, par exemple, est un régulateur négatif de la signalisation en aval du BCR et de TLR-9 dans les LB. L'absence de ce facteur augmente l'activation des cellules en réponse à la costimulation des deux récepteurs. Carabin est sous-exprimée dans les LB de patients lupiques et des souris (NZB/W)F1, ce qui pourrait être un élément important contribuant à l'hyperréactivité de ces cellules au cours de la maladie (119).

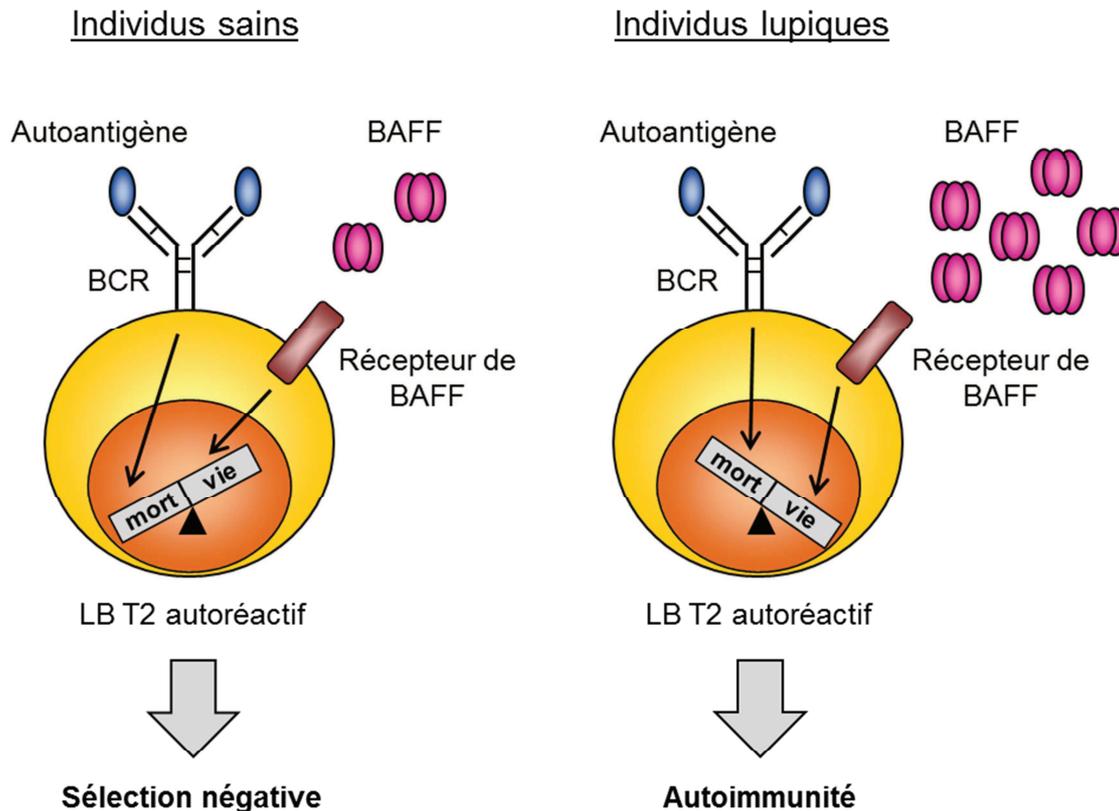
Comme mentionné plus haut, les LB matures comprennent les cellules B1 et B2, ces dernières étant classées en cellules MZ et FO. Au cours du lupus, ces trois populations sont à l'origine de la sécrétion d'autoanticorps (120). En ce qui concerne les cellules B1, une expansion de ces cellules est observée dans la cavité péritonéale et la rate des souris (NZB/W)F1 (121). Leur délétion chez ces souris réduit la sévérité de la maladie, mettant ainsi en avant un rôle important de cette population cellulaire dans la pathologie (122). Les cellules MZ sont aussi présentes en proportion plus importante chez les souris (NZB/W)F1 et représentent la population sécrétant le plus d'anticorps IgM anti-ADN (123). Par ailleurs, les cellules FO jouent un rôle majeur dans la pathogénèse lupique en migrant dans les centres germinatifs. Ces structures se forment spontanément dans les follicules de plusieurs modèles murins de lupus (124). Après un processus d'hypermutation somatique et commutation de classe, les LB autoréactifs se différencient en plasmocytes à longue durée de vie. Comme évoqué plus haut, l'excès de signaux de costimulation et cytokiniques apporté par les cellules  $T_{fh}$  en proportion plus importante stimulent ce mécanisme (Figure 6). Chez les souris MRL/lpr, une étude a cependant mis en évidence une accumulation anormale des LB autoréactifs en dehors du centre germinatif, à l'interface entre la zone T et la pulpe rouge. Ces cellules subissent néanmoins un mécanisme d'hypermutation somatique qui a habituellement lieu dans le centre germinatif (125).

Les plasmocytes générés à partir des LB autoréactifs produisent des quantités importantes d'autoanticorps au cours du lupus. On observe chez les souris (NZB/W)F1 une proportion accrue en plasmocytes à courte et longue durée de vie (126). Chez les patients lupiques, la fréquence des plasmocytes circulants est aussi plus élevée et corrèle avec le score SLEDAI de la maladie (127). Une partie de ces plasmocytes infiltre les organes inflammés, en particulier les reins où ils participent à la production locale d'autoanticorps (128). De plus, les reins des souris (NZB/W)F1 sont particulièrement enrichis en plasmocytes à longue durée de vie (129). Il est donc envisageable que ces organes inflammés jouent le rôle de niche de survie chez les individus lupiques.

Les autres fonctions des LB indépendantes de la production d'anticorps influencent aussi le développement du lupus. Par exemple, la présentation d'autoantigènes par ces cellules exprimant le CMH-II joue un rôle important dans la réponse autoimmune des LT  $CD4^+$ . En

effet, les LB MZ des souris (NZB/W)F1 expriment des niveaux élevés de molécules de costimulation B7 qui pourraient permettre une activation efficace de LT CD4<sup>+</sup> autoréactifs naïfs (130). La contribution des LB dans la présentation antigénique au cours du lupus a aussi été suggérée par une étude sur des souris MRL/lpr déficientes en LB qui présentent un nombre de LT activés et mémoire fortement réduit (131). Les LB régulent également la progression de la pathologie grâce à la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires favorisant la réponse autoimmune. Par exemple, les LB issus de patients lupiques produisent des niveaux élevés d'IL-6 qui stimulent de façon autocrine leur différenciation en plasmocytes (132). Enfin, quelques résultats suggèrent aussi un rôle protecteur des cellules B<sub>reg</sub> au cours du lupus grâce à leur sécrétion d'IL-10. En effet, ces cellules sont plus nombreuses chez les souris (NZB/W)F1 à un stade précoce de la maladie par rapport aux souris contrôles (133). De plus, les LB issus de patients lupiques ont des niveaux d'ARN messagers codant pour l'IL-10 plus élevés comparés aux sujets sains (134).

L'émergence de LB autoréactifs au cours du lupus a pour origine un défaut dans les mécanismes de tolérance à un stade précoce de leur développement. Au niveau de la moelle osseuse, des anomalies dans ces processus ont été fortement suggérées mais les arguments à ce sujet restent rares. Une étude sur des LB immatures de souris MRL/lpr a mis en évidence une capacité de réarrangement du récepteur réduite, ce qui pourrait favoriser le développement d'autoimmunité (135). En revanche, l'analyse de la réactivité des récepteurs BCR clonés à partir des LB de patients lupiques révèle une augmentation importante de la fréquence des cellules autoréactives par rapport aux sujets sains entre le stade transitionnel et le stade mature (136). Cette anomalie serait due à un excès de la cytokine BAFF au cours du lupus. En effet, ce facteur trimérique est reconnu par les trois récepteurs BCMA (« B cell maturation antigen »), TACI (« transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor ») et BAFF-R (« BAFF receptor ») à la surface des LB et induit un signal de survie. Il joue en particulier un rôle dans la survie des LB transitionnels au stade T2 et leur maturation en LB MZ (97). De manière intéressante, les souris transgéniques pour BAFF développent un syndrome autoimmun lupique avec une production d'autoanticorps et l'apparition de glomérulonéphrites (137). Cette cytokine est retrouvée à des taux élevés dans les sera des souris et des patients lupiques (138, 139). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc un rôle central de BAFF dans un défaut de sélection négative des LB au stade T2 au cours du lupus (Figure 8). Cette observation a été à l'origine de la mise au point d'une



**Figure 8. Rôle de BAFF dans le défaut de tolérance des LB au cours du LED.** Chez un individu sain, la reconnaissance d'un autoantigène par le BCR de LB T2 dans la rate induit un signal de mort permettant l'élimination de la cellule (sélection négative). Chez un individu lupique, l'excès de BAFF induit un signal de survie compensant le signal de mort induit en aval du BCR. Dans ce cas, la cellule mature participe au développement de l'autoimmunité.

molécule thérapeutique pour le lupus, appelé Belimumab, qui cible cette cytokine et inhibe son activité. Nous reviendrons sur ce point dans la partie consacrée aux traitements du LED (paragraphe 1.2.2.1).

Enfin, un défaut de tolérance périphérique chez les individus lupiques est présent au niveau du centre germinatif. En effet, nous avons évoqué plus haut l'expansion des cellules  $T_{fh}$  dans ces structures accompagnée d'une production accrue d'IL-21. Ces anomalies favorisent la survie des LB autoréactifs dans les centres germinatifs lors de la différenciation en plasmocytes à longue durée de vie. Ainsi, l'étude de biopsies de patients lupiques met en évidence une population importante de LB autoréactifs à l'intérieur des centres germinatifs alors que ces mêmes cellules sont exclues de ces structures chez les individus sains et chez les

patients développant d'autres pathologies autoimmunes comme la polyarthrite rhumatoïde (140).

#### 1.1.2.4. Atteinte systémique des organes provoquée par les autoanticorps

##### Les autoanticorps

Les autoanticorps sont spécifiques de nombreux constituants du soi et sont sécrétés par les plasmocytes générés à partir des LB autoréactifs au cours du LED. Ils sont présents chez 95% des patients. Les autoanticorps les plus fréquemment détectés dans les sera des patients lupiques reconnaissent des molécules nucléaires (ADN, histones), mais aussi des protéines cytosoliques (composants du spliceosome, chaperonnes), des composants de la surface

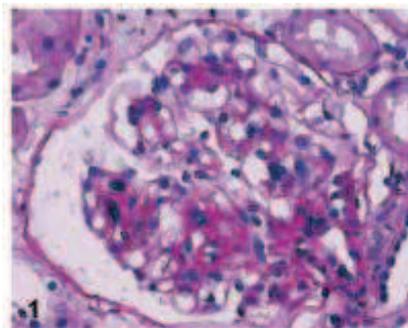
	<b>Autoanticorps</b>	<b>Autoantigène</b>	<b>Prévalence (%)</b>
<b>Autoanticorps dirigés contre le nucléosome ou des protéines associés</b>	anti-ADN	ADN db	60-90
		ADN sb	50-87
	anti-histone	H1, H2A, H2B, H3, H4	30-80
	anti-nucléosome	Nucléosome	50-90
<b>Autoanticorps dirigés contre le spliceosome</b>	anti-Sm	Protéines Sm B/B', D1, E, F, G	5-30
	anti-RNP	Protéines de U1snRNP	20-35
	anti-ARN	ARN U (U1)	10-20
<b>Autoanticorps dirigés contre la particule Ro et ses composants</b>	anti-Ro/SSA	Protéines Ro 60 et Ro 52	30-50
	anti-La/SSB	Protéines La	18-28
	anti-ARN	ARN hY	ND
<b>Autoanticorps dirigés contre le ribosome</b>	anti-rRNP	Protéines ribosomales P0, P1 et P2	10-20
<b>Autoanticorps dirigés contre les protéines de choc thermique</b>	anti-HSP	HSP65, HSP70, HSPA8, HSP90	5-20
	anti-ubiquitine	Ubiquitine	80

**Tableau 3. Spécificité antigénique et fréquence des principaux autoanticorps associés au LED.** ND : non déterminé ; HSP : « heat shock protein »

cellulaire (phospholipides, cardiolipines) et des facteurs extracellulaires (IgG, cytokines). Ces autoanticorps circulants s'associent à leur antigène sous forme de complexes immuns à l'origine de lésions dans les organes. De plus, ces composés amplifient la progression de la maladie en stimulant TLR-7 et TLR-9 après endocytose par les LB et les pDC. La prévalence des autoanticorps associés au LED est mentionnée dans le Tableau 3. Certains de ces autoanticorps peuvent avoir un rôle pathogène dans le LED. C'est le cas des anticorps anti-ADN db et anti-histones associés aux atteintes rénales et les anticorps anti-phospholipides et anti-cardiolipines associés aux thromboses et athéroscléroses se manifestant chez certains patients lupiques.

### L'atteinte rénale, un exemple du rôle pathogène des autoanticorps

Les lésions rénales sont un symptôme majeur du LED et se manifestent par une inflammation du néphron appelée néphrite. L'inflammation peut se localiser au niveau du glomérule (glomérulonéphrites) (141) (Figure 9), au niveau du tissu interstitiel et des tubules (néphrites tubulo-interstitielles) ainsi que dans la paroi des vaisseaux sanguins (vascularites rénales). L'origine de ces néphrites chez les individus lupiques est attribuée en partie aux autoanticorps anti-ADN et anti-histones. En effet, un transfert d'anticorps anti-ADN chez des souris saines provoque l'apparition de glomérulonéphrites et de troubles rénaux (142). La pathogénèse de ces anticorps au niveau des reins semble surtout liée à un isotype IgG, principalement de sous-classes IgG1 et IgG3 (143). L'analyse d'éluats de glomérules de patients et de souris lupiques montre un dépôt de ces anticorps anti-ADN au niveau de ces structures rénales (144, 145).



**Figure 9. Glomérulonéphrite dans une biopsie rénale d'un patient atteint de LED.** Coupe histologique issue d'une biopsie rénale de patient développant une néphrite de classe II après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (141).

Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer un dépôt de ces autoanticorps lors des néphrites lupiques. Le premier mécanisme repose sur une réactivité croisée des anticorps anti-ADN avec des antigènes glomérulaires. En effet, les anticorps anti-ADN sont capables de se lier à l' $\alpha$ -actinine (146) et l'annexin-II (147) exprimés par les cellules mésangiales. La seconde hypothèse implique un dépôt d'autoantigènes circulants au niveau de la membrane basale du glomérule, ces protéines sont ensuite reconnues par les autoanticorps au niveau de ce site. En particulier, les histones, plutôt chargées positivement, sont capables de se lier aux sulfates d'héparane de la membrane glomérulaire chargée négativement grâce à des interactions électrostatiques. Cette hypothèse est soutenue par la détection des histones H2A et H3 au niveau des glomérules dans des biopsies rénales de patients lupiques (148). De plus, une étude montre que l'injection d'héparine à des souris (NZB/W)F1 réduit le dépôt de complexes immuns contenant des nucléosomes au niveau du glomérule. Ce résultat suggère une compétition entre l'héparine et les sulfates d'héparane de la membrane glomérulaire pour l'interaction avec les nucléosomes (149). Enfin, la dernière hypothèse repose sur un dépôt des complexes immuns grâce à la reconnaissance de ces derniers par des récepteurs Fc exprimés au niveau de la membrane glomérulaire. En effet, des souris (NZB/W)F1 déficientes en récepteur Fc $\gamma$  développent une glomérulonéphrite réduite (150). Il faut garder à l'esprit cependant qu'une déficience génétique similaire chez la souris lupique MRL/lpr n'atténue ni la maladie, ni l'atteinte glomérulaire (151), suggérant une implication variable de ces récepteurs selon le modèle murin étudié.

La liaison des autoanticorps aux cellules épithéliales rénales provoque leur activation et la sécrétion par ces cellules de nombreuses cytokines. En particulier, les cytokines IL-12 et IL-18 de type Th1 sont détectées à des taux élevés dans les reins des souris lupiques MRL/lpr (152, 153) et des patients lupiques (154). De plus, la délétion de l'IL-12 ou de la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-18 chez ces souris réduit ou retarde l'apparition des néphrites et des symptômes associés (155, 156). Ces deux facteurs contribuent aux lésions rénales en activant l'expression de l'IFN- $\gamma$ . Cette cytokine, surexprimée dans les néphrites lupiques murines (157) et humaines (127), peut induire directement la mort des cellules épithéliales des reins chez la souris MRL/lpr (158). La sécrétion de chimiokines est aussi un processus contribuant au développement des néphrites lupiques. Certaines d'entre elles sont présentes à des taux élevés dans les reins des souris MRL/lpr avant même l'apparition de symptômes rénaux. Elles incluent, par exemple, les protéines MCP-1 (« monocyte chemoattractant protein 1 »),

RANTES (« regulated on activation normal T cell expressed and secreted ») et MIP-1 $\beta$  (« macrophage inflammatory protein 1 $\beta$  ») (159). Ces chimiokines recrutent ensuite de nombreuses cellules de l'immunité innée (macrophages, DC, pDC, neutrophiles) et adaptative (LB, LT, plasmocytes) au niveau du rein, amplifiant ainsi l'inflammation et les dommages tissulaires.

Le complément joue aussi un rôle central dans les néphrites lupiques et les dommages tissulaires. Son implication semble plutôt liée à la voie alternative. L'activation de cette dernière repose sur le clivage du composant C3, puis du clivage du composant C5, permettant *in fine* la formation d'un complexe d'attaque membranaire provoquant la mort des cellules. Des dépôts des composants C3 et C5 sont observés au niveau de la membrane glomérulaire des reins de patients lupiques (160). De plus, des complexes d'attaque membranaires sont aussi présents dans ces organes, suggérant un rôle de ces composés dans les dommages tissulaires associés au LED (161). Enfin, le blocage de la voie alternative du complément dans les souris MRL/lpr par des inhibiteurs pharmacologiques diminue fortement les symptômes rénaux (162). Ces résultats suggèrent donc un rôle important de cette voie dans les néphrites lupiques. Cependant, la délétion de C3 chez les souris MRL/lpr n'a pas de conséquence sur les symptômes rénaux (163). Dans ce cas, l'absence de C3 pourrait aussi diminuer la clairance des complexes immuns et cet effet pathogène compenserait la diminution des néphrites due à un défaut d'activation du complément.

## **1.2. Traitements du lupus**

La dérégulation de nombreux mécanismes immunitaires innés et adaptatifs est un aspect majeur du lupus, aboutissant à la production d'autoanticorps pathogènes. La découverte à partir des années 1950 de molécules immunosuppressives capables de réduire les symptômes associés au lupus fut une avancée majeure dans le traitement de la maladie, améliorant de façon importante la durée et la qualité de vie des patients. Aujourd'hui, la survie des individus lupiques dans les 5 ans qui suivent le déclenchement de la maladie excède 90% dans la plupart des pays développés. L'efficacité thérapeutique de ces immunosuppresseurs repose cependant sur un affaiblissement de l'ensemble du système

immunitaire et leur faible spécificité provoque malheureusement des effets secondaires néfastes (infections, tumeurs...). De plus, certains patients développent une pathologie réfractaire à la plupart de ces molécules, nécessitant la mise au point de nouvelles approches thérapeutiques. L'avancée des connaissances sur le lupus accéléra la découverte de nouveaux traitements plus spécifiques ciblant certaines voies biologiques jouant un rôle central dans la progression de la pathologie ou dans les dommages tissulaires associés. Cette partie aborde les principaux immunosuppresseurs et les molécules ciblées couramment utilisés dans le traitement du lupus (164–166). Nous évoquerons aussi certaines molécules ciblées en essais cliniques, parmi lesquelles le peptide P140 dont j'ai étudié les propriétés thérapeutiques pendant mon doctorat.

### 1.2.1. Les molécules immunosuppressives

Parmi les immunosuppresseurs couramment utilisés dans le traitement du lupus, plusieurs sont des inhibiteurs de synthèse de l'ADN qui ciblent préférentiellement les cellules lymphocytaires. Ces molécules incluent le mycophenolate mofetil qui est plutôt bien toléré et qui réduit la sévérité des néphrites lupiques à différents stades (167, 168). Des études ont aussi mis en évidence une amélioration d'autres paramètres cliniques avec une baisse des autoanticorps et une amélioration du score de la maladie (169). L'azathioprine est un autre inhibiteur de la synthèse d'ADN moins spécifique que le mycophenolate mofetil. De fait, son utilisation s'accompagne d'une toxicité importante mais il est utilisé dans des thérapies alternées en combinaison avec d'autres molécules immunosuppressives (170).

Les antipaludéens sont des immunosuppresseurs prescrits depuis longtemps dans le traitement du lupus. L'hydroxychloroquine, appartenant à cette famille, est un dérivé de la chloroquine et est encore couramment utilisée aujourd'hui bien que son mécanisme d'action dans le lupus reste inconnu. L'hydroxychloroquine est toutefois décrite comme un agent lysomotropique qui s'accumule dans le lysosome des cellules et réduit leur acidité. Cette propriété pourrait lui permettre de réduire la présentation antigénique par les molécules du CMH-II et la stimulation des TLR endosomaux qui dépend d'un pH acide dans le lysosome. De plus, à l'instar de la chloroquine, l'hydroxychloroquine pourrait agir sur la

macroautophagie, un processus catabolique impliqué dans l'immunité et certaines pathologies autoimmunes. Nous reviendrons sur ce point dans la partie consacrée au rôle de l'autophagie dans l'autoimmunité (paragraphe 3.2.3). Cette molécule immunosuppressive est principalement prescrite afin de limiter l'apparition des poussées lupiques. Elle est relativement bien tolérée avec assez peu d'effets secondaires, excepté quelques cas de cardiomyopathies et de rétinopathies (171).

Les glucocorticostéroïdes sont couramment utilisés comme immunosuppresseurs grâce à leur activité anti-inflammatoire. Ces molécules se lient au récepteur des glucocorticostéroïdes et diminuent l'expression de gènes pro-inflammatoires. Dans le cas du lupus, la prednisone et la méthylprednisolone appartenant à cette famille sont prescrites seulement lors de thérapies brèves en raison de nombreux effets secondaires (diabète, hypertension, troubles oculaires). Ils sont utilisés à faibles doses pour réduire les symptômes légers associés au lupus (atteintes cutanées) et à fortes doses dans le cas de symptômes plus sévères (néphrites, myocardites). Certains patients présentent des résistances aux glucocorticostéroïdes (172).

Enfin, le cyclophosphamide qui est couramment utilisé dans les chimiothérapies anticancéreuses, est aussi prescrit aux patients lupiques en combinaison avec les glucocorticostéroïdes. Cette molécule est un agent alkylant de l'ADN qui cible préférentiellement les cellules prolifératives et induit leur mort. Dans le cas du lupus, il permet de réduire les néphrites lupiques et d'autres symptômes sévères (problèmes cardiovasculaires, troubles neurologiques). Son utilisation reste toutefois limitée à cause de nombreux effets secondaires associés (troubles urinaires, réduction de la fertilité, apparition de tumeurs) (173).

## 1.2.2. Les molécules ciblées

### 1.2.2.1. Le Belimumab

Le Belimumab (ou Benlysta<sup>®</sup>), mis sur le marché en 2011, est la première molécule ciblée utilisée dans le traitement du LED et le premier médicament approuvé depuis 50 ans

par l'agence de santé américaine pour cette pathologie Il correspond à un anticorps monoclonal humanisé d'isotype IgG1 dirigé contre la cytokine BAFF. Comme évoqué plus haut, cette cytokine est détectée à des taux anormalement élevés dans les sera de patients lupiques et joue un rôle central dans la survie des LB autoréactifs. Le Belimumab, en se liant à BAFF, bloque sa liaison aux trois récepteurs BCMA, TACI et BAFF-R et inhibe ainsi son effet biologique (174). L'administration chronique de l'anticorps chez le singe pendant 26 semaines diminue la proportion de LB dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires (175). Lors d'un essai clinique de phase I, une diminution de la fréquence des LB chez l'homme a aussi été observée, ainsi qu'une baisse du taux sérique d'anticorps (176). L'effet thérapeutique du Belimumab a aussi été évalué dans deux essais cliniques de phase III, BLISS-52 et BLISS-76. L'anticorps est perfusé à J0, J14, J28, puis tous les mois chez des patients lupiques traités aux glucocorticoïdes. L'efficacité de ces essais a été mesurée par le taux de réponse des patients selon l'indice SRI comprenant différents critères d'amélioration des symptômes du lupus. Lors des deux essais sur plus de 800 patients, ce taux à 52 semaines fut plus élevé dans les groupes de patients recevant 10 mg/kg et 1 mg/kg. Cependant, cette amélioration ne fut pas retrouvée à 76 semaines lors de l'essai BLISS-76 (177). Aucun effet secondaire majeur dû au traitement n'a été observé lors des différentes phases de l'essai clinique. En conclusion, ce nouveau traitement permet de réduire les symptômes du lupus et semble bien toléré. Son efficacité dans le traitement des manifestations sévères du LED (néphrites, troubles psychiatriques) reste toutefois indéterminée puisque les patients présentant ces troubles ont été exclus de l'essai clinique.

#### 1.2.2.2. Les molécules ciblées en essais cliniques

Plusieurs molécules thérapeutiques sont actuellement en essais cliniques pour le traitement du LED, illustrant différentes approches possibles de ciblage de voies biologiques importantes dans la pathogénèse lupique (Tableau 4).

L'une de ces stratégies repose sur la déplétion des LB par des anticorps monoclonaux dirigés contre des récepteurs de surface. Cette déplétion repose sur un mécanisme de cytotoxicité dépendant du complément, ou dépendant des anticorps appelé ADCC (« antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity »). Des anticorps monoclonaux anti-CD20

Cellule / Élément ciblé	Cible protéique	Traitement	Type de molécule	Phase
LB	CD22	Epratuzumab	anticorps monoclonal	III
	CD20	Ocrelizumab	anticorps monoclonal	III
	CD20	SBI-087	anticorps monoclonal	I
	TACI	Atacicept	protéine de fusion	II/III
	BAFF	Blisibimob	protéine de fusion	II
	BAFF	Tabalumab	anticorps monoclonal	III
LT	CD40-L	CDP7657	anticorps monoclonal	I
CPA	B7	Abatacept	protéine de fusion	II
	B7RP-1	AMG 557	anticorps monoclonal	I
	MHC-II / HSPA8	Lupuzor	peptide	II
Cytokines	IFN- $\alpha$	Rontalizumab	anticorps monoclonal	II
	IFN- $\alpha$	Sifalimumab	anticorps monoclonal	II
	IFN- $\alpha$	AGS-009	anticorps monoclonal	I
	IFN- $\alpha$	IFN-Kinoïd	vaccin	I/II
	IFN- $\gamma$	AMG-811	anticorps monoclonal	I
	IL-6	Sirukumab	anticorps monoclonal	II
Autres	ND	Laquinimod	immunomodulateur	Ila

**Tableau 4. Traitements spécifiques du LED en cours d'essais cliniques.** ND : non déterminé (163).

(Rituximab, Ocrelizumab) ont été testés dans le traitement du LED lors d'essais cliniques, mais ces derniers n'ont pas été poursuivis par manque d'efficacité pour le Rituximab (178) ou à cause d'effets secondaires sévères associés au traitement par l'Ocrelizumab (179). L'Epratuzumab est un anticorps monoclonal d'isotype IgG1 dirigé contre le récepteur CD22 et possédant des propriétés thérapeutiques dans le traitement du LED. En effet, en plus d'induire une déplétion des LB, il inhibe aussi la signalisation des cellules par phosphorylation de CD22 (180). Ainsi, on observe une réduction de la prolifération des LB *in*

*vitro* en présence de l'anticorps (181). L'Epratuzumab a été testé dans un essai clinique chez des patients lupiques et a montré une efficacité importante avec une amélioration du score clinique BILAG, ainsi qu'une bonne tolérabilité. La phase III débutera en 2014.

Une autre approche de traitement spécifique du lupus actuellement en essai clinique est un blocage des signaux de costimulation des LB (interaction CD40/CD40-L) ou des LT (interaction B7/CD28). Ces signaux sont nécessaires à l'activation des LB et LT et participent au développement du lupus. Parmi les molécules en essai clinique, l'Abatacept est une protéine de fusion entre le domaine extracellulaire de la molécule CTLA4 et la portion Fc d'un anticorps d'isotype IgG1. CTLA4 est un homologue du récepteur CD28 exprimé par les LT activés avec une plus grande affinité pour la molécule B7 que CD28. Dès lors, l'Abatacept est capable bloquer l'interaction entre CD28 et B7 à la surface des cellules. L'administration de cette protéine de fusion aux souris lupiques (NZB/W)F1 abolit l'apparition d'autoanticorps et prolonge leur durée de vie (182). Bien que l'Abatacept n'ait pas montré d'effet bénéfique chez l'ensemble de patients traités lors d'un essai clinique de phase III, il pourrait toutefois présenter un potentiel thérapeutique dans un sous-groupe de patients présentant des arthrites lupiques (183). Par ailleurs, un anticorps monoclonal ciblant une protéine de la famille de B7 appelée ICOS-L (« inducible T-cell costimulator-ligand ») a été mise au point sous le nom AMG 557. L'interaction d'ICOS-L avec le récepteur de costimulation ICOS à la surface des LT joue un rôle important dans le développement des cellules T<sub>h</sub> dans le centre germinatif au cours du lupus. L'administration d'anticorps anti-ICOS-L chez la souris (NZB/W)F1 bloque ce processus et réduit la sévérité de la maladie (184). La phase I de l'essai clinique chez l'homme a été validée.

Enfin, le blocage de nombreuses cytokines pro-inflammatoires surexprimées au cours du lupus, autres que BAFF, fait aussi l'objet de plusieurs essais cliniques. En particulier, le ciblage de l'IFN- $\alpha$  semble présenter un intérêt thérapeutique majeur. Sifalimumab et Rontalizumab sont deux anticorps monoclonaux humanisés d'isotype IgG1 actuellement en essais cliniques de phase II pour le LED. Les phases I ont montré une réduction de la « signature IFN » associée aux traitements. De plus, chez les patients traités par le Sifalimumab, le besoin en immunosuppresseurs est plus faible et le SLEDAI est modérément diminué (185, 186). Par ailleurs, un vaccin anti-IFN- $\alpha$ , appelé IFN-kinoïde, est aussi à l'étude

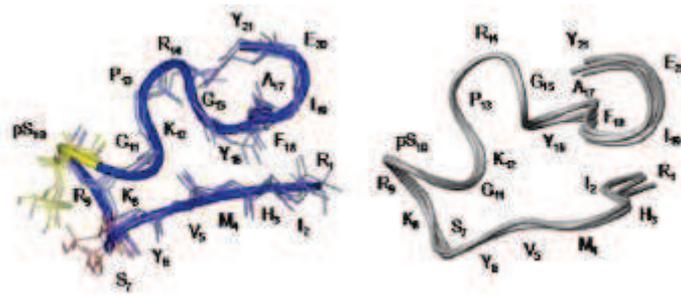
dans le LED. L'idée sous-jacente serait qu'une production d'anticorps anti-IFN- $\alpha$  générés par vaccination active des patients lupiques neutraliserait l'excès de cette cytokine délétère pour la pathologie. Son efficacité a été prouvée chez la souris (NZB/W)F1 avec une réduction de l'atteinte rénale et un prolongement de leur durée de vie (187). De plus, lors des de la phase I/II de l'essai clinique, une réduction de la « signature IFN » fut observée chez les patients immunisés sans effet secondaire important. Ces résultats positifs encouragent la poursuite des études chez l'homme.

### 1.2.3. Le peptide P140, un immunomodulateur du lupus

#### 1.2.3.1. Présentation

Les protéines du spliceosome sont une source importante d'autoantigènes au cours du lupus et elles sont reconnues par les anticorps et pour certaines par les LT CD4<sup>+</sup> de souris et patients lupiques. C'est lors d'une étude visant à identifier des épitopes T associés au lupus dans la protéine U1-70K du spliceosome que notre laboratoire a mis en évidence une séquence contenant les résidus 131 à 151 (RIHMOVYSKRSGKPRGYAFIEY) reconnue par les LT CD4<sup>+</sup> lupiques. En effet, le peptide 131-151 est capable de stimuler *in vitro* la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> issus de souris MRL/lpr et (NZB/W)F1 à des stades précoces de la maladie. Cette séquence est aussi reconnue par les autoanticorps présents chez ces souris (56, 188). Cet épitope, dont la séquence est entièrement conservée entre la souris et l'homme, est capable de lier une grande variété de molécules du CMH-II murines (I-A<sup>k</sup>, I-E<sup>k</sup>, I-A<sup>d</sup>, I-E<sup>d</sup>) (188) et humaines (HLA-DR1, -DR4, -DR7) (189). Etant donné sa reconnaissance précoce au cours du lupus, cet épitope pourrait jouer un rôle initiateur dans un processus de diversification des épitopes à d'autres séquences d'U1-70K (diversification intramoléculaire) (37) et à des séquences sur d'autres protéines du spliceosome (diversification intermoléculaire) (190).

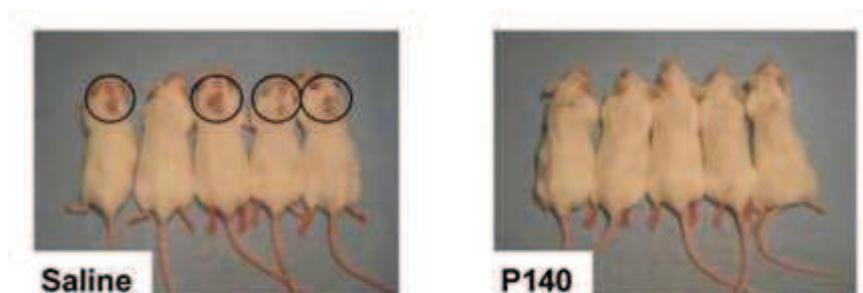
Suite à la synthèse et à l'évaluation des propriétés de plusieurs analogues phosphorylés et acétylés, il a été montré qu'un analogue peptidique de la séquence 131-151 phosphorylé sur le résidu sérine 140, appelé peptide P140, était reconnu par les LT CD4<sup>+</sup> des souris MRL/lpr et présentait un rôle protecteur dans le lupus (Figure 10). Cette phosphorylation du peptide initial 131-151 reproduit donc une des modifications post-traductionnelles d'U1-70K



**Figure 10. Structure du peptide P140 en solution aqueuse défini par résonance magnétique nucléaire.** Superposition des quatre structures possédant l'énergie la plus faible. Chaque résidu est indiqué par une lettre et un chiffre correspondant à sa position dans la séquence du peptide. pS10 correspond au résidu sérine 140 phosphorylé (191).

générées au cours de l'apoptose (détaillé dans le paragraphe 1.1.2.1). L'injection par voie intraveineuse de ce peptide aux souris MRL/lpr augmente significativement la durée de vie des souris, contrairement au peptide non phosphorylé 131-151 qui n'a pas d'effet. Il induit aussi une baisse du niveau d'autoanticorps sériques et réduit l'étendue des vasculites et des dermatites (Figure 11). Une amélioration des atteintes rénales des souris est aussi observée avec une diminution de la protéinurie et des glomérulonéphrites (192, 193). En revanche, l'injection du peptide phosphorylé aux souris MRL/lpr ne modifie pas la réponse humorale et cellulaire lors d'une infection virale, suggérant un effet bénéfique non immunosuppresseur du peptide pour le traitement du lupus (190).

Les effets protecteurs obtenus chez la souris ont encouragé la conduite d'un essai clinique chez l'homme, réalisé par la société Immupharma sous le nom Lupuzor ou IPP-201101. Les résultats de la phase I et IIa ont montré l'absence de toxicité chez les sujets sains et un effet bénéfique du traitement chez les patients ayant reçu trois injections sous-cutanées de 200 µg de peptide à deux semaines d'intervalle. On observe chez ces individus une diminution du taux d'anticorps anti-ADN, ainsi qu'une amélioration du score de la maladie SLEDAI. L'administration de doses plus élevées, à 1000 µg par injection, semble moins efficace. Aucun effet secondaire indésirable n'a été observé (194). L'efficacité du peptide P140 a ensuite été évaluée dans un essai clinique de phase IIb (195). Lors de cette étude, les patients reçurent 200 µg de peptide en injection sous-cutanée toutes les 4 semaines (groupe 1), ou toutes les 2 semaines (groupe 2), ou bien reçurent le placebo (groupe 3). L'efficacité du composé a été mesurée par le taux de réponse des patients selon l'indice SRI. A l'issue du test, ce taux fut de 53,1% dans le groupe 1, 45,1 % dans le groupe 2 et 36,2 % dans le groupe



**Figure 11. Effet du peptide P140 sur les dermatites des souris MRL/lpr.** Photographie de cinq souris MRL/lpr de 16 semaines qui ont reçu par voie intraveineuse quatre injections salines ou contenant le peptide P140 (100 µg/injection). Les dermatites sont visualisées par un cercle noir (193).

3, confirmant un effet bénéfique du peptide P140 dans le traitement du LED. De plus, aucun effet indésirable majeur ne fut observé (195). Récemment, l'agence de santé américaine a donné son accord pour la conduite d'une phase III.

#### 1.2.3.2. Un ligand peptide altéré

Après injection aux souris MRL/lpr, le peptide P140 se localise en grande partie au niveau de la zone marginale et du manteau de la rate, à proximité de nombreuses CPA (LB, macrophages) (193). De plus, il est reconnu *in vitro* par les anticorps et les LT CD4<sup>+</sup> des souris MRL/lpr (192). Il conserve aussi sa capacité de lier différentes molécules HLA-DR humaines et il est reconnu par les séra de patients lupiques (189). La présentation de ce peptide par les molécules du CMH-II suggère que cette molécule pourrait ralentir la progression du LED en agissant comme un ligand peptidique altéré (APL) qui jouerait le rôle d'agoniste partiel du TCR. Cette famille de molécules regroupe des variants peptidiques capables de moduler la réponse immunitaire des LT. Cette propriété repose sur des substitutions ou des changements des chaînes latérales des résidus, ou bien encore des altérations chimiques de la liaison CO-NH dans la chaîne peptidique qui modifient le contact avec le TCR lorsque ces peptides sont présentés par les molécules du CMH. L'activation de clones de LT spécifiques est alors déviée vers un profil et des fonctions immunitaires différentes (196). Dans le cadre de traitements de pathologies autoimmunes, plusieurs APL dérivés d'autoantigènes présentent des propriétés thérapeutiques, notamment pour le diabète de type I et l'encéphalite autoimmune expérimentale (EAE), un modèle murin de sclérose en

plaques (164). De manière intéressante, contrairement à son analogue non phosphorylé, le peptide P140 n'induit pas la prolifération de LT CD4<sup>+</sup> de patients lupiques mais ces cellules gardent leur capacité de sécréter de l'IL-10 immunorégulatrice (189). Le peptide P140 pourrait donc agir comme un agoniste partiel du TCR en déviant la réponse des LT CD4<sup>+</sup> autoréactifs vers un profil non-inflammatoire. Cette voie mécanistique, proposée dès 2003 (192), reste cependant à démontrer expérimentalement, tant chez la souris que chez l'homme.

### 1.2.3.3. Un inhibiteur de la chaperonne HSPA8

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu expliquant un effet protecteur du peptide P140, des expériences ont été réalisées afin d'identifier des cibles protéiques du peptide. Pour cela, une série d'expériences de « pull-down » et d'observations microscopiques a été réalisée. C'est ainsi qu'a été mise en évidence l'existence d'une interaction entre le peptide et la protéine HSPA8 (aussi appelée « heat shock cognate protein 70 » ou HSC70) à la fois à la surface de splénocytes et au niveau intracellulaire (191, 193).

HSPA8 est une chaperonne constitutivement exprimée de la famille des protéines de choc thermique (ou HSP). En surface des cellules, HSPA8 peut agir comme un récepteur cellulaire lors d'infections virales ou favoriser la reconnaissance d'une cellule anormale par des acteurs du système immunitaires comme les lymphocytes T  $\gamma/\delta$  (197, 198) (détaillé dans le paragraphe 2.3). Etant donné que HSPA8 est surexprimée en surface des cellules immunitaires des souris MRL/lpr (193), cette chaperonne pourrait agir comme un récepteur pour le peptide P140 et favoriser son entrée dans les cellules dans un contexte lupique. Au cours de ces études, il a été montré que l'injection intraveineuse du peptide P140 à des souris MRL/lpr provoque une baisse significative de l'hypercellularité typique mesurée dans le sang périphérique. Cette baisse de cellularité qui se retrouve au niveau basal d'une souris saine est obtenue par un mécanisme d'apoptose impliquant les LT  $\gamma/\delta$  (191). L'apoptose des LB et LT activés n'est en effet plus visualisée après administration d'un anticorps déplétant anti-  $\gamma/\delta$  aux souris traitées. *In vivo*, le LT  $\gamma/\delta$  semble donc jouer un rôle donc central dans ce mécanisme qui n'est pas élucidé à ce jour.

Au niveau intracellulaire, HSPA8 participe à l'homéostasie protéique en permettant le repliement des chaînes polypeptidiques nouvellement synthétisées et en ciblant les protéines mal repliées vers les systèmes de dégradation de la cellule (protéasome et autophagie). De plus, elle joue un rôle central dans la présentation antigénique en interagissant directement les molécules du CMH-II et indirectement par sa contribution dans la dégradation des protéines par autophagie (présenté en détail dans le paragraphe 2.3). Les résultats de l'équipe suggèrent que le peptide P140 réduirait la présentation d'autoantigènes par les molécules du CMH-II. En effet, d'une part, la liaison du peptide P140 à HSPA8 inhibe son activité de repliement protéique. D'autre part, des expériences réalisées *in vitro* sur des LB ont montré que la présence du peptide P140 provoque un ralentissement du flux de macroautophagie, un sous-type d'autophagie (193). Les voies autophagiques sont impliquées dans la présentation antigénique, en particulier dans la présentation d'antigènes endogènes par les molécules du CMH-II en délivrant des protéines cytosoliques au lysosome. Après dégradation, les peptides générés sont alors chargés par les molécules du CMH-II et présentés à la surface des cellules (ce mécanisme sera largement développé dans le paragraphe 3.2.2.1). De manière intéressante, en présence du peptide P140, la formation de dimères stables de molécules du CMH-II est diminuée et l'injection intraveineuse du peptide aux souris MRL/lpr réduit l'expression de ces molécules en surface des LB spléniques (193). L'ensemble de ces résultats suggère donc un autre mécanisme en plus de son rôle possible en tant que APL pouvant expliquer les propriétés thérapeutiques du peptide P140 dans le LED. Après entrée dans la cellule, le peptide P140 interagirait avec la chaperonne HSPA8 intracellulaire et inhiberait son activité. Il réduirait ainsi certaines voies autophagiques, entraînant alors un défaut de présentation d'autoantigènes endogènes par les molécules du CMH-II. En conséquence, l'activation des LT CD4<sup>+</sup> autoréactifs serait réduite avec un effet sur l'aide aux LB autoréactifs. Cette succession d'effets aboutirait *in fine* à ralentir la progression de la pathologie.

## **2. LA CHAPERONNE HSPA8/HSC70 ET SON ROLE DANS L'IMMUNITE**

### **2.1. Les HSP**

#### **2.1.1. Généralités**

La réponse au stress cellulaire constitue l'un des mécanismes moléculaires les plus conservés mis en place au cours de l'évolution afin de faire face aux multiples variations des conditions environnementales. L'un des stress cellulaires les plus connus est l'élévation de température qui déclenche l'expression d'une famille de protéines appelées protéines de choc thermique ou HSP.

L'expression de ces protéines fut initialement décrite chez la drosophile à la suite à de l'apparition de renflements au niveau des « chromosomes géants » polytènes des glandes salivaires en réponse à une élévation de température (199). Ces structures sont associées à une synthèse d'ARN messagers et les produits de ces transcrits furent identifiés comme appartenant à une nouvelle famille de protéines spécifiques, les HSP (200). L'expression de ces protéines fut ensuite décrite dans de nombreux organismes procaryotes et eucaryotes, allant des archaebactéries à l'homme (201, 202). Les gènes codant pour ces protéines sont parmi les plus conservés au sein de l'arbre évolutif, en lien probablement avec l'ancienneté de la réponse au stress cellulaire. Par exemple, le gène *HSP70* présente un degré d'homologie de 50% entre *Escherichia Coli* et l'homme (203). En 1982, une étude a mis en évidence un rôle cytoprotecteur des HSP à la suite d'une élévation de la température, appelé thermotolérance (204). Les résultats de cette étude montrent que des cellules exposées à une augmentation de température brève et non létale développent une résistance à une deuxième élévation de température normalement létale. L'acquisition de thermotolérance et la synthèse des HSP apparaissent simultanément, suggérant un rôle de ces protéines dans ce processus.

Les protéines HSP jouent un rôle central dans l'homéostasie protéique. La plupart d'entre elles sont constitutivement exprimées et jouent alors le rôle de « chaperon moléculaire » en interagissant avec les protéines en cours de synthèse. Ainsi, elles empêchent

leur agrégation et participent à leur repliement. De plus, la plupart des stress cellulaires altèrent la structure des protéines de la cellule qui forment alors des agrégats protéiques insolubles toxiques. Dans ce cas, les membres inductibles des HSP sont surexprimés et assistent les protéines dénaturées afin qu'elles retrouvent leur conformation native. Cette surexpression dépend des facteurs de transcription de la famille des HSF (« heat shock factor »). Après activation, ces derniers reconnaissent des séquences spécifiques HSE (« heat shock element ») situées dans le promoteur des gènes des HSP et induisent leur transcription. En absence des HSF, comme par exemple HSF1, les cellules ne développent plus de mécanisme de thermotolérance (205).

## 2.1.2. Les différentes familles de HSP

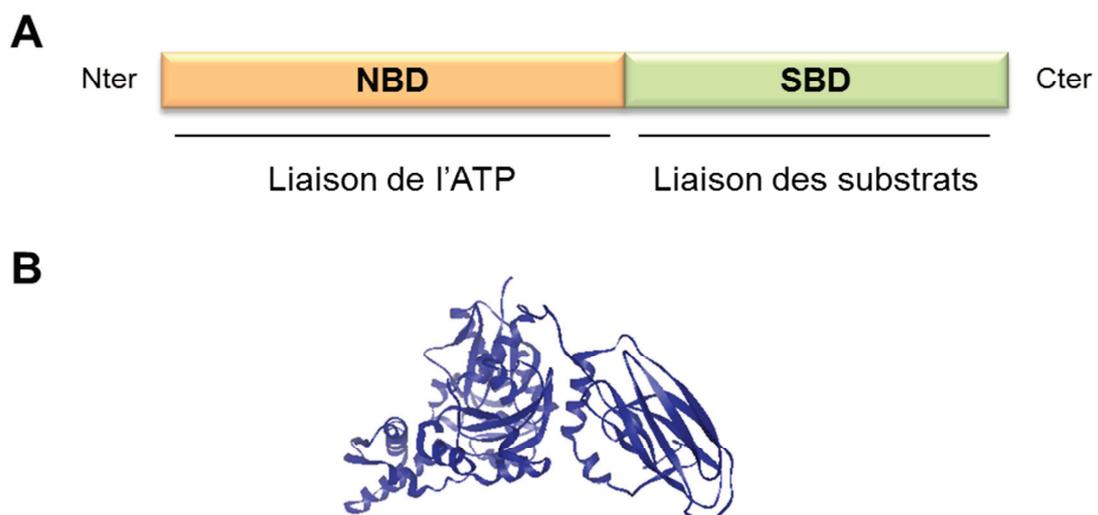
Il existe six grandes familles de HSP chez les mammifères qui, malgré leur propriété commune de chaperon moléculaire, diffèrent par leur localisation, leur nature inductible ou non et par leur mécanisme d'action. Nous aborderons dans cette partie les deux familles de HSP les plus décrites, à savoir les familles HSP70 et HSP90.

### 2.1.2.1. HSP70

Les membres de la famille des HSP70 (Tableau 5) regroupent des chaperonnes d'une masse moléculaire de 70 kDa et sont parmi les plus nombreux et les plus conservés des HSP. Ils possèdent une structure commune composée d'un domaine amino-terminal de liaison à l'ATP NBD (« nucleotide-binding domain ») et un domaine carboxy-terminal de liaison à des substrats protéiques SBD (« substrate-binding domain ») (Figure 12). Leur activité est dépendante de l'hydrolyse de l'ATP et de l'interaction avec plusieurs co-chaperonnes (détaillé dans le paragraphe 2.2.1 pour le membre HSPA8). Chez l'homme, il existe douze gènes codant pour quatorze membres de la famille HSP70, certains sont constitutivement exprimés, d'autres correspondent à des formes inductibles de HSP. Parmi ceux-ci, HSPA4 et HSPA4L ont paradoxalement des séquences plus proches des membres la famille des HSPH (HSP110) et ne sont pas présentés dans le Tableau 5.

Noms	Autres noms	Gène	Expression
HSPA1A	HSP70, HSP72, HSP70-1	<i>HSPA1A</i>	induite
HSPA1B	HSP70-2	<i>HSPA1B</i>	induite
HSPA1L	HSC70t, HSC70-hom	<i>HSPA1L</i>	constitutive
HSPA2	HSP70.2	<i>HSPA2</i>	constitutive
HSPA5	HSP70-5, Bip, GRP78	<i>HSPA5</i>	constitutive
HSPA6	HSP70-6, HSP70B'	<i>HSPA6</i>	induite
HSPA7	HSP70-7, HSP70B	<i>HSPA7</i>	induite
HSPA8	HSC70, HSC71, HSP71, HSP73	<i>HSPA8</i>	constitutive
HSPA8-2	Isoforme 2 de HSPA8, HSC54	<i>HSPA8</i>	constitutive
HSPA9	HSP70-9, GRP75, mtHSP70, mortalin, PBP74	<i>HSPA9</i>	constitutive
HSPA13	HSP70-13, STCH	<i>HSPA13</i>	constitutive
HSPA14	HSP70-14, HSP70L1	<i>HSPA14</i>	induite

**Tableau 5. Membres de la famille des HSP70 chez l'homme.**



**Figure 12. Structure des chaperonnes de la famille des HSP70.** A. Les deux domaines NBD et SBD des membres de la famille HSP70 sont représentés. B. Structure cristallographique de la chaperonne HSPA8 bovine.

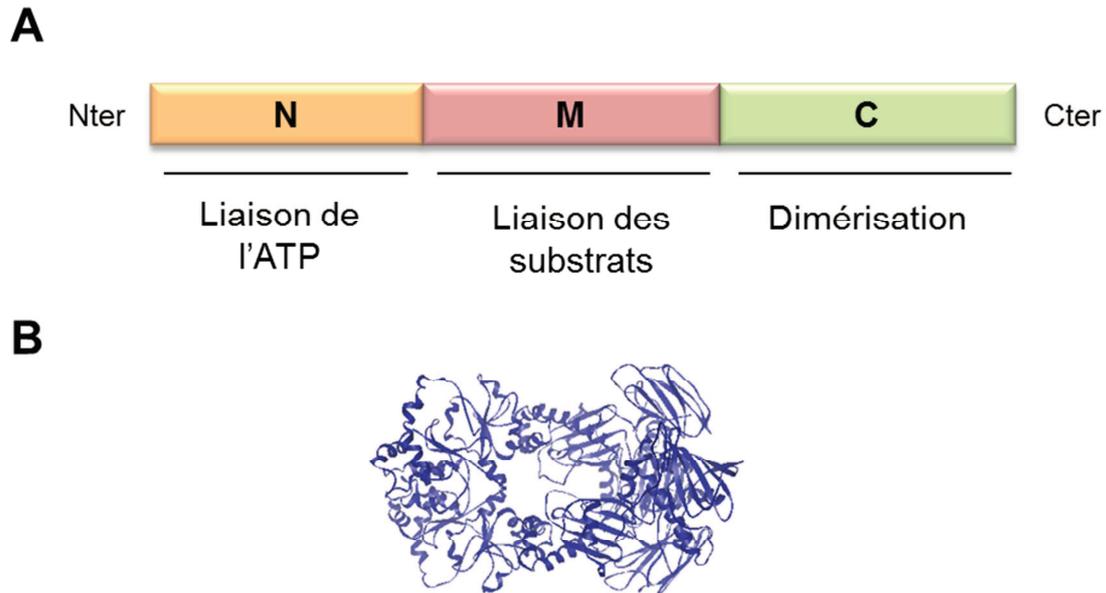
### 2.1.2.2. HSP90

La famille des HSP90 comportent cinq membres principaux codés chacun par un gène différent constitutivement exprimé (Tableau 6). Parmi ces membres, HSP90 $\alpha$  et HSP90 $\beta$ , regroupés sous le nom de HSP90, sont deux isoformes abondamment présentes dans les cellules eucaryotes. Ces deux protéines présentent 86 % d'homologie entre elles mais sont codées par deux gènes différents. HSP90 $\alpha$  correspond à une forme inductible mineure alors que HSP90 $\beta$  est constitutive et représente l'isoforme majoritaire.

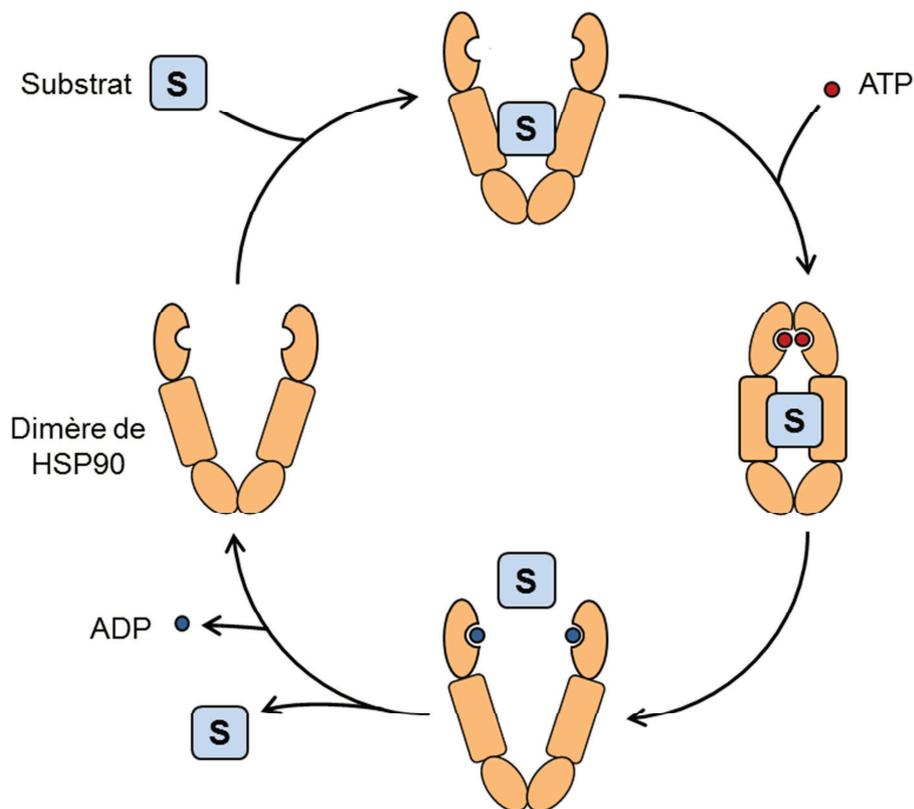
Noms	Autres noms	Gène
HSPC1	HSP90AA1, HSPN, HSP86, HSPC1, HSPCA, HSP89, HSP90, HSP90A, HSP90N, HSPCAL1, HSPCAL4,	<i>HSPC1</i>
HSPC2	HSP90AA2, HSPCA, HSPCAL3, HSP90 $\alpha$	<i>HSPC2</i>
HSPC3	HSP90AB1, HSPC2, HSPCB, HSP90B, HSP90 $\beta$	<i>HSPC3</i>
HSPC4	HSP90B1, ECGP, GP96, TRA1, GRP94, endoplasmin	<i>HSPC4</i>
HSPC5	TRAP1, HSP75, HSP90L	<i>HSPC5</i>

**Tableau 6. Membres de la famille des HSP90.**

La chaperonne HSP90 est composée de trois domaines distincts : un domaine amino-terminal de liaison à l'ATP, un domaine central de reconnaissance des protéines clientes et un domaine carboxy-terminal de dimérisation de la protéine (Figure 13). La dimérisation de HSP90 peut avoir lieu sous forme d'homodimères  $\alpha$ - $\alpha$  ou  $\beta$ - $\beta$  ou sous forme d'hétérodimères  $\alpha$ - $\beta$ . Seules les formes dimériques de HSP90 présentent une activité cellulaire (206). Ce dimère, en position « ouverte », reconnaît les protéines-cibles au niveau du domaine central. L'ATP se lie alors au niveau du domaine amino-terminal, provoquant un changement de conformation du dimère. Celui-ci se retrouve alors en position « fermée », piégeant ainsi le substrat. Par la suite, l'hydrolyse de l'ATP permet une réouverture du dimère et la libération du substrat. Le relargage de l'ADP permet l'interaction avec une nouvelle protéine cliente (Figure 14). Ce cycle d'activité de HSP90 nécessite l'action de nombreuses co-chaperonnes. Celles-ci possèdent un motif TRP (« tetratricopeptide repeat ») qui interagit avec le motif



**Figure 13. Structure de la chaperonne HSP90.** A. Les trois domaines de HSP90 sont représentés. B. Structure cristallographique de HSP90 homodimérique de *S. Cerevisiae*.



**Figure 14. Cycle d'activité moléculaire de HSP90.** Le dimère de HSP90 en conformation « ouverte » interagit avec un substrat protéique. La liaison de l'ATP provoque un changement de conformation du dimère qui piège le substrat. L'hydrolyse de l'ATP induit une réouverture du dimère et une libération du substrat et de l'ADP. S : substrat.

EEVD à l'extrémité carboxyterminal de HSP90. La co-chaperonne Hop (« HSP70/HSP90-organizing protein »), par exemple, recrute le complexe HSP70/HSP40 et facilite ainsi l'arrivée de la protéine cliente couplée à ce complexe sur HSP90. La fonction de HSP90 est aussi régulée par des modifications post-traductionnelles telles que des acétylations, des phosphorylations et des nitrosylations. L'hyperacétylation de HSP90, par exemple, inhibe son activité en réduisant la liaison de la protéine cliente et des co-chaperonnes (207).

Ce mécanisme moléculaire confère à HSP90 un rôle stabilisateur des protéines clientes, en particulier des protéines non structurées en cours de synthèse ou lors d'un stress cellulaire. Il empêche leur agrégation et favorise leur repliement par les autres HSP. De plus, HSP90 stabilise aussi le cytosquelette en se liant à certains de ses composants (208). Enfin, sa capacité à séquestrer certaines protéines cellulaires permet de réguler leur activité. C'est le cas principalement des kinases comme Akt (209) ou des facteurs de transcription tels que les récepteurs aux stéroïdes (210).

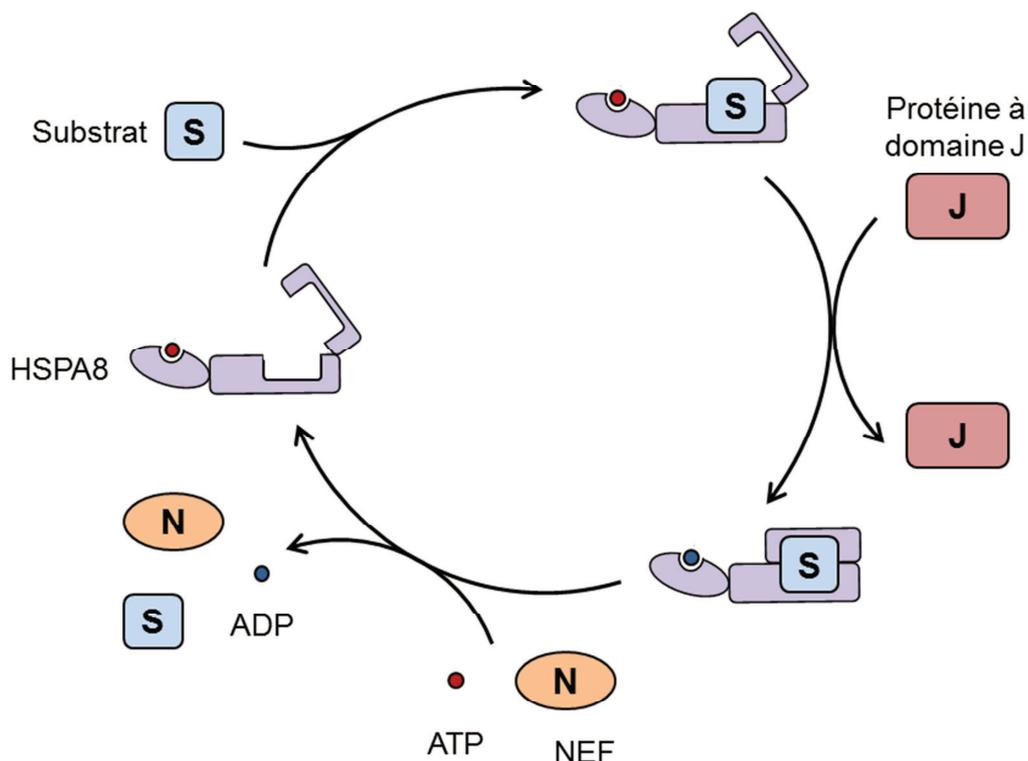
## **2.2. Fonctions moléculaires et cellulaires de HSPA8**

### **2.2.1. Fonctions moléculaires**

#### **2.2.1.1. Structure et activité**

La protéine HSPA8 est un membre constitutif de la famille des HSP70 possédant comme les autres HSP70 les deux domaines distincts NBD et SBD (Figure 12). Ces deux régions ont des structures très différentes, le NBD étant plutôt globulaire alors que le SBD est composé d'une succession de feuillets  $\beta$  et d'une hélice  $\alpha$  formant un « couvercle » amovible. Elles sont séparées par un lien très flexible essentiel à la transmission des changements conformationnel d'un domaine à l'autre. L'extrémité carboxy-terminale comporte aussi comme HSP90 un motif EEVD permettant l'association de multiples co-chaperonnes par leur domaine TRP. L'activité chaperonne de HSPA8 est composée d'une succession de cycles de liaison et de libération du substrat régulés par l'hydrolyse de l'ATP et de nombreuses co-chaperonnes. Ce processus a essentiellement été extrapolé à partir d'études sur son homologue bactérien DnaK. Chaque cycle débute par la liaison de l'ATP dans le domaine

NDB de HSPA8. Cette liaison induit un changement de conformation de la protéine au niveau du SBD avec l'ouverture du « couvercle » favorable à la liaison du substrat. Le site de liaison au substrat est composé de résidus plutôt hydrophobes au centre et chargés négativement en périphérie, permettant une interaction efficace avec des polypeptides comportant des motifs hydrophobes flanqués de résidus chargés positivement (211). L'activité ATPasique intrinsèque de HSPA8 est faible et représente une étape limitante du cycle d'activité de la protéine. La liaison du substrat dans le SBD stimule l'hydrolyse de l'ATP, et ce phénomène est amplifié par l'action des protéines à domaine J (212). Cette réaction provoque un changement de conformation permettant la fermeture du « couvercle » dans le domaine SBD et piégeant ainsi le substrat de manière efficace. Cette conformation de HSPA8 liée à l'ADP favorise aussi la dissociation des protéines à domaine J et l'association de co-chaperonnes impliquées dans l'échange des nucléotides NEF (« nucleotide exchange factor »). Ces facteurs dissocient l'ADP et le phosphate inorganique de HSPA8 et facilitent la liaison d'une nouvelle molécule d'ATP. Cette étape conduit à un changement conformationnel permettant la réouverture du « couvercle » dans le SBD et la libération du substrat protéique (Figure 15).



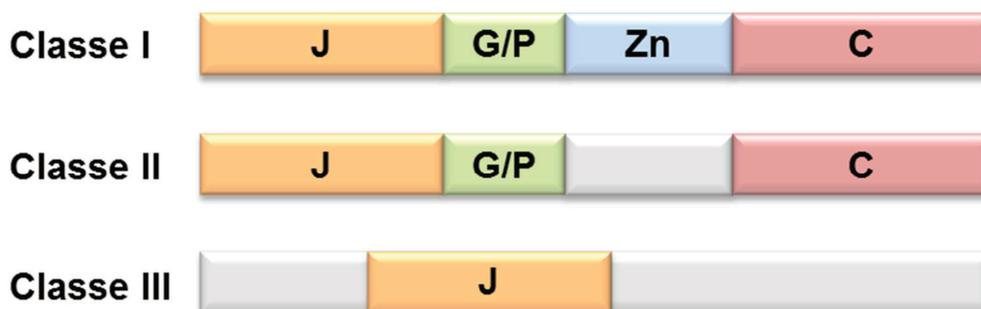
**Figure 15. Cycle d'activité moléculaire de HSPA8.** HSPA8, en position « ouverte » lie le substrat protéique. En parallèle, l'interaction avec une protéine à domaine J stimule l'hydrolyse de l'ATP et le passage de HSPA8 à une conformation « fermée » piégeant le substrat. HSPA8 lié à l'ADP recrute des co-chaperonnes NEF qui libèrent l'ADP et favorisent l'interaction avec une nouvelle molécule d'ATP. Cette étape permet le passage de HSPA8 à une conformation « ouverte » libérant le substrat. S : substrat ; N : NEF ; J : protéine à domaine J.

### 2.2.1.2. Les co-chaperonnes

#### 2.2.1.2.1. Les protéines à domaine J

Les co-chaperonnes sont des facteurs se liant à HSPA8 et modulant son activité. Les protéines à domaines J s'associent à la conformation liée à l'ATP et au substrat de HSPA8 et augmente l'hydrolyse de l'ATP comme évoqué précédemment. L'interaction de ces co-chaperonnes avec HSPA8 et la stimulation de l'activité ATPasique reposent sur un domaine J très conservé et commun à toutes ces protéines. Il existe toutefois trois sous-catégories différentes suivant la structure de ces protéines (Figure 16).

- Les protéines à domaine J de classe I. Elles possèdent une structure commune avec un domaine J à l'extrémité aminoterminal, suivi d'une région riche en résidus glycine et phénylalanine, d'un motif en « doigt de zinc » et d'une partie C variable à l'extrémité carboxy-terminale. Cette structure est observée par exemple dans la protéine DnaJ exprimé par les bactéries.
- Les protéines à domaine J de classe II. Elles ont la même structure que celles de type I, excepté l'absence du motif en « doigt de zinc ». Le membre le plus connu de cette catégorie est HSP40 exprimée chez les eucaryotes.
- Les protéines à domaine J de classe III. Ces co-chaperonnes n'ont en commun avec les autres catégories que le domaine J. De plus la localisation de cette région n'est pas limitée à l'extrémité amino-terminale mais peut varier selon les membres. L'auxiline, impliquée dans le détachement des clathrines, fait par exemple partie de cette catégorie.



**Figure 16. Structure des protéines à domaine J.** Les différentes classes de protéines à domaine J et leurs domaines fonctionnels sont représentés. J : domaine J ; G/P : motif riche en glycine et phénylalanine ; Zn : motif en « doigt de zinc » ; C : domaine C.

Plusieurs études ont montré que le domaine J de ces protéines interagit à lui seul avec l'homologue bactérien de HSPA8, DnaK, et suffit à stimuler son activité ATPasique (213, 214). De plus, les sites d'interaction de cette région sur HSPA8 ont été identifiés mais les résultats obtenus varient selon les études. En effet, l'étude cristallographique du domaine J de l'auxiline met en évidence une zone d'interaction dans le NBD de HSPA8. A ce niveau, le domaine J déplace une partie du lien flexible à l'extrémité du NBD, ce qui a pour effet de stimuler l'hydrolyse de l'ATP (215). Cependant, une autre étude biochimique a montré que l'interaction du domaine J de l'auxiline à HSPA8 nécessite la présence des deux domaines NBD et SBD de la chaperonne. L'extrémité carboxy-terminale du SBD contenant le motif EEVD n'est pas nécessaire à l'interaction avec l'auxiline, en revanche elle joue un rôle dans l'augmentation de l'activité ATPasique par cette co-chaperonne (216). La protéine à domaine J HSP40 se lie à HSPA8 de manière différente puisque l'absence de ce même motif EEVD dans le SBD abolit l'interaction entre les deux protéines (217, 218). En conclusion, le domaine J semble pouvoir se lier à différents sites sur HSPA8. Les différences observées entre les membres de cette famille de co-chaperonnes pourraient être liées à d'autres domaines de ces protéines pouvant moduler cette interaction.

En plus de leur impact sur l'activité ATPasique, les protéines à domaines J favorisent aussi la liaison du substrat à HSPA8. En effet, lors d'un stress cellulaire, elles s'associent aux protéines dénaturées et empêchent leur agrégation (219). Cette liaison est directe et indépendante de l'interaction de membres de la famille des HSP70 avec ces protéines, comme le suggère une étude avec DnaJ et DnaK (homologues bactériens respectifs de HSP40 et HSPA8) (220). De plus, la formation d'un complexe DnaJ/polypeptide/DnaK semble faciliter le transfert de ce substrat sur DnaK (221). La capacité de liaison des protéines à domaines J au substrat concerne majoritairement les membres de classes I et II malgré l'absence de domaine de type SBD. Cette interaction implique le motif en « doigt de zinc » et une partie du domaine C pour les protéines de la catégorie I (222) et seulement le domaine C pour les membres de catégorie II (223).

#### 2.2.1.2.2. Les NEF

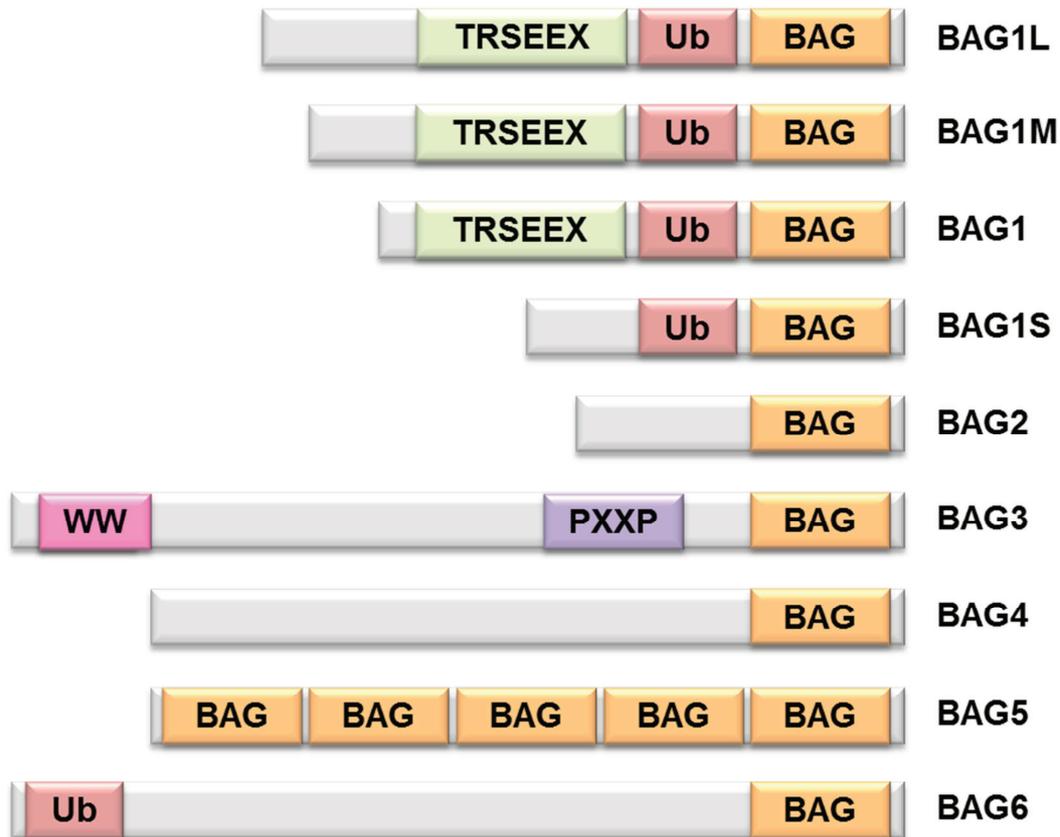
Les NEF interagissent toutes avec le NBD de HSPA8 après hydrolyse de l'ATP. Ces facteurs favorisent le relargage de l'ADP et du phosphate inorganique et le remplacement par une nouvelle molécule d'ATP. Chez les eucaryotes, il existe quatre types de NEF présentant très peu d'homologie entre eux : les GrpE-like, les HSPBP, les HSP110 et les protéines BAG.

Les protéines GrpE-like (« Glucose responsive protein E-like ») sont des homologues de la protéine GrpE chez les bactéries. Elles sont localisées dans la mitochondrie où elles assistent HSP70 mitochondrial dans ses fonctions de repliement et d'import protéique (224, 225). L'étude de l'interaction GrpE-DnaK montre que la liaison de ce NEF au NBD de HSPA8 induit un changement de conformation permettant l'ouverture de la poche contenant l'ADP et la libération de ce dernier (226).

Les protéines HSPBP (« HSP70-binding protein ») sont composées de deux membres constitutifs, à savoir HSPBP1 exprimé dans le cytosol et BAP exprimé dans le réticulum endoplasmique (RE). Ces deux protéines régulent l'activité respective de HSPA8 et Bip dans chacun de ces compartiments. HSPBP1 agit comme un NEF en liant le NBD de HSP70 et en provoquant une ouverture du domaine favorable à l'échange de nucléotides (227, 228).

Les membres de la famille des HSP110 sont des homologues des HSP70 avec une structure similaire composée de deux domaines NBD et SBD. Cependant, ces facteurs n'ont pas de capacité de repliement des protéines dénaturées indépendante des HSP70. Ces protéines agissent plutôt comme des NEF (229) en s'associant au NBD de HSPA8 par leur domaine SBD. Le mécanisme structural à l'origine de l'échange de nucléotide est similaire à celui décrit pour GrpE-like avec l'ouverture de la poche contenant l'ADP (230).

Enfin, les protéines BAG (« Bcl-2-associated athanogene ») comportent six membres chez l'homme dont BAG1 composé de quatre isoformes issues d'un épissage alternatif



**Figure 17. Structure des protéines BAG.** Les différentes protéines BAG et leurs domaines fonctionnels sont représentés. BAG : domaine BAG ; Ub : « ubiquitin-like domain » ; TRSEEX : région riche en répétition du motif composé des six résidus TRSEEX ; WW : domaine riche en résidus tryptophane ; PXXP : domaine riche en motifs contenant deux résidus proline séparées par deux résidus aléatoire.

(Figure 17). Ces protéines ont toutes en commun un seul domaine BAG conservé à l'extrémité carboxy-terminal conservé (excepté BAG5 qui en contient cinq) qui est suffisant pour l'interaction avec le NBD de HSPA8 et pour l'échange de nucléotides (231, 232). L'étude cristallographique du complexe HSPA8-BAG1 a mis en évidence un mode d'action similaire à celui de GrpE-like et HSP110, avec un changement de conformation du NBD provoquant l'ouverture de la poche contenant l'ADP et son relargage (233). Ce mécanisme peut légèrement varier suivant les membres de la famille des protéines BAG. Enfin, les autres domaines présents sur ces protéines et variables entre les membres leur permettent d'accomplir d'autres fonctions au sein de la cellule. Par exemple BAG1 et BAG6 possèdent un domaine « ubiquitin-like » participant au ciblage de substrats protéiques de HSPA8 vers leur dégradation (détaillé dans le paragraphe 2.2.2.1.2) (234). BAG1 favorise aussi la survie de la cellule en s'associant avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (235).

### 2.2.1.2.3. Hip, Hop et CHIP

D'autres co-chaperonnes s'associent à HSPA8 et modifient son activité. Parmi celles-ci, Hip (« HSC70-interacting protein ») lie sous forme de multimères le NBD de HSPA8 (236). Après hydrolyse de l'ATP, Hip stabilise la conformation de la chaperonne liée à l'ADP et au substrat (231, 236). La liaison des co-chaperonnes Hip et BAG1 sur le NBD de HSPA8 étant exclusive (231), Hip agirait en partie en empêchant la liaison de BAG1 et la libération de l'ADP induite par celle-ci.

Hop est une autre co-chaperonne composé de trois domaines TRP. En interagissant avec les motifs EEVD en carboxy-terminal de HSPA8 et HSP90, ces motifs permettent la formation d'un complexe contenant Hop et les deux chaperonnes (218, 237, 238). Ainsi, ce Hop permet de coupler le rôle stabilisateur de HSP90 sur le substrat protéique à l'activité de repliement protéique de HSPA8 (238).

Enfin, CHIP (« carboxyterminus of HSC70-interacting protein ») possède aussi un motif TRP lui permettant de partager le même site d'interaction que Hop et HSP40 sur HSPA8. Sa liaison à HSPA8 inhibe donc son cycle d'activité en empêchant l'action de ces co-chaperonnes (239). CHIP possède un domaine « U-box » lui permettant de cibler des substrats protéiques de HSPA8 vers certaines voies de dégradation (détaillé dans le paragraphe 2.2.2.1.2) (240).

## 2.2.2. Localisation et fonctions cellulaires de HSPA8

Grâce à sa capacité de lier les motifs hydrophobes des chaînes polypeptidiques et à son expression constitutive dans différents compartiments de la cellule, HSPA8 joue un rôle important dans de multiples voies biologiques en lien ou non avec l'immunité. Ce chapitre décrit sa localisation et ses principales fonctions cellulaires non immunitaires.

### 2.2.2.1. Localisation cellulaire

La chaperonne HSPA8 constitutive est abondante. Elle peut représenter jusqu'à 3% des protéines d'une cellule. Elle est majoritairement localisée dans le cytosol, mais on la retrouve également dans le noyau et dans la lumière des vésicules de types endosomes / lysosomes. Elle est aussi présente à la surface des cellules bien qu'elle ne possède pas de domaine transmembranaire (193, 241). Cette localisation membranaire serait due à une interaction avec des récepteurs membranaires comme CD14, CD40 ou certains TLR (242–245). De plus, sa localisation semble restreinte à des radeaux lipidiques riches en cholestérol où elle peut interagir directement avec certains lipides présents comme le globotriaosylcéramide (241, 246). La protéine HSPA8 est également détectée dans le milieu extracellulaire, provenant probablement de cellules nécrotiques ayant libéré leur contenu intracellulaire. Elle peut être activement sécrétée, en particulier par les cellules tumorales, malgré l'absence de séquence-signal de sécrétion (247, 248). Dans certains cas, elle peut aussi être sécrétée par des cellules immunitaires et tumorales à l'intérieur de vésicules appelées exosomes (249, 250). Ces structures dérivées d'endosomes tardifs participent à la communication intercellulaire et régulent certains mécanismes immunitaires en contribuant par exemple à la présentation d'antigènes aux LT (251).

### 2.2.2.2. Fonctions cellulaires

#### Détachement des clathrines

HSPA8 a été identifiée à l'origine comme une ATPase associée au détachement des trimères de clathrines des vésicules après endocytose dépendante des clathrines (252, 253). Cette voie d'internalisation spécifique repose sur la liaison d'un ligand à un récepteur ancré dans la membrane plasmique. Cette interaction provoque l'invagination de la membrane et la formation d'une vésicule cytosolique contenant le ligand internalisé. La clathrine joue un rôle central dans ce processus en s'associant sous forme trimérique sur la face cytosolique de la vésicule lors de sa formation et en favorisant la courbure de la membrane (254). L'introduction d'anticorps anti-HSPA8 (255) ou l'expression d'un dominant négatif de HSPA8 (256, 257) bloque cette voie, mettant ainsi en évidence un rôle de la chaperonne dans ce mécanisme. De nombreuses études ont montré l'association de HSPA8 avec l'auxiline

(258, 259) ou GAK (« cycline G-associated kinase ») dans les tissus non neuronaux (260). Cette interaction stimule l'activité d'hydrolyse de l'ATP de la chaperonne et provoque sa multimérisation (261). L'auxiline reconnaît aussi un motif spécifique QLMLT à l'extrémité carboxy-terminale des chaînes lourdes de clathrines (262). Ainsi, HSPA8 est recrutée au niveau des trimères de clathrines recouvrant les endosomes et l'hydrolyse de l'ATP provoque leur dissociation (263).

### Repliement protéique

L'une des fonctions majeures de HSPA8 dans la cellule repose sur son implication dans le repliement des protéines en cours de synthèse. Ce mécanisme est directement couplé à la traduction protéique et les chaînes polypeptidiques synthétisées sont protégées par de nombreuses chaperonnes et co-chaperonnes (264). En particulier, HSPA8 reconnaît des séquences hydrophobes et empêche la formation d'agrégats. Son cycle d'activité participe au repliement de la protéine synthétisée et lui confère une structure fonctionnelle. Ainsi, environ 20 % des protéines en cours de synthèse dans la cellule sont associées à HSPA8, incluant principalement des chaînes polypeptidiques de moins de 20 kDa (264). HSPA8 s'associe à de nombreux agrégats cellulaires issus de protéines mal conformées (265, 266) ou dénaturées à la suite d'un stress cellulaire (267) et contribue à réduire leur formation.

### Dégradation protéique

L'association de HSPA8 aux protéines mal ou non structurées joue aussi un rôle important dans le ciblage de ces polypeptides vers différentes voies de dégradation cellulaire. Le système ubiquitine-protéasome est une voie protéolytique reposant sur la modification post-traductionnelle d'un substrat protéique par addition de plusieurs molécules d'ubiquitine. Celles-ci sont ensuite reconnues par un complexe multiprotéique, appelé protéasome, dégradant les protéines ubiquitinées. En l'absence de HSPA8, de nombreuses protéines cellulaires telles que l'actine ou l'histone H2A ne sont plus ubiquitinées et dégradées par le protéasome (268), mettant en évidence un rôle de la chaperonne dans le ciblage de ces protéines vers cette voie. Cette fonction repose sur l'interaction de HSPA8 avec les deux co-chaperonnes BAG1 et CHIP. Le domaine « ubiquitin-like » de BAG1 participe au ciblage vers le protéasome en interagissant directement avec ce dernier (234) et le domaine « U-box »

de CHIP possède une fonction d'ubiquitine-ligase E3 lui permettant de coupler des chaînes d'ubiquitine au substrat associé à HSPA8 (269). De plus, BAG1 et CHIP interagissent ensemble et coopèrent pour une dégradation efficace du substrat par le complexe protéolytique (270). De manière intéressante, CHIP couple aussi directement des chaînes d'ubiquitine non canoniques plus courtes sur HSPA8 (271) et BAG1 (272). Ces modifications post-traductionnelles n'induisent pas leur dégradation, mais favoriseraient plutôt la reconnaissance par le protéasome du substrat associé au complexe HSPA8-co-chaperonnes. La protéine HSPA8 joue également un rôle important dans le ciblage et la dégradation des protéines cellulaires par autophagie. Cette fonction sera décrite dans la partie consacrée à l'autophagie et son rôle dans l'immunité.

### Trafic cellulaire

La capacité de HSPA8 de lier de nombreux substrats protéiques lui confère un rôle central dans l'import de protéines dans de nombreux organelles ou compartiments cellulaires. En particulier, plusieurs études ont rapporté un transport de HSPA8 entre le noyau et le cytoplasme dépendant de l'hydrolyse de l'ATP (273, 274). De nombreuses protéines cytosoliques dépendent d'une interaction avec cette chaperonne pour leur import dans le noyau, c'est le cas par exemple des protéines karyophiliques (275, 276) et de la calmoduline (277). Le transport de HSPA8 dans le noyau repose sur la présence de deux séquences de ciblage NLS (« nuclear localisation sequence »), une au niveau du NBD et l'autre à l'extrémité carboxy-terminale du SBD (278, 279). HSPA8 régule aussi l'export de certaines protéines nucléaires vers le cytosol, telles que les importines  $\alpha/\beta$  (280) ou la protéine de matrice du virus *Influenza* M1 (281). Cette propriété dépend d'une séquence d'export du noyau NES (« nuclear export sequence ») localisée au début de la région SBD. La régulation de l'import et l'export de la chaperonne dans le noyau en conditions physiologiques ou de stress cellulaire pourrait dépendre en partie d'une variation de l'exposition des séquences NLS et NES (282).

L'import de protéines vers d'autres organelles comme la mitochondrie ou le RE dépend aussi en partie de la chaperonne HSPA8 (283). Elle facilite l'import de protéines mitochondriales en empêchant leur agrégation et en les maintenant dans un état non replié

(284). De plus, en coopération avec HSP90, elle interagit directement avec le domaine TRP de la protéine Tom70 (« translocase of outer membrane 70 ») dans la membrane externe de la mitochondrie et facilite l'import du substrat associé par un mécanisme dépendant de l'hydrolyse de l'ATP (285). Concernant l'import des protéines dans le RE, la plupart des protéines sont transférées dans la lumière de l'organelle au cours de leur synthèse par les ribosomes grâce à la reconnaissance d'une séquence signal hydrophobe à l'extrémité aminotermine. Toutefois, certaines protéines possédant une séquence signal spécifique appelée TA (« tail-anchor ») à l'extrémité carboxy-terminale peuvent être importées dans le RE une fois leur synthèse terminée (286). Ce mécanisme dépend en partie de la chaperonne HSPA8 associée à HSP40. Ce complexe reconnaît la séquence TA de la protéine ciblée et facilite son transfert dans la lumière du RE grâce à l'hydrolyse de l'ATP (287, 288). Un degré d'hydrophobicité important de la séquence TA semble favoriser le choix de cette voie dépendante des chaperonnes (288). HSPA8 est aussi impliquée dans le transport d'organelles dans la cellule en régulant la dissociation de la protéine-moteur kinésine-1 le long des microtubules (289, 290).

### Apoptose

Plusieurs études ont rapporté un rôle anti-apoptotique de HSPA8. En effet, l'expression de HSPA8 est par exemple augmentée en réponse aux hormones de croissance (291), ou au cours du développement embryonnaire en réponse à l'insuline (292). Cette surexpression s'accompagne d'une résistance des cellules à l'apoptose bien que le lien entre les deux événements ne soit pas défini. La surexpression de HSPA8 (et HSP70) protège aussi contre l'apoptose induite lors d'un stress cellulaire par la chaleur. Bien que le mécanisme sous-jacent reste peu compris, celui-ci pourrait être lié à un blocage de l'activation des caspases 3 et 9 et une inhibition du relargage du cytochrome c de la mitochondrie (293). Des études ont également mis en évidence une variation de la viabilité cellulaire en présence de HSPA8 dans l'espace extracellulaire. Cette fonction reste cependant controversée puisque des effets à la fois anti-apoptotiques (294, 295) et pro-apoptotiques (296) ont été observés.

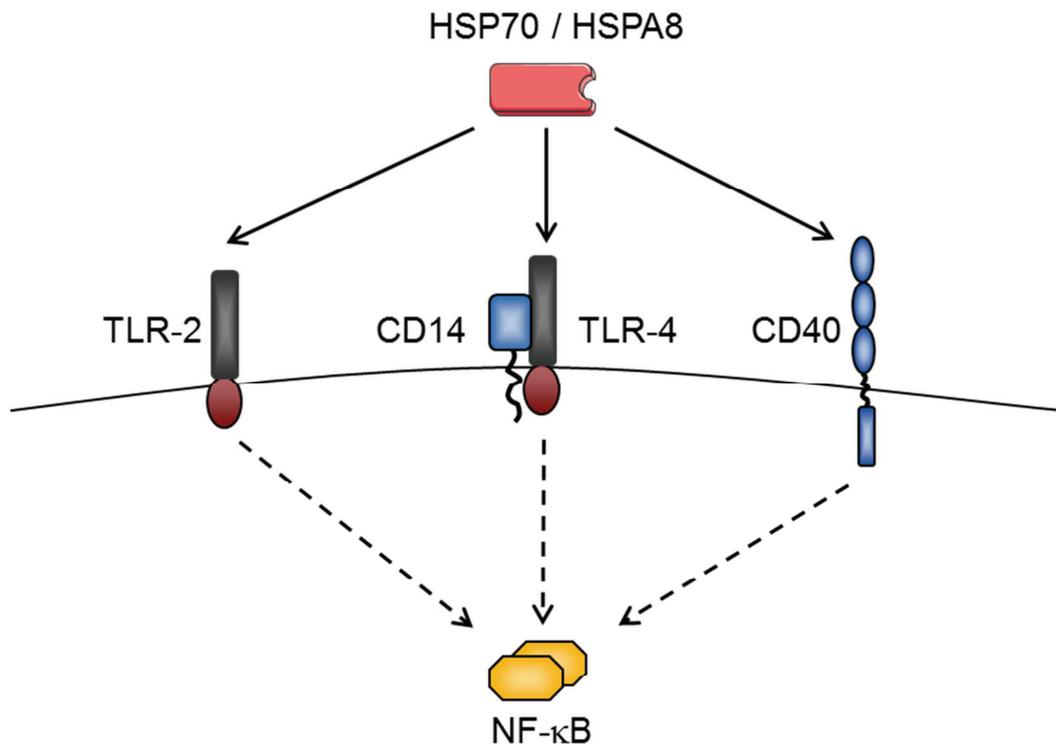
## 2.3. Rôle de HSPA8 dans l'immunité

### 2.3.1. Fonctions immunitaires de HSPA8 exogène

De nombreuses études font état des propriétés adjuvantes importantes des HSP. Cette caractéristique a été mise en évidence pour la première fois en utilisant comme vaccin les chaperonnes HSPA8 et HSP70 purifiés à partir de cellules de sarcome. Les souris immunisées développent une protection efficace et spécifique contre ces cellules tumorales (297). De plus, l'administration de complexes HSP70/peptide à des souris provoque l'activation de LT CD8<sup>+</sup> spécifique d'épitopes contenus dans la séquence du peptide (298). HSPA8 et HSP70 contribuent à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative spécifique de l'antigène couplé à la chaperonne. Les mécanismes sous-jacents expliquant ce phénomène sont abordés dans cette partie. Il est important de préciser que la majorité des études réalisées concerne la forme inductible HSP70, mais les résultats pour cette fonction peuvent être extrapolés à HSPA8 en raison du fort degré d'homologie entre les deux chaperonnes.

#### 2.3.1.1. Activation des cellules immunitaires innées

A l'instar d'autres HSP, HSPA8 et HSP70 sont capables de stimuler la maturation de nombreuses cellules de l'immunité innée. En effet, l'ajout exogène de HSP70 augmente la sécrétion d'oxydes de nitrite par les macrophages (299) et la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires par les DC et les monocytes telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-12, l'IL-6 et l'IL-1- $\beta$  (242, 300). La chaperonne HSP70 extracellulaire augmente aussi l'expression des marqueurs de maturation CD40, CD83 et CD86, mais cet effet semble restreint à la forme inductible, HSPA8 n'ayant aucun effet dans cette étude (301). L'effet pro-inflammatoire de ces chaperonnes repose sur une interaction avec des récepteurs exprimés par les cellules immunitaires innées (Figure 18). Une étude a mis en évidence la présence de récepteur en surface des monocytes et macrophages liant avec une forte affinité HSPA8 et HSP70 d'origine mammifère (302). L'effet pro-inflammatoire de HSP70 implique l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (« nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells ») et dépend de l'expression de TLR-2 et TLR-4, suggérant une liaison de la chaperonne à ces deux PRR (244, 245). De plus, CD14, une protéine adaptatrice de TLR-4, est aussi requise



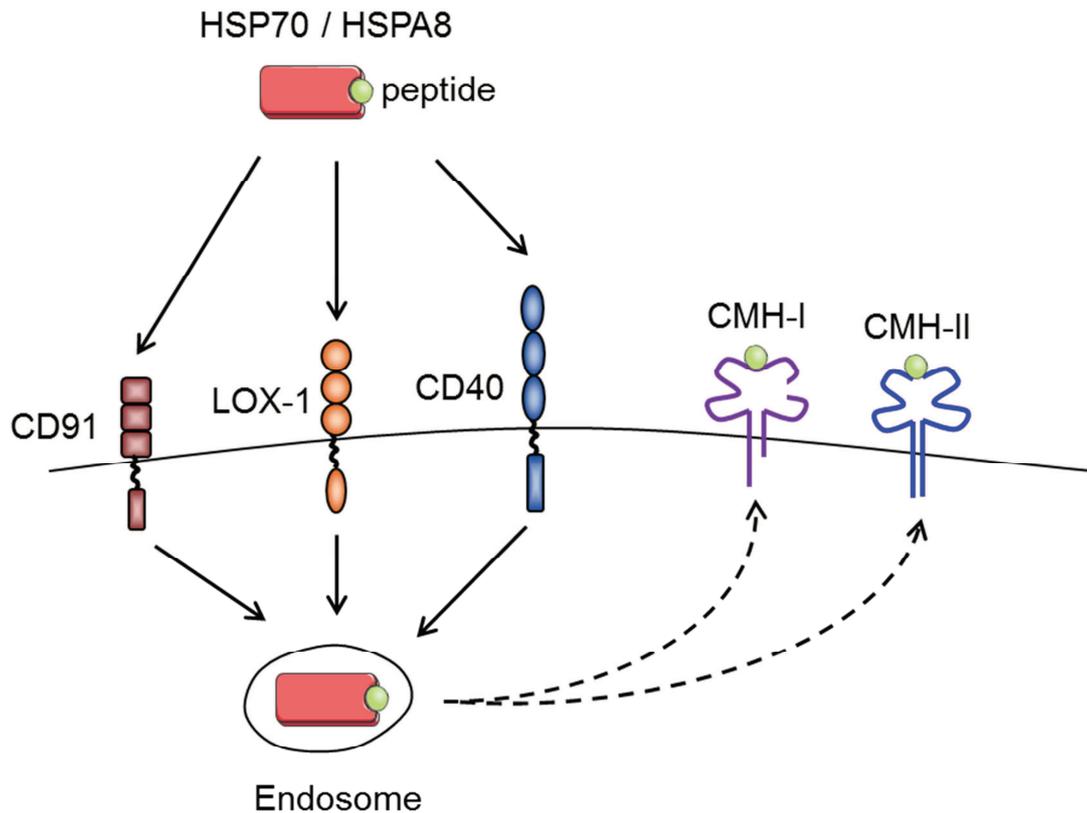
**Figure 18. Mécanisme d'activation de l'immunité innée par HSP70 ou HSPA8 extracellulaire.** La chaperonne HSP70 ou HSPA8 exogène est reconnue par TLR-2, TLR-4 associé au corécepteur CD14, ou CD40. Cette liaison stimule les voies de signalisation aboutissant à l'activation du facteur de transcription NF-κB et la maturation des cellules immunitaires innées.

pour l'induction de l'expression des cytokines pro-inflammatoires par HSP70 (242). CD40 est un autre récepteur exprimé par les cellules immunitaires innées qui pourrait être impliqué dans ce mécanisme. En effet, l'engagement de CD40 joue un rôle important dans la maturation des DC et une étude a mis en évidence une liaison de HSPA8 à ce récepteur par le NBD (243). Cependant, seul la chaperonne HSP70 bactérienne, mais pas son homologue d'origine mammifère, semble induire une maturation des cellules dépendante de CD40 (300, 303). L'implication des récepteurs TLR-2, TLR-4 ou CD40 pour la liaison de HSP70 est également contestée par une étude montrant que leur expression ectopique par des cellules transfectées ne modifie pas l'association de HSP70 à la surface (304). Il faut noter que plusieurs auteurs ont remis en cause ces propriétés adjuvantes en évoquant une contamination de la protéine HSP70 recombinante lors de sa production en bactéries. En particulier, les lipoprotéines et le lipopolysaccharide (LPS) bactériens sont deux ligands respectifs de TLR-2 et TLR-4 pouvant être à l'origine des effets observés (305, 306).

### 2.3.1.2. Présentation antigénique des peptides associés

L'interaction de HSP70 et HSPA8 à des récepteurs en surface des CPA, en plus d'induire leur maturation, permet aussi leur internalisation par endocytose dépendante des clathrines. Cette idée est soutenue par des photos de microscopie électronique montrant une localisation de HSPA8 à l'intérieur de vésicules recouvertes après incubation de DC en présence de la chaperonne (307). Ce mécanisme pourrait donc contribuer à une capture efficace de peptides antigéniques couplés à ces chaperonnes et leur présentation par les molécules du CMH. Parmi les récepteurs de HSP70 mentionnés plus haut qui induisent une maturation des cellules mentionnés, seul CD40 a été mis en évidence dans le mécanisme d'internalisation d'un complexe HSP70/peptide (243). Toutefois, un effet partiellement compétitif pour la liaison de HSP70 à la surface des CPA est aussi observé avec les chaperonnes GP96 (« glycoprotein 96 ») et HSP90, suggérant la présence d'autres récepteurs communs entre HSP70 et les autres chaperonnes (308). Ce récepteur peut correspondre à CD91 qui est exprimé par de nombreuses CPA et qui constitue un récepteur commun pour de nombreuses HSP telles que HSP90, GP96, HSP110, HSP70 et la calréticuline (309). Cependant, une autre étude montre que la variation de l'expression de CD91 ne modifie pas l'association de HSP70 à la surface des cellules (304). Il existe aussi des récepteurs éboueurs exprimés par les CPA pouvant agir comme des récepteurs de HSP. Parmi ceux-ci, LOX-1 pourrait s'associer à HSP70 puisque la liaison de la chaperonne à la surface des cellules est augmentée par l'expression ectopique du récepteur et inhibée en présence d'anticorps anti-LOX-1 (304, 310).

Après endocytose des chaperonnes HSP70 ou HSPA8 associées aux peptides antigéniques, ces derniers gagnent les voies de présentation antigéniques par les molécules du CMH-I et CMH-II dans les CPA, permettant l'activation spécifique des LT CD8<sup>+</sup> et des CD4<sup>+</sup> respectivement (Figure 19). La présentation d'antigènes exogènes par les molécules du CMH-II repose sur une dégradation de l'antigène dans des vésicules de types endosomes tardifs / lysosomes. Les peptides générés peuvent alors être chargés par les molécules du CMH-II et présentés en surface des CPA (311). Dans certaines CPA telles que les DC CD8<sup>+</sup>, les antigènes exogènes peuvent aussi être présentés par les molécules du CMH-I par un mécanisme de présentation croisée. Bien que ce processus reste encore aujourd'hui mal compris, deux voies principales ont été définies. La voie vacuolaire repose sur le recyclage



**Figure 19. Mécanisme de présentation antigénique des peptides associés à HSP70 ou HSPA8 exogène.** Le complexe HSP70/peptide ou HSPA8/peptide interagit avec CD40 ou les récepteurs éboueurs CD91 et LOX-1. Cette liaison provoque l'endocytose du complexe, et le peptide associé rejoint les voies de présentation antigénique par les molécules du CMH-II ou de présentation croisée par les molécules du CMH-I.

des molécules du CMH-I de surface couplées à des peptides endogènes. En rejoignant les vésicules contenant des produits de dégradation des antigènes internalisés, les molécules du CMH-I s'associent à des peptides d'origine exogène et sont ensuite ré-exprimées en surface. La voie cytosolique implique un export de l'antigène endocyté vers le cytosol où il est dégradé par le protéasome. Les peptides générés sont ensuite importés dans la lumière du RE par le récepteur membranaire TAP (« transporter-associated with antigen processing ») et chargés sur les molécules du CMH-I (312). Quelques études ont proposé l'existence de vésicules intracellulaires issues de la fusion du RE avec des phagosomes. L'export de l'antigène et l'import des peptides générés après dégradation par le protéasome ont lieu dans ce cas au sein de la même structure (313, 314).

L'internalisation de protéines HSP par le récepteur CD91 est associée à un mécanisme de présentation croisée des antigènes associés. La plupart des études à ce sujet concerne GP96 (309, 315–317), mais les résultats peuvent être extrapolés à HSP70 avec qui il partage le même récepteur. Dans ce cas, l'antigène s'associe aux molécules du CMH-I par un mécanisme impliquant le protéasome et le récepteur TAP, suggérant une implication de la voie cytosolique (309). De plus, une partie des antigènes endocytés est aussi présentée par les molécules du CMH-II (318). L'internalisation du complexe HSP70/peptide par le récepteur LOX-1 dans les DC favorise aussi une présentation croisée de l'antigène efficace mais la voie en jeu dans ce cas n'est pas déterminée (310). Une autre étude a mis en évidence l'implication à la fois de la voie cytosolique et vacuolaire dans la présentation croisée des peptides couplés à HSP70 et le choix de la voie utilisée semble dépendre de la séquence peptidique (319).

### 2.3.2. Fonctions immunitaires de HSPA8 endogène

En plus de ses fonctions de maintien de l'homéostasie protéique et de transport cellulaire, la chaperonne HSPA8 exprimée de façon endogène joue aussi un rôle important dans l'immunité, en particulier dans la présentation des antigènes par les CPA et la reconnaissance de cellules par des acteurs de l'immunité. Ces propriétés sont abordées dans cette partie.

#### 2.3.2.1. Présentation antigénique

La localisation de HSPA8 à l'intérieur de vésicules endo-lysosomales confère à la chaperonne un rôle important dans la présentation antigénique par les molécules du CMH-II. En effet, une étude a mis en évidence une interaction directe d'un antigène exogène HEL (« hen egg lysozyme ») avec HSPA8. La surexpression de la chaperonne augmente fortement la présentation de HEL intact aux LT CD4<sup>+</sup> mais ne modifie pas la présentation d'un peptide dérivé de la séquence de l'antigène (320). Ce résultat suggère que HSPA8 pourrait protéger l'antigène au moment de sa dégradation et préserver ainsi des épitopes importants. Les antigènes cytosoliques dégradés dans le lysosome par autophagie dépendante des chaperonnes, appelé CMA (« chaperone mediated autophagy »), peuvent également être

présentés par les molécules du CMH-II. Ce mécanisme protéolytique nécessite la présence d'un variant de HSPA8 intralysosomal (développé dans le paragraphe 3.2.2.1).

La protéine HSPA8 présente dans le cytosol est aussi impliquée indirectement dans la voie de présentation antigénique par les molécules du CMH-II. En effet, la chaperonne s'associe à la queue cytoplasmique de la chaîne invariante Li trimérique. Cette dernière est exprimée au niveau du RE et régule l'assemblage des molécules du CMH-II ainsi que leur export vers les endosomes. Elle module aussi la structure de ces vésicules endosomales et cette dernière fonction nécessite l'interaction du trimère de Li avec HSPA8 fonctionnelle (321). D'autres fonctions de la chaperonne cytosolique sont associées à la présentation d'antigènes endogènes par les molécules du CMH-I. En effet, HSPA8 s'associe avec le récepteur TAP dans la membrane du RE et favorise l'import des peptides issus de la dégradation d'antigènes cytosoliques pour leur apprêtement sur les molécules du CMH-I (322).

#### 2.3.2.2. Autres fonctions immunitaires

D'autres fonctions immunitaires de la protéine HSPA8 concernent la reconnaissance de cellules par des acteurs du système immunitaire. Les LT  $\gamma/\delta$  forment une petite population de LT cytotoxiques non conventionnels exprimant un TCR peu variable composé des chaînes  $\gamma$  et  $\delta$  au lieu des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  classiques. Le TCR de ces cellules interagit directement avec des ligands indépendamment d'une présentation par les molécules du CMH. Des études ont suggéré une reconnaissance de HSPA8 par les LT  $\gamma/\delta$ , en particulier par les cellules exprimant les chaînes  $V\gamma 1$  et  $V\delta 6$  du TCR (197, 198, 323). Les LT  $\gamma/\delta$  joue un rôle important dans l'immunité anti-tumorale, ces cellules pourraient donc reconnaître HSPA8 présente à la surface des cellules tumorales et induire leur lyse. Cependant, aucune étude à ce jour n'a mis en évidence un tel mécanisme. La localisation de la chaperonne à la surface des cellules leur confère aussi une protection vis-à-vis de la lyse par le complément (324).

Pour finir, HSPA8 joue aussi un rôle régulateur dans l'hématopoïèse. En particulier, la chaperonne lie la région 3' non transcrite des ARN messagers de Bim et stabilise ces

transcrits. Bim est une protéine pro-apoptotique décrite pour réguler l'homéostasie des leucocytes (325). Cette fonction est donc dépendante du rôle stabilisateur de HSPA8 et de l'association de multiples co-chaperonnes en réponse à l'IL-3 (326).

### 2.3.3. Implication dans l'autoimmunité

La chaperonne HSPA8 jouant un rôle important dans l'immunité, la dérégulation de son expression est souvent observée dans l'autoimmunité. Par exemple, la surexpression de HSPA8 dans un modèle murin de diabète de type I au niveau des cellules  $\beta$  pancréatiques accroît l'inflammation et favorise le développement de la pathologie. La mort des cellules  $\beta$  aggrave ce phénotype, suggérant un mécanisme par lequel la chaperonne libérée dans le milieu extracellulaire stimulerait la maturation des CPA et la présentation d'autoantigènes associés (327). HSPA8 semble aussi contribuer au développement de la polyarthrite rhumatoïde. En effet, elle s'associe de façon privilégiée aux allèles de susceptibilité des molécules du CMH-II HLA-DR4 et HLA-DR10 grâce à la reconnaissance d'un motif de cinq résidus QKRAA et RRRAA présents dans la séquence de ces variants (328). Des autoanticorps anti-HSPA8 d'isotype IgG et IgM sont aussi détectés dans les séra de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (329). Dans le LED, les études ayant mesuré le niveau d'expression de la chaperonne mettent en avant des résultats contradictoires. Certains auteurs ont rapporté une surexpression de certaines chaperonnes dans les leucocytes de patients lupiques, incluant HSP70 et HSP90, mais pas HSPA8 (330–332). Chez les souris MRL/lpr, un niveau élevé d'expression de HSP90 et HSP70 est aussi observé dans la rate, mais l'expression de HSPA8 reste inchangée par rapport aux souris contrôles BALB/c (333). En revanche, notre laboratoire a mis en évidence une surexpression de HSPA8 par les splénocytes des souris MRL/lpr comparés aux souris saines CBA/J. Cette surexpression est observée à la fois à la surface cellulaire et dans le cytoplasme et concerne les LB, les LT, les granulocytes et les macrophages/monocytes (193). Des autoanticorps anti-HSPA8 apparaissent aussi chez les patients lupiques (334).

La découverte d'une molécule immunosuppressive ciblant HSPA8, le 15-deoxyspergualin (DSG), a renforcé le lien entre la chaperonne et l'autoimmunité (335)

(Figure 20). Ce composé chimique interagit avec HSPA8, mais aussi HSP90 avec une constante d'affinité moyenne de l'ordre du micromolaire (336). Le site d'interaction se situe à l'extrémité carboxyterminale de la chaperonne au niveau du motif EEVD ciblé par de nombreuses co-chaperonnes telles que HSP40 (337). L'interaction du DSG avec HSPA8 stimule l'hydrolyse de l'ATP sans affecter toutefois l'interaction avec HSP40 (338). La propriété immunosuppressive du DSG repose principalement sur un blocage de la présentation antigénique par les CPA. En effet, la présence de cette molécule abolit la présentation aux LT CD4<sup>+</sup> d'un antigène issu du virus *Influenza* (339). Cet effet semble dépendre d'une inhibition de l'interaction de HSPA8 avec l'antigène endocyté (320). La voie de présentation antigénique par les molécules du CMH-I est aussi affectée par le DSG en inhibant l'association de HSPA8 avec le récepteur TAP dans la membrane du RE (322). D'autres études ont aussi rapporté une inhibition de la maturation des DC et une baisse de l'expression du récepteur pré-BCR par les cellules pré-B en présence de ce composé (340, 341). Les propriétés thérapeutiques du DSG vis-à-vis de l'autoimmunité ont été testées dans le lupus. Son administration aux souris MRL/lpr et (NZB/W)F1 provoque une baisse de l'activation des LB et une réduction du niveau sérique des anticorps anti-ADN db. Elle améliore aussi les glomérulonéphrites et prolonge la durée de vie des souris (342, 343). Le DSG a récemment été testé pour le traitement de néphrites lupiques dans un essai clinique de phase I/II. Il présente une bonne tolérabilité malgré quelques effets secondaires liés au traitement. Il améliore également la protéinurie des patients, ce qui encourage la poursuite de l'étude clinique (344).

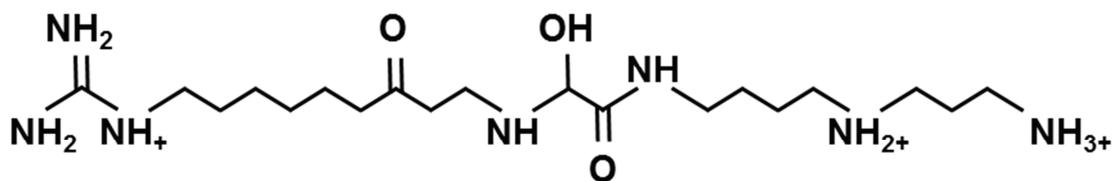


Figure 20. Structure chimique du DSG.

### **3. L'AUTOPHAGIE ET SON ROLE DANS L'IMMUNITE**

#### **3.1. Présentation de l'autophagie**

##### **3.1.1. Généralités**

Le catabolisme cellulaire dépend de nombreuses voies métaboliques dégradatives permettant une production énergétique essentielle aux fonctions et à la survie de la cellule. L'autophagie est un mécanisme catabolique très conservé chez les eucaryotes ciblant des composants cytosoliques (protéines, organelles) vers le lysosome afin de les dégrader. Cette voie est constitutive et peut être fortement stimulée par des signaux de stress cellulaire. Elle régule de nombreuses fonctions physiologiques (survie des cellules, immunité) et sa dérégulation participe au développement de pathologies (cancer, maladies neurodégénératives).

L'origine du mot autophagie provient du grec et signifie « manger soi-même ». Ce terme fut utilisé pour la première fois en 1963 par Christian de Duve pour décrire la présence de vésicules à simple ou double membrane contenant des structures cytosoliques partiellement digérées, en référence à un sous-type particulier d'autophagie connu aujourd'hui sous le nom de macroautophagie. D'autres chercheurs tels que Thomas Ashford and Keith Porter notèrent aussi la présence de vésicules contenant des mitochondries partiellement dégradées et des portions du RE dans des hépatocytes de rat (345). L'observation par Alex Novikoff de nombreuses vésicules à double membrane dans des hépatocytes de rats privés de nourriture en 1964 mit en avant un lien entre la déplétion en nutriments à une stimulation de l'autophagie (346). De nombreuses études morphologiques réalisées entre les années 1950 et 1980 permirent de disséquer les différentes étapes de la macroautophagie (347) et d'identifier les premiers composés chimiques inhibant ce processus comme la 3-méthyladénine (348).

A partir des années 1990, grâce aux progrès de la génétique, de nombreux gènes régulant la macroautophagie furent identifiés. En 1993, une analyse génétique chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* permit à l'équipe de Yoshinori Ohsumi d'identifier pour la

première fois des mutations associées à un défaut de dégradation protéique par autophagie (349). Cette étude fut suivie de la découverte en 1997 du premier gène régulant la macroautophagie, *ATG1* (« autophagy-related gene 1 ») (350), puis de nombreux autres gènes de la même famille furent identifiés. Peu de temps après, des gènes homologues chez les eucaryotes supérieurs furent à leur tour découverts, tels que *ATG5* et *ATG12* (351). En particulier, l'identification de *MAP1LC3*, un homologue de *ATG8* codant pour la protéine LC3 (« light chain 3 »), fut une avancée majeure contribuant au développement de techniques biologiques pour le suivi de l'activité de macroautophagie (352). Les premières voies de signalisation régulant cette voie furent aussi découvertes dans les années 1990. En particulier, un rôle inhibiteur de la kinase TOR (« target of rapamycin ») sur la macroautophagie fut mis en évidence en 1995 dans des hépatocytes de rat (353).

Après la découverte de la macroautophagie dans les années 1960, d'autres voies autophagiques furent identifiées. Tout d'abord, la microautophagie fut décrite pour la première fois en 1966 par Christian de Duve et Robert Wattiaux (354) mais le terme ne fut introduit qu'en 1983. Par ailleurs, l'équipe de James Dice observa en 1981 une dégradation inégale de protéines micro-injectées dans des fibroblastes, suggérant l'existence d'une autre voie autophagique plus sélective (355). Les travaux menés par la suite permirent d'identifier un motif KFERQ présent sur les substrats utilisant cette voie et responsable de cette sélectivité (356, 357). En 1989, une étude mit en évidence le rôle de la chaperonne cytosolique HSPA8 dans la reconnaissance spécifique de ce motif (358). C'est en 1996 que la compréhension du mécanisme moléculaire en jeu connut une avancée majeure avec la découverte du récepteur lysosomal LAMP2A (« lysosome-associated membrane protein 2a ») responsable de l'import et de la dégradation des protéines par cette voie (359). Elle fut suivie en 1997 par l'identification d'un variant de HSPA8 intralysosomal nécessaire à l'import sélectif des protéines dans le lysosome (360). Ce n'est qu'en 2000 que cette voie fut nommée pour la première fois « autophagie dépendante des chaperonnes » ou CMA (361).

### 3.1.2. Mécanismes et fonctions cellulaires

Chez les mammifères, il existe trois mécanismes principaux d'autophagie : la macroautophagie, la CMA et la microautophagie. Seules les deux premières voies seront abordées dans les pages qui suivent. Nous nous intéresserons aux mécanismes moléculaires et cellulaires, aux voies de régulation et aux principales fonctions non immunitaires de la macroautophagie et de la CMA.

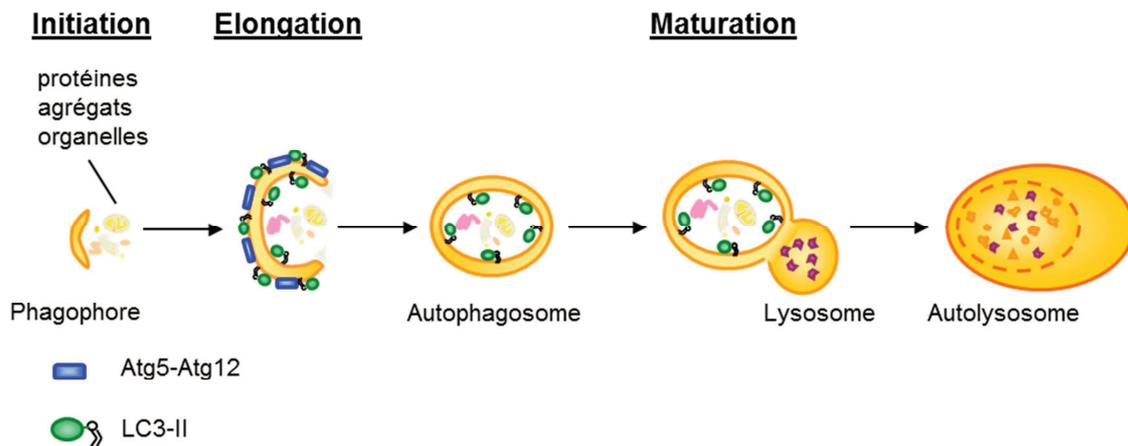
#### 3.1.2.1. La macroautophagie

##### 3.1.2.1.1. Mécanisme

La macroautophagie est un processus dynamique présent à l'état basal dans toutes les cellules. Elle peut aussi être activée par de nombreux signaux de stress, incluant la privation de nutriments, la privation de facteurs de croissance et des infections. Cette voie autophagique capture des composants cytosoliques (protéines à longue durée de vie, agrégats protéiques, organelles) et les délivre au lysosome où ils sont éliminés. Plus de 30 protéines Atg régulent ce processus chez la levure et la plupart d'entre elles possèdent un orthologue chez les mammifères. Trois étapes successives composent ce mécanisme. Pendant l'initiation, une structure membranaire, appelée phagophore, est isolée, puis s'étend pendant l'étape d'élongation jusqu'à former une vésicule à double membrane appelée autophagosome. Cette étape permet la séquestration de composants cytosoliques au sein de cette structure. Enfin, pendant l'étape de maturation, la membrane externe de l'autophagosome fusionne avec le lysosome, formant alors un autolysosome. A ce stade, la membrane interne et les composants capturés sont dégradés par les enzymes lysosomales. Le complexe protéique Atg5-Atg12 et la protéine LC3, sous la forme LC3-II, sont deux facteurs essentiels à ce processus (Figure 21).

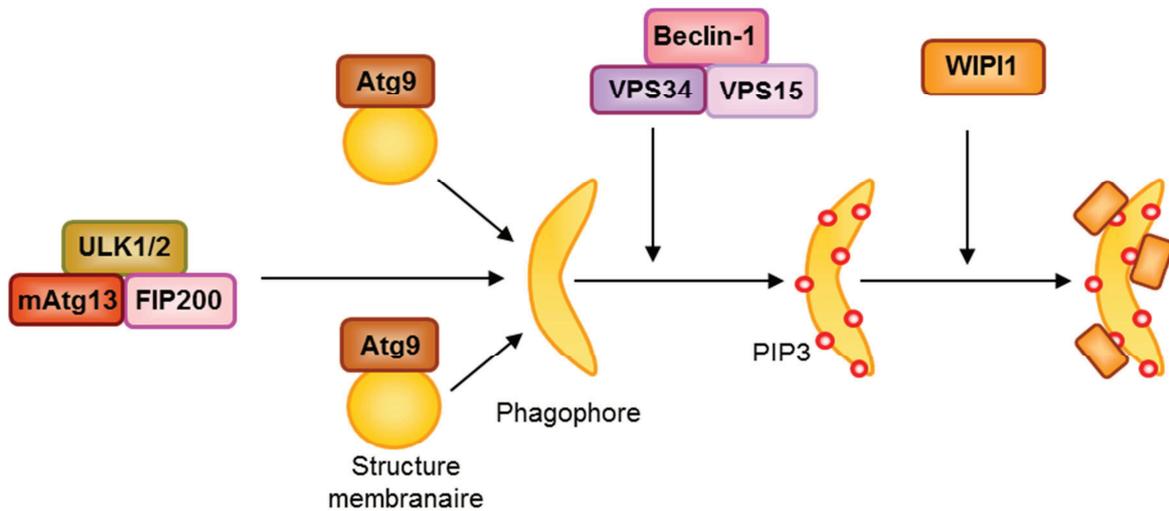
#### Initiation

La formation du phagophore constitue la première étape du mécanisme de macroautophagie. Chez les mammifères, cette étape est initiée par la formation d'un complexe protéique contenant les kinases ULK1/2 (« UNC-51-like kinase 1/2 », orthologue



**Figure 21. Les différentes étapes du processus de macroautophagie.** Lors de l'initiation, un phagophore se forme et s'allonge pendant l'élongation, séquestrant ainsi des composants cytosoliques au sein de l'autophagosome. La fusion de l'autophagosome et du lysosome lors de l'étape de maturation permet la formation d'un autolysosome et la dégradation du contenu. Les facteurs Atg5-Atg12 et LC3-II lient le phagophore en élongation et sont essentiels au processus de macroautophagie.

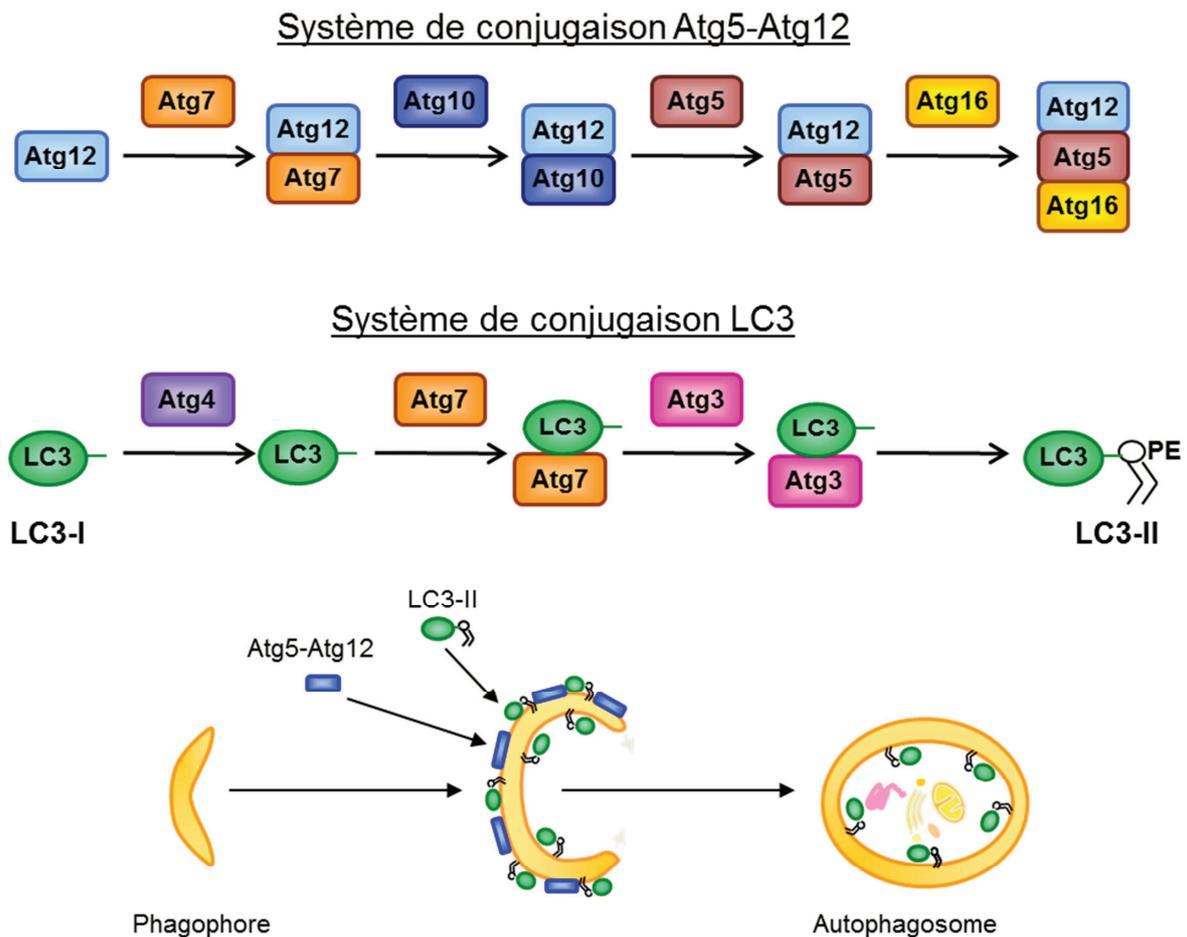
d'Atg1), mAtg13 (« mammalian Atg13 », orthologue d'Atg13) et FIP200 (orthologue d'Atg17). Lorsque les kinases ULK1/2 et mAtg13 sont déphosphorylées, ULK1/2 active alors FIP200 par phosphorylation et le complexe protéique est transféré sur le site d'isolement du phagophore où ils recrutent d'autres protéines Atg. En particulier, la protéine Atg9 transmembranaire navigue continuellement entre le lieu de formation de l'autophagosome, la zone *trans* de l'appareil de Golgi et les endosomes tardifs. Ainsi, Atg9 contribuerait à l'apport de membrane pour former le phagophore et permettrait son élongation. La source membranaire du phagophore reste cependant controversée. Des études récentes ont mis en avant une contribution du RE de la membrane externe de la mitochondrie et de la membrane plasmique (362–365). Ensuite, l'ancrage de molécules de phosphatidylinositol-3-phosphate (PIP3) dans la membrane du phagophore en formation est une étape importante permettant le recrutement d'autres protéines Atg. La source majeure de PIP3 dans ce cas est la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) de type III VPS34 (« vacuolar protein sorting 34 ») présente au sein d'un complexe protéique contenant aussi Beclin-1 (orthologue d'Atg6) et VPS15. Le rôle de ce complexe sera détaillé dans le paragraphe 3.1.2.1.2. Les protéines reconnaissant les molécules de PIP3 ancrées dans la membrane du phagophore comprennent en particulier la protéine WIPI-1 (« WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1 », orthologue d'Atg18) mais sa fonction exacte à cette étape n'est pas connue (Figure 22).



**Figure 22. Initiation du processus de macroautophagie.** Le complexe protéique ULK1/2-mAtg13-FIP200 initie la formation du phagophore. Ce processus dépend d'Atg9 qui serait impliqué dans l'apport de membrane à la structure. La kinase VPS34 génère des molécules de PI3P dans la membrane du phagophore et celles-ci sont reconnues par des protéines participant au processus de macroautophagie telles que WIPI1.

### Elongation

L'élongation du phagophore dépend de deux systèmes de conjugaison dits « ubiquitin like » (en raison de la similarité avec la conjugaison de l'ubiquitine) : la conjugaison d'Atg5-Atg12 et la conjugaison de LC3. Dans le premier système de conjugaison, Atg7 active Atg12, ce dernier est ensuite transféré à Atg10. Atg12 est finalement couplé de manière covalente à Atg5 et l'interaction avec Atg16L génère un complexe Atg5-Atg12/Atg16L s'associant au phagophore. Ce complexe se dissocie rapidement après formation de l'autophagosome (366). Le deuxième système de conjugaison implique la protéine LC3 (l'orthologue d'Atg8 chez les mammifères) initialement exprimée dans le cytosol sous une forme non mature. Cette protéine est d'abord clivée par Atg4, générant la forme LC3-I, puis activée par Atg7 et transférée à Atg3. Une chaîne de phosphatidyléthanolamine est alors couplée à LC3-I, générant la forme LC3-II qui est recrutée à la membrane interne et externe du phagophore en élongation. Elle reste ancrée à la membrane de l'autophagosome jusqu'à la fusion avec le lysosome. La protéine LC3-II présente sur la membrane externe est alors dissociée, recyclée en LC3-I et la protéine associée à la membrane interne est dégradée par les enzymes lysosomales (366) (Figure 23). Bien que les protéines Atg5 et Atg7 semblent nécessaires pour la formation des autophagosomes dans la plupart des études, quelques travaux mettent en



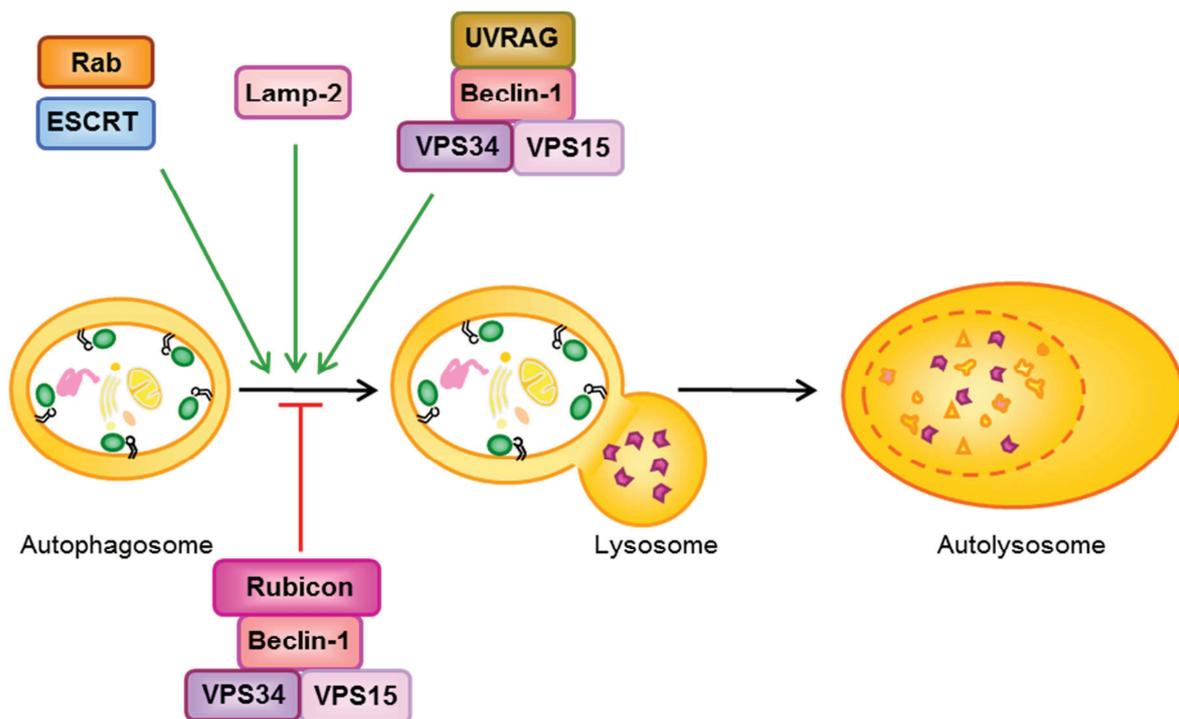
**Figure 23. Système de conjugaison « ubiquitin-like » de Atg5-Atg12 et de LC3 et élongation du phagophore au cours de la macroautophagie.** La protéine Atg12 est couplée de manière covalente à Atg5 et non covalente à Atg16 après une succession d'interactions avec différentes protéines Atg. De façon similaire, la protéine LC3 sous la forme LC3-I, est couplée de manière covalente à une chaîne de phosphatidyléthanolamine (notée PE) pour former LC3-II après une cascade d'actions de plusieurs protéines Atg. L'association des molécules Atg5-Atg12 et LC3-II au phagophore favorise son élongation et la formation d'un autophagosome.

avant l'existence d'un mécanisme de macroautophagie indépendant de ces deux facteurs (367).

### Maturation

La fusion de l'autophagosome avec le lysosome représente l'étape finale du processus de macroautophagie, permettant la dégradation du contenu capturé. Cette étape dépend de nombreuses protéines impliquées dans le transport vésiculaire et la fusion membranaire comme les protéines SNARE (« soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein

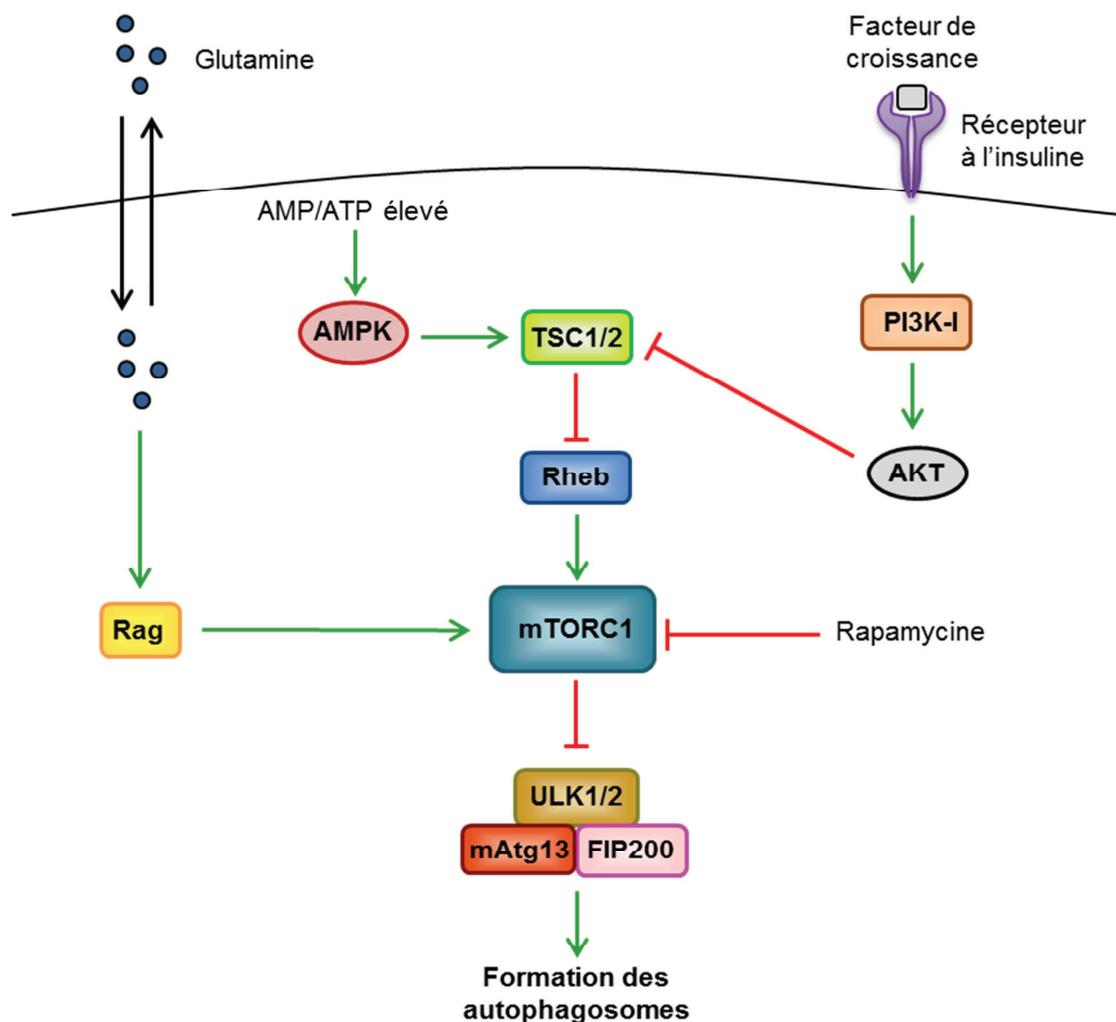
receptor ») (368), ESCRT (« endosomal sorting complexes required for transport ») (369) et certaines petites GTPases de la famille des Rab (370). La protéine Beclin-1, en complexe avec la kinase VPS34 et VPS15, est impliquée dans une voie de signalisation régulant la formation des autophagosomes (décrite dans le paragraphe suivant). Cependant, deux partenaires de Beclin-1, Rubicon et UVRAG (« UV-radiation resistance-associated gene »), régulent aussi la fusion autophagosome-lysosome. Rubicon inhibe la maturation des autophagosomes alors que UVRAG favorise cette étape (371, 372). Le cytosquelette joue aussi un rôle dans cette étape de maturation puisque des agents chimiques comme le nocodazole dissociant les microtubules inhibent la formation des autolysosomes (373). Enfin, cette étape requiert un lysosome fonctionnel. La présence d'agents chimiques réduisant l'acidité du lysosome comme la Bafilomycine A1, ou bien la délétion de la protéine transmembranaire lysosomale LAMP2 inhibent ce processus (374, 375) (Figure 24).



**Figure 24. Etape de maturation du processus de macroautophagie.** La fusion des autophagosomes avec le lysosome est facilitée par de nombreux facteurs tels que les protéines Lamp-2, Rab, ESCRT et la protéine UVRAG lié à Beclin-1. Rubicon, en interaction aussi avec Beclin-1 inhibe cette étape de maturation. Flèche verte : régulation positive ; flèche rouge : inhibition.

3.1.2.1.2. RégulationLa voie mTOR

La macroautophagie est un processus étroitement régulé afin d'être rapidement stimulé ou inhibé suivant les conditions cellulaires. L'une des voies de signalisation les mieux décrites est la voie mTOR (« mammalian target of rapamycin ») (Figure 25). La protéine mTOR est une kinase orthologue de TOR chez les mammifères qui régule de nombreuses



**Figure 25. Régulation de la formation des autophagosomes par la voie mTOR.** Le complexe mTORC1 inhibe la formation des autophagosomes en bloquant l'activité du complexe ULK1/2/mATG13/FIP200. Le transport bidirectionnel de la glutamine ou la liaison de facteurs de croissance au récepteur à l'insuline stimulent des voies de signalisation activant mTORC1. Lors d'une carence en acides aminés ou en facteurs de croissance, ces signaux de stress conduisent à une diminution de l'activité de ce complexe et à une activation de la macroautophagie. Un défaut énergétique se traduisant par un ratio AMP : ATP élevé induit aussi un signal activant cette voie autophagique par une voie de signalisation dépendante de mTORC1. La rapamycine est un agent induisant la macroautophagie en inhibant le complexe mTORC1. Flèche verte : activation ; flèche rouge : inhibition.

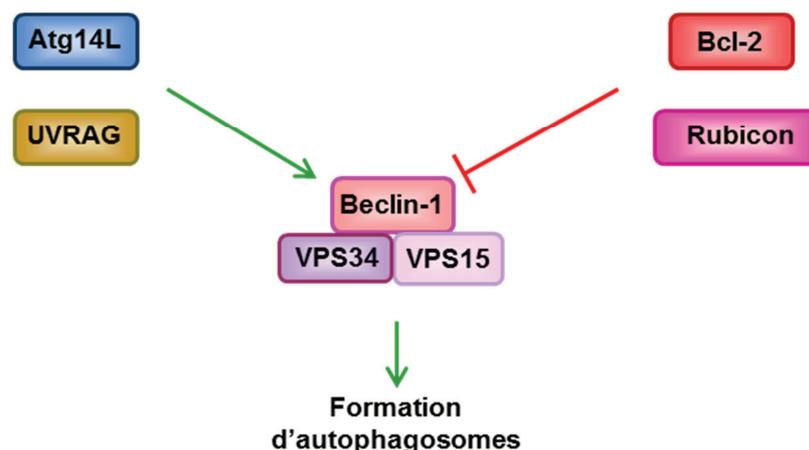
fonctions biologiques (croissance cellulaire, transcription, traduction, réarrangement du cytosquelette, etc...). Elle est présente au sein de deux complexes protéiques mTORC-1 et mTORC-2. Le complexe mTORC-1 (mTOR complex-1) est composé de mTOR et des sous-unités catalytiques raptor (« regulatory associated protein of mTOR »), GβL (« G protein β-subunit-like protein ») et PRAS40 (« proline-rich Akt substrate of 40 kDa »). Par ailleurs le complexe mTORC-2 contient mTOR associé à rictor (« rapamycin-sensitive companion of mTOR »), GβL, SIN1 (« SAPK-interacting protein-1 ») et PROTOR (« protein observed with rictor »). Seul mTORC-1 régule la macroautophagie en inhibant la formation des autophagosomes. Sous son état actif, ce dernier inhibe la formation des autophagosomes en s'associant au complexe ULK1/mAtg13/FIP200. Cette interaction induit la phosphorylation d'ULK1 et mAtg13 et inhibe leur activité. Lorsque mTORC-1 est inactivé, il se dissocie du complexe ULK-1/mAtg13/FIP200. L'activité kinase de ULK-1 induit alors la formation d'autophagosomes (376).

La rapamycine, une molécule connue pour activer la macroautophagie, agit en inhibant mTORC1. Ce mécanisme dépend de la liaison de cette molécule à la protéine FKBP12 (« FK506-binding protein of 12 kDa ») qui stabilise l'interaction entre raptor et mTOR et inhibe l'activité kinase de mTORC1 (377). De nombreuses voies de signalisation sensibles au stress cellulaire régulent aussi l'activité de mTORC1. Par exemple, la présence d'acides aminés induit un signal activant ce complexe protéique. Ce mécanisme repose en particulier sur le transport bidirectionnel de la glutamine par les transporteurs SLCA5 (« solute-linked carrier family A1 member 5 ») et SLC7A5/SLC3A2 (378). En aval, les GTPases de type Rag transduisent un signal activant le complexe mTORC1. La présence de facteurs de croissance est aussi une condition activatrice de ce complexe régulateur. Dans ce cas, la liaison de ces molécules au récepteur à l'insuline active une voie de signalisation contenant des kinases PI3K de type I et la kinase Akt. Un fois activée, cette dernière inhibe le complexe protéique TSC1/2 (« tuberous sclerosis complex 1/2 »), conduisant à l'activation de Rheb (« Ras homolog enriched in brain ») et de mTORC1. Un défaut d'activation de l'ensemble de ces voies de signalisation lors d'une carence en acides aminés ou en facteurs de croissance inhibe l'activité de mTORC1 et active la macroautophagie. Un niveau énergétique faible dans la cellule est aussi un signal activant cette voie autophagique par un mécanisme dépendant de mTORC1. Ce stress cellulaire se traduit par un ratio AMP : ATP intracellulaire

élevé qui active la kinase AMPK (« AMP-activated protein kinase »). Cette kinase active à son tour le complexe TSC1/2 conduisant à inhiber l'activité de Rheb et de mTORC1 (376).

### La voie Beclin-1/VPS34

Une autre voie de régulation de la macroautophagie repose sur un complexe protéique contenant Beclin-1, VSP34 et VSP15 (les orthologues respectifs d'Atg6, Vsp34 et Vsp15 chez les mammifères) (Figure 26). Comme évoqué plus haut, VPS34 est une kinase PI3K de type III qui génère des molécules de PIP3 au niveau de la membrane du phagophore. Ce processus permet le recrutement d'autres protéines Atg participant à l'élongation du phagophore (366). En plus de ces trois membres, ce complexe protéique possède d'autres partenaires qui varient suivant le contexte cellulaire. Une modification des protéines partenaires du complexe Beclin-1/VPS34/VPS15 influent sur l'activité de VPS34 et par conséquent régule la formation des autophagosomes. Certains de ces partenaires ont un effet activateur. C'est le cas par exemple de la protéine Atg14L (l'orthologue d'Atg14 chez les mammifères) qui s'associe à Beclin-1 et VPS34. Dans ce complexe, Atg14L stimule l'activité de VPS34 par un mécanisme dépendant de Beclin-1 (371, 379). Un autre partenaire du complexe Beclin-1/VPS34/VPS15 ayant un effet similaire est la protéine UVRAG. Cette dernière lie Beclin-1 de manière exclusive avec Atg14L et stimule l'activité de VPS34



**Figure 26. Régulation de la formation des autophagosomes par la voie Beclin-1 / VPS34.** Le complexe protéique comportant Beclin-1, VPS34 et VPS15 participe à la formation des autophagosomes. Des partenaires protéiques de ce complexe régulent sa fonction, soit en la stimulant (Atg14L, UVRAG) soit en l'inhibant (Bcl-2, Rubicon). Flèche verte : activation ; flèche rouge : inhibition.

indépendamment de Beclin-1 (371, 380). Comme évoqué plus haut, la protéine UVRAG agit aussi sur l'étape de maturation de la macroautophagie où elle favorise la formation des autolysosomes.

D'autres protéines partenaires du complexe Beclin-1/VPS34/VPS15 ont un effet inhibiteur sur la formation d'autophagosomes. C'est le cas par exemple des protéines anti-apoptotique de la famille de Bcl-2 s'associant à Beclin-1. Alors que cette interaction n'a pas d'effet démontré dans l'apoptose, elle bloque en revanche la formation des autophagosomes en réduisant la liaison de Beclin-1 à VPS34 (381). L'effet de cette interaction sur les autres partenaires protéiques du complexe n'est pas défini. Quelques résultats suggèrent une inhibition de l'association de Atg14L puisque cette dernière n'est pas retrouvée dans le complexe contenant Bcl-2, UVRAG, Beclin-1 et VPS34 (380). De plus, des membres de la famille de Bcl-2 réduisent aussi l'affinité de UVRAG pour Beclin-1 (382). La protéine Rubicon est un autre partenaire inhibant la formation des autophagosomes. Rubicon lie à la fois avec les protéines Beclin-1 et VPS34, empêchant ainsi l'interaction avec Atg14L à ce complexe. En revanche, la formation du complexe Rubicon /Beclin-1/VPS34/VPS15 n'exclut pas l'association de UVRAG à Beclin-1. La protéine Rubicon inhibe la formation d'autophagosomes en réduisant l'activité de VPS34 par un mécanisme indépendant de Beclin-1 (371, 379). Elle a aussi un effet inhibiteur sur la maturation des autophagosomes comme évoqué plus haut.

De nombreuses autres protéines ont été décrites pour interagir avec le complexe Beclin-1/VPS-34/VSP15 et réguler la macroautophagie. Par exemple, PINK1 (« PTEN-induced putative kinase 1 ») impliquée dans le ciblage des mitochondries non-fonctionnelles vers les autophagosomes, interagit directement avec Beclin-1 et stimule la macroautophagie (383). L'engagement de récepteurs de surface tels que CD46 liant de nombreux agents pathogènes induit aussi la formation d'autophagosomes en recrutant la protéine adaptatrice GOPC associée à Beclin-1 (384). Enfin, une nouvelle protéine Atg, Beclin-2, a été identifiée récemment chez les mammifères et possède une grande homologie de séquence et de structure avec Beclin-1. A l'instar de Beclin-1, Beclin-2 joue un rôle dans la régulation de la formation d'autophagosomes en formant un complexe protéique avec VPS34, VPS15 et les autres partenaires variables décrits plus haut. Cependant, contrairement à Beclin-1, Beclin-2 possède

aussi une fonction dans la signalisation cellulaire en contribuant à la dégradation dans le lysosome des protéines G couplées aux récepteurs après stimulation de ces derniers (385).

### Autres voies de signalisation

Il existe d'autres voies de signalisation chez les mammifères régulant la macroautophagie en activant ou inhibant en aval les voies mTOR et Beclin-1/VPS34 (366). De nombreux travaux ont mis aussi en avant l'existence de voies de signalisation agissant indépendamment de ces deux voies régulatrices. C'est le cas, par exemple, lors d'un stress du RE qui active une réponse cellulaire appelé UPR (« unfolded protein response ») induisant la macroautophagie. Lors d'un stress du RE induit par des agrégats polyglutamines, l'induction de la macroautophagie dépend de la phosphorylation du facteur eIF2 $\alpha$  (« eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  ») par la kinase PERK (« protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase »). Le facteur eIF2 $\alpha$  phosphorylé favoriserait la formation des autophagosomes en augmentant directement l'expression du gène *ATG12* (386). Le stress oxydatif est un autre activateur de la macroautophagie et implique la production par la mitochondrie d'espèces réactives de l'oxygène cytotoxiques. Dans ce cas, l'oxydation de Atg4 par ces molécules inhibe son activité protéase et favorise la conversion de LC3-I en LC3-II nécessaire à la formation des autophagosomes (387).

#### 3.1.2.1.3. Fonctions cellulaires

### Dégradation des protéines et des organelles

La macroautophagie joue un rôle central dans l'homéostasie protéique en ciblant les protéines mal structurées vers les lysosomes pour leur dégradation. En effet, en absence de cette voie, des agrégats protéiques s'accumulent au niveau du cytosol de différents types cellulaires (388, 389). Les protéines agrégées sont ubiquitinées, mais leur caractère insoluble empêche leur dégradation par le protéasome. Ces polypeptides sont transportés et regroupés sous forme de structures appelées « aggresome » à proximité du centre organisateur des microtubules. Ce transport dépend de la reconnaissance de l'ubiquitine par HDAC-6 (« histone deacetylase 6 ») et de son interaction avec la dynéine, une protéine-moteur, le long des microtubules (390). Puis, les protéines adaptatrices p62/SQSTM1 (« sequestosome-1 ») et

NBR-1 (« neighbor of BRCA1 gene 1 ») ciblent ces protéines ubiquitinées vers les autophagosomes en interagissant à la fois avec l'ubiquitine et la protéine LC3 (391, 392). La macroautophagie facilite aussi l'élimination des organelles endommagées telles que les mitochondries et le RE. Le ciblage des mitochondries vers cette voie implique deux protéines mitochondriales, BNIP3L (« Bcl2/adenovirus E1B 19 kDa protein interacting protein-like ») et Nix, capables d'interagir directement avec LC3 (393, 394). De plus, ce mécanisme est aussi régulé par la protéine Parkin, une ligase E3 capable d'ubiquitiner des protéines de la membrane externe de la mitochondrie. La reconnaissance ultérieure de ces modifications post-traductionnelles par p62 permet la capture de l'organelle par macroautophagie (395).

### Développement et différenciation

La macroautophagie joue un rôle important dans le développement des mammifères. En effet, son activité est fortement stimulée au stade préimplantatoire, une étape précoce de l'embryogénèse. A ce stade, elle dégrade les ARN messagers et les protéines maternelles, permettant ainsi le développement de l'oocyte (396). Cependant, la plupart des modèles murins de délétions de protéines Atg telles que Atg5 et Atg7 survivent tout au long de l'embryogénèse (389, 397). Cette absence de défaut pourrait s'expliquer par une compensation des fonctions entre plusieurs protéines Atg. En revanche, ces souris meurent prématurément à la naissance par un déficit en nutriments. La macroautophagie est aussi impliquée dans la différenciation de certains types cellulaires. Par exemple, la maturation des érythrocytes requiert une réduction du contenu en mitochondries grâce à leur élimination par macroautophagie. Par conséquent, les souris Atg7<sup>-/-</sup> présentent un défaut d'élimination des mitochondries endommagées dans les érythrocytes à l'origine d'une anémie sévère (398).

### Survie et mort cellulaire

De nombreuses études ont mis en avant un rôle cytoprotecteur de la macroautophagie contribuant à la survie de la cellule. Une preuve de cette fonction est apportée par la délétion spécifique d'Atg5 ou d'Atg7 dans les neurones de souris, qui provoque une neurodégénérescence importante (388, 397). De plus, la macroautophagie permet la survie des cellules épithéliales lors de leur détachement de la matrice extracellulaire (399). La dégradation des agrégats protéiques, des organelles endommagées cytotoxiques ainsi que la

production d'énergie et d'acides aminés grâce à ce mécanisme contribuent à la survie des cellules, en particulier en présence de signaux de stress. De plus, certains effecteurs de l'apoptose comme la caspase-8, sont dégradés par cette voie autophagique, réduisant ainsi la mort cellulaire par ce processus (400). La macroautophagie protège aussi les cellules contre d'autres types de mort cellulaire. Par exemple, des cellules déficientes pour la macroautophagie et pour l'apoptose meurent par nécrose lors d'un stress métabolique, suggérant une inhibition de l'induction de cette mort par l'autophagie (401). Lors d'une infection par la bactérie *Shigella*, la macroautophagie protège également les macrophages contre la mort par pyroptose, une mort cellulaire semblable à la nécrose et dépendante de la caspase-1(402).

De nombreux résultats mettent également en avant une contribution active de la macroautophagie dans la mort cellulaire. Elle peut en effet déclencher l'apoptose, comme par exemple lorsque les glycoprotéines de l'enveloppe du virus de l'immunodéficience humaine interagissent avec le récepteur cellulaire CXCR4. Dans ce cas, la macroautophagie précède l'apoptose des cellules infectées et l'inhibition de cette voie autophagique augmente leur survie (403). Le lien entre la macroautophagie et l'induction d'apoptose est complexe et peut dépendre d'un rôle pro-apoptotique direct de certaines protéines Atg comme Atg5 ou Atg7 (404, 405). La protéine adaptatrice p62 peut aussi stimuler l'apoptose en s'associant et augmentant l'activité de la caspase-8 polyubiquitinée (406). Dans certaines conditions, la macroautophagie peut contribuer à d'autres types de mort cellulaires non apoptotiques. Lorsque l'autophagie a un rôle fonctionnel dans ces processus, on parle même de mort par autophagie, ou ACD (« autophagic cell death »), même si l'existence d'un tel mécanisme reste très discutée (407). Un exemple d'ACD est apporté par les cellules souches neurales de l'hippocampe qui meurent en absence d'insuline sans marqueur d'apoptose. En revanche, elles présentent une activité autophagique importante et l'inhibition de cette voie par la délétion de Atg7 augmente la survie des cellules (408).

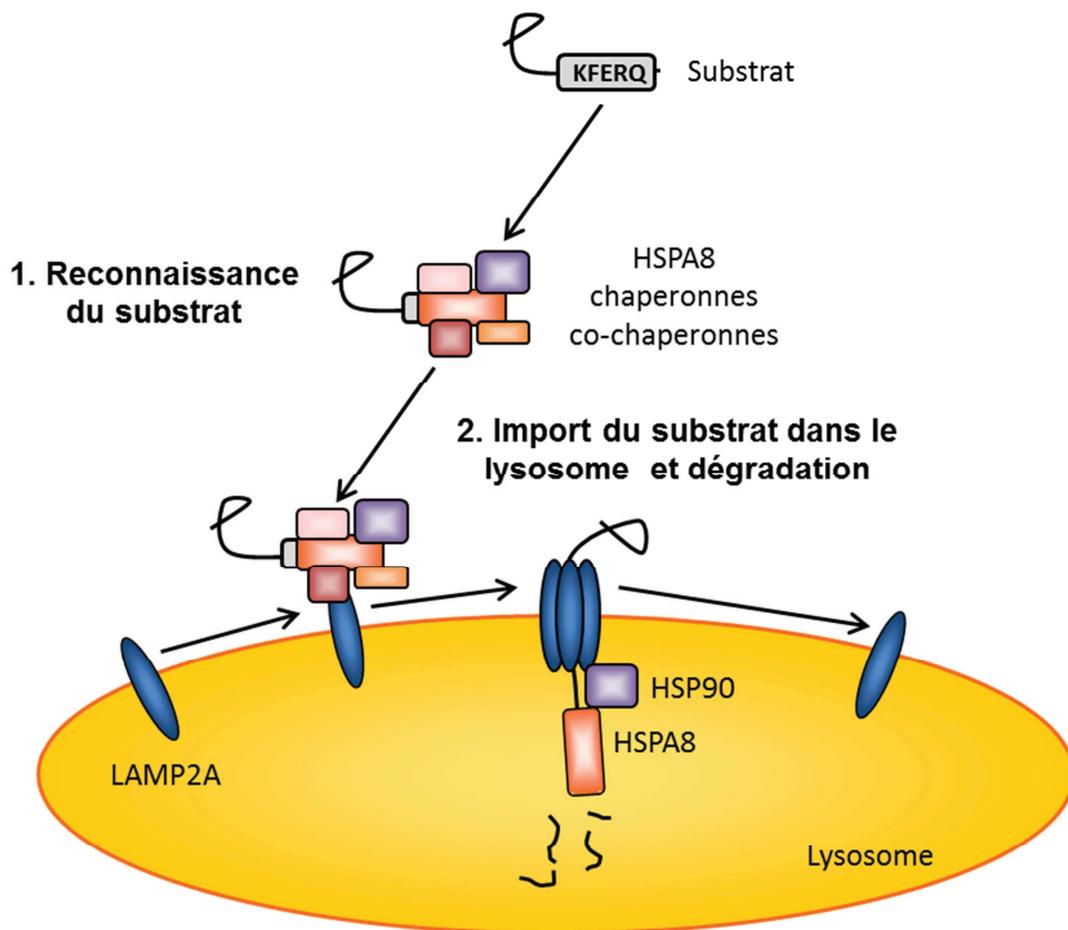
### 3.1.2.2. L'autophagie dépendante des chaperonnes

#### 3.1.2.2.1. Mécanisme

La CMA est une voie autophagique permettant le transfert de substrats protéiques cytosoliques à travers la membrane du lysosome. Les protéines importées sont ensuite dégradées dans la lumière du lysosome par les protéases luminales. Contrairement à la macroautophagie qui cible les protéines à longue durée de vie et ubiquitinées vers le lysosome, la CMA dégrade une sous-population de protéines comportant un motif spécifique dans leur séquence (Figure 27). La CMA est active à l'état basal dans les cellules de mammifères et cette activité est fortement stimulée par de nombreux signaux de stress tels que la carence en acides aminés ou un stress oxydatif (409).

#### Reconnaissance de protéines cytosoliques portant un motif spécifique

Tous les substrats protéiques de la CMA possèdent un motif composé de la séquence KFERQ. Ces cinq résidus, identifiés pour la première fois sur la ribonucléase A, sont nécessaires et suffisants pour cibler une protéine vers la CMA (356, 357). Cependant, ce motif peut modérément varier sur certains substrats de la CMA. Une séquence consensus a été définie, composée d'une glutamine (Q), précédée ou suivie d'une combinaison de quatre résidus : l'un de ces résidus doit être acide (D ou E), un autre doit être basique (R ou K), un troisième doit être hydrophobe (F, I, L ou V) et un quatrième est soit basique, soit hydrophobe. Dans certains cas, le résidu glutamine peut être remplacé par le résidu asparagine (N) (409). Des expériences d'immunoprécipitation avec un anticorps anti-KFERQ ont montré qu'environ 30 % des protéines cytosoliques possèdent ce type de motif (357). L'accessibilité du motif KFERQ sur le substrat protéique est aussi une propriété essentielle pour le ciblage vers la CMA. Bien que certaines protéines possèdent un motif KFERQ non accessible dans leur conformation native, des modifications post-traductionnelles ou des dépliements partiels de ces protéines pourraient favoriser l'exposition du motif. De plus, le nombre de motifs KFERQ présents peut aussi avoir un impact sur le ciblage vers la CMA. C'est le cas par exemple de la protéine MEF2D (« myocyte enhancer factor 2D ») qui est ciblée vers la CMA grâce à trois motifs KFERQ incomplets et chevauchants (410).



**Figure 27. Processus d'import et de dégradation de protéines cytosoliques par la CMA.** Un substrat protéique comportant un motif spécifique KFERQ est reconnu par un complexe de chaperonnes et co-chaperonnes incluant HSPA8. L'association de ce complexe avec le récepteur LAMP2A à la membrane du lysosome provoque l'assemblage de ce dernier en multimères. Le substrat protéique est alors directement transféré à travers la membrane du lysosome. Du côté luminal, la chaperonne HSPA8 est nécessaire à l'import du substrat et la chaperonne HSP90 stabilise le récepteur LAMP2A sous sa forme multimérique. Le substrat est ensuite dégradé et le multimère de LAMP2A est désassemblé en monomères.

Le motif KFERQ est reconnu par la chaperonne cytosolique HSPA8 (358). Cette dernière facilite non seulement l'import du substrat protéique dans le lysosome en interagissant avec le récepteur LAMP2A lysosomal, mais aussi en participant à son dépliement (411). Des expériences d'immunoprécipitation montrent que HSPA8 associée à la membrane lysosomale interagit avec la chaperonne HSP90 et les co-chaperonnes Hip, Hop, BAG1 et HSP40. Chacune de ces protéines est nécessaire à l'import du substrat dans le lysosome (412).

### Import et dégradation du substrat dans le lysosome

L'import du substrat dans le lysosome par la CMA dépend de la protéine transmembranaire lysosomale LAMP2A (359). Cette dernière correspond à l'une des trois isoformes fortement glycosylées codées par le gène *LAMP2* (LAMP2A, LAMP2B et LAMP2C). Ces trois isoformes diffèrent par leur domaine cytoplasmique et seul le domaine cytoplasmique de LAMP2A est capable d'interagir avec les substrats de la CMA. Des expériences de mutagenèse ont permis d'identifier quatre résidus de cette région nécessaires à l'interaction avec le substrat (413). En revanche, l'identité des résidus reconnus dans le substrat reste non définie. L'interaction du substrat avec le récepteur LAMP2A monomérique provoque un assemblage de ce dernier en multimères nécessaire à l'import du substrat dans le lysosome. Il retrouve ensuite une forme monomérique une fois le substrat transféré, grâce notamment à HSPA8 qui contribue à ce désassemblage (414). Le niveau de LAMP2A à la membrane lysosomale est souvent considéré comme le facteur limitant dans la voie CMA. Ainsi, la surexpression de ce récepteur dans les cellules augmente l'activité de la CMA (359).

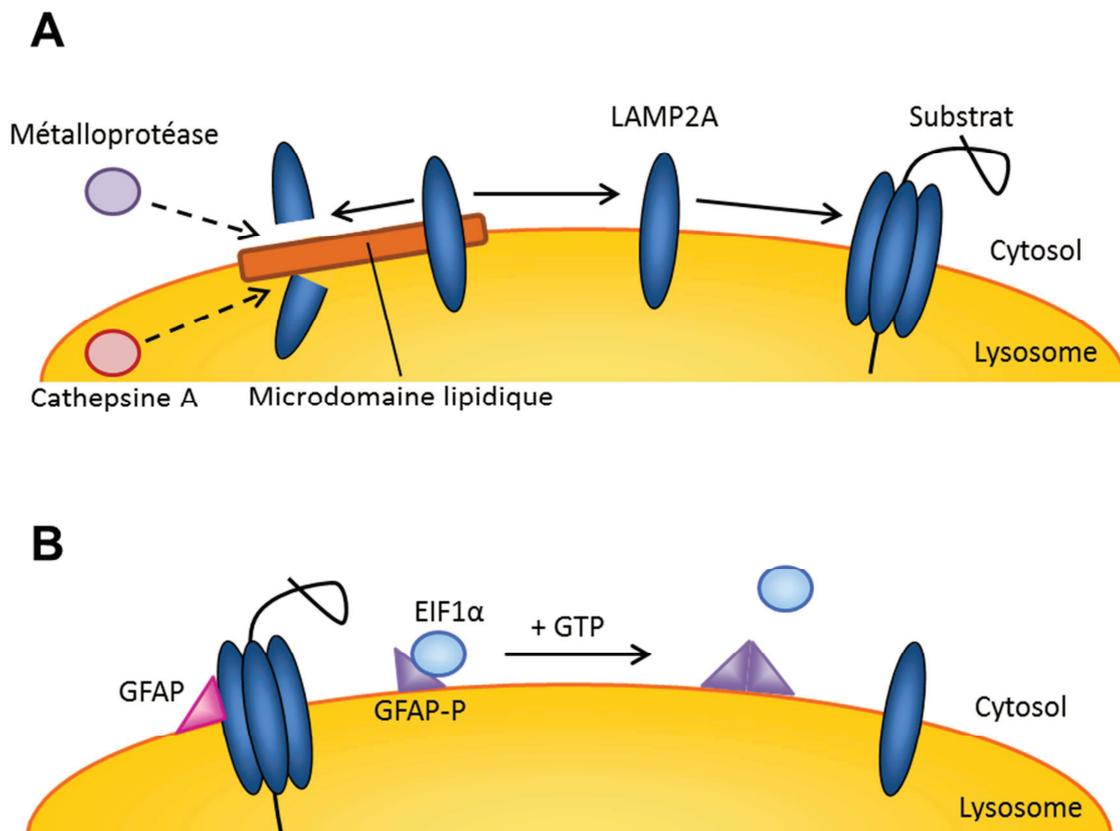
La lumière du lysosome contient aussi un variant de HSPA8 nécessaire à l'import du substrat protéique par la CMA. En effet, l'endocytose d'anticorps anti-HSPA8 inhibe l'activité de la CMA (360). De plus, les lysosomes comportent deux sous-populations qui diffèrent selon la présence ou l'absence de ce variant intralysosomal et seuls les lysosomes contenant HSPA8 sont actifs pour la CMA (415). Bien que le mécanisme sous-jacent ne soit pas connu, des hypothèses suggèrent un rôle actif de la chaperonne intralysosomale en s'associant au substrat et en participant à son transfert à l'intérieur du lysosome. Elle pourrait aussi agir passivement en empêchant un rétro-transfert du substrat vers le cytosol. De manière intéressante, HSPA8 intralysosomale correspond à la forme la plus acide des variants de HSPA8 présents dans le cytosol, avec un pI de 5,3 (360). Cette caractéristique pourrait expliquer sa stabilité dans la lumière acide du lysosome. L'origine de cette isoforme reste cependant inconnue puisque ni le blocage de la CMA (416), ni l'inhibition de la voie macroautophagique (417) ne réduit la quantité de HSPA8 intralysosomale. Par ailleurs, la chaperonne HSP90 est aussi présente dans la lumière du lysosome où elle stabilise la forme multimérique de LAMP2A pendant le transfert du substrat (414).

### 3.1.2.2.2. Régulation

#### Niveau et assemblage de LAMP2A à la membrane lysosomale

La liaison du substrat à LAMP2A est le facteur limitant dans la voie CMA. Par conséquent, une variation du niveau d'expression du récepteur à la membrane lysosomale permet une modification rapide de l'activité de cette voie autophagique sélective. Ce changement peut dépendre d'une synthèse *de novo* du récepteur, par exemple lors d'un stress oxydatif (418). Une étude récente a aussi mis en évidence une augmentation de l'activité de la CMA en présence d'antagonistes du récepteur  $\alpha$  à l'acide rétinoïque (RAR $\alpha$ ) et cet effet s'accompagne d'une surexpression de LAMP2A. Ces résultats suggèrent que RAR $\alpha$  inhibe l'activité de la CMA en diminuant l'expression du gène codant pour le récepteur lysosomal (419). Le niveau de LAMP2A à la membrane lysosomale peut aussi augmenter rapidement grâce au recrutement d'un « stock » de protéines LAMP2A contenues dans la lumière du lysosome. La nature de ces protéines lumineales est inconnue. Cependant des analyses révèlent que celles-ci sont associées à des lipides, suggérant la présence possible de micelles contenant le récepteur à l'intérieur des lysosomes et pouvant fusionner avec la membrane de l'organelle. Ce mécanisme est impliqué dans l'augmentation de l'activité de la CMA lors d'une carence nutritionnelle (420).

L'assemblage de la protéine LAMP2A en multimères à la membrane du lysosome et son désassemblage en monomères sont des processus dynamiques et étroitement régulés. En condition basale, une proportion importante de LAMP2A se localise dans des microdomaines de la membrane du lysosome riches en cholestérol où la protéine est clivée par une métalloprotéase non définie du côté cytosolique et par la cathepsine A du côté luminal. En présence d'un substrat ou lors d'un stress cellulaire activant la CMA, la protéine LAMP2A est exclue des microdomaines lipidiques, permettant sa multimérisation et l'import des substrats de la CMA dans le lysosome (421, 422). Par conséquent, le mouvement du récepteur LAMP2A au sein de la membrane du lysosome participe à la régulation de cette voie (Figure 28 A).



**Figure 28. Régulation de l'assemblage du récepteur de la voie CMA LAMP2A.** A. La protéine LAMP2A monomérique est localisée dans des microdomaines riches en cholestérol où elle est rapidement clivée par la cathepsine A du côté luminal et par une métalloprotéase du côté cytosolique. Lorsque la CMA est activée, la protéine LAMP2A est exclue des microdomaines et s'assemble en multimères permettant le transfert d'un substrat dans le lysosome. B. La protéine GFAP non phosphorylée (notée GFAP) interagit avec la forme multimérique de LAMP2A et la stabilise alors que la forme phosphorylée (notée GFAP-P), en interaction avec EIF1 $\alpha$ , s'associe à la membrane du lysosome. En présence de GTP, EIF1 $\alpha$  est libéré, et GFAP phosphorylé se dimérise. Ainsi, le récepteur LAMP2A se désassemble en monomères ce qui inhibe l'import du substrat dans le lysosome.

La stabilité du récepteur LAMP2A multimérique est aussi modulée par plusieurs facteurs. Par exemple, les protéines cytosoliques GFAP (« glial fibrillary acidic protein ») et EIF1 $\alpha$  (« elongation factor 1  $\alpha$  ») agissent en coopération afin de moduler la quantité de LAMP2A multimérique à la membrane du lysosome. GFAP existe sous deux formes : une forme non phosphorylée en interaction avec LAMP2A et stabilisant la forme multimérique du récepteur ; une forme phosphorylée en interaction avec EIF1 $\alpha$  et qui s'associe à la membrane lysosomale indépendamment de LAMP2A. La présence de guanosine triphosphate (GTP) dissocie le complexe GFAP/EIF1 $\alpha$ , favorisant alors la formation d'homodimères contenant GFAP. Cette dimérisation inhibe la fonction stabilisatrice de GFAP non phosphorylé sur le

complexe LAMP2A. Ce dernier se désassemble alors en monomères, ce qui bloque l'import du substrat par CMA. Par conséquent, la concentration en GTP à proximité de la membrane lysosomale semble être un élément important dans la régulation de l'assemblage du récepteur LAMP2A et de l'activité de la CMA (423) (Figure 28 B).

### Rôle de HSPA8 intralysosomal

Un autre élément limitant l'activité de la CMA est la chaperonne HSPA8 intralysosomale. Nous avons vu plus haut que sa présence et son activité sont nécessaires à l'import du substrat par cette voie autophagique. La quantité de HSPA8 intralysosomale augmente lors d'un stress nutritionnel par un mécanisme non connu (415). La chaperonne n'est pas transférée dans la lumière du lysosome par macroautophagie ou CMA puisque le blocage de ces deux voies ne réduit pas le niveau de HSPA8 intralysosomale (416, 417).

### Rôle de la macroautophagie

Des changements d'activité de la macroautophagie participent aussi à la régulation de la CMA. En effet, les cellules *Atg5<sup>-/-</sup>* déficientes pour la macroautophagie présentent une activité CMA augmentée (417). Inversement, le blocage de la CMA stimule l'activation de la macroautophagie (416). Le mécanisme moléculaire reliant ces deux voies autophagiques reste peu défini. Cependant, il est envisageable que la fusion des autophagosomes avec les lysosomes « dilue » les protons contenus dans le lysosome et provoque une augmentation transitoire du pH luminal. Or le variant de HSPA8 intralysosomale n'est stable qu'à un pH compris entre 5,2 et 5,4 et une augmentation au-dessus de ces valeurs provoque sa dégradation (415). Ainsi, la macroautophagie induirait indirectement une dégradation de la chaperonne dans la lumière du lysosome et réduirait l'activité de la CMA. Cette idée est soutenue par l'augmentation du niveau de HSPA8 intralysosomale dans les cellules *Atg5<sup>-/-</sup>* (417).

### 3.1.2.2.3. Fonctions cellulaires

#### Dégradation des protéines

La capacité de la CMA à transférer certains substrats spécifiques dans le lysosome confère à cette voie un rôle central dans l'élimination des protéines mal structurées en conditions physiologiques ou lors de stress cellulaires. En particulier, l'oxydation des protéines lors d'un stress oxydatif accélère leur dégradation par la CMA. Ce processus repose principalement sur une augmentation de l'activité de la CMA grâce à la surexpression des ARN messagers codant pour LAMP2A. De plus, l'expression de HSPA8 et HSP90 intralysosomales est aussi plus importante (418). Inversement, la réduction de l'activité CMA au cours du vieillissement provoque une accumulation de protéines oxydées dans les tissus de l'organisme, mais leur élimination peut être restaurée par la surexpression de LAMP2A chez la souris (424).

#### Survie cellulaire

A l'instar de la macroautophagie, l'activité CMA favorise la survie des cellules, en particulier lors de stress cellulaires cytotoxiques. Lors d'un stress nutritionnel, la CMA est activée plus tardivement que la macroautophagie et reste maintenue à un niveau élevé pendant toute la durée du stress (425, 426). Ces observations pourraient refléter une stratégie évolutive mise en place par la cellule pour sa survie. En effet, l'utilisation d'une voie autophagique plus sélective à long terme permettrait une production d'acides aminés et d'énergie par la cellule en éliminant certaines protéines non essentielles telles que les enzymes glycolytiques (427) et en conservant d'autres protéines indispensables aux fonctions vitales pour la cellule. La dégradation des protéines endommagées et cytotoxiques par la CMA lors d'un stress cellulaire augmente également la survie des cellules (416, 428).

#### Régulation de l'activité de facteurs de transcription

La CMA est aussi un processus régulant l'expression de certains gènes en dégradant les facteurs de transcription ou des protéines régulant leur activité. C'est le cas, par exemple, d'I $\kappa$ B $\alpha$ , un inhibiteur endogène du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Lors d'un stress nutritionnel, l'oxydation de cette protéine provoque sa dégradation par CMA, permettant la

transcription de gènes spécifiques régulés par NF- $\kappa$ B (429). Par ailleurs, le facteur de transcription Pax2 (« paired box gene 2 ») régulant la prolifération et la différenciation cellulaire est dégradé par la voie CMA. La réduction de l'activité de cette voie autophagique dans les cellules épithéliales rénales en réponse au facteur de croissance EGF (« epidermal growth factor ») provoque une accumulation de Pax2. Ce mécanisme pourrait participer au contrôle de la croissance des cellules tubulaires du rein par l'EGF (430).

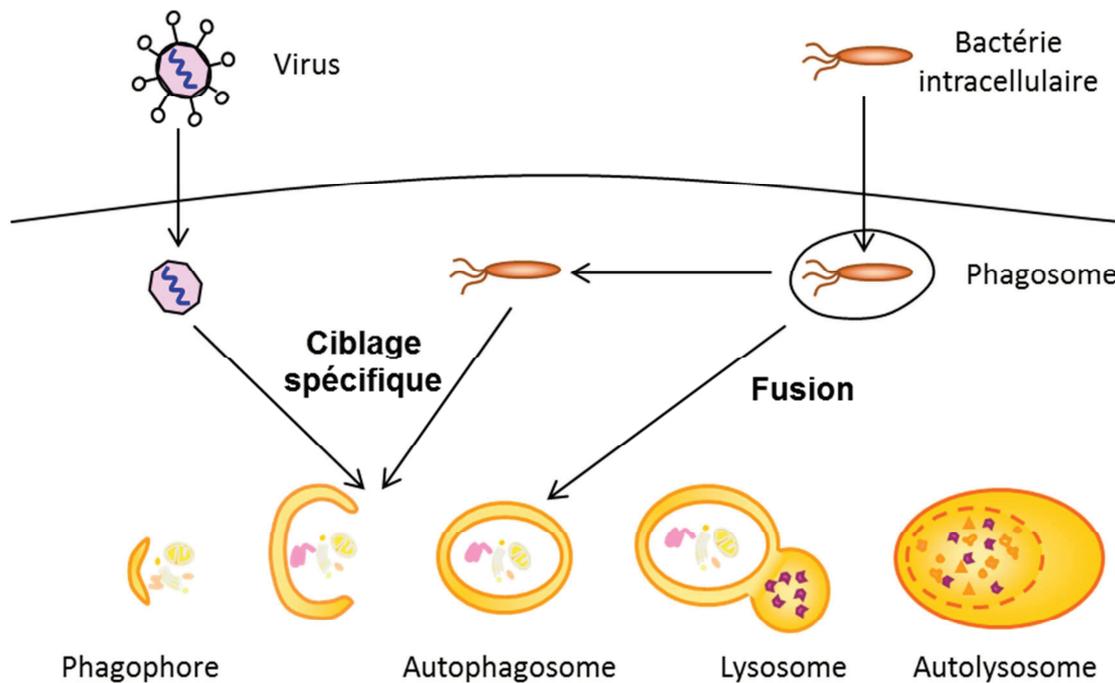
## 3.2. Rôle de l'autophagie dans l'immunité

L'autophagie apparaît comme un mécanisme conservé de survie des organismes en réponse à des signaux de stress. Ces derniers incluent l'infection par des agents infectieux et de nombreuses études parues ces dernières années ont mis en avant un rôle central de l'autophagie dans l'immunité. Chez les mammifères, l'autophagie contribue à l'immunité innée en dégradant des pathogènes intracellulaires et en régulant la production de cytokines. Cette voie est aussi étroitement liée à l'immunité adaptative en participant à la présentation antigénique et en régulant l'ontogénèse des LT et LB. Nous décrirons dans cette partie ces mécanismes immunitaires associés à l'autophagie (principalement la macroautophagie) et nous aborderons sa contribution au développement de pathologies autoimmunes.

### 3.2.1. Implication dans l'immunité innée

#### 3.2.1.1. Dégradation des pathogènes intracellulaires

La macroautophagie constitue un système de défense de la cellule contre les agents pathogènes intracellulaires. En effet, ces derniers peuvent être capturés au sein d'autophagosomes et dégradés après fusion avec le lysosome. On parle dans ce cas de xénophagie (Figure 29). Ce mécanisme est particulièrement efficace dans la lutte contre les bactéries intracellulaires. Par exemple, l'infection de macrophages par les bactéries *Mycobacterium Tuberculosis* provoque leur accumulation dans les phagosomes. Ces vésicules fusionnent avec des autophagosomes, puis évoluent en autolysosomes facilitant l'élimination des bactéries. Ainsi, l'activation de la macroautophagie par privation de sérum ou par la rapamycine réduit la survie de ces agents infectieux (431). Certaines bactéries capables de



**Figure 29. Elimination des agents pathogènes par xénophagie.** Après la capture de bactéries intracellulaires par phagocytose, les phagosomes peuvent fusionner directement avec des autophagosomes, facilitant ainsi l'élimination de ces agents infectieux. Certaines bactéries colonisent le cytosol et sont efficacement ciblées vers les autophagosomes grâce à plusieurs signaux (ubiquitine, diacylglycérol, ...). Certains composants issus de virus sont aussi ciblés vers la machinerie autophagique.

coloniser le cytosol des cellules infectées peuvent aussi être éliminées par la machinerie autophagique. C'est le cas par exemple des bactéries *Streptococcus* de groupe A qui, après endocytose, s'échappent des endosomes et se localisent rapidement au sein d'autophagosomes. Ces derniers, en fusionnant avec les lysosomes, permettent l'élimination des bactéries (432). Le ciblage dans le cytosol des bactéries vers les autophagosomes dépend de l'interaction avec des protéines adaptatrices. Lors de l'infection par *Salmonella Typhimurium*, l'ubiquitination à la surface de la paroi bactérienne permet l'interaction de la protéine adaptatrice p62. Ainsi, les bactéries sont efficacement capturées au sein d'autophagosomes et dégradées (433). NDP52 (« nuclear dot protein 52 ») et l'optineurine sont deux autres protéines adaptatrices qui lient à la fois l'ubiquitine et LC3 et participent ainsi à l'élimination de *Salmonella Typhimurium* (434, 435). Il existe par ailleurs d'autres signaux indépendants de l'ubiquitine impliqués dans le ciblage des bactéries intracellulaires vers la macroautophagie tels que le diacylglycérol et des lectines cytosoliques (436, 437).

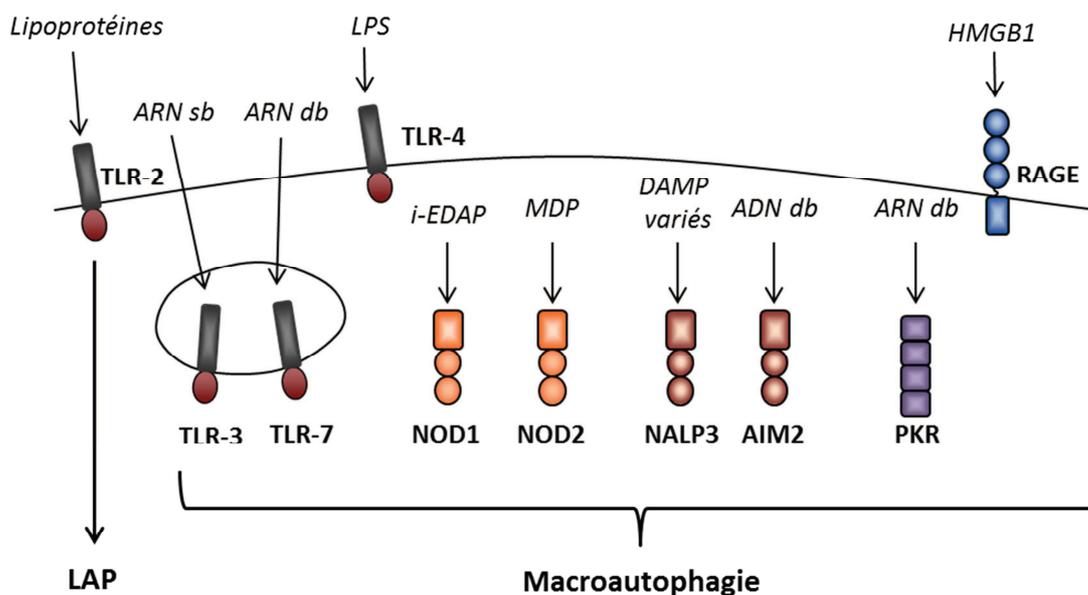
Peu de travaux font état de xénophagie lors d'infections virales. Une seule étude à ce jour a mis en évidence par microscopie électronique la présence de virions à l'intérieur d'autophagosomes dans des cellules infectées par le virus de l'herpès de type 1 (HSV-1) muté capable d'induire la macroautophagie (438). Bien que ce mécanisme aboutisse à la dégradation des virions, l'absence de macroautophagie n'a pas de conséquence sur la réplication du virus (439). Certains composants structuraux des virus peuvent aussi être dégradés par macroautophagie. Par exemple, l'interaction de la capsid du virus *Sindbis* avec la protéine adaptatrice p62 permet son élimination par cette voie. Ce processus est important pour la survie des neurones infectés en réduisant la cytotoxicité provoquée par l'accumulation de la capsid virale (440).

La reconnaissance de molécules issues des bactéries ou des virus par des récepteurs de la cellule-hôte s'accompagne souvent une induction de la macroautophagie. Ce processus est probablement un mécanisme mis en place par la cellule afin d'éliminer rapidement l'agent pathogène dès son entrée. Ces récepteurs comportent de nombreux PRR induisant la formation d'autophagosomes (décrits dans le paragraphe suivant). D'autres récepteurs activent aussi ce processus après reconnaissance d'agents pathogènes. C'est le cas par exemple de la protéine CD46 liant le virus de la rougeole et des bactéries *Streptococcus* du groupe A. L'engagement de l'isoforme CD46-Cyt-1 permet le recrutement de la protéine adaptatrice GOPC qui, en interagissant avec Beclin-1, active la macroautophagie (347).

### 3.2.1.2. Régulation de l'autophagie par l'immunité innée

#### Régulation de l'autophagie par les PRR

La reconnaissance de nombreux PAMP ou DAMP par les PRR constitue une étape importante dans la mise en place de l'immunité innée. Beaucoup de ces récepteurs activent la macroautophagie après stimulation par leurs ligands respectifs (Figure 30). Ce mécanisme concerne la plupart des TLR, en particulier TLR-3, TLR-4 et TLR-7 (441–443) et dépend des deux types de protéines adaptatrices des TLR, MyD88 (« myeloid differentiation primary response 88 ») et TRIF (« TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$  »). Ces protéines recrutent Beclin-1, ce qui dissocie l'interaction de ce dernier avec la protéine Bcl-2 inhibitrice. Par conséquent, le complexe contenant Beclin-1/VPS34/VPS15 induit la



**Figure 30. Activation de la macroautophagie par les PRR.** La stimulation de nombreux PRR par des PAMP ou DAMP (en italique) active la formation d'autophagosomes. De plus, la stimulation de TLR2 peut activer le mécanisme non conventionnel de macroautophagie LAP. *i*-EDAP : acide  $\gamma$ -D-glutamyl-meso-diaminopimelique ; MDP : muramyl dipeptide

formation d'autophagosomes (442). De plus, TRAF6 (« tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 ») est un facteur de signalisation activé en aval de TLR-4 et qui interagit avec Beclin-1, provoquant son ubiquitination. Cette modification post-traductionnelle amplifie le signal stimulant la macroautophagie (443). Par ailleurs, l'engagement des TLR et en particulier de TLR-2, est aussi responsable de l'activation d'un mécanisme non conventionnel de macroautophagie dans les macrophages murins appelé phagocytose associée à LC3 ou LAP (« LC3-associated phagocytosis »). Dans ce cas, la stimulation de TLR-2 à l'intérieur des phagosomes provoque une conjugaison directe de LC3 à la simple membrane des vésicules. La fusion avec des autophagosomes n'est pas requise, mais en revanche ce processus nécessite les protéines Atg5 et Atg7. La conjugaison de LC3 à la surface des phagosomes facilite leur fusion avec le lysosome et la dégradation du contenu (444).

D'autres PRR en plus des TLR sont capables de moduler l'activité autophagique. Deux membres de la famille des NLR, Nod1 et Nod2 stimulent la formation d'autophagosomes après activation en interagissant directement avec la protéine ATG16L1 (445). De plus, l'engagement des membres de l'inflammasome AIM2 et NALP3 stimule aussi la macroautophagie en activant la GTPase Ral1B impliquée dans la formation du phagophore

(446). En revanche NALP4, un autre membre de l'inflammasome, a une fonction inhibitrice sur l'activité de la macroautophagie. En effet, sa stimulation bloque à la fois l'étape d'initiation en interagissant directement avec Beclin-1 et l'étape de fusion des autophagosome avec le lysosome en s'associant avec le complexe VPS de type C (447). Certaines hélicases cytosoliques, en liant des acides nucléiques viraux, modulent aussi la macroautophagie. Par exemple, la liaison d'ARN db à la protéine PKR (« protein kinase regulated by RNA ») active la formation d'autophagosomes par un mécanisme impliquant la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  (448). Enfin, la protéine HMGB1, qui joue le rôle de DAMP dans le milieu extracellulaire, active la macroautophagie sous sa forme réduite en se liant au récepteur RAGE (« receptor for advanced glycation end products »). Ce mécanisme est dépendant de Beclin-1 (449).

### Régulation de l'autophagie par les cytokines

En plus du lien étroit existant entre la stimulation des PRR et l'autophagie, certaines cytokines produites lors d'une réponse immunitaire modulent le flux de macroautophagie en se liant à leur récepteur (Figure 31). En général, les cytokines associées à une réponse immunitaire de type Th1 ont une fonction activatrice sur cette voie. L'exemple le plus connu est l'IFN- $\gamma$  qui provoque une accumulation d'autophagosomes chez la souris par un mécanisme dépendant de la GTPase irgm1 (« immune-related GTPase M member 1 »). L'expression de cette protéine est induite par l'IFN- $\gamma$  et contribue à l'élimination des pathogènes intracellulaires. La surexpression d'irgm1 est suffisante pour activer la macroautophagie et son absence bloque la formation d'autophagosomes en réponse à l'IFN- $\gamma$ . Chez l'homme, bien que l'expression de IRGM (orthologue de irgm1) ne soit pas induite par



**Figure 31. Régulation de la macroautophagie par les cytokines.** Les cytokines plutôt associées à une réponse immunitaire de type Th1 activent la formation d'autophagosomes (en vert) alors que les cytokines associées à une réponse de type Th2 inhibent ce mécanisme (en rouge).

l'IFN- $\gamma$ , cette GTPase est aussi nécessaire à l'induction de la macroautophagie en réponse à cette cytokine (450). Le TNF- $\alpha$  active aussi ce processus en stimulant la voie de signalisation dépendante de la kinase JNK (« Jun kinase ») et en inhibant la voie de signalisation comportant la kinase Akt, ce qui provoque l'expression de Beclin-1 et LC3 (451). Une autre étude met en avant l'activation de la voie de signalisation impliquant les kinases ERK1/2 (« extracellular signal-regulated kinase 1/2 ») dans ce processus (452). D'autres cytokines tels que le TGF- $\beta$ , l'IL-1- $\alpha/\beta$ , l'IL-2 et l'IL-6 stimulent aussi la formation des autophagosomes (453).

D'autres cytokines, principalement associées à une réponse immunitaire de type Th2 ont un effet inhibiteur sur la macroautophagie. L'IL-4 et l'IL-13 par exemple réduisent l'activité de la macroautophagie induite par une carence en nutriments ou par l'IFN- $\gamma$ . Ce mécanisme repose sur l'activation d'une voie de signalisation impliquant Akt pour l'IL-4 et impliquant STAT6 (« signal transducer and activator of transcription 6 ») pour l'IL-13 (454). La macroautophagie induite par un stress nutritionnel est aussi inhibée en présence d'IL-10 par la voie de signalisation dépendante de Akt (455).

### 3.2.1.3. Régulation de l'immunité innée par l'autophagie

L'autophagie, en plus d'être régulée en réponse à des ligands de PRR ou à des cytokines, peut aussi elle-même influencer l'activation de mécanismes immunitaires innés ou moduler certaines voies de signalisation associées. Plusieurs études font état d'une contribution de la macroautophagie dans la stimulation de TLR endosomaux des pDC, à l'origine de la production d'IFN-I. La délétion d'Atg5 dans les pDC infectées par le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) affecte la production d'IFN- $\alpha$  dépendante de TLR-7. Dans ce cas, la macroautophagie permet la capture des molécules d'ARN simple brin viraux dans le cytosol et leur transfert dans des endosomes à la suite d'une fusion autophagosome-endosome. Ce mécanisme aboutit à la stimulation de TLR-7 (456). Une étude récente a aussi suggéré un rôle du mécanisme non conventionnel de macroautophagie LAP dans la production des IFN-I par les pDC. Après endocytose de complexes immuns couplés à l'ADN, TLR-9 est recruté dans les endosomes contenant ces composés. Puis, l'association directe de LC3 à la membrane endosomale contribue à la progression de la vésicule vers des

compartiments tardifs favorables à la stimulation de TLR-9 par l'ADN et à l'induction de l'expression d'IFN- $\alpha$  (457).

Par ailleurs, l'autophagie module aussi certaines voies de signalisation en aval des PRR ou des récepteurs aux cytokines. Elle amplifie par exemple la signalisation en aval du récepteur à l'IFN- $\gamma$ . L'absence de macroautophagie dans ce cas augmente la production d'espèces réactives de l'oxygène qui inactivent STAT1 par un mécanisme dépendant de la phosphatase SHP2 (« Src homology-2 domain-containing phosphatase 2 »). L'IFN- $\gamma$  induisant lui-même la macroautophagie, ce mécanisme participe probablement à une boucle de rétrocontrôle positive (458). En revanche, la macroautophagie réduit la production d'IL-1 $\beta$  en réponse à l'activation de l'inflammasome par deux mécanismes distincts. Tout d'abord, la stimulation des membres AIM2 et NLRP3 induit l'ubiquitination et la dégradation par macroautophagie de la protéine adaptatrice ASC nécessaire pour la production d'IL-1 $\beta$  (446). Ensuite, les espèces réactives de l'oxygène sont capables de stimuler NLRP3. Or, la macroautophagie, en éliminant les mitochondries endommagées par mitophagie, réduit la génération de ces molécules dans le cytosol et limite ainsi l'activation de l'inflammasome (459). Comme évoqué plus haut, la macroautophagie est induite en aval d'AIM2 et NLRP3, il apparaît dans ce cas un mécanisme de rétrocontrôle négatif limitant l'activation de l'inflammasome. La réduction de la quantité d'espèces réactives de l'oxygène intracellulaire par mitophagie diminue aussi le signal induit en aval des RLR lors d'une infection par VSV. Ce processus repose sur une diminution du niveau de la protéine adaptatrice des RLR IPS-1 (« interferon-beta promoter stimulator 1 ») (460).

### 3.2.2. Implication dans l'immunité adaptative

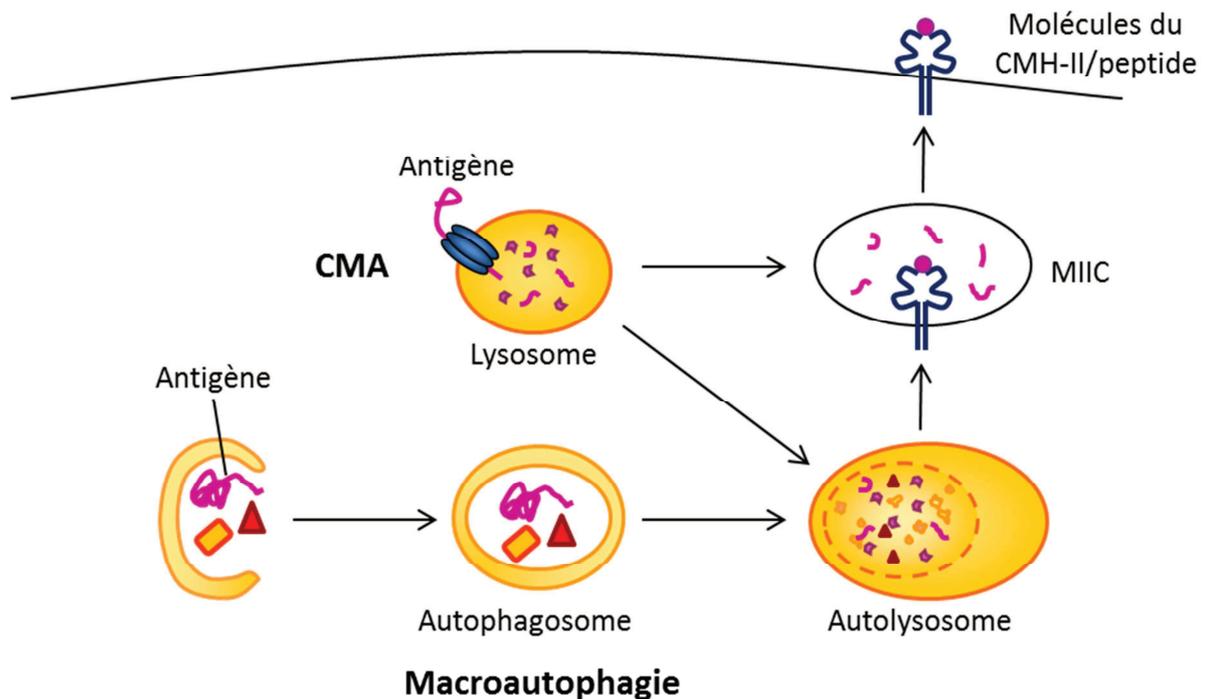
#### 3.2.2.1. Rôle dans la présentation antigénique

##### Rôle dans la présentation d'antigènes par les molécules du CMH-II

La présentation des antigènes par les molécules du CMH-I et du CMH-II est un élément important dans l'initiation et le maintien d'une immunité adaptative permettant l'activation respective des LT CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>. Les premiers travaux sur les mécanismes de

présentation antigénique ont restreint l'origine des antigènes présentés par les molécules du CMH-II à une source extracellulaire. Après endocytose et dégradation dans le lysosome, les peptides générés à partir de ces protéines sont chargés et présentés par les molécules du CMH-II. Cependant, certaines études ont permis de réfuter cette théorie unique et exclusive en mettant en évidence une contribution de l'autophagie dans la présentation d'antigènes endogènes par cette voie. En effet, l'analyse du répertoire peptidique présenté par les molécules du CMH-II d'une lignée lymphoblastoïde B révèle qu'environ 30% des peptides dérivent de protéines cytosoliques ou nucléaires. De plus, cette proportion augmente fortement et spécifiquement lors d'une carence nutritionnelle, suggérant un rôle de l'autophagie dans ce processus (461). Par ailleurs, une fusion continue des autophagosomes et des compartiments MIIC (« MHC class II compartment ») est observée dans les cellules épithéliales et les DC. De plus, il a été observé que la fusion d'un antigène viral MP1 (« matrix protein 1 ») à la protéine LC3 augmente l'activation d'un clone T CD4<sup>+</sup> spécifique de l'antigène (462). L'ensemble de ces résultats suggère donc un mécanisme par lequel la macroautophagie, en capturant des composants cytosoliques et en les ciblant vers le lysosome, génèrent des peptides chargés sur les molécules du CMH-II dans les compartiments MIIC et présentés en surface aux LT CD4<sup>+</sup> (Figure 32).

Le lien entre la macroautophagie et la présentation d'antigènes endogènes par les molécules du CMH-II joue un rôle important dans la tolérance immunitaire centrale des LT CD4<sup>+</sup> dans le thymus. Les cellules épithéliales thymiques (TEC) présentent des antigènes endogènes par les molécules du CMH-II aux thymocytes immatures au cours de la sélection positive (par les TEC corticales) et la sélection négative (par les TEC médullaires). Les TEC corticales et médullaires possèdent un nombre basal d'autophagosomes élevé capables de fusionner avec les compartiments MIIC (463, 464). La délétion d'Atg5 dans le thymus des souris modifie le répertoire des LT CD4<sup>+</sup> périphériques en réduisant la sélection positive des LT CD4<sup>+</sup> immatures mais pas des LT CD8<sup>+</sup>. De plus, ces souris développent une inflammation chronique et systémique, suggérant aussi un défaut de sélection négative des LT CD4<sup>+</sup> à l'origine d'un syndrome autoimmun (463). Cette dernière hypothèse a été confirmée récemment par une étude démontrant une participation de la macroautophagie dans la sélection négative des LT CD4<sup>+</sup> immatures par les TEC médullaires (465). Des travaux ont également mis en évidence un lien entre la macroautophagie et la présentation de peptides citrullinés. En effet, le blocage cette voie autophagique inhibe la présentation constitutive de



**Figure 32. Rôle de l'autophagie dans la présentation d'antigènes endogènes par les molécules du CMH-II.** Des antigènes cytosoliques peuvent être capturés par macroautophagie et être dégradés après formation de l'autolysosome. Aussi, certains antigènes comportant un motif de ciblage vers la CMA sont dégradés par cette voie sélective. Les peptides générés sont chargés sur les molécules du CMH-II dans les compartiments MIIC et présentés en surface de la cellule.

peptides comportant cette modification post-traductionnelle par les molécules du CMH-II à la surface des DC et des macrophages. Un processus similaire est observé dans les LB, mais uniquement après stimulation du BCR (466). La CMA est une voie autophagique participant également à la présentation d'antigènes endogènes par les molécules du CMH-II. En effet, la surexpression du récepteur LAMP2A dans une lignée lymphoblastoïde augmente la présentation aux LT CD4<sup>+</sup> de deux antigènes exprimés le cytosol, GAD65 (« glutamic acid decarboxylase 65 ») et SMA (« smooth muscle antibody »). En revanche, la présentation d'antigènes exogènes n'est pas affectée (467) Dans ce cas, l'import de protéines cytosoliques dans le lysosome par la CMA et leur dégradation génèrent des peptides chargés et présentés par les molécules du CMH-II (Figure 32).

En plus des antigènes du soi, l'autophagie est aussi un mécanisme produisant des peptides dérivés d'agents pathogènes et présentés par les molécules du CMH-II. La première

étude à ce sujet concerne l'antigène viral EBNA1 dans une lignée B infectée par EBV. La protéine EBNA1 est ciblée vers les autophagosomes et le blocage de la macroautophagie réduit l'activation d'un clone T CD4<sup>+</sup> spécifique de l'antigène (468). Par ailleurs, cette fonction de la macroautophagie n'est pas restreinte aux protéines cytosoliques. En effet, la dégradation d'antigènes extracellulaires dérivés d'agents pathogènes et leur présentation par les molécules du CMH-II peuvent aussi dépendre de cette voie autophagique. Par exemple, la délétion conditionnelle d'Atg5 dans les DC de souris infectées par HSV diminue fortement la réponse immunitaire des LT CD4<sup>+</sup>. Cet effet provient d'un défaut de fusion des phagosomes avec le lysosome empêchant la dégradation des antigènes endocytés (469). Une autre étude a aussi mis en évidence que la stimulation de la macroautophagie par la rapamycine dans des macrophages et des DC infectées par des mycobactéries augmente la présentation d'un antigène bactérien aux LT CD4<sup>+</sup>. Dans ce cas, les bactéries phagocytées sont efficacement dirigées par xénophagie vers le lysosome, ce qui génère des épitopes T chargés sur les molécules du CMH-II (470).

#### Rôle dans la présentation d'antigènes par les molécules du CMH-I

Peu de travaux font état d'un rôle de l'autophagie dans la présentation d'antigènes par les molécules du CMH-I aux LT CD8<sup>+</sup>. Une étude a évoqué un mécanisme de ce type lors la présentation de l'antigène viral pUL138 issu de HCMV par une voie indépendante du transporteur TAP. En effet, le blocage de la macroautophagie réduit la présentation de cet antigène aux LT CD8<sup>+</sup>. De plus, ce processus dépend de la dégradation lysosomale, suggérant que la capture d'un antigène cytosolique par macroautophagie pourrait générer des peptides dans le lysosome qui seraient chargés sur les molécules du CMH-I au niveau des endosomes (471). Une autre étude a démontré que l'infection de macrophages par HSV-1 active la macroautophagie et le blocage de cette activation inhibe la présentation d'un antigène virale aux LT CD8<sup>+</sup> dans la phase tardive de l'infection. Ce mécanisme dépend du lysosome, de TAP et du protéasome. Ainsi, dans ce cas, après ciblage et dégradation de l'antigène cytosolique par macroautophagie, les peptides antigéniques seraient exportés du lysosome vers le cytosol, puis importés dans le RE où ils rejoignent la voie classique de présentation par les molécules du CMH-I (472).

La macroautophagie joue également un rôle dans le mécanisme de présentation croisée vis à vis d'un antigène issu de cellules mortes. En effet, une immunisation de souris avec des débris cellulaires dérivés de cellules MEF Bax/Bak<sup>-/-</sup> infectées par le virus *Influenza* induit une réponse immunitaire T CD8<sup>+</sup> antivirale plus efficace que les cellules sauvages. Les cellules MEF Bax/Bak<sup>-/-</sup> sont déficientes pour l'apoptose et meurt avec une activation de la macroautophagie. L'inhibition de l'expression d'Atg5 dans ces cellules réduit l'activation des LT CD8<sup>+</sup> après immunisation, suggérant une contribution importante de la macroautophagie dans les cellules exprimant l'antigène vis-à-vis de la présentation croisée (473). D'autres travaux ont montré qu'un antigène issu de cellules dont la formation d'autophagosomes est bloquée ou augmentée a une capacité respectivement réduite ou accrue d'être présentée par les DC au LT CD8<sup>+</sup>. Cette propriété reposerait sur l'association de l'antigène aux autophagosomes. En effet, après purification à partir des cellules exprimant l'antigène, les autophagosomes ciblent efficacement celui-ci vers les voies de présentation croisée des DC (474).

### 3.2.2.2. Rôle dans la biologie des lymphocytes T

Malgré une altération des mécanismes de sélection positive et négative des LT CD4<sup>+</sup> immature dans le thymus en absence de macroautophagie, la délétion spécifique de cette voie dans les LT n'affecte pas leur développement. En effet, les souris déficientes pour Atg3, Atg5 et Atg7 dans les LT présentent des fréquences normales des différentes populations de thymocytes malgré une diminution modérée du nombre de thymocytes. En revanche, ces délétions réduisent de façon importante la survie des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> en périphérie. L'effet est plus important pour les LT CD8<sup>+</sup> et s'accompagne d'une apoptose accrue des cellules (475–478). La macroautophagie apparaît donc comme un processus important dans l'homéostasie des LT matures. Ce processus est étroitement lié à l'élimination d'organelles dans ces cellules, en particulier des mitochondries par mitophagie. En effet, au cours du développement des LT, la transition du stade de thymocytes simples positifs au stade de LT matures périphériques s'accompagne normalement d'une réduction du contenu mitochondriale. Les LT déficients pour l'autophagie présentent une accumulation de mitochondries en périphérie et une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène. Ces molécules cytotoxiques provoquent un déséquilibre d'expression de facteurs pro- et anti-apoptotiques à l'origine probable de l'apoptose observée (475, 478). Les LT matures

déficients pour l'autophagie présentent aussi une expansion du RE qui affecte leurs fonctions (détaillé plus bas) (475, 479).

La macroautophagie, qui est présente à l'état basale dans les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, est activée par une carence nutritionnelle, par la présence de cytokines et par l'activation du TCR comme décrit plus haut (476, 480). Les voies de signalisation en jeu dans la formation d'autophagosomes par la stimulation du TCR sont peu décrites. La présence d'inhibiteurs des kinases JNK et PI3K bloque l'induction de la macroautophagie (480). Cependant, la délétion de la kinase PI3K de type III VPS34 n'affecte pas ce processus, suggérant l'implication d'autres kinases PI3K (481). Le calcium intracellulaire est aussi un activateur de la formation d'autophagosomes (366), par conséquent la libération de celui-ci au niveau du cytosol en réponse à la stimulation du TCR pourrait induire la macroautophagie par cette voie.

L'activation de la macroautophagie joue un rôle important dans la fonction des LT à différents niveaux. L'expansion du RE observée dans les LT en absence de macroautophagie augmente le stockage du calcium intracellulaire et réduit sa libération dans le cytosol en réponse à une stimulation du TCR (479). Cependant, les LT déficients pour la macroautophagie produisent paradoxalement plus d'IL-2, suggérant un rôle inhibiteur de cette voie autophagique sur l'activation des LT. Cette hypothèse est soutenue par une étude récente montrant que dans les LT effecteurs, mais non naïfs, la stimulation du TCR induit l'ubiquitination de Bcl10. Ce facteur joue un rôle essentiel dans la voie de signalisation activant le facteur de transcription NF- $\kappa$ B en aval du récepteur. Cette modification post-traductionnelle de Bcl10 est reconnue par la protéine adaptatrice p62 et permet sa dégradation par macroautophagie. Par conséquent, l'absence de macroautophagie dans les LT effecteurs provoque une activation accrue de NF- $\kappa$ B (482). En revanche, la délétion d'Atg3 et d'Atg5 dans les LT activés réduit leur prolifération *in vitro*, ce qui semble lié à un déficit énergétique dans ces cellules (475, 476).

### 3.2.2.3. Rôle dans la biologie des lymphocytes B

La macroautophagie est un mécanisme important dans le développement des LB. Dans la moelle osseuse, la délétion d'Atg5 réduit la proportion de LB immatures lors de la transition du stade pro-B au stade pré-B. Ce défaut s'accompagne d'une apoptose accrue des cellules et provoque une forte baisse du nombre de LB matures en périphérie. En revanche, la délétion d'Atg5 ne joue pas de rôle dans la survie des LB naïfs matures excepté pour la sous-population B-1a qui est fortement réduite (483). Par conséquent, l'absence de macroautophagie dans les LB est principalement à l'origine d'un défaut de développement tardif de ces cellules.

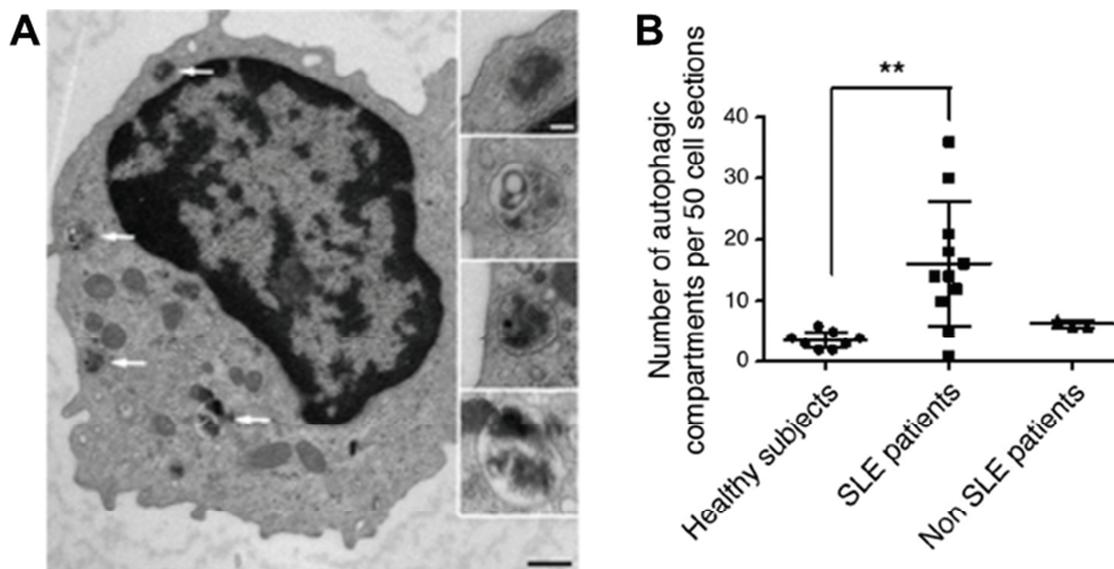
La stimulation du BCR en surface des LB induit un signal activant la macroautophagie. Cette stimulation, sans signal de costimulation, provoque l'apoptose rapide des cellules. Cependant, en présence d'une costimulation de CD40, l'engagement du récepteur BCR n'induit plus la formation d'autophagosomes et s'accompagne d'une survie des cellules (474). Ces résultats suggèrent un lien étroit entre la macroautophagie induite par la stimulation du récepteur BCR et la régulation de la survie des LB après activation. Les voies de signalisation impliquées dans la formation d'autophagosomes en aval du BCR ne sont pas connues, mais pourrait également reposer sur un recrutement du calcium dans le cytosol après stimulation du récepteur. Une autre étude a suggéré un rôle de la macroautophagie dans les LB lors de la costimulation du BCR et de TLR-9 par un antigène contenant de l'ADN (484). En effet, la stimulation du BCR induit une relocalisation de TLR-9 au niveau d'autophagosomes par un mécanisme dépendant de la phospholipase D. De plus, le BCR après internalisation rejoint aussi les autophagosomes. Ainsi, un antigène contenant de l'ADN stimule le BCR, puis après relocalisation dans les autophagosomes, engage TLR-9 ce qui permet une activation accrue des LB. Enfin, une étude a récemment montré un rôle important de macroautophagie dans l'immunité humorale (485). En effet, les plasmocytes présentent une activité basale de macroautophagie élevée. La délétion d'Atg5 dans les LB de souris immunisées par des antigènes T-dépendants et T-indépendants réduit la production d'anticorps. Cette délétion est aussi responsable d'une diminution de la fréquence des plasmocytes à longue durée de vie, spécifiques de l'antigène. Cet effet serait lié à un défaut en ATP et une réduction de leur viabilité au cours de la différenciation plasmocytaire. La

macroautophagie jouerait ainsi un rôle important dans l'homéostasie des plasmocytes en produisant l'énergie nécessaire à la mise en place d'une réponse humorale.

### 3.2.3. Implication dans l'autoimmunité

L'autophagie jouant un rôle important dans l'immunité innée et adaptative, la dérégulation de ce mécanisme pourrait modifier certains mécanismes immunitaires et contribuer au développement de maladies autoimmunes. Quelques études suggèrent une modification de l'activité de macroautophagie dans plusieurs pathologies autoimmunes. Par exemple, l'expression d'Atg5 est augmentée chez la souris au cours de l'EAE et corrèle avec la sévérité de la maladie. Cette protéine est aussi surexprimée chez les patients atteints de sclérose en plaques. L'effet de cette surexpression sur l'activité de la macroautophagie n'a cependant pas été étudié (486).

Dans le LED, des études d'associations pangénomiques ont permis d'identifier deux polymorphismes associés à la pathologie à proximité du gène *ATG5* et dans un intron de celui-ci. Les conséquences sur l'expression protéique d'Atg5 ne sont pas connues (487, 488). Par ailleurs, comparés aux souris et sujets sains, les LT des souris et des patients lupiques possèdent un nombre plus élevé d'autophagosomes, ce qui se traduit par une augmentation de l'activité autophagique. Cette dérégulation, démontré pour la première fois dans notre équipe, n'est pas retrouvé dans d'autres pathologies inflammatoires non lupiques (Figure 33) (489). Une augmentation de l'activité basale de macroautophagie a aussi été rapportée par une étude ultérieure dans les LT CD4<sup>+</sup> naïfs (490). L'origine de cette dérégulation au cours du LED reste peu connue. La voie mTOR, qui inhibe la formation d'autophagosomes est suractivée dans les LT des patients lupiques. Par conséquent, l'augmentation de l'activité de macroautophagie dans les LT au cours de la pathologie n'est pas due à un défaut d'activation de cette voie. D'autres voies de signalisation régulant la macroautophagie pourrait compenser cette activation accrue de mTOR (491). Un mécanisme possible reposerait sur un rôle des autoanticorps produits au cours de la maladie. En effet, les anticorps d'isotype IgG issus de sera de patients lupiques activent fortement la formation d'autophagosomes dans les LT de patients sains. Cependant, les LT de patients lupiques semblent résistants à ce mécanisme, et



**Figure 33. Nombre d'autophagosomes élevé dans les LT d'individus lupiques.** A. Coupe de microscopie électronique à transmission de LT périphériques issus d'individus lupiques. Les flèches blanches désignent les structures correspondant à des autophagosomes agrandies à droite de la photographie. B. Quantification du nombre d'autophagosomes dans les LT périphériques issus du sang d'individus sains, lupiques, ou atteints par d'autres maladies autoimmunes (syndrome de Sjögren et vasculites). SLE : « systemic lupus erythematosus » (485).

ceci pourrait être lié à une activité de macroautophagie déjà maximale dans ces cellules (490). Ainsi, très peu de résultats expérimentaux sur un rôle de l'autophagie dans le lupus ont été rapportés à ce jour.

Grâce à l'avancée des connaissances sur l'autophagie et son rôle dans l'immunité, d'autres hypothèses peuvent être émises quant à son implication dans l'autoimmunité, en particulier au cours du lupus. Etant donné le rôle central de la macroautophagie dans les TEC vis-à-vis de la sélection des LT CD4<sup>+</sup> au cours de leur développement (463, 465), un défaut de ce mécanisme dans certaines pathologies autoimmunes pourrait contribuer à l'émergence de LT CD4<sup>+</sup> autoréactifs en périphérie. De plus, nous avons vu qu'un excès d'apoptose associé à un défaut de clairance des débris apoptotiques est un élément important dans la pathogénèse lupique. Puisque l'autophagie contribue à la survie des cellules ou bien favorise leur mort, une dérégulation de ce mécanisme pourrait provoquer un excès d'apoptose contribuant à la progression de la pathologie. La macroautophagie pourrait aussi réguler la production d'IFN- $\alpha$  au cours du lupus. En effet, nous avons évoqué précédemment qu'après endocytose de

complexes immuns contenant de l'ADN par les pDC, ces composés sont relocalisés en présence de TLR-9 vers des compartiments de type endosomes tardifs grâce au processus non conventionnel LAP. Ce mécanisme permet l'activation de TLR-9 et l'expression d'IFN- $\alpha$  (420). L'étude de ce processus pourrait s'avérer intéressant dans le cas du lupus où les complexes immuns circulants contenant de l'ADN sont en grande partie responsables d'une production importante d'IFN- $\alpha$  par les pDC. Par ailleurs, l'autophagie pourrait aussi participer à la présentation d'autoantigènes endogènes ou exogènes par les molécules du CMH-II, contribuant à l'activation de LT CD4<sup>+</sup> autoréactifs chez les individus lupiques. De plus, le processus LAP pourrait se révéler pertinent dans le cas du lupus en raison de son rôle dans l'élimination efficace des cellules mortes par les macrophages. L'absence de ce mécanisme provoque une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires et une baisse de l'expression de cytokines anti-inflammatoires par les macrophages (492). Chez les individus lupiques, une réduction de ce processus pourrait contribuer au défaut de clairance des corps apoptotiques et à l'activation de l'immunité innée. Enfin, comme évoqué plus haut, la macroautophagie amplifie l'activation des LB en présence d'antigènes contenant de l'ADN grâce à la costimulation du BCR et de TLR-9 (446). Un mécanisme similaire pourrait être observé au cours du lupus où des fragments de chromatine peuvent à la fois stimuler les récepteurs BCR et TLR-9 des LB autoréactifs.

Le lien entre autophagie et autoimmunité est aussi renforcé par les connaissances sur certaines molécules thérapeutiques utilisées pour le traitement du LED et qui agissent sur cette voie ou sont susceptibles de le faire. C'est le cas par exemple de la rapamycine qui induit la macroautophagie en inhibant mTORC1. Ce complexe protéique, en plus de réguler la formation des autophagosomes, est nécessaire à la transduction du signal induit par le TCR. La rapamycine possède des propriétés immunosuppressives en bloquant le signal en aval de ce récepteur. Néanmoins, d'autres effets sur le système immunitaire en lien avec sa capacité d'activer la macroautophagie ne peuvent pas être exclus. L'administration de rapamycine aux souris (NZB/W)F1 et MRL/lpr diminue la production d'autoanticorps, améliore les fonctions rénales et prolonge leur durée de vie (493, 494). Actuellement, un essai clinique de phase II évalue son efficacité thérapeutique chez des patients lupiques sous le nom Rapamune. Nous avons évoqué aussi dans la première partie de l'introduction l'utilisation de l'hydroxychloroquine comme traitement lors des poussées lupiques. Cet agent réduit l'acidité du lysosome et pourrait, comme la chloroquine, réduire le flux autophagique en inhibant la

formation des autolysosomes. Enfin, le phosphopeptide P140 étudié pendant mon doctorat et prochainement évalué en essai clinique de phase III pour le traitement du LED, ralentit aussi le flux autophagique des LB des souris MRL/lpr (193).

## **4. CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE**

Comme décrit plus haut, le LED est une maladie autoimmune polymorphe caractérisée par la production d'autoanticorps pathogènes. La plupart des traitements prescrits aux patients lupiques repose sur des molécules immunosuppressives qui, bien qu'efficaces présentent de nombreux inconvénients liés à leur faible spécificité (toxicité, infections). Depuis quelques années, de nouveaux traitements plus spécifiques sont mis au point afin de cibler certains mécanismes biologiques impliqués dans la pathogénèse lupique, incluant des anticorps monoclonaux ou des peptides thérapeutiques. Ces derniers présentent un intérêt grandissant dans le traitement des maladies autoimmunes grâce à leur faible coût de production par rapport aux anticorps monoclonaux. Certains de ces peptides ont un effet bénéfique en tant que vaccin en générant une réponse humorale dirigée contre une cytokine impliquée dans la progression de la maladie. D'autres peptides sont dérivés d'autoanticorps ou d'autoantigènes avec des mécanismes d'actions variés, incluant par exemple une fonction d'APL capable de moduler la réponse immunitaire des LT. Les caractéristiques et les effets biologiques de ces peptides thérapeutiques pour les maladies autoimmunes sont abordés dans une revue présentée dans le chapitre 1.

Pendant mes travaux de doctorat, je me suis intéressé aux propriétés thérapeutiques du peptide P140 dans le traitement du LED. Comme évoqué plus haut, ce peptide, découvert dans notre laboratoire, est dérivé de la séquence de la protéine U1-70K et comporte une phosphorylation sur le résidu Ser<sup>140</sup>. Son administration aux souris MRL/lpr diminue la sévérité de la maladie et il est actuellement en essai clinique chez l'homme. Initialement, ce peptide thérapeutique avait été décrit comme un APL agoniste partiel capable de se lier à un large panel de molécules du CMH-II et de dévier la réponse des LT CD4<sup>+</sup> vers un profil non-inflammatoire. Cependant, un autre mode d'action du peptide P140 a été mis en évidence avant le début de mon doctorat (191, 193). En effet, le peptide P140 interagit avec la chaperonne HSPA8 à la fois à la surface des splénocytes et au niveau intracellulaire et cette association inhibe l'activité de la chaperonne. Comme évoqué plus haut dans l'introduction, HSPA8 joue un rôle à la fois dans l'homéostasie protéique par autophagie et la présentation d'antigènes. De manière intéressante, le peptide P140 induit *in vitro* un ralentissement du flux de macroautophagie dans les LB des souris MRL/lpr et provoque une déstabilisation des

dimères de molécules du CMH-II dans une lignée lymphoblastoïde humaine. De plus, l'injection *in vivo* du peptide aux souris MRL/lpr provoque une diminution d'expression des molécules du CMH-II en surface des LB spléniques. L'ensemble de ces résultats suggère un mécanisme par lequel le peptide P140 affecterait la présentation d'antigènes endogènes par les molécules du CMH-II en bloquant leur ciblage vers le lysosome par macroautophagie. L'objectif principal de mon projet de thèse a consisté à consolider et compléter ce mécanisme d'action. Pour cela, nous avons étudié le mode d'entrée du peptide P140 dans les LB et son trafic intracellulaire. De plus, nous avons évalué les conséquences de l'interaction du peptide P140 à HSPA8 intracellulaire sur l'association de chaperonnes et co-chaperonnes. Par ailleurs, HSPA8 jouant un rôle central dans la dégradation sélective des protéines par la CMA, nous avons voulu savoir si l'interaction du peptide P140 avec la chaperonne pouvait affecter également cette voie autophagique. Les résultats de ces travaux sont présentés dans le chapitre 2, précédés d'une revue abordant la structure de HSPA8, ses fonctions cellulaires et les différentes molécules chimiques modulant son activité.

Des défauts dans les mécanismes de tolérance centrale et périphérique sont à l'origine de l'émergence de LB et LT autoréactifs au cours du LED. La stimulation du BCR et du TCR de ces cellules par des antigènes du soi provoque alors une réponse autoimmune délétère. Pendant mes travaux de doctorat, nous avons entrepris une analyse comparative du répertoire des LT et des LB des souris MRL/lpr et des souris saines CBA/J afin de déterminer une possible signature de la maladie lupique sur ce répertoire. Pour cela, nous avons analysé à partir des cellules issues de la rate et du sang périphérique la fréquence de réarrangements entre les différents gènes codant pour les segments V et J de la chaîne  $\beta$  du TCR et de la chaîne lourde des immunoglobulines pour le BCR. Ces réarrangements génétiques contribuent en partie à la variabilité des récepteurs TCR et BCR, nous avons pu ainsi comparer la diversité globale du répertoire des LT et LB entre la condition saine et la condition lupique. De plus, nous avons défini en particulier les réarrangements plus fréquents chez la souris MRL/lpr qui marqueraient une signature de la maladie lupique. Nous avons également évalué les conséquences de l'administration du peptide phosphorylé aux souris MRL/lpr sur le répertoire des LT et LB. Les résultats de cette étude sont présentés dans le chapitre 3.