

**ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la vie et de la santé**

**CNRS UPR3572**

**THÈSE** présentée par :

**Lucie AUBERGEON**

soutenue le : **04 mars 2022**

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

Discipline/ Spécialité : Immunologie

**Implication du récepteur co-inhibiteur BTLA dans la régulation de la réponse immunitaire au cours du Lupus Érythémateux Systémique**

**THÈSE dirigée par :**

**Mme MONNEAUX Fanny**

Chargée de recherche, CNRS UPR3572, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mme HILLION Sophie**

MCU-PH, INSERM UMR1227, Université de Bretagne Occidentale

**M. RICHEZ Christophe**

PU-PH, CNRS UMR5164, Université de Bordeaux

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Mme FOURNEL Sylvie**

Professeure, CNRS UMR7199, Université de Strasbourg

**MEMBRE INVITE :**

**Mme DUMORTIER Hélène**

Directrice de recherche, CNRS UPR3572, Université de Strasbourg



## **Remerciements**

*Je tiens à remercier dans un premier temps les membres de mon jury, Dr Sophie HILLION, Pr Christophe RICHEZ et Pr Sylvie FOURNEL qui ont accepté de prendre le temps d'évaluer mon travail de thèse.*

*Je remercie Hélène DUMORTIER pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de l'UPR3572 et au sein de son équipe. Je te souhaite bon courage pour ce nouveau mandat à la tête du labo !*

*Je tiens à remercier particulièrement ma directrice de thèse Fanny MONNEAUX. Merci d'avoir été présente et disponible au cours de ces 4 dernières années et de m'avoir permis de m'élever scientifiquement et personnellement. C'est incroyable comme le temps passe vite. Je me souviens comme si c'était hier de la préparation du concours de l'école doctorale. Aujourd'hui je deviens à mon tour docteur et pourtant je n'ai pas vu le temps passer ! Je te souhaite le meilleur pour le futur, que ce soit au labo ou en dehors !*

*Je remercie également tous les membres de l'équipe passés et présents : Jacques-Eric, Renaud, Cerise, Hayet, Cédric, Lou, Matthieu, Sophia, Romain, Annaïck, Armelle et Léa. Renaud, merci pour ta gentillesse, ta relecture et les prélèvements qui m'ont permis de réaliser une partie de ma thèse. Matthieu, merci de m'avoir si bien accueilli dans l'équipe, de m'avoir donné confiance et l'envie de continuer lorsque je n'étais encore qu'un petit Master 2, tu m'as beaucoup appris ! Hayet, merci pour ta disponibilité et toutes les tâches que tu gères au labo ! Sophia, merci pour ta gentillesse et les bons moments passés avec toi que je garde en mémoire ! Mention spéciale pour toi mon Romain, surtout ne change pas qui tu es ! Tu as aussi été l'un de mes mentors au labo et je ne me rappelle que de bons moments passés avec toi ! Bon je me souviens bien de tes tee-shirts aussi hein x) Annaïck et Armelle, merci d'apporter de la bonne humeur dans l'équipe et d'être toujours venues me chercher pour manger au moment précis où mon ventre grognait le plus ! Je vais tout faire pour qu'on puisse boire un Hugo ensemble le jour de la soutenance je vous le dis ;) Enfin Léa, merci pour ta joie de vivre et ton amitié. Je ne pouvais pas rêver d'un meilleur partenaire de paillasse avec qui chanter et danser sur du HSM devant le Gallios à 23h :D Je te souhaite le meilleur pour ta thèse et j'espère que tu porteras loin notre projet !*

*En plus des membres de l'équipe, il y a aussi les membres du bureau 139 ! Merci à vous Hazel, Zina, Raquel, Léa, et Wacym pour les bons moments passés ensemble ! Wacym, j'espère que tu deviendras un créateur de jeux scientifiques renommé après ta thèse et que tous tes projets farfelus comme « confluence » verront le jour ! Pense à moi pour une collaboration cellulaire-pâtisserie ;)*

*Merci à tous les autres membres de l'unité et des équipes Chris et Alberto que je n'ai pas encore cité dont particulièrement Chris, Vincent (merci pour ton implication lors de mes CST), Isabelle, Ben, Layal, Alice, Astrid, Jean-Daniel, Kim, Lucas, Céline, Chloé, Abdou, Janina, Adrien, Quentin M pour les conseils que vous avez pu m'apporter et les bons moments passés au laboratoire ! Un merci tout particulier aux filles du bureau 153 qui apportent toujours des choses réconfortantes à manger ;) Merci à vous aussi Delphine et Fabien pour votre gentillesse et pour le temps passé à la paillasse ou en dehors du labo ensemble ! Fabien, je te vois déjà me répondre que je ne travaillais pas tant que ça, écoute, ce genre de réponse va me manquer ! Tiens bon Delphine x)*

*Merci également aux membres de « l'équipe 1 », Pauline, Fred, Sophie, Nadège, Sabine, Vincent, Yannick, Quentin F et Damien avec qui j'ai passé le début de ma thèse et avec qui je garde de bons souvenirs.*

*Merci à mes amis Juliette, Claire et Matthieu pour tous les moments où je suis montée m'incruster dans votre bureau pour discuter et me changer les idées ! Mais aussi et surtout, merci pour tous les moments passés en dehors du labo ! Merci à toi Marina, pour tes conseils et ton soutien, je connais peu de gens aussi obstinés et déterminés que toi !*

*A Rym, tu es l'une de mes plus belles rencontres de ces dernières années. Merci pour ta gentillesse et ton soutien au cours de cette folle aventure qu'est la thèse ! Nous sommes rentrées en thèse ensemble, on va en sortir Dr ensemble ! :D Je suis fière de te compter parmi mes amies les plus proches aujourd'hui et j'ai hâte qu'on se raconte les prochaines aventures de nos vies !*

*A mes deux amies les plus fidèles, Camille et Margaux. Camille, ta folie et ta gentillesse ont été d'un support indispensable pour moi ces dernières années ! Tu as bien fait de me faire rentrer dans le clan des BG de LLB il y a bientôt 10 ans dans ce fameux bus ;) Margaux, j'ai envie de dire que toi aussi, ta folie et ta gentillesse ont été très précieuses tout au long de la thèse ! Tu*

*sais comment me redonner confiance en moi au détour d'un snap ou d'un petit message de thésarde désespérée. Je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse et je suis impatiente que l'on vive de nouvelles aventures en Haute-Saône, dans le Haut-Doubs ou ailleurs... toutes les trois !*

*A ma mamie, Marco, Jacquot, mes parents, ma sœur Julie et mon frère Nico. Merci pour le soutien et la confiance que vous m'avez donné au quotidien pour en arriver jusque-là ! Julie, merci pour tes remarques amusées sur le fait qu'une intro de 100 pages ce n'est plus vraiment une intro finalement si ?*

*Enfin, merci à toi Quentin. Tu es le pilier le plus fort sur lequel j'ai pu m'appuyer depuis plus de 3 ans. Tu sais toujours me faire rire et me redonner le sourire, et surtout, tu arrives à supporter ma folie au quotidien depuis tout ce temps ! J'ai hâte de savoir ce que l'avenir nous réserve et de vivre les prochaines étapes de ma vie à tes côtés.*



## **INTRODUCTION .....**.....**1**

### **A) Le lupus érythémateux systémique .....**.....**5**

I)	Historique du lupus : de la description d'une atteinte cutanée au Moyen Âge à la définition d'une maladie auto-immune systémique du 20 <sup>ème</sup> siècle.....	5
II)	Épidémiologie.....	6
1)	Incidence et prévalence.....	6
1.1.	En France.....	6
1.2.	Dans le monde : impact de l'ethnicité dans le développement du lupus .....	7
2)	Le ratio Femme/Homme et l'âge de diagnostic .....	8
3)	Mortalité.....	8
III)	Manifestations cliniques .....	9
1)	Diagnostic et critères de classification .....	9
2)	Symptômes cliniques.....	11
2.1.	Manifestations cutanées et articulaires.....	11
2.2.	Atteintes rénales .....	12
2.3.	Atteintes neurologiques.....	12
2.4.	Atteintes pulmonaires et cardiaques .....	13
2.5.	Atteintes vasculaires .....	13
2.6.	Atteintes hématologiques et sérologiques .....	14
3)	Scores d'activité.....	14
IV)	Étiologie du lupus .....	16
1)	Les facteurs génétiques .....	16
1.1.	Gènes de susceptibilité .....	16
1.2.	Le rôle de l'épigénétique .....	19
2)	Les facteurs environnementaux .....	20
2.1.	Les rayonnements ultraviolets (UV).....	21
2.2.	Le tabagisme .....	22
2.3.	Les agents polluants.....	22
2.4.	Les agents infectieux.....	23
2.5.	Les hormones .....	23
2.6.	Lupus induit par les médicaments .....	23
V)	Traitements du lupus .....	24
1)	Anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	24
2)	Glucocorticoïdes .....	25
3)	Antipaludéens de synthèse .....	25
4)	Immunosuppresseurs .....	25
4.1.	Cyclophosphamide.....	25
4.2.	Méthotrexate .....	26
4.3.	Mycophénolate mofétil .....	26
4.4.	Azathioprine .....	26
4.5.	Ciclosporine .....	26
5)	Biothérapies.....	27
5.1.	Rituximab (anti-CD20) .....	28
5.2.	Belimumab (anti-BLyS/BAFF) .....	28
5.3.	Anifrolumab (anti-IFNAR1).....	29
5.4.	Nouvelles biothérapies en développement .....	29
VI)	Modèles murins de lupus .....	31
1)	Modèles spontanés .....	31
1.1.	NZB/W F1 .....	31

1.2.	NZM.....	32
1.3.	MRL/lpr .....	33
1.4.	BXSB/Yaa .....	33
1.5.	Modèle DNASE1L3-KO .....	35
2)	Modèles induits .....	35
2.1.	Modèle induit au pristane.....	35
2.2.	Modèle induit au resiquimod/imiquimod.....	36
2.3.	Modèle de la maladie du greffon contre l'hôte .....	36
3)	Modèles humanisés.....	36
3.1.	Greffe de PBMC de patients lupiques dans des souris SCID .....	36
3.2.	Greffe de cellules souches hématopoïétiques humaines dans des souris NSG suivie d'induction au pristane .....	37
4)	Exemples d'avancées thérapeutiques générées grâce au modèle murin NZB/W F1 .....	37

## **B) Les acteurs de la réponse auto-immune ..... 40**

I)	Rupture de tolérance et développement de l'auto-immunité.....	40
1)	Rupture de tolérance.....	40
2)	Défaut de l'apoptose et de la clairance apoptotique .....	40
3)	Dépôts de complexes immuns et implication du complément.....	43
II)	Dérégulation de l'activation du système immunitaire inné .....	43
1)	Cellules dendritiques conventionnelles.....	44
2)	Cellules dendritiques plasmacytoïdes .....	44
3)	TLR et IFN de type I.....	45
4)	Macrophages .....	47
III)	Dérégulation de l'activation du système adaptatif .....	48
1)	Anomalies des LT .....	48
2)	Anomalies des LB.....	54
3)	Les molécules régulatrices impliquées dans la pathogénèse lupique .....	60

## **C) Le récepteur co-inhibiteur BTLA ..... 64**

I)	Structure et expression de BTLA et de son ligand HVEM .....	64
1)	Structure de BTLA.....	64
2)	Expression de BTLA.....	65
2.1.	Sur les populations lymphoïdes .....	65
2.2.	Sur les populations myéloïdes .....	66
3)	Interaction entre BTLA et HVEM .....	66
3.1.	Expression de HVEM .....	66
3.2.	Ligands de HVEM .....	67
II)	Fonction de BTLA.....	69
1)	Mécanisme d'action .....	69
2)	Rôle fonctionnel de BTLA dans l'immunité innée.....	71
3)	Rôle fonctionnel de BTLA dans les LT .....	72
4)	Rôle fonctionnel de BTLA dans les LB .....	73
III)	BTLA dans les pathologies .....	74
1)	Hypersensibilités : allergies et asthme .....	74
2)	Transplantations et rejets de greffe .....	74
3)	Réponses anti-virales.....	75
3.1.	VIH.....	76
3.2.	Hépatite .....	76

3.3.     SARS-CoV-2 .....	77
4)     Réponses antiparasitaires et antibactériennes .....	77
4.1.     Paludisme.....	77
4.2.     Infections bactériennes.....	77
4.3.     Choc sceptique .....	78
5)     Cancer.....	79
6)     Auto-immunité .....	81
 <b>D) Contexte et objectifs de l'étude.....</b>	<b>85</b>
 <b>RESULTATS .....</b>	<b>87</b>
 <b>CHAPITRE 1 : Expression de BTLA par des populations lymphocytaires impliquées dans la pathogénèse du LES .....</b>	<b>89</b>
I)     Avant-propos.....	91
II)    Expression de BTLA par les T <sub>FH</sub> et les Tregs de patients lupiques : PUBLICATION N°1 .....	93
III)   Expression de BTLA par les LB .....	94
1)    Expression de BTLA par les LB d'individus sains .....	94
2)    Expression de BTLA par les LB de patients lupiques.....	96
3)    Expression de BTLA par les LB DN .....	97
4)    Caractérisation phénotypique de la population LB DN BTLA <sup>low</sup> .....	103
5)    Expression de HVEM par les LB .....	108
6)    Fonctionnalité de BTLA dans les LB d'individus sains .....	109
IV)   Régulation de l'expression de BTLA .....	111
V)    Conclusion .....	114
 <b>CHAPITRE 2 : BTLA, cible thérapeutique dans le LES ?.....</b>	<b>118</b>
I)     Avant-propos.....	120
II)    Implication de BTLA dans la pathogénèse lupique chez la souris NZB/W : de l'analyse phénotypique et fonctionnelle au ciblage thérapeutique : PUBLICATION N°2 .....	122
III)   Commentaires relatifs à la publication n°2 et résultats complémentaires .....	124
1)    Expression et fonction de BTLA <i>in vitro</i> .....	124
2)    Évaluation du potentiel thérapeutique du ciblage de BTLA <i>in vivo</i> .....	129
 <b>DISCUSSION.....</b>	<b>144</b>
 <b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>162</b>
 <b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES .....</b>	<b>200</b>
I)     Publications scientifiques .....	202

II)	Communications orales.....	202
III)	Posters.....	202

## ABREVIATIONS

<b>ABC</b> : Aged-associated B Cells	<b>GWAS</b> : Genome-wide association studies
<b>ACR</b> : American college of rheumatology	<b>HCQ</b> : Hydroxychloroquine
<b>ADCC</b> : Antibody-dependent cellular cytotoxicity	<b>HDAC</b> : Histones déacétylases
<b>ADN</b> : Acide désoxyriboNucléique	<b>HVEM</b> : Herpes virus entry mediator
<b>AINS</b> : Anti-inflammatoires non stéroïdiens	<b>HSV</b> : Virus Herpes Simplex
<b>ANA</b> : Anticorps anti-nucléaires	<b>IFN</b> : Interféron
<b>APS</b> : Antipaludéens de synthèse	<b>IFNAR</b> : Récepteur des IFN de type I
<b>auto-Ac</b> : Auto-anticorps	<b>Ig</b> : Immunoglobuline
<b>BAFF</b> : B-cell activating factor	<b>IL</b> : Interleukine
<b>BCMA</b> : B-cell maturation antigen	<b>IRF</b> : Interferon regulatory factors
<b>BCR</b> : B-cell receptor	<b>ITIM</b> : Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
<b>BILAG</b> : British isles lupus assessment group index	<b>ITSM</b> : Immunoreceptor tyrosine-based switch motif
<b>Bregs</b> : Lymphocytes B régulateurs	<b>JAK</b> : Janus kinase
<b>BTLA</b> : B and T lymphocyte attenuator	<b>LB</b> : Lymphocyte B
<b>CD</b> : Cluster de différenciation	<b>LES</b> : Lupus érythémateux systémique
<b>CMV</b> : Cytomégavirus	<b>LIGHT</b> : Lymphotoxin-like, exhibits inducible expression, and competes with HSV gD for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes
<b>CPA</b> : Cellule présentatrice d'antigène	<b>LT</b> : Lymphocyte T
<b>CRD</b> : Cystein-rich domains	<b>LT<math>\alpha</math></b> : Lymphotoxine- $\alpha$
<b>CQ</b> : Chloroquine	<b>MAI</b> : Maladie auto-immune
<b>CTLA-4</b> : Costimulatory molecule cytotoxic T T lymphocyte associated Antigen 4	<b>MBL</b> : Mannose-binding lectin
<b>DAMPs</b> : Damage-associated molecular patterns	<b>miR</b> : micro-ARN
<b>db</b> : double brin	<b>NB-DNJ</b> : N-butyl-deoxynojirimycin
<b>DC</b> : Cellule dendritique	<b>NET</b> : Neutrophil Extracellular Traps
<b>DN</b> : Double négatif	<b>NZB/W</b> : NZB x NZW F1
<b>EAE</b> : Encéphalomyélite auto-immune expérimentale	<b>OLS</b> : Organes lymphoïdes secondaires
<b>EBV</b> : Virus d'Epstein-Barr	<b>PAMPs</b> : Pathogen-Associated Molecular Patterns
<b>EULAR</b> : European league against rheumatism	<b>PB</b> : Plasmablaste
<b>FDA</b> : Food and drug administration	<b>PBMC</b> : Cellules mononucléées du sang Péphérique
<b>FDC</b> : Cellule dendritique folliculaire	<b>pDC</b> : Cellule dendritique plasmacytoïde
<b>GC</b> : Centre germinatif	<b>PL</b> : Plasmocyte
<b>GCC</b> : Glucocorticoïdes	<b>PR</b> : Poliarthrite rhumatoïde
<b>GVHD</b> : Graft-versus-host disease	

**PRR** : *Pattern-recognition receptors*

**SAPL** : Syndrome des anti-phospholipides

**sb** : simple brin

**SEP** : Sclérose en plaques

**SLEDAI** : *Systemic lupus erythematosus*

*disease activity index*

**SLICC** : *Systemic lupus international*

*collaborating clinics*

**SS** : Syndrome de Sjögren

**TACI** : *Transmembrane activator and*

*calcium modulator ligand Interactor*

**TCR** : *T-cell receptor*

**TFH** : LT folliculaires *helper*

**TFR** : LT folliculaires régulateurs

**TLR** : *Toll-like receptor*

**Th** : Lymphocyte T *helper*

**TNF** : *Tumor necrosis factor*

**Tregs** : Lymphocyte T régulateurs

**UV** : Ultraviolets

**VIH** : Virus de l'immunodéficience humaine

## **LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES**

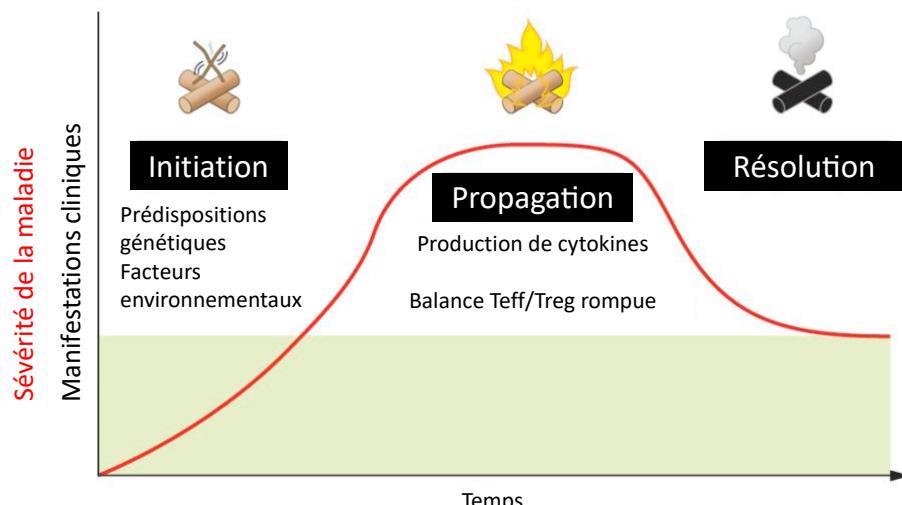
<b><u>TABLEAU 1.</u></b> Liste des anticorps utilisés pour l'analyse des LB humains .....	94
<b><u>TABLEAU 2.</u></b> Caractéristiques cliniques et biologiques des patients lupiques inclus dans notre étude .....	100
<b><u>FIGURE 1.</u></b> Les trois phases principales d'évolution des MAI.....	3
<b><u>FIGURE 2.</u></b> Carte de l'incidence du LES en fonction des pays pour 100 000 habitants.....	7
<b><u>FIGURE 3.</u></b> Carte de la prévalence du LES en fonction des pays pour 100 000 habitants.....	8
<b><u>FIGURE 4.</u></b> Critères de classification du LES proposés par L'ACR en 1982 et mis à jour en 1997. ....	9
<b><u>FIGURE 5.</u></b> Nouveaux critères EULAR/ACR de classification du LES publiés en 2019.....	10
<b><u>FIGURE 6.</u></b> Manifestations cliniques du lupus.....	11
<b><u>FIGURE 7.</u></b> Indice d'activité du LES, méthode de calcul du SLEDAI. ....	15
<b><u>FIGURE 8.</u></b> Les gènes de susceptibilité du LES.....	16
<b><u>FIGURE 9.</u></b> Les facteurs extrinsèques impliqués dans le développement du lupus. ....	21
<b><u>FIGURE 10.</u></b> Nouvelles stratégies thérapeutiques du LES. ....	27
<b><u>FIGURE 11.</u></b> Caractéristiques des modèles murins spontanés de lupus. ....	34
<b><u>FIGURE 12.</u></b> Aperçu des voies immunologiques menant au LES. ....	42
<b><u>FIGURE 13.</u></b> Rôle des pDC et des IFN de type I dans le LES. ....	47
<b><u>FIGURE 14.</u></b> Signalisation du TCR chez les individus sains et les patients lupiques. ....	49
<b><u>FIGURE 15.</u></b> Origines potentielles des LB mémoires DN. ....	56
<b><u>FIGURE 16.</u></b> Liste non exhaustive des différentes populations de Bregs retrouvées chez l'Homme et la souris et leur implication dans diverses pathologies.....	58
<b><u>FIGURE 17.</u></b> Les récepteurs co-activateurs et co-inhibiteurs impliqués dans la pathologie lupique. ....	63
<b><u>FIGURE 18.</u></b> Structure de BTLA.....	64
<b><u>FIGURE 19.</u></b> Interaction de HVEM avec ses différents ligands. ....	67
<b><u>FIGURE 20.</u></b> Interaction entre BTLA et HVEM. ....	69
<b><u>FIGURE 21.</u></b> Mécanisme d'action de BTLA. ....	70
<b><u>FIGURE 22.</u></b> Le blocage de BTLA induit la prolifération des LT CD8 <sup>+</sup> spécifiques des cellules tumorales. ....	80
<b><u>FIGURE 23.</u></b> Implication de BTLA dans diverses pathologies. ....	84
<b><u>FIGURE 24.</u></b> Expression de BTLA par les différentes sous-populations de LB chez l'individu sain. ....	95
<b><u>FIGURE 25.</u></b> Diminution de l'expression de BTLA à la surface des LB de patients lupiques.....	96
<b><u>FIGURE 26.</u></b> La distribution des sous-populations de LB est altérée chez les patients lupiques.....	97
<b><u>FIGURE 27.</u></b> Mise en évidence d'une sous-population BTLA <sup>low</sup> parmi les LB DN. ....	98
<b><u>FIGURE 28.</u></b> La population BTLA <sup>low</sup> est particulièrement retrouvée chez les patients présentant des auto-anticorps anti-ADN .....	99
<b><u>FIGURE 29.</u></b> L'expression de BTLA n'est pas influencée par les différents traitements ni par l'âge des patients	101
<b><u>FIGURE 30.</u></b> Le défaut d'expression de BTLA par les LB DN n'est pas dû à un défaut traductionnel.....	102
<b><u>FIGURE 31.</u></b> Les LB DN BTLA <sup>low</sup> ont un phénotype de cellules activées et expriment des IgG intracellulaires. ....	103
<b><u>FIGURE 32.</u></b> Les LB DN BTLA <sup>low</sup> ne semblent correspondre ni aux cellules DN1 ni aux cellules DN2 décrites dans la littérature.....	105
<b><u>FIGURE 33.</u></b> L'expression de BTLA est faible à la surface des DN CD19 <sup>int</sup> CXCR5 <sup>-</sup> CD11c <sup>-/int</sup> . ....	106
<b><u>FIGURE 34.</u></b> Les cellules DN BTLA <sup>low</sup> présentent des caractéristiques de cellules sécrétrices d'anticorps. ....	107
<b><u>FIGURE 35.</u></b> L'expression de HVEM est similaire à la surface des LB d'individus sains et de patients lupiques. ....	109
<b><u>FIGURE 36.</u></b> Un anticorps agoniste de BTLA n'induit pas d'inhibition de l'activation des LB.....	111
<b><u>FIGURE 37.</u></b> Cinétique d'expression de BTLA par les LB après stimulation. ....	112
<b><u>FIGURE 38.</u></b> La concentration en HVEM soluble est identique chez les individus sains et les patients lupiques. ....	113
<b><u>FIGURE 39.</u></b> HVEM et BTLA sont exprimés de façon similaire par les monocytes d'individus sains et de patients lupiques. ....	114
<b><u>FIGURE 40.</u></b> La fréquence des LB DN est corrélée à la fréquence des aTregs chez les patients lupiques.....	115
<b><u>FIGURE 41.</u></b> La dérégulation de l'expression de BTLA semble impliquée dans la pathogénèse lupique. ....	117
<b><u>FIGURE 42.</u></b> La distribution des populations lymphocytaires est modifiée chez les souris NZB/W âgées.....	125
<b><u>FIGURE 43.</u></b> Les PL de souris NZB/W âgées expriment plus faiblement BTLA que les LB FO. ....	126
<b><u>FIGURE 44.</u></b> Les LT CD4 <sup>+</sup> effecteurs/mémoires de souris NZB/W âgées ne s'activent pas efficacement. ....	127
<b><u>FIGURE 45.</u></b> La fonctionnalité de BTLA n'est pas altérée chez les souris NZB/W jeunes. ....	128
<b><u>FIGURE 46.</u></b> La fréquence des LT ne semble pas modifiée chez les souris ayant reçu l'anticorps anti-BTLA.....	130
<b><u>FIGURE 47.</u></b> La fréquence des Tregs n'est pas modifiée par le traitement anti-BTLA.....	131

<b>FIGURE 48.</b> L'administration de l'anticorps anti-BTLA induit une déplétion partielle des LB et la diminution de l'expression de BTLA par les LB.....	132
<b>FIGURE 49.</b> L'administration de l'anticorps anti-BTLA induit l'augmentation de la fréquence des LB du centre germinatif .....	133
<b>FIGURE 50.</b> La fréquence des PL n'est pas modifiée dans la rate des animaux traités.....	134
<b>FIGURE 51.</b> L'administration de l'anticorps anti-BTLA n'induit pas de diminution de la production d'auto-anticorps dans le sérum.....	134
<b>FIGURE 52.</b> Le titre en auto-anticorps anti-ADNdb reste stable chez les souris NZB/W traitées par l'anticorps anti-BTLA.....	135
<b>FIGURE 53.</b> La fréquence des PL semble diminuer dans les reins de souris NZB/W traitées par l'anticorps anti-BTLA.....	136
<b>FIGURE 54.</b> La souris 129 ne semble pas avoir réagi au traitement.....	137
<b>FIGURE 55.</b> La souris 129 ne voit pas son expression de BTLA par les LB diminuer dans les OLS.....	138
<b>FIGURE 56.</b> La souris 129 traitée par l'anticorps anti-BTLA présente une atteinte rénale plus importante que les autres souris du même groupe.....	139
<b>FIGURE 57.</b> L'expression de BTLA par des splénocytes incubés en présence du clone 6F7 est détectable par le clone 8F4.....	141
<b>FIGURE 58.</b> L'administration de forte quantité d'anticorps 6F7 induit une diminution de la fréquence des LB.....	142
<b>FIGURE 59.</b> Les LB DN BTLA <sup>low</sup> sont-ils impliqués dans une réponse extra-folliculaire au cours du LES ?.....	149
<b>FIGURE 60.</b> Mécanismes d'action potentiels de l'anticorps anti-BTLA 6F7 <i>in vivo</i> .....	158

# **INTRODUCTION**



Les maladies auto-immunes (MAI) font référence à un groupe hétérogène de plus de 80 pathologies différentes qui se développent lorsque le système immunitaire attaque les cellules de l'hôte, ses tissus ou ses organes. Bien qu'elles soient souvent considérées comme rares, elles représentent la troisième catégorie de maladies les plus fréquentes aux États-Unis après les cancers et les maladies cardiovasculaires en touchant 5% à 8% de la population générale (**La Cava, 2015**). Les MAI varient de par les organes affectés et les manifestations cliniques qui en résultent. En effet, elles peuvent être spécifiques d'organes ou systémiques. Malgré ces différences, toutes les MAI sont suspectées d'évoluer en 3 phases : une phase d'initiation de la maladie, de propagation et de résolution (**Figure 1**) (**Rosenblum et al., 2015**).



**Figure 1. Les trois phases principales d'évolution des MAI.** Une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux prédispose à l'auto-immunité. Lors de la phase d'initiation, les patients ne présentent pas de symptômes, contrairement à la phase de propagation pouvant être caractérisée par des dommages tissulaires causés notamment par une production accrue de cytokines pro-inflammatoires et une désréglation de la balance lymphocytes T effecteurs/lymphocytes T régulateurs (Teff/Tregs). La phase de résolution est définie par une amélioration, généralement à court terme, des manifestations cliniques (D'après Rosenblum et al., 2015).

L'une des questions les plus répandues concernant l'auto-immunité est : pourquoi se développent-elles ? Le système immunitaire protège l'hôte contre divers pathogènes ou contre des cellules cancéreuses, en faisant la distinction entre le soi et le non-soi afin d'éviter une réponse qui pourrait nuire à l'hôte. Cette balance fragile entre la reconnaissance du soi et la protection envers le non-soi requiert un contrôle précis de l'activité de nombreuses cellules immunitaires, grâce à des mécanismes de tolérance centrale et périphérique. Si cette balance est déséquilibrée, la tolérance immunitaire peut être rompue et induire une auto-immunité (**La Cava, 2015**). Une fois la maladie déclarée, le contrôle de la réponse auto-

immune implique l'activation de mécanismes de régulation qui limitent les réponses effectrices envers l'hôte. Ces derniers font intervenir des cellules régulatrices appelées lymphocytes T régulateurs (Tregs), mais également des molécules inhibitrices appelées « immune checkpoint » (**Rosenblum et al., 2015**).

Depuis leur découverte dans les années 1980-1990, les « immune checkpoint » ont fait l'objet de multiples recherches dans le domaine de la cancérologie. En effet, la découverte du rôle des molécules inhibitrices PD-1 et CTLA-4 dans le contrôle de la réponse immunitaire anti-tumorale, a conduit à l'attribution du Prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 2018 à James Allison et Tasuku Honjo. Ces découvertes ont mené au développement d'anticorps capables de bloquer ces molécules et ainsi de relâcher « le frein » immunitaire pour permettre au système immunitaire d'attaquer efficacement les cellules tumorales. Ces nouvelles thérapies connues sous le nom de « checkpoint inhibitors » ont révolutionné le traitement de patients atteints de cancers tels que le mélanome métastatique (**Paluch et al., 2018**). Cette nouvelle génération de traitements est actuellement à l'étude dans d'autres pathologies telles que les MAI. En effet, des modèles murins déficients pour plusieurs « immune checkpoint » développent des symptômes auto-immuns, soulignant l'importance de ces molécules dans la prévention de l'auto-immunité. L'engagement de ces récepteurs inhibiteurs par des anticorps agonistes pourraient ainsi rétablir un état de tolérance perdu au cours du développement de MAI (**Paluch et al., 2018**). Aujourd'hui, de nombreux essais cliniques de molécules ciblant des « immune checkpoint » ont lieu dans diverses MAI telles que le lupus érythémateux systémique (LES). Les traitements actuels du LES ne sont pas curatifs, et ne ciblent pas les acteurs responsables du développement de la maladie, mais permettent seulement de réduire l'inflammation. La plupart du temps, les patients doivent être traités sur de longues périodes, voire à vie, ce qui entraîne des effets secondaires à long terme et augmente le risque de complications infectieuses ou malignes. La recherche de nouveaux traitements qui tend vers la médecine personnalisée, est donc fondamentale.

C'est pourquoi, mon travail de thèse vise à la fois des objectifs fondamentaux et thérapeutiques grâce à l'étude du rôle d'un récepteur inhibiteur nommé B and T Lymphocyte Attenuator (BTLA) dans le LES, à la fois chez l'Homme, et dans un modèle murin de lupus. En effet, les objectifs de ce travail sont *i)* d'étudier l'expression de BTLA à la surface de différentes sous-populations lymphocytaires impliquées dans le LES et *ii)* de déterminer si BTLA pourrait être envisagé comme nouvelle stratégie thérapeutique dans le LES.

## A) Le lupus érythémateux systémique

### I) Historique du lupus : de la description d'une atteinte cutanée au Moyen Âge à la définition d'une maladie auto-immune systémique du 20<sup>ème</sup> siècle

Au Moyen Âge, le terme « lupus » faisait référence à un grand nombre d'affections ulcérées de la peau rappelant des morsures de loup. La première apparition de l'appellation lupus dans la littérature date de 916 et désigne la maladie de l'évêque de Liège Eraclius, qui souffrait d'une maladie ulcérée (**Scofield and Oates, 2009**). En 1305, le terme « lupus » est associé aux formes ulcérées de l'Herpès, puis en 1577 à des éruptions rouges présentes sur le visage (**Felten et al., 2020**).

A la fin du 18<sup>ème</sup> siècle, Robert Willan classifie les maladies de peau et fait la distinction entre le lupus désignant une maladie de la peau ulcérée et la maladie de l'Herpès (**Scofield and Oates, 2009**). Des années plus tard, en 1828, Alphée Cazenave et Henri Schedel publient un ouvrage nommé « Abrégés pratiques des maladies de la peau » qui décrit différentes formes de lupus : le lupus qui détruit en surface, le lupus qui détruit en profondeur et le lupus avec hypertrophie. En 1833, ils publient une deuxième édition de leur ouvrage qui est complétée par la description d'une forme particulière de lupus appelée « érythème centrifuge ». Cette forme de lupus sera nommée en 1851 « lupus érythémateux » (**Felten et al., 2020**). En parallèle, en 1846, Ferdinand Von Hebra décrit une affection de la peau et plus particulièrement une éruption malaire en forme « d'ailes de papillon », dont il fera plus tard le lien avec le lupus érythémateux décrit en 1851 (**Felten et al., 2020**).

La compréhension de cette maladie a ensuite évolué grâce aux travaux de Moriz Kaposi. En 1872, ce dernier décrit deux types de lupus : le lupus discoïde, qui présente des symptômes exclusivement cutanés, et le lupus disséminé, associé à des complications systémiques (fièvre, perte de poids, anémie, arthralgie). En 1902, Sequira et Baleau décrivent de nouvelles manifestations associées au lupus : le phénomène de Raynaud, la pleurésie/péricardite, et la néphrite lupique (**Mallavarapu and Grimsley, 2007**). Enfin, en 1904, William Osler confirme le concept de lupus systémique en substituant le terme « lupus

érythémateux disséminé » par celui de « lupus érythémateux systémique » (**Scofield and Oates, 2009**).

Ce n'est qu'à partir de la fin du 20<sup>ème</sup> siècle que le lupus est considéré comme une maladie auto-immune grâce au développement des connaissances en immunologie. En 1948, Malcom Hargraves découvre dans la moelle osseuse de patients lupiques, des cellules particulières qu'il nommera cellules LE (pour « lupus érythémateux »). Ces cellules sont constituées de neutrophiles ayant phagocyté de l'acide désoxyribonucléique (ADN) d'une autre cellule. L'année suivante, il a été montré que le sérum de patients lupiques est capable de conduire à la formation de cellules LE à partir de cellules de moelle osseuse d'individus sains. En 1954, Peter Miescher découvre que le facteur sérique capable d'induire des cellules LE, est un anticorps ciblant un antigène nucléaire. En 1957, il est montré que les auto-anticorps (auto-Ac) retrouvés chez les patients sont dirigés contre des nucléoprotéines et de l'ADN : les anticorps anti-ADN deviennent alors des marqueurs sérologiques spécifiques du lupus. Dans les années 1960, la recherche des anticorps anti-nucléaires est généralisée grâce au développement des techniques d'immunofluorescence, puis, dans les années 1970, ils sont recherchés sur des cultures de cellules Hep-2. Par la suite, la spécificité de nombreux autres auto-Ac a été mis en évidence et a participé à l'amélioration du diagnostic de la maladie (**Mallavarapu and Grimsley, 2007**).

## II) Épidémiologie

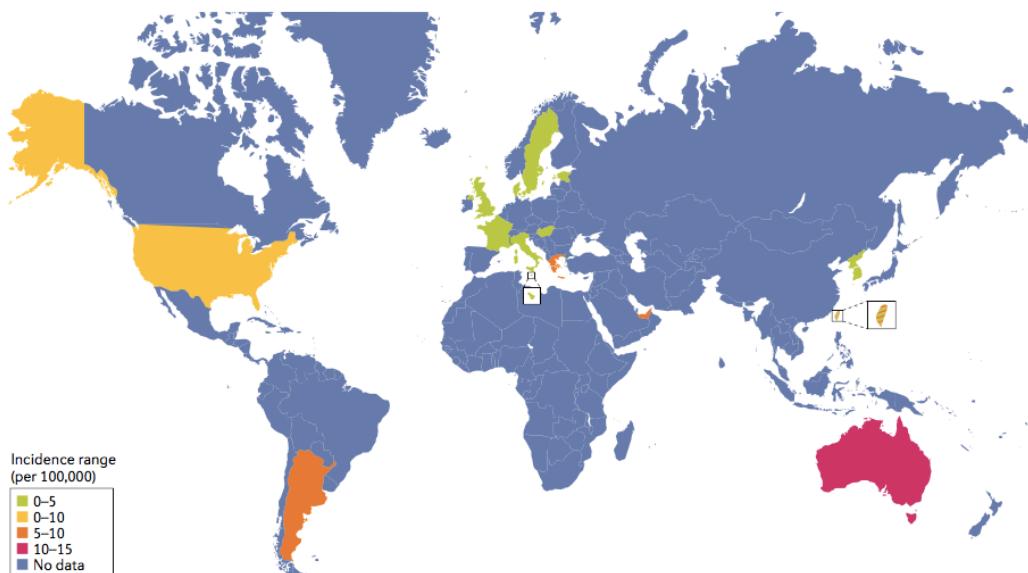
### 1) Incidence et prévalence

#### 1.1. En France

En France, le lupus est encore considéré comme une maladie rare puisque la prévalence est inférieure à 1 cas sur 2000. En effet, une étude de 2010 indique que la prévalence est évaluée à 47 cas sur 100 000 et que l'incidence est de 3,32 cas pour 100 000. La moyenne d'âge des patients atteints de lupus est de 51 ans pour les hommes et de 48,4 ans pour les femmes. De plus, 88% des cas recensés sont des femmes (**Arnaud et al., 2014**).

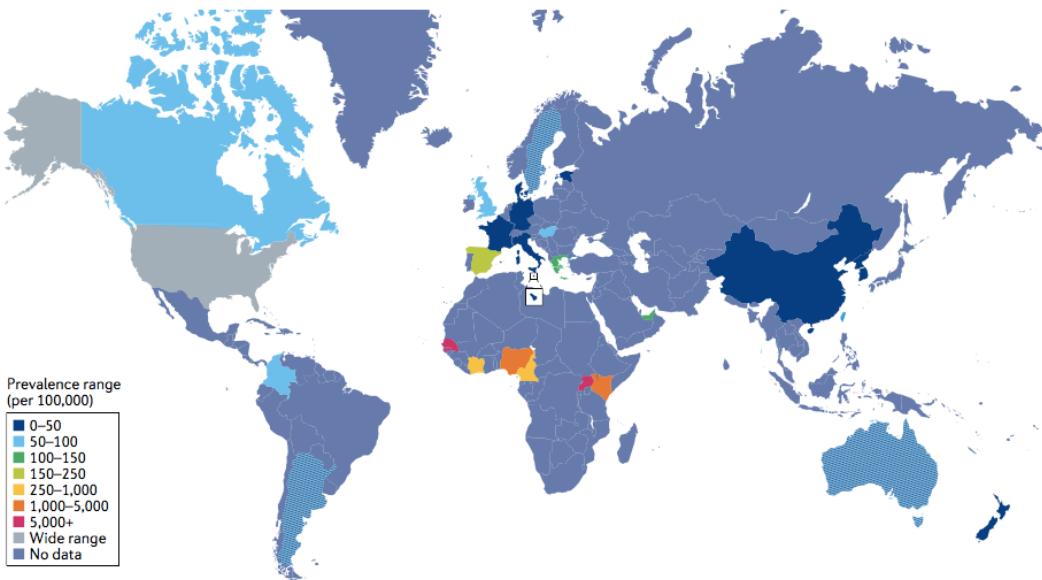
## 1.2. Dans le monde : impact de l'ethnicité dans le développement du lupus

Un grand nombre d'études a été mené ces dernières années et ont permis de mettre à jour les données épidémiologiques mondiales du lupus. Certains pays tels que les États-Unis, le Royaume-Uni ou la Grèce, ont noté une augmentation du taux d'incidence ces dernières années. Cette augmentation peut en partie être expliquée par une meilleure connaissance de la maladie et reconnaissance des patients grâce à une amélioration du diagnostic du fait d'avancées technologiques permettant le dosage de marqueurs biologiques de la maladie (**Carter et al., 2016**). L'incidence (**Figure 2**) et la prévalence (**Figure 3**) varient grandement en fonction de l'origine ethnique.



**Figure 2.** Carte de l'Incidence du LES en fonction des pays pour 100 000 habitants (Barber et al., 2021).

En effet, bien que le lupus soit décrit dans le monde entier, la prévalence et l'incidence sont significativement plus importants chez les individus d'origine africaine, hispanique ou asiatique que chez les individus d'origine caucasienne. Aux États-Unis, la prévalence et l'incidence sont de 2 à 5 fois plus élevées pour les individus d'origine africaine que pour les individus d'origine caucasienne (**Carter et al., 2016**). De plus, ces patients ont un plus grand risque de développer des formes sévères de la maladie, notamment des atteintes rénales.



**Figure 3.** Carte de la prévalence du LES en fonction des pays pour 100 000 habitants (Barber et al., 2021).

## 2) Le ratio Femme/Homme et l'âge de diagnostic

L'âge et le sexe sont deux facteurs qui influencent le développement du lupus. En effet, cette maladie touche classiquement les femmes adultes et le pic d'incidence se situe entre 20 et 40 ans (**Pons-Estel et al., 2017**). Toutefois, 10 à 20% des cas de lupus sont pédiatriques, concernant alors des enfants ou des adolescents. Dans le cas des lupus pédiatriques, les manifestations cliniques sont souvent plus sévères. Les enfants sont notamment plus sujets aux atteintes rénales et neurologiques que les adultes (**Harry et al., 2018**). Par ailleurs, bien que le lupus se déclare majoritairement chez les femmes, le ratio femme/homme varie en fonction de l'âge de diagnostic. En effet, le ratio femme/homme est d'environ 1 femme pour 1 homme dans les dix premières années de vie, de 9 femmes pour 1 homme entre 20 et 40 ans, puis le ratio décline jusqu'à 70 ans et augmente de nouveau chez les personnes âgées de plus de 70 ans (**Margery-Muir et al., 2017**).

## 3) Mortalité

L'espérance de vie des patients lupiques a considérablement augmenté lors des dernières décennies. En effet, le taux de survie à 10 ans est de plus de 90% aujourd'hui, alors qu'il était d'environ 60% en 1950. Toutefois, le taux de mortalité reste plus élevé chez les

patients lupiques que dans la population générale. La mortalité liée au lupus est majoritairement due au développement d'atteintes cardiovasculaires et rénales et au risque accru d'infections en raison de la baisse de l'immunité induite par les traitements corticostéroïdes et/ou immunosuppresseurs prescrits aux malades (**Pons-Estel et al., 2017**).

### III) Manifestations cliniques

#### 1) Diagnostic et critères de classification

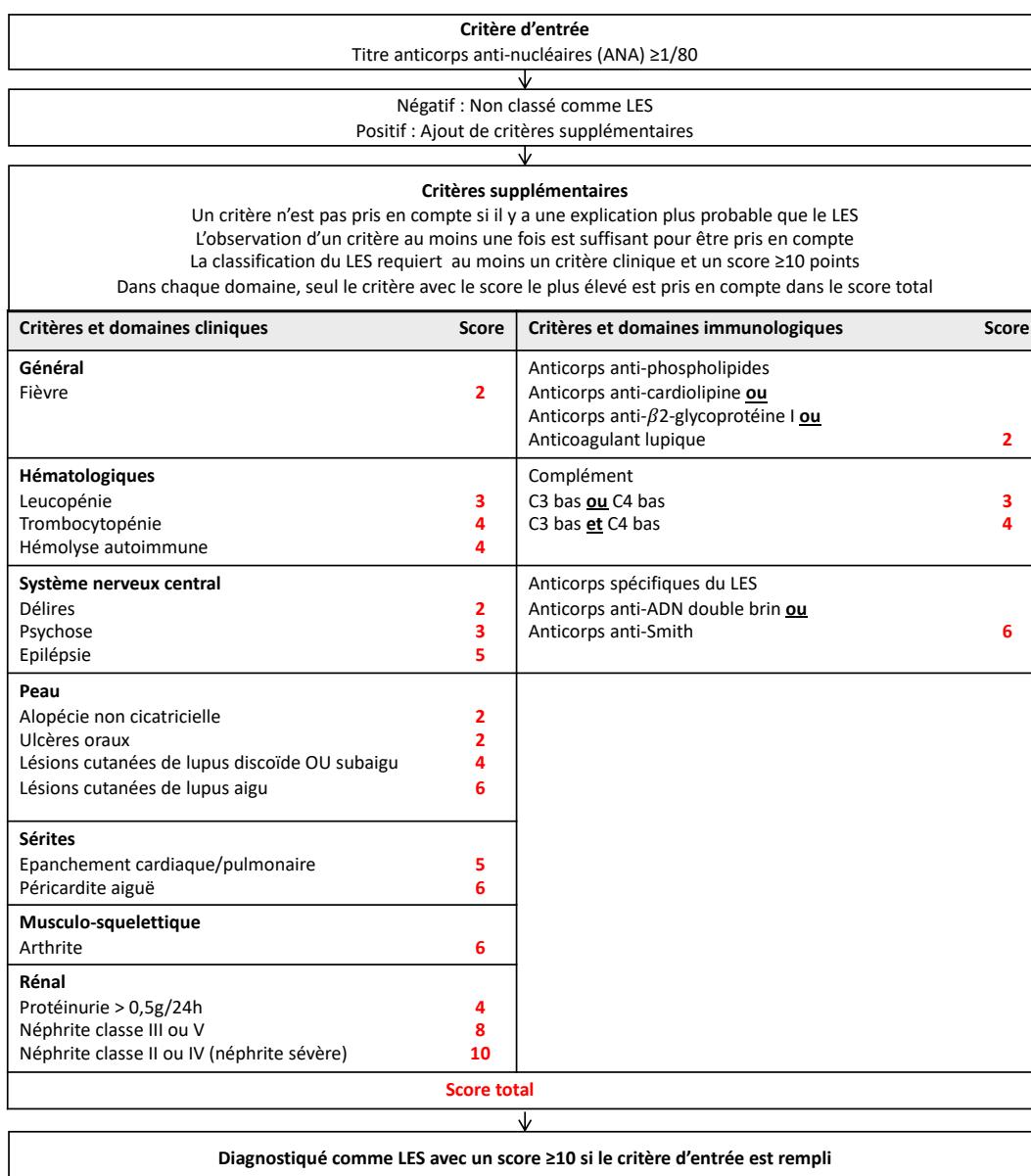
Le lupus étant une maladie complexe et très hétérogène, le diagnostic est parfois complexe. Pour faciliter l'inclusion de patients atteints de lupus dans des études cliniques, des critères de classification du lupus ont été établis en 1971 par l'*American College of Rheumatology* (ACR), et révisés en 1982 (**Tan et al., 1982**). Cette liste est composée de 11 critères (**Figure 4**) et la mise en évidence de 4 critères sur 11 permet d'affirmer le diagnostic de lupus. En 1997, cette liste a été actualisée afin d'inclure de nouveaux critères immunologiques (**Hochberg, 1997**).

1	Rash malaire
2	Lupus discoïde
3	Photosensibilité
4	Ulcérations orales ou nasopharyngées
5	Arthrites non érosives touchant au moins 2 articulations périphériques, caractérisées par une douleur, un gonflement ou un épanchement
6	Pleurésie ou péricardite
7	Protéinurie persistante > 0,5 g/jour ou cylindrurie
8	Convulsions ou psychose (en l'absence de cause médicamenteuse ou métabolique)
9	Atteintes hématologiques : - Anémie hémolytique, ou - Leucopénie < 4000/ $\mu$ l constatée à 2 reprises, ou - Lymphopénie < 1500/ $\mu$ l constatée à 2 reprises, ou - Trombopénie < 100 000/ $\mu$ l, en l'absence de drogues cytopéniantes
10	Titre abnormal d'anticorps antinucléaires par immunofluorescence (en l'absence de drogues inductrices)
11	Perturbations immunologiques : - Titre abnormal d'anticorps anti-ADN natif, anticorps anti-Sm, ou présence d'anticorps antiphospholipides : sérologie syphilitique dissociée constatée à 2 reprises en 6 mois ou anticoagulant circulant de type lupique ou titre abnormal d'anticorps anti-cardiolipine en IgG ou IgM

**Figure 4.** Critères de classification du LES proposés par l'ACR en 1982 et mis à jour en 1997. La présence d'au moins 4 des 11 critères de classification permet d'affirmer l'existence d'un lupus systémique.

Afin d'améliorer la méthode de classification, le groupe *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) a mis en place des nouveaux critères en 2012, permettant d'augmenter la sensibilité (**Petri et al., 2012**). Contrairement aux critères ACR, la présence de

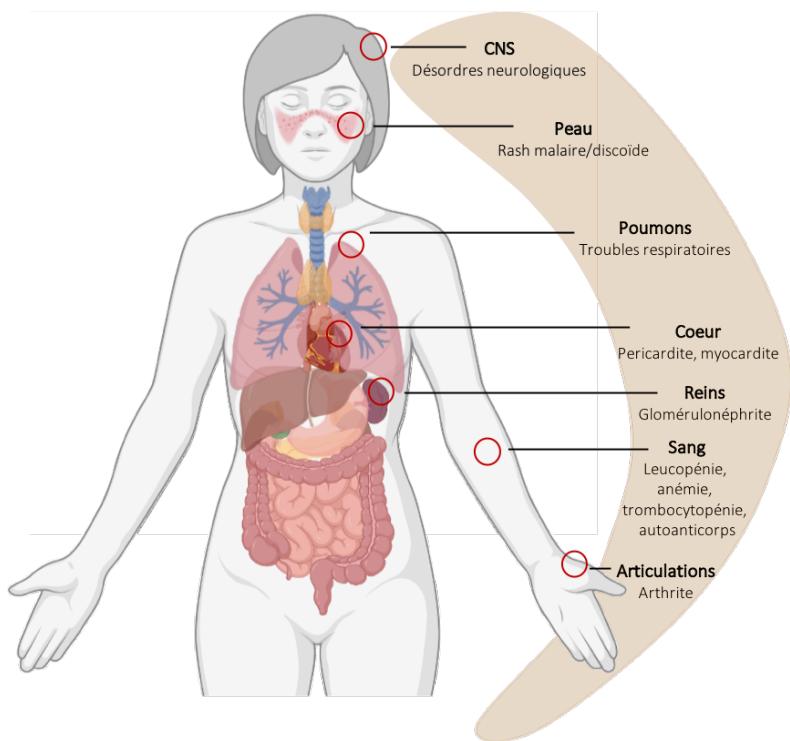
4 critères sur 11 dont au moins un critère clinique et un critère biologique, ou une histologie de glomérulonéphrite lupique associée à la présence d'anticorps anti-nucléaires (ANA) et/ou d'anticorps anti-ADN permet d'affirmer l'existence d'un lupus systémique. Enfin, en 2019, les membres de l'ACR et de l'*European League Against Rheumatism* (EULAR) ont une nouvelle fois mis à jour ces critères en imposant la présence d'ANA à une dilution supérieure à 1/80, et un score supérieur ou égale à 10 pour classifier la pathologie de lupus (**Figure 5**) (**Aringer et al., 2019**).



**Figure 5.** Nouveaux critères EULAR/ACR de classification du LES publiés en 2019. La présence d'anticorps anti-nucléaires à une dilution supérieure ou égale à 1/80, et un score supérieur ou égale à 10 est nécessaire pour diagnostiquer un LES selon ces critères (D'après Aringer et al., 2019).

## 2) Symptômes cliniques

Le lupus est une pathologie complexe qui touche de nombreux organes et tissus (**Figure 6**). La maladie se déclare souvent par des symptômes mimant un état grippal. En effet, les premiers symptômes peuvent être une perte de poids, une forte fatigue (asthénie) et de la fièvre. Au vu du très large spectre des manifestations cliniques de cette maladie, nous nous focaliserons sur les manifestations les plus courantes.



**Figure 6. Manifestations cliniques du lupus.** Le LES est une pathologie systémique complexe affectant de nombreux organes. Les atteintes les plus communes sont les manifestations cutanées et articulaires et l'atteinte la plus grave est l'atteinte rénale.

### 2.1. Manifestations cutanées et articulaires

Les atteintes cutanées touchent 70 à 80% des patients lupiques, et représentent une manifestation caractéristique de la maladie. Ces atteintes sont particulièrement retrouvées sur les zones photo-exposées, du fait de leur forte photosensibilité. En effet, l'une des caractéristiques couramment observées chez les patients est la fameuse éruption en forme d'ailes de papillon (ou « masque de loup ») au niveau des joues et du nez. On observe plusieurs

degrés de sévérité concernant les atteintes cutanées dans le lupus. Elles peuvent se manifester uniquement par des petites lésions cutanées, mais aussi par des lésions plus sévères qui cicatrisent difficilement (**Kiriakidou and Ching, 2020**).

Une autre manifestation lupique très courante est représentée par l'atteinte articulaire. Elle est observée dans plus de 90% des cas de lupus et se manifeste souvent avant le diagnostic de la maladie. Dans le cas du lupus, il s'agit le plus souvent de polyarthralgies inflammatoires associées éventuellement à des arthrites symétriques et non érosives. L'atteinte articulaire touche principalement les petites articulations des doigts et des poignets, et plus rarement les grosses articulations telles que les genoux et les chevilles (**Grossman, 2009**).

## 2.2. Atteintes rénales

La néphrite lupique est la principale cause de mortalité et est observée dans 40 à 60% des cas de lupus. Environ 10% des patients atteints d'une néphrite lupique ont un risque de développer une insuffisance rénale. Le diagnostic est histologique et repose sur une biopsie rénale réalisée chez les patients présentant une protéinurie significative. La néphrite lupique est la conséquence d'un dépôt d'auto-Ac sous forme de complexes immuns au niveau des glomérules. Ces complexes immuns sont capables d'induire une inflammation au niveau des reins, ce qui se traduit notamment par la présence de protéines dans les urines et une diminution de la fonction rénale (**Almaani et al., 2017**).

## 2.3. Atteintes neurologiques

De nombreux patients lupiques (25 à 75%) développent des symptômes neurologiques ou psychiatriques. Le spectre des atteintes neurologiques est très large et non spécifique, ce qui rend leur diagnostic difficile. Elles se traduisent par exemple par des maux de tête, des troubles du comportement, des troubles épileptiques ou une psychose. Plusieurs types d'auto-Ac semblent impliqués dans le développement des atteintes neurologiques dont : les anticorps anti-phospholipides, les anticorps anti-récepteur N-méthyl-D-asparate et les anticorps anti-ribosomes P. La plupart des symptômes touchant le cerveau peuvent être

expliqués par des atteintes vasculaires. Les anticorps anti-phospholipides sont associés à un risque élevé d'accident vasculaire cérébral et de thrombose (**Kivity et al., 2015**).

#### **2.4. Atteintes pulmonaires et cardiaques**

L'atteinte pulmonaire est une complication connue et fréquente de la maladie. Ces atteintes peuvent toucher tous les compartiments du système respiratoire mais l'atteinte pulmonaire la plus fréquente est la pleurésie lupique qui touche environ 60% des patients. Les patients atteints de pleurésie souffrent de douleurs thoraciques, d'essoufflement et de fièvre. La pleurésie est associée à des niveaux élevés d'ANA et d'anticorps anti-ADNdb dans le liquide pleural. Une atteinte pulmonaire plus rare est la pneumonie lupique aiguë. Elle est caractérisée par une inflammation des poumons, de la fièvre, des douleurs thoraciques, de la toux et des essoufflements. Des taux élevés d'anticorps anti-SSA et anti-Ro sont associés au développement de la pneumonie lupique aiguë (**Lopez Velazquez and Highland, 2018**).

Outre les atteintes pulmonaires, des atteintes cardiaques sont fréquemment retrouvées chez les patients lupiques, la péricardite étant l'atteinte cardiaque la plus commune. Elle se caractérise par de la tachycardie, des douleurs thoraciques accentuées en position allongée, et des essoufflements. Elle est plus fréquente au début de la maladie ou lors de rechutes, bien qu'elle puisse se présenter à tout moment. Une autre manifestation cardiaque associée au lupus est le développement d'une maladie coronarienne, en raison d'une forte prévalence d'athérosclérose chez les patients lupiques (**Miner and Kim, 2014**).

#### **2.5. Atteintes vasculaires**

Les atteintes vasculaires sont très communes chez les patients lupiques et représentent une importante cause de morbidité. Le phénomène de Raynaud est observé chez un tiers des patients lupiques, mais n'est pas spécifique. Ce phénomène est un trouble de la circulation sanguine qui touche les doigts, les orteils, le nez et les oreilles (**Cojocaru et al., 2011**). En plus de ce phénomène, les patients lupiques sont particulièrement sensibles au développement de l'athérosclérose et peuvent également présenter un syndrome des anti-phospholipides (SAPL). Lorsque ce syndrome est associé au lupus, on parle de SAPL secondaire.

## 2.6. Atteintes hématologiques et sérologiques

Enfin, le lupus est caractérisé par un large spectre d'anomalies impliquant le système immunitaire. On retrouve différentes cytopénies telles qu'une anémie, une leucopénie (particulièrement une lymphopénie) ou une thrombopénie. Les patients lupiques présentent également de faibles taux de compléments circulants, et des taux élevés d'auto-Ac. En effet, le lupus est une maladie impliquant des complexes immuns qui activent le complément entraînant ainsi une diminution du taux de protéines circulantes (en particulier les fractions C3 et C4) (**Aringer and Johnson, 2020**). Les auto-Ac les plus caractéristiques du lupus sont principalement dirigés contre le matériel nucléaire mais leur spécificité est variée. En effet, les auto-Ac anti-nucléaires sont définis comme marqueurs biologiques du LES et sont utilisés au moment du diagnostic de la maladie. Les auto-Ac anti-ADN sont les auto-Ac les plus fréquemment retrouvés chez les patients (70%), mais les auto-Ac anti-histones , anti-nucléosomes, anti-Sm, anti-RNP, anti-SSA ou anti-SSB sont également caractéristiques de la maladie (**Kurien and Scofield, 2006**). De plus, même s'ils ne sont pas spécifiques du lupus, on peut observer des anticorps anti-phospholipides associés à des évènements thrombotiques.

### 3) Scores d'activité

En plus de la diversité des signes cliniques retrouvés dans le lupus, cette pathologie évolue selon différentes phases. En effet, on observe une alternance entre des phases de poussée où se manifestent les symptômes, et des phases quiescentes asymptomatiques. Déterminer l'activité de la maladie lupique est primordial puisque c'est sur cette dernière que se base le choix du traitement à prescrire aux patients. Il existe de nombreux score d'activité : le BILAG (« British Isles Lupus Assessment Group Index »), le SLEDAI (« Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index »), le SLAM (« Systemic Lupus Erythematosus Activity Measure »), l'ECLAM (« European Consensus Lupus Activity Measurement »), le LAI (« Lupus Activity Index »), et le SLAQ (« Systemic Lupus Activity Questionnaire »). Parmi ces scores, le SLEDAI et le BILAG sont les plus couramment utilisés.

Le SLEDAI a été développé en 1992, révisé en 2002 (SLEDAI-2K) puis en 2005 (SELENA-SLEDAI). Ce score mesure l'activité globale de la maladie dans les 10 jours précédent

l'évaluation. Il comporte 24 critères couvrant 9 domaines (**Figure 7**). Le score peut théoriquement varier de 0 à 105 (ce score maximal n'étant jamais atteint car il traduirait un patient présentant simultanément les 24 manifestations cliniques ou biologiques), et un score  $\geq 20$  correspond à une maladie lupique de très haute activité. Les points faibles du SLEDAI sont *i)* qu'il permet une évaluation binaire de chaque critère mais pas une évaluation de leur gravité, *ii)* qu'il ne permet pas d'analyse précise organe par organe. En revanche, ce score est facile d'utilisation et détecte les variations d'activité, paramètre important lors d'essais cliniques (**Ohmura, 2021**).

Le BILAG a été développé en 1988 et révisé également plusieurs fois, en 2004 et en 2009. Ce score diffère du SLEDAI car il permet d'évaluer l'activité pour chaque organe. En effet, il est composé d'une centaine de critères couvrant 9 domaines, et évalue l'activité sur les 4 semaines précédant l'évaluation. Pour chaque domaine, on obtient un score complexe variant de A (le plus haut niveau d'activité) à E (le plus faible niveau d'activité). Le BILAG est un excellent score pour détecter les phases de poussées, mais il est très complexe et est réservé à un usage lors des essais cliniques car il est très difficile à utiliser en routine par les cliniciens (**Ohmura, 2021**).

Manifestations	Score	Manifestations	Score
Convulsion	8	Protéinurie	4
Psychose	8	Pyurie	4
Atteinte cérébrale	8	Nouveau rash	2
Troubles visuels	8	Alopécie	2
Nerfs crâniens	8	Ulcères muqueux	2
Céphalées	8	Pleurésie	2
Accident Vasculaire Cérébral	8	Péricardite	2
Vascularite	8	Baisse du complément	2
Arthrites	4	Elévation des anti-ADN	2
Myosite	4	Fièvre	1
Cylindres urinaires	4	Trombopénie	1
Hématurie	4	Leucopénie	1

**Figure 7.** Indice d'activité du LES, méthode de calcul du SLEDAI. Le SLEDAI comporte 24 critères, dont chacun est associé à un score. Ce score permet d'évaluer l'activité de la maladie. Un score d'activité  $\geq 20$  reflète une pathologie de très haute activité.

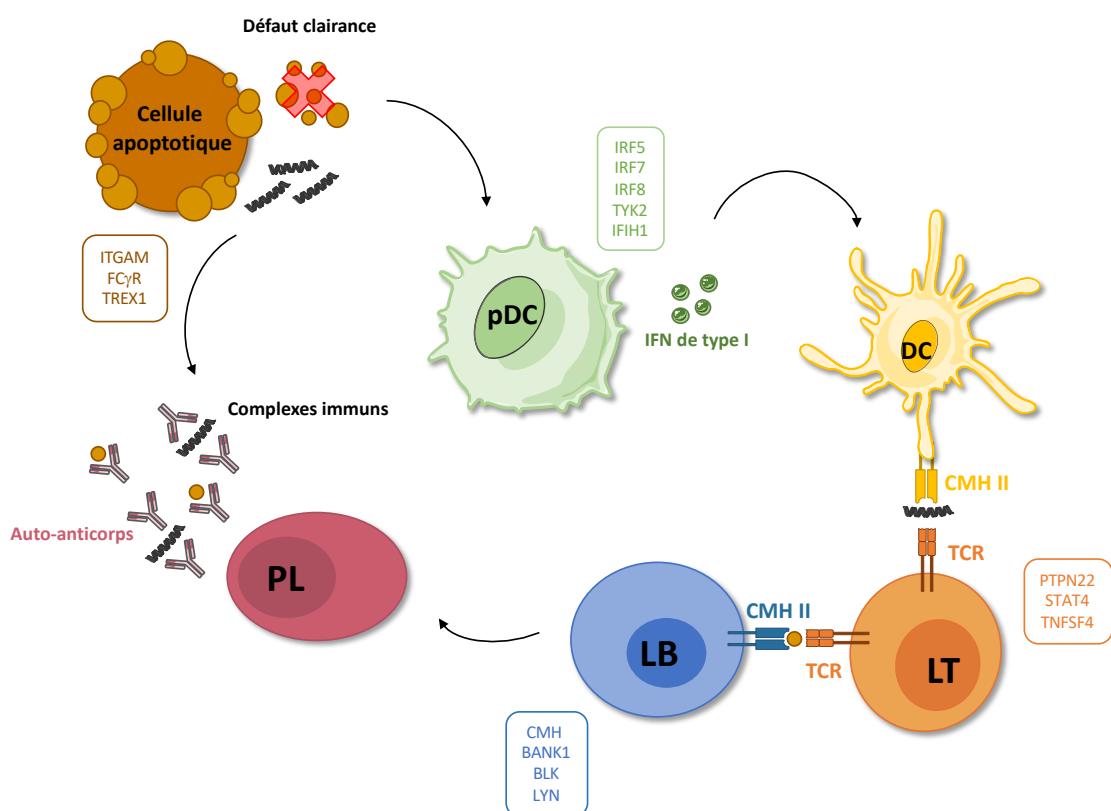
## IV) Étiologie du lupus

### 1) Les facteurs génétiques

#### 1.1. Gènes de susceptibilité

Les facteurs génétiques jouent un rôle important dans la physiopathologie du lupus.

Des études montrent que la concordance entre jumeaux hétérozygotes est d'environ 5%, alors qu'elle est de 25 à 50% pour des jumeaux homozygotes. Il existe des formes monogéniques de lupus mais elles sont rares. Le lupus est une maladie majoritairement multigénique. Les modèles murins ainsi que des études de type « Genome-Wide Association Studies » (GWAS) sur le génome humain entier ont permis de mettre en évidence une centaine de loci de prédisposition au lupus et de multiples mutations SNP (Single Nucleotide Polymorphism) associées au lupus (**Figure 8**). Quelques exemples sont présentés ci-dessous.



**Figure 8. Les gènes de susceptibilité du LES.** Il existe de nombreux gènes associés au développement du LES. On peut citer des polymorphismes dans des gènes impliqués dans la clairance des corps apoptotiques et des complexes immuns (cadre marron). Le défaut d'élimination des corps apoptotiques peut participer à l'activation des pDC, entraînant ainsi la production d'IFN de type I. Au niveau de l'immunité innée, des gènes sont également associés au LES (cadre vert) et sont impliqués dans la régulation de la réponse IFN de type I. Les cellules de l'immunité innée sont alors activées et participent à leur tour à l'activation des cellules de l'immunité adaptative : les LB et les LT. Plusieurs gènes impliqués dans le dysfonctionnement de l'immunité adaptative sont également impliqués dans le LES (cadre bleu et cadre orange). pDC : cellule dendritique plasmacytoïde ; PL : plasmocyte ; DC : cellule dendritique ; LT : lymphocyte T ; LB : lymphocyte B ; CMH : complexe majeur d'histocompatibilité ; TCR : T cell receptor

Une caractéristique immunologique du lupus est l'accumulation de corps apoptotiques capables d'induire une réaction inflammatoire chez les patients, et un nombre important de mutations associées au LES sont en lien avec ce défaut d'apoptose ou de clairance apoptotique. Le gène *ITGAM* code pour la protéine CD11b qui joue un rôle dans la phagocytose et l'adhésion des leucocytes. Plusieurs polymorphismes de ce gène sont retrouvés chez les patients lupiques, et l'un d'eux (rs1143679) est fortement associé à la maladie. Des variants de *ITGAM* sont associés à un défaut de phagocytose et de clairance apoptotique induisant ainsi une augmentation de l'inflammation (**Teruel and Alarcón-Riquelme, 2016**). En plus de *ITGAM*, des variants du gène *FCyR* codant pour différents récepteurs spécifiques de la fraction Fc des immunoglobulines G (IgG) sont également associés au LES. Ces mutations diminuent la capacité de ces récepteurs à lier les IgG, et donc la capacité des cellules les exprimant, à éliminer les complexes immuns (**Guerra et al., 2012**). Enfin, le gène *TREX1* code pour la DNase III, une exonucléase responsable de la dégradation de l'ADN. Des mutations dans ce gène induisent un défaut de la dégradation de l'ADN et ainsi, une accumulation d'ADN dans le cytoplasme. Cet ADN non dégradé active les cellules de l'immunité innée et adaptative et participe ainsi au phénomène d'auto-immunité (**Deng and Tsao, 2010**). Plusieurs variants de ce gène sont retrouvés chez des patients lupiques.

Des études transcriptomiques ont montré l'existence d'une signature interféron (IFN) de type I dans le LES, soulignant le rôle important de cette voie dans la pathogénèse. Des mutations dans les gènes IRF (interferon regulatory factors) *IRF5*, *IRF7* et *IRF8* codant pour des facteurs de transcription jouant un rôle important dans la signalisation de la voie IFN de type I ont été mises en évidence et associées au LES. Plusieurs mutations de *IRF5* entraînent une expression plus stable et prolongée du transcrit de *IRF5* ce qui induit une augmentation de la production d' $\text{IFN}\alpha$  (**Guerra et al., 2012**). Des variants de *IRF5* sont également associés au développement d'une néphrite lupique (**Ceccarelli et al., 2015**). *TYK2* intervient dans la voie des IFN en codant pour une tyrosine kinase impliquée dans la phosphorylation des récepteurs aux IFN de type I. Des variants de *TYK2* sont associés à une augmentation de l'expression des gènes IFN de type I ou à un phénotype pro-inflammatoire caractérisé par une réponse Th1/Th17. Enfin, plusieurs variants du gène *IFIH1* (hélicase impliquée dans la reconnaissance d'ARNsb et l'induction d'une réponse IFN de type I) sont associés au développement de maladies auto-immunes telles que le diabète, ou le psoriasis, et une mutation (rs1990760) de

ce gène entraînant une augmentation de son expression, est plus particulièrement associée au LES.

Des mutations conduisant à des dysfonctionnements au niveau de l'immunité adaptative peuvent également jouer un rôle dans le développement du lupus. En effet, de nombreux gènes impliqués dans le développement des lymphocytes T (LT) et la voie de signalisation du TCR (T cell receptor) sont associés au LES. Parmi ces gènes, on peut citer *PTPN22* qui code pour une tyrosine phosphatase exerçant une régulation négative des LT, *TNFSF4* qui code pour OX40L exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et qui participe à la co-stimulation des LT, et *STAT4* qui code pour un facteur de transcription impliqué dans la transduction du signal de l'IL-12/23 et la production d'IFN $\gamma$ . Chez les patients lupiques, un variant de *PTPN22* (rs2476601) conduit à l'altération de la régulation négative des LT et des lymphocytes B (LB), alors qu'un variant de *TNFSF4* (rs2205960) entraîne la surexpression de OX40L et promeut la co-signalisation des LT, leur survie et ainsi l'auto-immunité (**Guerra et al., 2012**). Concernant *STAT4*, un variant de ce gène (rs7574865) est fortement associé à un risque accru de développer un LES grave chez des sujets jeunes (<30 ans) associant une néphrite et des taux élevés d'anticorps anti-ADN (**Ceccarelli et al., 2015**).

Différents gènes participant au développement des LB et la signalisation du BCR (B-cell receptor) sont également associés au LES. Le gène *BLK* code pour une tyrosine kinase impliquée dans la prolifération, la différenciation et la tolérance des LB. Des variants de ce gène associés au LES conduisent à une réduction de son expression, pouvant mener à une altération du développement des LB. D'autres études ont permis d'identifier le gène *BANK1* comme facteur de susceptibilité du LES. *BANK1* code pour une protéine adaptatrice impliquée dans l'activation des LB et un variant de *BANK1* (rs10516487) est fortement associé au LES. En effet, ce variant induit l'augmentation de l'expression de *BANK1*, se traduisant par une hyper-activation des LB (**Guerra et al., 2012**).

Enfin, la première association génétique décrite dans le LES concerne la région HLA. Ce locus est divisé en trois régions principales (HLA classe I, classe II et classe III) qui contiennent de nombreux gènes codant notamment pour des protéines impliquées dans la présentation antigénique (**Deng and Tsao, 2010**). Dans cette région, de nombreux gènes sont associés au

LES, et des mutations dans le gène HLA-DRB1 sont particulièrement liées à la pathogénèse lupique (**Guerra et al., 2012**).

## 1.2. Le rôle de l'épigénétique

Plus récemment, le rôle d'une dérégulation épigénétique dans le déterminisme du LES a été évoqué. L'épigénétique consiste en des modifications transmissibles et réversibles de l'expression des gènes, ne faisant intervenir aucun changement de la séquence nucléotidique. Les altérations épigénétiques peuvent être représentées par des modifications biochimiques de la méthylation de l'ADN, des modifications des histones et une régulation de l'expression des gènes par des petits ARN régulateurs non codants (notamment les micro-ARN).

Les modifications épigénétiques de l'ADN sont principalement les méthylations et déméthylation de l'ADN. La méthylation s'effectue par l'intermédiaire d'une DNA méthyltransférase (DNMT) particulièrement au niveau des îlots CpG, régions majoritairement localisées dans des régions promotrices et intervenant donc dans la régulation de l'expression des gènes. Chez les patients lupiques, une hypométhylation de l'ADN des LT CD4<sup>+</sup> et des LB est observée en comparaison à des individus sains, entraînant ainsi une surexpression de gènes associés au développement du lupus (*CD70, CD40L, CD11A, LFA-1...*) (**Moulton et al., 2017**). De plus, l'inactivation du chromosome X suite aux méthylations de l'ADN, pourrait en partie expliquer la forte prédominance féminine du LES. En effet, il a été montré que la déméthylation du gène *CD40L* sur le chromosome X inactif, entraîne une surexpression de ce gène dans les LT de femmes atteintes de lupus (**Miceli-Richard, 2015**).

Un deuxième type de modification épigénétique touche les histones. Les histones sont des protéines associées à l'ADN sous forme d'octamère pour former un nucléosome (ADN + octamère d'histones), plus petite sous-unité fonctionnelle de la chromatine. La chromatine peut quant à elle se présenter sous deux formes : l'hétérochromatine, très condensée et associée à des gènes peu exprimés, et l'euchromatine, décondensée et dont les gènes sont accessibles à la machinerie transcriptionnelle. Le niveau de compaction de la chromatine est notamment régulé par des modifications biochimiques des histones telles que des méthylations, acétylations ou phosphorylations. Dans le cas du LES, les histones H3 et H4 des

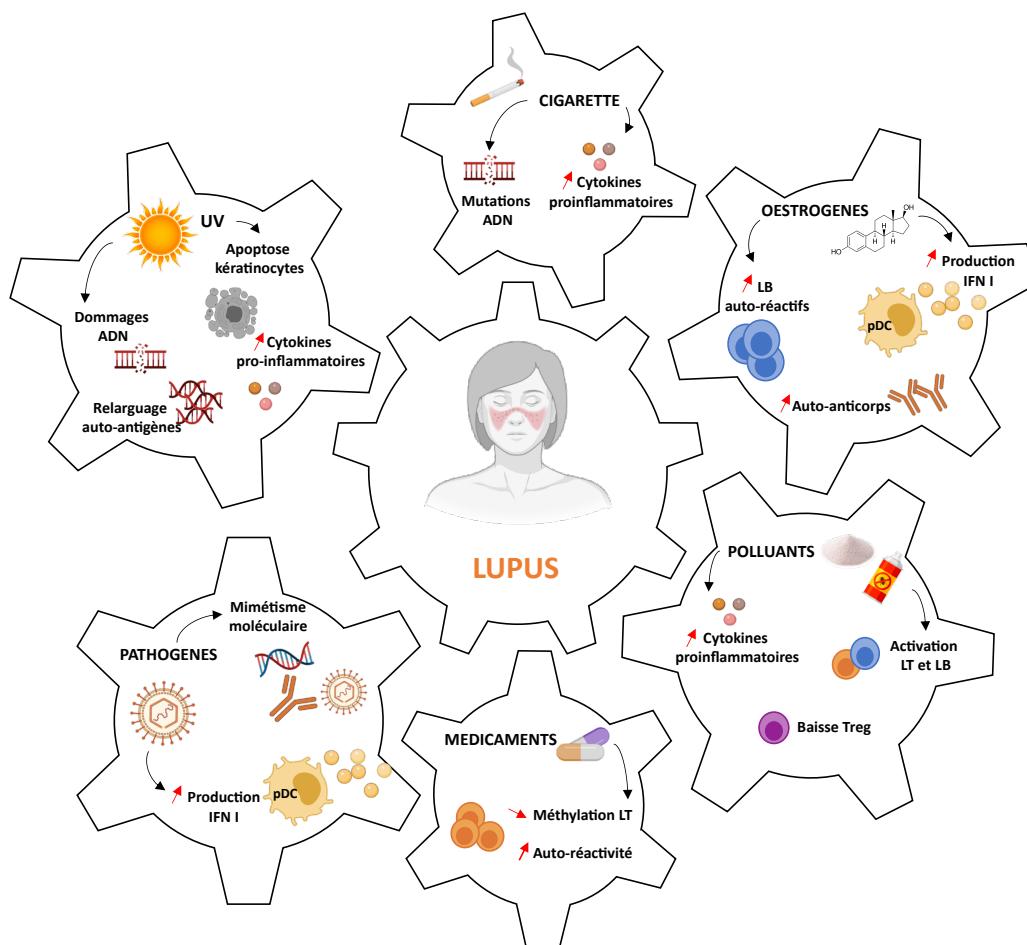
LT CD4<sup>+</sup> de patients lupiques sont hypoacétylés et la lysine 9 de l'histone H3 est hypométhylée (**Xiao and Zuo, 2016**). Dans les modèles murins de lupus NZB/W F1 et MRL<sup>lpr/lpr</sup>, l'administration d'inhibiteurs d'histones déacétylases (HDAC) a permis de restaurer un niveau normal d'acétylation des histones et d'améliorer les manifestations cliniques du lupus (**Miceli-Richard, 2015; Moulton et al., 2017**), faisant des inhibiteurs de HDAC des pistes thérapeutiques intéressantes.

Enfin, en plus des modifications de l'ADN ou des histones, l'expression des gènes peut être régulée par l'intermédiaire de petits ARN non codants régulateurs, appelés micro-ARN (miR). Les micro-ARN sont des petits ARN longs de 21 à 25 nucléotides qui peuvent se lier à un ARN messager cible et ainsi inhiber sa traduction en protéine ou réduire sa stabilité. Au cours du LES, on retrouve une augmentation ou une diminution de l'expression de certains micro-ARN dans les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) de patients. Par exemple, les cellules périphériques de patients lupiques présentent une diminution de l'expression de miR-146a. Ce micro-ARN est un régulateur négatif de la voie de signalisation des interférons de type I car il peut cibler les facteurs de transcription STAT1 ou IRF5. La diminution de ce micro-ARN chez les patients entraîne donc une forte activation de la voie des IFN de type I et participe ainsi à la signature interféron observée chez les patients lupiques (**Chi et al., 2021**). L'expression du micro-ARN miR-155 est également diminuée chez les patients lupiques. Ce micro-ARN est un régulateur négatif de la molécule CREB (CAMP response element binding protein), qui est elle-même un régulateur positif de la phosphatase 2A (PP2A). Par ailleurs, PP2A régule négativement la production d'IL-2, qui est diminuée chez les patients (**Lashine et al., 2015**). D'autres micro-ARN sont eux augmentés chez les patients, comme miR-21 ou de miR-148a. Ces deux micro-ARN régulent négativement l'expression de DNMT1, entraînant ainsi une hypométhylation de l'ADN. miR-21 induit également une hyperprolifération des LT, une augmentation de la production d'IL-10 et de l'expression de CD40L, conduisant alors à une plus forte maturation des LB (**Hong et al., 2020**).

## 2) Les facteurs environnementaux

Bien que la génétique ait un impact important sur le développement du lupus, il existe une grande disparité de la prévalence et de l'incidence au sein de populations génétiquement

liées. Ces observations montrent donc l'importance des facteurs environnementaux dans la survenue de la pathologie lupique (**Figure 9**).



**Figure 9. Les facteurs extrinsèques impliqués dans le développement du lupus.** Les rayons UV induisent l'apoptose des kératinocytes, le relargage de cytokines pro-inflammatoires et engendrent des dommages au niveau de l'ADN. Les agents pathogènes et en particuliers les virus, stimulent le système immunitaire et par un mécanisme de mimétisme moléculaire, induisent la production d'anticorps qui cross-réagissent avec des auto-anticorps. Les oestrogènes entraînent la production d'IFN de type I et régulent la survie des LB auto-réactifs, et ainsi la production d'auto-anticorps. De nombreux polluants et agents toxiques stimulent la réponse immunitaire et peuvent induire des mutations associées au lupus dans l'ADN. Enfin, certains médicaments peuvent conduire au développement du lupus.

## 2.1. Les rayonnements ultraviolets (UV)

L'exposition aux UV est un facteur environnemental décrit comme étant impliqué dans la pathologie lupique. Les UV-B comme les UV-A2 peuvent aggraver les atteintes cutanées chez les patients. Les UV peuvent induire l'apoptose des kératinocytes stimulant ainsi une production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-1. De plus, l'exposition de l'épiderme aux UV entraîne la dénaturation de l'ADN, favorisant ainsi le relargage d'auto-

antigènes nucléaires SSA/Ro, SSB et Sm (**Barbhaiya and Costenbader, 2014**). En raison de leur forte photosensibilité, les patients lupiques doivent se protéger des rayonnements du soleil. Cette photoprotection engendre un risque de carence en vitamine D inversement corrélée avec l'activité de la maladie. La vitamine D joue un rôle direct sur l'homéostasie lymphocytaire, l'immunité innée et adaptative. En effet, la vitamine D promeut entre autres, la différenciation des Tregs, inhibe la présentation antigénique aux LT, ainsi que la prolifération des LB et leur différenciation en PL (**Mok, 2013**). Les patients lupiques peuvent donc être périodiquement supplémentés en vitamine D (**Hassanalilou et al., 2017**).

## 2.2. Le tabagisme

L'exposition à la fumée de cigarette est considérée comme un facteur de risque du lupus (**Barbhaiya et al., 2018; Costenbader et al., 2004**). En effet, des composants toxiques de la fumée de cigarette peuvent induire un stress oxydatif et endommager l'ADN, entraînant ainsi des mutations génétiques liées au développement du lupus. Il a notamment été montré que la fumée de cigarette stimule l'expression du marqueur CD95 à la surface des LB et du marqueur CD4 à la surface des LT, et augmente la production de cytokines pro-inflammatoires, ce qui participe à la forte activation du système immunitaire (**Arnson et al., 2010**).

## 2.3. Les agents polluants

Outre les études concernant le tabac, une association positive entre le développement du lupus et l'exposition à la silice a été montrée. L'exposition à la silice cristalline induit la production de cytokine pro-inflammatoires, stimule l'activation des LT et altère la balance LTh/Tregs chez la souris. Les individus exposés à la silice ont donc plus de risques de développer un lupus que des personnes non exposées (**Finckh et al., 2006**). D'autres agents polluants tels que les pesticides ou les polluants organiques sont également associés au développement du lupus (**Barbhaiya and Costenbader, 2016**).

## 2.4. Les agents infectieux

Plusieurs agents infectieux tels que des virus, des bactéries ou des parasites sont proposés comme étant des facteurs de risque au développement du lupus. Les pathogènes les plus fréquemment impliqués sont les virus, notamment le parvovirus B19, le cytomégalovirus (CMV) et le virus d'Epstein-Barr (EBV). L'EBV est le virus pour lequel il existe le plus de données dans la littérature. Le lien entre l'EBV et le lupus peut être expliqué par un mécanisme de mimétisme moléculaire entre des antigènes viraux telle que la protéine virale EBNA-1, et des auto-antigènes décrit dans le lupus comme les protéines Sm et Ro. De ce fait, les anticorps dirigés contre la protéine EBNA-1 vont être capable de reconnaître les protéines Sm et Ro et induire une rupture de tolérance. De plus, l'EBV est capable d'activer les cellules dendritiques plasmacytoides (pDC) *via* les TLR7 et TLR9, et ainsi induire la production d'IFN de type I, signature de la pathologie lupique (**Harley and James, 2010**). Au-delà des virus, certaines bactéries peuvent également générer ou entretenir une réponse auto-immune *via* une réaction croisée à partir des antigènes bactériens ou *via* l'induction de dégâts tissulaires génératrices d'auto-antigènes.

## 2.5. Les hormones

La plupart des maladies auto-immunes sont caractérisées par une plus forte prévalence et incidence chez les femmes. Cette observation est particulièrement vraie dans le cas du lupus, où l'on retrouve un ratio de 9 femmes pour 1 homme. La majorité des patientes atteintes de lupus sont en âge de procréer, alors que cette maladie est moins fréquente après la ménopause, suggérant ainsi un rôle des hormones, particulièrement des œstrogènes dans la pathogénèse lupique (**Guéry, 2019**). Les œstrogènes régulent notamment la survie des LB autoréactifs et la production d'auto-Ac, et induisent la production d'IFN de type I par les pDC, mécanismes impliqués dans la pathologie lupique. En revanche, la progestérone semble contrecarrer les effets des œstrogènes (**Hughes and Choubey, 2014**).

## 2.6. Lupus induit par les médicaments

Le lupus induit est un phénomène auto-immun d'origine médicamenteuse, caractérisé par des manifestations cliniques qui disparaissent en quelques semaines à mois après l'arrêt du

traitement inducteur. Le lupus induit par les médicaments diffère du LES dans ses manifestations cliniques et biologiques car il est souvent moins sévère avec des atteintes majoritairement cutanées, et une absence d'anticorps anti-ADN. Il représente environ 10% des cas de lupus (**Solhjoo et al., 2021**). La mise en évidence d'une association entre médicaments et induction du lupus peut être difficile à démontrer. En revanche, ce phénomène est bien établi pour deux molécules nommées procaïnamide et hydralazine. Ces médicaments induisent une hypométhylation de l'ADN des LT, provoquant l'expression de LFA-1 et ainsi l'auto-réactivité des LT (**He and Sawalha, 2018**). Plus récemment, il a été montré que des inhibiteurs du TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ) sont capables d'induire un lupus avec production d'anticorps anti-ADN et des manifestations cliniques pouvant être plus sévères (atteintes rénales et neurologiques) (**Solhjoo et al., 2021**).

## V) Traitements du lupus

Le LES étant une pathologie très hétérogène et caractérisée par des phases de poussées et de rémissions, cette maladie est complexe à traiter. Il n'existe pas à ce jour de traitements curatifs permettant de guérir définitivement du LES. Les traitements prescrits ont donc pour but d'améliorer et atténuer les symptômes et d'éviter les complications liées aux atteintes d'organes. Les traitements principalement employés sont les corticoïdes, les antipaludéens de synthèse et les immunosuppresseurs.

### 1) Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont utilisés pour traiter les formes mineures du LES telles que des atteintes articulaires peu sévères ou de la fièvre. Les AINS inhibent la production des cyclo-oxygénases COX-1 et COX-2 entraînant ainsi la diminution de la production de prostaglandines (molécules pro-inflammatoires). Les AINS peuvent générer des complications intestinales et rénales et sont donc fortement déconseillés chez les patients souffrant déjà d'une atteinte rénale. En effet, l'inhibition de la synthèse des prostaglandines par les AINS peut perturber l'homéostasie rénale et réduire la filtration glomérulaire (**Østensen and Villiger, 2001**).

## **2) Glucocorticoïdes**

Les glucocorticoïdes (GCT) représentent l'un des traitements les plus utilisés dans le traitement du lupus. Les GCT ont un effet anti-inflammatoire et immunosupresseur. Ils réduisent la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IL-6, TNF $\alpha$ ...) et inhibent l'expression des molécules d'adhésion entraînant une diminution du recrutement des leucocytes au site de l'inflammation (**Durcan et al., 2019**). La survenue d'effets secondaires est fréquente comme le développement d'une hyperglycémie, d'une ostéoporose, d'une obésité, d'une hypertension, ou d'une athérosclérose accélérée (**Kasturi and Sammaritano, 2016**). Pour éviter ces complications, le dosage des GCT doit régulièrement être ajusté et la posologie doit être maintenue au niveau le plus bas possible.

## **3) Antipaludéens de synthèse**

Parmi les traitements les plus couramment prescrits dans le lupus, on retrouve les antipaludéens de synthèse (APS). Ils sont représentés par l'hydroxychloroquine (HCQ) et la chloroquine (CQ) qui est principalement utilisée en cas d'intolérance à l'HCQ. Ces drogues modifient le système immunitaire en s'accumulant dans les lysosomes où elles augmentent leur pH, et modulent ainsi la présentation antigénique. De plus, elles sont également capables d'inhiber l'activation du TLR9 (**Felten et al., 2019**). Les APS sont très efficaces contre les atteintes cutanées et articulaires du lupus, et présentent des effets bénéfiques sur le risque de thrombose sans augmenter le risque infectieux.

## **4) Immunosuppresseurs**

### **4.1. Cyclophosphamide**

Le cyclophosphamide est un agent alkylant qui réagit avec les purines de l'ADN pour former des liaisons covalentes avec les substrats nucléophiles de l'ADN. Il en résulte une inhibition de la réponse des LT et LB. Le cyclophosphamide est principalement employé dans le lupus en cas de manifestations particulièrement sévères comme la néphrite lupique (**Felten et al., 2019**).

#### **4.2. Méthotrexate**

Le méthotrexate est un agent anti-métabolite qui empêche la synthèse des bases purines de l'ADN, et entraîne ainsi l'apoptose des cellules inflammatoires par arrêt de la synthèse d'ADN. Le méthotrexate réduit également la production de cytokines inflammatoires. Ce traitement est particulièrement efficace contre les manifestations cutanées et articulaires (**Felten et al., 2019**).

#### **4.3. Mycophénolate mofétيل**

Le mycophénolate mofétيل inhibe la synthèse de guanosines *de novo*, entraînant l'inhibition de la prolifération des LT et LB, et ainsi la production d'anticorps. Ce traitement est employé dans le cas de néphrites lupiques, mais également dans le cas d'atteintes cutanées résistantes à d'autres prescriptions, ou dans le cas de sérites. Lors du traitement des atteintes rénales, le mycophénolate mofétيل présente une efficacité similaire au cyclophosphamide mais avec une moindre toxicité (**Durcan et al., 2019**).

#### **4.4. Azathioprine**

L'azathioprine affecte la synthèse des bases puriques et entraîne donc l'arrêt de la synthèse de l'ADN. Ce médicament est utilisé pour traiter des patients souffrant de lupus neuropsychiatrique et d'insuffisance rénale sévère. Ce traitement a permis de diminuer les doses de GCT administrées aux patients. Il est également possible de le prescrire lors de la grossesse car il ne présente aucun risque tératogène contrairement aux autres traitements immunosuppresseurs (cyclophosphamide, méthotrexate ou mycophénolate mofétيل) (**Felten et al., 2019**).

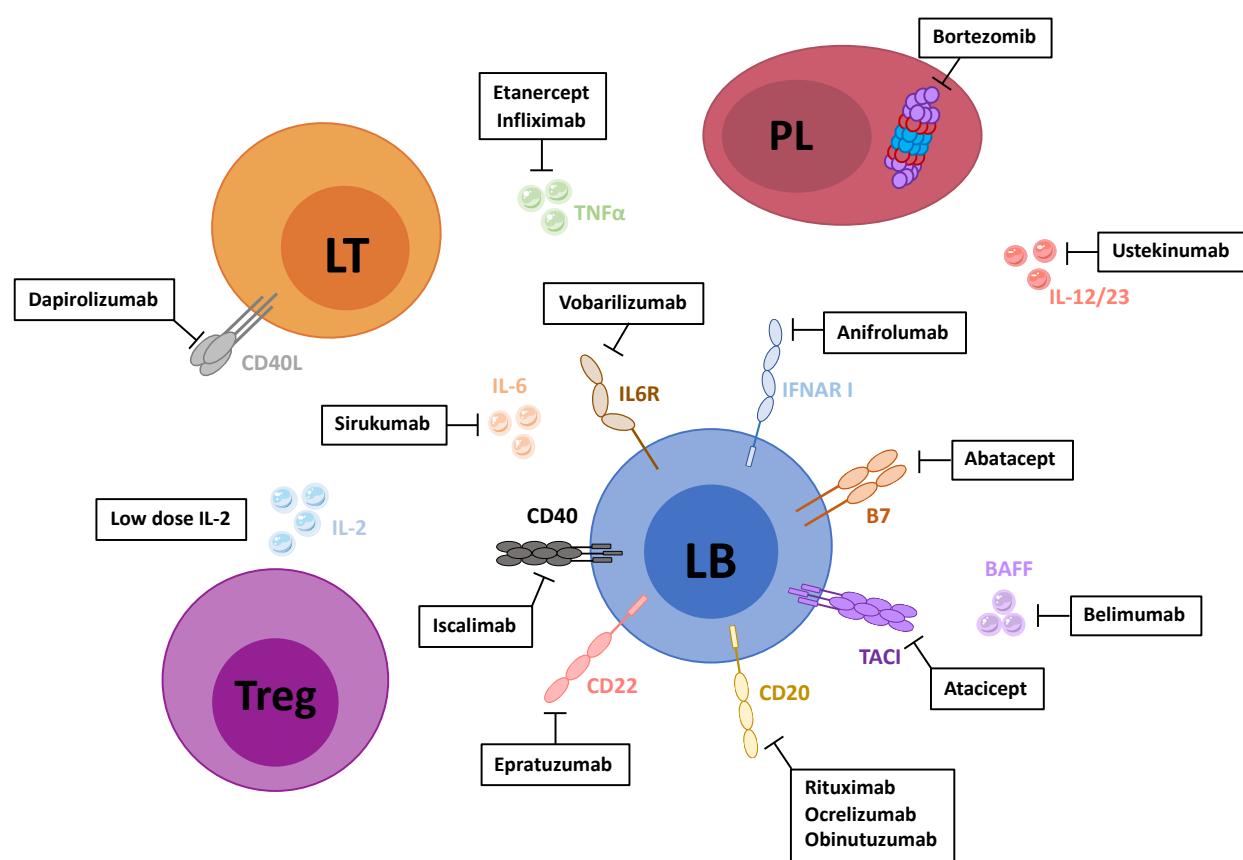
#### **4.5. Ciclosporine**

La ciclosporine a été le premier immunosuppresseur découvert permettant une régulation des LT sans toxicité excessive. La ciclosporine est un inhibiteur de la calcineurine qui conduit à l'inhibition des LT auxiliaires et de la production d'IL-2 et d'IFN $\gamma$ . Ce médicament

a d'abord été utilisé dans le cas de greffes d'organes, et est aujourd'hui prescrit dans le lupus (**Felten et al., 2019**).

## 5) Biothérapies

Jusqu'à peu, le traitement du lupus se basait principalement sur les médicaments classiques décrit ci-dessus (anti-inflammatoires, glucocorticoïdes, hydroxychloroquine, immunosupresseurs). Cependant, la prise en charge du lupus reste difficile en raison des effets indésirables générés par l'utilisation de ces thérapies conventionnelles, mais également par les formes réfractaires résistant encore à ces traitements. Ainsi, la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques est indispensable, et de nombreuses molécules ciblant des composés du système immunitaire sont en cours de développement dans le lupus (**Figure 10**).



**Figure 10. Nouvelles stratégies thérapeutiques du LES.** Différentes stratégies thérapeutiques (souvent représentées par des anticorps monoclonaux) sont étudiées dans le LES, ciblant diverses molécules ou cellules, en particulier les LB.

### **5.1. Rituximab (anti-CD20)**

Le rituximab est un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre la protéine CD20 humaine. Le CD20 est une protéine transmembranaire exprimée par toutes les cellules de la lignée lymphocytaire B excepté les plasmocytes (PL). Le fragment Fc de l'anticorps induit une cytotoxicité dépendante des anticorps et une cytotoxicité dépendante du complément qui provoque l'apoptose des cellules CD20<sup>+</sup> sur lesquelles l'anticorps s'est fixé (**Wise and Stohl, 2020**). De nombreuses équipes ont mis en évidence dans les années 2000 une certaine efficacité et l'absence de toxicité du rituximab chez des patients lupiques. A la suite de ces observations, deux essais de phase II/III ont été lancés mais n'ont malheureusement pas atteint leurs critères de jugement principaux (**Merrill et al., 2010; Rovin et al., 2012**). Ces résultats décevants peuvent notamment être expliqués par l'absence d'expression de CD20 à la surface des PL/plasmablastes (PB) qui produisent les auto-Ac. Cependant, le rituximab a montré son intérêt dans le traitement de certaines formes de néphrites lupiques et est efficace dans les formes réfractaires graves de lupus cutané. Il est utilisé en dehors d'une autorisation de mise sur le marché dans ces indications.

### **5.2. Belimumab (anti-BLyS/BAFF)**

La découverte de la cytokine BAFF (B-cell activating factor), également appelée BLyS (B lymphocyte stimulator), a permis d'avancer dans la recherche de traitements du lupus. BAFF est un facteur essentiel à la survie des LB. Cette cytokine est surexprimée dans le sérum de patients souffrant de lupus et la concentration sérique est corrélée à l'activité de la maladie. BAFF représente donc une cible thérapeutique de choix dans le lupus. Le belimumab est un anticorps monoclonal entièrement humanisé dirigé contre la cytokine BAFF qui est capable d'inhiber son activité biologique (**Wise and Stohl, 2020**). L'administration du belimumab induit la déplétion des LB naïfs et activés, et une réduction du titre des anticorps anti-ADN. Ce traitement a montré son efficacité au cours de différents essais cliniques de phases III (**Furie et al., 2011; Navarra et al., 2011**). Il est le premier agent biologique ayant reçu une autorisation d'emploi dans le traitement du lupus par la FDA (« Food and Drug Administration ») en 2011 (**Felten et al., 2019**). Actuellement, c'est toujours la seule biothérapie bénéficiant d'une AMM dans le lupus en France.

### **5.3. Anifrolumab (anti-IFNAR1)**

L'une des nouvelles pistes thérapeutiques la plus exploitée est le ciblage de la voie des IFN de type I. En effet, la concentration en IFN de type I est plus élevée dans le sérum de patients lupiques que dans le sérum d'individus sains, et une signature interféron de type I caractéristique est retrouvée chez certains patients lupiques. L'IFN $\alpha$  est impliqué dans l'activation et la différenciation de différentes cellules immunitaires comme les plasmocytes, ou les cellules dendritiques, ainsi que dans l'inactivation des Tregs. L'anifrolumab est un anticorps monoclonal humain dirigé contre le récepteur des IFN de type I (IFNAR1) et qui bloque l'activité des IFN de type I. Ce traitement a montré son efficacité au cours d'essais cliniques de phase III. Très récemment, en juillet 2021, la FDA a approuvé l'utilisation de l'anifrolumab dans le traitement du lupus. C'est le seul traitement approuvé depuis 10 ans et seulement le deuxième en 60 ans dans le lupus (**Mullard, 2021**).

### **5.4. Nouvelles biothérapies en développement**

**-Biothérapies ciblant les LB :** En plus du rituximab, d'autres anticorps ciblant la molécule CD20 et induisant la déplétion des LB sont étudiées : l'obinutuzumab (essai de phase II positif), et l'ocrelizumab dont l'essai de phase III n'a pas montré d'efficacité particulière (**Bag-Ozbek and Hui-Yuen, 2021**). Le ciblage d'autres molécules de surface tel que le récepteur inhibiteur CD22, est également prometteur en tant que nouvelle stratégie thérapeutique. En effet, l'epratuzumab est un anticorps monoclonal qui induit l'inhibition de l'activation des LB. Cet anticorps a été testé dans deux essais cliniques de phase III, mais malheureusement ces essais n'ont pas montré d'efficacité dans le lupus (**Clowse et al., 2017**). L'atacicept est une protéine de fusion humaine dirigée contre la protéine transmembranaire TACI, qui est le récepteur de BAFF et APRIL. Ce traitement n'a pas montré son efficacité lors d'un essai clinique de phase III (**Isenberg et al., 2015**). Dans le lupus, les plasmocytes à longue durée de vie sont également une cible intéressante. Ces cellules sont particulièrement résistantes aux traitements immunosuppresseurs conventionnels et continuent ainsi de produire des auto-Ac. L'une des stratégies pour cibler ces cellules est d'employer des inhibiteurs du protéasome tels que le bortezomib. Plusieurs études ont montré des résultats encourageants mais de nombreux

effets indésirables ont été observés (fièvre, hypersensibilité sévère) (**Bag-Ozbek and Hui-Yuen, 2021; Felten et al., 2018**).

**Cytokines et leurs récepteurs :** Outre les molécules de surface ciblant particulièrement les LB, les cytokines pro-inflammatoires et leurs récepteurs sont également étudiés pour essayer de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le lupus. Le TNF $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire dont la concentration est élevée dans le sérum et les reins de patients lupiques. En revanche, les essais cliniques utilisant des anti-TNF $\alpha$  (etanercept, infliximab) n'ont pas été concluants. Des inhibiteurs de l'IL-6 (sirukumab) ou du récepteur IL-6R (vobarilizumab, tocilizumab) n'ont également pas montré leur efficacité. Cibler les cytokines IL-12/23 avec l'anticorps ustekinumab semble présenter des résultats intéressants en essai de phase II. Enfin, une autre stratégie a consisté en l'administration de faibles doses d'IL-2 chez les patients lupiques. En effet, l'IL-2 active les Tregs et pourrait donc améliorer la régulation de l'immunité (**Felten et al., 2018**). Des travaux de 2016 relatent l'effet de l'administration de faibles doses d'IL-2 chez des patients lupiques. A la suite de ce traitement, les auteurs ont observé une augmentation de la fréquence des Tregs dans le sang (**He et al., 2016; von Spee-Mayer et al., 2016**), ainsi qu'une diminution de la fréquence des LT folliculaires helper (T<sub>FH</sub>), des Th17, et des LT doubles négatifs (LT DN) (**He et al., 2016**). De façon très intéressante, cette thérapie a également permis d'améliorer les capacités suppressives des Tregs *ex vivo* (**He et al., 2016**). Par ailleurs, les patients ayant reçu un tel traitement ont vu leurs symptômes cliniques diminuer.

**Signaux de costimulation :** La réponse immunitaire adaptative est notamment régulée par l'interaction entre les CPA, les LB et les LT *via* des molécules de surface. C'est pourquoi il est intéressant de cibler certaines molécules de co-stimulation afin de réguler l'activation du système immunitaire. Dans ce contexte, le récepteur inhibiteur CTLA-4 est une cible thérapeutique intéressante. En effet, en se liant aux récepteurs CD80/86 à la place de la molécule CD28, CTLA-4 entraîne l'inhibition de l'activation des LT. L'abatacept est une protéine de fusion qui mime l'action de CTLA-4 et diminue ainsi l'inflammation. Ce traitement est actuellement testé dans le lupus mais n'a pour le moment pas montré de résultats concluants. Différents traitements visant d'autres molécules de co-stimulations telles que CD40/CD40L ou ICOS/ICOSL sont évalués dans le lupus, mais l'essai du dapirolizumab (anti-

CD40L) s'est avéré négatif. Enfin, notre laboratoire est à l'origine du lupuzor, un peptide de 21 acides aminés provenant de la ribonucléoprotéine U1-70K, phosphorylée à la position Ser140 (**Monneaux et al., 2003**). Le lupuzor a montré son efficacité dans le modèle murin MRL<sup>lpr/lpr</sup> et sur des PBMC de patients lupiques *ex vivo*, en exerçant un effet tolérogénique et immunomodulateur (**Zimmer et al., 2013**). Cette molécule a récemment fait l'objet d'un essai clinique de phase III, mais a malheureusement montré des résultats décevants. En effet, associé aux traitements standards, le lupuzor n'a pas démontré d'augmentation significative du taux de réponse par rapport aux soins standards seuls.

**-Kinases intracellulaires :** Des inhibiteurs de kinases Janus Kinase (JAK) sont des traitements prometteurs dans le cadre du LES puisqu'ils supprimeraient les voies de signalisation induites par de multiples cytokines dont les IFN de type I. Plusieurs inhibiteurs sont à l'étude dans le LES et ont atteint un essai clinique de phase II (tofacitinib, spécifique de JAK1/JAK3 ; filgotinib, spécifique de JAK1), ou de phase III (baricitinib, spécifique de JAK1/JAK2) (**Felten et al., 2018**; **Tsang-A-Sjoe and Bultink, 2021**). Le baracitinib est actuellement évalué en phase III après des résultats encourageants en phase II.

## VI) Modèles murins de lupus

Les modèles murins de maladies humaines sont des outils considérables pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ces modèles peuvent être divisés en plusieurs catégories : les modèles spontanés (**Figure 11**), induits, et humanisés. Les différents modèles murins de lupus possèdent leurs propres caractéristiques, mais la plupart partagent des symptômes du lupus humain incluant la production d'auto-Ac, une activation lymphocytaire accrue et une néphrite lupique.

### 1) Modèles spontanés

#### 1.1. NZB/W F1

Le modèle spontané NZB/W F1 décrit dans les années 1960, est le plus ancien modèle murin de lupus décrit. Ce modèle est généré par le croisement des souches NZB (New Zealand

Black) et NZW (New Zealand White). Les souris NZB présentent tardivement des symptômes auto-immuns tels qu'une anémie hémolytique et une glomérulonéphrite liée aux dépôts de complexes immuns au niveau des reins entraînant la mort de ces souris à l'âge de 15-18 mois. La maladie se déclare particulièrement chez les femelles. La souche NZW est quant à elle saine mais les femelles peuvent développer une néphrite en fin de vie (**Howie and Helyer, 1968**). Les souris F1 NZB/W développent un phénotype lupique comparable à celui observé chez les patients lupiques. De façon similaire à l'Homme, la maladie se développe préférentiellement chez les femelles, avec un phénotype plus sévère que celui observé chez les mâles. En effet, le taux de survie est de 50% à 9 mois chez les femelles contre 15 mois pour les mâles. Les souris NZB/W femelles présentent une lymphadénopathie, une splénomégalie, des taux élevés d'auto-Ac anti-ADN et anti-nucléaires dans leur sérum, et une glomérulonéphrite médiaée par les complexes immuns qui se développe à l'âge de 5-6 mois entraînant une insuffisance rénale (**Andrews et al., 1978; Dixon et al., 1978; Helyer and Howie, 1963**). De nombreux auto-Ac sont retrouvés à la fois chez ce modèle murin et les patients lupiques incluant les auto-Ac anti-ADNdb et anti-chromatine, anti-RNP (anti-Sm, anti-snRNP-U1-70K, anti-hnRNP-A2/B1) (**Monneaux et al., 2001**), et anti-histones (**Brick et al., 1990**). La maladie se développant majoritairement chez les femelles, ce modèle représente également l'importance des hormones dans la pathogénèse lupique. En effet, des femelles NZB/W ayant subi une ovariectomie présentent un retard d'apparition des symptômes du lupus et une diminution du taux d'auto-Ac dans leur sérum (**Roubinian et al., 1978**). De plus, la maladie est exacerbée chez des souris NZB/W femelles ayant subi une ovariectomie et traitées par de l'œstradiol, suggérant ainsi un rôle pathogène des œstrogènes dans le lupus (**Roubinian et al., 1978**).

## 1.2. NZM

En 1993, Rudofsky *et al.*, ont décrit un nouveau modèle murin de lupus, le modèle NZM (New Zealand Mixed), résultant du croisement accidentel entre une souris NZB/W F1 et une souris NZW suivi de différents croisements, générant ainsi 27 souches différentes de souris NZM (**Rudofsky et al., 1993**), dont les souches NZM2328 et NZM2410 qui sont aujourd'hui utilisées comme modèles murins de lupus. Les souches NZM2410 et NZM2328 produisent les mêmes auto-Ac que les NZB/W mais les souris NZM2410 développent plus rapidement et plus

sévèrement une glomérulonéphrite par rapport à la souche NZB/W (**Rudofsky et al., 1993**). Le caractère homozygote de cette souche NZM2410 a permis d'étudier l'importance de la génétique dans le développement du lupus. En croisant la souche NZM2410 avec la souche C57BL/6, un nouveau modèle congénique a été mis en évidence combinant trois loci de susceptibilité, *Sle1*, *Sle2* et *Sle3*, nécessaires et suffisants pour induire un phénotype lupique dans le modèle murin non auto-immun C57BL/6 (**Morel et al., 1994**).

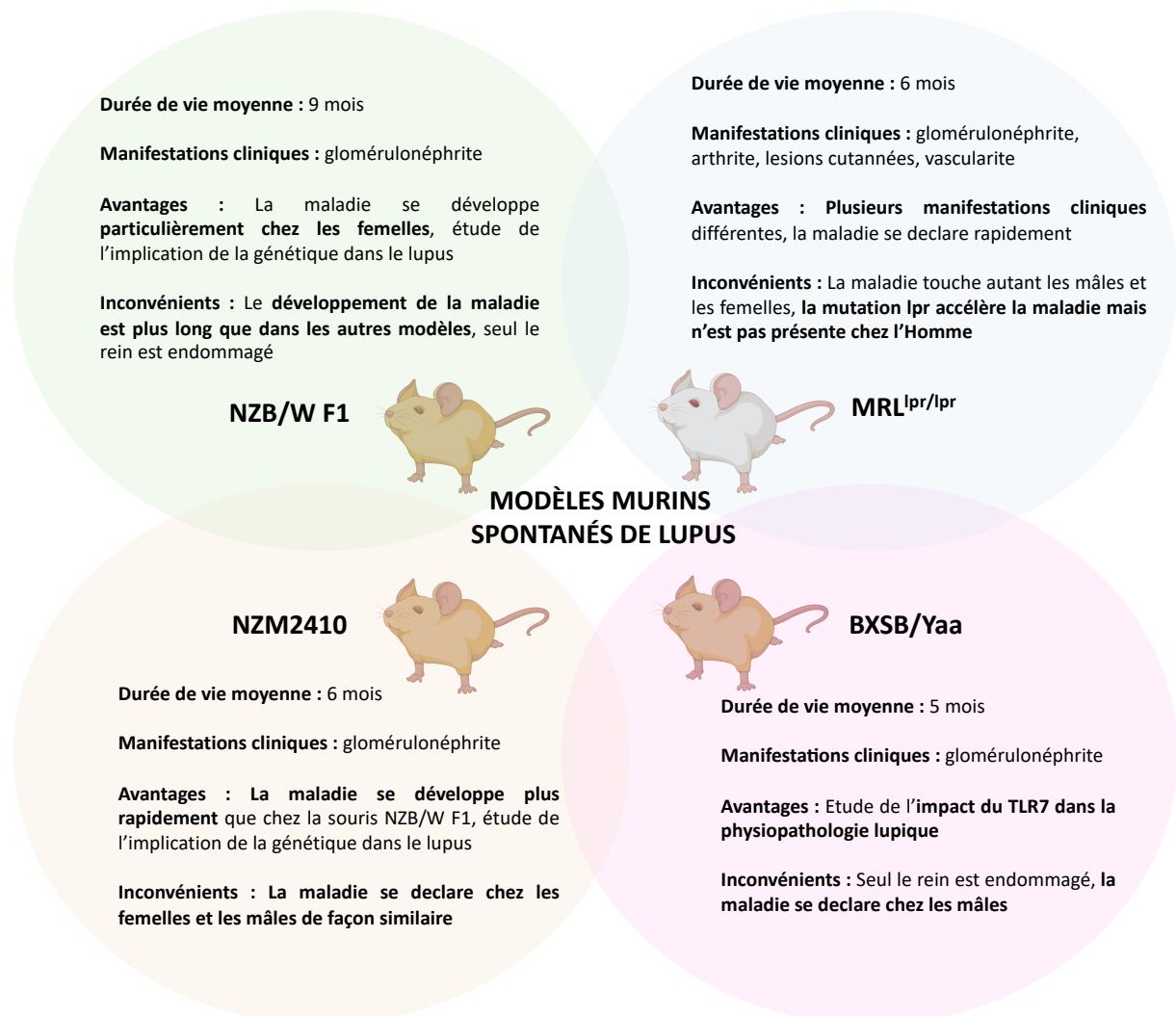
### 1.3. MRL/lpr

La souche MRL/lpr générée en 1976 après croisement de 4 souches de souris différentes (LG/J, C3H/Di, C57BL/6 et AKR/J), porte une mutation spontanée nommée lpr pour lympho-prolifération. Cette mutation entraîne une altération de la transcription du gène FAS, un régulateur majeur de l'apoptose des cellules immunitaires. Les souris portant cette mutation développent une lymphadénopathie et une splénomégalie résultant de l'accumulation de LB et de LT. De façon intéressante, ces souris présentent des LT DN (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>) auto-réactifs qui sont également observés chez certains patients lupiques. Dans ce modèle, les souris produisent un large spectre d'auto-Ac caractéristiques du lupus tels que les auto-Ac anti-ADNdb, anti-nucléaires, anti-Sm ou anti-Ro, menant à une grande quantité de complexes immuns circulants. Les souris MRL/lpr développent un lupus sévère caractérisé par des atteintes cutanées, articulaires et rénales, et un taux de survie moyen de 5 mois (**Andrews et al., 1978; Eisenberg et al., 1978**). En raison des similitudes avec la pathologie humaine, ce modèle murin est souvent utilisé pour l'évaluation de traitements candidats du lupus, et a également permis de mettre en évidence le rôle des TLR7 et 9 dans le lupus (**Christensen et al., 2006**). Toutefois, les mâles comme les femelles développent la maladie, et, contrairement à la pathologie humaine caractérisée par une signature IFN de type I, le développement du lupus chez les MRL/lpr est médié par l'IFN $\gamma$  (**Hron and Peng, 2004**).

### 1.4. BXSB/Yaa

Le modèle nommé BXSB/Yaa dérivant d'un croisement entre une femelle C57BL/6 et un mâle SB/Le, et d'un rétrocroisement avec une souris SB/Le a été développé en 1978. Ces souris développent un phénotype lupique caractérisé notamment par une

hypergammaglobulinémie, une production d'auto-Ac anti-nucléaires, et une glomérulonéphrite médiaée par les complexes immuns qui induit la mort des mâles BXSB/Yaa en moyenne à 5 mois et des femelles en moyenne à 15 mois (**Andrews et al., 1978**). Le développement sévère et rapide de la maladie chez les mâles est dû à la présence d'un locus de susceptibilité sur le chromosome Y (Yaa). Ce locus provient de la translocation de l'extrémité télomérique du chromosome X vers le chromosome Y, entraînant la duplication de 16 gènes incluant le gène codant pour le TRL7. Ce phénomène a été particulièrement intéressant pour démontrer le rôle de la production des IFN de type I via l'activation du TLR7 dans la pathogénèse lupique (**Pisitkun et al., 2006; Subramanian et al., 2006**).



**Figure 11.** Caractéristiques des modèles murins spontanés de lupus.

### **1.5. Modèle DNASE1L3-KO**

Enfin, de nombreux modèles de souris transgéniques ou knock-out présentent des caractéristiques phénotypiques et cliniques proches du lupus humain. Nous pouvons citer par exemple, le cas du modèle DNASE1L3-KO. La DNASE1L3 est une DNase capable de dégrader l'ADN contenu dans les corps apoptotiques ou nécrotiques. De par la digestion de l'ADN présent dans les microparticules de cellules apoptotiques, la DNASE1L3 participe à la prévention du développement de l'auto-immunité. En effet, il a été montré que des souris C57BL/6 ou 129SvEv déficientes pour la DNASE1L3 développent des auto-Ac anti-ADNdb et anti-chromatine. De plus, ces souris présentent des symptômes caractéristiques du lupus tels qu'une splénomégalie accompagnée d'une formation spontanée de centres germinatifs, et d'une augmentation de la fréquence des LB du centre germinatif. Enfin, une déficience en DNASE1L3 dans les deux fonds génétiques induit un dépôt d'IgG au niveau des reins, ainsi qu'une glomérulonéphrite à 50 semaines chez les souris de souche 129SvEv (**Sisirak et al., 2016**). Très récemment, ce modèle a permis de mettre en évidence le potentiel thérapeutique du ciblage de la P-sélectine dans le lupus. En effet, l'interaction de la P-sélectine avec les Tregs altère le phénotype de ces cellules et limite leurs capacités suppressives (**Scherlinger et al., 2021**).

## **2) Modèles induits**

### **2.1. Modèle induit au pristane**

Le pristane (2,6,10,14-tetramethyl-pentadecane, TMPD) est un alkane terpénoïde retrouvé à forte concentration dans les huiles minérales, qui, lorsqu'il est injecté dans la cavité intrapéritonéale de souris saines, induit la formation d'ascite riche en anticorps monoclonaux. Une injection de pristane chez des souris BALB/c entraîne après quelques mois le développement d'une maladie semblable au lupus caractérisée par de l'arthrite et une glomérulonéphrite, ainsi qu'une production d'auto-Ac caractéristiques du lupus tels que des auto-Ac anti-histones, anti-ADN ou anti-RNP (**Satoh and Reeves, 1994; Satoh et al., 1995**). Il a été montré que l'induction du lupus par le pristane est médiée par une forte réponse IFN de type I. De par cette caractéristique, le modèle pristane représente un bon modèle pour l'étude de la signature interféron retrouvée chez les patients lupiques.

## **2.2. Modèle induit au resiquimod/imiquimod**

Récemment, il a été décrit que l'application cutanée répétée d'agonistes des TLR7/8, Resiquimod (R848) ou Imiquimod (R837), sous forme de crème au niveau des oreilles de souris BALB/c, induit un phénotype lupique. En effet, les souris soumises à cette application développent des auto-Ac, une splénomégalie et une glomérulonéphrite médiée par les complexes immuns (**Yokogawa et al., 2014**). Comme attendu après activation du TLR7, ces souris présentent de forts taux d'IFN de type I dans leur sérum.

## **2.3. Modèle de la maladie du greffon contre l'hôte**

D'autres études se sont intéressées au modèle de la maladie du greffon contre l'hôte (« Graft-versus-host disease », GVHD) comme modèle de lupus. En effet, une transplantation de moelle osseuse de l'un des deux parents dans une souris F1 peut induire soit *i*) une maladie du greffon contre l'hôte chronique, soit *ii*) une maladie du greffon contre l'hôte aigüe avec manifestation de symptômes lupiques tels que la production d'auto-Ac et une néphrite. Le développement de l'une ou l'autre des formes de cette maladie dépend des combinaisons de souche de souris utilisées. De plus, la maladie du greffon contre l'hôte étant une maladie principalement médiée par les LT, ce modèle induit de lupus a permis d'étudier l'implication des LT auto-réactifs dans les dommages tissulaires et la production d'auto-Ac par les LB (**Eisenberg and Via, 2012**).

## **3) Modèles humanisés**

### **3.1. Greffe de PBMC de patients lupiques dans des souris SCID**

Les souris immunodéficientes ont permis d'établir des modèles murins humanisés de lupus. En effet, l'administration intrapéritonéal de PBMC de patients lupiques dans des souris SCID entraîne le développement d'un lupus. Les souris développent des auto-Ac anti-ADNdb, de la protéinurie et une glomérulonéphrite (**Duchosal et al., 1990**). De façon similaire, la transplantation de PBMC de patients lupiques dans des souris BALB/c RAG-2<sup>-/-</sup> IL2R<sup>-/-</sup>, engendre également des symptômes lupiques (auto-Ac anti-ADN, protéinurie, dépôts de complexes immuns dans les reins) (**Andrade et al., 2011**). Ces modèles sont très intéressants pour étudier l'implication de nombreuses cellules immunitaires dans la pathogénèse lupique.

En revanche, ils présentent certaines limitations : la greffe de cellules humaines peut être compliquée et peu efficace et elle nécessite une quantité importante de PBMC alors que les patients lupiques sont parfois lymphopéniques.

### **3.2. Greffe de cellules souches hématopoïétiques humaines dans des souris NSG suivie d'induction au pristane**

Plus récemment, un nouveau modèle murin humanisé de lupus induit au pristane a été développé. En effet, une greffe de cellules souches hématopoïétiques humaines CD34<sup>+</sup> dans des souris NSG irradiées, suivie d'une injection de pristane, a permis le développement d'un phénotype lupique chez ces souris. Ce protocole d'induction engendre la production d'un large spectre d'auto-Ac antinucléaires humains (anti-ADNdb, anti-histone, anti-RNP70, anti-Sm, anti-SSA), ainsi que des manifestations cliniques caractéristiques du lupus humain telles que l'apparition de protéinurie et d'une néphrite lupique. Ce modèle est intéressant pour l'étude *in vivo* de la pathogénèse lupique et l'évaluation de nouveaux traitements avec un fond immunitaire humain (**Gunawan et al., 2017**).

## **4) Exemples d'avancées thérapeutiques générées grâce au modèle murin NZB/W F1**

Différents traitements visant à améliorer les symptômes lupiques ont été évalués dans les modèles murins de lupus, notamment dans le modèle spontané NZB/W. La plupart de ces études ont été poursuivies par des essais cliniques chez l'Homme (**cf partie V**).

Cibler des cytokines ayant un rôle pathogène dans le lupus est l'une des voies envisagées pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'IL-6 est une cytokine multifonctionnelle produite par les macrophages, les monocytes, les LB et les LT. Cette cytokine est impliquée dans la différenciation des T<sub>FH</sub>, la différenciation et la maturation des LB, ainsi que dans la sécrétion d'immunoglobulines ou la fonction des macrophages. Le traitement des souris par un anticorps anti-IL-6 réduit la prolifération des LB, la production d'auto-Ac anti-ADNdb, et les atteintes rénales (**Liang et al., 2006**). De plus, un traitement par un anticorps dirigé contre le récepteur à l'IL-6 avait également permis d'inhiber la production d'auto-Ac et par conséquent, ce traitement a augmenté la durée de vie des souris (**Mihara et**

**al., 1998).** L'IL-10 est une cytokine aux propriétés à la fois immunsuppressives et immunostimulatrices produite par de nombreuses cellules immunitaires tels que les LT, les macrophages, les cellules dendritiques (DC) ou les LB. Cette cytokine joue un rôle régulateur en inhibant la réponse Th1 et ainsi la production d'IFN $\gamma$ , mais peut également promouvoir la prolifération des LB et la production d'IgG1, IgG3 et d'IgA. Chez des souris jeunes non malades, la neutralisation de l'IL-10 par un anticorps monoclonal anti-IL-10 tarde l'apparition de la maladie et augmente la survie des souris à 9 mois, suggérant un rôle pathogène de l'IL-10 (**Ishida et al., 1994**). Toutefois, le traitement de souris ayant développé les premiers symptômes de la maladie avec un anticorps anti-IL-10R, accélère la progression de la pathologie, suggérant cette fois, que la voie de l'IL-10 est protectrice une fois la maladie déclarée (**Amend et al., 2021**).

Le ciblage des LB et des LT est également exploité pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le lupus. La molécule CD20 exprimée par les LB est une protéine transmembranaire, qui, lorsqu'elle est ciblée par un anticorps monoclonal anti-CD20, favorise la survie des souris âgées (**Haas et al., 2010**). Cet anticorps déplète les LB par un mécanisme de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). L'interaction entre les molécules CD80/86 exprimées par les cellules présentatrices d'antigènes et les molécules co-stimulatrice CD28 et co-inhibitrice CTLA-4 exprimées par les LT, est une voie de régulation importante du système immunitaire. Les molécules de co-signification sont donc intéressantes à cibler dans le cadre des maladies auto-immunes. De façon intéressante, des souris exprimant une protéine de fusion CTLA-4-Ig murine voient une amélioration de leurs symptômes lupiques et une augmentation de leur survie (**Mihara et al., 2000**).

Pour finir, l'une des avancées les plus importantes concerne la cytokine BAFF. Cette cytokine est produite notamment par les cellules myéloïdes et les LT activés et est impliquée dans le développement et la survie des LB. BAFF se lie à trois récepteurs à la surface des LB : TACI (« transmembrane activator and calcium modulator ligand interactor »), BCMA (Antigène de maturation des LB) et BAFF récepteur. Cibler le récepteur TACI à l'aide d'une protéine de fusion TACI-Ig, inhibe le développement de la protéinurie et augmente la survie des animaux traités (**Gross et al., 2000**). De plus, une co-administration de la protéine TACI-Ig

et de la protéine CTLA-4-Ig induit une déplétion des LB spléniques, prolonge la survie et réverse la protéinurie chez les souris NZB/W âgées (**Ramanujam et al., 2004**). Ces études ont ouvert la porte aux essais cliniques sur le Belimumab (anticorps monoclonal anti-BAFF), première biothérapie approuvée aujourd’hui pour le traitement du lupus.

## **B) Les acteurs de la réponse auto-immune**

### I) Rupture de tolérance et développement de l'auto-immunité

#### 1) Rupture de tolérance

Différents facteurs sont impliqués dans l'initiation et la progression de l'auto-immunité au cours du LES. Au cours de leur développement, les lymphocytes peuvent exprimer des récepteurs spécifiques d'auto-antigènes et donc présenter un caractère auto-réactif. En condition physiologique, des mécanismes de tolérance centrale préviennent la maturation des lymphocytes auto-réactifs, et des mécanismes de tolérance périphériques régulent les lymphocytes matures qui auraient échappé aux premiers points de contrôles. Au niveau de la moelle osseuse, et lors d'une forte interaction entre un LB immature et un auto-antigène, le BCR du LB auto-réactif peut subir des modifications. Ce phénomène est nommé « édition de récepteur », et permet la synthèse d'un nouveau BCR non-auto-réactif. Les LB auto-réactifs peuvent également être éliminés par apoptose, ou devenir anergiques, c'est-à-dire inactifs en cas de rencontre avec un auto-antigène. Les LB auto-réactifs qui ont échappé aux mécanismes de tolérance centrale, peuvent être éliminés par la suite par des mécanismes de sélection périphériques (induction de l'anergie des LB, apoptose, ou régulation par des récepteurs inhibiteurs) au niveau des organes lymphoïdes secondaires (OLS). Dans le cas du LES, les patients présentent une rupture de tolérance due à un défaut des différents points de contrôles présentés ci-dessus (**Malkiel et al., 2016; Yurasov et al., 2005**). Les LT sont eux, sélectionnés au niveau du thymus, puis en périphérie dans les OLS. En périphérie, les LT auto-réactifs peuvent être éliminés par apoptose, être inactivés fonctionnellement (anergie), ou être inhibés par des Tregs. Dans le LES, le phénotype et la fonctionnalité des Tregs qui sont des acteurs majeurs du maintien de la tolérance périphérique, sont très étudiés. Bien que les études concernant la fréquence ou la fonctionnalité de ces cellules peuvent être contradictoires dans la littérature, des défauts fonctionnels des Tregs ont été rapportés chez les patients lupiques (**Ohl and Tenbrock, 2015**).

#### 2) Défaut de l'apoptose et de la clairance apoptotique

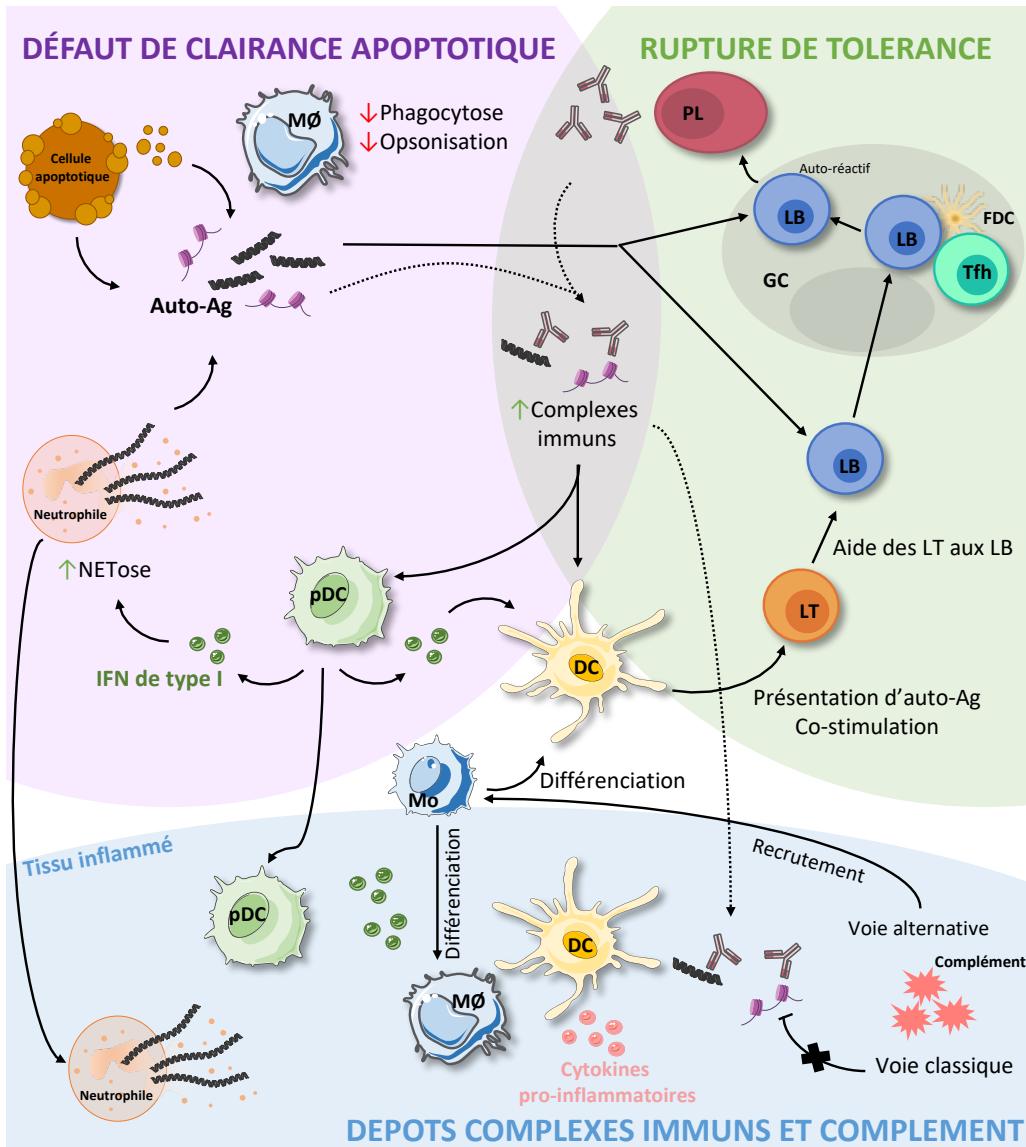
La phagocytose est un phénomène de mort cellulaire programmée déclenché par divers signaux (TNF $\alpha$ , perforine, FasL...) qui engendre une activation en série de caspases qui

vont dégrader de nombreux composants protéiques et induire la fragmentation de l'ADN. En condition physiologique, les corps apoptotiques sont phagocytés par les macrophages et n'induisent pas de réaction inflammatoire : ce mécanisme est alors directement impliqué dans le phénomène de tolérance périphérique. Une augmentation de l'apoptose des cellules immunitaires (lymphocytes, neutrophiles, macrophages) est observée dans les PBMC de patients lupiques, et, comme présenté dans la **partie IV 1 a**, l'exposition des patients aux UV induit une apoptose importante des kératinocytes. Cet excès d'apoptose entraîne une accumulation des corps apoptotiques riches en auto-antigènes nucléaires impliqués dans la rupture de tolérance (**Casciola-Rosen et al., 1994**). Plus récemment, il a été montré que la mort cellulaire des neutrophiles appelée NETose, est également une source d'auto-antigènes. En effet, lors de la NETose, les neutrophiles relarguent dans le milieu extracellulaire leur contenu nucléaire (NET; Neutrophil Extracellular Traps), rendant ainsi accessible la chromatine et des protéines nucléaires (**Knight et al., 2012**) (**Figure 12**).

En plus d'un excès d'apoptose, il existe chez les patients lupiques un défaut de clairance des corps apoptotiques. En effet, il a été décrit que les macrophages de patients LES présentent un défaut de phagocytose du matériel apoptotique (**Herrmann et al., 1998**) et une morphologie différente : ils sont plus petits et peu capables d'ingérer du matériel apoptotique (**Pieterse and van der Vlag, 2014**). De plus, le nombre de macrophages retrouvés au niveau du centre germinatif (GC), ayant pour rôle de phagocytter le matériel apoptotique présent dans le GC, est réduit chez les patients. En condition physiologique, il n'y a pas d'accumulation de débris apoptotiques dans les GC puisqu'ils représentent une source potentielle d'auto-antigènes (**Mahajan et al., 2016**), alors qu'en condition lupique, le matériel apoptotique est moins phagocyté et se retrouve à la surface des cellules dendritiques folliculaires (FDC) qui peuvent alors apporter des signaux de survie aux LB auto-réactifs (**Baumann et al., 2002**).

L'élimination des débris apoptotiques repose sur la bonne détection des cellules apoptotiques. En plus de l'exposition de résidus phosphatidylsérines à la surface de la cellule, la reconnaissance des cellules apoptotiques dépend de protéines opsonisantes telles que les IgM, la protéine MBL (Mannose-Binding Lectin), ou encore les protéines du système du complément. De nombreuses études démontrent l'implication de ces protéines dans le défaut de clairance apoptotique retrouvé dans le LES : par exemple, la diminution des IgM sériques

et l'augmentation de la protéine MBL chez les patients est corrélée à l'activité de la maladie (Pieterse and van der Vlag, 2014).



**Figure 12. Aperçu des voies immunologiques menant au LES.** Les défauts de l'immunité innée entraînent un défaut de phagocytose et de clairance apoptotique (violet) induisant un relargage d'auto-anticorps. La rupture de tolérance (vert) induit une augmentation de la fréquence de LB autoréactifs producteurs d'auto-anticorps qui vont former des complexes immuns avec les auto-anticorps cités précédemment. Ces complexes immuns se déposent dans les organes cibles tels que les reins (bleu) et induisent des dommages tissulaires (Inspirée de Zharkova et al 2017). DC : cellule dendritique ; pDC : cellule dendritique plasmacytoidé ; FDC : cellule dendritique folliculaire ; Mo : monocyte ; MØ : macrophage ; GC : centre germinatif ; LT : lymphocyte T ; LB : lymphocyte B ; Tfh : lymphocyte T folliculaire

Dans le cas de la NETose, les macrophages éliminent les NETs à l'aide de la DNase I. En effet, cette enzyme dégrade l'ADN, composé principal des NETs. L'activité de la DNase I est

réduite chez de nombreux patients lupiques, et cette faible activité est corrélée à une forte production d'auto-Ac anti-ADNdb et des symptômes lupiques sévères (**Skiljevic et al., 2013**). De plus, deux études indépendantes ont confirmé que la fixation d'auto-Ac sur les NETs bloque la dégradation de ces derniers, en empêchant l'action de la DNase I (**Hakkim et al., 2010; Leffler et al., 2012**).

### 3) Dépôts de complexes immuns et implication du complément

Les dommages tissulaires observés au cours du LES sont associés au dépôt de complexes immuns et à l'activation du complément dans les organes cibles. Les protéines du complément C1q et C4 opsonisent les débris apoptotiques et les complexes immuns et facilitent leur élimination par les phagocytes. Le complément joue un rôle paradoxal dans le LES puisqu'il peut à la fois être protecteur et induire des dommages tissulaires. En effet, des souris déficientes pour C1q développent rapidement des auto-Ac dirigés contre des antigènes nucléaires, indiquant le rôle protecteur de C1q et de la voie classique du complément dans le LES (**Botto et al., 1998**) (**Figure 12**). En revanche, la voie du complément peut également être néfaste dans le cas du LES. Les protéines du complément sont observées dans les biopsies rénales de patients lupiques, co-localisent avec les dépôts de complexes immuns, et ces dépôts sont corrélés avec la sévérité de la maladie (**Tan et al., 2013**). Par ailleurs, des souris lupiques MRL<sup>lpr/lpr</sup> déficientes pour des molécules associées à la voie alterne du complément voient leurs symptômes lupiques diminuer (**Watanabe et al., 2000**). En résumé, la voie classique du complément facilite l'élimination des cellules apoptotiques et des complexes immuns, réduisant ainsi le risque de développer des réactions auto-immunes contre des auto-antigènes. Toutefois, le système du complément peut également participer aux dommages tissulaires et entretenir l'inflammation en recrutant des leucocytes et en induisant la production d'IFN de type I par les pDC au site de l'inflammation (**Figure 12**).

## II) Dérégulation de l'activation du système immunitaire inné

En raison de la forte implication des IgG auto-réactives dans la pathologie, le développement du lupus a longtemps été associé à des dysfonctionnements du système immunitaire adaptatif, particulièrement des LB. Ce dogme a rapidement été aboli avec les

rapides avancées indiquant un rôle important des cellules du système immunitaire inné dans la pathogénèse de la maladie.

### **1) Cellules dendritiques conventionnelles**

Les DC sont à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Elles sont impliquées dans la tolérance immunitaire mais peuvent aussi participer à l'initiation de réactions auto-immunes. En effet, les DC participant à la tolérance en présentant des auto-antigènes dans le thymus afin de sélectionner les LT non-auto-réactifs (**Bonasio et al., 2006**). En périphérie, la présentation d'auto-antigènes par les DC entraîne l'anergie des LT auto-réactifs en induisant l'expression de récepteurs inhibiteurs tels que PD1 ou CTLA-4 à la surface des cellules auto-réactives (**Probst et al., 2005**). Par ailleurs, les DC sont impliquées dans la génération de Tregs dans le thymus (**Proietto et al., 2008**), mais également en périphérie (**Suffner et al., 2010**).

Diverses études ont montré l'implication des DC dans le LES. Des souris lupiques MRL<sup>lpr/lpr</sup> déficientes en DC présentent une amélioration des symptômes de la maladie, une diminution de l'expansion des LT et de la production d'auto-Ac (**Teichmann et al., 2010**). De plus, les DC de patients lupiques ont un profil d'expression de molécules co-stimulatrices (augmentation de l'expression de CD86) et co-inhibitrices (diminution de l'expression de CD32b) (**Carreño et al., 2009; Decker et al., 2006**) différent de celui observé chez les individus sains. L'augmentation de l'expression de CD86 implique que les DC sont plus aptes à la présentation antigénique et donc à la rupture de tolérance.

### **2) Cellules dendritiques plasmacytoides**

Les pDC, de par leur production d'IFN de type I, sont très impliquées dans le LES. Les pDC représentent moins de 1% des PBMC mais sont les producteurs majeurs d'IFN de type I. Ces cellules peuvent reconnaître des motifs pathogènes *via* les TLR7 et 9 notamment. Des études ont montré une diminution du nombre de pDC dans le sang chez les patients lupiques, et une augmentation du nombre de pDC dans les infiltrats au niveau des reins, suggérant que ces cellules une fois activées, migrent vers les organes cibles (**Fiore et al., 2008; Tucci et al.,**

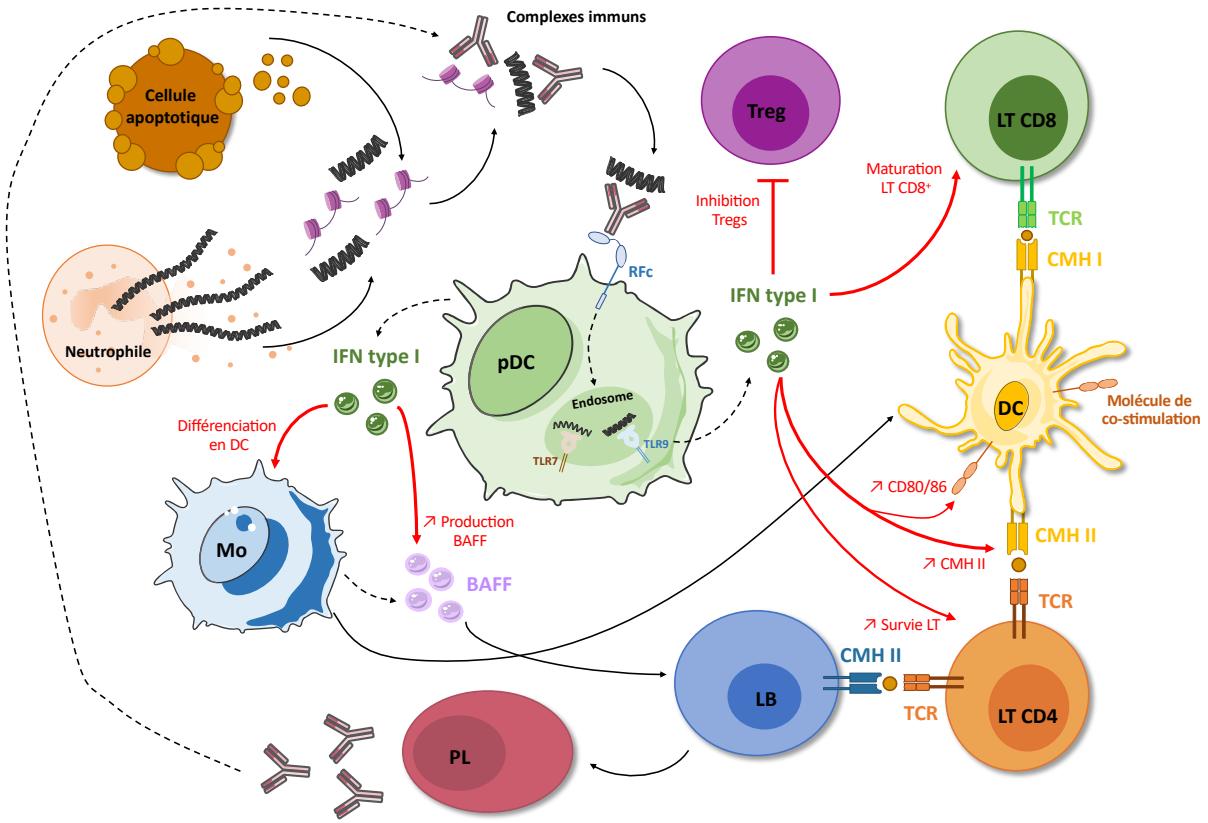
**2008).** Une accumulation de pDC dans les lésions cutanées a aussi été révélée (**Blomberg et al., 2001; Farkas et al., 2001**). De plus, des changements phénotypiques et fonctionnels des pDC sont observés dans le LES. Les pDC de patients lupiques expriment fortement les marqueurs CD40 et CD86, et ont une importante capacité à induire la prolifération des LT (**Jin et al., 2010; Nie et al., 2010**). Par ailleurs, l’implication des pDC dans le LES a été montrée dans le modèle murin de lupus BXSB. En effet, la déplétion des pDC dans ces souris réduit les symptômes de la maladie, la production d’auto-Ac et l’atteinte rénale (**Rowland et al., 2014**).

### **3) TLR et IFN de type I**

Le système immunitaire inné représente la première ligne de défense de l’organisme et se base sur la reconnaissance de signaux de danger par des récepteurs connus sous le nom de PRR (Pattern-Recognition Receptors) qui reconnaissent des molécules spécifiques portées par des pathogènes, appelées Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs), ou des molécules endogènes produites en situation de stress, appelées Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs). Ces récepteurs sont notamment représentés par des récepteurs nommés Toll-Like Receptors (TLR). Parmi les molécules capables de lier les TLR et de les activer, on retrouve l’ADN hypométhylé (motifs CpG) et l’ARN simple brin. Ces molécules sont reconnues respectivement par le TLR9 et les TLR7/8. La localisation intracellulaire de ces TLR implique l’internalisation et l’acheminement de leurs ligands jusqu’aux compartiments endosomaux. De ce fait, les complexes immuns sont reconnus par les pDC *via* le Fc $\gamma$ RIIA (CD32a), endocytés, puis les molécules composant ces complexes immuns sont reconnues par les TLR. Les complexes immuns peuvent aussi être reconnus par les LB *via* le BCR ou le CD32a, être transportés dans les endosomes et activer les LB par les TRL7/9. L’implication de ces TLR dans la pathogénèse lupique a été étudiée dans le modèle murin de lupus MRL<sup>lpr/lpr</sup>. La pathologie lupique est aggravée chez des souris MRL<sup>lpr/lpr</sup> traitées par un agoniste du TLR9 (CpG) (**Anders et al., 2004**) ou du TLR7 (imiquimod) (**Pawar et al., 2006**). En revanche, les TLR9 et 7 ont des rôles contradictoires dans le développement de la pathologie. En effet, des souris MRL<sup>lpr/lpr</sup> déficientes pour TLR7 produisent peu d’auto-Ac et présentent une néphrite lupique moins sévère que les souris sauvages, alors que la maladie est exacerbée chez des souris déficientes pour TLR9 (**Christensen et al., 2006**). Au regard de ces résultats, il a été montré que l’aggravation de la maladie chez les souris MRL<sup>lpr/lpr</sup> TLR9<sup>-/-</sup> peut être inversée si les souris

sont également déficientes pour l'expression de TLR7. Par conséquent, le TLR9 pourrait jouer un rôle protecteur dans le LES en étant un régulateur négatif de la voie TLR7 (**Nickerson et al., 2010**). Récemment, Tilstra et al., ont confirmé ce rôle protecteur du TLR9 dans le modèle MRL<sup>lpr/lpr</sup>. En effet, la sur-expression du TLR9 dans les LB induit la diminution de l'atteinte rénale chez ces souris (**Tilstra et al., 2020**). De façon intéressante, les LB de patients lupiques sont hypo-réactifs à une stimulation du TLR9 *in vitro*, suggérant que cette déficience pourrait participer à la rupture de tolérance dans le LES (**Gies et al., 2018; Sieber et al., 2014**).

Dans le LES, la sur-activation des pDC provoquée par la reconnaissance de molécules contenues dans les complexes immuns (ADN ou ARN) par les TLR7/9, entraîne une forte production d'IFN de type I. Le taux d'IFN $\alpha$  retrouvé dans le sérum de patients lupiques corrèle avec l'activité de la maladie, la présence d'auto-Ac anti-ADN, et la sévérité des symptômes, comme le développement d'une néphrite lupique (**Kim et al., 2015**). Les IFN de type I sécrétés par les pDC induisent également la maturation des DC conventionnelles capables de phagocytter les corps apoptotiques. Les DC peuvent alors présenter des auto-antigènes aux LT, entraînant une réponse auto-réactive accompagnée d'une production d'auto-Ac qui seront impliqués dans la formation de nouveaux complexes immuns qui activeront à leur tour les pDC, perpétuant ainsi la production d'IFN de type I (**Pan et al., 2020**). Dans le cas du lupus, l'IFN $\alpha$  présent dans le sérum de patients lupiques est capable d'induire la différenciation de monocytes en DC *in vitro*, ainsi que l'augmentation de l'expression des molécules HLA et des molécules de co-stimulation (CD80, CD86) à la surface de ces cellules. L'IFN $\alpha$  augmente ainsi la présentation antigénique aux LT auto-réactifs et participe à la différenciation des LB en cellules sécrétrices d'auto-Ac (**Blanco et al., 2001**). L'IFN $\alpha$  permet également d'augmenter la survie des LT, d'inhiber les fonctions suppressives des Tregs, et d'induire la maturation des LT CD8 cytotoxiques, responsables de la génération d'une grande quantité d'auto-antigènes. Enfin, la sécrétion d'IFN $\alpha$  a également des conséquences sur les LB. En effet, la production d'IFN $\alpha$  induit la sécrétion des cytokines BAFF et APRIL, connues pour être impliquées dans la survie des LB auto-réactifs, et contribue ainsi à leur différenciation en PL sécréteurs d'auto-Ac pathogènes (**Kim et al., 2015**). De par leurs nombreux effets sur les cellules de l'immunité innée comme adaptative, les IFN de type I sont des acteurs majeurs de la pathogénèse lupique (**Figure 13**).



**Figure 13. Rôle des pDC et des IFN de type I dans le LES.** Dans le cadre du LES, les cellules apoptotiques et les NETs favorisent la production de complexes immuns contenant des acides nucléiques. Ces complexes immuns sont reconnus par les pDC et entraînent la production d'IFN de type I suite à l'activation des TLR7 et 9. Les IFN de type I agissent sur le système immunitaire en favorisant notamment l'expression de molécules de co-stimulation et du CMH-II par les DC, et ainsi la présentation antigénique. De plus, les IFN de type I favorisent la survie des LT, inhibent les Tregs, et augmentent la maturation des LT CD8+. Enfin, les IFN de type I entraînent la production de la cytokine BAFF qui va favoriser la survie des LB.

#### 4) Macrophages

Comme décrit précédemment, les macrophages de patients lupiques sont moins efficaces dans l'élimination des corps apoptotiques, augmentant ainsi l'exposition de potentiels auto-antigènes aux cellules de l'immunité adaptative. Il existe deux types de macrophages appelés M1 (inflammatoires) et M2 (impliqués dans la réparation des tissus). La balance entre macrophages M1 et M2 dans le LES est déséquilibrée puisqu'on observe une augmentation de la fréquence des macrophages M1 et une diminution de la fréquence des macrophages M2 chez les patients lupiques (**Mohammadi et al., 2017; Niu et al., 2019**). Le transfert de macrophages M2 dans un modèle murin de lupus induit (induction par administration d'ADN dérivant de lymphocytes activés dans des souris BALB/c) réduit la

sévérité du LES alors qu'un transfert de macrophages M1 amplifie les symptômes de la maladie (**Li et al., 2015**). Cette étude indique que les macrophages M1 jouent un rôle pathogène dans le lupus alors que les macrophages M2 sont protecteurs. En conclusion, le défaut de phagocytose des macrophages et l'altération de la balance M1/M2 sont impliqués dans l'activation de l'immunité adaptative et les dommages tissulaires du LES (**Herrada et al., 2019**).

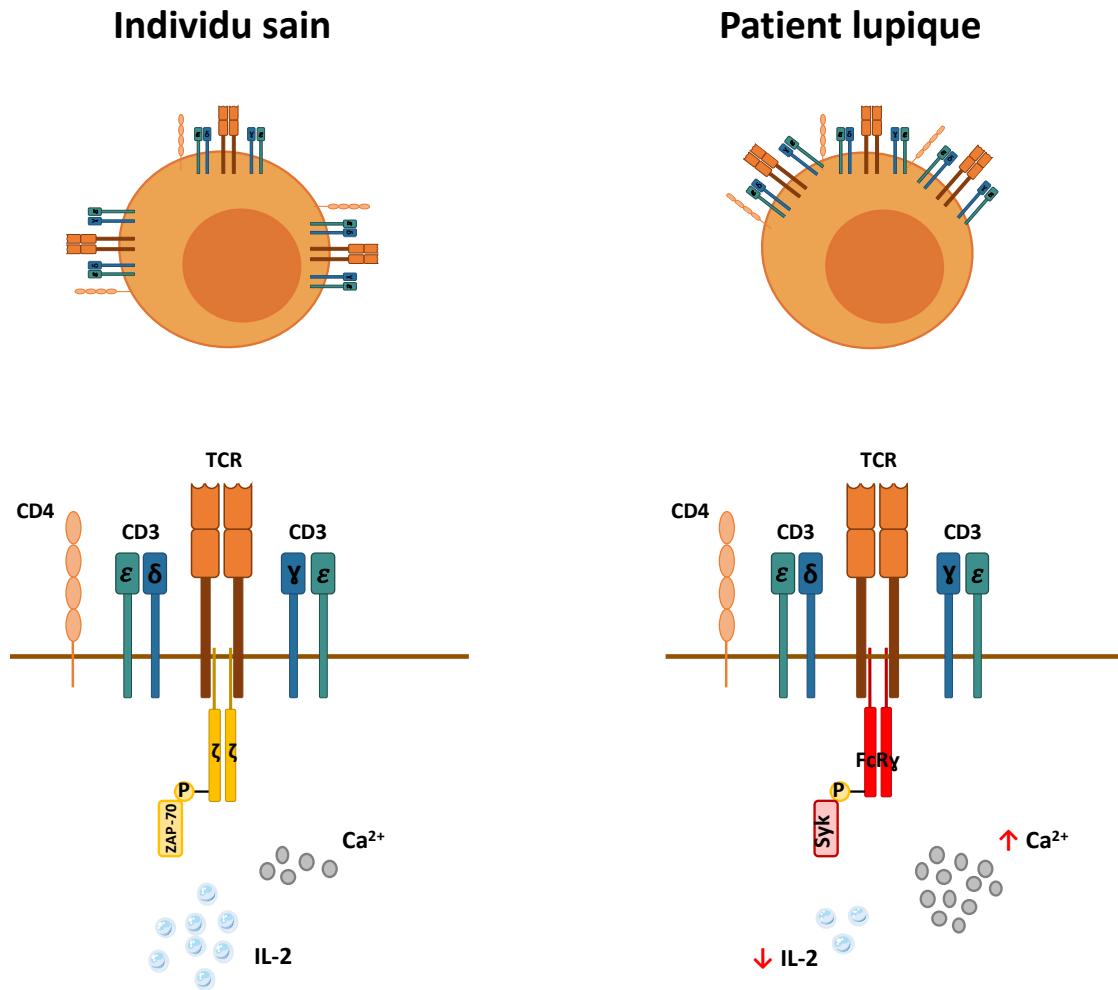
### III) Dérégulation de l'activation du système adaptatif

#### 1) Anomalies des LT

Les LT jouent un rôle majeur dans la pathogénèse lupique en amplifiant l'inflammation par la production de cytokines et en apportant de l'aide aux LB qui produiront des auto-Ac. De nombreuses aberrations concernant la signalisation et la fonctionnalité des LT dans le LES ont été rapportées. Ces modifications des LT conduisent à la sur-activation de la signalisation du TCR et à la perte de tolérance périphérique.

**Signalisation du TCR et radeaux lipidiques :** Les LT sont majoritairement activés après reconnaissance d'un fragment antigénique par leur TCR. Lors de la fixation d'un antigène au TCR, la chaîne CD3 $\zeta$  associée au TCR recrute la protéine kinase ZAP70 qui active différentes voies de signalisation. Chez les patients lupiques, l'expression de la chaîne CD3 $\zeta$  est diminuée ou absente des LT et est substituée par la chaîne FcR $\gamma$  (**Enyedy et al., 2001**) qui recrute la tyrosine kinase Syk à la place de ZAP-70. L'interaction entre Syk et la chaîne FcR $\gamma$  est 100 fois plus forte que l'interaction entre ZAP-70 et CD3 $\zeta$  (**Nambiar et al., 2002**), entraînant ainsi un flux calcique plus important et une stimulation excessive des LT (**Nambiar et al., 2003**). De plus, pour que les LT soient correctement activés, le complexe du TCR doit être recruté au niveau des radeaux lipidiques, domaines riches en cholestérol et sphingolipides. La formation des radeaux lipidiques après activation entraîne une accumulation de divers récepteurs et molécules indispensables pour la bonne transduction du signal. Dans les LT de patients lupiques, les radeaux lipidiques sont pré-clusterisés, induisant ainsi une accumulation anormale de complexes du TCR à la membrane, et une activation précoce des LT (**Jury et al., 2004; Krishnan et al., 2004**) (**Figure 14**). De façon intéressante, certains récepteurs inhibiteurs

tels que CTLA-4 (Jury et al., 2010) ou BTLA (Sawaf et al., 2018) sont quant à eux exclus des radeaux lipidiques dans les LT de patients lupiques.



**Figure 14. Signalisation du TCR chez les individus sains et les patients lupiques.** Lors de l'activation du TCR, la chaîne CD3 $\zeta$  associée au TCR recrute la protéine ZAP-70 qui active différentes voies de signalisation induisant la production d'IL-2 et l'augmentation du flux calcique. En condition lupique, la chaîne CD3 $\zeta$  est remplacée par la chaîne FcR $\gamma$  qui recrute préférentiellement la kinase Syk. Ce recrutement induit une augmentation du flux calcique et une diminution de la production d'IL-2. De plus, les radeaux lipidiques sont pré-clusterisés chez les patients lupiques induisant ainsi une activation précoce des LT (Inspirée de Moulton et al., 2011).

Ce phénomène empêche l'inhibition de l'activation des LT et contribue à la sur-activation de ces cellules. Les modèles murins de lupus MRL<sup>lpr/lpr</sup> et NZB/W présentent comme chez les patients, une accumulation de radeaux lipidiques à la membrane des LT, et la dissociation de ces domaines chez la souris MRL<sup>lpr/lpr</sup> retarde l'apparition des symptômes de la maladie (Deng and Tsokos, 2008). Chez l'Homme, le traitement de LT de patients lupiques *ex vivo* par un inhibiteur de la synthèse du cholestérol (atorvastatin) ou par un inhibiteur de l'expression des

sphingolipides (N-butyldeoxyojirimycin) a permis de dissocier les radeaux lipidiques et de restaurer la fonctionnalité inhibitrice des molécules CTLA-4 et BTLA (**Jury et al., 2006; McDonald et al., 2014; Sawaf et al., 2018**).

**Distribution des sous-populations de LT effecteurs :** La distribution des sous-populations de LT est fortement modifiée chez les patients atteints de LES. En effet, on retrouve chez les patients lupiques une augmentation de la fréquence des LT $\alpha\beta$  double négatifs (CD4 $^-$ CD8 $^-$ , DN). Chez l'individu sain, cette population de LT est faiblement représentée et possède des capacités immunosuppressives (**Priatel et al., 2001; Voelkl et al., 2011**). En revanche, les LT DN sont retrouvés au niveau des reins de patients et jouent un rôle pro-inflammatoire dans le cas du LES (**Crispín et al., 2008**). En effet, ces cellules produisent une cytokine pro-inflammatoire, l'IL-17, et participent à la production d'auto-Ac par les LB (**Shivakumar et al., 1989**).

Les LT CD4 $^+$  effecteurs sont liés au développement du LES puisqu'ils apportent des signaux indispensables à la production d'Ac par les LB, et sont impliqués dans l'inflammation des tissus. Les Th17 représentent une sous-population de LT CD4 $^+$  effecteurs aux capacités pro-inflammatoires de par leur production d'IL-17. La fréquence de ces cellules est augmentée chez les patients lupiques, est corrélée à l'activité de la maladie et est associée à une baisse de la production des cytokines produites par les Th1 (IFN $\gamma$ ) et les Tregs (TGF $\beta$ ), et à une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 ou l'IL-17 (**Talaat et al., 2015**). De plus, le taux d'IL-17 est très élevée dans le sérum et les reins de patients (**Koga et al., 2017**).

Le LES est caractérisé par la production d'auto-Ac de haute affinité. Ces anticorps peuvent être produits au niveau des GC grâce à l'interaction entre les LB et les T<sub>FH</sub>. Les T<sub>FH</sub> sont caractérisées par l'expression des marqueurs CXCR5, ICOS, CD40L et PD-1 et produisent de l'IL-21 qui régule la prolifération des LB, la commutation de classe isotypique, l'hypermutation somatique et la différenciation des LB en plasmocytes. Puisque l'activation anormale des LB et leur production d'IgG sont des éléments centraux du développement du LES, de nombreuses études se sont concentrées sur la fonction, la différenciation et la régulation des T<sub>FH</sub> dans cette pathologie (**Sawaf et al., 2016**). Chez la souris, le taux d'IL-21 dans les modèles

murins de lupus BXSB.Yaa et MRL<sup>Ipr/Ipr</sup> est particulièrement élevé (**Herber et al., 2007; Ozaki et al., 2004**). Par ailleurs, le nombre de T<sub>FH</sub> est diminuée chez des souris MRL<sup>Ipr/Ipr</sup> déficientes pour le récepteur à l'IL-21 (IL-21R) (**Rankin et al., 2012**). Enfin, il a été montré que le taux d'IL-21, cytokine sécrétée par les T<sub>FH</sub>, est augmenté chez les patients lupiques (**Le Coz et al., 2013**).

Étudier les T<sub>FH</sub> afin de déterminer si la fréquence et/ou la fonction de ces cellules sont altérées dans le LES est difficile chez l'Homme puisque, par définition, ces cellules se situent dans les OLS. Les premières études chez l'Homme se sont focalisées sur les cellules CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> retrouvées dans le sang périphérique. En utilisant cette stratégie, il a été montré que la fréquence des T<sub>FH</sub> circulants (cT<sub>FH</sub>) définies comme CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD1<sup>+/high</sup> est augmentée chez les patients lupiques et que leur présence est corrélée à l'activité de la maladie (**Choi et al., 2015; Simpson et al., 2010**). En 2011, Morita *et al.*, ont caractérisé 3 sous-populations de cT<sub>FH</sub> grâce aux marqueurs CCR6 et CXCR3 : les cT<sub>FH</sub>1 (CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>), les cT<sub>FH</sub>2 (CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>) et les cT<sub>FH</sub>17 (CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup>) (**Morita et al., 2011**). A la différence des cT<sub>FH</sub>1, les cT<sub>FH</sub>17 et les cT<sub>FH</sub>2 sont capables d'apporter de l'aide aux LB *via* leur production d'IL-21. Cette équipe a également mis en évidence une augmentation de la fréquence des cT<sub>FH</sub>17 et cT<sub>FH</sub>2 chez des patients atteints de dermatomyosite juvénile, suggérant que l'altération de la balance des sous-populations de cT<sub>FH</sub> pourrait contribuer au développement de l'auto-immunité (**Morita et al., 2011**). Au sein de notre laboratoire, une étude a appuyé cette hypothèse en montrant une augmentation de la fréquence des cT<sub>FH</sub>2 et une diminution de la fréquence des cT<sub>FH</sub>1 chez des patients lupiques présentant un lupus actif (**Le Coz et al., 2013**).

En parallèle d'une altération de la balance des sous-populations de cT<sub>FH</sub> dans le LES, l'expression de différentes molécules impliquées dans la génération ou la régulation des T<sub>FH</sub> est altérée chez les patients. ICOS est une molécule de co-stimulation nécessaire à la différenciation des T<sub>FH</sub>, à leur migration dans les follicules et à leur survie. Son expression est augmentée dans les LT CD4<sup>+</sup> de patients lupiques et est plus élevée chez les patients souffrant de néphrite (**Li et al., 2012**). L'interaction entre OX40L (exprimé par les APC) et OX40 (exprimé par les LT CD4<sup>+</sup> activés) est également impliquée dans le développement des T<sub>FH</sub>. L'expression de OX40 est particulièrement élevée dans les reins de patients souffrant de néphrite (**Aten et al., 2000**). Par ailleurs, il a été montré que la signalisation *via* OX40/OX40L induit la génération *ex vivo* de cellules présentant un phénotype de T<sub>FH</sub> fonctionnels. De plus, la fréquence de CPA OX40L<sup>+</sup> corrèle avec l'activité de la maladie et la fréquence de cellules CXCR5<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> chez les patients lupiques (**Jacquemin et al., 2015**).

Les Tregs sont des LT CD4<sup>+</sup> qui inhibent l'activation, la prolifération et la différenciation de différents types cellulaires tels que les LT CD4<sup>+</sup> effecteurs, les LT CD8<sup>+</sup>, les LB ou les DC. Il existe deux types de Tregs : les Tregs différenciés dans le thymus (tTregs) et les Tregs induits en périphérie (iTregs) après stimulation de LT naïfs en présence de TGFβ. La différenciation des Tregs et leur activité suppressive est notamment dépendante de l'IL-2 et de l'expression du facteur de transcription FoxP3. Par exemple, les Tregs inhibent l'activité des LT CD4<sup>+</sup> effecteurs en consommant l'IL-2 produit, et en réduisant l'expression des molécules de co-stimulation CD80/86 à la surface des CPA après interaction avec la molécule CTLA-4 exprimée par les Tregs. Par ailleurs, si les tTregs suppriment l'activation des LB par un mécanisme cytotoxique, les iTregs inhibent les LB par la production de TGFβ (**Xu et al., 2016**), ou en induisant l'anergie des LB chez la souris (**Liu et al., 2014**).

Chez la souris, le rôle protecteur des Tregs dans le LES a été démontré grâce à un transfert de Tregs dans le modèle murin de lupus NZB/W. En effet, le développement de la maladie est retardé chez ces souris (**Scalapino et al., 2006**). Au contraire, une réduction du nombre de Tregs après administration d'un anticorps déplétant anti-CD25 accélère le développement de la maladie (**Humrich et al., 2010**). Différentes études ont montré une augmentation du nombre absolu de Tregs dans les modèles NZB/W (**Humrich et al., 2010; Scalapino et al., 2006**) et MRL<sup>lpr/lpr</sup> (**Divekar et al., 2011; Yang et al., 2008**) au cours du développement de la maladie. En revanche, on observe également une augmentation du nombre de LT effecteurs plus importante que celle des Tregs, créant ainsi un déséquilibre de la balance LT effecteurs/Tregs.

Chez l'Homme, les données concernant le nombre et la fonctionnalité des Tregs sont assez conflictuelles. Bien que de nombreuses études aient observé une diminution du nombre de Tregs circulants (**Crispin et al., 2003; Liu et al., 2004; Miyara et al., 2005**) ou des capacités inhibitrices réduites chez les patients lupiques (**Bonelli et al., 2008; Lyssuk et al., 2007; Valencia et al., 2007**), d'autres études ne rapportent aucune différence par rapport aux individus sains (**Alvarado-Sánchez et al., 2006; Miyara et al., 2005; Vargas-Rojas et al., 2008**), voire une augmentation du nombre de Tregs (**Lin et al., 2007; Suárez et al., 2006**). L'altération des fonctions suppressives des Tregs observée par plusieurs équipes est expliquée par différents mécanismes. En effet, une diminution de l'expression du facteur de transcription FoxP3 dont l'expression est indispensable pour assurer les capacités inhibitrices des Tregs a été associée à une altération des fonctions suppressives des Tregs (**Lyssuk et al., 2007**;

**Valencia et al., 2007).** D'autre part, il a été montré que les LT CD4<sup>+</sup> effecteurs sont moins sensibles à la suppression par les Tregs chez les patients lupiques présentant un lupus actif (**Venigalla et al., 2008**).

L'hétérogénéité des résultats rapportés par ces différentes études peut s'expliquer par les différentes stratégies d'identification des Tregs, les différents protocoles d'isolement de ces cellules, ainsi que le statut des patients (activité de la maladie et traitements prescrits). De nombreuses équipes n'ont utilisé que les marqueurs CD25, FoxP3 et CD127 pour identifier les Tregs *ex vivo*. Toutefois, les marqueurs CD25 et FoxP3 peuvent être exprimés par des LT activés (**Tran et al., 2007**), la population de Tregs observée grâce à ces marqueurs peut alors également contenir des cellules effectrices et ainsi altérer les résultats. En 2009, Miyara et al., ont décrit trois sous-populations de cellules possédant un phénotype et des capacités suppressives différentes grâce aux marqueurs CD45RA et FoxP3. Cette équipe a décrit une sous-population de cellules ayant de fortes capacités suppressives (activated Tregs, aTregs, CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>FoxP3<sup>high</sup>), une sous-population n'ayant pas de capacité suppressive mais pouvant se différencier en aTregs (resting Tregs, rTregs, CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>FoxP3<sup>int</sup>), et une sous-population n'ayant pas de capacités suppressives mais produisant des cytokines pro-inflammatoires (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>Foxp3<sup>low</sup>) (**Miyara et al., 2009**). Cette étude a également montré une diminution de la fréquence des aTregs, et une augmentation de la fréquence des rTregs et des cellules CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>Foxp3<sup>low</sup> chez les patients lupiques (**Miyara et al., 2009**). Une nouvelle population de Tregs appelée Tregs folliculaires (CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>, T<sub>FR</sub>) partageant des caractéristiques phénotypiques de T<sub>FH</sub> a été mise en évidence comme étant capable de réguler la réponse immunitaire au niveau des GC (**Chung et al., 2011; Linterman et al., 2011**) en limitant le nombre de T<sub>FH</sub> et de LB du GC. Récemment, des études ont montré une augmentation du ratio T<sub>FH</sub>/T<sub>FR</sub> dans le LES (**Xu et al., 2017**) ou de la fréquence des T<sub>FR</sub> qui restent fonctionnelles chez les patients (**Liu et al., 2018a**). En revanche, une récente étude de 2021 a mis en évidence une diminution des capacités suppressives des T<sub>FR</sub> PD1<sup>+</sup> chez les patients lupiques (**Kurata et al., 2021**). Toutefois, une majorité des patients inclus dans cette étude avaient reçu des glucocorticoïdes ou des immunosuppresseurs, alors que ces traitements peuvent modifier la fréquence et le phénotype des sous-populations de T<sub>FR</sub>. Ces résultats doivent donc être interprétés avec précaution.

Enfin, les LT CD8<sup>+</sup> contrôlent les infections, les cellules tumorales et les cellules auto-réactives par le relargage de protéines cytotoxiques telles que les granzymes et les perforines.

Les fonctions cytotoxiques des LT CD8<sup>+</sup> périphériques sont diminuées chez les patients lupiques et ne permettent pas d'éliminer efficacement les LB auto-réactifs. De plus, ils augmentent le risque d'infection chez les patients pouvant induire l'auto-immunité par un mécanisme de mimétisme moléculaire. Des souris lupiques déficientes pour la production de perforine développent la maladie plus précocement, confirmant l'importance des LT CD8<sup>+</sup> dans la prévention de la pathogénèse lupique (**Peng et al., 1998**). De plus, l'activation des LT CD8<sup>+</sup> dans le modèle murin de lupus GVHD grâce à l'administration d'un anticorps anti-CD40, réduit les symptômes de la maladie (**Puliaev et al., 2008**). Cependant, les LT CD8<sup>+</sup> résidants dans les reins sont fonctionnels et contribuent aux dommages tissulaires de par leur propriétés cytotoxiques et leur présence est corrélée avec l'activité de la maladie (**Couzi et al., 2007**).

## 2) Anomalies des LB

Les LB jouent un rôle crucial dans le développement du LES de par leur production d'auto-Ac, mais également de par leurs propriétés de CPA professionnelles et leur sécrétion de cytokines. Les modèles murins de lupus et les patients lupiques présentent de nombreuses anomalies des LB représentées par une lymphopénie et une hyper-activation cellulaire. En condition physiologique, les LB sont sélectionnés par des mécanismes de tolérance centrale et périphérique. Un défaut de ces mécanismes de sélection a été démontré chez les patients lupiques et participe à la génération de LB auto-réactifs (**Yurasov et al., 2005**).

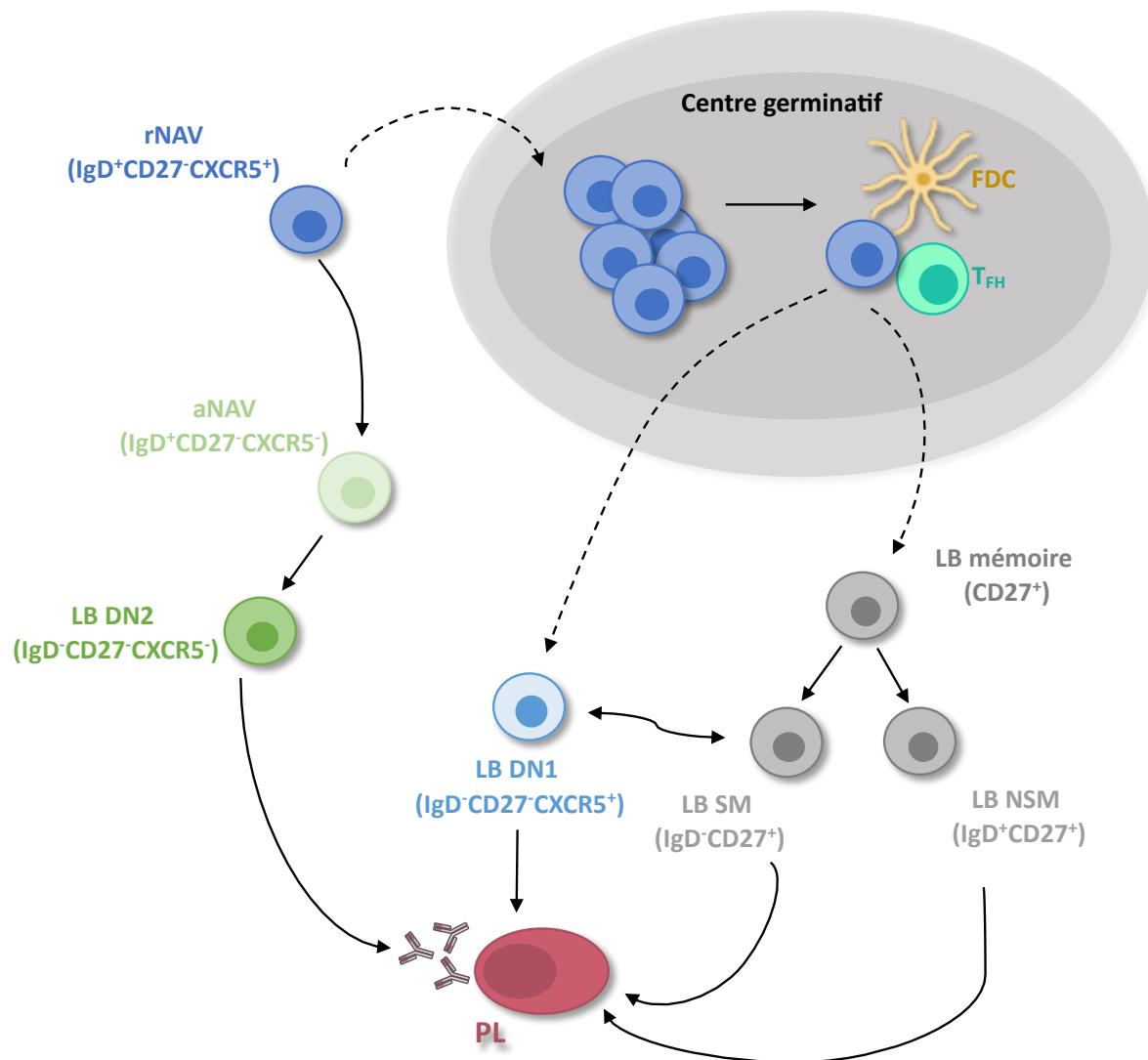
Le lupus est caractérisé par une profonde lymphopénie affectant les LB et une altération de la distribution des sous-populations de LB traduite par une augmentation de la fréquence des LB transitionnels (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>) (**Sims et al., 2005**), des LB mémoires « switchés » (CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>, SM), des LB mémoires double négatifs (CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>, DN), des plasmablastes (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>, PB) et des plasmocytes (CD19<sup>dim</sup>CD27<sup>hi</sup>CD138<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup>, PL) et une diminution de la fréquence des LB naïfs (CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>) (**Jacobi et al., 2003; Odendahl et al., 2000; Wei et al., 2007**).

Les LB double négatifs (DN) représentent une population de LB dont la fréquence est augmentée chez les personnes âgées (**Colonna-Romano et al., 2009**), chez les patients

atteints de maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde (PR), le syndrome de Sjögren (SS) (**Saadoun et al., 2013**), la sclérose en plaques (SEP) (**Claes et al., 2016**), ou le LES (**Rubtsov et al., 2011**), ou encore dans le cadre d'infections chroniques (**Moir et al., 2008; Portugal et al., 2015**). Différents termes sont employés pour décrire ces LB mémoires atypiques : « aged-associated B cells » (ABC), « atypical memory B cells », LB CD11c<sup>hi</sup>, et LB DN. Tous ces termes font référence à des populations de LB qui partagent de nombreuses caractéristiques et dont la fréquence est enrichie dans le sang de personnes âgées, en cas d'infections, d'auto-immunité, d'obésité (**Frasca et al., 2021**) ou encore de cancer (**Centuori et al., 2018**). Dans le cadre d'une infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou chez des patients souffrant de paludisme, les LB DN présentent un phénotype « exhausted » (**Moir et al., 2008; Portugal et al., 2015**), alors que dans un contexte auto-immun, ces cellules sont capables de produire des auto-Ac, sont impliquées dans la présentation d'antigènes aux LT, et dans la formation de GC (**Domeier et al., 2016; Rubtsov et al., 2011, 2015**). En 2011, Hao *et al* et Rubtsov *et al* décrivirent pour la première fois une population de LB exprimant CD11c chez la souris (**Hao et al., 2011; Rubtsov et al., 2011**). Ces cellules présentent de nombreuses similitudes avec les LB DN IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> décrits précédemment chez l'Homme, à savoir l'expression des marqueurs T-bet, CD95, CD80, CD86 ou CMH II (**Hao et al., 2011**).

Chez les patients atteints de LES, plusieurs groupes ont décrit une augmentation de la fréquence de la sous-population de LB DN (**Anolik et al., 2003; Huang et al., 2002**). Ces LB DN sont dits mémoires car même s'ils n'expriment pas le marqueur conventionnel CD27, ces cellules partagent des caractéristiques de LB mémoires CD27<sup>+</sup>. En effet, parmi les LB DN, autant de cellules ayant subi la commutation de classe vers l'isotype IgG sont retrouvées que dans la population de cellules CD27<sup>+</sup>. Elles présentent également un niveau d'hypermutations somatiques important, et sont capables de proliférer sans que le BCR ne soit engagé (**Wei et al., 2007**). Une autre équipe a mis en évidence que la fréquence d'une sous-population de LB DN exprimant le marqueur d'activation CD95 (IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>CD95<sup>+</sup>) est particulièrement augmentée chez les patients lupiques présentant un lupus actif, et que cette augmentation corrèle avec l'activité de la maladie (**Jacobi et al., 2008**). L'origine des LB DN n'est pas encore clairement définie. En effet, lors de la différenciation des LB au niveau du GC, l'expression du marqueur CD27 est augmentée à leur surface. L'absence d'expression de ce marqueur à la

surface des LB DN peut donc laisser penser que ces cellules ont une origine extra-folliculaire. Une deuxième hypothèse est que les LB DN dérivent de LB mémoires « switchés » qui auraient « perdu » l'expression de CD27, car ces deux types de cellules partagent de nombreux clones après analyse des séquences V<sub>H</sub> du BCR (**Bagnara et al., 2015**) (**Figure 15**).



**Figure 15. Origines potentielles des LB mémoires DN.** Plusieurs hypothèses sont proposées pour rendre compte de l'origine des LB mémoires DN. Ces cellules pourraient dériver des LB mémoires « switchés » (LB SM) car elles partagent des clones communs avec ces cellules mémoires. Toutefois, l'absence du marqueur CD27 à la surface de ces cellules peut indiquer que les LB DN ont une origine extra-folliculaire. De plus, différentes études montrent que les LB DN sont capables de se différencier en PL sécrétaires d'Ac. FDC : cellules dendritiques folliculaires ; T<sub>FH</sub> : lymphocytes T folliculaires ; rNAV : LB naïfs « resting » ; aNAV : LB naïfs « activated » ; DN : LB double négatif ; SM : LB « switchés » ; NSM : LB « non switchés » ; PL : plasmocytes

Bien que les LB DN partagent des caractéristiques de cellules mémoires, leur fonction précise dans l'immunité est encore inconnue. Toutefois, plusieurs études indiquent que ces

cellules auraient la capacité de se différencier en plasmocytes (**Jenks et al., 2018; Wang et al., 2018; Wei et al., 2007**), et de produire des cytokines pro-inflammatoires et des granzymes B après stimulation (**Bulati et al., 2014**).

En 2018, Jenks *et al.* ont décrit pour la première fois deux sous-populations de LB DN se différenciant notamment par leur expression de CXCR5 chez les patients lupiques : LB DN1 (CXCR5<sup>+</sup>CD19<sup>int</sup>), et LB DN2 (CXCR5<sup>-</sup>CD19<sup>hi</sup>CD21<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup>). Les DN1 dont la fréquence n'est pas augmentée chez les patients lupiques, semble correspondre aux LB DN augmentés chez les personnes âgées. Au contraire des DN1, la fréquence des LB DN2 est particulièrement plus élevée chez les patients lupiques que chez des patients atteints de PR ou de SS : les LB DN2 semblent donc être spécifiques de la pathologie lupique (**Jenks et al., 2018**). De plus, l'absence d'expression de CXCR5 par les LB DN2 suggère une origine extra-folliculaire de ces cellules, et cette sous-population de LB DN a été montrée comme étant destinée à se différencier en cellules productrices d'auto-Ac (**Golinski et al., 2020; Jenks et al., 2018**). Les LB DN2 dérivent de LB naïfs « activated » (aNAV) dont la fréquence est augmentée chez les patients lupiques, et qui eux-mêmes dérivent de LB naïfs « resting » (rNAV) (**Jenks et al., 2018; Wangriatisak et al., 2021**). Les aNAV présentent un phénotype similaire aux LB DN2 (CD11c<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup>CD21<sup>-</sup>) et sont capables après stimulation, de se différencier en LB DN2 et en PL sécréteurs d'auto-Ac (**Jenks et al., 2018; Tipton et al., 2015**). Les LB DN2 partagent des caractéristiques de plasmablastes circulants telles qu'une forte expression des facteurs de transcription IRF4 et PRDM1, et une faible expression de IRF8 et ETS1. Par ailleurs, ces cellules sont hyper-réactives à une stimulation *via* le TLR7 et la différenciation des LB DN2 en cellules sécrétaires d'auto-Ac est dépendante du TRL7, de l'IL-21 et de l'IFNy connus pour induire l'expression des marqueurs T-bet et CD11c à la surface des LB activés (**Naradikian et al., 2016**). De façon intéressante, il a été montré dans le modèle murin de lupus B6.SLE1,2,3, que la délétion conditionnelle de T-bet dans les LB améliore les symptômes de la maladie (**Rubtsova et al., 2017**), indiquant que les LB T-bet<sup>+</sup> sont pathogènes dans le lupus. De par l'expression de nombreux marqueurs en commun, une fonctionnalité et une activation similaire, les LB DN2 semblent être proches des LB CD11c<sup>+</sup> décrit par Hao *et al* et Rubstov *et al* (**Hao et al., 2011; Rubtsov et al., 2011**), ainsi que des LB CD11c<sup>+</sup> décrits par Wang *et al* dont la fréquence est augmentée chez les patients lupiques (**Wang et al., 2018**). En effet, cette équipe a montré

que chez les patients lupiques, l'IL-21 induit la différenciation des LB en LB CD11c<sup>+</sup> auto-réactifs producteurs d'auto-Ac (**Wang et al., 2018**).

En conclusion, les LB DN sont composés d'un ensemble de cellules complexe et diversifié. Dans le LES, la fréquence de ces cellules corrèle avec l'activité de la maladie, suggérant qu'elles pourraient à la fois représenter un bon marqueur de pronostic de la maladie et être envisagées comme cible de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les LB peuvent également avoir une fonction régulatrice. Différentes sous-populations de LB régulateurs (Bregs) ayant des phénotypes et des mécanismes suppresseurs différents ont été décrit chez l'Homme et chez la souris (**Figure 16**).

Modèle	Nom	Phénotype	Molécules suppressives	Pathologies associées (humaine ou modèle murin)
Souris	B10	CD19 <sup>+</sup> CD1d <sup>hi</sup> CD5 <sup>+</sup>	IL-10	EAE, Lupus, Allergies, Colite, Arthrite
	Lymphocytes transitionnels 2	CD19 <sup>+</sup> CD21 <sup>hi</sup> CD23 <sup>hi</sup> CD24 <sup>hi</sup> IgM <sup>hi</sup> IgD <sup>hi</sup> CD1d <sup>hi</sup>	IL-10 IL-10 indépendant	Arthrite Lupus, Allogreffe
	GIFT-15	B220 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup> CD22 <sup>+</sup> CD23 <sup>+</sup> CD24 <sup>+</sup> CD1d <sup>+</sup> CD138 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup>	IL-10	EAE
	Plasmocytes	IgM <sup>+</sup> CD138 <sup>hi</sup> TACI <sup>+</sup> CXCR4 <sup>+</sup> CD1d <sup>int</sup> TIM1 <sup>int</sup>	IL10, IL-35	EAE, Cancer
	Plasmablastes	CD138 <sup>+</sup> CD44 <sup>hi</sup>	IL-10	EAE
	i35	CD5 <sup>+</sup> CD1d <sup>hi</sup> FcyIIb <sup>hi</sup> IL-35 <sup>+</sup>	IL-35	UAE
Homme		CD1d <sup>hi</sup>	IL-10	SEP, HBC, HCC
	Lymphocytes B transitionnels	CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD38 <sup>hi</sup>	IL-10	LES, PR, HBC, SS
	Lymphocytes B mémoires	CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD27 <sup>+</sup>	IL-10	LES
	B10	CD27 <sup>hi</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD148 <sup>hi</sup> CD48 <sup>hi</sup>	IL-10	LES, PR, SS, SEP
	BR1	CD73 CD25 <sup>+</sup> CD71 <sup>+</sup>	IL-10	Allergies
	Plasmablastes	CD27 <sup>hi</sup> CD38 <sup>+</sup>	IL-10	Cancer, cGVHD
	GrB+	CD38 <sup>+</sup> CD1d <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> CD147 <sup>+</sup>	IL-10, GrB	LES

**Figure 16.** Liste non exhaustive des différentes populations de Bregs retrouvées chez l'Homme et la souris et leur implication dans diverses pathologies. EAE : Encéphalomyélite allergique expérimentale ; EAU : Uvête auto-immune expérimentale ; SEP : Sclérose en plaques ; LES : Lupus érythémateux systémique ; PR : Polyarthrite rhumatoïde ; SS : Syndrome de Sjögren ; cGVHD : Réaction du greffon contre l'hôte chronique ; HBC : Hépatite B chronique ; HCC : Hépatite C chronique ; GrB : granzyme B.

Les Bregs ont été découverts chez la souris comme cellules productrices d'IL-10 (**Fillatreau et al., 2002**). Depuis, d'autres populations produisant de l'IL-35 ou du TGFβ ont été mises en évidence. Chez l'Homme, plusieurs populations de Bregs produisant de l'IL-10 ont été décrites mais ces cellules sont majoritairement caractérisées comme étant similaires aux

LB transitionnels ( $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ ), ou ayant un phénotype de LB mémoires ( $CD24^{hi}CD27^+$ ). Par ailleurs, une étude a notamment mis en évidence que les LB  $CD24^{hi}CD38^{hi}$  sont composés de plusieurs sous-populations de LB possédant des capacités régulatrices différentes *in vitro* (**Simon et al., 2016**). En fonction de la stratégie d'identification des Bregs, les données concernant la fréquence de ces cellules chez les patients lupiques peuvent être conflictuelles. En effet, une étude n'observe aucune différence de la fréquence des cellules  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$  (**Heinemann et al., 2016**), alors que d'autres observent une augmentation de la fréquence des cellules  $CD19^+CD5^+CD1d^{hi}$  (**Yang et al., 2014**) ou  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$  (**Blair et al., 2010; Wang et al., 2017b**) chez les patients lupiques. En revanche, plusieurs études ont montré que ces cellules sont non fonctionnelles chez les patients lupiques (**Blair et al., 2010; Gao et al., 2014**). Outre la production de cytokines régulatrices, les Bregs peuvent également agir *via* la sécrétion de granzymes B. Des études très récentes ont montré que la fréquence de Bregs produisant des granzymes B est diminuée chez les patients lupiques (**Rabani et al., 2018**), et que la fonctionnalité de ces cellules est altérée chez les patients (**Bai et al., 2021**).

En plus d'une profonde altération de la distribution des sous-populations de LB chez les patients lupiques, de nombreuses anomalies de la voie de signalisation du BCR sont retrouvées. Le BCR ne procure pas uniquement une spécificité de liaison à l'antigène aux LB, il joue également un rôle essentiel dans le développement, l'activation et la survie des LB. Les LB de patients lupiques présentent une augmentation de la signalisation du BCR traduite par une augmentation de la phosphorylation des motifs tyrosines et une augmentation du flux calcique, c'est-à-dire une hyperactivation cellulaire (**Liossis et al., 1996; Mackay et al., 2006; Wu et al., 2014**). En effet, il a été montré que la kinase Lyn est plus phosphorylée dans les LB au niveau des radeaux lipidiques chez les patients (**Flores-Borja et al., 2007**), et que le niveau de phosphorylation des kinases Syk et Btk est également plus élevé (**Fleischer et al., 2014; Iwata and Tanaka, 2016; Iwata et al., 2012**). De plus, l'activité de la phosphatase PTEN, normalement impliquée dans la régulation négative de la voie de signalisation du BCR, est réduite dans les LB de patients lupiques (**Wu et al., 2014**). Ces données traduisent donc un état hyperactif des LB au cours du LES.

L'une des caractéristiques majeures du lupus est la production d'auto-Ac par les PL à courte et à longue durée de vie résidant principalement au niveau de la moelle osseuse.

Toutefois, au sein de notre laboratoire, nous avons pu observer la présence de PL sécrétant des auto-Ac au niveau des reins chez les souris NZB/W (**Lacotte et al., 2010**). La présence de ces PL peut résulter d'une migration dans les reins en réponse à l'inflammation et/ou d'une différenciation au sein de cet organe. Au laboratoire, il a été montré que la présence des PL retrouvés au niveau des reins de souris NZB/W résulte en partie de l'expression du récepteur CXCR3 à leur surface (**Lacotte et al., 2013**).

Outre le caractère pathogène des LB de par leur production d'auto-Ac, les LB jouent d'autres rôles impliqués dans la pathogénèse lupique. Des souris possédant des LB incapables de produire des anticorps mais ayant toujours des capacités de présentation antigénique et capables de sécréter des cytokines, présentent toujours des atteintes rénales, même si ces dernières sont moins sévères que chez des souris sauvages (**Chan et al., 1999**). Les LB contribuent donc de différentes façons au développement de la pathologie. En effet, les LB activent les LT en présentant des auto-anticorps au TCR par le CMH de classe II, et en interagissant *via* des molécules de co-stimulation exprimées à leur surface telles que CD80/86, CD40, ICOSL ou OX40L. De plus, les LB produisent de nombreuses cytokines telles que l'IL-4, l'IL-6, l'IL-10 ou l'IFN $\gamma$ . L'IL-6 produite en plus grande quantité chez les patients lupiques (**Linker-Israeli et al., 1991; Peterson et al., 1996**) est impliqué dans la différenciation des LT CD4 $^{+}$  en T<sub>FH</sub>, et dans la formation des GC (**Arkatkar et al., 2017**). Comme présenté précédemment, les LB peuvent également avoir un rôle régulateur *via* leur production d'IL-10.

### **3) Les molécules régulatrices impliquées dans la pathogénèse lupique**

L'activation de LT nécessite un premier signal apporté par la stimulation du TCR par le complexe CMH/peptide et un second signal co-stimulateur apporté par l'interaction entre des récepteurs co-activateurs exprimés par les LT et leurs ligands exprimés par les CPA. Afin de réguler l'activation des LT, des récepteurs co-inhibiteurs sont induits suite à l'activation des LT et inhibent les signaux co-stimulateurs afin d'empêcher une sur-activation des cellules. En évitant cette sur-activation des cellules immunitaires, ces signaux empêchent la rupture de tolérance et le développement de cellules auto-réactives. Une dérégulation de la balance

entre signaux activateurs et signaux inhibiteurs peut alors participer à l'émergence de maladies auto-immunes.

Différentes voies de signalisation associées aux récepteurs co-activateurs sont impliquées dans le développement du LES. En effet, le récepteur CD28 une fois activé par ses ligands CD80 et CD86, induit la prolifération et la survie des LT. Des souris lupiques MRL<sup>lpr/lpr</sup> déficientes pour l'expression de CD28 présentent une glomérulonéphrite moins sévère et une diminution des arthrites (**Tada et al., 1999**), suggérant que bloquer l'interaction entre CD28 et ses ligands pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante. Plus récemment, une étude a mis en évidence que l'administration d'un anticorps anti-CD28 à des souris NZB/W permet de retarder le développement de la maladie et de prolonger la survie des animaux (**Laurent et al., 2017**). En revanche, des souris MRL<sup>lpr/lpr</sup> CD80<sup>-/-</sup> développent des atteintes rénales plus sévères que des souris sauvages (**Liang et al., 1999**). Cette observation peut être due à la forte interaction entre CD80 et les récepteurs inhibiteurs CTLA-4 et PD-L1 (**Butte et al., 2007**). Toutefois, l'utilisation d'une protéine de fusion CTLA-4-Ig inhibant l'interaction entre CD28 et ses ligands en se liant à CD80/86 avec une plus forte affinité que CD28, prolonge la survie de souris lupiques NZB/W, et réduit la production d'auto-Ac et l'activation des LT et des LB (**Finck et al., 1994; Mihara et al., 1998**). Chez l'Homme, l'expression du récepteur inhibiteur CTLA-4 est augmentée à la surface des LT CD4<sup>+</sup> de patients lupiques, mais son activité inhibitrice est altérée *in vitro* (**Jury et al., 2010**). Bien que des souris lupiques CD28<sup>-/-</sup> développent la maladie plus tardivement que des souris sauvages, l'accumulation de LT auto-réactifs n'est pas affectée suggérant que le rôle d'autres récepteurs co-activateurs reste à exploiter dans le LES.

ICOS est un récepteur co-activateur essentiel pour l'activation des LT, impliqué dans l'immunité humorale, et indispensable à la différenciation et à la fonction des T<sub>FH</sub>. Différentes études ont pu montrer une augmentation de l'expression de ICOS à la surface des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> de patients lupiques et une diminution de l'expression de ICOS-L à la surface des LB, reflétant une interaction récente avec des LT ICOS<sup>+</sup> (**Hutloff et al., 2004; Yang et al., 2005**). De plus, l'augmentation de l'expression de ICOS à la surface des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> est plus importante chez les patients lupiques développant une néphrite (**Li et al., 2012**). Ces différentes études montrent donc que l'expression de ICOS est corrélée au développement de la maladie.

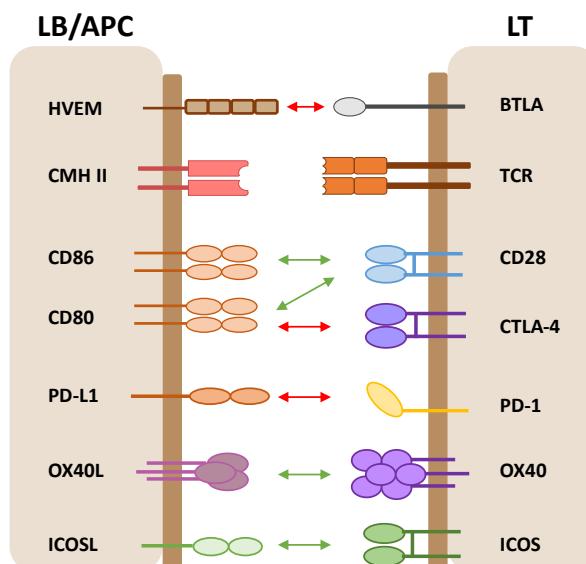
L'expression du récepteur co-activateur OX40 à la surface des LT CD4<sup>+</sup> est également augmentée chez les patients lupiques (**Farres et al., 2011; Patschan et al., 2006**). De plus, un polymorphisme du gène codant pour OX40L est associé à un risque accru de développer un lupus et à l'expression anormale de cette protéine chez les patients lupiques (**Cunninghame Graham et al., 2008; Manku et al., 2013**). Récemment, il a été montré que la voie OX40/OX40L participe à la physiopathologie du LES. En effet, la fréquence de CPA exprimant OX40L est corrélée à l'activité de la maladie et à la fréquence de T<sub>FH</sub> ICOS<sup>+</sup> dans le sang (**Jacquemin et al., 2015**). De plus, l'axe OX40/OX40L inhibe la fonction suppressive des Tregs et des T<sub>FR</sub> chez les patients lupiques. Les auteurs ont montré que les Tregs de patients lupiques expriment plus fortement OX40 que les Tregs d'individus sains et que les CPA OX40L<sup>+</sup> de patients inhibent les fonctions suppressives des Tregs en diminuant leur expression de FoxP3 (**Jacquemin et al., 2018**).

Bien que différents récepteurs co-activateurs aient été associés à la réponse anormale observée au cours du LES, plusieurs récepteurs co-inhibiteurs semblent également impliqués dans le développement de cette pathologie. PD-1 est l'un des récepteurs inhibiteurs les plus étudiés dans le LES. Cette protéine interagit avec deux ligands : PD-L1 et PD-L2. Des polymorphismes du gène codant pour PD-1 ont été associés au risque de développer un lupus. En 1999, Nishimura *et al.*, ont montré que des souris C57BL/6 déficientes pour PD-1 développent des symptômes lupiques caractérisés par le développement d'arthrites et d'une glomérulonéphrite (**Nishimura et al., 1999**). Dans le modèle murin de lupus NZB/W, l'administration d'un anticorps anti-PD-1 a diminué les atteintes rénales, et amélioré les capacités suppressives des Tregs (**Kasagi et al., 2010; Wong et al., 2013**). Chez l'Homme, les résultats concernant l'expression de PD-1 dans le LES sont contradictoires. En effet, des études ont montré une diminution de l'expression de ce récepteur à la surface des Tregs (**Kristjansdottir et al., 2010**) et un défaut de l'augmentation de l'expression de PD-1 après activation de LT CD4<sup>+</sup> *in vitro* (**Bertsias et al., 2009**). En revanche, d'autres études ont observé une augmentation de l'expression de PD-1 à la surface des Tregs (**Singla et al., 2017**), des LT CD4<sup>+</sup> (**Dolff et al., 2014**) et des LB (**Stefanski et al., 2019**). Un autre récepteur inhibiteur a très largement retenu l'attention de nombreuses équipes : CTLA-4. Des souris déficientes pour l'expression de CTLA-4 développent rapidement des symptômes sévères apparentés à ceux du lupus (**Stohl et al., 2008; Tivol et al., 1995**). Chez l'Homme, comme présenté précédemment, l'expression et la fonction de ce récepteur sont altérées chez les patients

lupiques (**Jury et al., 2010**). La réponse humorale étant contrôlée via l'expression de CTLA-4 par les T<sub>FH</sub>, Tregs et T<sub>FR</sub> (**Sage et al., 2014**), un défaut d'expression ou de fonction de CTLA-4 sur ces populations cellulaires pourrait contribuer à la pathogénèse lupique.

Enfin, BTLA est un récepteur co-inhibiteur décrit plus récemment et exprimé notamment à la surface des LT et des LB. Comme les autres récepteurs présentés, BTLA est impliqué dans la régulation de la réponse immunitaire au cours du LES. Sa structure, son expression, sa fonction et son rôle dans diverses pathologies dont le LES est décrit dans la Partie C de l'introduction.

En conclusion, bien que les récepteurs des LT (TCR) et des LB (BCR) soient les principaux acteurs de l'activation lymphocytaire, les récepteurs co-activateurs et co-inhibiteurs régulent et participent à l'homéostasie de la réponse immunitaire (**Figure 17**). Une dérégulation de l'expression et/ou de la fonction de ces récepteurs se traduisant par des signaux co-activateurs excessifs ou des signaux co-inhibiteurs insuffisants, peut mener à la rupture de tolérance et au développement de pathologies auto-immunes telles que le LES.



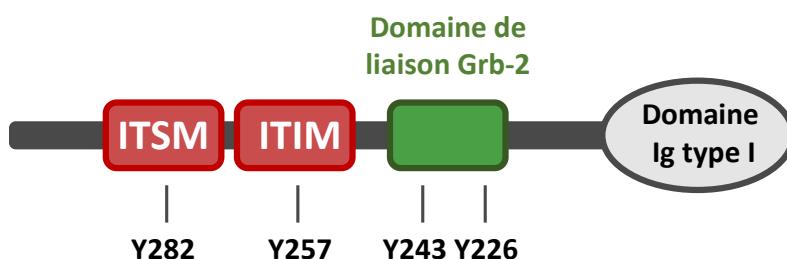
**Figure 17. Les récepteurs co-activateurs et co-inhibiteurs impliqués dans la pathologie lupique.** Les LT sont activés par la présentation d'un antigène par le CMH II au TCR, mais cette activation est finement régulée par différents récepteurs co-activateurs et co-inhibiteurs. Des altérations de l'expression et/ou de la fonction de différents récepteurs ont été mises en évidence chez les patients lupiques. Des signaux co-activateurs excessifs (flèches vertes) ou des signaux co-inhibiteurs insuffisants (flèches rouges) peuvent mener à l'hyperactivation des LT et des LB et ainsi participer à la pathogénèse lupique.

## C) Le récepteur co-inhibiteur BTLA

### I) Structure et expression de BTLA et de son ligand HVEM

#### 1) Structure de BTLA

B and T Lymphocyte Attenuator (BTLA ou CD272) est un récepteur inhibiteur décrit pour la première fois en 2003 par l'équipe de Kenneth Murphy. C'est le troisième membre de la famille CD28 découvert après les récepteurs inhibiteurs PD-1 et CTLA-4. Le gène humain *btlA* est localisé sur le chromosome 3 (3q13) et code pour une protéine transmembranaire glycosylée de type I de 289 acides aminés. Sa structure est similaire à celle de CTLA-4 et de PD-1. Elle est composée d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique (**Gavrieli et al., 2003; Watanabe et al., 2003**). Le domaine cytoplasmique de BTLA comporte trois domaines conservés : un domaine de liaison de la protéine Grb-2, un motif ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) et un motif ITSM (Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif) (**Gavrieli and Murphy, 2006; Watanabe et al., 2003**) (**Figure 18**). De façon surprenante, BTLA interagit avec un membre de la famille des TNF récepteurs (TNFR) appelé Herpes Virus Entry Mediator (HVEM, ou TNFRS14, ou CD270). En effet, BTLA lie la partie N-terminale de HVEM et est capable de se fixer sur un domaine de reconnaissance similaire à la glycoprotéine gD du virus de l'herpès (**Compaan et al., 2005**). Une forme soluble de BTLA a également été décrite ; elle est issue d'un épissage alternatif de l'ARN messager de BTLA entraînant l'apparition d'un codon stop et résultant en une forme tronquée et soluble de BTLA (**Monaghan et al., 2018**).



**Figure 18. Structure de BTLA.** BTLA est une protéine membranaire composée d'un domaine extracellulaire de type immunoglobuline, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique. Le domaine cytoplasmique de BTLA comporte trois motifs possédant des tyrosines : un motif ITIM, un motif ITSM et un motif de liaison de la protéine Grb-2.

## **2) Expression de BTLA**

### **2.1. Sur les populations lymphoïdes**

BTLA est exprimé par les LT du thymus lors de la sélection positive, et faiblement par les LB dans la moelle osseuse durant les stades de développement pro-B et pre-B (**Han et al., 2004**).

L'expression de BTLA à la surface des LT $\alpha\beta$  a fait l'objet de plusieurs études et son expression sur les différentes populations de LThelper (Th) est controversée. En effet, deux équipes ont montré que BTLA est uniquement exprimé par les Th1 et non par les Th2 (**Hurchla et al., 2005; Loyet et al., 2005**), alors qu'une troisième équipe a montré que les Th1 et les Th2 expriment BTLA de façon similaire (**Otsuki et al., 2006**). Par ailleurs, l'expression de BTLA est faible à la surface des LT CD4 $^{+}$  naïfs et est rapidement augmentée après activation (**Hurchla 2005**). Contrairement à l'expression d'autres récepteurs inhibiteurs tels que PD-1 ou CTLA-4, les Tregs expriment faiblement BTLA par rapport aux autres populations de LT CD4 $^{+}$  (**Tao et al., 2008**). Chez l'Homme, l'expression de BTLA est augmentée à la surface LT CD4 $^{+}$  différenciés en comparaison aux LT CD4 $^{+}$  naïfs, alors qu'elle diminue à la surface des LT CD8 $^{+}$  au cours de leur différenciation (**Derré et al., 2010; Serriari et al., 2010**).

BTLA est également exprimé par les cellules lymphoïdes du système immunitaire innée, notamment les LT $\gamma\delta$ . Chez la souris, les LT $\gamma\delta$  expriment BTLA et cette expression est régulée par celle du facteur de transcription ROR $\gamma$ t et par la production d'IL-7 (**Bekiaris et al., 2013**). Chez l'Homme, BTLA est exprimé de façon similaire entre les LT $\gamma\delta$  et les LT $\alpha\beta$ . De plus, son expression est plus élevée sur les LT $\gamma\delta$  naïfs que sur les LT $\gamma\delta$  effecteurs-mémoires (**Gertner-Dardenne et al., 2013**).

D'autre part, BTLA est dix fois plus exprimé à la surface des LB qu'à la surface des LT (**Han et al., 2004**). Chez l'Homme, deux études ont montré que le niveau d'expression de BTLA est augmenté sur les LB mémoires non-switchés (CD19 $^{+}$ IgD $^{+}$ CD27 $^{+}$ IgM $^{+}$ ) par rapport aux LB naïfs (CD19 $^{+}$ IgD $^{+}$ CD27 $^{-}$ IgM $^{+}$ ) et aux LB mémoires switchés (CD19 $^{+}$ IgD $^{-}$ CD27 $^{+}$ IgM $^{-}$ ) (**Llinàs et al., 2011; Thibault et al., 2013**). Récemment, une autre étude a montré que les LB naïfs expriment BTLA de façon similaire aux LB transitionnels (CD19 $^{+}$ CD24 $^{++}$ CD38 $^{++}$ ), et que ce sont ces deux sous-populations de LB qui expriment le plus fortement BTLA. De plus, cette étude indique

que les plasmablastes (PB, CD19<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>CD38<sup>++</sup>CD27<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup>) présentent une expression plus faible de BTLA que les LB naïfs. Les sous-populations de LB mémoires switchés (CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>), non-switchés (CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>) et double négatifs (CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>), expriment quant à elles plus faiblement BTLA que les LB naïfs ou les PB. Par ailleurs, les LB mémoires switchés expriment plus faiblement BTLA que les LB mémoires non switchés et double négatifs (**Axelsson et al., 2020**). En 2010, il a été montré que BTLA est plus fortement exprimé à la surface des PL humains circulants qu'à la surface des PL présents dans les amygdales ou la moelle osseuse (**Rodríguez-Bayona et al., 2010**). Enfin, en 2015, il a également été observé que le niveau d'expression de BTLA diminue à la surface des LB de personnes âgées par rapport à ceux d'individus plus jeunes (**Kannan et al., 2015**).

## 2.2. Sur les populations myéloïdes

BTLA est également exprimé par les cellules myéloïdes. En effet, son expression a été détectée à la surface de cellules spléniques TCR<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>CHMII<sup>+</sup> de diverses lignées murines, ainsi qu'à la surface de macrophages CD11b<sup>+</sup> (**Han et al., 2004**). Par la suite, il a été confirmé que BTLA est exprimé sur les cellules myéloïdes telles que les DC, les macrophages et les neutrophiles (**Hurchla et al., 2005**). Parmi les DC, l'expression de BTLA est faible sur les DC immatures et est augmentée à la surface des DC matures (**Han et al., 2004**).

## 3) Interaction entre BTLA et HVEM

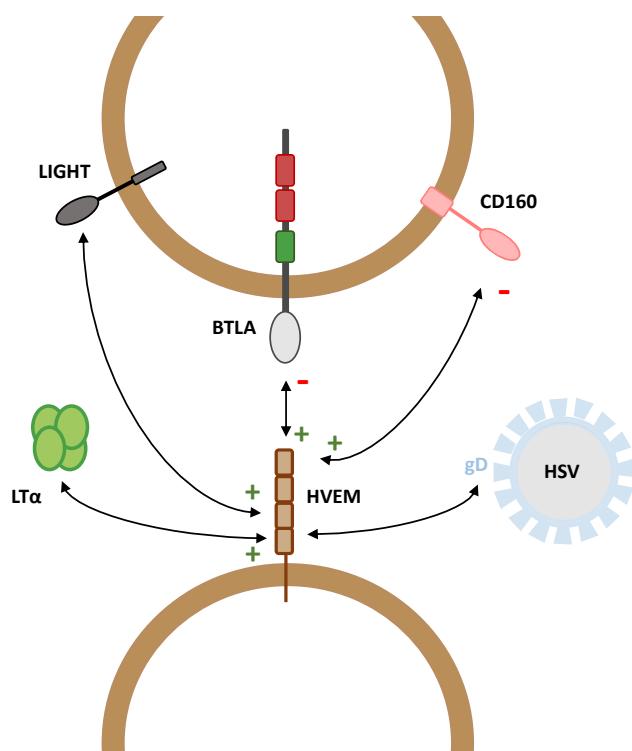
### 3.1. Expression de HVEM

Le récepteur HVEM a été découvert lors de l'identification des protéines impliquées dans les mécanismes d'entrée du virus Herpes Simplex 1 (HSV1) dans la cellule (**Montgomery et al., 1996**). En effet, l'interaction entre HVEM et la glycoprotéine gD exprimée par le HSV1, induit la fusion du virus avec la membrane cellulaire, et ainsi l'internalisation du virus. Par la suite, l'ADN complémentaire (ADNc) codant pour HVEM a été identifié chez l'Homme et la souris par d'autres équipes s'intéressant aux nouveaux membres de la famille des TNFR (**Hsu et al., 1997; Kwon et al., 1997; Marsters et al., 1997**). HVEM est composé d'un domaine cytoplasmique dépourvu de domaine de mort, indiquant que HVEM n'est pas impliqué dans la signalisation apoptotique, et d'un domaine extracellulaire composé de quatre domaines

riches en cystéine (CRD, Cystein-Rich Domains). La liaison de HVEM à ses ligands active les facteurs de transcription NF-κB et AP-1 dans la cellule exprimant HVEM. Cette protéine est exprimée à la surface de nombreuses cellules hématopoïétiques (LT, LB, DC, Treg, monocytes, neutrophiles, NK) et non-hématopoïétiques (cellules épithéliales, et mésenchymateuses). Chez l'Homme, HVEM est fortement exprimé à la surface des LB naïfs et mémoires mais elle est peu exprimé par les LB du GC (**Duhen et al., 2004**).

### 3.2. Ligands de HVEM

Avant que BTLA ne soit identifié comme étant un ligand de HVEM, il a été montré que la lymphotoxine- $\alpha$  (LT $\alpha$ ), LIGHT (« lymphotoxin-like, exhibits inducible expression, and competes with HSV gD for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes ») et CD160 étaient capables d'interagir avec HVEM (**Mauri et al., 1998**) (**Figure 19**).

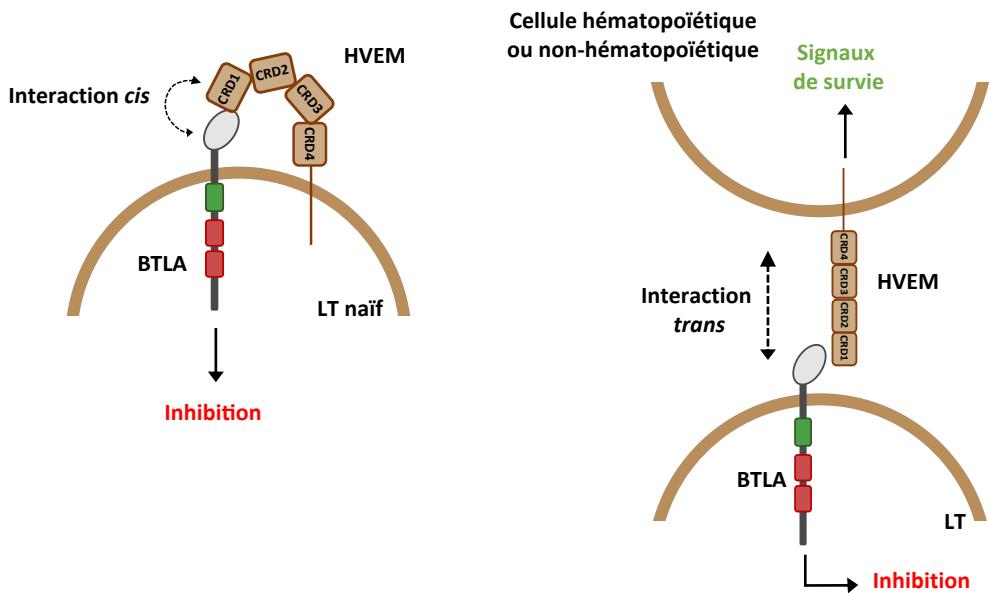


**Figure 19. Interaction de HVEM avec ses différents ligands.** HVEM a été découvert comme étant impliqué dans l'entrée du virus HSV1 dans les cellules via sa liaison à la protéine virale gD. En parallèle, le récepteur HVEM est capable de lier différentes protéines aux fonctions diverses. La liaison de HVEM à LT $\alpha$  ou LIGHT induit un signal stimulateur (+) à la cellule exprimant HVEM. Toutefois, l'interaction entre HVEM et BTLA ou CD160 est bidirectionnelle. En effet, l'engagement de BTLA et CD160 induit un signal inhibiteur à la cellule portant ces récepteurs (-), alors que l'engagement de HVEM par ces deux molécules entraîne un signal activateur à la cellule exprimant HVEM (Inspirée de Demerlé et al., 2021).

La LT $\alpha$  est une protéine soluble qui se lie également aux TNFR1 et TNFR2, tandis que LIGHT est une protéine membranaire (mais possédant également une forme soluble) capable de se lier au LT $\beta$ R et au récepteur soluble DcR3. CD160 est quant à elle une protéine membranaire qui possède un motif glycosylphosphatidylinositol (GPI) lui permettant d'être ancrée à la membrane cellulaire. Cette protéine était connue pour son interaction avec la molécule du CMH de classe I. La LT $\alpha$  et LIGHT se lient aux domaines CRD2 et CRD3 de HVEM, alors que CD160 se lie au domaine CRD1 (**Murphy and Murphy, 2010**). La liaison de LIGHT à HVEM conduit au recrutement de TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) au niveau du domaine cytoplasmique de HVEM, entraînant ainsi l'activation de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B qui induit un signal de survie aux cellules exprimant HVEM. Par ailleurs, la liaison de HVEM à CD160 conduit à l'inhibition de la cellule portant CD160, et une activation de la cellule portant HVEM (**Cheung and Ware, 2011**).

Concernant BTLA, la recherche de ligands s'était dans un premier temps concentrée sur les membres de la famille des récepteurs B7, BTLA présentant des similarités avec les récepteurs CTLA-4 et PD-1. De façon surprenante, HVEM a été identifié comme étant le ligand exclusif de BTLA en 2005 chez la souris (**Sedy et al., 2005**) et chez l'Homme (**Gonzalez et al., 2005**). BTLA interagit avec le domaine CRD1 de HVEM (**Gonzalez et al., 2005**), et leur interaction génère des signaux bidirectionnels. En effet, comme lors de la liaison de LIGHT à HVEM, la liaison de BTLA induit le recrutement de TRAF2 et l'activation de la voie de NF- $\kappa$ B dans la cellule exprimant HVEM. En revanche, cette interaction entraîne également un signal inhibiteur dans la cellule exprimant BTLA après recrutement des phosphatases SHP-1 et SHP-2 au niveau du domaine cytoplasmique de BTLA (**Watanabe et al., 2003**). Ces signaux bidirectionnels sont observés lorsque l'interaction entre BTLA et HVEM a lieu en *trans*, c'est-à-dire, entre deux cellules. De façon intéressante, ces deux molécules interagissent préférentiellement en *cis* lorsqu'elles sont exprimées par la même cellule. Lors d'une interaction en *cis*, BTLA se lie, comme lors d'une interaction en *trans*, au site CRD1 de HVEM. Cette interaction empêche ainsi la liaison des autres ligands (CD160 et BTLA en *trans*) de HVEM et participe au maintien des cellules dans un état quiescent, inhibant l'activation cellulaire dépendante de HVEM. Après activation des LT, le complexe *cis* BTLA-HVEM est déstabilisé et l'expression de BTLA est augmentée, permettant une interaction en *trans* avec HVEM (**Cheung et al., 2009a**) (**Figure 20**). La forme membranaire de LIGHT peut également

dissocier le complexe *cis* BTLA-HVEM et ainsi activer la cellule portant HVEM (Pasero et al., 2012).



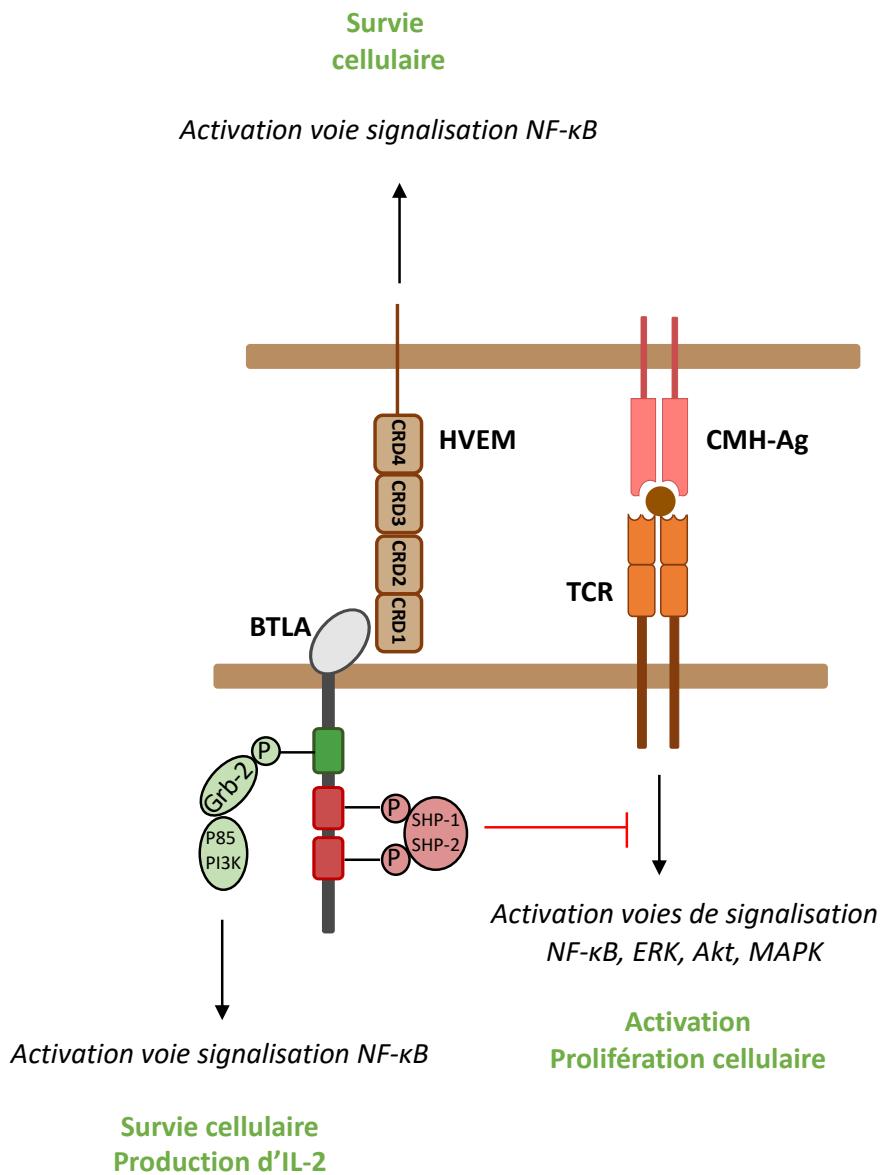
**Figure 20. Interaction entre BTLA et HVEM.** La liaison en *cis* entre BTLA et HVEM délivre des signaux inhibiteurs maintenant ainsi les cellules dans un état quiescent (Figure de gauche) et empêche la liaison en *trans* de BTLA et CD160 à HVEM. Après activation des LT, le complexe *cis* BTLA/HVEM est déstabilisé et permet une interaction en *trans* entre ces deux molécules exprimées par deux cellules distinctes. Cette interaction induit des signaux inhibiteurs à la cellule exprimant BTLA, réduisant ainsi son activation, et des signaux de survie à la cellule exprimant HVEM (Figure de droite).

## II) Fonction de BTLA

### 1) Mécanisme d'action

BTLA comporte dans sa queue cytoplasmique trois motifs contenant des tyrosines. Ces motifs sont conservés au cours de l'évolution chez la souris, le rat et l'Homme. Deux de ces motifs sont des domaines inhibiteurs similaires à ceux retrouvés dans les récepteurs CTLA-4 et PD-1 (Gavrieli et al., 2003). Le troisième motif est un site de recrutement de Grb-2. Lors des premières études concernant le rôle de BTLA, il a été montré que le recrutement de BTLA au niveau du TCR d'un LT activé après son engagement par HVEM, entraîne la phosphorylation des tyrosines des motifs ITIM de BTLA et le recrutement des phosphatases SHP-1 et SHP-2 induisant ainsi une diminution de l'activation de la cellule exprimant BTLA (Otsuki et al., 2006; Sedy et al., 2005; Watanabe et al., 2003). Aussi bien chez l'Homme que chez la souris, une mutation dans l'un ou l'autre des motifs ITIM ou ITSM abolit l'association de BTLA avec SHP-1

et SHP-2 (Gavrieli et al., 2003), contrairement à ce qui a été montré pour le récepteur inhibiteur PD-1, où seul un motif fonctionnel est nécessaire pour le recrutement des phosphatases (Okazaki et al., 2001).



**Figure 21. Mécanisme d'action de BTLA.** Après engagement de BTLA par HVEM, BTLA est accumulé dans les radeaux lipidiques à proximité du TCR. Les tyrosines contenues dans la queue cytoplasmique de BTLA sont phosphorylées et recrutent les phosphatases SHP-1 et SHP-2 qui déphosphorylent à leurs tours les premiers messagers associés au TCR. Cette inhibition régule négativement les voies associées à l'activation et la prolifération cellulaire : NF-κB, ERK, JNK, MAPK. En parallèle, le recrutement de la protéine Grb-2 favorise la survie cellulaire en activant la voie de signalisation NF-κB. De plus, l'interaction entre BTLA et HVEM étant bidirectionnelle, la cellule exprimant HVEM reçoit des signaux de survie suite à l'activation de la voie de signalisation de NF-κB.

Très récemment, une étude a montré que BTLA recrute préférentiellement la phosphatase SHP-1 alors que PD-1 recrute préférentiellement SHP-2. De plus, le complexe BTLA-SHP-1 entraîne une meilleure inhibition des LT que le complexe BTLA-SHP-2 (**Xu et al., 2020**). Outre ce rôle inhibiteur, BTLA par l’intermédiaire du recrutement de la protéine Grb-2, peut également induire des signaux de survie. En effet, le recrutement de Grb-2 et de la sous-unité p85 de la protéine PI3K induit des signaux de survie et de prolifération, et promeut la production d’IL-2 (**Gavrieli and Murphy, 2006; Ritthipichai et al., 2017**). En 2009, il a été montré chez la souris que BTLA est principalement localisé au niveau du golgi et des lysosomes dans des LT au repos. Après activation des LT, BTLA se retrouve localisé à leur surface et s’accumule au niveau de la synapse immunologique. De plus, l’interaction entre BTLA et HVEM est indispensable à l’accumulation de BTLA dans les radeaux lipidiques (**Owada et al., 2010**). Enfin, comme mentionné précédemment, la liaison de BTLA à HVEM active la voie de signalisation de NF-κB dans la cellule exprimant HVEM (**Cheung et al., 2009b**) (**Figure 21**).

## 2) Rôle fonctionnel de BTLA dans l’immunité innée

Comme l’indique son nom, BTLA est majoritairement exprimé par les LT et les LB, mais est aussi exprimé par les cellules de l’immunité innée comme les DC. La voie de signalisation BTLA/HVEM est indispensable à la régulation de l’homéostasie des DC. En effet, alors que la voie de signalisation du récepteur à la lymphotoxine  $\beta$  engendre la prolifération des DC, la voie de signalisation BTLA/HVEM inhibe leur prolifération (**Trez et al., 2008**). Plus récemment, Xin *et al.*, ont montré que la surexpression de BTLA inhibe la maturation des DC et induit la tolérance des DC immatures (**Xin et al., 2017**). BTLA peut également inhiber la voie de signalisation du TLR4 et ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires par les DC (**Kobayashi et al., 2013**). Les DC exprimant BTLA sont capables, après engagement de HVEM sur les LT, d’induire l’expression de CD5 par les LT et de promouvoir leur différenciation en Tregs périphériques, indiquant ainsi que BTLA est impliqué dans la tolérance périphérique (**Jones et al., 2016**).

Les LT $\gamma\delta$ , dont la survie est dépendante de l’IL-7, sont des cellules qui se situent à la frontière entre immunité innée et adaptative. La cytokine IL-7 augmente l’expression de BTLA à la surface des LT $\gamma\delta$ , induisant une diminution de l’expansion de ces cellules (**Bekiaris et al., 2013**). Dans cette même étude, des souris déficientes pour BTLA sont plus sensibles au

développement de dermatites dépendantes des LT $\gamma\delta$ . De plus, l'administration d'un anticorps agoniste de BTLA réduit la prolifération des LT $\gamma\delta$  et leur production d'IL-17, entraînant ainsi une diminution de l'inflammation et du développement de dermatites chez ces souris (**Bekiaris et al., 2013**). Chez l'Homme, une population de LT $\gamma\delta$  nommée LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T est particulièrement impliquée dans l'immunosurveillance des tumeurs. Dans ce contexte, l'engagement de BTLA sur ces LT $\gamma\delta$  par HVEM exprimé par les cellules tumorales, induit l'inhibition de la prolifération des LT $\gamma\delta$  (**Gertner-Dardenne et al., 2013; Hwang et al., 2021**). De plus, bloquer l'interaction BTLA/HVEM à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-BTLA ou anti-HVEM, conduit à une augmentation de la prolifération des LT $\gamma\delta$  (**Gertner-Dardenne et al., 2013; Hwang et al., 2021**) sans modifier les capacités anti-tumorales de ces cellules (**Hwang et al., 2021**).

### 3) Rôle fonctionnel de BTLA dans les LT

Bien que BTLA soit exprimé à la surface de nombreux types cellulaires, c'est sa fonction inhibitrice sur les LT qui est à ce jour la plus étudiée. Des LT murins déficients pour BTLA présentent une activation accrue en réponse à une stimulation du TCR (**Han et al., 2004**). De plus, l'utilisation d'un anticorps agoniste de BTLA (**Han et al., 2004; Krieg et al., 2005**) ou d'une protéine de fusion HVEM-Fc (**Gonzalez et al., 2005**) induit l'inhibition de l'activation des LT *ex vivo*. Chez la souris, l'utilisation d'un anticorps agoniste de BTLA a permis de démontrer que l'engagement de la voie de BTLA entraîne une inhibition de la prolifération plus marquée des LT CD4 $^+$  que des LT CD8 $^+$  *ex vivo* (**Krieg et al., 2005**). Chez l'Homme, l'utilisation d'un anticorps agoniste conduit également à une inhibition de l'activation et de la prolifération des LT CD4 $^+$  *ex vivo* (**Otsuki et al., 2006**).

En ce qui concerne les Tregs, il a été montré chez la souris que BTLA est faiblement exprimé par ces cellules. De plus, l'expression de BTLA n'est pas augmentée après activation des Tregs contrairement aux LT CD4 $^+$  effecteurs. En revanche, après activation, les Tregs présentent une augmentation de l'expression de HVEM à leur surface, ce qui n'est pas le cas des LT CD4 $^+$  effecteurs. Par ailleurs, des LT effecteurs cultivés en présence de Tregs HVEM-/- ne sont pas inhibés et prolifèrent fortement suggérant que l'expression de HVEM par les Tregs est indispensable à leurs fonctions suppressives. De même, des LT effecteurs BTLA-/- prolifèrent plus que des LT effecteurs WT en présence de Tregs WT. Les auteurs ont donc

proposé que les Tregs exercent leur fonction suppressive *via* la liaison de HVEM qu'ils expriment, à BTLA exprimé à la surface des LT CD4<sup>+</sup> effecteurs (**Tao et al., 2008**).

L'expression et la fonction de BTLA dans les T<sub>FH</sub> ont également été étudiées. Les T<sub>FH</sub> CXCR5<sup>+</sup> expriment très fortement BTLA par rapport aux LT CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>-</sup> (**Kashiwakuma et al., 2010; Nurieva et al., 2008**). Kashiwakuma *et al.*, ont montré chez la souris, que l'expression de BTLA par les T<sub>FH</sub> permet de réguler la production d'IgG par les LB. En effet, l'engagement de la voie de BTLA dans les T<sub>FH</sub> entraîne une inhibition de la production d'IL-21 par ces cellules (**Kashiwakuma et al., 2010**).

#### 4) Rôle fonctionnel de BTLA dans les LB

La majorité des études concernant BTLA ont porté sur son rôle dans la régulation des LT et peu de données sont connues quant à son rôle dans la régulation des LB. BTLA est très fortement exprimé à la surface des LB suggérant un rôle dans la réponse humorale. Des LB déficients en BTLA présentent une augmentation de la réponse à une stimulation par des anticorps anti-IgM (**Watanabe et al., 2003**) et des souris BTLA<sup>-/-</sup> immunisées présentent quant à elles, une plus forte production d'anticorps de type IgG1, IgG2a et IgG2b (**Watanabe et al., 2003**). De plus, une augmentation de la production d'IgG3, isotype associé à des réponses T-indépendantes, est observée chez ces souris (**Hurchla et al., 2005**). L'ensemble de ces observations indique que BTLA régule la voie du BCR.

En 2009, Vendel *et al.*, ont évalué pour la première fois le rôle et la fonction de BTLA dans des LB humains. Ils ont mis en évidence que l'interaction BTLA/HVEM atténue la prolifération des LB humains après recrutement de la phosphatase SHP-1 (et non de SHP-2) suite à la phosphorylation des domaines ITIM de BTLA (**Vendel et al., 2009**). En effet, grâce à l'utilisation de la lignée cellulaire BJAB humaine, les auteurs ont mis en évidence que BTLA est recruté au niveau du complexe du BCR après activation des cellules. Ce recrutement entraîne une réduction de la phosphorylation des protéines SYK et BLNK, ainsi qu'une réduction de la localisation nucléaire du facteur de transcription NF-κB, après engagement de BTLA par son ligand HVEM (**Vendel et al., 2009**). En 2013, Thibult *et al.*, ont étudié la fonction de BTLA dans des LB primaires humains. Les auteurs ont montré que l'engagement de BTLA par son ligand HVEM induit une inhibition de la prolifération et de la production de cytokines par les LB après leur activation par un agoniste du TLR9, le CpG (**Thibult et al., 2013**). Au contraire, en 2019,

Werner et al., ont montré à l'aide de LB primaires, que l'engagement de BTLA par un anticorps agoniste (clone MIH26) n'induit pas d'inhibition de leur prolifération et de leur production de cytokines suite à leur activation par du CpG (**Werner et al., 2019**).

### III) BTLA dans les pathologies

#### 1) Hypersensibilités : allergies et asthme

L'implication de BTLA dans la réaction allergique a été montrée pour la première fois en 2006 grâce à un modèle murin de développement d'allergies des voies respiratoires. En effet, dans ce modèle, BTLA agit en synergie avec PD-1 pour limiter la durée et l'importance de l'inflammation (**Deppong et al., 2006**). De plus, il a été mis en évidence que BTLA joue un rôle protecteur dans les réactions allergiques en inhibant le recrutement d'éosinophiles, la production d'IL-5 dans les voies respiratoires (**Tamachi et al., 2007**) et en régulant l'inflammation *in vivo* (**Deppong et al., 2008**). Chez l'Homme, le rôle de BTLA dans la réaction allergique a été étudiée pour la première fois chez des patients allergiques au pollen. Cette étude a mis en évidence une diminution de l'expression de BTLA sur les LT CD4<sup>+</sup> de patients allergiques non traités mais une augmentation chez des patients ayant subi une désensibilisation. Cette augmentation de l'expression de BTLA est corrélée à une diminution de la production d'IL-5 chez des patients sous immunothérapie spécifique, indiquant que BTLA contribue à la régulation de la réponse allergique chez l'Homme (**Okano et al., 2008**). Dans le cadre d'hypersensibilité de type dermatite allergique, il semble que BTLA soit également une piste thérapeutique intéressante. En effet, l'administration *in vivo* d'un anticorps agoniste anti-BTLA permet d'inhiber la production d'IFNγ par les LT CD8<sup>+</sup> et le développement de l'hypersensibilité de contact dans un modèle murin (**Nakagomi et al., 2013**).

#### 2) Transplantations et rejets de greffe

Les LT sont considérés comme les acteurs majeurs du rejet de greffe. Étudier leur régulation *via* les récepteurs activateurs et inhibiteurs ouvre donc la porte à l'identification de nouvelles stratégies permettant de maintenir la survie du greffon. Dans ce contexte, l'impact de BTLA dans la régulation des réponses allogéniques a fait l'objet de plusieurs études.

Dans un modèle murin de greffe cardiaque allogénique mais partiellement non apparié au niveau du CMH, l'expression de BTLA (mais pas de PD-1) est fortement induite dans les LT alloréactifs entraînant ainsi une meilleure survie des greffes (**Tao et al., 2005**). La maladie du greffon contre l'hôte (GVDH) est une complication sévère de l'allogreffe de cellules souches. Dans ce contexte, Albring *et al.*, ont montré que l'administration d'un anticorps agoniste anti-BTLA à des souris au même moment que la transplantation de cellules souches hématopoïétiques, a permis d'empêcher la réponse du greffon contre l'hôte (**Albring et al., 2010**). Une autre équipe a confirmé ces résultats et a montré que l'amélioration du maintien de la greffe est dépendante de l'inhibition des LT du donneur, et non des LT du receveur (**Sakoda et al., 2011**). En effet, l'administration d'un anticorps anti-BTLA chez des souris entraîne une diminution de la cytotoxicité des LT donneurs envers l'hôte (**del Rio et al., 2011, 2012**). Dans le cas d'une greffe cardiaque, l'administration d'un anticorps agoniste de BTLA prolonge la survie de la greffe probablement due à une augmentation de la fréquence des Tregs et une diminution de la production d'IL-2 et d'IFN $\gamma$  (**Uchiyama et al., 2014**). Plus récemment, il a été montré que la voie de signalisation de BTLA/HVEM n'intervient pas dans la réponse humorale mise en place lors d'un rejet de greffon. En effet, le blocage de la voie de BTLA/HVEM n'affecte ni la prolifération des T<sub>FH</sub>, ni celle des LB du GC (**Rodriguez-Barbosa et al., 2017**).

Chez l'Homme, l'analyse de l'expression de BTLA dans le cas d'une greffe de rein, a révélé des résultats conflictuels. En effet, il a été montré en 2013 que BTLA est surexprimé chez des patients ayant rejeté une greffe de rein, par rapport au groupe de patients ayant toléré la greffe (**Tian et al., 2013**). En revanche, une étude plus récente a observé que l'expression de BTLA est diminuée à la surface des LT périphériques de patients ayant rejeté une greffe de rein (**Zhang et al., 2019**).

### 3) Réponses anti-virales

BTLA peut également jouer un rôle dans les infections virales. La protéine virale de l'herpès gD, peut se lier sélectivement à HVEM et ainsi bloquer son engagement avec BTLA ou LIGHT. D'autre part, le cytomégavirus humain code pour une protéine virale (UL144) présentant une forte homologie avec le domaine CRD1 de HVEM. Cette protéine virale se lie

alors à BTLA et mime la liaison BTLA/HVEM entraînant ainsi l'inhibition des LT (**Cheung et al., 2005**).

### 3.1. VIH

Une première étude datant de 2009 a étudié l'expression de BTLA sur les LT du sang périphérique de patients atteints du VIH-1. Cette étude a montré que l'expression de BTLA est significativement diminuée à la surface des LT CD4<sup>+</sup> et des LT CD8<sup>+</sup> de patients VIH-1<sup>+</sup> par rapport à des individus sains. De plus, cette diminution de l'expression de BTLA sur les LT de patients est corrélée à la progression de l'infection (**Xu et al., 2009**). En 2011, Zhang *et al.*, ont montré que la diminution de l'expression de BTLA à la surface des LT CD4<sup>+</sup> de patients VIH-1<sup>+</sup> par rapport aux LT CD4<sup>+</sup> d'individus sains est dépendante de la production d'IFN $\alpha$  par les pDC. En effet, le blocage ou la déplétion de l'IFN $\alpha$  entraîne une augmentation de l'expression de BTLA à la surface des LT CD4<sup>+</sup>. De plus, ces travaux ont mis en évidence un défaut d'inhibition de la voie de BTLA sur les LT CD4<sup>+</sup> de patients VIH-1<sup>+</sup>, puisqu'après engagement de la voie de BTLA à l'aide d'un anticorps agoniste, l'inhibition de l'activation des LT CD4<sup>+</sup> de patients est plus faible que celle observée chez des individus sains (**Zhang et al., 2011b**). L'expression de BTLA est également diminuée à la surface des LB de patients atteint du VIH (**Boliar et al., 2012**). Récemment, il a été montré que l'utilisation d'un anticorps bloquant dirigé contre BTLA entraîne la prolifération des LT CD8<sup>+</sup> de patients. De plus, ces résultats sont d'autant plus statistiquement significatifs que l'anticorps est associé à un anticorps bloquant anti-PD-1 (**Grabmeier-Pfistershammer et al., 2017**).

### 3.2. Hépatite

Les niveaux d'expression de BTLA ont également été analysés dans le cadre de l'hépatite B. Il a été montré que l'expression de BTLA à la surface des LT CD4<sup>+</sup> périphériques de patients n'est pas différente de celle retrouvée à la surface de LT CD4<sup>+</sup> d'individus sains (**Nan et al., 2010**). En revanche, en 2013, une étude a révélé que l'expression de BTLA est augmentée à la surface des LT CD4<sup>+</sup> intra-hépatique chez les patients atteints de l'hépatite B. Le blocage *in vitro* de la voie de BTLA entraîne la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> intra-hépatiques ainsi que la sécrétion de cytokines par ces cellules. Cette stratégie pourrait alors permettre de restaurer la réponse antivirale des LT dans le cadre d'une infection par le HBV (**Cai et al., 2013**).

Par ailleurs, des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du HBV exprimant fortement BTLA mais ne produisant pas d'IFNγ sont recrutés au niveau du foie. Ces LT CD8<sup>+</sup> retrouvent leur fonction inhibitrice après blocage de la voie de BTLA (**Wang et al., 2017a**).

### **3.3. SARS-CoV-2**

Très récemment, l'expression de BTLA a également été évaluée chez des patients atteint du virus SARS-CoV-2. Deux études ont mis en évidence une augmentation de l'expression de BTLA à la surface des LT CD8<sup>+</sup> périphériques chez les patients atteint de la COVID-19 par rapport aux LT CD8<sup>+</sup> d'individus sains (**Herrmann et al., 2020; Schultheiß et al., 2020**). Une autre étude a quant à elle détecté une augmentation de l'expression de BTLA dans les poumons de patients décédés de la COVID-19 (**Sharif-Askari et al., 2021**).

## **4) Réponses antiparasitaires et antibactériennes**

### **4.1. Paludisme**

Dans un modèle murin de paludisme, il a été observé une sur-expression de BTLA sur les LT de la rate ainsi qu'une infiltration de LT exprimant BTLA au niveau du cerveau. Le traitement de ces souris avec un anticorps agoniste de BTLA *in vivo* a permis de réduire les symptômes de la maladie et de diminuer le recrutement de LT au niveau du cerveau des souris infectées (**Lepenies et al., 2007**). Toutefois, des souris déficientes pour BTLA et infectées par *Plasmodium yoelli*, éliminent plus rapidement l'infection (**Adler et al., 2011**). Ces données contradictoires quant au rôle de BTLA dans le paludisme, indiquent que BTLA semble avoir un rôle néfaste au moment du développement de la maladie, mais un rôle bénéfique une fois la maladie déclarée.

### **4.2. Infections bactériennes**

BTLA joue également un rôle dans la réponse anti-bactérienne. Des souris déficientes pour BTLA ou HVEM sont plus résistantes à une infection par la listériose et produisent plus de cytokines pro-inflammatoires (**Sun et al., 2009**). Bloquer la voie de signalisation de BTLA pourrait alors permettre une élimination plus rapide du pathogène infectieux. En revanche, une autre étude a montré que des souris déficientes pour BTLA et infectées par *Listeria*

*monocytogenes* présentent moins de LT CD8 effecteurs et mémoires que des souris contrôles. De plus, bloquer la voie de signalisation BTLA/HVEM permet de diminuer le nombre de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène (**Steinberg et al., 2013**). Ces résultats suggèrent que la voie de signalisation BTLA/HVEM peut également induire la survie de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'agent infectieux nécessaires pour combattre l'infection.

Lors d'une infection par la tuberculose, l'expression de BTLA est augmentée à la surface des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> circulants de patients par rapport à des individus sains (**Shen et al., 2019**), ainsi qu'à la surface des DC (**Cai et al., 2019; Wang et al., 2017c; Zhang et al., 2020a**). Les DC exprimant BTLA présentent de faibles capacités à stimuler des LT allogéniques (**Wang et al., 2017c**) et produisent plus d'IL-4 et de TGF-β que des DC n'exprimant pas BTLA, polarisant ainsi la réponse T vers une réponse de type Th2 et Tregs (**Zhang et al., 2020a**) ce qui altère alors la réponse immunitaire anti-tuberculose.

#### 4.3. Choc septique

Lors d'une infection par un agent infectieux, une inflammation sévère peut se produire et est nommée choc septique. Le rôle de BTLA dans le choc septique a été étudié pour la première fois en 2012 par Shubin *et al.* Cette équipe a montré que l'expression de BTLA dans un modèle murin de choc septique est corrélée à un taux de mortalité plus important (**Shubin et al., 2012**). Cette même équipe a montré que des patients ayant subi un choc septique, présentent plus de LT CD4<sup>+</sup> BTLA<sup>+</sup> périphériques que des patients malades mais n'ayant pas subi de choc septique (**Shubin et al., 2013**). De plus, des patients présentant plus de 80% de LT CD4<sup>+</sup> BTLA<sup>+</sup> dans le sang sont plus sensibles au développement de maladies nosocomiales et sont plus longuement hospitalisés (**Shubin et al., 2013**). Les auteurs ont également observé dans un modèle murin de choc septique, que l'expression de BTLA est augmentée à la surface des LT et des LB circulants, et que ces cellules meurent par apoptose. Par ailleurs, l'apoptose de ces cellules est inhibée chez des souris BTLA<sup>-/-</sup> (**Shubin et al., 2013**). Quelques années plus tard, cette même équipe a administré un anticorps agoniste anti-BTLA à un modèle murin de choc septique. Ce traitement a entraîné une augmentation de la réponse immunitaire, de la lésion de certains organes et de la mortalité des animaux, indiquant que BTLA joue un rôle négatif dans la régulation du choc septique (**Cheng et al., 2016**). Plus récemment, il a été montré que des patients ayant subi un choc septique présentent de fortes concentrations de

la forme soluble de BTLA dans leur sérum, corrélées à la sévérité de la maladie (**Lange et al., 2017; Monaghan et al., 2018**). De plus, une augmentation de l'expression de BTLA à la surface des Tregs a été récemment observée chez des patients ayant subi un choc septique. Cette augmentation de l'expression de BTLA à la surface des Tregs est corrélée à la sévérité du sepsis (**Liu et al., 2018b**). Ces différentes études s'accordent donc pour décrire BTLA comme un potentiel biomarqueur du choc septique.

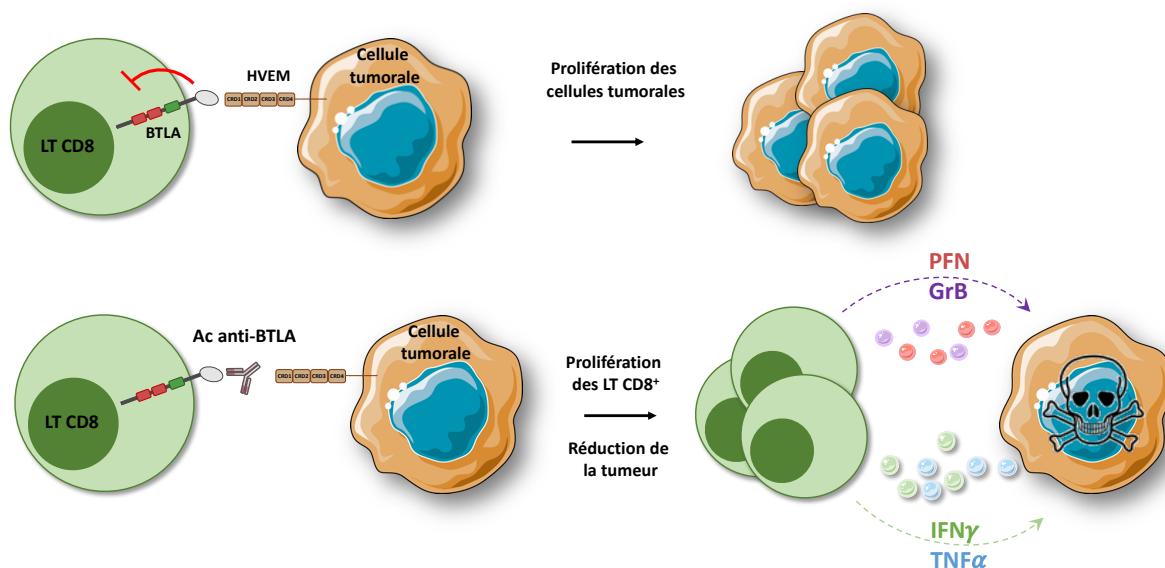
## 5) Cancer

De nombreux polymorphismes du gène de BTLA sont associés à un risque plus élevé de développer certains cancers. Une première étude a mis en évidence des polymorphismes au niveau du gène de BTLA associés à un risque plus élevé de développer un cancer du sein dans une population chinoise (**Fu et al., 2010**). Un polymorphisme (rs1982809) situé dans la région 3'UTR proche du gène de BTLA pourrait être considéré comme étant un facteur de risque de développer un carcinome rénal (**Partyka et al., 2016**). Dans le cas du carcinome épidermoïde de l'œsophage, deux polymorphismes du gène de BTLA (rs3112270 et rs2171513) sont associés à un risque plus élevé de développer ce type de cancer (**Cao et al., 2020**). De plus, un autre polymorphisme du gène de BTLA (rs1982809) est également associé à un risque plus élevé de développer un cancer du poumon dans une population tunisienne (**Khadhraoui et al., 2020**). L'association de la présence de la forme soluble de BTLA avec le risque de développer un cancer fait également l'objet de plusieurs études. En effet, dans le cas du carcinome à cellules claires du rein, une forte concentration de BTLA soluble dans le sérum de patients est associée à un risque de mortalité plus élevé (**Wang et al., 2019**), tout comme dans le cas de l'adénocarcinome du pancréas (**Bian et al., 2019**).

Plusieurs travaux ont étudié le potentiel thérapeutique de BTLA dans le cadre du cancer. Chez la souris, une administration de la forme soluble de BTLA, qui bloque l'interaction entre BTLA et HVEM, engendre une diminution de la production d'IL-10 et de TGF $\beta$ . De plus, les DC de ces souris présentent un phénotype activé par l'augmentation de l'expression de B7-1 et de leur production d'IL-12. En revanche, ce traitement n'a pas permis d'éradiquer la tumeur (**Han et al., 2009**). Chen *et al.*, ont quant à eux montré que l'administration d'un anticorps antagoniste de BTLA combinée à une chimiothérapie dans un modèle murin de

carcinome ovarien a permis de réduire la taille de la tumeur et d'augmenter la survie des animaux (**Chen et al., 2019**).

Chez l'Homme, plusieurs études ont également envisagé BTLA comme cible thérapeutique intéressante dans le cadre du cancer (**Figure 22**). En effet, des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de mélanomes expriment fortement BTLA *ex vivo* et présentent un défaut fonctionnel (**Derré et al., 2010; Fourcade et al., 2012**). De façon intéressante, le blocage de BTLA grâce à un anticorps antagoniste, associé à un blocage de PD-1 et de Tim-3, engendre la prolifération et la production de cytokines par les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de la tumeur *in vitro* (**Fourcade et al., 2012**). Une autre étude a montré qu'après une greffe de cellules souches allogéniques à des patients atteints de cancer, cibler la voie BTLA/HVEM grâce à un anticorps bloquant, permet d'engendrer la prolifération des LT CD8<sup>+</sup> du donneur, la production de cytokines et la libération de granules par des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de la tumeur (**Hobo et al., 2012**). Plus récemment, il a été mis en évidence que les LT CD8<sup>+</sup> exprimant BTLA et infiltrant les tumeurs, présentent une meilleure survie que les LT CD8<sup>+</sup> n'exprimant pas BTLA. En effet, les cellules exprimant BTLA sont protégées de l'apoptose suite à la lyse de cellules tumorales (**Haymaker et al., 2015**), et cette résistance à l'apoptose est due au domaine Grb-2 de BTLA (**Ritthipichai et al., 2017**).



**Figure 22. Le blocage de BTLA induit la prolifération des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques des cellules tumorales.** L'interaction entre HVEM exprimé par les cellules tumorales et BTLA exprimé par les LT CD8<sup>+</sup> induit l'inhibition des LT CD8<sup>+</sup> et promeut la prolifération des cellules tumorales (en haut). Toutefois, l'emploi d'un anticorps antagoniste de BTLA (en bas) entraîne la prolifération des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques des cellules tumorales, la production de perforines (PFN) et granzymes (GrB), ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires.

Par ailleurs, il a également été montré que l'activité anti-tumorale des LT $\gamma\delta$  est modulée par l'expression de récepteurs activateurs ou inhibiteurs. En effet, l'inhibition de l'interaction entre BTLA et HVEM permet une augmentation de la prolifération des LT $\gamma\delta$  en co-culture avec des cellules de lymphomes (**Gertner-Dardenne et al., 2013**). Cette étude suggère donc que les cellules tumorales sont capables d'utiliser cette voie de signalisation pour échapper au système immunitaire. BTLA est également particulièrement exprimé à la surface des T<sub>FH</sub> et des LB de patients atteints d'une leucémie lymphoïde chronique par rapport à d'autres lymphomes B (**M'Hidi et al., 2009**). En revanche, une autre étude a montré très récemment que l'expression de BTLA est diminuée à la surface des LB de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique par rapport à des LB d'individus sains (**Karabon et al., 2020**).

Toutes ces études indiquent que BTLA est une cible thérapeutique intéressante dans la lutte contre le cancer. En effet, en 2019, et pour la toute première fois, un anticorps monoclonal antagoniste anti-BTLA (TAB004) a été approuvé par la FDA dans le cadre d'un essai clinique.

## 6) Auto-immunité

L'observation des souris déficientes pour BTLA, développant des symptômes auto-immuns, a très vite suggéré un rôle de l'axe BTLA/HVEM dans l'auto-immunité. En effet, des souris déficientes pour BTLA développent plus tôt et plus sévèrement l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) par rapport à des souris sauvages (**Watanabe et al., 2003**). De façon similaire, des souris HVEM<sup>-/-</sup> sont plus susceptibles de développer l'EAE et présentent une augmentation de la prolifération des LT ainsi qu'une augmentation de la production de cytokines (**Wang et al., 2005**). Quelques années après les études de Watanabe *et al.*, les travaux de Oya *et al.*, ont montré que des souris déficientes pour BTLA développaient des symptômes auto-immuns. En effet, ces souris développent une hypergammaglobulinémie, produisent divers auto-Ac, et présentent une augmentation de l'activation des LT CD4<sup>+</sup> en périphérie. Ces souris sont également caractérisées par la présence d'infiltrets lymphocytaires dans de multiples organes comme les glandes salivaires, les poumons et le pancréas, ce qui correspond à une complication fréquente de l'hépatite auto-immune (**Oya et al., 2008**). L'implication de BTLA dans le développement du lupus a été étudié dans le modèle murin

spontané de lupus MRL<sup>Ipr/Ipr</sup>. Les auteurs ont observé que des souris MRL<sup>Ipr/Ipr</sup> déficientes pour BTLA développent de sévères infiltrats lymphocytaires dans les glandes salivaires, les poumons, les reins et les articulations par rapport à des souris MRL<sup>Ipr/Ipr</sup> exprimant BTLA. Les souris MRL<sup>Ipr/Ipr</sup> BTLA<sup>-/-</sup> présentent également plus d'auto-Ac et un taux de survie réduit par rapport aux souris MRL<sup>Ipr/Ipr</sup> BTLA<sup>+/+</sup> (**Oya et al., 2011**). Ces résultats indiquent l'importance de BTLA dans le maintien de la tolérance et la prévention des maladies auto-immunes.

En 2009, Truong *et al.*, ont étudié l'implication de BTLA dans le développement du diabète de type 1. Dans cette étude, les auteurs ont évalué l'effet d'un co-traitement avec des anticorps monoclonaux anti-BTLA (déplétant) et anti-PD-1 (bloquant) dans le développement de la maladie dans un modèle de souris diabétiques, les souris NOD. Les auteurs ont pu montrer que l'administration du clone anti-BTLA 6F7 a permis de retarder le développement du diabète provoqué par l'anticorps anti-PD-1, et d'éliminer les cellules auto-réactives exprimant fortement BTLA. Ce traitement a également favorisé une augmentation de la proportion des Tregs chez les souris NOD (**Truong et al., 2009**). Par la suite, une autre étude a mis en place un protocole thérapeutique impliquant BTLA chez des souris NOD. En effet, l'activation, la prolifération, ainsi que la production de cytokine par les LT CD8<sup>+</sup> sont diminuées chez des souris NOD ayant reçu une injection de DC transfectées par un vecteur codant pour BTLA. De plus, ce traitement a permis d'atténuer la sévérité de la maladie chez ces souris, faisant ainsi de BTLA une cible thérapeutique intéressante dans le diabète auto-immun (**Li et al., 2011**).

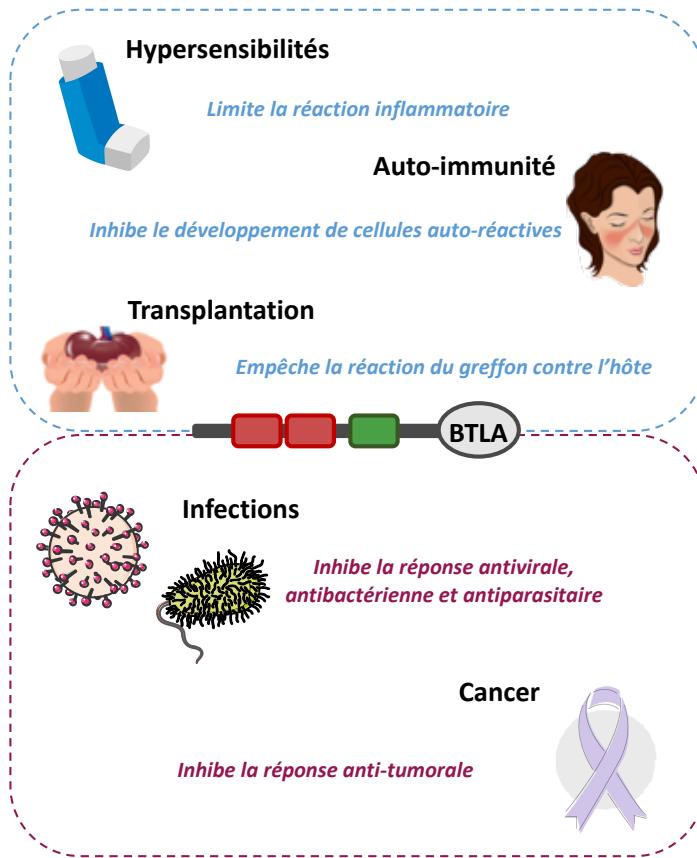
Chez l'Homme, deux études ont évalué l'impact de modifications génétiques de BTLA dans le développement de maladies auto-immunes. Une première étude a montré qu'une mutation ponctuelle (C800T) dans l'exon 5 du gène codant pour BTLA est associée à une augmentation du risque de développer une polyarthrite rhumatoïde dans une population taiwanaise (**Lin et al., 2006**). Une deuxième étude a montré dans une population chinoise que la mutation ponctuelle 590C était également associée à une augmentation du risque de développer une polyarthrite rhumatoïde mais pas un lupus ou un syndrome de Sjögren (**Oki et al., 2011**).

Au niveau cellulaire, les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> de patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde expriment plus fortement BTLA que ceux d'individus sains (**Yang et al., 2016**).

L'expression de BTLA dans le cadre de la sclérose en plaque a fait l'objet de deux études montrant une diminution de la fréquence des LB totaux et des LB régulateurs (Bregs) exprimant BTLA (**Piancone et al., 2016**), et une augmentation de l'expression de BTLA à la surface des Tregs (**Tapia-Maltos et al., 2021**) de patients par rapport aux individus sains.

Dans le cas du lupus chez l'Homme, les travaux de Oster *et al.*, ont étudié l'expression de BTLA à la surface des LT CD4<sup>+</sup> de patients lupiques. Cette équipe a pu mettre en évidence que le pourcentage de LT CD4<sup>+</sup> exprimant BTLA est diminué chez les patients lupiques présentant un lupus actif. En revanche, la fréquence de Tregs BTLA<sup>+</sup> est similaire chez les patients lupiques et les individus sains (**Oster et al., 2019**). Au sein de notre laboratoire, bien que les niveaux d'expression de BTLA à la surface des LT CD4<sup>+</sup> soient similaires entre individus sains et patients lupiques *ex vivo*, il a été mis en évidence un défaut de fonctionnalité de la voie de signalisation de BTLA dans les LT CD4<sup>+</sup> de patients lupiques. Cette altération est due à un mauvais recrutement de BTLA au niveau des clusters de TCR après activation des LT CD4<sup>+</sup>. Par ailleurs, ce défaut de fonctionnalité de BTLA a pu être restauré *ex vivo* en incubant des LT CD4<sup>+</sup> de patients lupiques en présence d'un inhibiteur de l'expression des sphingolipides (NB-DNJ) qui corrige le métabolisme lipidique et restaure le trafic intracellulaire (**Sawaf et al., 2018**). Une autre étude a confirmé qu'il n'y a pas de différence d'expression de BTLA à la surface des sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> de patients lupiques et d'individus sains (**Murphy et al., 2019**). En revanche, très récemment, Wiedemann *et al.*, ont décrit une diminution de l'expression de BTLA à la surface des LB naïfs (IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>) et mémoires double négatifs (IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>) de patients lupiques par rapport aux individus sains. De plus, ces auteurs ont montré un défaut de fonctionnalité de la voie de signalisation de BTLA au niveau des LB de patients lupiques (**Wiedemann et al., 2021**).

En conclusion, BTLA est un acteur central de la réponse immunitaire (**Figure 23**). En effet, de par son implication dans la tolérance centrale, dans le contrôle de la réponse immunitaire mais également dans l'échappement des tumeurs à l'immunosurveillance tumorale, BTLA est une cible thérapeutique intéressante dans diverses pathologies.



**Figure 23. Implication de BTLA dans diverses pathologies.** La fonction inhibitrice de BTLA joue un rôle bénéfique dans différentes pathologies. En effet, elle permet de freiner la réaction inflammatoire en cas d'hypersensibilités, d'empêcher la réaction du greffon contre l'hôte, participe à la tolérance et empêche le développement de cellules auto-réactives. En revanche, son rôle peut être néfaste dans d'autres situations. En effet, l'engagement de BTLA participe à l'inhibition de la réponse anti-tumorale et des réponses antivirales, antibactériennes, et antiparasitaires.

## **D) Contexte et objectifs de l'étude**

Comme décrit au cours de l'introduction, le lupus est une maladie auto-immune caractérisée par une activation anormale du système immunitaire menant à la production d'auto-Ac pathogènes et à une inflammation de nombreux organes tels que la peau ou les reins. La différenciation des LB auto-réactifs en PL est médiée par les LT CD4<sup>+</sup>, et particulièrement les T<sub>FH</sub>, soulignant l'importance de la communication entre LB et LT. Dans le contexte lupique, les LB auto-réactifs jouent un rôle central de par leur capacité à se différencier en PL qui produisent des auto-Ac capables de se déposer dans les organes cibles sous la forme de complexes immuns, déclenchant ainsi une atteinte systémique.

Le dialogue entre les LT et les LB peut être régulé par différents mécanismes. En effet, les Tregs sont des cellules régulatrices qui inhibent l'activation, la prolifération et la différenciation de différents types cellulaires tels que les LT CD4<sup>+</sup> effecteurs ou les LB. Chez l'Homme, les études portant sur le nombre ou la fonctionnalité des Tregs chez les patients lupiques sont conflictuelles mais plusieurs études rapportent une altération des fonctions suppressives des Tregs chez les patients.

Un autre mécanisme de régulation de la réponse immunitaire fait intervenir la balance entre les molécules co-stimulatrices et co-inhibitrices exprimées à la surface des cellules immunitaires. En effet, une dérégulation de l'expression et/ou de la fonction de ces molécules peut contribuer au développement de certaines pathologies, dont des pathologies auto-immunes telles que le LES. Envisager le ciblage de ces molécules comme stratégies thérapeutiques fait donc l'objet de plusieurs études dans le lupus. BTLA est un récepteur co-inhibiteur exprimé à la surface de nombreuses cellules myéloïdes et lymphoïdes dont le rôle dans l'homéostasie et la régulation de la réponse immunitaire est aujourd'hui mieux connu.

Chez la souris, il a été montré que BTLA est impliqué dans le maintien de la tolérance et la prévention de maladies auto-immunes, puisque des souris lupiques déficientes pour BTLA voient leurs symptômes lupiques s'aggraver (**Oya et al., 2011**). Chez l'Homme, les données concernant l'implication de BTLA dans la pathogénèse lupique sont assez restreintes. En effet, seulement deux équipes ont étudié l'expression de BTLA par les LT de patients lupiques (**Murphy et al., 2019; Oster et al., 2019**), et une étude a récemment analysé l'expression et la fonctionnalité de BTLA dans les LB de patients lupiques (**Wiedemann et al.,**

**2021).** Au sein de notre laboratoire, nous avons mis en évidence un défaut de fonctionnalité de la voie de signalisation de BTLA dans les LT CD4<sup>+</sup> de patients lupiques (**Sawaf et al., 2018**).

L'étude de l'expression et de la fonction de BTLA sur d'autres populations cellulaires jouant un rôle clé dans la pathologie lupique, à la fois chez l'Homme et chez la souris, a fait l'objet de mon sujet de thèse. Les objectifs de mon travail de thèse étaient donc de répondre aux questions suivantes :

- 1. Dans un contexte lupique, les LB, les T<sub>FH</sub> et les Tregs présentent-ils une expression altérée de BTLA ? (Chapitre 1)**
- 2. BTLA peut-il être envisagé comme nouvelle stratégie thérapeutique intéressante dans le lupus ? Recherche exploratoire dans le modèle murin de lupus NZB/W (Chapitre 2)**

# **RESULTATS**



# **CHAPITRE 1 : Expression de BTLA par des populations lymphocytaires impliquées dans la pathogenèse du LES**



## I) Avant-propos

En raison du rôle pathogène majeur joué par les auto-Ac, le lupus fut longtemps considéré comme une maladie B. Il est aujourd’hui évident que d’autres populations cellulaires, en particulier les LT CD4<sup>+</sup>, participent activement à la pathogénèse lupique. En effet, l’activation optimale des LB et leur différenciation en cellules productrices d’anticorps (PL et PB) implique les T<sub>FH</sub> *via* l’engagement de molécules de co-stimulation (CD40L ou ICOS exprimés par les T<sub>FH</sub>, et CD40 et ICOSL exprimés par les LB), et *via* la production de cytokines (IL-21 et IL-4 notamment). Chez les patients lupiques, la fréquence en T<sub>FH</sub> circulants est augmentée et corrèle avec l’activité de la maladie (**Choi et al., 2015; Simpson et al., 2010**). Par ailleurs, la distribution des sous-populations de T<sub>FH</sub> est dérégulée chez les patients. En effet, il a été précédemment montré au laboratoire, une augmentation de la fréquence des T<sub>FH2</sub> (CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>), et une diminution de la fréquence des T<sub>FH1</sub> (CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>) qui ne sont pas capables d’apporter de l’aide aux LB contrairement aux T<sub>FH2</sub>, chez les patients présentant un lupus actif. La distribution des LB est également altérée dans le LES, et se traduit notamment par une augmentation de la fréquence des LB DN (CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>) (**Le Coz et al., 2013**). Ces dernières années, une attention particulière a été portée sur cette population de LB dans le LES. En 2018, une population de LB DN exprimant les marqueurs CD11c et T-bet, et capable de se différencier en PL sécrétateurs d’auto-Ac, a été décrite chez les patients lupiques (**Wang et al., 2018**). Cette même année, une deuxième équipe a mis en évidence deux sous-populations de LB DN dans le LES : LB DN1 (CXCR5<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>T-bet<sup>-</sup>) et LB DN2 (CXCR5<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup>). La fréquence des LB DN2 est drastiquement augmentée chez les patients lupiques, ces cellules sont hyper-réactives à une stimulation du TLR7 et sont capables de produire des auto-Ac (**Jenks et al., 2018**). L’ensemble des données de la littérature indiquent que ces deux populations lymphocytaires (T<sub>FH</sub> et LB DN) suspectées de jouer un rôle pathogène dans le LES présentent une distribution altérée.

Les Tregs quant à elles, sont indispensables pour contrôler l’hyperactivation de la réponse immunitaire observée au cours du LES. Toutefois, plusieurs défauts concernant le nombre et/ou la fonctionnalité des Tregs ont été rapportés dans le cadre du LES. Outre les Tregs, la réponse immunitaire peut être contrôlée par des molécules inhibitrices. BTLA est un récepteur inhibiteur impliqué dans le maintien de la tolérance périphérique et dans la prévention du développement de pathologies auto-immunes telles que le LES (**cf Introduction**

**partie C).** Chez l'Homme, le rôle de BTLA dans la pathologie lupique n'est pas encore clairement établi. Toutefois, notre équipe a récemment mis en évidence un défaut de fonctionnalité de ce récepteur dans les LT CD4<sup>+</sup> de patients lupiques (Sawaf et al., 2018). Rien n'était connu quant à l'expression de BTLA sur d'autres populations jouant un rôle clé dans la pathologie lupiques, tels que les T<sub>FH</sub>, les Tregs ou les LB lorsque nous avons initié ce travail. **Au cours de ma thèse, j'ai donc mené une étude compréhensive de l'expression de BTLA par les T<sub>FH</sub> et les Tregs (Publication n°1) et ai entrepris l'analyse phénotypique et fonctionnelle de BTLA dans les LB.** Mes résultats ayant mis en lumière des défauts d'expression de BTLA sur certaines sous-populations lymphocytaires, j'ai par ailleurs amorcé une étude concernant la régulation de l'expression de BTLA.

**II) Expression de BTLA par les T<sub>FH</sub> et les Tregs de patients lupiques : PUBLICATION  
N°1**

**High BTLA expression likely contributes to contraction of the regulatory T cell subset in lupus disease**

**Lucie Aubergeon<sup>1</sup>, Matthieu Sawaf<sup>1</sup>, Renaud Felten<sup>1,2</sup>, Jacques-Eric Gottenberg<sup>1,2</sup>, Hélène Dumortier<sup>1</sup>, Fanny Monneaux<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>CNRS UPR3572, Immunology, Immunopathology and Therapeutic Chemistry, Institute of Molecular and Cellular Biology, Strasbourg, France

<sup>2</sup>Rheumatology Department, National Reference Center for Autoimmune Diseases, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

(2021), Frontiers in Immunology, doi: 10.3389/fimmu.2021.767099





# High BTLA Expression Likely Contributes to Contraction of the Regulatory T Cell Subset in Lupus Disease

Lucie Aubergeon<sup>1</sup>, Matthieu Sawaf<sup>1</sup>, Renaud Felten<sup>1,2</sup>, Jacques-Eric Gottenberg<sup>1,2</sup>, Hélène Dumortier<sup>1</sup> and Fanny Monneaux<sup>1\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Sophie Hillion,  
U1227 Lymphocytes B et  
Autoimmunité (LBAI) (INSERM),  
France

### Reviewed by:

Sun Jung Kim,  
Northwell Health, United States  
Ei Wakamatsu,  
Tokyo Medical University, Japan

### \*Correspondence:

Fanny Monneaux  
f.monneaux@ibmc-cnrs.unistra.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Autoimmune and  
Autoinflammatory Disorders,  
a section of the journal  
*Frontiers in Immunology*

Received: 30 August 2021

Accepted: 08 November 2021

Published: 25 November 2021

### Citation:

Aubergeon L, Sawaf M, Felten R, Gottenberg JE, Dumortier H and Monneaux F (2021) High BTLA Expression Likely Contributes to Contraction of the Regulatory T Cell Subset in Lupus Disease. *Front. Immunol.* 12:767099.  
doi: 10.3389/fimmu.2021.767099

B and T lymphocyte attenuator (BTLA) is a co-inhibitory receptor that is expressed by lymphoid cells and regulates the immune response. Consistent with an inhibitory role for BTLA, the disease is exacerbated in BTLA-deficient lupus mice. We recently demonstrated that the BTLA pathway is altered in CD4<sup>+</sup> T cells from lupus patients. In the present work, we aimed at delineating the expression pattern of BTLA on CD4<sup>+</sup> T cell subsets suspected to play a key role in lupus pathogenesis, such as circulating follicular helper T cells (cT<sub>FH</sub>) and regulatory T cells (Tregs). We did not detect significant ex vivo variations of BTLA expression on total CD4<sup>+</sup> T cells (naive and memory), cT<sub>FH</sub> or T<sub>FH</sub> subsets between lupus patients and healthy controls. However, we interestingly observed that BTLA expression is significantly increased on activated Tregs, but not resting Tregs, from lupus patients, especially those displaying an active disease. Moreover, it correlates with the diminution of the Tregs frequency observed in these patients. We also showed that both BTLA mRNA and protein expression remain low after TCR stimulation of activated Tregs sorted from healthy donors and evidenced a similar dynamic of BTLA and HVEM expression profile by human Tregs and effector CD4<sup>+</sup> T cells upon T cell activation than the one previously described in mice. Finally, we observed that the HVEM/BTLA ratio is significantly lower in Tregs from lupus patients compared to healthy controls, whereas ex vivo effector CD4<sup>+</sup> T cells express higher BTLA levels. Our data suggest that an altered expression of BTLA and HVEM could be involved in an impaired regulation of autoreactive T cells in lupus. These results provide a better understanding of the BTLA involvement in lupus pathogenesis and confirm that BTLA should be considered as an interesting target for the development of new therapeutic strategies.

**Keywords:** systemic lupus erythematosus, BTLA, HVEM, regulatory T cells, inhibitory receptors

## INTRODUCTION

As cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) and programmed cell death 1 (PD1), B and T lymphocyte attenuator (BTLA) is a co-inhibitory receptor through which immune responses can be negatively regulated (1). BTLA, a member of the immunoglobulin superfamily, has been detected on various immune cells including B and T lymphocytes, macrophages, dendritic cells and natural killer cells (2) and interacts with herpesvirus-entry mediator (HVEM) which is also widely expressed on hematopoietic cells (3). Following HVEM ligation to BTLA, immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs (ITIM) located in BTLA cytoplasmic tail become phosphorylated, triggering the recruitment of SHP1 (and to a lower extend SHP2) (4, 5) and the dephosphorylation of both the TCR and CD28. Consequently, BTLA engagement through HVEM leads to diminished cell activation, cytokine production and proliferation of BTLA-expressing cells, particularly T cells (6).

In the absence of BTLA, mice display autoimmune features such as auto-antibody (autoAb) production and increased lymphocyte proliferation (1). BTLA deficient mice are more susceptible than wild type counterparts to the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (1) and autoimmune like-hepatitis (7) and exhibit enhanced hapten-induced contact hypersensitivity (8). Moreover, BTLA deficiency makes mice resistant to peripheral T cell tolerance induction (9), whereas the administration of an agonistic anti-BTLA antibody prevents the development of graft *versus* host disease [GVHD; (10)] and prolongs cardiac allograft survival (11). Altogether, these studies highlight the key role of BTLA in the maintenance of peripheral tolerance in mouse models. However, BTLA expression and function in T cells in human diseases as well as its contribution in peripheral tolerance remains poorly documented.

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a severe systemic autoimmune disease characterized by a loss of self-tolerance. The etiology of SLE is not fully defined, but genetic, hormonal and environmental factors, as well as various immunological abnormalities, are implicated. Dysregulation of various components of the immune system can be observed at different stages of SLE development, but hyperactivity of B cells, leading to excessive production of multiple autoAb and their deposit into targeted organs such as skin and kidney, plays a crucial role in the severity of lupus disease (12). In that context, we previously demonstrated that some pathogenic antinuclear autoAb are produced by plasma cells, which are localized into inflamed kidneys of lupus mice (13, 14). B cells, as plasma cell precursors and autoAb producers, are thus considered as a major pathogenic cell subset in SLE. However, the T-B crosstalk, leading to B cell differentiation into plasma cells, represents a central element in lupus pathogenesis, and as such, CD4<sup>+</sup> T cells are key contributors of the altered immune response as well. Among the large variety of CD4<sup>+</sup> T cell subsets described in the literature, follicular helper T cells (T<sub>FH</sub>) and regulatory T cells (Tregs) caught a lot of attention from researchers working on lupus. Indeed, T<sub>FH</sub> orchestrate the molecular interactions that

provide help to B cells in secondary lymphoid organs (SLO) and are defined as facilitators of Ab production. In contrast, Tregs negatively regulate the immune response. In accordance with their respective functions, several groups have evidenced altered proportion and/or function of these two CD4<sup>+</sup> T cell subsets in SLE, T<sub>FH</sub> (or T<sub>FH</sub> subsets) being enhanced (15, 16) whereas Tregs display reduced frequency (17).

To date, most research has focused on BTLA expression on the surface of total CD4<sup>+</sup> T cells, and data regarding BTLA expression in these two major T cell populations in humans are missing. In mice, BTLA is highly expressed by T<sub>FH</sub> localized in the germinal centers (GC) (18). The number of GC B cells is increased in BTLA deficient mice and adoptive transfer of T<sub>FH</sub> deficient for BTLA to wild type mice induces more antigen-specific IgG2a and IgG2b production (19), indicating that BTLA expressed by T<sub>FH</sub> may control GC B cell development. Concerning Tregs, Tao and colleagues showed that BTLA is up-regulated on TCR-stimulated effector T cells (Teffs) but expressed at very low levels by Tregs, whereas HVEM is mainly expressed by Tregs upon T cell activation (20). Co-culture of Tregs and Teffs isolated from BTLA and HVEM deficient mice revealed that Tregs exert suppression *via* up-regulation of HVEM, which binds to BTLA expressed by Teffs (20). The authors proposed that low BTLA expression on Tregs, favors effector T cell suppression while preventing HVEM-BTLA interactions between Tregs. Interestingly, in the MRL/lpr lupus mouse-model, characterized by T<sub>FH</sub> hyperactivity and Tregs dysfunction, BTLA deficiency leads to exacerbation of lupus symptoms and reduced survival, suggesting that the BTLA pathway plays important roles in controlling the disease development (21).

We recently demonstrated that, in SLE, BTLA signaling is unable to properly inhibit CD4<sup>+</sup> T cell activation, due to an impaired recruitment of this co-receptor to the immunological synapse following T cell stimulation (22). In this study, we did not detect significant *ex vivo* variations of BTLA expression on total CD4<sup>+</sup> T cells between lupus patients and healthy controls (HC); however, very interestingly, we observed that the enhancement of BTLA expression following *in vitro* T cell activation is significantly lower in SLE patients compared to HC.

Considering the critical role of T<sub>FH</sub> in plasma cell generation on the one hand, and of Tregs in maintaining peripheral tolerance on the other hand, we aimed in the present work at delineating the expression pattern of the co-inhibitory receptor BTLA on these two CD4<sup>+</sup> T cell subsets in steady state and lupus settings.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients and Controls

A total of 47 SLE patients (40 women and 7 men, aged from 18 to 82 years) attending at University Hospital (Strasbourg, France) and 34 age and sex-matched healthy controls (HC) were enrolled in this study. All patients met the American College of Rheumatology criteria for classification of SLE (23) and disease activity was assessed by SLEDAI. Routine measures were used to determine

anti-nuclear Abs (ANAs, by indirect immunofluorescence with Hep-2 cells) and anti-dsDNA (screened by ELISA; Kallestad anti-DNA microplate EIA, Bio-rad Lab. Inc., CA, USA). To avoid the effect of immunosuppressive agents on BTLA expression, all patients who received prolonged and heavy suppressive agents (cyclophosphamide, mycophenolate mofetil, azathioprine) or biologics (belimumab or rituximab in the previous 12 months) were excluded from our study. Patients included in the study were untreated or treated with methotrexate, hydroxychloroquine, and/or dose of steroids  $\leq 15$  mg prednisone equivalent a day. Characteristics of SLE patients are listed in **Table 1**.

### Ethics Statement

All samples were obtained from volunteers attending the Rheumatology Clinic of Strasbourg University Hospitals and were collected during routine clinical (diagnostic/prognostic/therapeutic) procedures prescribed. The ethical approval is not required for these types of studies under French legislation if no additional procedures are performed, as it is the case in our study. All patients provided written informed consent prior to

**TABLE 1 |** Clinical and biological characteristics of SLE patients.

	SLE patients (n = 47)
<b>Sex (F/M)</b>	40/7
<b>Age (years), median (range)</b>	46 (18–82)
<b>SLEDAI, median (range)</b>	4 (0–21)
<i>n (%)</i>	
In remission (SLEDAI = 0)	15 (32)
Low activity (SLEDAI 1–5)	16 (34)
Mild activity (SLEDAI 6–10)	10 (21)
High activity (SLEDAI 11–19)	3 (6)
Very high activity (SLEDAI $\geq 20$ )	3 (6)
<b>Clinical manifestations*</b>	
Rash	8
Arthritis	15
Pleurisy/Pericarditis	5
Nephritis	7
<b>Biological features</b>	
Anti-dsDNA**	22
Low complements	19
Proteinuria	10
<b>Hematological features</b>	
Anemia	11
Lymphopenia	10
Leucopenia	5
Thrombocytopenia	3
Hematuria	5
<b>Treatment, median (range)</b>	
None	6
CS <10mg/day	16
Median (range)	5 (2.5–7)
CS $\geq 10$ mg/day	8
Median (range)	10 (10–15)
HCQ (mg/day)	26
Median (range)	400 (200–600)
MTX (mg/week)	9
Median (range)	20 (10–25)

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

\*at the time of blood drawn \*\*considered positive when the titer was  $50\text{ IU/ml}$  as measured by ELISA.

their participation in the study in accordance with the Declaration of Helsinki.

### PBMC, CD4<sup>+</sup> T Cell and Treg Isolation, and Cell Culture

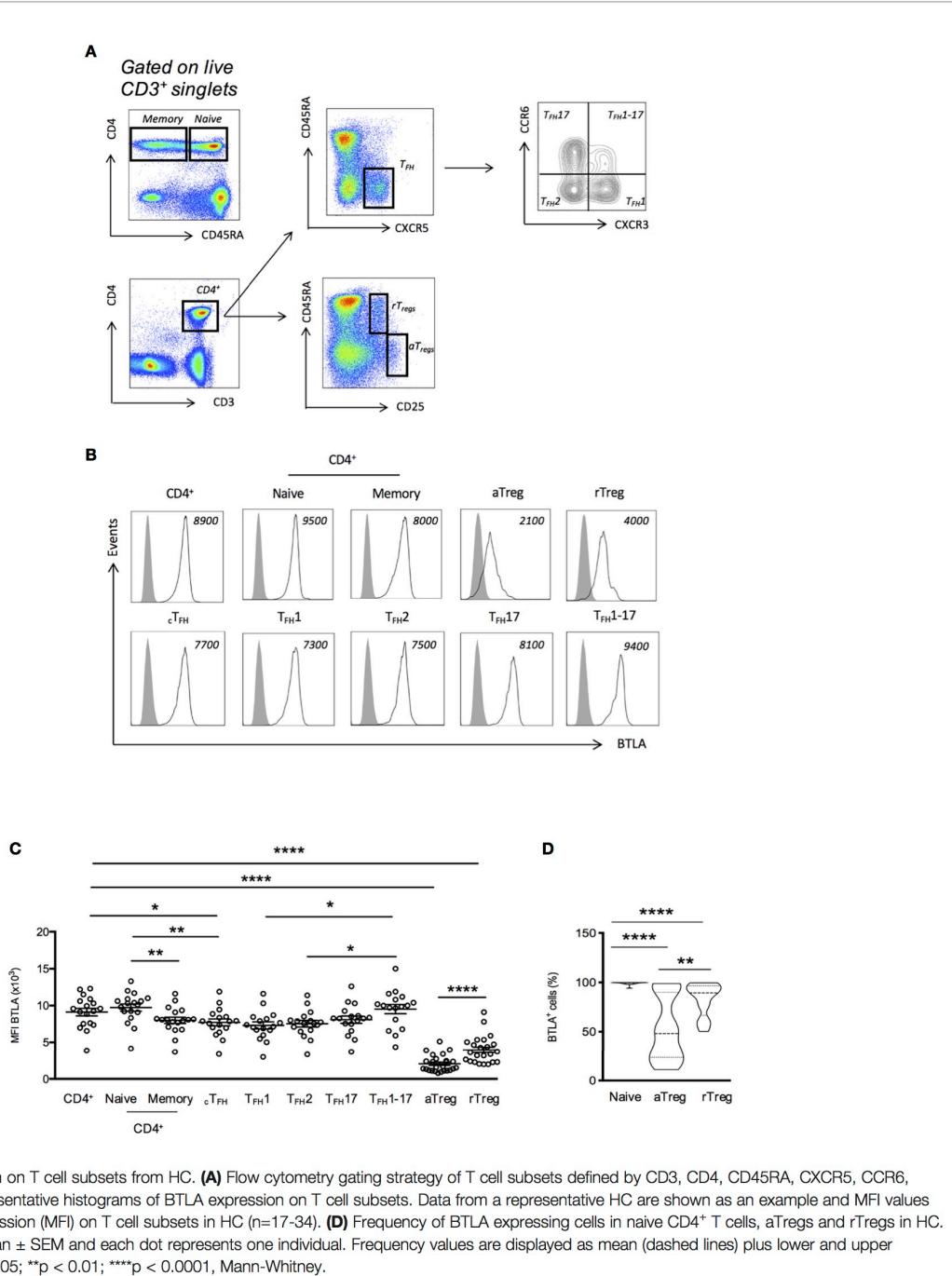
Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from lupus patients and from volunteers and anonymous donors of *Etablissement Français du Sang* were isolated from heparinized venous blood by Ficoll density gradient centrifugation (GE Healthcare). CD4<sup>+</sup> T cells from healthy donors were negatively selected using the MojoSort Human CD4 T Cell Isolation Kit (Biolegend) according to the manufacturer's instructions. The purity of the CD4<sup>+</sup> population was typically  $\geq 90\%$ . Isolated CD4<sup>+</sup> T cells were incubated with the following conjugated mAbs: anti-CD4-allophycocyanin (APC) Violet-770 (clone REA 623, Miltenyi); anti-CD45RA-phycoerythrin (PE) Violet-615 (clone 562, Miltenyi); anti-CD25-APC (clone REA 570, Miltenyi), and naive CD4<sup>+</sup> T cells and Treg subpopulations (aTregs and rTregs) were isolated by a FACSaria<sup>TM</sup> Fusion cell sorter (BD). Purified naive CD4<sup>+</sup> T cells, aTregs and rTregs were cultured in complete medium (RPMI 1640 containing 10% FCS, 10  $\mu\text{g/ml}$  gentamicin, and 10 mM HEPES) and plated at  $5 \times 10^5$  cells per ml at 37°C. Cells were stimulated with 5  $\mu\text{g/ml}$  plate-bound anti-CD3 (clone OKT3, eBioscience) and with 5  $\mu\text{g/ml}$  soluble anti-CD28 (clone CD28.2, BD Pharmingen). Samples were cultured for 4 hours or 48 hours, harvested, and used for RNA isolation or flow cytometric analysis respectively.

### Flow Cytometry Analysis

PBMCs, naive CD4<sup>+</sup> T cells or Treg subpopulations were stained for 20 min at 4°C in staining buffer (2% FCS in PBS) with the following conjugated mAbs: anti-BTLA-PE (clone MIH26, Biolegend); anti-CD45RA-PE Violet-615 (clone 562, Miltenyi); anti-CXCR5-fluorescein (FITC) (clone REA103, Miltenyi); anti-HVEM-PE Cyanine-7 (PE-Cy7) (clone 122, Biolegend); anti-CD25-APC (clone REA 570, Miltenyi); anti-CD3-Alexa Fluor 700 (clone UCHT-1, BD Pharmingen); anti-CD4-APC Violet-770 (clone REA 623, Miltenyi); anti-CCR6-PE-Cy7 (clone 11A9, BD); anti-CXCR3-APC (clone REA232, Miltenyi). Dead cells were excluded using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and single cells were discriminated from aggregates or doublets using SS-W versus SS-H and FS-W versus FS-H plots. Cell acquisition was performed using 10-color Flow Cytometer Gallios-Navios (Beckman Coulter). At least  $1 \times 10^6$  cells were analyzed using FlowJo 7.6.5 software (TreeStar) with the strategy depicted in **Figure 1** by using Fluorescence Minus One (FMO) controls to define gates.

### RNA Isolation, cDNA Synthesis, and Quantitative Real-Time PCR

To measure BTLA and HVEM mRNA expression, RNA was extracted from CD4<sup>+</sup> T cells, aTreg or rTreg using an RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesized using the Maxima First Strand cDNA Synthesis kit for RT-qPCR (Thermo Scientific). The relative amount of each transcript was normalized against the mean expression of two



housekeeping genes, namely glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and beta-actin (ACTB). The qPCR primers and probes were purchased from ThermoFisher as predesigned TaqMan gene expression assays for the targeted genes as follows: ACTB (Hs99999903\_m1); GAPDH (Hs99999905\_m1); BTLA (Hs00699198\_m1) and HVEM (Hs00187058\_m1). All amplification reactions were

performed in a total volume of 10  $\mu$ l using a StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems) with TaqMan<sup>TM</sup> Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems). The thermocycling conditions were: initial 10 min incubation at 95°C followed by 40 cycles of denaturation for 15 s at 95°C and annealing/extension for 1 min at 60°C. Data were collected with StepOne v2.1 software and the  $\Delta\Delta CT$  method was used to

calculate fold changes. Values of  $\Delta Ct$  and  $\Delta\Delta Ct$  are depicted in **Supplementary Table S1**.

## Statistics

Data were analyzed using GraphPad Prism version 6 or version 8 (GraphPad Software Inc). Differences between SLE patients and healthy individuals were determined with a Mann-Whitney test. Relationships between two variables were evaluated using Spearman's correlation coefficient. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, and differences were considered to be statistically significant at  $p<0.05$  or less.

## RESULTS

### Ex Vivo Expression of BTLA by CD4<sup>+</sup> T Cell Subsets

In mice, BTLA is highly expressed by  $T_{FH}$  from SLO and is considered as a  $T_{FH}$  marker (18), whereas spleen Tregs express very low levels of BTLA (20). To date, the description of BTLA expression by human cells is mainly restricted to total CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and there are only few available data regarding circulating  $T_{FH}$  ( $cT_{FH}$ ) and Tregs. Therefore, we examined the expression of BTLA *ex vivo* in PBMCs isolated from HC by using a multicolor staining allowing to identify  $cT_{FH}$  (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CXCR5<sup>+</sup>) and  $T_{FH}$  subsets ( $T_{FH1}$ ; CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>,  $T_{FH2}$ ; CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup>,  $T_{FH17}$ ; CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>, and  $T_{FH1-17}$ ; CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>), as well as the two main Tregs subsets, as defined by Miyara and colleagues (24) i.e. activated Tregs (aTregs; CD45RA<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>) and resting Tregs (rTregs; CD45RA<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) (**Figure 1A**). In HC, BTLA is more highly expressed on naive CD4<sup>+</sup> T cells than on memory CD4<sup>+</sup> T cells (MFI 9738  $\pm$  490 vs 8003  $\pm$  431,  $p<0.01$ ; **Figures 1B, C**). In  $cT_{FH}$  cells, the expression of BTLA was found to be diminished compared to naive CD4<sup>+</sup> T cells (MFI 7722  $\pm$  471 vs 9738  $\pm$  490,  $p<0.01$ ; **Figures 1B, C**). Moreover, among the four  $cT_{FH}$  subsets ( $T_{FH1}$ ,  $T_{FH2}$ ,  $T_{FH17}$  and  $T_{FH1-17}$ ), the  $T_{FH1-17}$  subset is the one that expresses the highest BTLA level (MFI 9533  $\pm$  619 for  $T_{FH1-17}$  and 7722  $\pm$  471 for  $T_{FH1}$ ,  $p<0.05$ ). Concerning Tregs, our results revealed that, as in mice, BTLA expression is low on both Treg subsets from HC, the lowest BTLA expression being observed on the aTreg subset (MFI 2064  $\pm$  228 for total aTregs and 3971  $\pm$  366 for total rTregs,  $p<0.0001$  compared to total CD4<sup>+</sup> T cells; **Figures 1B, C**). The weak BTLA expression by Tregs is accompanied with a decreased frequency of BTLA<sup>+</sup> expressing cells. Indeed, whereas BTLA is expressed on the majority of circulating CD4<sup>+</sup> T cells [**Figure 1D**; median of 99% (range 89–100)], only about 50% of aTregs were found to express BTLA [48% (11–98)].

### Increased Expression of BTLA on Lupus aTregs

We next evaluated BTLA expression by CD4<sup>+</sup> T cells isolated from 25-47 SLE patients (**Table 1**) compared to 17-34 age- and sex-matched healthy individuals. We found that BTLA expression on  $cT_{FH}$ ,  $T_{FH}$  subsets and naive and memory CD4<sup>+</sup> T cells did not substantially differ between SLE patients and HC (**Figures 2A, B**).

However, even if aTregs from lupus patients still express lower levels of BTLA than other lupus CD4<sup>+</sup> T cells (MFI 3188  $\pm$  357 vs 9358  $\pm$  559 in total CD4<sup>+</sup> T cells,  $p<0.0001$ ), we noticed a significant increase of BTLA expression on lupus aTregs compared to HC aTregs (MFI 2064  $\pm$  228 vs 3188  $\pm$  357,  $p<0.05$ ; **Figures 2C, D**) as well as an enhancement of the frequency of BTLA-expressing aTregs in lupus patients [median of 79% (range 15–100), **Figure 2E**]. This was not observed for rTregs, indicating that there is no systemic defect in the regulation of BTLA expression but rather a specific alteration in aTregs.

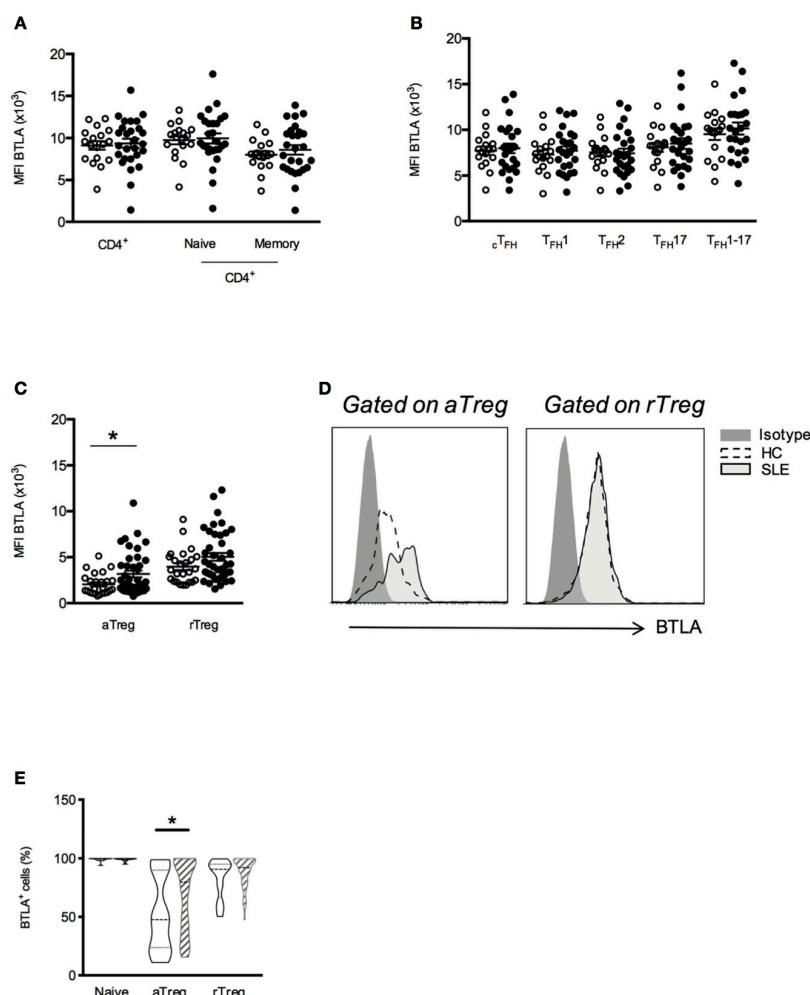
### Association of Enhanced BTLA Expression on aTregs and Clinical Parameters

To investigate the clinical significance of higher BTLA expression on lupus Tregs, we then analyzed BTLA levels (MFI) in relation to disease activity assessed by the SLEDAI score. When patients were classified according to their disease activity status [inactive SLE to low SLE activity (SLEDAI<6) *versus* mild to severe SLE (SLEDAI $\geq$ 6)], we found that BTLA expression was statistically higher on aTregs from patients with mild/severe SLE (**Figure 3A**;  $p<0.01$ ). Moreover, the enhancement of BTLA expression on aTregs is significantly associated to the presence of circulating anti-dsDNA autoAbs, which are characteristic for lupus (MFI 3499  $\pm$  620 in the group of patients with anti-dsDNA autoAbs vs MFI 2064  $\pm$  228 in HC,  $p<0.05$ ; **Figure 3B**). Interestingly, we did not observe any association between disease activity or the presence of anti-dsDNA and the level of BTLA expression in rTregs, which did not display increased BTLA expression in lupus patients compared to HC (**Figures 3A, B**). Finally, BTLA expression is not significantly higher on aTregs from patients harboring proteinuria compared to lupus patients with no proteinuria; however, the number of proteinuria positive patients in our cohort is low ( $n=8$ , **Figure 3C**). Importantly, higher BTLA expression on lupus aTreg was not related to the age or to the treatments received by lupus patients (**Supplementary Figures S1A, B**).

As previously described by Miyara and colleagues (24), the aTreg percentage was significantly diminished in lupus patients particularly those displaying an active disease (SLEDAI $\geq$ 6; 0.28%  $\pm$  0.04 vs 0.67%  $\pm$  0.08 in HC,  $p<0.001$ , **Figure 3D**). Very interestingly, we observed that the expression level of BTLA on aTregs inversely correlated with their frequency in PBMCs from lupus patients (**Figure 3E**,  $p<0.01$ ). No significant correlation was found between BTLA expression and rTreg percentages (**Supplementary Figure S2A**), the frequency of the latter being not altered in our lupus cohort (**Supplementary Figure S2B**). Our results suggest that the higher BTLA expression on the surface of lupus aTregs may account for the reduced frequency of this Treg subset in lupus patients.

### Dynamics of BTLA and HVEM Expression on Treg Subsets Following Activation

In mice, it was shown that Tregs can exert suppression *via* up-regulation of HVEM on their surface upon activation and subsequent binding to BTLA, which is highly expressed by activated Teffs (20). In this work, the authors suggested that low BTLA expression on Tregs favors Teff suppression by



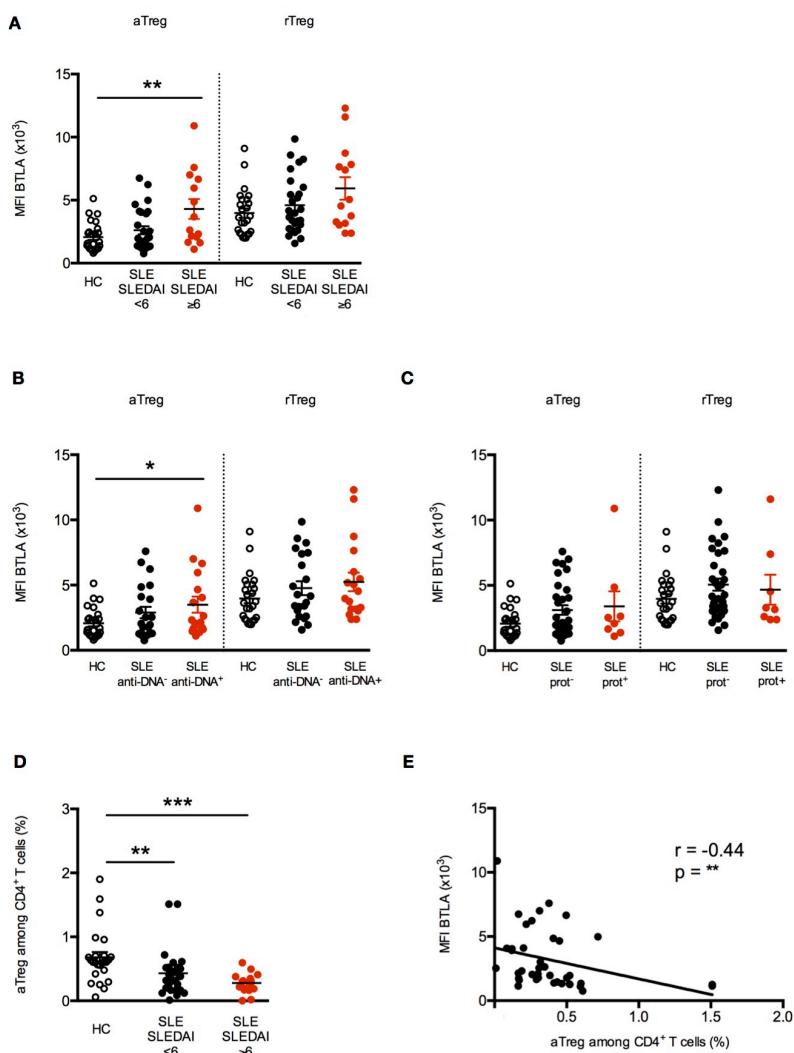
**FIGURE 2 |** BTLA expression is enhanced on aTregs from SLE patients compared to HC. Comparison of BTLA expression (MFI) on CD4<sup>+</sup> T cell (A), cT<sub>FH</sub> (B) and Treg subsets (C) in HC (white dots, n=17–34) and SLE patients (black dots, n=25–47). (D) Representative histograms of BTLA staining in aTregs and rTregs from one HC and one lupus patient. (E) Comparison of BTLA expressing cell subset frequencies between HC (empty boxes) and lupus patients (hatched boxes). Frequency values are displayed as mean (dashed lines) plus lower and upper quartiles (dotted lines). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM and each dot represents one individual. \*p < 0.05, Mann-Whitney.

preventing Treg HVEM-Treg BTLA interactions in *cis*. To date, there is no data concerning the dynamics of BTLA and HVEM expression by Tregs in humans following activation.

We FACS-sorted aTreg and rTreg subsets as well as naive CD4<sup>+</sup> T cells and performed quantitative real-time PCR in order to assess the expression of both BTLA and HVEM at the transcriptional level. Similarly, to what we found regarding protein expression by FACS, levels of BTLA-encoding mRNA were detectable but very low in both Treg subsets compared to naive CD4<sup>+</sup> T cells (fold changes  $0.08 \pm 0.02$  and  $0.24 \pm 0.03$  for aTreg and rTreg respectively compared to naive CD4<sup>+</sup> T cells, p<0.01, Figure 4A). On the contrary, all CD4<sup>+</sup> T cell subsets express similar HVEM-encoding mRNA levels (Figure 4A). We then stimulated FACS-sorted CD4<sup>+</sup> T cell subsets *in vitro* with anti-CD3/CD28 Abs and analyzed BTLA

and HVEM mRNA and protein levels following 4h or 48h of stimulation respectively. As it was previously demonstrated in mice, TCR activation led to BTLA mRNA upregulation by naive CD4<sup>+</sup> T cells (fold change  $6.8 \pm 2.2$ , p<0.05; Figure 4B) and to a lower extent by Tregs (fold change  $3.9 \pm 1.1$  in rTregs, p<0.05 and  $4 \pm 1.3$  in aTregs, p=0.06; Figure 4B). In contrast, HVEM was down regulated in CD4<sup>+</sup> T cells upon 4h of stimulation (fold change  $0.4 \pm 0.1$ , p<0.05; Figure 4C), whereas it remains unchanged in Tregs. However, the mRNA level of BTLA following 4h of stimulation was still significantly lower on both aTregs and rTregs (p<0.05; Figure 4D) whereas HVEM mRNA tends to be enhanced compared to naive activated CD4<sup>+</sup> T cells (Figure 4E).

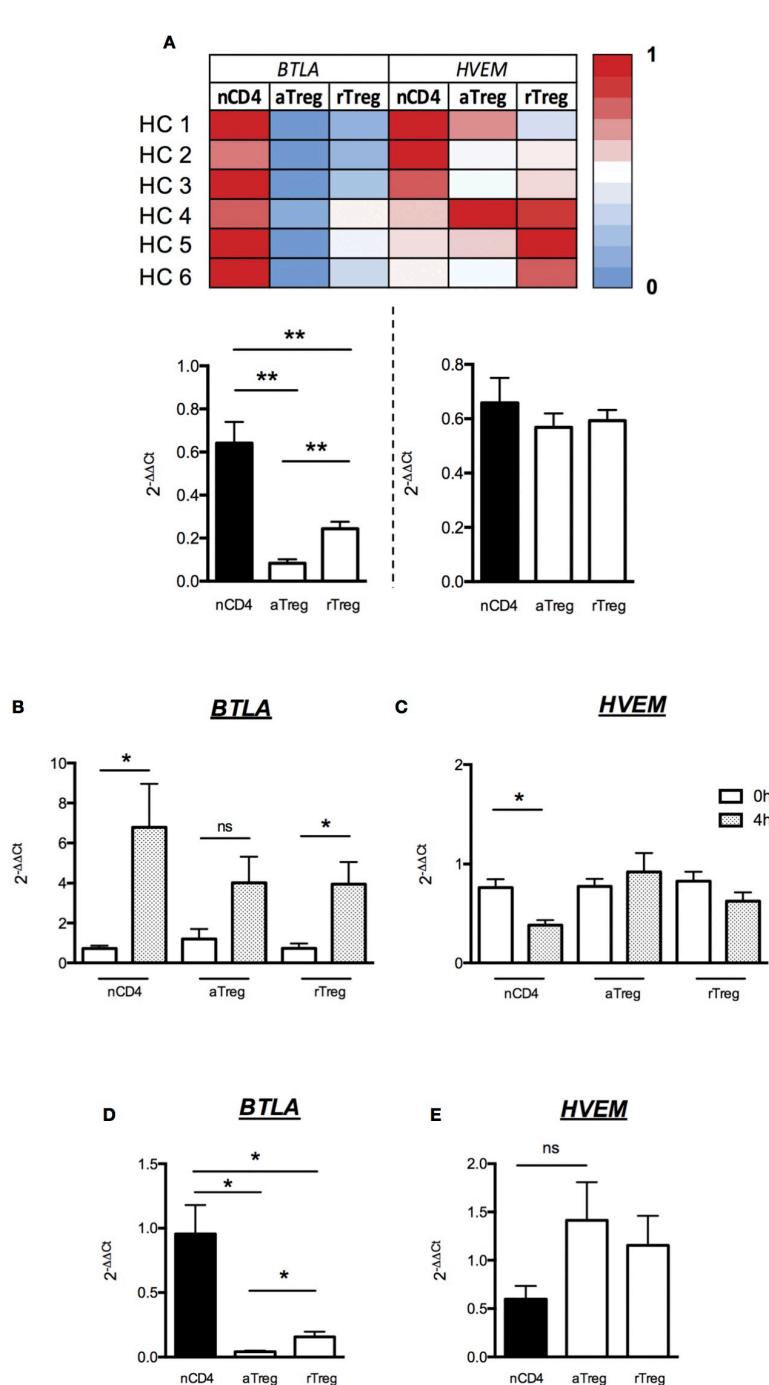
At the protein level, we found that two days of activation led to a significant increase of BTLA expression at the surface of



**FIGURE 3 |** Increased BTLA expression correlates with decreased aTregs frequency in active SLE patients. **(A)** BTLA expression on aTregs and rTregs in HC (white dots, n=25), patients with inactive SLE or with low activity (SLEDAI <6; black dots, n=27) and patients with mild to severe SLE (SLEDAI≥6; red dots, n=14). **(B)** BTLA expression on aTregs and rTregs in HC (white dots, n=25), SLE patients without @DNA Abs (black dots, n=22) and SLE patients with @DNA Abs (red dots, n=18). **(C)** BTLA expression on aTregs and rTregs in HC (white dots, n=25), SLE patients without proteinuria (black dots, n=32) and SLE patients with proteinuria (red dots, n=8). **(D)** Frequency of aTregs among CD4<sup>+</sup> T cells from HC (white dots, n=25), patients with inactive SLE or with low activity (SLEDAI <6; black dots, n=27) and patients with mild to severe SLE (SLEDAI≥6; red dots, n=14). Results are expressed as mean ± SEM and each dot represents one individual. **(E)** Correlation between BTLA expression (MFI) and the percentage of aTregs among CD4<sup>+</sup> T cells (n=40). \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001, Mann-Whitney test; r, Spearman correlation coefficient.

naive CD4<sup>+</sup> T cells (MFI 7065 ± 958 vs 3475 ± 377, p<0.05) but not on aTregs and rTregs whereas HVEM protein expression remains unchanged in all CD4<sup>+</sup> T cell subsets (Figures 5A, B). As HVEM and BTLA are co-expressed by the same cell, we calculated the ratio of HVEM and BTLA protein levels to evaluate their concomitant expression and their respective dynamics upon T cell stimulation. We observed a two-fold decrease of the HVEM/BTLA ratio in naive CD4<sup>+</sup> T cells but not in aTregs (1.5 ± 0.2 vs 0.7 ± 0.1 in naive CD4<sup>+</sup> T cells, p=0.055 and 2.9 ± 0.1 vs 2.8 ± 0.1 in aTregs, Figure 5C) following

activation. In summary, our results show that although TCR stimulation led to its upregulation, BTLA expression by Tregs remains low compared to Teffs. On the contrary, HVEM mRNA expression (but not HVEM protein) is down regulated by activated CD4<sup>+</sup> T cells but not by Tregs. Altogether, our results demonstrate for the first time, a similar dynamic of BTLA and HVEM expression pattern on Tregs and CD4<sup>+</sup> T cells between human and mice following activation, suggesting that BTLA/HVEM-mediated suppression mechanisms previously described in the mouse-model may take place in the same way in humans.

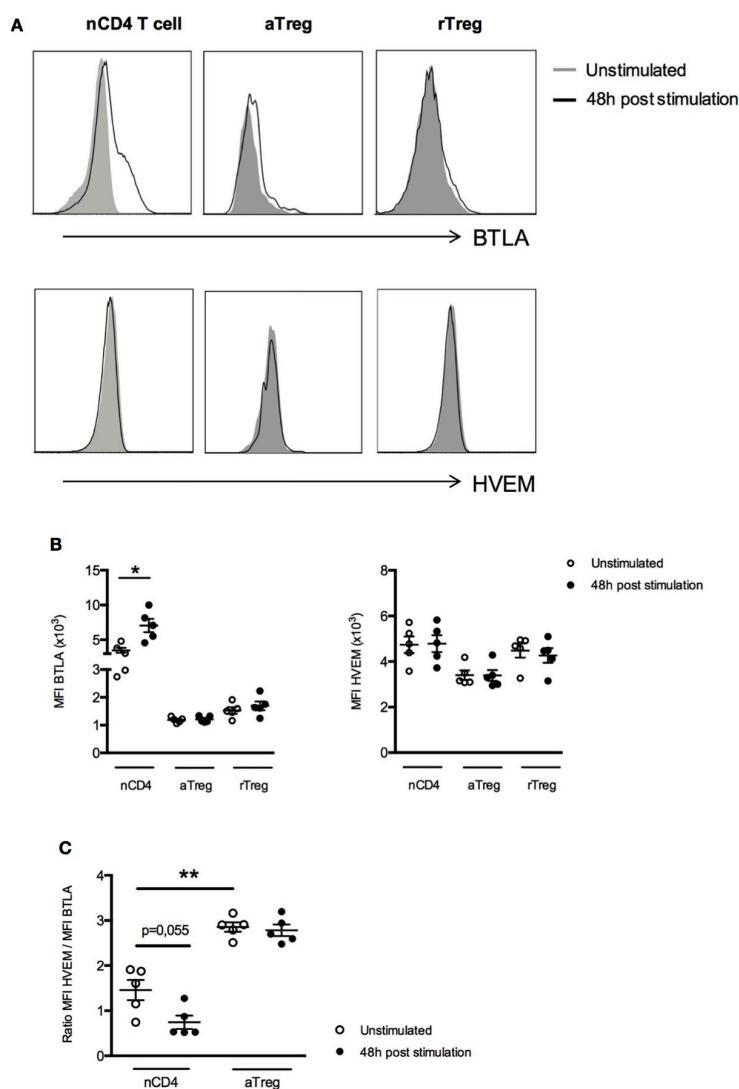


**FIGURE 4 |** Low BTLA mRNA expression and maintained HVEM mRNA expression by Tregs after activation. **(A)** Levels of BTLA and HVEM transcripts were assessed by RT-qPCR on FACS-sorted naive CD4<sup>+</sup> T cells (nCD4), aTregs and rTregs. Heatmap shows qPCR values of BTLA and HVEM transcripts normalized to GAPDH and ACTB. Results show average qPCR values from 6 HC and are expressed as fold change ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) compared to nCD4<sup>+</sup> T cells. **(B, C)** BTLA and HVEM mRNA expression by naive CD4<sup>+</sup> T cells, aTregs and rTregs from HC (n=4) following activation. Cells were stimulated with anti-CD3 (5 µg/ml) and anti-CD28 (5 µg/ml) Abs for 4 hours and harvested for analysis of BTLA and HVEM mRNA expression by RT-qPCR. Results show average qPCR values at t=4h and are expressed as fold change ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) compared to qPCR values at t=0. **(D, E)** Comparison of BTLA **(D)** and HVEM **(E)** mRNA expression between nCD4<sup>+</sup> T cells, aTregs and rTregs from HCs (n=4) after 4 hours of stimulation (as described above). Results show fold changes ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) of qPCR values compared to nCD4<sup>+</sup> T cells (n=4). Results are expressed as mean ± SEM. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01, Mann-Whitney. ns, non significant.

## Decreased HVEM/BTLA Ratio in aTregs and Higher BTLA Expression by Effector CD4<sup>+</sup> T Cells in Lupus Settings

Our phenotypic analysis revealed a higher *ex vivo* BTLA expression on aTregs from lupus patients than HC. As HVEM plays a pivotal role in Treg-mediated suppression in mice, we compared the *ex vivo* expression of HVEM on peripheral CD4<sup>+</sup> T cells and Tregs between HC and lupus patients. On the contrary to BTLA, all CD4<sup>+</sup> T cells (naive CD4<sup>+</sup> T cells, aTregs and rTregs) express similar levels of HVEM on their surface in HC (Figures 6A, B). Moreover, we did not notice any variation

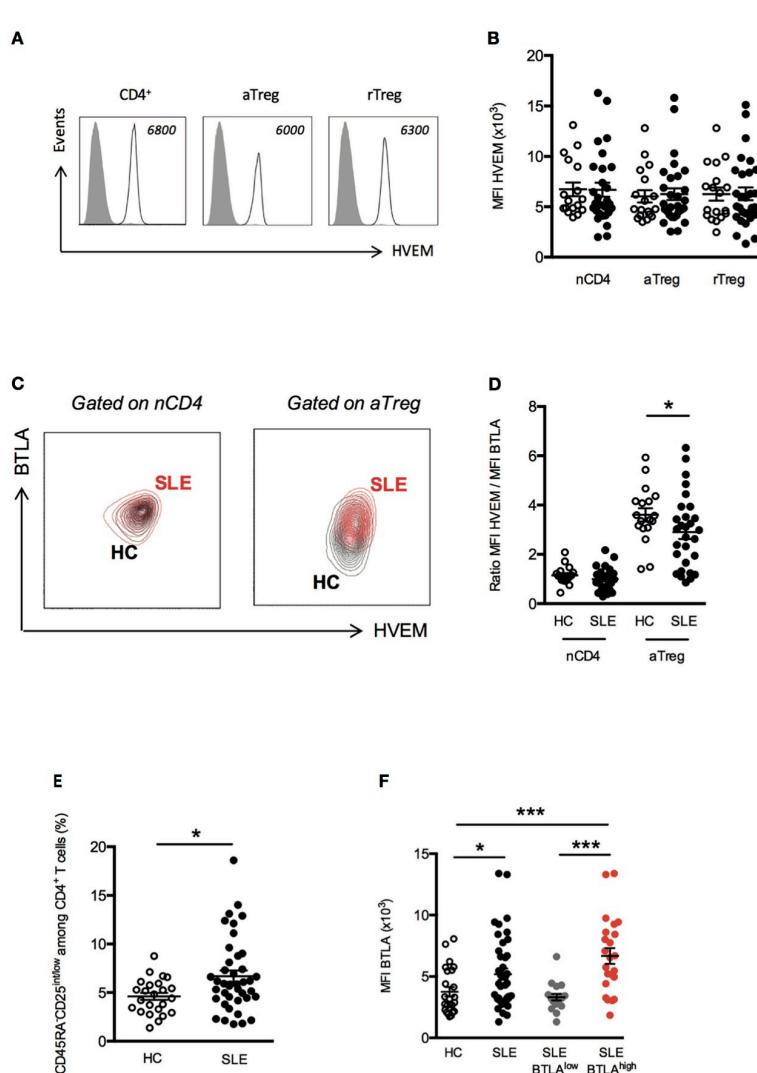
of HVEM expression on CD4<sup>+</sup> T cells or Tregs from lupus patients compared to HC (Figure 6B). Due to the higher BTLA expression by lupus aTregs, the overlay of the BTLA/HVEM dot plots of a HC and a lupus patient, revealed an upward shift in lupus aTregs compared to HC aTregs (Figure 6C) and consequently, the calculated ratio of HVEM and BTLA expression on aTregs, which is of  $3.6 \pm 0.3$  in HC is significantly decreased in aTregs from lupus patients ( $2.9 \pm 0.3$ ,  $p < 0.05$ ; Figure 6D) but not in other populations, such as naive CD4<sup>+</sup> T cells. To investigate whether enhanced BTLA expression by lupus aTregs may have biological significance in the disease



**FIGURE 5 |** Expression of BTLA and HVEM proteins by Treg subsets do not change after activation. **(A)** Representative histograms of BTLA and HVEM expression on unstimulated naïve CD4<sup>+</sup> T cells (nCD4), aTregs and rTregs or following 48h of stimulation. Data from a representative experiment are shown as an example. **(B)** BTLA and HVEM expression (MFI) after 48 hours of stimulation (anti-CD3 5 $\mu$ g/ml and anti-CD28 5 $\mu$ g/ml,  $n=5$ ). **(C)** Comparison of the ratio of HVEM and BTLA expression in naïve CD4<sup>+</sup> T cells and aTregs in the absence of stimulation (white dots,  $n=5$ ) and following 48h of TCR stimulation (black dots,  $n=5$ ). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM and each dot represents one individual. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , Mann-Whitney test.

pathogenesis, we further focused on pathogenic effector T cells. We did not find any correlation between BTLA expression by lupus aTregs and circulating  $T_{FH}$  frequencies (not shown), but this result is consistent with the fact that there was no significant altered distribution of  $cT_{FH}$  (defined as CD45RA $^{-}$ CXCR5 $^{+}$  CD4 $^{+}$  T cells) in our lupus cohort compared to HC. On the contrary, and as previously described (24), the frequency of CD45RA $^{-}$  CD25 $^{\text{int}/\text{low}}$  defined by Miyara and colleagues as activated effector T cells (**Supplementary Figure S3**) with no suppressive activities

but with high pro-inflammatory potential, is significantly higher in lupus patients ( $6.7 \pm 0.6$  in SLE patients vs  $4.6 \pm 0.4$  in HC,  $p < 0.05$  **Figure 6E**). These lupus effector T cells express higher levels of BTLA than activated effector T cells from HC (MFI  $3762 \pm 387$  in HC vs  $5199 \pm 461$ ,  $p < 0.05$ , **Figure 6F**) and more interestingly, the enhanced expression of BTLA by effector T cells is only observed in lupus patients displaying high BTLA expression levels by aTregs (MFI  $3310 \pm 268$  in lupus patients with low BTLA expression by aTregs vs  $6678 \pm 646$  in



**FIGURE 6 |** Disturbed HVEM/BTLA ratio on aTregs from SLE patients. **(A)** Representative histograms of HVEM expression on T cell subsets. Data from a representative HC are shown as an example and MFI values are indicated. **(B)** Comparison of HVEM expression (MFI) on naive CD4 $^{+}$  T cells (nCD4), aTregs and rTreg in HC (white dots,  $n=18$ ) and SLE patients (black dots,  $n=29$ ). **(C)** Representative dot plot of BTLA and HVEM expression on naive CD4 $^{+}$  T cells and aTregs from a HC (in black) and a SLE patient (in red). **(D)** Comparison of the ratio of HVEM and BTLA expression on naive CD4 $^{+}$  T cells and aTregs in HC (white dots,  $n=18$ ) and SLE patients (black dots,  $n=29$ ). **(E)** Frequency of CD45RA/CD25 $^{\text{int}/\text{low}}$  CD4 $^{+}$  effector T cells among CD4 $^{+}$  T cells from HC (white dots,  $n=24$ ) and SLE patients (black dots,  $n=41$ ). **(F)** BTLA expression on CD45RA/CD25 $^{\text{int}/\text{low}}$  CD4 $^{+}$  effector T cells in HC (white dots,  $n=24$ ), SLE patients with low BTLA expression by aTregs (grey dots,  $n=18$ ) and SLE patients with high BTLA expression by aTregs (red dots,  $n=23$ ). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM and each dot represents one individual. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ , Mann-Whitney.

lupus patients with high BTLA expression by aTregs,  $p<0.001$ , **Figure 6F**.

## DISCUSSION

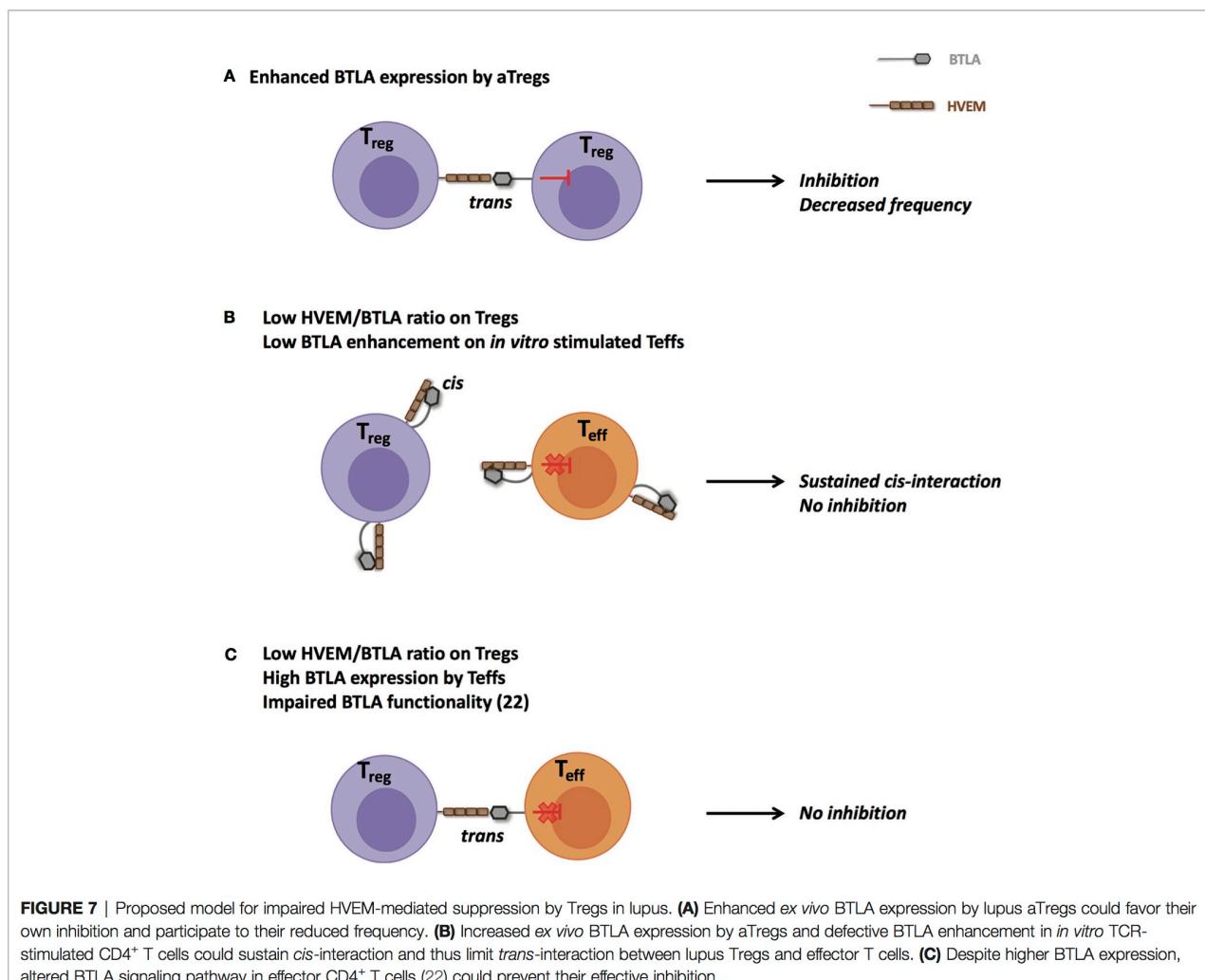
The co-inhibitory receptor BTLA is nowadays clearly considered as a critical regulator of T cell responses, however, data regarding its expression in peripheral blood CD4 $^{+}$  T cell subsets are still limited. In the present work, we performed an in-depth analysis of BTLA expression on CD4 $^{+}$  T cell subsets suspected to play a key role in lupus pathogenesis, either by promoting the Ab-response or by limiting lymphocyte activation, i.e. cT<sub>FH</sub> cells and Tregs respectively. Similarly, to what was described in CD8 $^{+}$  T cells (25, 26), we noticed that circulating CD4 $^{+}$  T cell subsets with a memory phenotype (CD45RA $^{-}$  cells) express lower levels of BTLA than naive CD4 $^{+}$  T cells. Although BTLA is considered as a T<sub>FH</sub> marker in mice, we did not observe a higher BTLA expression by cT<sub>FH</sub> compared to other CD4 $^{+}$  T cell subsets. However, this result is not surprising and is consistent with other typical GC T<sub>FH</sub> markers such as PD1 and Bcl6, which are highly expressed by tonsil T<sub>FH</sub> but not by cT<sub>FH</sub>. Concerning Tregs, our results highlight that as in mice, human Tregs express very low levels of BTLA.

In the present work, we analyzed the *ex vivo* expression of BTLA by Tregs, but more importantly, we investigated the dynamic expression of BTLA and its ligand HVEM by Tregs and Teffs following TCR stimulation. As described by Tao and colleagues in mice (20), we evidenced that human Teffs up-regulate BTLA upon activation, whereas BTLA expression by Tregs remains low. On the contrary, TCR stimulation led Teffs to down-regulate and Tregs to slightly enhance their respective HVEM expression, at least at the mRNA level. Indeed, we were not able to detect any enhancement of HVEM protein expression by Tregs in our culture conditions. This results could be explained by a too short time of stimulation (48h) as the increase of HVEM expression by Tregs was evidenced only following 72h of stimulation in mice (20). As the differential expression of BTLA and HVEM by Tregs was shown to play an important role for Treg-suppressive functions both *in vitro* and *in vivo* in the mouse-model (20), one can speculate that a closely related mechanism may account for Treg functionality in human beings.

In this study, we found that *ex vivo* expression of BTLA on CD4 $^{+}$  T cells (both naive and memory) and on cT<sub>FH</sub> was comparable between lupus patients and healthy individuals. Contrary to what we could expect, T<sub>FH2</sub> cells, which we previously described as enhanced in active lupus patients (15), do not express lower levels of BTLA than other T<sub>FH</sub> subsets. Very interestingly, we observed an altered expression of BTLA on lupus Treg subsets. Indeed, BTLA expression was significantly increased on terminally differentiated and highly suppressive aTregs, but not on rTregs (Tregs in a quiescent state that can differentiate into aTregs upon stimulation), of lupus patients compared to HC. BTLA expression by lupus Tregs was recently explored by two groups. Oster et al. reported similar frequencies of BTLA expressing Tregs (CD25 $^{\text{hi}}$ CD127 $^{\text{lo}}$ ) in lupus patients compared to healthy individuals, however, levels of BTLA expression by Tregs

were not assessed in this study (27). Murphy et al. recently described a lower expression of BTLA on Tregs (defined as CD25 $^{\text{hi}}$ CD127 $^{\text{lo}}$ CD4 $^{+}$  T cells) compared to Th1 and Th17 cells in lupus patients (28), but they did not observe any significant variation of BTLA expression on Tregs between HC and SLE patients. However, lupus patients (only 5) analyzed in this study displayed low SLEDAI scores between 4-6, and accordingly in our cohort, BTLA expression by aTregs is only significantly enhanced in patients having a SLEDAI score higher than 6.

What are the potential consequences of such a higher BTLA expression by lupus aTregs? The most obvious answer is the BTLA-mediated inhibition of Treg cells. Our data support this hypothesis, as BTLA expression by lupus aTregs strongly correlates with decreased frequencies of aTregs in PBMCs from lupus patients and we propose a model in which HVEM-expressing Tregs mediate BTLA-expressing Tregs inhibition through *trans*-interaction (**Figure 7A**). Another outcome could be directly linked to Treg functionality. One limitation of the current study is that due to the very low frequency of aTregs in lupus patients (particularly those with a mild/severe disease), we were not able to collect enough cells to perform functional experiments that would allow to demonstrate that a higher BTLA expression impairs the suppressive ability of HVEM-expressing Tregs. As Treg-mediated suppression was described to be defective in SLE patients (29, 30), understanding whether defective BTLA expression could influence the function of lupus Tregs would be particularly interesting. In resting T cells, HVEM preferentially interacts with BTLA expressed on the same cell (31, 32) thus preventing the binding of other signaling molecules to HVEM. Indeed, HVEM is able to bind various ligands in addition to BTLA (33). The *trans*-interaction of HVEM with any of these ligands [BTLA but also LIGHT, CD160 and lymphotoxin  $\alpha$  (34)], leads to the activation of the NF- $\kappa$ B pathway in HVEM-expressing cells. The HVEM-BTLA *cis*-interaction was proposed to play a role in maintaining T cell tolerance by impeding the establishment of *trans*-interaction and holding HVEM in an inactive state. Upon T cell activation, there is an inverse correlation between BTLA and HVEM expression [(35, 36) and the present work] allowing *trans*-interactions. Interestingly, we have previously shown that BTLA expression is significantly diminished in lupus CD4 $^{+}$  T cells compared to HC following *in vitro* TCR activation (22). In the present work, we evidenced that *ex vivo* lupus Tregs express higher levels of BTLA. We hypothesize that enhanced BTLA expression by lupus aTregs could sustain HVEM-BTLA *cis*-interactions and limit HVEM availability on Tregs. In parallel BTLA enhancement on stimulated CD4 $^{+}$  T cells is likely not sufficient enough to disrupt HVEM/BTLA *cis*-interactions on effector T cells and to allow HVEM $^{+}$ Treg binding in *trans* to BTLA $^{+}$ Teffs (**Figure 7B**). This proposed model is supported by the impaired suppressive functions of lupus Tregs *in vitro* as described by several groups. Surprisingly, and contrary to what was observed in *in vitro* stimulated T cells, we noticed that *ex vivo* CD4 $^{+}$  effector T cells from lupus patients express higher levels of BTLA than those from HC, suggesting that lupus Teffs may be efficiently suppressed *in vivo*. However, our previous study revealed that



**FIGURE 7 |** Proposed model for impaired HVEM-mediated suppression by Tregs in lupus. **(A)** Enhanced ex vivo BTLA expression by lupus aTregs could favor their own inhibition and participate to their reduced frequency. **(B)** Increased ex vivo BTLA expression by aTregs and defective BTLA enhancement in *in vitro* TCR-stimulated CD4<sup>+</sup> T cells could sustain *cis*-interaction and thus limit *trans*-interaction between lupus Tregs and effector T cells. **(C)** Despite higher BTLA expression, altered BTLA signaling pathway in effector CD4<sup>+</sup> T cells (22) could prevent their effective inhibition.

despite normal levels of BTLA expression, CD4<sup>+</sup> T cells from lupus patients display an altered functionality of the BTLA signaling pathway (22), and may thus consequently be refractory to Treg-mediated suppression (**Figure 7C**). Altogether, our data suggest that the altered BTLA expression by lupus Tregs and effector T cells may contribute to decreased numbers of Tregs and potentially to their reduced suppressive activity.

In the view of developing new therapeutic strategies for SLE, identifying molecular and/or cellular elements leading to enhanced BTLA expression on lupus aTregs is an open avenue. Very little is known about the factors that regulate BTLA expression but among them are microRNA (miRNA) that recently emerged as important regulators of immune responses. In mice, it was shown that miR155 targets the BTLA 3'UTR region and that knockdown of miR-155 in CD4<sup>+</sup> T cells resulted in upregulation of BTLA expression (37). Interestingly, miR155 is highly expressed by Tregs and miR-155 deficient mice display significant decreased numbers of

Tregs (38). In human autoimmune diseases, a decrease in the upregulation of miR155 in stimulated Tregs was evidenced in rheumatoid arthritis (39). Further studies are required to define whether miR155 (and/or others) effectively targets BTLA in human and whether a dysregulated miRNA expression by lupus aTregs may account for enhanced BTLA expression. BTLA expression could also be regulated thanks to direct interactions with cells expressing HVEM. Indeed, it was previously demonstrated that TCR ligation by HVEM-expressing cells led to downregulation of BTLA on antigen-specific T cells (26). In contrast, in the absence of HVEM, antigen-triggered BTLA downregulation was less pronounced and led to higher BTLA expression levels at late time points. Moreover, levels of soluble HVEM (sHVEM) were described to be enhanced in autoimmune or infectious contexts (40). Whether sHVEM directly influences BTLA expression is not known but we wondered whether there is a link between BTLA expression and sHVEM levels in our lupus cohort. However, we did not evidence any enhancement of sHVEM in lupus patients

compared to HC (unpublished results), nor any correlation between sHVEM in lupus sera and the higher level of BTLA expression by lupus aTregs.

In conclusion, this study deepens our knowledge regarding the expression of BTLA in CD4<sup>+</sup> T cells, not only in SLE but also in healthy settings. Indeed, we provide evidences of BTLA and HVEM expression and their respective dynamics following activation on human Tregs, which has never been described before. We evidenced a higher expression of the co-inhibitory receptor BTLA in lupus aTregs, and our results support the hypothesis of a link between this observation and the diminution of aTreg frequency in lupus settings. An extensive knowledge of BTLA expression on all immune cell subsets involved in lupus pathogenesis is absolutely required to envisage targeting this molecule in the context of new therapeutic strategies. Our results contribute to this progress and may open the door to the development of new drugs and therapeutic approaches for SLE patients in the future.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

## ETHICS STATEMENT

Ethical review and approval was not required for the study on human participants in accordance with the local legislation and institutional requirements. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## REFERENCES

- Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, Yang J, Fallarino F, Loftin SK, et al. BTLA is a Lymphocyte Inhibitory Receptor With Similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat Immunol* (2003) 4:670–9. doi: 10.1038/ni944
- Hurchla MA, Sedy JR, Gavrieli M, Drake CG, Murphy TL, Murphy KM. B and T Lymphocyte Attenuator Exhibits Structural and Expression Polymorphisms and Is Highly Induced in Anergic CD4<sup>+</sup> T Cells. *J Immunol* (2005) 174:3377–85. doi: 10.4049/jimmunol.174.6.3377
- Sedy JR, Gavrieli M, Potter KG, Hurchla MA, Lindsley RC, Hildner K, et al. B and T Lymphocyte Attenuator Regulates T Cell Activation Through Interaction With Herpesvirus Entry Mediator. *Nat Immunol* (2005) 6:90–8. doi: 10.1038/ni1144
- Gavrieli M, Watanabe N, Loftin SK, Murphy TL, Murphy KM. Characterization of Phosphotyrosine Binding Motifs in the Cytoplasmic Domain of B and T Lymphocyte Attenuator Required for Association With Protein Tyrosine Phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Biochem Biophys Res Commun* (2003) 312:1236–43. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.11.070
- Xu X, Hou B, Fulzeli A, Masubuchi T, Zhao Y, Wu Z, et al. PD-1 and BTLA Regulate T Cell Signaling Differentially and Only Partially Through SHP1 and SHP2. *J Cell Biol* (2020) 219:e201905085. doi: 10.1083/jcb.201905085
- Murphy TL, Murphy KM. Slow Down and Survive: Enigmatic Immunoregulation by BTLA and HVEM. *Annu Rev Immunol* (2010) 28:389–411. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101202
- Oya Y, Watanabe N, Owada T, Oki M, Hirose K, Suto A, et al. Development of Autoimmune Hepatitis-Like Disease and Production of Autoantibodies to Nuclear Antigens in Mice Lacking B and T Lymphocyte Attenuator. *Arthritis Rheum* (2008) 58:2498–510. doi: 10.1002/art.23674
- Nakagomi D, Suzuki K, Hosokawa J, Kobayashi Y, Suto A, Takatori H, et al. Therapeutic Potential of B and T Lymphocyte Attenuator Expressed on CD8<sup>+</sup> T Cells for Contact Hypersensitivity. *J Invest Dermatol* (2013) 133:702–11. doi: 10.1038/jid.2012.396
- Liu X, Alexiou M, Martin-Orozco N, Chung Y, Nurieva RI, Ma L, et al. Cutting Edge: A Critical Role of B and T Lymphocyte Attenuator in Peripheral T Cell Tolerance Induction. *J Immunol* (2009) 182:4516–20. doi: 10.4049/jimmunol.0803161
- Albrink JC, Sandau MM, Rapaport AS, Edelson BT, Satpathy A, Mashayekhi M, et al. Targeting of B and T Lymphocyte Associated (BTLA) Prevents Graft-Versus-Host Disease Without Global Immunosuppression. *J Exp Med* (2010) 207:2551–9. doi: 10.1084/jem.20102017
- Uchiyama M, Jin X, Matsuda H, Bashuda H, Imazuru T, Shimokawa T, et al. An Agonistic Anti-BTLA mAb (3C10) Induced Generation of IL-10-Dependent Regulatory CD4<sup>+</sup> T Cells and Prolongation of Murine Cardiac Allograft. *Transplantation* (2014) 97:301–9. doi: 10.1097/TP.0000438204.96723.8b
- Cameron JS. Lupus Nephritis. *J Am Soc Nephrol* (1999) 10:413–24. doi: 10.1681/ASN.V102413
- Lacotte S, Dumortier H, Décosas M, Briand J-P, Muller S. Identification of New Pathogenic Players in Lupus: Autoantibody-Secreting Cells are Present

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

FM designed the study. LA performed the experiments and analyzed the data. LA and FM wrote the manuscript. RF and J-EG participated in sample collection and clinical analysis and reviewed the article. MS and HD participated to discussions and reviewed the article. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

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

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Department of Rheumatology, Hautepierre hospital (Strasbourg), the Department of Clinical Immunology and Internal Medicine, Strasbourg hospital and the patients for participating in the study. We acknowledge the IGBMC flow cytometry facility (Illkirch France) and Claudine Ebel and Muriel Philipps for help in cell-sorting.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

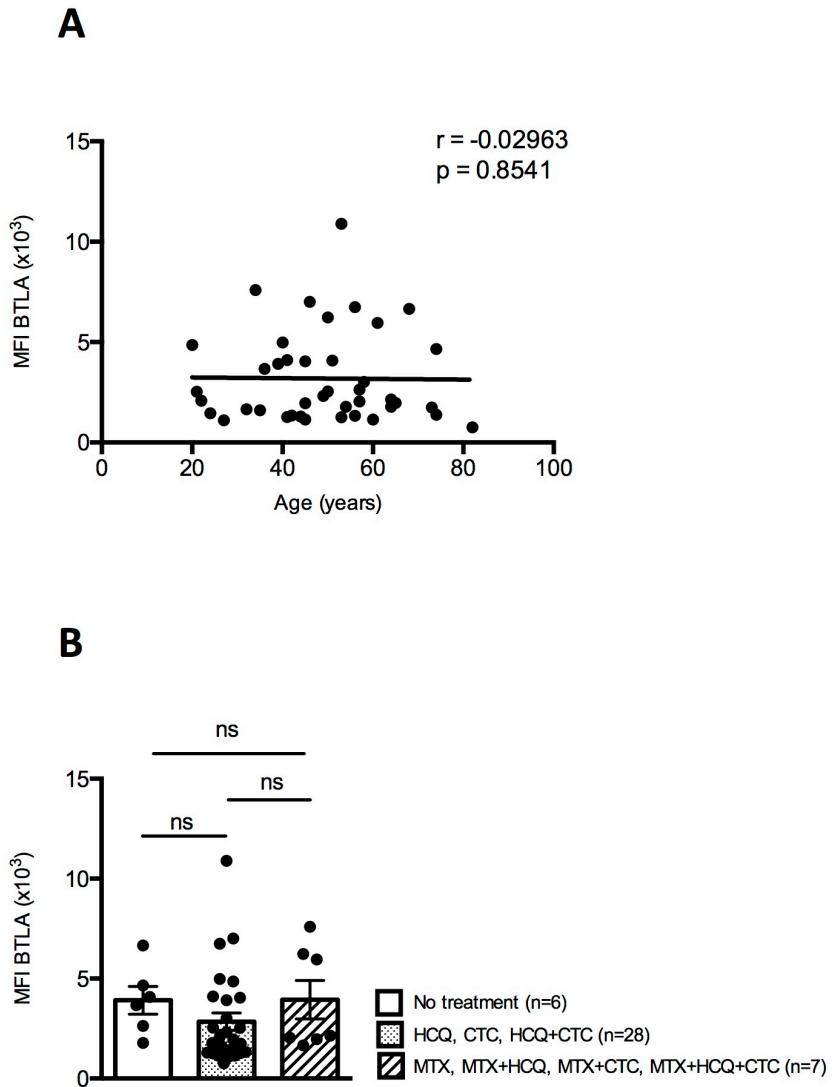
The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.767099/full#supplementary-material>

- in Nephritic Kidneys of (NZBxNZW)F1 Mice. *J Immunol* (2010) 184:3937–45. doi: 10.4049/jimmunol.0902595
14. Lacotte S, Decossas M, Le Coz C, Brun S, Muller S, Dumortier H. Early Differentiated CD138(high) MHCII+ IgG+ Plasma Cells Express CXCR3 and Localize Into Inflamed Kidneys of Lupus Mice. *PLoS One* (2013) 8:e58140. doi: 10.1371/journal.pone.0058140
  15. Le Coz C, Joublin A, Pasquali J-L, Korganow A-S, Dumortier H, Monneaux F. Circulating TFH Subset Distribution Is Strongly Affected in Lupus Patients With an Active Disease. *PLoS One* (2013) 8:e75319. doi: 10.1371/journal.pone.0075319
  16. Sawaf M, Dumortier H, Monneaux F. Follicular Helper T Cells in Systemic Lupus Erythematosus: Why Should They Be Considered as Interesting Therapeutic Targets? *J Immunol Res* (2016) 2016:5767106. doi: 10.1155/2016/5767106
  17. Li W, Deng C, Yang H, Wang G. The Regulatory T Cell in Active Systemic Lupus Erythematosus Patients: A Systemic Review and Meta-Analysis. *Front Immunol* (2019) 10:159. doi: 10.3389/fimmu.2019.00159
  18. Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, et al. Generation of T Follicular Helper Cells Is Mediated by Interleukin-21 But Independent of T Helper 1, 2, or 17 Cell Lineages. *Immunity* (2008) 29:138–49. doi: 10.1016/j.immuni.2008.05.009
  19. Kashiwakuma D, Suto A, Hiramatsu Y, Ikeda K, Takatori H, Suzuki K, et al. B and T Lymphocyte Attenuator Suppresses IL-21 Production From Follicular Th Cells and Subsequent Humoral Immune Responses. *J Immunol* (2010) 185:2730–6. doi: 10.4049/jimmunol.0903839
  20. Tao R, Wang L, Murphy KM, Fraser CC, Hancock WW. Regulatory T Cell Expression of Herpesvirus Entry Mediator Suppresses the Function of B and T Lymphocyte Attenuator-Positive Effector T Cells. *J Immunol* (2008) 180:6649–55. doi: 10.4049/jimmunol.180.10.6649
  21. Oya Y, Watanabe N, Kobayashi Y, Owada T, Oki M, Ikeda K, et al. Lack of B and T Lymphocyte Attenuator Exacerbates Autoimmune Disorders and Induces Fas-Independent Liver Injury in MRL-Lpr/Lpr Mice. *Int Immunopharmacol* (2011) 23:335–44. doi: 10.1093/intimm/dxr017
  22. Sawaf M, Fauny J-D, Felten R, Sagez F, Gottenberg J-E, Dumortier H, et al. Defective BTLA Functionality Is Rescued by Restoring Lipid Metabolism in Lupus CD4+ T Cells. *JCI Insight* (2018) 3:99711. doi: 10.1172/jci.insight.99711
  23. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* (1997) 40:1725. doi: 10.1002/art.1780400928
  24. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4+ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity* (2009) 30:899–911. doi: 10.1016/j.immuni.2009.03.019
  25. Baitsch L, Legat A, Barba L, Fuertes Marraco SA, Rivals J-P, Baumgaertner P, et al. Extended Co-Expression of Inhibitory Receptors by Human CD8 T-Cells Depending on Differentiation, Antigen-Specificity and Anatomical Localization. *PLoS One* (2012) 7:e30852. doi: 10.1371/journal.pone.0030852
  26. Derrière L, Rivals J-P, Jandus C, Pastor S, Rimoldi D, Romero P, et al. BTLA Mediates Inhibition of Human Tumor-Specific CD8+ T Cells That Can be Partially Reversed by Vaccination. *J Clin Invest* (2010) 120:157–67. doi: 10.1172/JCI40070
  27. Oster C, Wilde B, Specker C, Sun M, Kribben A, Witzke O, et al. BTLA Expression on Th1, Th2 and Th17 Effector T-Cells of Patients With Systemic Lupus Erythematosus Is Associated With Active Disease. *Int J Mol Sci* (2019) 20:E4505. doi: 10.3390/ijms20184505
  28. Murphy KA, Bhamidipati K, Rubin SJS, Kipp L, Robinson WH, Lanz TV. Immunomodulatory Receptors are Differentially Expressed in B and T Cell Subsets Relevant to Autoimmune Disease. *Clin Immunol* (2019) 209:108276. doi: 10.1016/j.clim.2019.108276
  29. Parietti V, Chiffot H, Muller S, Monneaux F. Regulatory T Cells and Systemic Lupus Erythematosus. *Ann N Y Acad Sci* (2007) 1108:64–75. doi: 10.1196/annals.1422.007
  30. Scheinecker C, Bonelli M, Smolen JS. Pathogenetic Aspects of Systemic Lupus Erythematosus With an Emphasis on Regulatory T Cells. *J Autoimmun* (2010) 35:269–75. doi: 10.1016/j.jaut.2010.06.018
  31. Cheung TC, Oborne LM, Steinberg MW, Macauley MG, Fukuyama S, Sanjo H, et al. T Cell Intrinsic Heterodimeric Complexes Between HVEM and BTLA Determine Receptivity to the Surrounding Microenvironment. *J Immunol* (2009) 183:7286–96. doi: 10.4049/jimmunol.0902490
  32. del Rio M-L, Jones ND, Buhler L, Norris P, Shintani Y, Ware CF, et al. Selective Blockade of Herpesvirus Entry Mediator-B and T Lymphocyte Attenuator Pathway Ameliorates Acute Graft-Versus-Host Reaction. *J Immunol* (2012) 188:4885–96. doi: 10.4049/jimmunol.1103698
  33. Steinberg MW, Cheung TC, Ware CF. The Signaling Networks of the Herpesvirus Entry Mediator (TNFSF14) in Immune Regulation. *Immunol Rev* (2011) 244:169–87. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01064.x
  34. Cai G, Freeman GJ. The CD160, BTLA, LIGHT/HVEM Pathway: A Bidirectional Switch Regulating T-Cell Activation. *Immunol Rev* (2009) 229:244–58. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00783.x
  35. del Rio M-L, Kaye J, Rodriguez-Barbosa J-I. Detection of Protein on BTLA Low Cells and *In Vivo* Antibody-Mediated Down-Modulation of BTLA on Lymphoid and Myeloid Cells of C57BL/6 and BALB/c BTLA Allelic Variants. *Immunobiology* (2010) 215:570–8. doi: 10.1016/j.imbio.2009.09.008
  36. Ware CF, Sedgwick JR. TNF Superfamily Networks: Bidirectional and Interference Pathways of the Herpesvirus Entry Mediator (TNFSF14). *Curr Opin Immunol* (2011) 23:627–31. doi: 10.1016/j.co.2011.08.008
  37. Liu Y, Nie W, Jin Y, Zhuo A, Zang Y, Xiu Q, et al. B and T Lymphocyte Attenuator is a Target of miR-155 During Naïve CD4+ T Cell Activation. *Iran J Immunol* (2016) 13:89–99.
  38. Lu L-F, Thai T-H, Calado DP, Chaudhry A, Kubo M, Tanaka K, et al. Foxp3-Dependent MicroRNA155 Confers Competitive Fitness to Regulatory T Cells by Targeting SOCS1 Protein. *Immunity* (2009) 30:80–91. doi: 10.1016/j.immuni.2008.11.010
  39. Zhou Q, Haupt S, Kreuzer JT, Hammitzsch A, Proft F, Neumann C, et al. Decreased Expression of miR-146a and miR-155 Contributes to an Abnormal Treg Phenotype in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Ann Rheum Dis* (2015) 74:1265–74. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204377
  40. Jung HW, La SJ, Kim JY, Heo SK, Kim JY, Wang S, et al. High Levels of Soluble Herpes Virus Entry Mediator in Sera of Patients With Allergic and Autoimmune Diseases. *Exp Mol Med* (2003) 35:501–8. doi: 10.1038/emm.2003.65

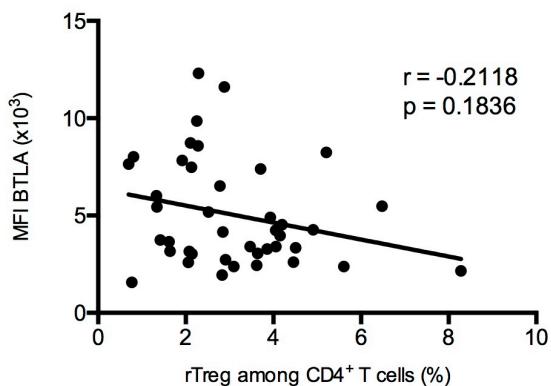
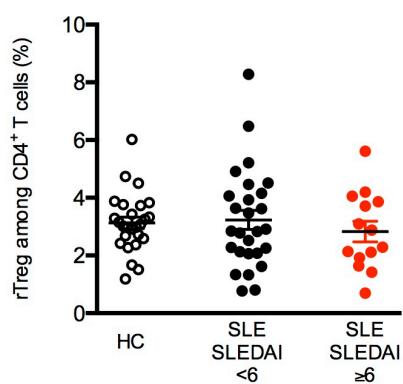
**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Aubergeon, Sawaf, Felten, Gottenberg, Dumortier and Monneaux. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

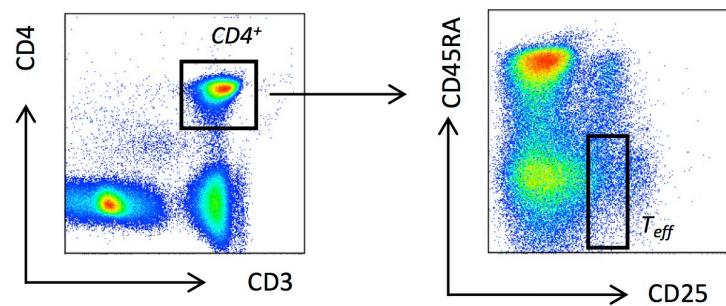


**Figure S1.** BTLA expression on aTregs from SLE patients does not correlate with treatments or age. **(A)** Correlation between BTLA expression (MFI) on aTregs from SLE patients and age. **(B)** BTLA expression (MFI) on aTregs from SLE patients according to treatments. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM and each dot represents one individual.  $r$ , Spearman correlation coefficient; HCQ, hydroxychloroquine; CTC, corticosteroids; MTX, methotrexate.

**A****B**

**Figure S2.** BT LA expression on lupus rTregs does not correlate with rTregs frequency. **(A)** Correlation between BT LA expression (MFI) on rTregs from SLE patients and the frequency of rTregs. **(B)** Frequency of rTregs among CD4<sup>+</sup> T cells from HC (white dots, n=26) patients with inactive SLE or with low activity (SLEDAI<6; black dots, n=27) and patients with mild to severe SLE (SLEDAI $\geq 6$ ; red dots, n=14). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM and each dot represents one individual.  $r$ , Spearman correlation coefficient.

**Supplementary S2**



**Figure S3.** Flow cytometry gating strategy of effector T cells ( $CD45RA^-CD25^{\text{int/low}}$ ) defined by CD3, CD4, CD45RA and CD25.

**A**

	BTLA 0h			HVEM 0h			BTLA 4h			HVEM 4h		
	nCD4	aTreg	rTreg	nCD4	aTreg	rTreg	nCD4	aTreg	rTreg	nCD4	aTreg	rTreg
S1	5,664	8,565	7,532	2,264	2,568	3,194	3,905	8,317	6,755	3,789	4,584	4,928
S2	6,247	10,365	8,684	2,507	3,624	3,471	4,345	9,398	7,151	4,744	3,940	4,663
S3	6,089	10,423	7,967	2,822	3,724	3,578	3,267	8,523	6,939	5,129	3,896	4,167
S4	7,265	11,107	9,668	3,500	4,251	4,355	4,843	8,822	6,748	4,881	4,907	4,672
S5	6,914	11,413	9,529	3,272	4,225	3,648						
S6	6,187	8,995	7,591	3,239	4,246	3,921						

**B**

	BTLA 0h			HVEM 0h			BTLA 4h			HVEM 4h		
	nCD4	aTreg	rTreg	nCD4	aTreg	rTreg	nCD4	aTreg	rTreg	nCD4	aTreg	rTreg
S1	0	2,900	1,868	0	0,304	0,929	0	4,412	2,850	0	0,794	1,138
S2	0,583	4,117	2,437	0,243	1,116	0,963	0,440	5,052	2,805	0,954	-0,803	-0,080
S3	0,424	4,334	1,877	0,558	0,901	0,755	-0,637	5,256	3,672	1,339	-1,232	-0,962
S4	1,601	3,841	2,403	1,236	0,751	0,852	0,938	3,978	1,904	1,091	0,026	-0,208
S5	1,249	4,499	2,615	1,008	0,953	0,376						
S6	0,523	2,807	1,403	0,975	1,007	0,682						

**Supplemental Table 1.**  $\Delta Ct$  (A) and  $\Delta\Delta Ct$  (B) values for BTLA and HVEM. S, Sample.

### III) Expression de BTLA par les LB

#### 1) Expression de BTLA par les LB d'individus sains

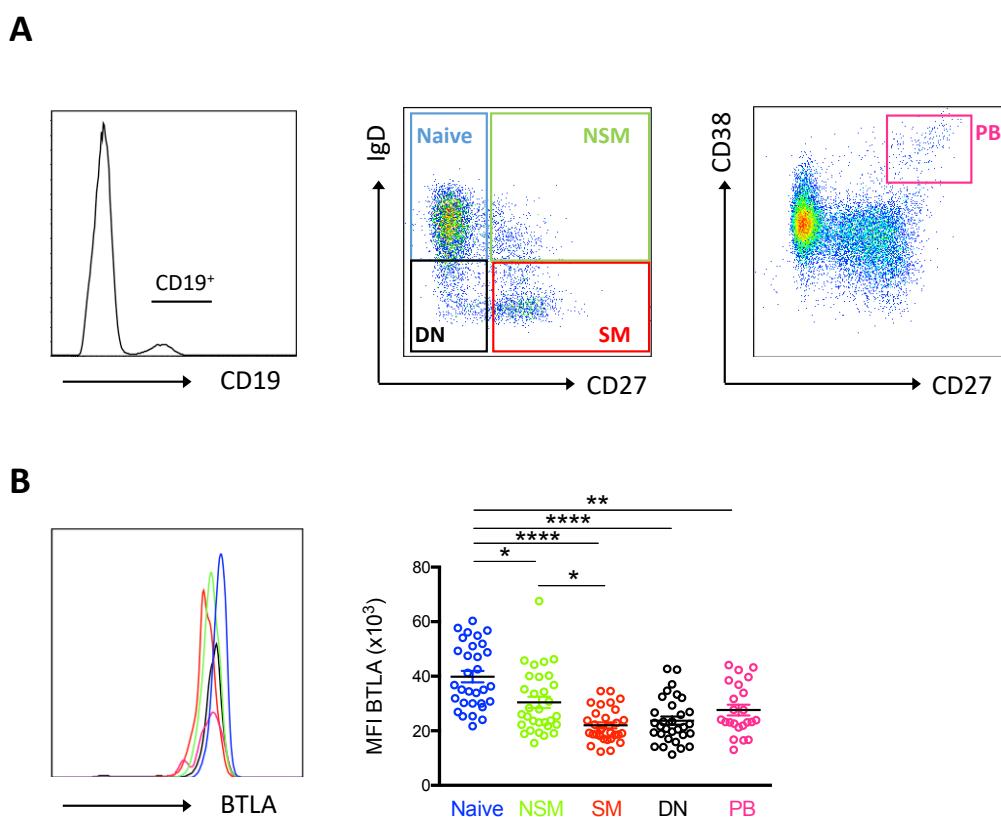
Comme montré précédemment, nous avons observé une augmentation de l'expression de BTLA à la surface des aTregs de patients lupiques inversement corrélée à la fréquence de ces cellules. Ces résultats suggèrent donc qu'une forte expression de BTLA par les aTregs pourrait conduire en une contraction de cette population dans un contexte lupique. Nous avons ensuite souhaité analyser l'expression de BTLA par les LB, acteurs majeurs de la pathologie lupique. Il est connu que BTLA est fortement exprimé par les LB périphériques et que ce récepteur régule leur activation et leur maturation (**Thibult et al., 2013**). En effet, BTLA est recruté au niveau du BCR après activation et entraîne une déphosphorylation des protéines Syk et Blnk, inhibant ainsi l'activation, la prolifération et la production de cytokines par les LB chez l'Homme (**Thibult et al., 2013; Vendel et al., 2009**).

Nous avons donc évalué l'expression de BTLA sur cinq sous-populations de LB périphériques par cytométrie en flux (**Tableau 1**).

Cible	Clone	Isotype	Fluorochrome	Fournisseur
IgD	IA6-2	IgG2a, souris	FITC	BD Pharmingen
BTLA	MIH26	IgG2a, souris	PE	Biolegend
HVEM	122	IgG1, souris	PE-Cy7	Biolegend
CD27	M-T271	IgG1, souris	APC	BD Pharmingen
CD27	REA499	rhlG1	APC-Vio770	Miltenyi
IgG	ISAA-3B2.2.3	IgG1, souris	PerCP-Vio770	Miltenyi
IgA	IS11-8E10	IgG1, souris	PE-Vio770	Miltenyi
CD95	DX2	IgG1, souris	APC-Vio770	Miltenyi
CD19	LT19	IgG1, souris	VioBlue	Miltenyi
CD38	HIT2	IgG1, souris	PE-Cy7	BD Pharmingen
CD11c	REA618	rhlG1	APC-Vio770	Miltenyi
CXCR5	REA103	rhlG1	Pe-Vio615	Miltenyi
HLA-DR	L203	IgG1, souris	AF700	R&D
T-bet	4B10	IgG1, souris	PE-Cy7	Biolegend
SLAMF7	162.1	IgG2b, souris	PE/Dazzle 594	Biolegend
CD14	M5E2	IgG2a, souris	PerCP-Cy5.5	BD Pharmingen
CD3	UCHT1	IgG1, souris	AF700	BD Pharmingen
CD69	REA824	rhlG1	APC	Miltenyi
CD86	2331 (FUN-1)	IgG1, souris	FITC	BD Pharmingen

**Tableau 1.** Liste des anticorps utilisés pour l'analyse des LB humains.

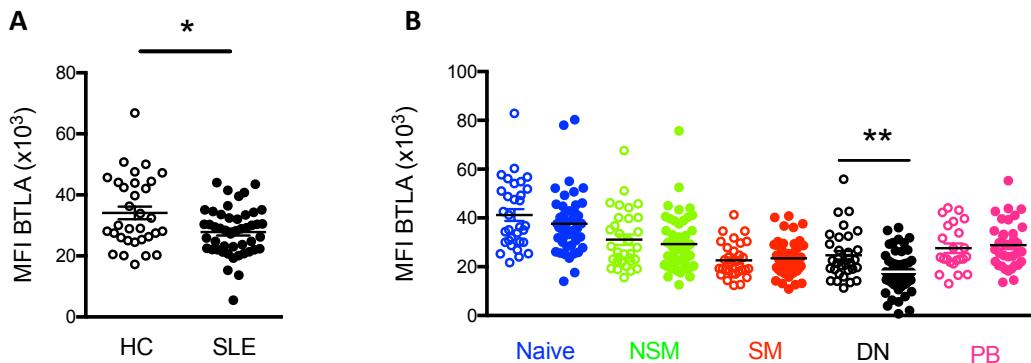
Les populations de LB ont été identifiées grâce aux marqueurs IgD, CD27 et CD38 en tant que LB naïfs (Naive,  $CD19^+IgD^+CD27^-$ ), LB mémoires non-switchés (NSM,  $CD19^+IgD^+CD27^+$ ), LB mémoires switchés (SM,  $CD19^+IgD^-CD27^+$ ), LB mémoires doubles négatifs (DN,  $CD19^+IgD^-CD27^-$ ) et plasmablastes (PB,  $CD19^+CD27^{hi}CD38^{hi}$ ) (**Figure 24A**). Nous avons observé que l'expression de BTLA est très élevée à la surface des LB naïfs (MFI =  $39860 \pm 2109$ ), et qu'elle diminue progressivement à la surface des LB NSM (MFI =  $30440 \pm 2073$ , p<0,05) et SM (MFI =  $22010 \pm 1100$ , p<0,05). L'expression de BTLA à la surface des LB DN (MFI =  $23730 \pm 1495$ ) est similaire à celle retrouvée à la surface des LB SM (**Figure 24B**). De façon intéressante, et contrairement à d'autres récepteurs inhibiteurs, BTLA est exprimé à la surface des PB à un niveau moindre que sur les LB naïfs, mais similaire à celui observé sur les LB SM ou DN (MFI =  $27600 \pm 1946$ ).



**Figure 24. Expression de BTLA par les différentes sous-populations de LB chez l'individu sain. (A)** Exemple d'expression de BTLA à la surface des sous-populations de LB périphériques par cytométrie en flux : LB naïfs (Naive,  $CD19^+IgD^+CD27^-$ ), LB mémoires non-switchés (NSM,  $CD19^+IgD^+CD27^+$ ), LB mémoires switchés (SM,  $CD19^+IgD^-CD27^+$ ), LB mémoires DN (DN,  $CD19^+IgD^-CD27^-$ ) et les plasmablastes (PB,  $CD19^+CD27^{hi}CD38^{hi}$ ). **(B)** Comparaison de l'expression de BTLA à la surface des différentes sous-populations de LB d'individus sains (n=23-32). Les résultats sont exprimés en MFI moyenne  $\pm$  SEM et chaque point représente un individu. \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*\*p<0,0001, Kruskal-Wallis test.

## 2) Expression de BTLA par les LB de patients lupiques

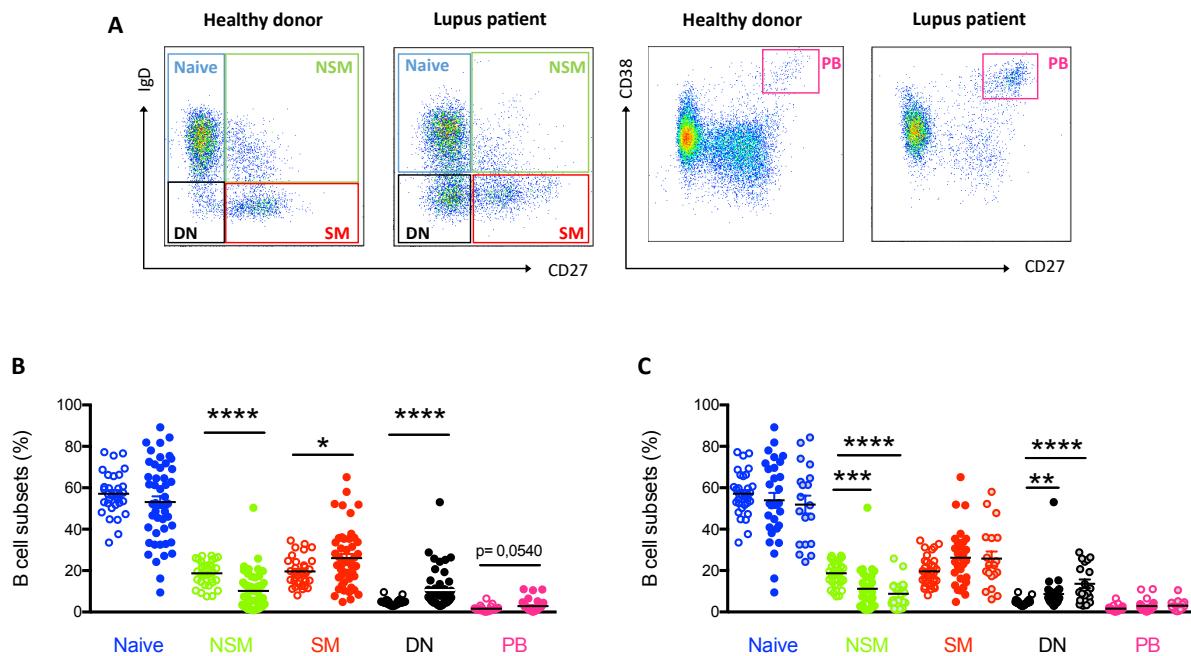
Chez les patients lupiques, l'expression de BTLA est significativement diminuée à la surface des LB totaux CD19<sup>+</sup> par rapport aux individus sains (MFI = 27850 ± 1143 pour les patients LES vs 34120 ± 2064 pour les HC, p<0,05) (**Figure 25A**). En analysant plus précisément les différentes sous populations de LB, nous avons observé que la diminution de l'expression de BTLA chez les patients lupiques par rapport aux individus sains, ne concerne que les LB DN (MFI = 24730 ± 1763 pour les HC vs MFI = 17950 ± 1215 pour les patients LES, p<0,01) (**Figure 25B**).



**Figure 25.** Diminution de l'expression de BTLA à la surface des LB de patients lupiques. (A) Expression de BTLA par les LB d'individus sains (HC, n =32) et de patients lupiques (SLE, n= 48). (B) Comparaison de l'expression de BTLA à la surface des sous-populations de LB entre individus sains (ronds vides, n=23-32) et patients lupiques (ronds pleins, n=35-48). Les résultats sont exprimés en MFI moyenne ± SEM et chaque point représente un individu. \*p<0,05 ; \*\*p<0,01, Mann Whitney test. HC : healthy controls

Les patients lupiques présentent une altération de la distribution des sous-populations de LB qui se traduit notamment par une diminution de la fréquence des LB naïfs et des LB NSM et une augmentation des LB SM, DN et des PL/PB (**Jacobi et al., 2003; Le Coz et al., 2013; Odendahl et al., 2000; Wei et al., 2007**). Lors de notre étude, nous avons pu confirmer ces tendances avec notre cohorte de patients (**Figure 26A**). Nous avons observé une diminution des LB NSM (18,68% ± 1,06 pour les HC vs 10,23% ± 1,31 pour les patients LES, p<0,0001), et une augmentation des LB SM (19,60% ± 1,26 pour les HC vs 26,02% ± 2,04 pour les patients LES, p<0,05), des LB DN (4,68% ± 0,25 pour les HC vs 10,65% ± 1,34 pour les patients LES, p<0,0001), et des PB (1,62% ± 0,29 pour les HC vs 2,90% ± 0,47 pour les patients LES) (**Figure 26B**). La fréquence des LB DN est particulièrement augmentée chez les patients présentant

un lupus actif ( $4,68\% \pm 0,25$  pour les HC vs  $8,71\% \pm 1,69$  pour les patients présentant un SLEDAI<6 vs  $13,61\% \pm 2,07$  pour les patients présentant un SLEDAI $\geq 6$ ) (Figure 26C).



**Figure 26.** La distribution des sous-populations de LB est altérée chez les patients lupiques. (A) Exemple de représentation des sous-populations de LB chez un individu sain et un individu lupique par cytométrie en flux. (B) Distribution des sous-populations de LB parmi les LB CD19<sup>+</sup> chez les individus sains (ronds vides, n= 23-32) et les patients lupiques (ronds pleins, n= 35-48). (C) Distribution des sous-populations de LB parmi les LB CD19<sup>+</sup> chez les individus sains (ronds vides, n= 23-32), les patients présentant un lupus inactif (ronds pleins, n= 20-27), et les patients présentant un lupus actif (ronds grisés, n= 13-18). Les résultats sont exprimés en MFI moyenne  $\pm$  SEM et chaque point représente un individu. \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; \*\*\*\*p<0,0001, Kruskal-Wallis test.

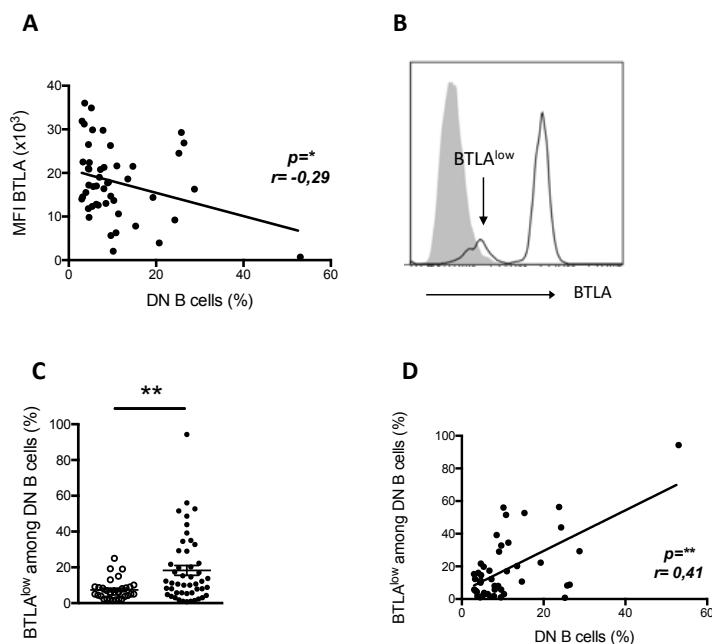
En conclusion, nous avons mis en évidence une diminution de l'expression de BTLA à la surface d'une sous-population de LB, les LB DN, dont la fréquence est augmentée chez les patients lupiques.

### 3) Expression de BTLA par les LB DN

Les LB DN sont des cellules mémoires très peu représentées chez les individus sains, mais dont la fréquence est augmentée chez les patients lupiques (Anolik et al., 2003; Huang et al., 2002), et corrèle avec la sévérité de la maladie (Wei et al., 2007; You et al., 2020). Ces LB partagent de nombreuses caractéristiques avec les LB mémoires CD27<sup>+</sup>. En effet, ces cellules peuvent produire des Ig de type IgG ou IgA, et possèdent de nombreux clones en commun avec les LB SM (Bagnara et al., 2015). Tout comme les LB CD27<sup>+</sup>, les LB DN peuvent

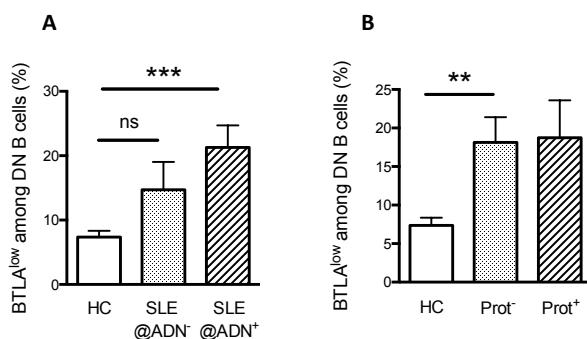
proliférer sans que le BCR ne soit engagé, suite à une stimulation du TLR9 par du CpG (**Wei et al., 2007**). En revanche, même si les LB DN partagent des caractéristiques de cellules mémoires, ils ne semblent pas impliqués dans la présentation antigénique car ils n'expriment que faiblement les marqueurs CD80, CD40 et HLA-DR (**Colonna-Romano et al., 2009**). Toutefois, les LB DN peuvent se différencier en cellules productrices d'anticorps (**Jenks et al., 2018; Wei et al., 2007**) et produire des cytokines pro-inflammatoires ainsi que des granzymes B cytotoxiques (**Bulati et al., 2014**).

De façon intéressante, les LB DN n'expriment pas le récepteur inhibiteur FcRH4 (**Wei et al., 2007**). Dans notre étude, nous avons pu montrer une diminution de l'expression du récepteur inhibiteur BTLA à la surface des LB DN de patients lupiques (**Figure 25B**). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que cette diminution de l'expression de BTLA pourrait participer à l'expansion des LB DN chez les patients lupiques. Cette hypothèse est indirectement confirmée par notre analyse de corrélation entre l'expression de BTLA par les LB DN et la fréquence de ces cellules chez les patients. En effet, moins BTLA est exprimé par les LB DN de patients, plus la fréquence des LB DN est importante ( $p= 0,0431$  ;  $r= -0,29$ , **Figure 27A**).



**Figure 27.** Mise en évidence d'une sous-population BTLA<sup>low</sup> parmi les LB DN. **(A)** Corrélation entre l'expression de BTLA à la surface des LB DN et le pourcentage de LB DN chez les patients lupiques. Chaque point représente un individu. **(B)** Exemple de représentation de la population BTLA<sup>low</sup> parmi les LB DN par cytométrie en flux. **(C)** Distribution de la population BTLA<sup>low</sup> parmi les LB DN chez les individus sains (ronds vides,  $n=32$ ) et les patients lupiques (ronds pleins,  $n=48$ ). **(D)** Corrélation entre le pourcentage de cellules BTLA<sup>low</sup> parmi les LB DN et le pourcentage de LB DN chez les patients lupiques. Chaque point représente un individu. \* $p<0,05$  ; \*\* $p<0,01$ , Mann Whitney test,  $r$  : coefficient de corrélation de Spearman.

De plus, nous avons mis en évidence parmi la population de LB DN, une population jamais décrite auparavant exprimant peu ou pas BTLA ( $BTLA^{low}$ ) (**Figure 27B**), expliquant la diminution globale de l'expression de BTLA à la surface des LB DN chez les patients lupiques. Cette population est également observée chez les individus sains mais elle est très peu représentée par rapport aux patients lupiques ( $7,35\% \pm 0,98$  pour les HC vs  $18,27\% \pm 2,73$  pour les patients LES) (**Figure 27C**). La fréquence de la population de LB DN  $BTLA^{low}$  corrèle avec à la fréquence des LB DN ( $p= 0,0095$  ;  $r= 0,3705$ ) suggérant que la perte de l'expression de BTLA pourrait favoriser la prolifération de ces cellules (**Figure 27D**), et est particulièrement élevée chez les patients présentant des auto-Ac anti-ADNdb circulants ( $14,71\% \pm 4,34$  pour les SLE @ADN<sup>-</sup> vs  $21,28\% \pm 3,42$  pour les SLE @ADN<sup>+</sup>,  $p<0,001$ ) (**Figure 28A**). Toutefois, l'augmentation de leur fréquence n'est pas associée au développement d'une protéinurie chez les patients (**Figure 28B**).



**Figure 28.** La population  $BTLA^{low}$  est particulièrement retrouvée chez les patients présentant des auto-anticorps anti-ADN. **(A)** Distribution de la population  $BTLA^{low}$  parmi les LB DN chez les individus sains (HC,  $n= 32$ ), les patients présentant des auto-anticorps anti-ADN (@ADN<sup>+</sup>,  $n= 24$ ) ou non (@ADN<sup>-</sup>,  $n= 21$ ). **(B)** Distribution de la population  $BTLA^{low}$  parmi les LB DN chez les individus sains (HC,  $n= 32$ ), les patients présentant une protéinurie (prot<sup>-</sup>,  $n= 11$ ) ou non (prot<sup>+</sup>,  $n= 34$ ). Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen ou MFI moyenne  $\pm$  SEM \* $p<0,05$  ; \*\* $p<0,01$  ; \*\*\* $p<0,001$ , Mann Whitney test.

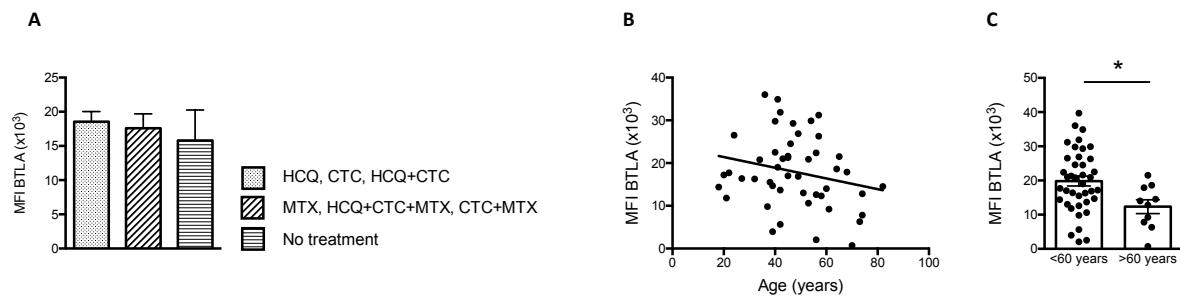
Afin que les traitements prescrits aux patients n'interfèrent pas avec nos résultats, nous avons sélectionné les patients avant le début de l'étude. En effet, aucun patient inclus dans notre cohorte n'était traité par des agents immunosupresseurs ou des biothérapies et les seuls traitements autorisés pour permettre l'inclusion dans notre étude étaient le méthotrexate, l'hydroxychloroquine et/ou les corticostéroïdes à des doses inférieures à 15 mg/jour. Toutefois, nous avons vérifié que les traitements prescrits aux patients n'influencent pas nos résultats. Les caractéristiques des patients inclus dans l'analyse de l'expression de BTLA par les LB sont résumées dans le **tableau 2**.

	<b>Patients LES (n=48)</b>
<b>Sexe (F/H)</b>	42/6
<b>Age (années), médiane (intervalle)</b>	45,5 (18-82)
<b>SLEDAI, médiane (intervalle, ou %)</b>	4 (0-23)
Pas d'activité (SLEDAI = 0)	13 (27%)
Faible activité (SLEDAI 1-5)	16 (33%)
Activité moyenne (SLEDAI 6-10)	11 (23%)
Forte activité (SLEDAI 11-19)	4 (8%)
Très forte activité (SLEDAI ≥ 20)	4 (8%)
<b>Manifestations cliniques*</b>	
Cutannée	9
Arthrite	16
Pleurisie/Péricardite	5
Néphrite	7
<b>Caractéristiques biologiques</b>	
Anti-ADNdb**	23
Faible taux de complément	19
Protéinurie	11
<b>Caractéristiques hématologiques</b>	
Anémie	12
Lymphopénie	11
Leucopénie	5
Thrombocytopénie	5
Hématurie	6
<b>Traitements, médiane (intervalle)</b>	
Aucun	6
CS <10mg/day <i>Médiane (intervalle)</i>	18 5 (2,5-7,5)
CS ≥10 mg/day <i>Médiane (intervalle)</i>	7 10 (10-15)
HCQ (mg/day) <i>Médiane (intervalle)</i>	29 400 (200-600)
MTX (mg/week) <i>Médiane (intervalle)</i>	10 20 (10-25)

**Tableau 2. Caractéristiques cliniques et biologiques des patients lupiques inclus dans notre étude.** F, femme ; H, homme ; SLEDAI, SLE disease activity index ; CS, corticostéroïdes ; HCQ, hydroxychloroquine ; MTX, méthotrexate. \*au moment du prélèvement sanguin \*\* considéré positif si le titre mesuré par ELISA est ≥50 IU/ml.

Nous avons confirmé que l'expression de BTLA sur les LB DN n'est pas influencée par les différents traitements reçus par les patients (**Figure 29A**). L'âge des patients n'est pas significativement corrélé avec l'expression de BTLA par les LB DN (**Figure 29B**), cependant,

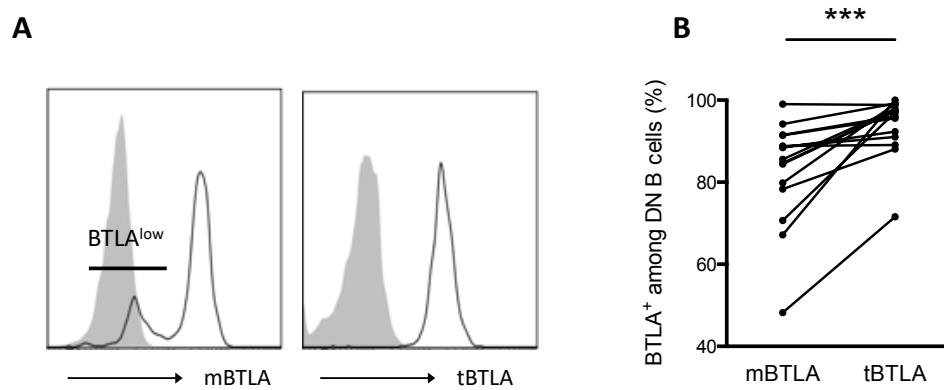
lorsque les patients sont séparés en deux groupes en fonction de leur âge, nous observons une diminution de l'expression de BTLA par les LB DN chez les individus âgés de plus de 60 ans ( $MFI = 12330 \pm 2010$  pour les patients âgés de plus de 60 ans vs  $MFI = 19820 \pm 1440$  pour les patients âgés de moins de 60 ans,  $p<0,05$ , **Figure 29C**).



**Figure 29.** L'expression de BTLA n'est pas influencée par les différents traitements ni par l'âge des patients. (A) Expression de BTLA par les LB DN chez les patients lupiques en fonction des traitements prescrits selon différentes classes : hydroxychloroquine (HCQ), corticostéroïdes (CTC) ou HCQ+CTC ( $n=28$ ), méthotrexate (MTX), HCQ+CTC+MTX ou CTC+MTX ( $n=10$ ), patients non traités (no treatment,  $n=7$ ). (B) Corrélation entre l'expression de BTLA à la surface des DN et l'âge des patients. (C) Expression de BTLA par les LB DN chez les patients lupiques âgés de moins de 60 ans ou de plus de 60 ans. Les résultats sont exprimés en MFI moyenne  $\pm$  SEM et chaque point représente un individu. \* $p<0,05$ , Mann Whitney test.

Pour résumer, nos résultats indiquent que l'expression de BTLA est diminuée à la surface des LB de patients lupiques, et particulièrement au niveau des LB mémoires DN. Cette diminution de l'expression de BTLA est due à la présence d'une population BTLA<sup>low</sup> parmi les LB DN, présente chez les individus sains, mais dont la fréquence est fortement augmentée chez les patients lupiques, notamment chez les patients présentant des auto-Ac anti-ADNdb. L'origine de cette population reste donc à déterminer et plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'absence d'expression de BTLA à la surface des LB DN BTLA<sup>low</sup>. En effet, ce défaut d'expression pourrait résulter d'un défaut transcriptionnel ou traductionnel. Nous avons dans un premier temps supposé que l'absence d'expression de BTLA pourrait être due à un défaut d'expression membranaire, et à une retenue de ce récepteur au niveau de compartiments intracellulaires. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des marquages intracellulaires par cytométrie en flux permettant d'évaluer la quantité totale de protéine (tBTLA, membranaire + intracellulaire) et pas seulement la quantité exprimée à la membrane (mBTLA, membranaire). Nos résultats montrent que la population BTLA<sup>low</sup> que nous observons lors du marquage membranaire, n'est pas retrouvée lors du marquage intracellulaire (**Figure 30A**), indiquant que la quantité totale de protéines n'est pas altérée dans les LB DN de patients

lupiques. En effet, pour la majorité des patients lupiques, la population de LB DN exprime BTLA uniformément (et de façon similaire à celle observée chez les HC, cf **Figure 24B**) après marquage intracellulaire (82% après marquage membranaire *vs* 94% après marquage intracellulaire) (**Figure 30B**).



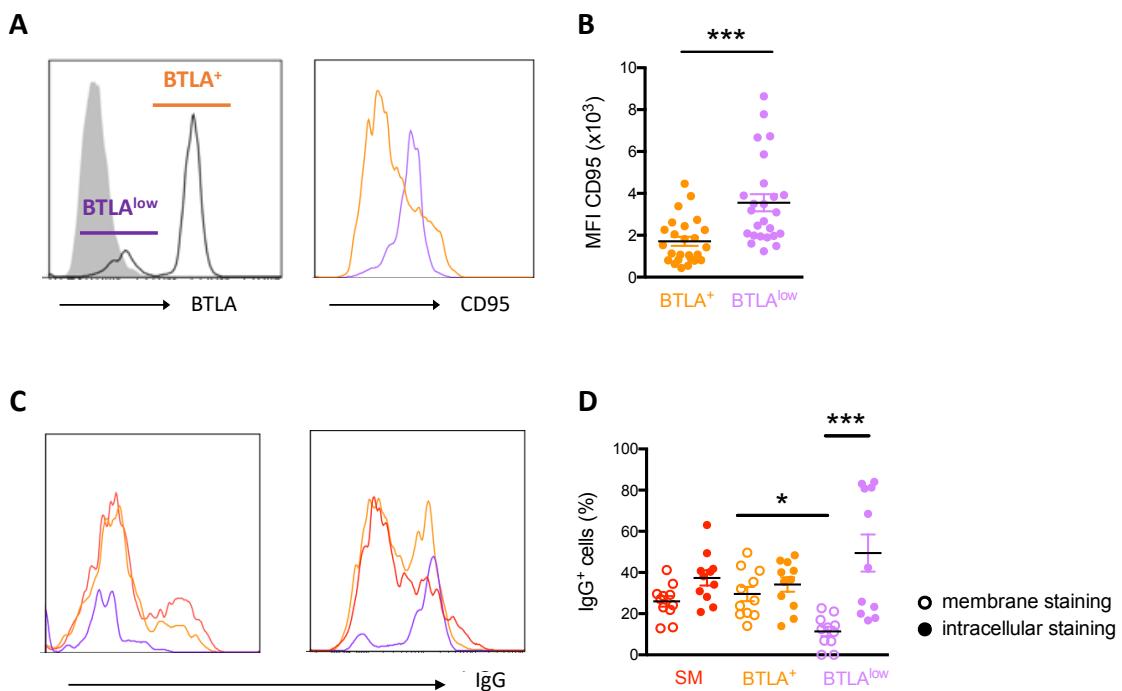
**Figure 30.** Le défaut d'expression de BTLA par les LB DN n'est pas dû à un défaut traductionnel. (A) Exemple de marquage membranaire (mBTLA, gauche,  $n=15$ ) et intracellulaire (mBTLA, droite,  $n=15$ ) de BTLA par les LB DN obtenu par cytométrie en flux. (B) Fréquence de cellules BTLA<sup>+</sup> parmi les LB DN après marquage membranaire ou intracellulaire par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen  $\pm$  SEM et chaque point représente un individu. \*\*\* $p<0,001$ , Wilcoxon test.

Nos résultats indiquent qu'un défaut traductionnel ne serait pas à l'origine de la population BTLA<sup>low</sup>, mais que cette faible expression de BTLA pourrait être due à un défaut d'adressage de BTLA à la membrane. Afin de vérifier cette hypothèse, la prochaine étape consistera à visualiser dans quel compartiment intracellulaire pourrait être retenu BTLA. En effet, nous pourrons étudier la colocalisation de BTLA dans des LB DN de patients lupiques, avec différents compartiments intracellulaires (appareil de golgi, lysosome, endosomes) par microscopie confocale. Ces analyses nous permettraient de comprendre le trafic intracellulaire de cette protéine. A l'heure actuelle, rien n'est connu quant à la régulation de l'expression de BTLA. En revanche, la régulation de l'expression du récepteur co-inhibiteur CTLA-4 est assez bien caractérisée. En effet, CTLA-4 est régulièrement recyclé par endocytose dans les LT. Dans des LT activés, CTLA-4 est transporté à la membrane grâce au complexe protéique TRIM/LAX/Rab8, est phosphorylé, et recrute des phosphatases qui induisent l'inhibition de la voie de signalisation du TCR. Suite à l'engagement de CTLA-4, cette protéine est déphosphorylée, internalisée et acheminée au niveau de compartiments intracellulaires tels que les endosomes ou les lysosomes où elle pourra être recyclée avant d'être de nouveau

exprimée à la membrane (**Schneider and Rudd, 2014**). Comprendre le (les) mécanisme(s) de régulation de BTLA représente une étape clé afin d'envisager son ciblage thérapeutique.

#### 4) Caractérisation phénotypique de la population LB DN BTLA<sup>low</sup>

Nous avons par la suite souhaité caractériser plus précisément la population de LB DN BTLA<sup>low</sup> à l'aide de différents marqueurs par cytométrie en flux (**tableau 1 cf p. 94**). En 2008, Jacobi *et al* ont montré une augmentation de la fréquence de la population de LB IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> CD95<sup>+</sup> chez les patients présentant un lupus actif. Le marqueur CD95 est un marqueur d'activation des LB, et la fréquence de la population DN CD95<sup>+</sup> est corrélée avec l'activité de la maladie (**Jacobi et al., 2008**). Nous avons donc analysé l'expression de CD95 par les cellules DN BTLA<sup>low</sup>. De façon intéressante, nous avons observé que l'expression de CD95 est augmentée à la surface des LB DN BTLA<sup>low</sup> par rapport aux LB DN BTLA<sup>+</sup> (MFI = 3554 ± 412 vs MFI = 1710 ± 216, p<0,001) (**Figure 31A et B**).



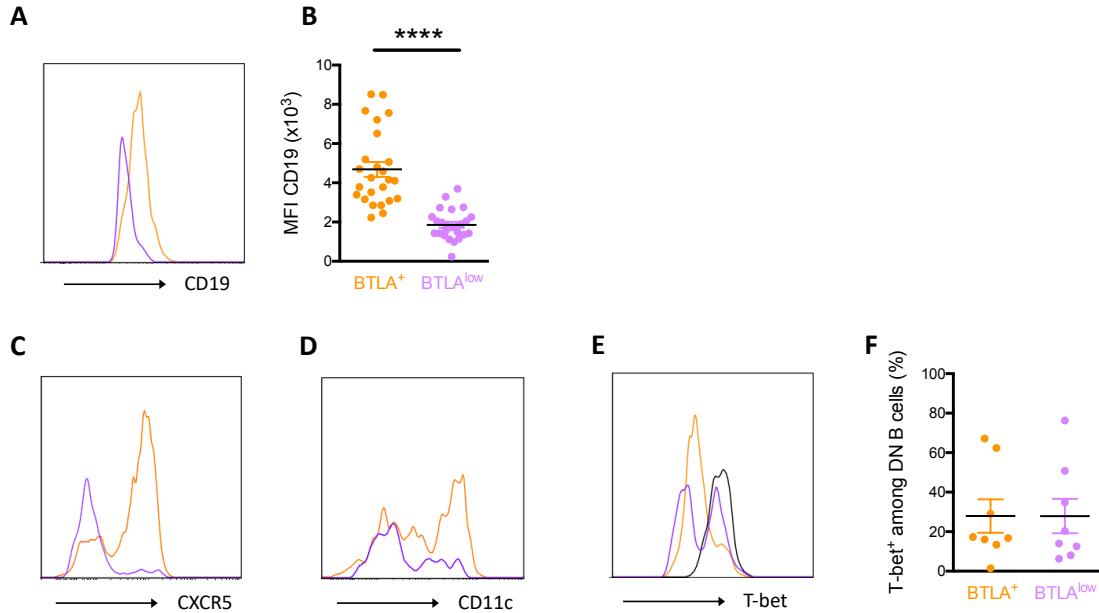
**Figure 31.** Les LB DN BTLA<sup>low</sup> ont un phénotype de cellules activées et expriment des IgG intracellulaires. Exemple de marquage (**A**) et expression (**B**) du marqueur CD95 à la surface des LB DN BTLA<sup>low</sup> (violet) et BTLA<sup>+</sup> (orange) par cytométrie en flux chez les patients lupiques (n= 25). (**C**) Exemple de marquage des IgG membranaires (gauche) et intracellulaires (droite) à la surface des LB DN BTLA<sup>low</sup>, BTLA<sup>+</sup>, et des LB SM (rouge). (**D**) Expression membranaire (ronds vides, n=11) et intracellulaire (ronds pleins, n=11) du marqueur IgG par les LB DN BTLA<sup>low</sup> et BTLA<sup>+</sup> et les LB SM (rouge) chez les patients lupiques. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen ou MFI moyenne ± SEM et chaque point représente un individu. \*p<0,05 ; \*\*\*p<0,001, Mann Whitney test.

Ce résultat montre que les DN BTLA<sup>low</sup> présentent un phénotype de cellules activées. Par ailleurs, les LB DN BTLA<sup>low</sup> expriment peu d'IgG à la membrane par rapport aux LB DN BTLA<sup>+</sup> ( $11,41\% \pm 2,28$  vs  $29,55\% \pm 3,48$ ). En revanche, après marquage intracellulaire permettant de déterminer à la fois l'expression membranaire et intracellulaire d'IgG (**Figure 31C**), nous avons remarqué que les LB DN BTLA<sup>low</sup> expriment de forts taux d'IgG ( $11,41\% \pm 2,28$  après marquage membranaire vs  $49,44\% \pm 9,00$  après marquage intracellulaire, **Figure 31D**) indiquant que ces cellules sont capables de produire des anticorps et de les stocker au niveau du cytoplasme.

Très récemment, une nouvelle population de LB DN exprimant le marqueur CD11c et le facteur de transcription T-bet a été décrite dans le LES. Ces cellules sont capables de se différencier en PL sécréteurs d'anticorps et sont donc décrites comme pathogènes dans le LES (**Wang et al., 2018**). En parallèle, deux populations de LB DN ont été mises en évidence dans le lupus et ont été nommées DN1 et DN2 (**Jenks et al., 2018**). Les LB DN2, dont la fréquence est augmentée dans le LES, expriment les marqueurs de cellules atypiques mémoires CD11c et T-bet, et n'expriment pas CXCR5, suggérant une origine extra-folliculaire de ces cellules. Cette population est hyper-réactive à une stimulation *via* le TLR7 et est capable de se différencier en PL sécréteurs d'auto-Ac (**Jenks et al., 2018**). En revanche, les LB DN1 n'expriment pas les marqueurs de cellules atypiques mémoires CD11c et T-bet mais expriment CXCR5 (**Jenks et al., 2018**). En nous appuyant sur ces études, nous avons cherché à savoir si les LB DN BTLA<sup>low</sup> partagent des caractéristiques de DN1 ou de DN2. Afin de définir si les LB DN BTLA<sup>low</sup> sont plus particulièrement appariées aux DN1 ou aux DN2, nous avons étudié l'expression de CD11c et de T-bet, mais aussi de deux marqueurs permettant de discriminer ces deux populations, CD19 et CXCR5. En effet, les DN1 expriment plus faiblement CD19 que les DN2 et expriment CXCR5 alors que les DN2 ne l'expriment pas (**Jenks et al., 2018**).

Nous avons pu observer que comme les LB DN1, les LB DN BTLA<sup>low</sup> expriment faiblement CD19 (**Figure 32A et B**). Cependant, comme les LB DN2, les LB DN BTLA<sup>low</sup> n'expriment pas CXCR5 (**Figure 32C**), leur conférant ainsi des caractéristiques des deux sous-populations de DN. Puisque les DN capables de sécréter des anticorps ont été décrits comme exprimant les marqueurs T-bet et CD11c (**Jenks et al., 2018; Wang et al., 2018**), nous nous sommes également intéressés à leur expression par les DN BTLA<sup>low</sup>. Contrairement aux DN2,

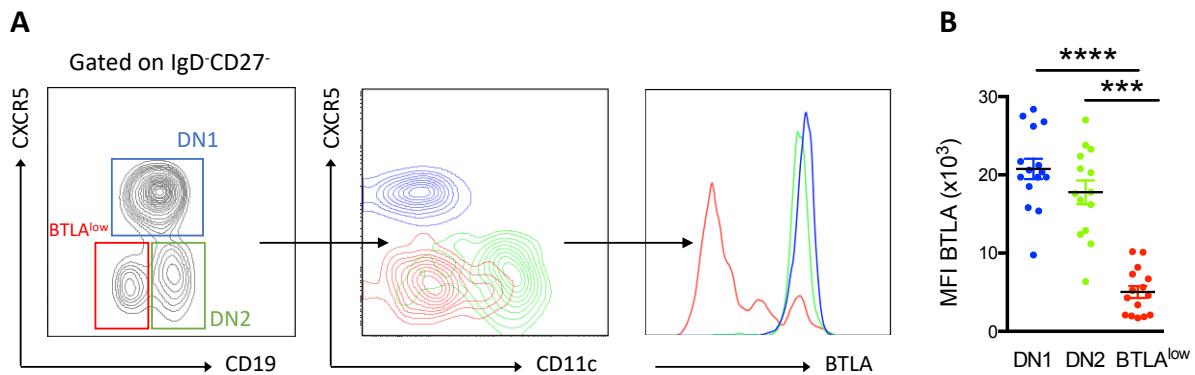
les LB DN BTLA<sup>low</sup> n'expriment pas uniformément CD11c (**Figure 32D**), et seule une partie de cette population exprime le facteur de transcription T-bet (**Figure 32E et F**). Ces cellules ne correspondent donc ni aux LB DN1 (car elles n'expriment pas CXCR5) ni aux LB DN2 (car elles expriment faiblement CD19, et présentent une expression variable de CD11c et de T-bet) décrites dans la littérature.



**Figure 32.** Les LB DN BTLA<sup>low</sup> ne semblent correspondre ni aux cellules DN1 ni aux cellules DN2 décrites dans la littérature. Exemple de marquage (**A**) et expression (**B**) du marqueur CD19 à la surface des LB DN BTLA<sup>low</sup> (violet) et BTLA<sup>+</sup> (orange) par cytométrie en flux ( $n=25$ ). Exemple de marquage des marqueurs CD11c (**C**), CXCR5 (**D**) et T-bet (**E**) par les LB DN BTLA<sup>low</sup>, BTLA<sup>+</sup>, et par les cellules atypiques mémoires (CD19<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>, noir) par cytométrie en flux. (**F**) Expression du marqueur T-bet par les LB DN BTLA<sup>low</sup> et BTLA<sup>+</sup> ( $n=8$ ). Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen ou MFI moyenne  $\pm$  SEM et chaque point représente un individu.  $****p<0,0001$ , Mann Whitney test.

Au regard de nos résultats, nous avons mis en évidence une nouvelle population de DN exprimant peu BTLA (**Figure 33A et B**), ce qui n'est pas le cas des DN1 et des DN2. De façon intéressante, une troisième population de DN a été décrite dans le cas de l'infection au SARS-CoV-2 très récemment. Cette population appelée DN3, est caractérisée par l'absence d'expression de CD21 et de CD11c (**Sosa-Hernández et al., 2020; Woodruff et al., 2020**). La fréquence de cette population est augmentée chez les patients infectés par rapport aux individus sains (**Sosa-Hernández et al., 2020**) et les DN3 semblent impliquées dans une réponse extra-folliculaire (**Woodruff et al., 2020**). La population BTLA<sup>low</sup> que nous avons mis

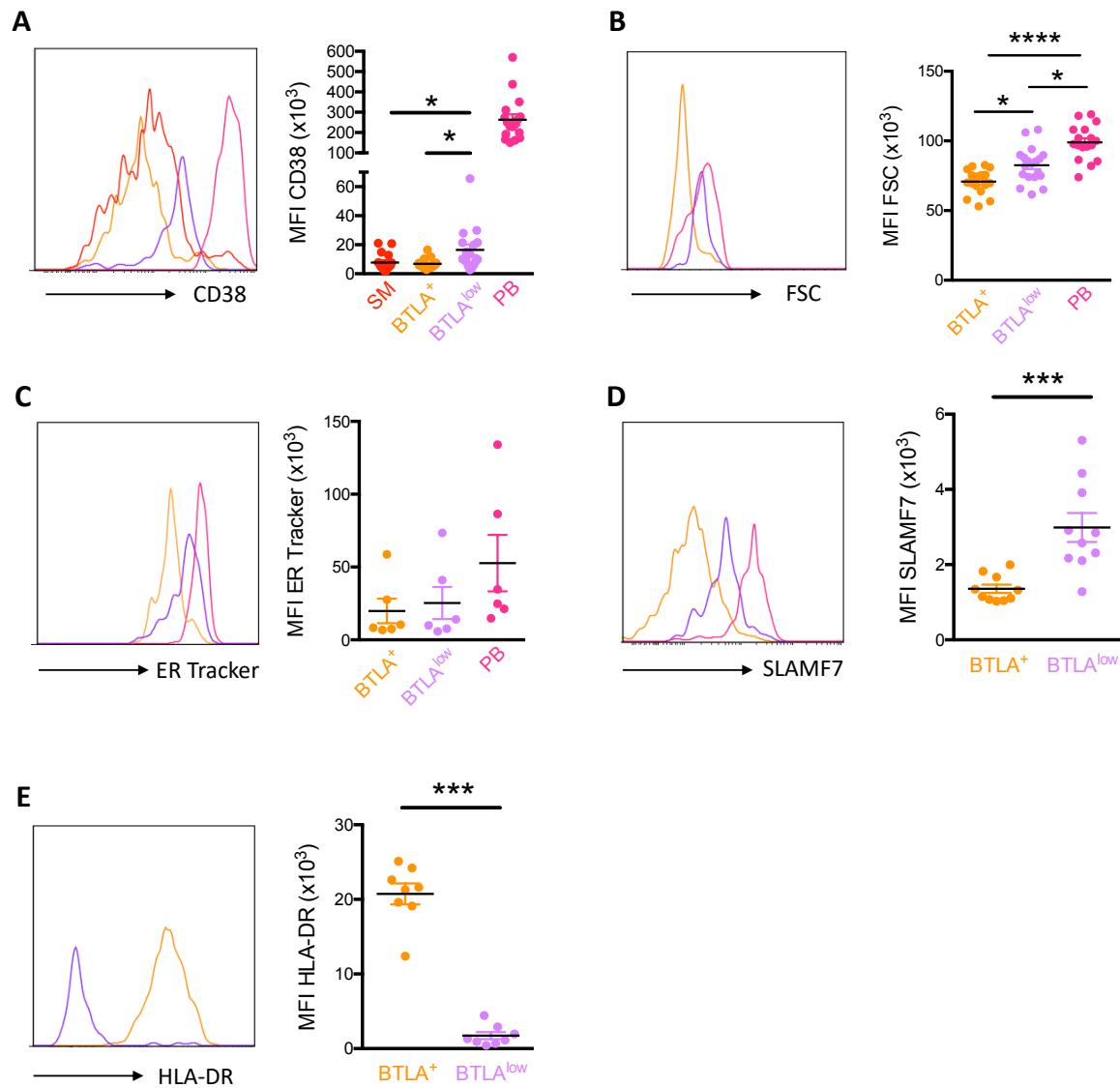
en évidence et caractérisée par une expression faible de BTLA pourrait correspondre à cette nouvelle population de DN décrite très récemment.



**Figure 33.** L'expression de BTLA est faible à la surface des DN  $CD19^{int}CXCR5^{-}CD11c^{-}int$ . (A) Exemple de marquage et expression de BTLA par les sous-populations DN1 (bleu), DN2 (vert) et BTLA<sup>low</sup> (rouge discriminées grâce aux marqueurs CD19, CXCR5 et CD11c) par cytométrie en flux. (B) Expression de BTLA par les sous-populations de DN ( $n=15$ ). Les résultats sont exprimés en MFI moyenne  $\pm$  SEM et chaque point représente un individu. \*\*\* $p<0,001$ ; \*\*\*\* $p<0,0001$ , Mann Whitney test.

Afin de mieux caractériser la population de LB DN BTLA<sup>low</sup> et surtout de définir si elle s'apparente à une population sécrétrice d'anticorps, nous avons évalué l'expression d'autres marqueurs par cytométrie en flux (tableau 1, cf p. 94). Nous avons montré que les DN BTLA<sup>low</sup> expriment plus fortement le marqueur CD38 (caractéristique des PB) que les DN BTLA<sup>+</sup> et les LB SM, bien que le niveau d'expression de ce marqueur soit plus faible à la surface des DN BTLA<sup>low</sup> qu'à la surface des PB (MFI =  $16470 \pm 3652$  pour les DN BTLA<sup>low</sup> vs  $6827 \pm 806$  pour les DN BTLA<sup>+</sup> vs  $263500 \pm 26240$  pour les PL) (Figure 34A). Comme indiqué précédemment, les LB DN BTLA<sup>low</sup> expriment peu d'IgG en surface, mais expriment des IgG intracellulaires (Figure 31D). De plus, ces cellules ont une taille plus importante que les cellules DN BTLA<sup>+</sup>, qui se rapproche de celle des PL (Figure 34B), suggérant un stade de différenciation et d'activation plus avancé que celui des DN BTLA<sup>+</sup>. De même, nos résultats semblent indiquer que les DN BTLA<sup>low</sup> présentent un réticulum endoplasmique plus étendu que les DN BTLA<sup>+</sup>, même si les résultats ne sont pas significativement différents (Figure 34C). Nous avons également étudié l'expression du marqueur SLAMF7, décrit comme marqueur des PL, et nous avons observé que les LB DN BTLA<sup>low</sup> expriment plus fortement ce marqueur que les LB DN BTLA<sup>+</sup> (MFI =  $2986 \pm 385$  vs  $1357 \pm 111$ ) (Figure 34D). De façon intéressante, nous avons montré que les DN BTLA<sup>low</sup> n'expriment pas la molécule du CMH de classe II HLA-DR (Figure 34E) dont l'expression

est absente à la surface des PB. L'ensemble de ces résultats nous indique que les LB BTLA<sup>low</sup> partagent de nombreuses caractéristiques avec des cellules sécrétrices d'anticorps.

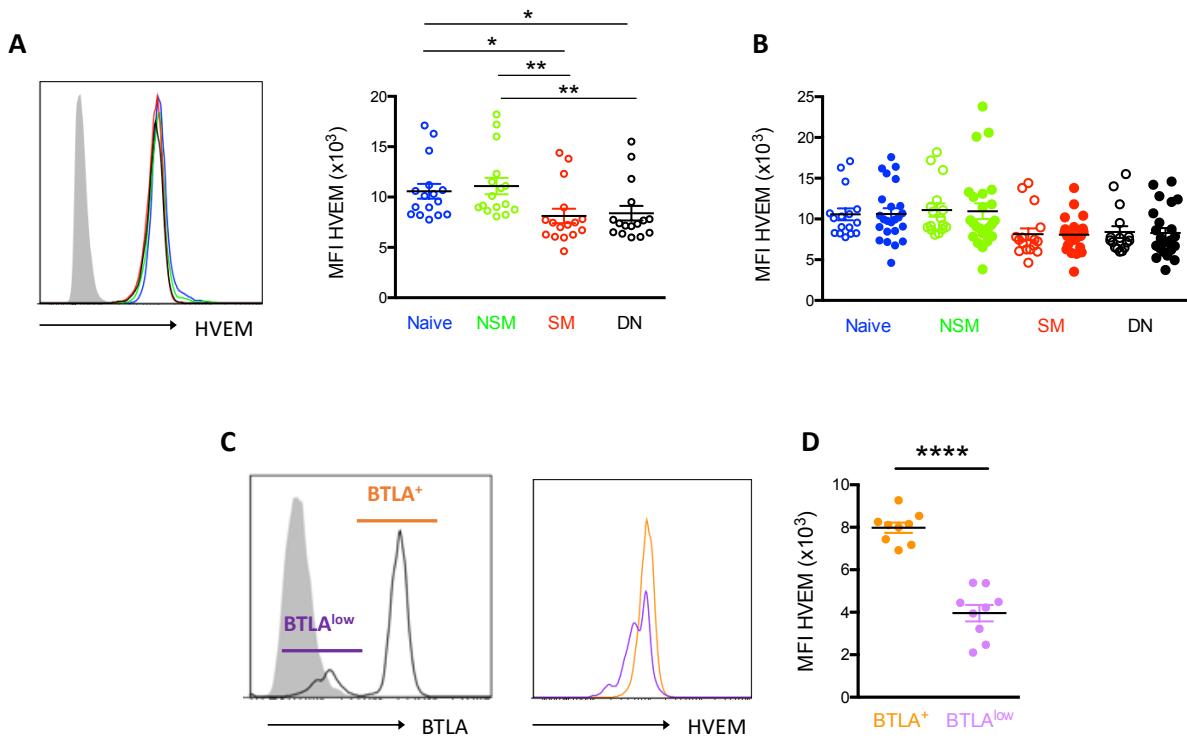


**Figure 34. Les cellules DN BTLA<sup>low</sup> présentent des caractéristiques de cellules sécrétrices d'anticorps.** (A) Exemple de marquage (à gauche) et expression du marqueur CD38 (à droite) à la surface des LB SM (rouge), DN BTLA<sup>+</sup> (orange), DN BTLA<sup>low</sup> (violet), et des PB (rose) par cytométrie en flux ( $n=17$ ). (B) Exemple de marquage (à gauche) et quantification de la taille (à droite) des cellules DN BTLA<sup>+</sup> (orange), DN BTLA<sup>low</sup> (violet), et des PB (rose) par cytométrie en flux grâce à l'indice de lumière diffractée (FSC) ( $n=19$ ). (C) Exemple de marquage (à gauche) et quantification de la taille du réticulum endoplasmique (à droite) des LB DN BTLA<sup>+</sup> (orange), DN BTLA<sup>low</sup> (violet), et des PB (rose) par cytométrie en flux ( $n=5$ ). (D) Exemple de marquage (à gauche) et expression du marqueur SLAMF7 (à droite) à la surface LB DN BTLA<sup>+</sup> (orange), DN BTLA<sup>low</sup> (violet), et des PB (rose) par cytométrie en flux ( $n=10$ ). (E) Exemple de marquage (à gauche) et expression du marqueur HLA-DR (à droite) à la surface des LB DN BTLA<sup>+</sup> (orange) et DN BTLA<sup>low</sup> (violet) par cytométrie en flux ( $n=8$ ). Les résultats sont exprimés MFI moyenne  $\pm$  SEM et chaque point représente un individu. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,001$ ; \*\*\* $p<0,0001$ , Mann-Whitney test.

En résumé, nous avons mis en évidence une nouvelle population de LB DN exprimant peu ou pas BTLA, nommée BTLA<sup>low</sup>. Cette population présente un profil d'expression de marqueurs à la fois typique des LB DN1 et des LB DN2, faisant d'elle une nouvelle sous-population de DN qui présente des caractéristiques de cellules sécrétrices d'anticorps. L'absence d'expression de CXCR5 par les DN BTLA<sup>low</sup> rapproche notre population d'une population de LB DN décrite par Murphy *et al* (**Murphy et al., 2019**). En effet, cette équipe a décrit une population de LB DN CXCR5<sup>-</sup> présentant des caractéristiques de cellules pré-plasmocytaires, semblable aux cellules DN2 décrites par Jenks *et al* (**Jenks et al., 2018**), mais qui diffère des DN2 de par une faible expression de CD19. Ces cellules DN CXCR5<sup>-</sup> semblent donc présenter des similarités avec les DN BTLA<sup>low</sup> que nous décrivons, à savoir une absence d'expression de CXCR5 et de HLA-DR, une faible expression de CD19 et d'autres récepteurs inhibiteurs tels que CD32 ou CD22 (**Murphy et al., 2019**). Une caractérisation plus fine des LB DN BTLA<sup>low</sup> reste à réaliser à l'aide d'analyses fonctionnelles afin de définir si ces cellules sont réellement en capacité de produire des anticorps, et ce, dans quel contexte.

## 5) Expression de HVEM par les LB

En parallèle de l'étude de l'expression de BTLA par les LB, nous avons évalué l'expression de son ligand, HVEM. Chez l'individu sain, nous avons observé que HVEM est plus exprimé par les LB naïfs (MFI = 10570 ± 731) et les NSM (MFI = 11090 ± 814) que par les LB SM (MFI = 8131 ± 716) et les LB DN (MFI = 8399 ± 719) (**Figure 35A**). Contrairement à ce que nous avons observé pour BTLA, l'expression de HVEM sur les différentes sous-populations de LB est similaire entre les individus sains et les patients lupiques (**Figure 35B**). Toujours dans le but de caractériser notre population de LB DN BTLA<sup>low</sup>, nous nous sommes intéressés à l'expression de HVEM sur cette population, et nous avons observé que l'expression de HVEM est diminuée à la surface des cellules DN BTLA<sup>low</sup> par rapport aux LB DN BTLA<sup>+</sup> (MFI = 3962 ± 388 vs MFI = 7982 ± 241, p<0,0001, **Figure 35C et D**).



**Figure 35.** L'expression de HVEM est similaire à la surface des LB d'individus sains et de patients lupiques. **(A)** Exemple de marquage (à gauche) et expression (à droite) de HVEM à la surface des sous-populations de LB chez l'individu sain ( $n=16$ ). **(B)** Comparaison de l'expression de HVEM par les sous-populations de LB chez les individus sains ( $n=16$ ) et les patients lupiques ( $n=24$ ). **(C)** Exemple de marquage de HVEM à la surface des LB DN BTLA<sup>low</sup> (violet) et BTLA<sup>+</sup> (orange) par cytométrie en flux. **(D)** Expression de HVEM par les LB DN BTLA<sup>low</sup> et BTLA<sup>+</sup> de patients lupiques ( $n=9$ ). Les résultats sont exprimés en MFI moyenne  $\pm$  SEM et chaque point représente un individu. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,0001$ , Mann Whitney ou Kriskal-Wallis test.

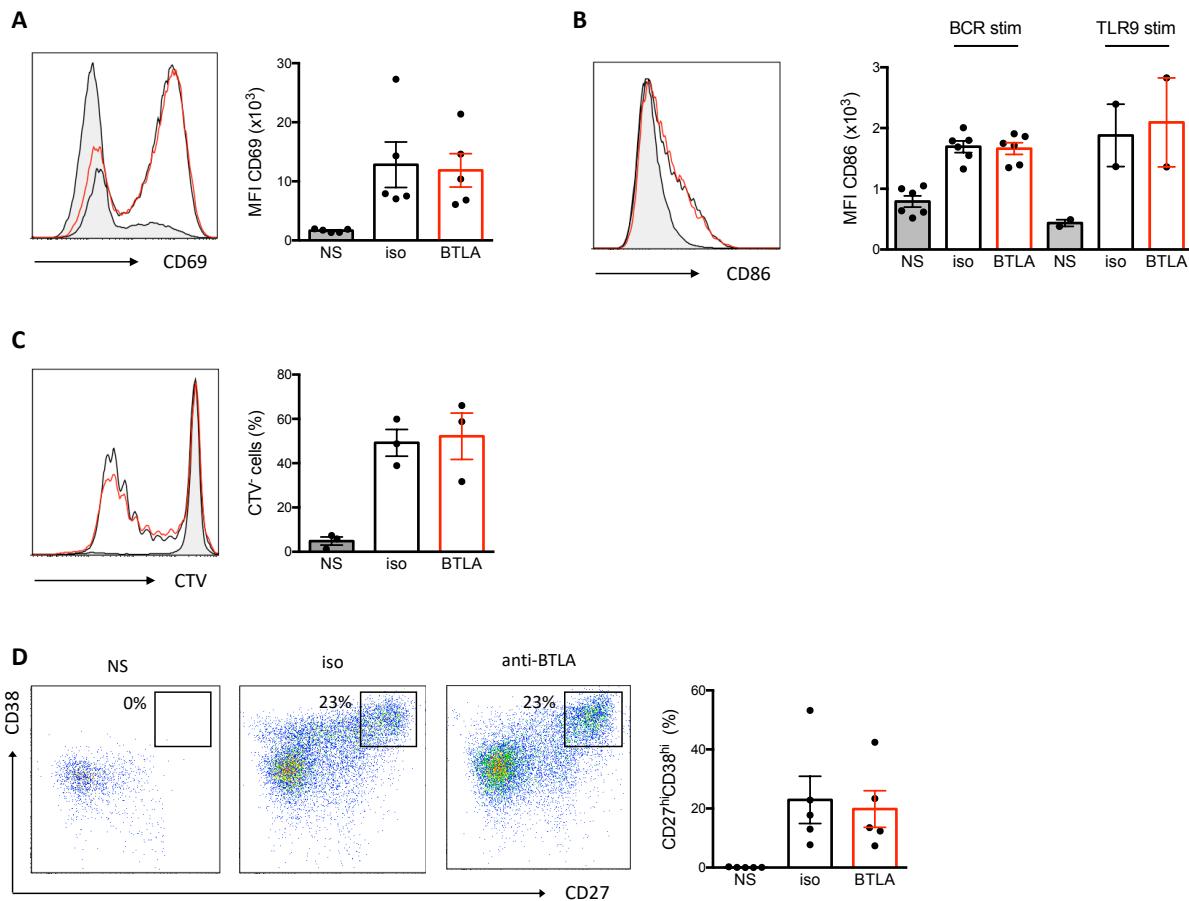
## 6) Fonctionnalité de BTLA dans les LB d'individus sains

Au sein du laboratoire, nous avons démontré un défaut de la voie de signalisation de BTLA dans les LT CD4<sup>+</sup> de patients lupiques (Sawaf et al., 2018). Nous avons donc souhaité définir si les LB de patients lupiques présentaient également un défaut de fonctionnalité de BTLA. Chez l'Homme, il a été montré en 2009 à l'aide d'une lignée cellulaire, que l'interaction entre BTLA et HVEM atténue la prolifération des LB humains après recrutement de la phosphatase SHP-1 (Vendel et al., 2009). L'inhibition de l'activation de LB primaires humains a été étudiée en 2013. En effet, l'engagement de BTLA par son ligand HVEM induit une inhibition de la prolifération et de la production de cytokines par les LB après stimulation du TLR9 par du CpG (Thibault et al., 2013). Nous avons donc cherché à mettre au point les conditions optimales d'inhibition de l'activation des LB à l'aide d'un anticorps agoniste de BTLA (clone MIH26, utilisé dans notre étude concernant la fonctionnalité de BTLA dans les LT

CD4<sup>+</sup>, (Sawaf et al., 2018)) chez l'individu sain afin d'étudier par la suite la fonctionnalité de ce récepteur chez les patients lupiques.

Pour cela, nous avons stimulé des LB humains purifiés avec un anticorps anti-IgM/IgG/IgA, un anticorps anti-CD40 et de l'IL-21 recombinante, ou par du CpG, en présence de l'anticorps agoniste de BTLA ou de son isotype. Nous avons stimulé les cellules de 1 à 7 jours afin d'étudier l'activation et la prolifération cellulaire, ainsi que la différenciation des LB en PL. Malheureusement, nous n'avons pas pu mettre en évidence une inhibition de l'activation, de la prolifération ou de la différenciation en PL après engagement de BTLA par un anticorps agoniste (au contraire des résultats obtenus par d'autres équipes mais à l'aide d'une protéine recombinante HVEM) dans ces conditions expérimentales. En effet, l'expression des marqueurs d'activation CD69 (MFI = 1186 ± 28 en présence de l'anticorps anti-BTLA et MFI = 1281 ± 39 en présence de l'anticorps isotypique) et CD86 (MFI = 1662 ± 9,6 en présence de l'anticorps anti-BTLA et MFI = 1693 ± 9,5 en présence de l'anticorps isotypique après stimulation du BCR) est similaire en présence ou en absence de l'anticorps agoniste de BTLA, que ce soit après une stimulation du BCR, ou après une stimulation du TLR9 (**Figure 36A et B**). Le pourcentage de cellules ayant prolifié (CTV<sup>+</sup>) est également comparable en présence ou non de l'anticorps anti-BTLA (52,2% ± 10,4 pour l'anticorps anti-BTLA et 49,2% ± 6,1 pour l'isotype) (**Figure 36C**). Afin de visualiser les PL, nous avons étudié l'expression des marqueurs CD27 et CD38 à la surface des LB après 7 jours d'activation. De façon analogue à l'activation ou à la prolifération, le pourcentage de PL (CD27<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>) est comparable en présence de l'anticorps agoniste de BTLA ou en présence d'un anticorps isotypique (19,8% ± 6,2 pour l'anticorps anti- BTLA et 22,9% ± 7,9 pour l'isotype) (**Figure 36D**).

En résumé, nous n'avons pas mis en évidence d'inhibition de l'activation des LB après engagement de BTLA par un anticorps agoniste, que ce soit après une stimulation du BCR (anticorps anti-IgM/IgG/IgA), ou une stimulation du TLR9 (CpG). Ces travaux réalisés en 2018, ont donc donné des résultats décevants. Toutefois, ils sont cohérents avec les travaux de Werner *et al* qui ont publié en 2019 que l'engagement de BTLA par ce même anticorps agoniste de BTLA n'induisait pas d'inhibition de la prolifération des LB après une stimulation du TLR9 (**Werner et al., 2019**).

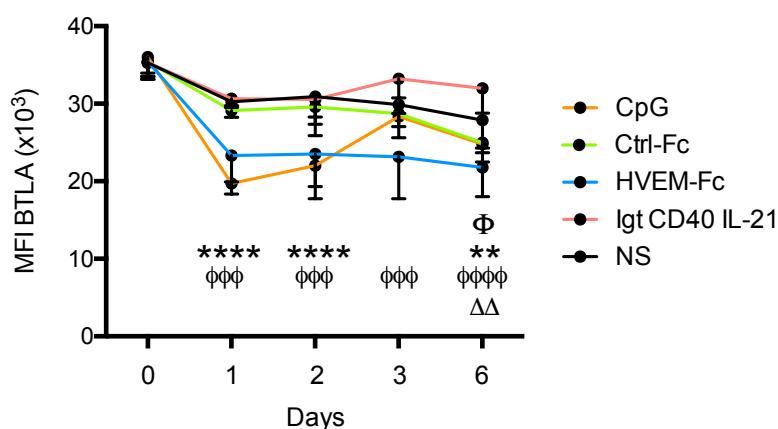


**Figure 36. Un anticorps agoniste de BTLA n'induit pas d'inhibition de l'activation des LB.** Expression des marqueurs d'activation CD69 (A) et CD86 (B) après 24h et 48h de stimulation des LB respectivement avec un anticorps anti-IgM+IgG+IgA (Jackson Laboratories, 10 µg/ml), un anticorps anti-CD40 (BD, 5 µg/ml) et de l'IL-21 recombinante (Miltenyi, 100 ng/ml), ou du CpG (Invivogen, 1 µg/ml), en présence d'un anticorps agoniste de BTLA (clone MIH26, Biolegend, BTLA) adsorbé à 20 µg/ml au fond des puits, ou d'un contrôle isotypique (IgG2ak, Biolegend, iso) (n=2-6). (C) Étude de la prolifération des LB marqués au CTV après 5 jours de stimulation (anti-IgM+IgG+IgA, anti-CD40, IL-21) en présence (BTLA) ou non (iso) d'un anticorps agoniste de BTLA (n=3). (D) Différenciation des LB en plasmocytes (CD27<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>) après 7 jours de stimulation (anti-IgM+IgG+IgA, anti-CD40, IL-21) en présence (BTLA) ou non (iso) d'un anticorps agoniste de BTLA (n=5). Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen ou MFI moyenne ± SEM et chaque point représente une expérience indépendante. NS = non stimulées

#### IV) Régulation de l'expression de BTLA

Comme discuté précédemment, comprendre la régulation de BTLA est important pour pouvoir envisager cette protéine comme cible thérapeutique. Pour amorcer l'étude de la régulation de l'expression de BTLA à la surface des LB notamment, nous avons étudier l'impact de la stimulation des LB sur son expression chez l'individu sain. Nous avons observé une diminution de l'expression de BTLA à la surface des LB un ou deux jours après stimulation du TLR9 par du CpG, puis un retour à un niveau d'expression basal après 3 jours de stimulation.

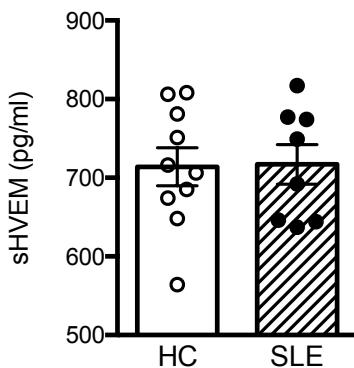
Suite à une stimulation du BCR à l'aide d'un anticorps anti-IgM/IgG/IgA supplémenté d'un anticorps anti-CD40 et d'IL-21 recombinante, l'expression de BTLA reste stable à la surface des LB. De façon intéressante, et comme montré précédemment par Thibult *et al.* (**Thibult et al., 2013**), l'incubation des LB en présence du ligand de BTLA, HVEM, a entraîné une diminution significative de l'expression de BTLA qui reste stable au cours du temps (à la différence de la condition CpG). Ce résultat suggère que l'expression de BTLA à la surface des LB pourrait être régulée par l'interaction avec son ligand (**Figure 37**).



**Figure 37. Cinétique d'expression de BTLA par les LB après stimulation.** Les LB ont été stimulés plusieurs jours par un anticorps anti-IgM+IgG+IgA (Jackson Laboratories, 10 µg/ml, IgT), un anticorps anti-CD40 (BD, 5 µg/ml) et de l'IL-21 recombinante (Miltenyi, 100 ng/ml), ou du CpG (Invivogen, 1 µg/ml), ou incubés en présence d'une protéine HVEM recombinante (Biolegend, HVEM-Fc, 10 µg/ml) ou d'une protéine recombinante contrôle (IgG1-Fc, R&D Systems, Ctrl-Fc, 10 µg/ml). \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; \*\*\*\*p<0,0001. Two-way ANOVA test. Les statistiques sont données par rapport au temps 0. n=4-5 \* : CpG ; Δ : Ctrl-Fc ; φ : HVEM-Fc ; ϕ : NS.

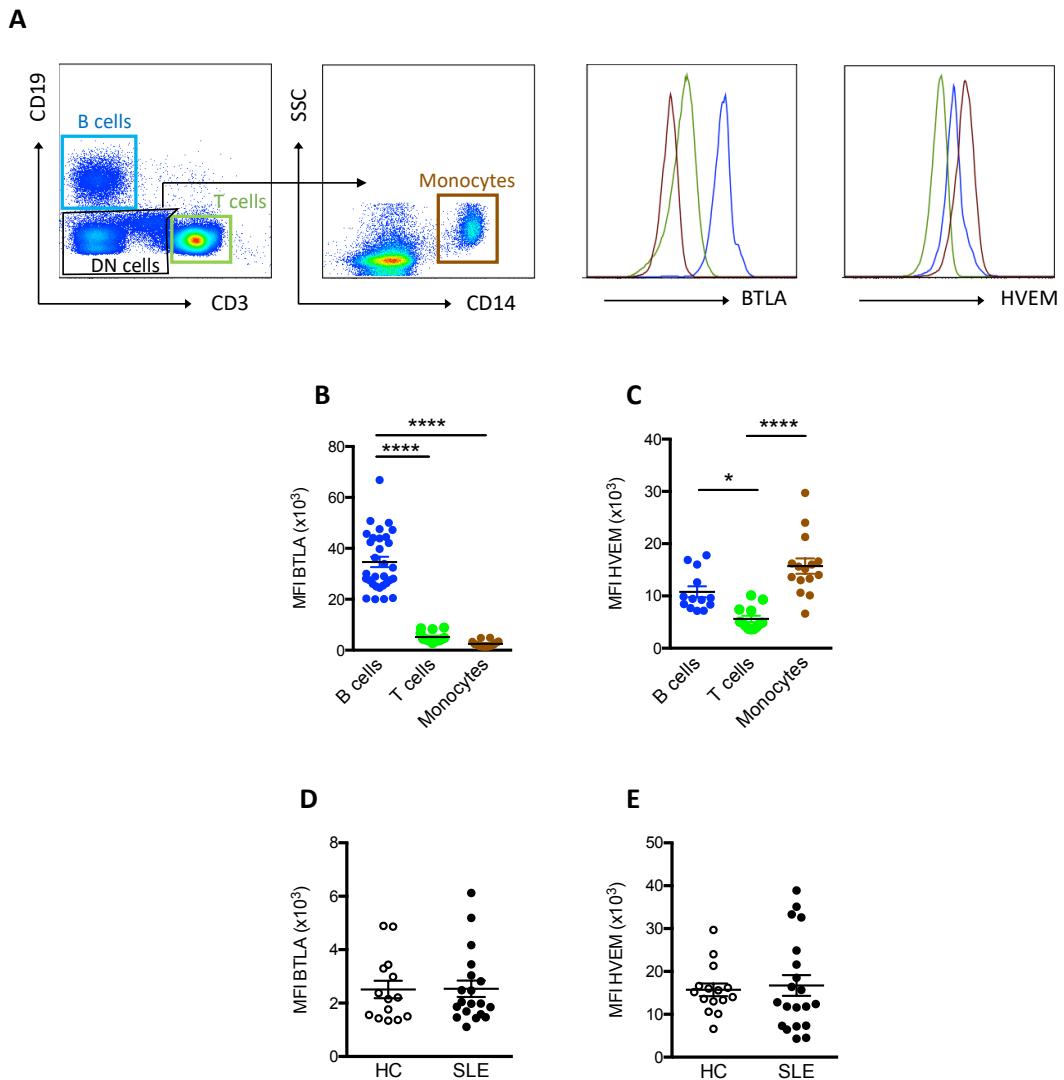
La régulation de l'expression de BTLA par son ligand HVEM pourrait être médiée par différents mécanismes : *via* une interaction en *cis* entre les deux molécules à la surface de la même cellule, *via* une interaction en *trans* à la surface de différentes cellules, ou *via* la forme soluble du ligand déjà décrite dans la littérature. En effet, des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde présentent des taux élevés de HVEM soluble dans leur sérum (**Jung et al., 2003**). Afin d'évaluer un éventuel impact de son ligand sur l'expression de BTLA, nous avons dosé la quantité de HVEM soluble dans le sérum d'individus sains et de patients lupiques par ELISA. Nous n'avons pas observé de différence significative lors de l'analyse de ces 8 échantillons de patients lupiques par rapport aux individus sains (**Figure 38**). Cependant, il est important de noter que seuls 3 patients sur 8 présentaient une pathologie active. Il sera donc nécessaire de

compléter cette étude sur un nombre plus important de patients, et notamment des patients présentant un lupus actif.



**Figure 38.** La concentration en HVEM soluble est identique chez les individus sains et les patients lupiques. La concentration en HVEM soluble a été mesurée dans le sérum d'individus sains (barre blanche, n=10) ou de patients lupiques (barre hachurée, n=8) grâce au kit ELISA Human HVEM/TNFRS14 (R&D Systems). Chaque point représente un individu.

Afin d'évaluer l'implication de HVEM dans la régulation de BTLA via une interaction en *trans* entre ces deux molécules, nous avons également évalué leur expression à la surface des différents partenaires. En effet, les LT CD4<sup>+</sup> exprimant HVEM, interagissent avec les LB afin d'induire leur activation et leur différenciation. Comme montré dans la **publication n°1**, l'expression de HVEM est semblable à la surface des LT CD4<sup>+</sup> d'individus sains et de patients lupiques, suggérant que la diminution de l'expression de BTLA à la surface des LB observée chez les patients lupiques n'est pas due à une plus forte expression de HVEM par les LT CD4<sup>+</sup>. Par ailleurs, de par l'interaction des monocytes avec les LT CD4<sup>+</sup>, nous nous sommes également intéressés à l'expression de BTLA et HVEM par ces cellules. Chez l'individu sain, BTLA est plus faiblement exprimé par les monocytes que par les LB et les LT (**Figure 39A et B**), tandis que l'expression de HVEM est plus élevée à la surface des monocytes (**Figure 39A et C**) par rapport aux LB et aux LT. Toutefois, nous n'avons observé aucune différence d'expression de ces deux récepteurs à la surface des monocytes entre les individus sains et les patients lupiques (**Figure 39D et E**). A ce jour, l'interaction entre HVEM à la surface des monocytes et BTLA à la surface des LT effecteurs ou des Tregs n'est pas connue mais serait intéressante à étudier en réalisant des co-cultures et en bloquant par exemple, l'expression de HVEM par les monocytes.

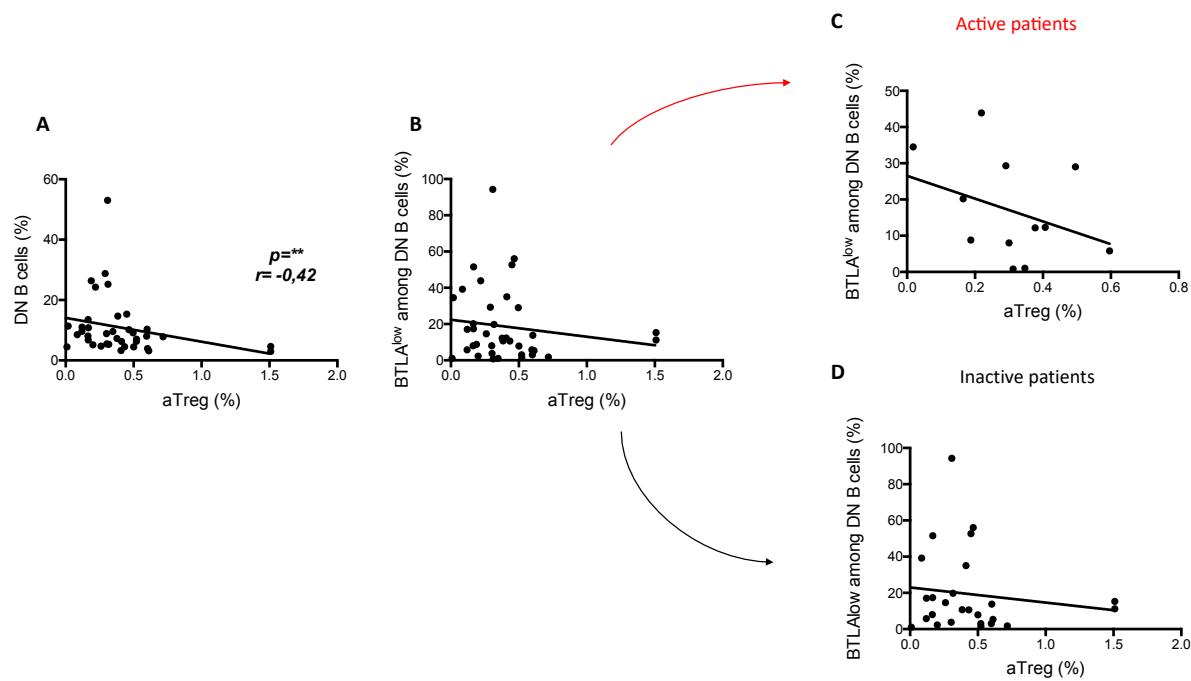


**Figure 39.** HVEM et BTLA sont exprimés de façon similaire par les monocytes d'individus sains et de patients lupiques. Exemple de marquage (**A**) et expression de BTLA (**B**) et HVEM (**C**) par les LB CD19<sup>+</sup> (bleu), les LT CD3<sup>+</sup> (vert), et les monocytes CD14<sup>+</sup> (marron) par cytométrie en flux. Expression de BTLA (**D**) et HVEM (**E**) par les monocytes chez les individus sains (ronds vides, n= 14) et les patients lupiques (ronds pleins, n= 19).<sup>+</sup>. Les résultats sont exprimés en MFI moyenne ± SEM et chaque point représente un individu. \*p<0,05 ; \*\*\*p<0,0001, Mann-Whitney test.

## V) Conclusion

Au cours de ma thèse je me suis principalement intéressée à l'expression de BTLA à la surface des Tregs, des T<sub>FH</sub> (*cf publication n°1*) et des LB, trois populations cellulaires impliquées dans la pathogénèse lupique. Dans un premier temps, nous avons observé une augmentation de l'expression de BTLA à la surface des aTregs pouvant expliquer la diminution de la fréquence de ces cellules chez les patients. En revanche, nous avons montré que l'expression de BTLA à la surface des T<sub>FH</sub> est similaire entre les patients lupiques et les individus

sains. D'autre part, nous avons mis en évidence une diminution de l'expression de BTLA à la surface des LB DN pouvant rendre compte cette fois, de l'augmentation de la fréquence de ces cellules chez les patients lupiques. De façon intéressante, la fréquence des LB DN est inversement corrélée à la fréquence des aTregs chez les patients : les patients présentant une fréquence élevée de LB DN, sont ceux présentant une fréquence en aTregs inférieure à la moyenne observée chez les individus sains (**Figure 40A**). De plus, nous avons montré que la diminution de l'expression de BTLA à la surface des LB DN est liée à la présence d'une population de LB DN BTLA<sup>low</sup>. La corrélation entre la fréquence des cellules BTLA<sup>low</sup> et des aTregs n'est pas statistiquement significative lorsque l'on prend en compte l'ensemble de notre cohorte ( $p= 0,177$ ) (**Figure 40B**). Cependant, une corrélation inverse semble se dessiner particulièrement chez les patients présentant un lupus actif ( $p= 0,141$ ) (**Figure 40C**) par rapport aux patients présentant une faible activité de la maladie ( $p= 0,455$ ) (**Figure 40D**).



**Figure 40.** La fréquence des LB DN est corrélée à la fréquence des aTregs chez les patients lupiques. (A) Corrélation entre la fréquence des LB DN et la fréquence des aTregs chez les patients lupiques. Corrélation entre la fréquence de LB DN BTLA<sup>low</sup> chez les patients lupiques totaux (B), actifs (C), ou inactifs (D). Chaque point représente un individu. \*\* $p<0,01$ ,  $r$  = coefficient de corrélation de Spearman.

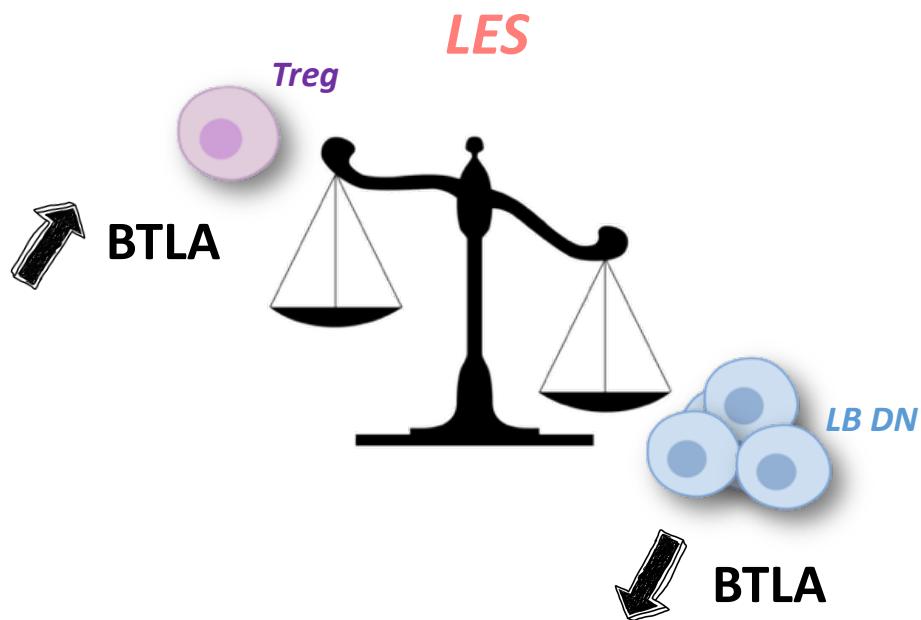
En résumé, nous avons observé que BTLA est différemment exprimé à la surface des sous-populations de LB chez l'individu sain comme chez les patients lupiques. L'expression de

BTLA est très élevée à la surface des LB naïfs puis diminue en fonction des stades de différenciation des LB, tout comme l'ont observé récemment Axelsson *et al.* (**Axelsson et al., 2020**). Par ailleurs, BTLA reste exprimé par les PL chez les individus sains comme chez les patients lupiques malgré le stade de différenciation avancé de ces cellules. Cette observation est particulièrement intéressante dans le cadre du ciblage thérapeutique de BTLA dans le LES. En effet, l'échec de certaines biothérapies dirigées contre des récepteurs tels que CD20 (rituximab) ou CD22 (epratuzumab) peut s'expliquer par le fait que les PL/PB n'expriment pas ces molécules. Les PL ne sont pas éliminés suite à ces traitements et continuent d'être pathogènes de par leur sécrétion d'auto-Ac.

De façon intéressante, nous avons mis en évidence une diminution de l'expression de BTLA à la surface des LB mémoires DN de patients lupiques dont la fréquence est augmentée chez ces patients. Cette diminution de l'expression de BTLA correspond notamment à la présence d'une population BTLA<sup>low</sup> parmi les LB DN. Après analyse phénotypique de ces cellules par cytométrie en flux, nous avons montré que cette population présente des caractéristiques de cellules sécrétrices d'anticorps et ne semble correspondre ni aux LB DN1 ni aux LB DN2 décrits dans la littérature, mais plutôt aux LB DN3 décrit très récemment principalement dans le cas d'une infection au SARS-CoV-2 (**Sosa-Hernández et al., 2020; Woodruff et al., 2020**). Cette population de LB DN BTLA<sup>low</sup> sera donc à caractériser plus finement notamment par une analyse fonctionnelle afin de déterminer si elle est capable de produire des anticorps.

Par ailleurs, le défaut d'expression observé à la surface des LB DN ne semble pas être dû à un défaut traductionnel et nous émettons l'hypothèse que BTLA pourrait être retenu dans des compartiments intracellulaires. Afin de vérifier ces suppositions, la recherche d'une potentielle colocalisation entre BTLA et différents compartiments intracellulaires par microscopie confocale devra être réalisée. Enfin, il sera intéressant d'étudier les facteurs impliqués dans la régulation de l'expression BTLA dans les LB, mais également dans d'autres populations lymphocytaires tels que les LT, afin de comprendre l'origine des altérations de l'expression de BTLA et avant de l'envisager comme cible thérapeutique dans le LES.

Pour conclure, nos résultats montrent une altération de l'expression de BTLA dans un contexte lupique à la surface de deux populations cellulaires impliquées dans la pathogénèse lupique (**Figure 41**). L'ensemble de ces résultats démontre alors l'implication de BTLA dans le lupus et suggère que ce récepteur pourrait être envisagé comme une nouvelle cible thérapeutique dans le LES.



**Figure 41.** La dérégulation de l'expression de BTLA semble impliquée dans la pathogénèse lupique. L'expression de BTLA est augmentée à la surface des Tregs chez les patients lupiques alors qu'elle est diminuée à la surface des LB mémoires DN. Cette altération de l'expression de BTLA est corrélée à la fréquence de ces cellules chez les patients suggérant un rôle important de BTLA dans la pathogénèse lupique chez l'Homme.

## **CHAPITRE 2 : BTLA, cible thérapeutique dans le LES ?**



## I) Avant-propos

Le LES est une maladie auto-immune complexe caractérisée par des phases de poussées et de rémissions, expliquant en partie la prise en charge difficile des patients. Les traitements prescrits à ce jour, ne permettent pas de guérir définitivement du LES, mais uniquement d'améliorer les symptômes et d'empêcher les complications liées aux atteintes d'organes. Le traitement du LES se base majoritairement sur la prescription d'anti-inflammatoires, de glucocorticoïdes, d'hydroxychloroquine et d'immunosuppresseurs. Toutefois, la prise en charge des patients est compliquée en raison des effets indésirables générés par l'utilisation de ces thérapies conventionnelles. La recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques est donc indispensable et, à l'heure actuelle, seules deux biothérapies ont reçu une autorisation d'emploi par la FDA dans le traitement du LES : le belimumab (anticorps anti-BAFF) et l'anifrolumab (anticorps anti-IFNAR1).

De nombreuses molécules dirigées contre des acteurs du système immunitaires qu'ils soient cellulaires ou moléculaires, sont en cours de développement dans le lupus. Des traitements ciblant directement (par l'intermédiaire de récepteurs exprimés par les cellules) ou indirectement (*via* des cytokines indispensables à la différenciation ou à la survie par exemple) les LB ou les PL/PB sont particulièrement intéressants puisque ces cellules sont impliquées dans la production d'auto-Ac pathogènes essentiels au développement de la pathologie lupique. Deux anticorps dirigés contre les molécules CD20 (rituximab) ou CD22 (epratuzumab) ont été testés dans le cadre du LES mais ont montré des résultats décevants. Ces observations peuvent notamment être expliquées par le fait que les PL/PB n'expriment pas ces récepteurs.

La réponse immunitaire adaptative étant notamment régulée par l'intermédiaire de molécules de co-stimulation ou de co-inhibition, il est également intéressant d'envisager le ciblage de ces molécules comme nouvelles stratégies thérapeutiques. BTLA est un récepteur co-inhibiteur dont le rôle dans le maintien de la tolérance (**Oya et al., 2008; Watanabe et al., 2003**) et la prévention du lupus a été décrit. En effet, des souris lupiques déficientes pour BTLA voient leurs symptômes lupiques s'aggraver et leur survie diminuer (**Oya et al., 2011**). Par ailleurs, nous avons montré au sein du laboratoire que la fonctionnalité de BTLA est altérée dans les LT CD4<sup>+</sup> de patients lupiques (**Sawaf et al., 2018**). De façon intéressante, BTLA est exprimé à la surface des PL chez l'Homme (**Axelsson et al., 2020; Rodríguez-Bayona et al.,**

**2010**), permettant ainsi le ciblage de cette population par l'intermédiaire de ce récepteur. A ce jour, seul un essai clinique visant à évaluer le potentiel thérapeutique d'un anticorps antagoniste de BTLA dans le cadre du cancer a été approuvé. L'évaluation du potentiel thérapeutique d'une molécule débute toujours par l'évaluation *in vivo* du traitement sur des modèles animaux. **C'est pourquoi, au cours de ma thèse, nous avons *i*) étudié l'expression et la fonctionnalité de BTLA dans le modèle murin spontané de lupus NZB/W, et *ii*) testé le potentiel thérapeutique d'un traitement à l'aide d'un anticorps anti-BTLA dans le lupus grâce à ce modèle murin. L'ensemble des résultats obtenus est résumé dans la publication n°2 en cours de préparation.**

- II) **Implication de BTLA dans la pathogénèse lupique chez la souris NZB/W : de l'analyse phénotypique et fonctionnelle au ciblage thérapeutique : PUBLICATION N°2**

**Targeting B and T Lymphocyte Attenuator regulates lupus disease development in NZB/W mice**

**Lucie Aubergeon<sup>1</sup>, Léa Gherardi<sup>1</sup>, Jean-Daniel Fauny<sup>1</sup>, Hélène Dumortier<sup>1</sup>, Fanny Monneaux<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>CNRS UPR3572, Immunology, Immunopathology and Therapeutic Chemistry, Institute of Molecular and Cellular Biology, Strasbourg, France

En préparation



En préparation

**Targeting B and T lymphocyte attenuator regulates lupus disease  
development in NZB/W mice**

**Lucie Aubergeon<sup>1</sup>, Léa Gherardi<sup>1</sup>, Jean-Daniel Fauny<sup>1</sup>, Hélène Dumortier<sup>1</sup>, Fanny  
Monneaux<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>CNRS UPR3572, Immunology, Immunopathology and Therapeutic Chemistry, Institute of Molecular and Cellular Biology, Strasbourg, France.

**\*Correspondence**

Fanny Monneaux

[f.monneaux@ibmc-cnrs.unistra.fr](mailto:f.monneaux@ibmc-cnrs.unistra.fr)

**Keywords:** systemic lupus erythematosus, BTLA, lupus mice, inhibitory receptors

## INTRODUCTION

The ability of the immune system to distinguish self from non-self is central for generating protective immunity to pathogens while maintaining tolerance to autoantigens. An unbalance towards either of these states, i.e. an absence of response (immunodeficiency) or an excessive and inappropriate response (autoimmunity or allergy) can lead to physiopathological manifestations. The establishment of self-tolerance thus represents an essential element avoiding autoimmune disease pathogenesis. However, T cells that escape mechanisms of self-tolerance, may contribute to inflammation and provide help to autoreactive B cells, leading to their activation and differentiation into plasma cells producing autoantibodies, which further contribute to tissue damage. Fortunately, autoimmune diseases occur only rarely and immunological tolerance is maintained in the periphery thanks to various mechanisms. One such mechanism is the balance between costimulatory and coinhibitory signals delivered to T and B cells.

B and T lymphocyte attenuator (BTLA) is an inhibitory receptor of the CD28 superfamily that negatively regulates the immune response in synergy with CTLA-4/B7 and PD-1/PDL1 pathways (1). BTLA is expressed on T cells (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells), B cells, but also natural killer (NK) cells, NKT cells, macrophages and dendritic cells (DC) (2). Moreover, BTLA was described to be expressed by T follicular helper (T<sub>FH</sub>) cells (3). The ligand for BTLA is Herpes Virus-Entry Mediator (HVEM; TNFRS14) (4), a TNF receptor family protein found on T, B, NK, DC and myeloid cells. The ligation of BTLA by HVEM attenuates T-cell activation, leading to decreased cell proliferation, cytokine production and cell cycle progression. The inhibitory role of BTLA *in vivo* was revealed by the analyses of BTLA-deficient mice characterized by a breakdown of self-tolerance, resulting in the development of an autoimmune hepatitis-like disease, lymphocytic infiltration in multiple organs (5) and

enhanced specific antibody responses and sensitivity to EAE (1). On the contrary, BTLA engagement through the use of agonistic antibodies leads to the induction of tolerance. Indeed, the administration of an agonistic anti-BTLA antibody 3C10 was shown to prolong heart allograft survival and the beneficial effect was due to the induction of IL-10-producing regulatory T cells (6). Moreover, the agonistic BYK1 anti-BTLA antibody prevents the development of GVHD, if it was administered at the time of transplantation (7).

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a highly complex and heterogeneous autoimmune disease characterized by the presence of autoantibodies directed against a spectrum of self-antigens (including nuclear antigens) and by the subsequent formation of immune complexes. Hallmark features of SLE are immune system activation and inflammation in multiple organs, such as the skin, joints, kidneys, lungs and central nervous system. Interestingly, the lupus disease is exacerbated in MRL/lpr lupus mice deficient for BTLA (8) suggesting a protective role of BTLA in lupus.

We previously investigated the expression of BTLA on T cell subsets in lupus patients compared to healthy controls (HC). Interestingly, we described that the enhancement of BTLA expression after activation is significantly lower in SLE patients compared to HC. In addition, we analyzed the BTLA-mediated inhibition of CD4<sup>+</sup> T cell activation and showed that in lupus, there is a significant decrease in the capacity of BTLA to inhibit the proliferation and the activation of CD4<sup>+</sup> T cells compared to HC. We evidenced that BTLA deficiency is due to the poor BTLA recruitment to the immunological synapse following activation, and can be corrected by restoring intracellular trafficking (9). Moreover, we very recently observed that BTLA expression is significantly increased on activated Tregs (aTregs) from lupus patients, especially those displaying an active disease (10). BTLA expression by lupus aTregs correlates with the diminution of the aTregs frequency observed in these patients, suggesting that the higher BTLA expression on the surface of lupus aTregs may account for the reduced frequency

of this Treg subset in lupus settings. Altogether, our results highlight a possible involvement in defective BTLA signaling pathway in lupus patients. As mouse models are crucial for designing and evaluating therapeutic protocols, we now wish to investigate BTLA expression and function in lupus mice.

In the present study, we investigated the role played by BTLA in the development of lupus in NZB/W F1 mice, that spontaneously develop a syndrome resembling human SLE notably because of the development of severe immune complex-related glomerulonephritis. We analyzed BTLA expression and function in this lupus-mouse model, compared to BALB/W non-autoimmune mice and we examined the *in vivo* effects of an anti-BTLA antibody administration in lupus NZB/W F1 mice. We found that diseased-NZB/W mice display similar pattern of BTLA expression and function than the one we previously observed in human SLE patients, highlighting the relevance of this mouse-model for evaluating the therapeutical potential of BTLA targeting. Very interestingly, we found that an anti-BTLA antibody was effective for treating the lupus-like nephritis of NZB/W F1 mice.

## MATERIALS AND METHODS

### *Mice*

Female BALB/c, BALB/W (BALB/c x NZW) F1 and NZB/W (NZB x NZW) F1 mice were bred in our animal facilities (approved by French Veterinary Services, #I-67-482-2). Proteinuria was evaluated in fresh urine samples using a colorimetric assay for albumin (Albustix, Siemens, Munich, Germany) and was semi-quantitatively estimated according to the scale recommended by the manufacturer. All experiments were carried out in conformity with the 2010/63/UE European animal bioethics legislation (French decree #2013-118 – 1<sup>st</sup> February 2013) and were approved by the Regional Ethics Committee of Strasbourg (CREMAS) and by the French Ministry of Higher Education and Research (APAFIS #2020041717124974).

### *CD4<sup>+</sup> T cell purification and cell culture*

Total or naïve CD4<sup>+</sup> T cells were negatively isolated from spleen or lymph nodes respectively using Mojosort Mouse CD4 T Cell Isolation Kit or Mojosort Mouse CD4 Naïve T Cell Isolation Kit (Biolegend) according to the manufacturer's instructions. The purity of the total CD4<sup>+</sup> or naïve CD4<sup>+</sup> T cell population was typically ≥ 90%. Purified CD4<sup>+</sup> T cells were cultured in complete medium (RPMI 1640 containing 10% FCS, 10 µg/ml gentamicin, 0.05 mM β-mercaptoethanol and 10 mM HEPES) at the rate of 100 000/well in 96-well plates at 37°C.

### *BTLA functional analysis in CD4<sup>+</sup> T cells*

Purified CD4<sup>+</sup> T cells were stimulated with beads (Dynabeads M-450 Epoxy, Invitrogen) coated with anti-CD3 (7.5%, clone 145-2C11, BD) / anti-CD28 (7.5%, clone 37.51, BD) / anti-BTLA (85%, clone 6F7, Invitrogen) or IgG1κ (85%, clone P3.2.8.2, Invitrogen) antibodies (ratio bead/cell = 1:1). Flow cytometric analysis of CD69, CD25 and BTLA was performed after 24 hours and 48 hours of culture. To measure cell proliferation, cells were incubated for

10 min at 37°C with 5 µM CellTrace Violet (Thermofisher). After washing, cells were activated as described above and cultured for 5 days.

#### *Flow cytometry analysis*

Cells were stained for 20 minutes at 4°C in staining buffer (2% FCS in PBS) with several conjugated antibodies or isotype matched controls: anti-CD3-Fluorescein isothiocyanate (anti-CD3-FITC, clone 17A2, rat IgG2b, BD Pharmingen), anti-CD4-AlexaFluor 700 (anti-CD4-AF700, clone RM4-5, rat IgG2a, BD Pharmingen), anti-CD8α-allophycocyanin-Cyanine 7 (anti-CD8α-APC-Cy7, clone 53-6.7, rat IgG2b, BD Pharmingen), anti-CD19-Peridinin-Chlorophyll-Protein-Cy5.5 (anti-CD19-PerCP-Cy5.5, clone 1D3, rat IgG2a, BD Pharmingen), anti-CD21-FITC (clone 8C12, rat IgG2b, BD Pharmingen), anti-CD23-phycoerythrin (anti-CD23-PE, clone B2B4, rat IgG2a, BD Pharmingen), anti-CD25-FITC (clone PC61, rat IgG1, Biolegend), anti-CD44-PE-Cy7 (clone IM7, rat IgG2b, Biolegend), anti-CD62L-PE (clone MEL-14, rat IgG2a, BD Pharmingen), anti-CD45-APC-Cy7 (clone 30F11, rat IgG2b, Biolegend), anti-CD69-PE (clone H1.2F3, hamster IgG1, BD Pharmingen), anti-BTLA-AF647 (clone 8F4, mouse IgG1, Biolegend). Cell acquisition was performed using 10-color Flow Cytometer Gallios-Navios (Beckman Coulter). Data were analyzed using FlowJo 7.6.5 software (Treestar). For blood phenotyping, 50 µl of blood were incubated with conjugated-antibodies for 20 minutes at 4°C in staining buffer (2% FCS in PBS). Red blood cells were then lysed with lysis buffer (EasyLyse, Agilent Technologies) for 15 minutes and cells were washed twice in staining buffer.

#### *Treatment of mice*

NZB/W female (20-22 weeks of age) were randomly assigned to treatment groups and received either an i.p. administration of an agonistic anti-BTLA antibody (clone 6F7; 100 µg/injection,

BioXcell), or an appropriate mouse isotype antibody (IgG1κ; 100 µg/injection, BioXcell) twice a week for 10 weeks. Urine protein levels and weight were determined twice a week and mice exhibiting high proteinuria (score >4) for at least two consecutive weeks were considered to be severely proteinuric. Blood samples were collected every 3 weeks to evaluate auto-antibody levels in the serum and to perform a phenotypic analysis in peripheral blood. Mice were euthanized either *i*) at limit point achievements (high proteinuria and/or 20% weight loss and/or prostration) in order to evaluate clinical and biological signs of the disease (proteinuria, autoantibodies, survival) or *ii*) at 33 weeks of age to evaluate the therapeutic effect of anti-BTLA administration on kidney damages.

#### *ELISA*

Anti-dsDNA and anti-chromatin levels were determined using ELISA tests. Polystyrene plates were coated overnight at 37°C with dsDNA (Sigma, 100 ng/ml, in citrate buffer), or mouse chromatin (1 µg/ml expressed as dsDNA concentration in PBS prepared as described [12]). Mouse sera (1/100 to 1/24 300 in PBS-Tween 0.05% BSA 0.5%) were added for 2h, followed by goat anti-mouse IgG (1/20 000) supplemented with a goat anti-mouse IgG3 (1/10 000) conjugated to HRP for 30 min at 37°C in PBS containing 0.05% Tween and 0.5% BSA. Substrate solution (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB) was added, the reaction was stopped with the addition of 1M HCl, and the final absorbance was read at 450nm with the Varioskan Lux (ThermoFisher) lector.

#### *Assessment of kidney disease*

Kidneys were fixed overnight at 4°C in paraformaldehyde 4% and embedded in paraffin (Leica). Sections of 5 µm were dewaxed, rehydrated and stained with hematoxylin and eosin (H&E), dehydrated and permanently mounted. Pathological changes in the kidneys were assessed by evaluating glomerular activity (i.e., increased glomerular size, mesangial

proliferation, hyaline deposit, glomerular lesions) and tubulointerstitial activity (i.e., interstitial inflammation, tubule dilatation/atrophy, interstitial fibrosis). Sections were scored using a 0-4 scale for glomerular or tubular activity, as follows: 0 = no lesion, 1 = lesions in <25% of glomeruli/tubules, 2 = lesions in 25-50% of glomeruli/tubules, 3 = lesions in 51-75% of glomeruli/tubules and 4 = lesions in > 75% of glomeruli/tubules. Images were acquired with a 40x objective on a NanoZoomer S60 (Hamamatsu Photonics) and analyzed with the QuPath Software.

#### *Statistical analyses*

Data are shown as mean +/- SEM. Data were analyzed using a Mann-Whitney test. Data concerning survival or proteinuria were analyzed using a Log-Rank test (Prism version 6.0; GraphPad Software). P-values <0.05 were considered significant.

## RESULTS

*BTLA expression is modified with age but is similar between lupus NZB/W and BALB/W control mice*

To determine the role of BTLA in lupus pathogenesis in the NZB/W mouse model, we first examined BTLA expression on B and T lymphocyte subsets at various stages of the disease, i.e. prior biological and clinical symptoms appearance (10-12 week-old) and after disease development (mice older than 35 weeks and displaying proteinuria), compared to haplotype-matched BALB/W ([BALB/c x NZW] F1 carrying the H2<sup>d/z</sup> haplotype and the same BTLA.1 allele as NZB/W mice).

As previously described, we observed that BTLA expression is higher on B cells than on both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (MFI: 18836 ± 1969 on B cells, 1223 ± 113 on CD4<sup>+</sup> T cells and 1307 ± 91 on CD8<sup>+</sup> T cells for young BALB/W mice, Figure 1A, p<0.0001). BTLA expression augments slightly with age on B cells (23953 ± 1484 vs 18836 ± 1969 for BALB/W, p<0.05 and 19089 ± 1074 vs 23830 ± 2416 for NZB/W, ns, Figure 1A). Concerning T cells, BTLA expression is enhanced in CD4<sup>+</sup> T cells from old-diseased NZB/W mice compared to young, non-diseased animals (1774 ± 221 vs 992 ± 68 Figure 1A; p<0.01). However, the comparison of BTLA expression on T cells (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>) and CD19<sup>+</sup> B cells between young and old lupus NZB/W mice and age-related BALB/W mice in the spleen (Figure 1A) and lymph nodes (not shown) did not reveal significant variations.

In CD4<sup>+</sup> T cell subsets, BTLA is not differentially expressed on naive (CD44<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>) and effector/memory (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) CD4<sup>+</sup> T cells of NZB/W lupus mice (young and old-diseased) compared to control age-related BALB/W mice (Figure 1B). BTLA expression is significantly increased on naive (MFI: 1466 ± 193 vs 959 ± 66, p<0.05) and effector/memory (MFI= 1768 ± 227 vs 1027 ± 71, p<0.01) CD4<sup>+</sup> T cells from old NZB/W mice compared to

young NZB/W mice. However, there is no significant variation between old NZB/W mice and old BALB/W mice regarding BTLA expression on these T cell subsets. In B cells, BTLA expression is significantly higher on follicular B cells (FO: CD21<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>) compared to marginal zone B cells (MZ, CD21<sup>-</sup>CD23<sup>+</sup>) and CD21<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup> B cells in BALB/W and NZB/W mice (MFI: 21027 ± 1536 on FO; 6198 ± 902 on MZ and 5665 ± 485 on CD21<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup> for young BALB/W mice, p<0.0001; Figure 1C). In accordance with the enhancement of BTLA expression on total CD19<sup>+</sup> B cells with age in BALB/W mice (Figure 1A), we noticed that BTLA is increased on the 3 subpopulations of B cells in old BALB/W mice compared to young mice (MFI: 25388 ± 1813 vs 21027 ± 1536 for FO B cells, p<0.05; 9262 ± 672 vs 6198 ± 902 for MZ B cells, p<0.05; 7753 ± 544 vs 5665 ± 485 for CD21<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup> B cells, p<0.01). In the lupus NZB/W mouse model, the enhancement of BTLA expression with age is only statistically significant on MZ B cells (MFI: 14371 ± 1588 vs 7987 ± 520, p<0.05). When we compared BTLA expression levels between BALB/W and NZB/W mice, we observed a significant increase of BTLA on CD21<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup> B cells from lupus mice whatever the age (MFI: 8388 ± 508 vs 5665 ± 485 for young mice, p<0.001 and 13229 ± 1642 vs 7753 ± 544 for old mice, p<0.01), and a higher BTLA expression on MZ B cells from old-diseased NZB/W mice compared to old BALB/W mice (MFI: 14371 ± 1588 vs 9262 ± 672, p<0.001; Figure 1C).

*The anti-BTLA 6F7 antibody has agonistic activity in mice carrying the BTLA.1 allele*

In human lupus CD4<sup>+</sup> T cells, we previously evidenced that despite comparable BTLA expression with healthy donors, the BTLA signaling pathway was defective. We thus wondered whether the engagement of BTLA could efficiently inhibit CD4<sup>+</sup> T cell activation in lupus mice. The mouse BTLA protein has 2 allelic variants whose pattern of expression differs between mouse strains, e.g. BALB/c (*Btla<sup>a</sup>* encoding BTLA.1) and C57BL/6 (*Btla<sup>b</sup>* encoding BTLA.2).

Among specific antibodies recognizing murine BTLA, only 5 were described as able to react with the BTLA.1 allele (the one which is also expressed by NZB and NZW mice) (13). Contrary to what was done with human cells, there are relatively few data regarding BTLA functionality *in vitro* in mice and unfortunately, the only studies in which anti-BTLA antibodies were used in “agonistic tests” *in vitro* were performed in the C57BL/6 mouse model. We thus first had to select an anti-BTLA antibody that could be used to study BTLA function and we decided to test the 6F7 clone, which is specific for both BTLA.1 (thus recognizing BTLA expressed by BALB/c, BALB/W and NZB/W mice) and BTLA.2 alleles, and was shown to display agonistic activity in the C57BL/6 mouse model. To investigate the agonistic properties of the anti-BTLA 6F7 antibody, we compared the activation state of purified CD4<sup>+</sup> T cells isolated from BALB/c mice upon TCR activation (anti-CD3/CD28) associated either with BTLA cross-linking (thanks to 6F7 antibody) or not (corresponding isotype control). We observed, when the TCR and BTLA were co-engaged, that the upregulation of activation markers CD25 and CD69 are inhibited in the presence of the 6F7 anti-BTLA antibody (21% ± 1 of CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> and 17% ± 1 of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>; Figure 2 A-B) compared to the stimulation of the TCR alone (39% ± 3 of CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> and 23% ± 1 of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>; p<0.05) or with the isotype control (42% ± 3 of CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> and 25% ± 1 of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>; p<0.01), indicating that this anti-BTLA antibody also possesses an agonistic activity in mice carrying the BTLA.1 allele.

#### *Impaired capacity of BTLA to inhibit total CD4<sup>+</sup> T cells from old diseased NZB/W mice*

We then have undertaken the analysis of the BTLA-mediated inhibition of CD4<sup>+</sup> T cell activation in lupus settings. We found that the CD4<sup>+</sup> T cell activation is inhibited in young and old BALB/W when TCR and BTLA are co-engaged as shown by the expression of the two activation marker CD69 (inhibition by 52.6% ± 3.8 for young mice and 52.9% ± 3.3 for old

mice) and CD25 (inhibition by  $29.9\% \pm 4.3$  for young mice and  $41.8\% \pm 2.5$  for old mice) (Figure 3A-B). In the same way, CD4<sup>+</sup> T cell proliferation was inhibited in the presence of the agonistic anti-BTLA antibody (inhibition by  $42.9\% \pm 7.3$  for young mice and  $37.7\% \pm 4.7$  for old mice; Figure 3C). In contrast, we observed a decreased capacity of BTLA to inhibit CD69 (inhibition by  $29.9\% \pm 2.0$ ;  $p < 0.001$ ) and CD25 (inhibition by  $24.1\% \pm 2.1$ ;  $p < 0.001$ ) expression in old-diseased NZB/W mice (but not in young NZB/W mice) compared to BALB/W mice of the same age (Figure 3A-B). Accordingly, the inhibition of the proliferation is also defective in old lupus mice (inhibition by  $13.3\% \pm 2.8$ ;  $p < 0.01$ ) (Figure 3C).

However, if the proportion between naïve and effector/memory T cells did not significantly differ with age in BALB/W mice, there is a strong diminution of naïve CD4<sup>+</sup> T cells ( $69.4\% \pm 1.7$  vs  $12.3\% \pm 2.7$ ;  $p < 0.0001$ ) towards an enhancement effector/memory CD4<sup>+</sup> T cells ( $76.4\% \pm 3.2$  vs  $29.6\% \pm 2.1$ ;  $p < 0.0001$ ) in old NZB/W mice compared to young lupus mice (Figure 4A). In old-diseased NZB/W mice, the majority of splenic CD4<sup>+</sup> T cells are effector/memory cells whereas CD4<sup>+</sup> T cells predominantly display a naïve phenotype in old-BALB/W control mice (Figure 4B). We thus analyzed whether defective BTLA signaling in old lupus mice was associated with this shift of CD4<sup>+</sup> T cells toward an effector/memory phenotype. Interestingly, when purified naïve CD4<sup>+</sup> T cells from old-diseased NZB/W mice were used in the functional test, defective BTLA functionality was not observed anymore (Figure 4C). Indeed, the inhibition of CD69 (inhibition by  $55.5\% \pm 2.6$  for NZB/W mice vs  $61.1\% \pm 2.7$  for BALB/W mice), of CD25 (inhibition by  $24.4\% \pm 1.6$  for NZB/W mice vs  $27.2\% \pm 3.0$  for BALB/W) and of the proliferation (inhibition by  $24.1\% \pm 4.8$  for NZB/W mice vs  $30.0\% \pm 24.4$  for BALB/W mice) are similar between old NZB/W mice and old BALB/W control mice. Altogether, our results suggest that defective BTLA functionality in old-diseased NZB/W mice is related to the high frequency of effector/memory CD4<sup>+</sup> T cells, that may be refractory to BTLA-mediated inhibition.

*Defective upregulation of BTLA expression upon activation on old-diseased NZB/W CD4<sup>+</sup> T cells*

In lupus patients, we observed that BTLA is not fully upregulated after activation of CD4<sup>+</sup> T cells compared to healthy controls (9). As BTLA upregulation plays an important role to allow this co-inhibitory receptor to further regulate lymphocyte activation, we analyzed whether the membrane level of BTLA is efficiently increased following activation in CD4<sup>+</sup> T cells of lupus mice. In both young and old BALB/W mice, stimulation of purified CD4<sup>+</sup> T cells for 2 days with agonistic anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, induced a two-fold enhancement of BTLA expression on average ( $2.3 \pm 0.2$  in CD4<sup>+</sup> T cells from old BALB/W mice; Figure 5 A). Interestingly, and as we previously have shown in lupus patients, the enhancement of BTLA expression after activation is significantly lower in total CD4<sup>+</sup> T cells from old-diseased NZB/W mice (but not young lupus mice) compared to control mice of the same age (Fold enhancement:  $1.5 \pm 0.1$  vs  $2.3 \pm 0.2$ ;  $p < 0.01$ , Figure 5A). This defective BTLA upregulation is probably related to the high frequency of effector/memory CD4<sup>+</sup> T cells in diseased-NZB/W mice as it is no more detectable when we used purified naïve CD4<sup>+</sup> T cells (Fold enhancement:  $1.8 \pm 0.2$  in old BALB/W mice vs  $1.9 \pm 0.2$  in old NZB/W mice; Figure 5B).

*Prophylactic treatment with an anti-BTLA antibody prevents the development of proteinuria and extends survival in NZB/W mice*

We then analyzed whether targeting the BTLA pathway would be effective in preventing lupus disease development *in vivo*. For that purpose, we administered the agonistic anti-BTLA 6F7 antibody (or its isotype control) into NZB/W mice prior the first clinical signs of the disease appear

(20-22 week-old), by the i.p route at 3mg/kg twice a week for 10 weeks. Mice were followed for various parameters until they die or were sacrificed one week after the end of the administrations (Figure 6A). We observed that 6F7 administration into 20-22 week-old NZB/W mice results in delayed proteinuria onset ( $p<0.01$ ; Figure 6B). At the age of 44 weeks, all isotype-treated NZ/W mice had developed proteinuria, whereas only 40% of 6F7-treated mice were proteinuria positive. As proteinuria is a marker of renal lesions, we performed histological analyses. Kidneys sections were stained with H&E and observed with light microscopy. Accordingly, with our results obtained in collected urine samples, anti-BTLA treated mice displayed limited kidney damages with a reduction in glomerular size and cellularity, mesangial expansion and deposits, and glomerular damages, all taken into consideration in the histopathological score ( $p<0.05$ ; Figure 6C). The 6F7 administration also limits the body weight loss (Figure 6D). More importantly, 6F7-treated mice exhibited an extended survival time ( $p<0.01$ ; Figure 6E). The life span of 6F7-treated mice was significantly prolonged and at the age of 47 weeks, all isotype-treated mice had succumbed, whereas 50% of 6F7-treated mice were still alive.

*Efficacy requires continuous exposure to anti-BTLA antibody and is accompanied by a decrease in B cell frequency*

All mice included in the therapeutic protocol (anti-BTLA treated or isotype-treated) developed proteinuria, but the timing of its onset is time dependent and corresponds to the loss of anti-BTLA antibody exposure (10 weeks; Figure 6B). Survival follows the same pattern (the first mouse reaching limit points and being sacrificed was 26-week-old in the isotype group and 36-week-old in the 6F7-treated group), suggesting that efficacy requires continuous administration and does not induce long-term protective effect (Figure 6E). Interestingly, the beneficial effect of anti-BTLA antibody administrations was accompanied by a significant

decrease (but not a total depletion) of CD19<sup>+</sup> B cell. Indeed, circulating B cell frequency (but not T cell frequencies) was significantly reduced during the treatment ( $24.5\% \pm 1.6$  of CD19<sup>+</sup> B cells before administrations vs  $17.5\% \pm 1.6$  after 9 weeks of administrations,  $p<0.001$ ; Figure 7A) in anti-BTLA treated mice. Moreover, circulating B cell frequency was lower in anti-BTLA treated mice compared to isotype treated mice until 12 weeks after the beginning of the treatment ( $22.2\% \pm 3.3$  vs  $37.7\% \pm 2.8$ ,  $p<0.01$ ) (Figure 7A). Autoantibodies directed against nuclear antigens are a hallmark of SLE, and NZB/W mice exhibit elevated levels coincident with disease development (11). Unfortunately, we didn't notice any significant differences concerning levels of circulating anti-dsDNA (Figure 7B) and anti-chromatin IgG antibodies (Figure 7C) in comparison with isotype-treated mice. Our results demonstrate that the anti-BTLA treatment, when started at 20-22 weeks of age, reduces circulating B cell frequency but not autoantibody levels in sera from NZB/W lupus mice.

## REFERENCES

1. Watanabe, N., Gavrieli, M., Sedy, J.R., Yang, J., Fallarino, F., Loftin, S.K., Hurchla, M.A., Zimmerman, N., Sim, J., Zang, X., et al. (2003). BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat. Immunol.* *4*, 670–679.
2. Han, P., Goularte, O.D., Rufner, K., Wilkinson, B., and Kaye, J. (2004). An inhibitory Ig superfamily protein expressed by lymphocytes and APCs is also an early marker of thymocyte positive selection. *J. Immunol.* *172*, 5931–5939.
3. M'Hidi, H., Thibult, M.-L., Chetaille, B., Rey, F., Bouadallah, R., Nicollas, R., Olive, D., and Xerri, L. (2009). High expression of the inhibitory receptor BTLA in T-follicular helper cells and in B-cell small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.* *132*, 589–596.
4. Sedy, J.R., Gavrieli, M., Potter, K.G., Hurchla, M.A., Lindsley, R.C., Hildner, K., Scheu, S., Pfeffer, K., Ware, C.F., Murphy, T.L., et al. (2005). B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat. Immunol.* *6*, 90–98.
5. Oya, Y., Watanabe, N., Owada, T., Oki, M., Hirose, K., Suto, A., Kagami, S.-I., Nakajima, H., Kishimoto, T., Iwamoto, I., et al. (2008). Development of autoimmune hepatitis-like disease and production of autoantibodies to nuclear antigens in mice lacking B and T lymphocyte attenuator. *Arthritis Rheum.* *58*, 2498–2510.
6. Uchiyama, M., Jin, X., Matsuda, H., Bashuda, H., Imazuru, T., Shimokawa, T., Yagita, H., and Niimi, M. (2014). An agonistic anti-BTLA mAb (3C10) induced generation of IL-10-dependent regulatory CD4+ T cells and prolongation of murine cardiac allograft. *Transplantation* *97*, 301–309.
7. Albring, J.C., Sandau, M.M., Rapaport, A.S., Edelson, B.T., Satpathy, A., Mashayekhi, M., Lathrop, S.K., Hsieh, C.-S., Stelljes, M., Colonna, M., et al. (2010). Targeting of B

- and T lymphocyte associated (BTLA) prevents graft-versus-host disease without global immunosuppression. *J. Exp. Med.* **207**, 2551–2559.
8. Oya, Y., Watanabe, N., Kobayashi, Y., Owada, T., Oki, M., Ikeda, K., Suto, A., Kagami, S., Hirose, K., Kishimoto, T., et al. (2011). Lack of B and T lymphocyte attenuator exacerbates autoimmune disorders and induces Fas-independent liver injury in MRL-lpr/lpr mice. *Int. Immunol.* **23**, 335–344.
  9. Sawaf, M., Fauny, J.-D., Felten, R., Sagez, F., Gottenberg, J.-E., Dumortier, H., and Monneaux, F. (2018). Defective BTLA functionality is rescued by restoring lipid metabolism in lupus CD4+ T cells. *JCI Insight* **3**.
  10. Aubergeon, L., Sawaf, M., Felten, R., Gottenberg, J.-E., Dumortier, H., and Monneaux, F. (2021). High BTLA Expression Likely Contributes to Contraction of the Regulatory T Cell Subset in Lupus Disease. *Front Immunol* **12**, 767099.
  11. Monneaux, F., Dumortier, H., Steiner, G., Briand, J.P., and Muller, S. (2001). Murine models of systemic lupus erythematosus: B and T cell responses to spliceosomal ribonucleoproteins in MRL/Fas(lpr) and (NZB x NZW)F(1) lupus mice. *Int Immunol* **13**, 1155–1163.
  12. Lacotte, S., Dumortier, H., Décossas, M., Briand, J.-P., and Muller, S. (2010). Identification of new pathogenic players in lupus: autoantibody-secreting cells are present in nephritic kidneys of (NZBxNZW)F1 mice. *J Immunol* **184**, 3937–3945.
  13. Crawford, A., and Wherry, E.J. (2009). Editorial: Therapeutic potential of targeting BTLA. *Journal of Leukocyte Biology* **86**, 5–8.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1:** BTLA expression on T and B cells. BTLA expression on CD19<sup>+</sup> B cells , CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (**A**), CD4<sup>+</sup> T cell subsets (**B**), and B cell subsets (**C**) in young BALB/W (open dots, empty blue bars, n=13), old BALB/W (black dots, empty green bars, n=17), young NZB/W (open dots, hatched blue bars, n=18) and old NZB/W mice (black dots, hatched green bars, n=10). Results are expressed as mean ± SEM and each dot represents one individual.

\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*\*p<0.0001, Mann-Whitney test.

**Figure 2:** The 6F7 anti-BTLA antibody has an agonistic activity in mice carrying the BTLA.1 allele. Percentage of CD69<sup>+</sup> (**A**) or CD25<sup>+</sup> cells (**B**) among CD4<sup>+</sup> T cells from BALB/c mice (n=5). Purified CD4<sup>+</sup> T cells were stimulated (anti-CD3/anti-CD28 antibody-coated beads) or not (NS) for 24h or 48h in the presence of the agonistic anti-BTLA 6F7 antibody or its isotype control (IgG1). CD69 (24h; **A**) and CD25 (48h; **B**) expression were measured by flow cytometry and the percentages of positive cells are shown. \*p<0.05; \*\*p<0.01, Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparison.

**Figure 3:** BTLA functionality is impaired in total CD4<sup>+</sup> T cells from old NZB/W mice. Purified CD4<sup>+</sup> T cells from young BALB/W (open dots, empty blue bars, n=8-11), old BALB/W (black dots, empty green bars, n=13-16), young NZB/W (open dots, hatched blue bars, n=11-16) and old NZB/W mice (black dots, hatched green bars, n=9-10) were stimulated with anti-CD3/anti-CD28 antibody-coated beads in the presence of the agonistic anti-BTLA 6F7 antibody or its isotype control. The expression of CD69 at 24h (**A**) and CD25 at 48h (**B**) were analyzed by flow cytometry. (**C**) CD4<sup>+</sup> T cells were stained with CTV and stimulated as described above. CTV expression was analyzed by flow cytometry after 5 days of culture. The percentages of inhibition of the activation (**A**, **B**) and of the proliferation (**C**) were calculated. \*p<0.05; \*\*\*p<0.001, Mann-Whitney test.

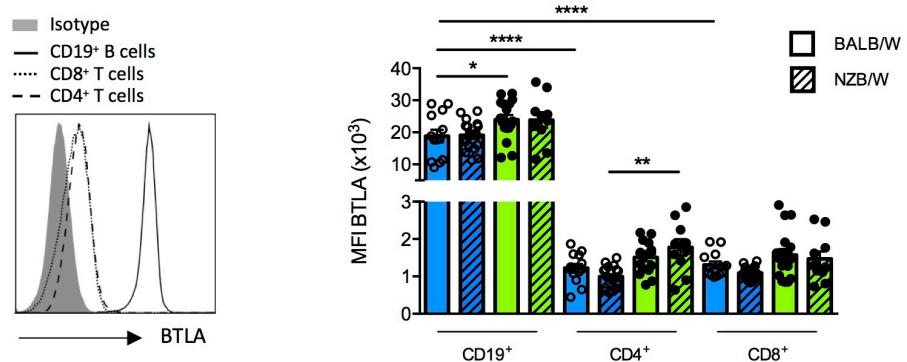
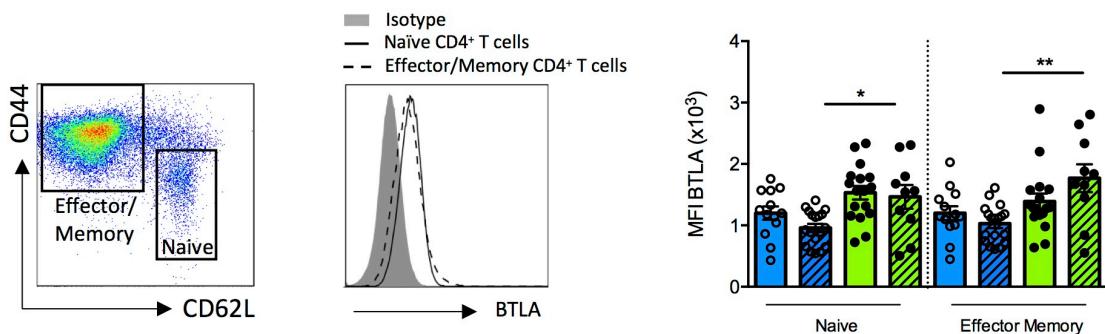
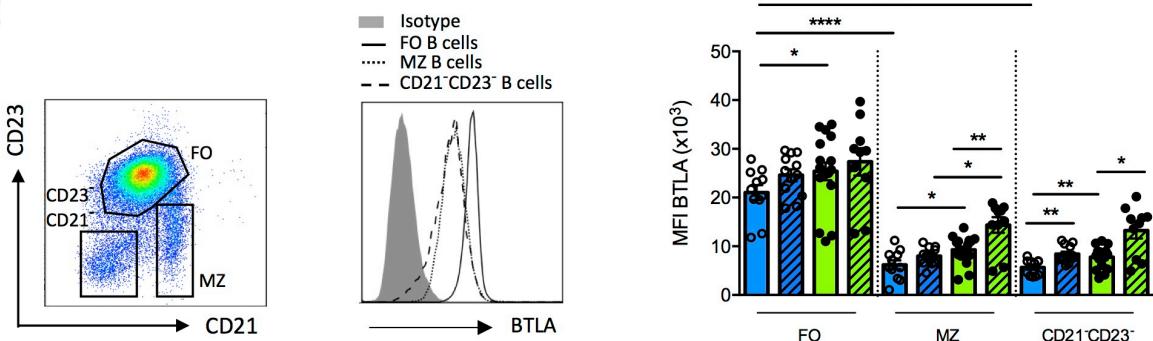
**Figure 4:** The functional defect of BTLA signaling is restricted to effector/memory CD4<sup>+</sup> T cells. **(A)** Percentage of CD4<sup>+</sup> T cell subsets in young (open dots, blue bars, n=13) and old (black dots, green bars, n=10) NZB/W mice. **(B)** Comparison of naïve (CD44<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>) and effector/memory (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) CD4<sup>+</sup> T cell frequencies between an old BALB/W and an old NZB/W mouse by flow cytometry is shown as an example. **(C)** Purified naïve CD4<sup>+</sup> T cells from old BALB/W (black dots, empty green bars, n=14) and old NZB/W mice (black dots, hatched green bars, n=10) were stimulated with anti-CD3/anti-CD28 antibody-coated beads in the presence of the agonistic anti-BTLA 6F7 antibody or its isotype control. The expression of CD69 (at 24h) and CD25 (at 48h) was analyzed by flow cytometry. CD4<sup>+</sup> T cells were stained with CTV and stimulated as described above. CTV expression was analyzed by flow cytometry after 5 days of culture. The percentages of inhibition of the activation and of the proliferation were calculated. \*\*\*p<0.0001, Mann-Whitney test.

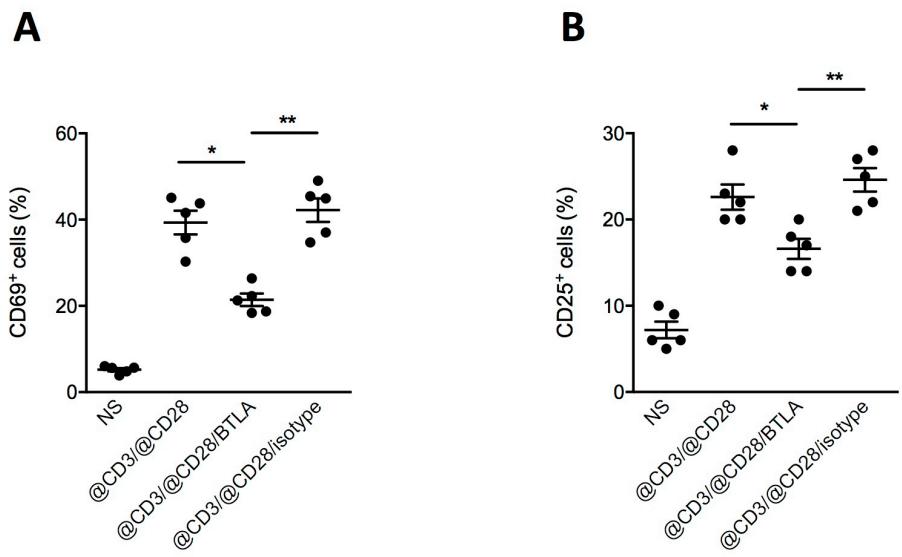
**Figure 5:** The upregulation of BTLA expression upon activation is defective in total CD4<sup>+</sup> T cells from old NZB/W mice. Purified total CD4<sup>+</sup> T cells **(A)** or naïve CD4<sup>+</sup> T cells **(B)** from young BALB/W (open dots, empty blue bars, n=11), old BALB/W (black dots, empty green bars, n=16), young NZB/W (open dots, hatched blue bars, n=16) and old NZB/W mice (black dots, hatched blue bars, n=10) were stimulated with anti-CD3/anti-CD28 antibody-coated beads in the presence of the agonistic anti-BTLA 6F7 antibody or its isotype control and cultured for 24h. BTLA expression was analyzed by flow cytometry (on the left as an example) and the BTLA fold enhancement (expressed as a ratio of BTLA MFI following activation/BTLA MFI without stimulation) on total CD4<sup>+</sup> T cells **(A)** or naïve CD4<sup>+</sup> T cells **(B)** from BALB/W and NZB/W mice were calculated (right panel) . \*\*p<0,01, Mann-Whitney test.

**Figure 6:** Prophylactic treatment of NZB/W mice with the anti-BTLA 6F7 antibody results in delayed proteinuria onset and extended survival. **(A)** Non-diseased NZB/W mice (proteinuria score<1) were enrolled in the study at 20-22 weeks of age and received either an i.p.

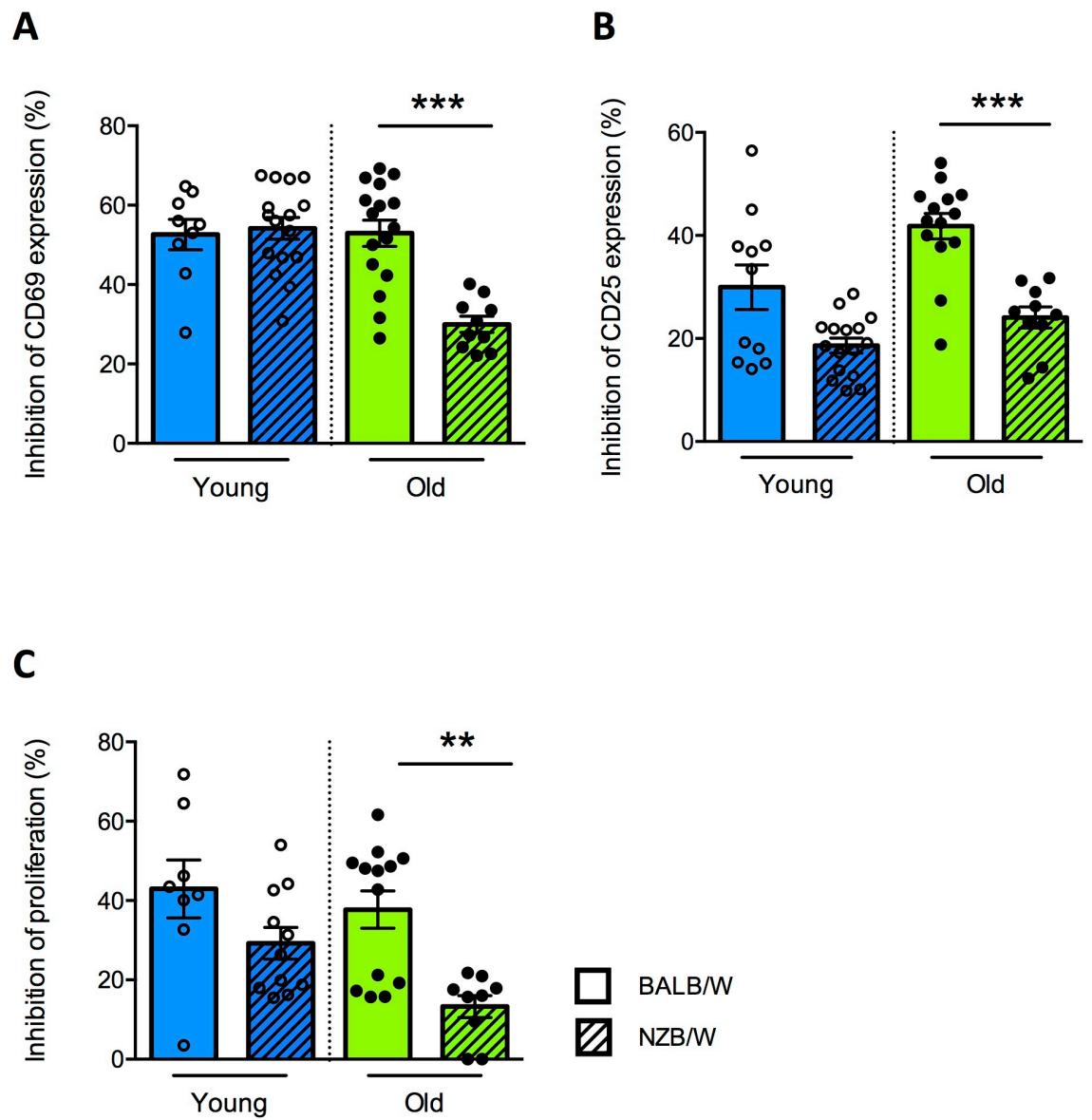
administration of an agonistic anti-BTLA antibody (clone 6F7; 100 µg/administration) or an appropriate mouse isotype antibody (IgG1κ; 100 µg/administration) twice a week for 10 weeks. Mice were sacrificed either at limit points (n=10/group) or one week after the end of the treatment (n=8/group). **(B)** Percentages of NZB/W mice that developed severe proteinuria in the group of anti-BTLA-treated mice (n=10, in red) and isotype-treated mice (n=10, in black). **(C)** Kidneys sections from a representative BALB/W, an isotype-treated NZB/W or an anti-BTLA-treated NZB/W mice (left) and comparison of pathological changes (right) assessed by evaluating glomerular activity and tubulointerstitial activity between anti-BTLA (red) and isotype (black) treated mice. **(D)** Body weight loss expressed as a ratio compared to the initial body weight in anti-BTLA-treated mice (in red) and isotype-treated mice (in black). **(E)** Percentages of mice that had survived in anti-BTLA treated (red) or isotype control treated mice (black). \*p<0,05; \*\*p<0.01, Mann-Whitney or Log-rank test.

**Figure 7:** Anti-BTLA antibody treatment decreases peripheral B cell frequency. **(A)** Percentages of peripheral CD19<sup>+</sup> B cells, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells assessed by flow cytometry (n=18/group) in the anti-BTLA-treated group (red) and the isotype-treated group (black). **(B-C)** Levels of anti-DNA **(B)** and anti-chromatine antibodies **(C)** in the sera of anti-BTLA-treated mice (red) and isotype-treated mice (black) were determined by ELISA. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0.0001, Multiple t-test.

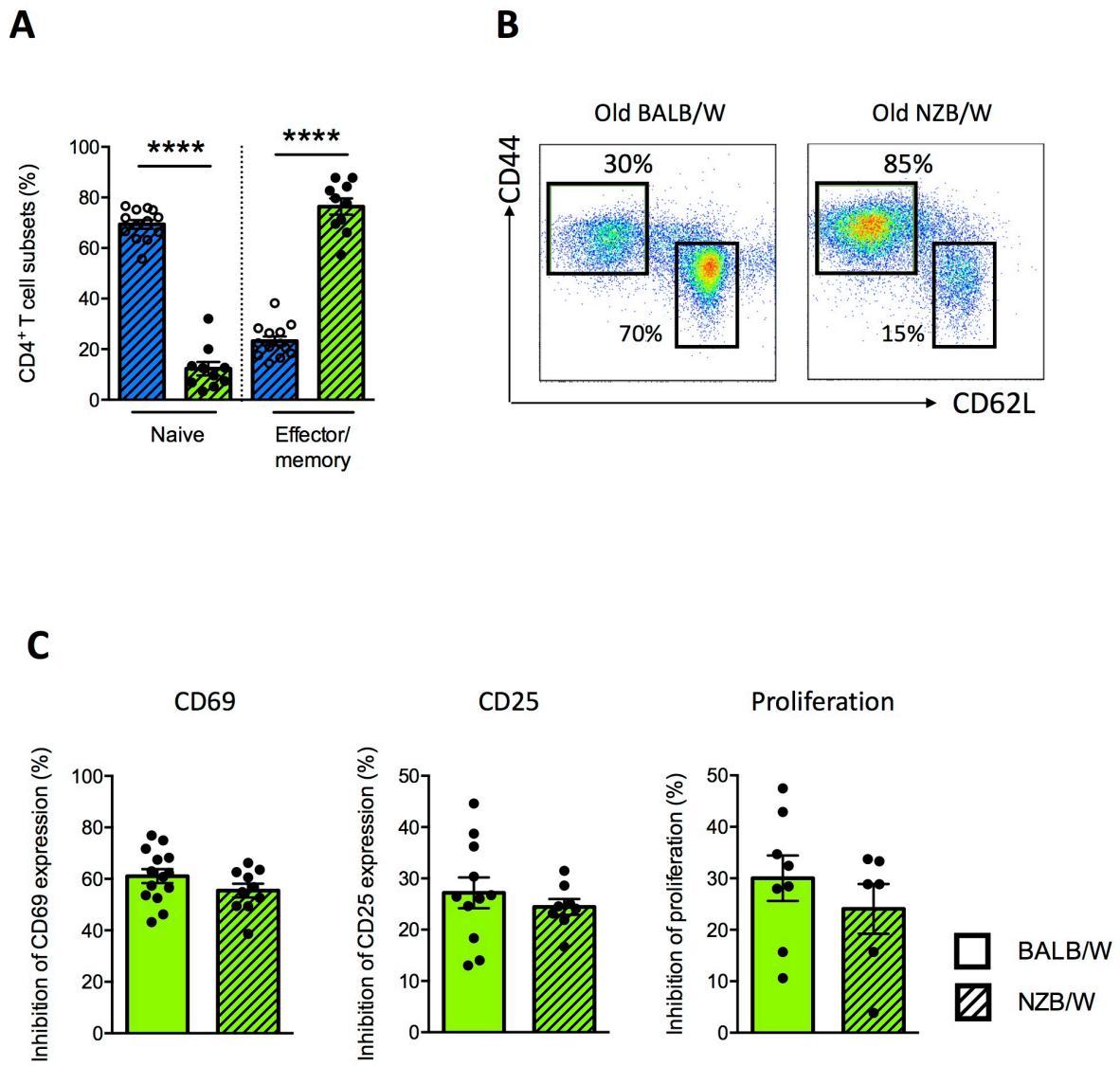
**A****B****C****Figure 1**



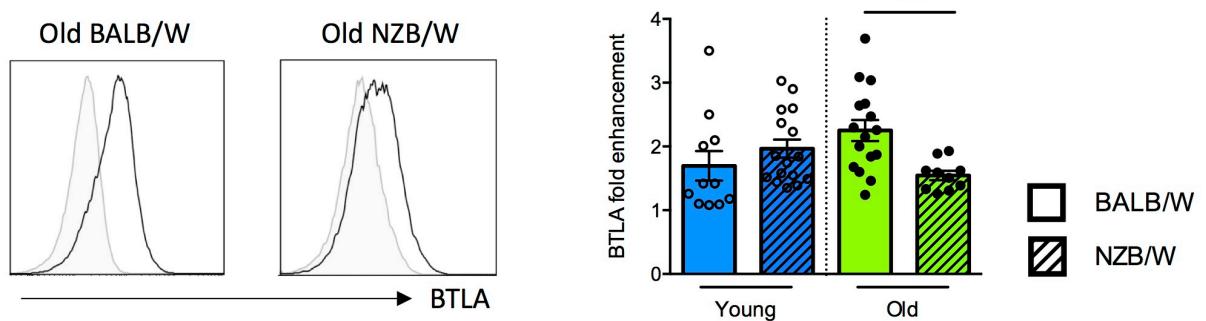
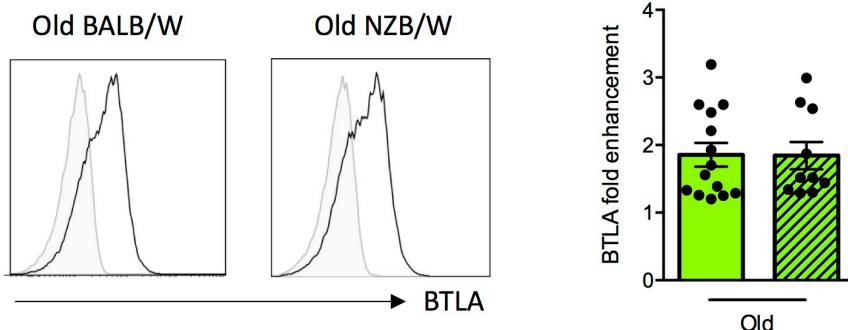
**Figure 2**

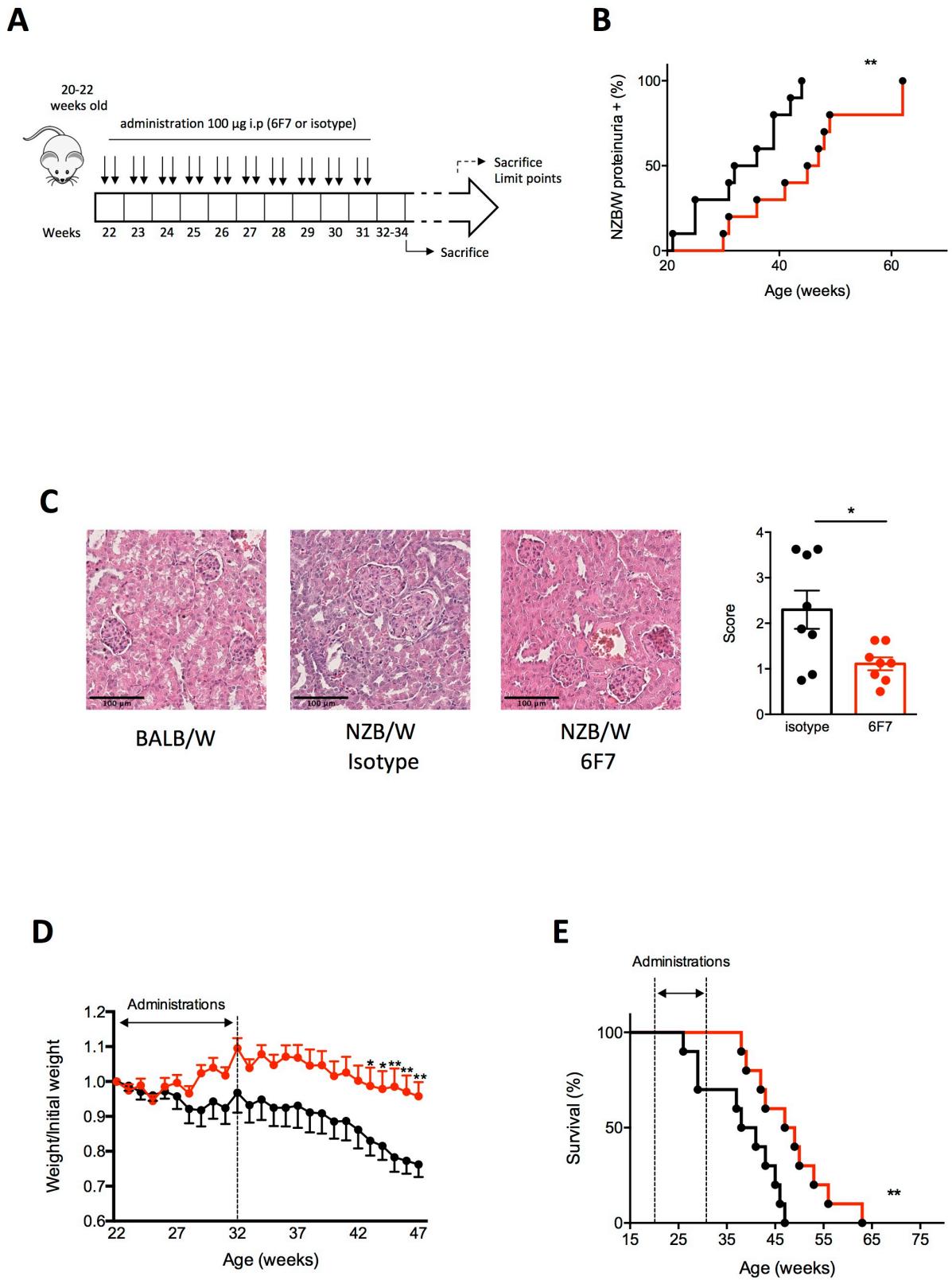


**Figure 3**

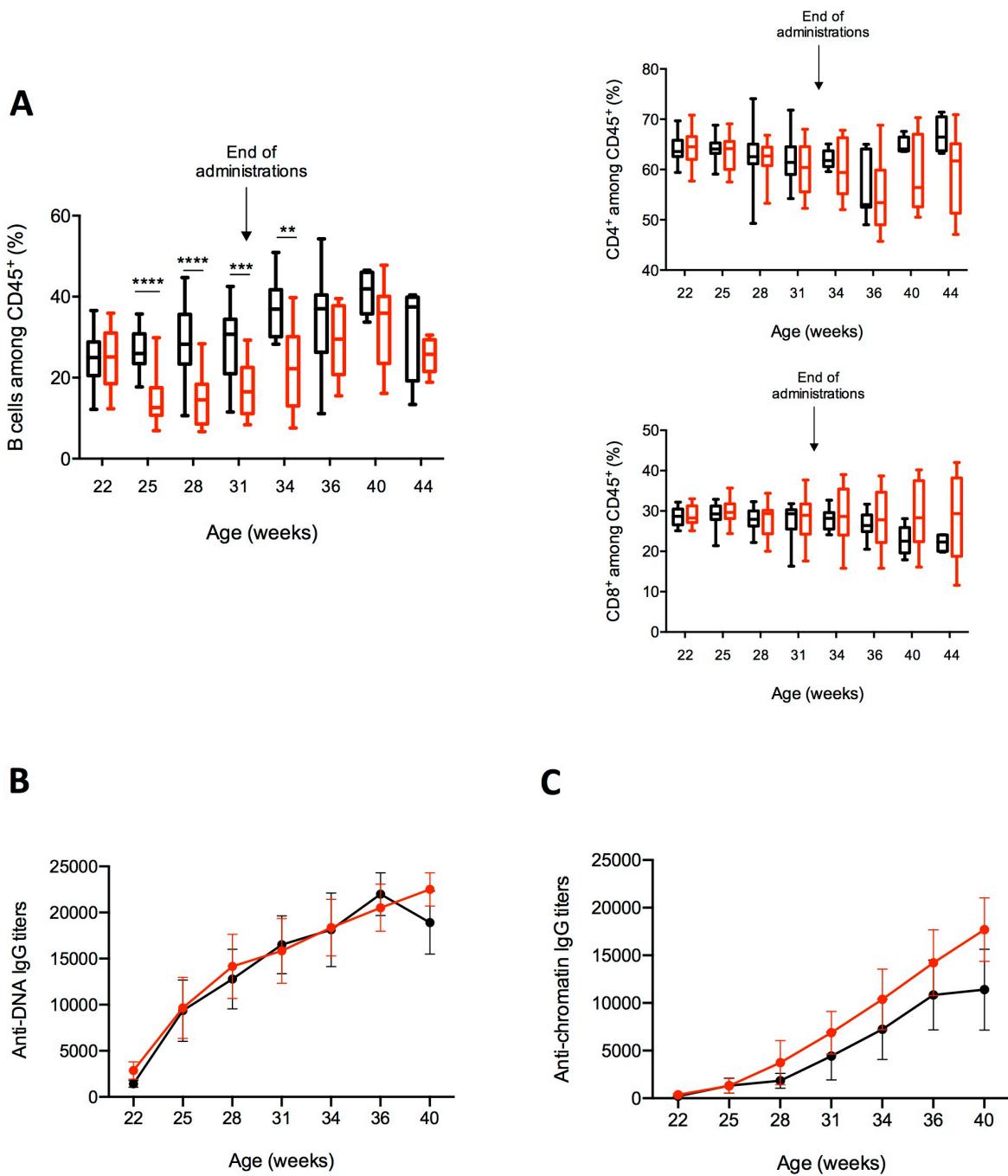


**Figure 4**

**A****B****Figure 5**



**Figure 6**



**Figure 7**



### III) Commentaires relatifs à la publication n°2 et résultats complémentaires (Les figures indiquées en italique font référence à la publication n°2)

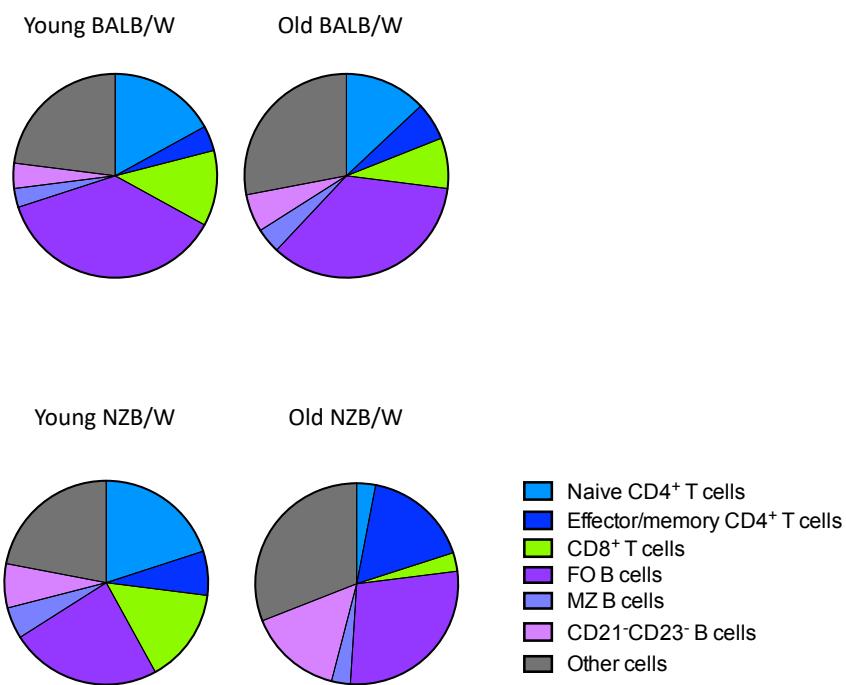
Le modèle murin spontané de lupus NZB/W présente de nombreuses caractéristiques biologiques et cliniques avec l'Homme, c'est pourquoi nous avons choisi ce modèle pour réaliser une étude phénotypique et fonctionnelle de BTLA. En parallèle, nous avons évalué le potentiel thérapeutique *in vivo* de l'administration d'un anticorps anti-BTLA dans ce modèle murin.

#### 1) Expression et fonction de BTLA *in vitro*

Nous avons confirmé que, comme montré dans la littérature (**Han et al., 2004**), BTLA est dix fois plus exprimé par les LB que par les LT (**Figure 1**). Concernant les LT, l'expression de BTLA est augmentée à la surface des LT CD4<sup>+</sup> naïfs et effecteurs/mémoires chez les souris NZB/W malades par rapport aux souris NZB/W jeunes (**Figure 1**). A propos des LB, nous avons mis en évidence que l'expression de BTLA est augmentée à la surface des LB MZ et des LB CD21<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup> chez les souris lupiques NZB/W jeunes et âgées par rapport aux souris contrôles du même âge (**Figure 1**).

Afin de faire le lien entre l'expression de BTLA et la fréquence des différentes populations lymphocytaires, nous avons comparé ces fréquences chez les souris jeunes et âgées. Comme décrit dans la littérature (**Karpouzas et al., 2004**), nous avons observé une diminution drastique de la fréquence des LT CD4<sup>+</sup> naïfs et une augmentation de la fréquence des LT CD4<sup>+</sup> effecteurs/mémoires chez les souris NZB/W âgées par rapport aux souris NZB/W jeunes mais également par rapport aux souris BALB/W âgées (**Figure 42**). Nous avons également montré que la fréquence des LB FO est diminuée alors que celle des LB CD21<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup> est augmentée chez les NZB/W âgées par rapport aux BALB/W du même âge (**Figure 42**). L'augmentation de l'expression de BTLA à la surface des LB CD21<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup> pourrait traduire un phénotype d'activation puisque ces cellules sont caractérisées comme étant des cellules « atypiques mémoires » (ABC, *cf Introduction partie B*). En effet, BTLA est exprimé par les cellules activées, et il a été décrit que les LB CD21<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup> expriment de nombreux marqueurs

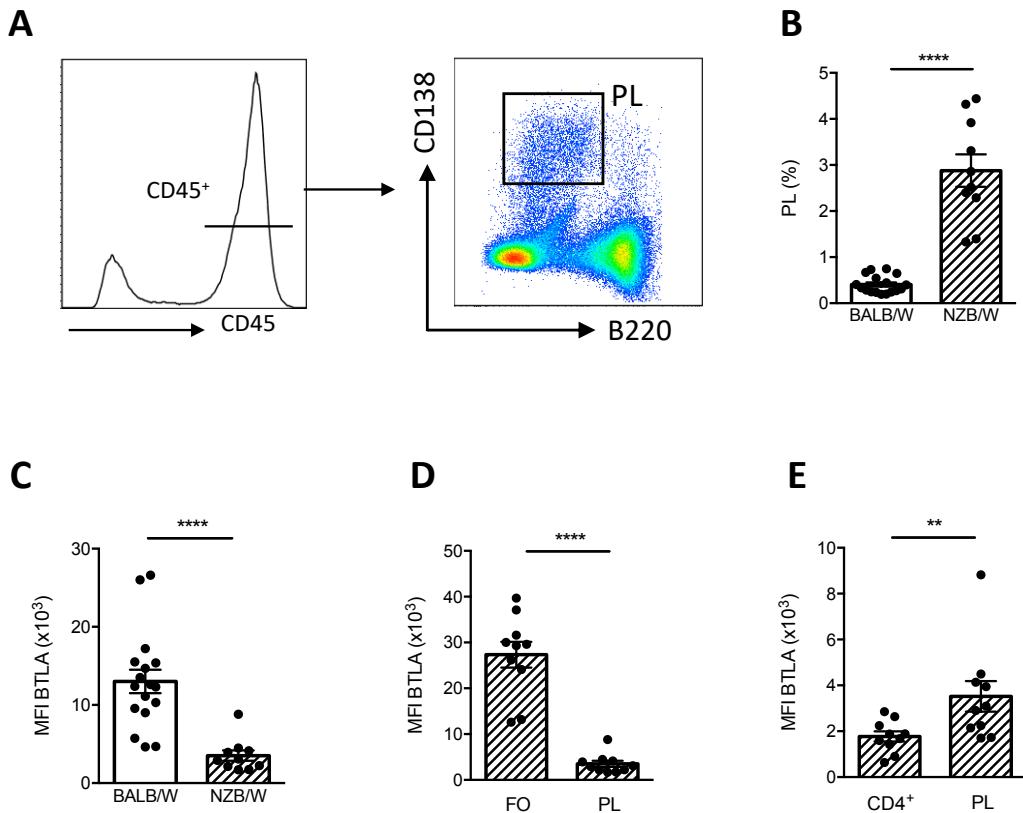
de cellules mémoires activées tels que Fas, CD11c, CD80, CD86 ou le CMH de classe II (**Hao et al., 2011; Rubtsov et al., 2011**).



**Figure 42.** La distribution des populations lymphocytaires est modifiée chez les souris NZB/W âgées. Les différentes sous-populations lymphocytaires ont été déterminées par cytométrie en flux, et sont exprimées en pourcentages de cellules parmi les cellules CD45<sup>+</sup>.

Chez l'Homme, et contrairement à d'autres récepteurs tels que CD20 ou CD22 (**Kehrl et al., 1994**), BTLA est exprimé par les cellules productrices d'anticorps, les PB ou PL (**Axelsson et al., 2020; Rodríguez-Bayona et al., 2010**). Les biothérapies anti-CD20 (rituximab) ou anti-CD22 (epratuzumab) ont présenté des résultats décevants dans le LES pouvant être expliqués par l'absence d'expression de ces récepteurs par les PB/PL. Chez la souris NZB/W âgée, et comme décrit dans la littérature, nous avons observé une augmentation de la fréquence des PL dans la rate des animaux par rapport aux BALB/W âgées ( $2,9\% \pm 0,4$  vs  $0,4\% \pm 0,1$ ) (**Figure 43 A-B**). De façon décevante, contrairement à l'Homme où BTLA est exprimé de façon similaire entre les patients lupiques et les individus sains par les PB, l'expression de BTLA est diminuée à la surface des PL de la rate chez les souris lupiques NZB/W âgées par rapport aux souris saines du même âge ( $MFI= 3522 \pm 669$  vs  $MFI= 13010 \pm 1508$ ) (**Figure 43C**). Toutefois, bien que BTLA soit beaucoup moins exprimé par les PL que par les LB FO chez les souris NZB/W âgées ( $MFI= 3522 \pm 669$  vs  $MFI= 27340 \pm 2811$ , **Figure 43D**), BTLA reste plus fortement exprimé

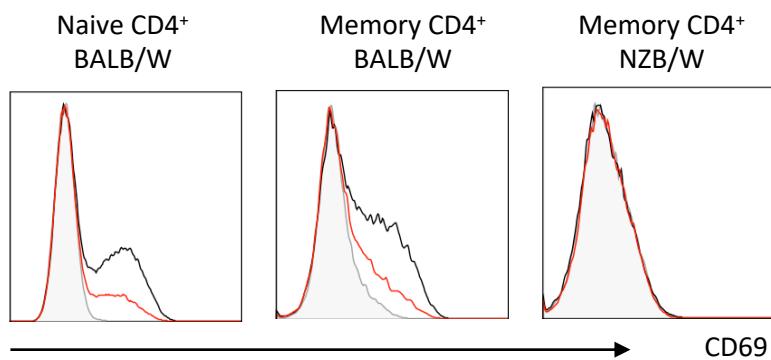
par les PL que par les LT CD4<sup>+</sup> (MFI= 3522 ± 669 vs MFI= 1774 ± 221, **Figure 43E**). Ces résultats restent donc encourageants quant à l'évaluation thérapeutique d'un traitement ciblant BTLA dans le lupus.



**Figure 43.** Les PL de souris NZB/W âgées expriment plus faiblement BTLA que les LB FO. (A) Exemple de marquage des plasmocytes (CD138<sup>hi</sup>B220<sup>low</sup>) dans la rate par cytométrie en flux. (B) Pourcentage de PL parmi les cellules CD45<sup>+</sup>. (C) Expression de BTLA par les PL chez les souris BALB/W (barres blanches, n=17) et NZB/W (barres hachurées, n=10) âgées. (D) Expression de BTLA par les LB FO et les PL chez les souris NZB/W âgées (n=10). (E) Expression de BTLA par les LT CD4<sup>+</sup> et les PL chez les souris NZB/W âgées (n=10). Chaque point représente une souris et les valeurs sont exprimées en pourcentage moyen ou MFI moyenne ± SEM. \*\*p<0,01 ; \*\*\*\*p<0,0001, Mann-Whitney test.

Nos résultats montrent que BTLA est exprimé de façon similaire à la surface des LT et des LB entre les souris lupiques NZB/W et les souris contrôles du même âge. Mais qu'en est-il de la fonctionnalité de BTLA ? Chez l'Homme, nous avons montré que *i)* l'expression *ex vivo* de BTLA à la surface des LT CD4<sup>+</sup> est identique entre les patients lupiques et les individus sains, mais que l'expression de BTLA après activation de ces cellules est moindre chez les patients lupiques, et que *ii)* les LT CD4<sup>+</sup> de patients lupiques présentent un défaut de fonctionnalité de BTLA (**Sawaf et al., 2018**). De façon intéressante, nous avons observé un défaut d'inhibition de l'activation des LT CD4<sup>+</sup> totaux chez les souris NZB/W âgées par rapport aux souris saines

de même âge (**Figure 3**), mais pas chez les souris NZB/W jeunes. Toutefois, la distribution des LT CD4<sup>+</sup> est fortement modifiée chez les souris NZB/W âgées par rapport aux souris jeunes ou aux souris contrôles (**Figure 4**). En effet, les souris lupiques âgées présentent une majorité de cellules effectrices/mémoires alors que les LT CD4<sup>+</sup> de souris contrôles ont majoritairement un phénotype de cellules naïves. Après purification cellulaire des LT CD4<sup>+</sup> naïfs, nous n'observons plus de défaut de la voie de signalisation de BTLA (**Figure 4**), suggérant que cette altération est restreinte aux LT CD4<sup>+</sup> effecteurs/mémoires. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons souhaité évaluer la fonctionnalité de BTLA sur des cellules mémoires de souris NZB/W et BALB/W âgées purifiées. Si les LT CD4<sup>+</sup> mémoires de souris BALB/W ont pu être activés efficacement, ceux des souris NZB/W n'ont pas été activés dans nos conditions, comme le démontre la non-expression de CD69 après activation (**Figure 4**).



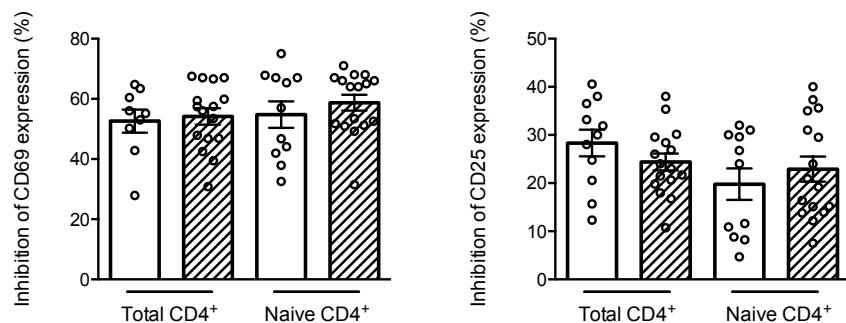
**Figure 4.** Les LT CD4<sup>+</sup> effecteurs/mémoires de souris NZB/W âgées ne s'activent pas efficacement. Les LT CD4<sup>+</sup> ont été activés par des billes adsorbées par des anticorps anti-CD28 et anti-CD3 et un anticorps isotypique (noir) ou avec l'anticorps anti-BTLA (rouge) pendant 24h et l'expression de CD69 a été déterminée par cytométrie en flux. Des cellules non stimulées sont représentées en gris pour comparaison.

Toutefois, cette observation est cohérente avec les données de la littérature. En effet, les LT CD4<sup>+</sup> effecteurs/mémoires de souris NZB/W âgées prolifèrent peu et sont peu sensibles à une stimulation *in vitro* (**Kasagi et al., 2010**). Il faudra donc adapter dans le futur la stimulation des LT CD4<sup>+</sup> mémoires afin d'étudier la fonctionnalité de BTLA dans ces cellules.

Comme précisé précédemment, l'expression de BTLA n'est pas correctement augmentée après activation des LT CD4<sup>+</sup> chez les patients lupiques (**Sawaf et al., 2018**), et nous avons observé le même phénomène dans les LT CD4<sup>+</sup> totaux de souris lupiques NZB/W âgées par rapport à des souris contrôles BALB/W du même âge (**Figure 5**). Ce résultat indique

que le défaut de fonctionnalité de la voie de signalisation de BTLA que nous avons observé pourrait être dû à une augmentation de l'expression de BTLA altérée après activation. En effet, pour que l'activation des LT CD4<sup>+</sup> soit inhibée, l'expression membranaire de BTLA doit être augmentée, et BTLA doit être localisé à proximité du TCR pour induire la déphosphorylation de protéines impliquées dans la voie de signalisation du TCR (**Watanabe et al., 2003**). La proximité entre ces deux molécules représente alors un paramètre essentiel de l'inhibition de l'activation médiée par BTLA. Chez l'Homme, le défaut de fonctionnalité de BTLA observé dans les LT CD4<sup>+</sup> de patients lupiques est dû à un mauvais recrutement de BTLA au niveau des clusters de TCR dans les radeaux lipidiques après activation, empêchant ainsi l'inhibition de la voie du TCR dépendante de BTLA (**Sawaf et al., 2018**). Chez la souris, BTLA est majoritairement localisé au niveau de l'appareil de Golgi et des lysosomes dans les LT CD4<sup>+</sup> à l'état basal. Après activation, BTLA est transloqué à la surface des cellules, est accumulé au niveau de la synapse immunologique, et colocalise avec le TCR (**Owada et al., 2010**). Il sera donc intéressant d'étudier par microscopie confocale la localisation de BTLA dans les LT CD4<sup>+</sup> de souris NZB/W avant et après activation afin de savoir si le défaut de fonctionnalité de BTLA que nous avons observé est en partie dû à un mécanisme similaire à celui observé chez l'Homme.

Nos résultats ont également montré que nous n'observons pas de défaut de fonctionnalité dans les LT CD4<sup>+</sup> totaux de souris NZB/W jeunes (**Figure 3**). Puisque, contrairement aux souris NZB/W âgées, les LT CD4<sup>+</sup> de souris NZB/W jeunes sont majoritairement des cellules naïves, nous n'avons observé aucun défaut de fonctionnalité de BTLA dans les LT CD4<sup>+</sup> naïfs de souris jeunes (**Figure 45**).



**Figure 45. La fonctionnalité de BTLA n'est pas altérée chez les souris NZB/W jeunes.** Les LT CD4<sup>+</sup> de jeunes souris BALB/W (barres blanches,  $n=9-11$ ) ou NZB/W (barres hachurées,  $n=16$ ) ont été activés par des billes adsorbées par des anticorps anti-CD28 et anti-CD3 en présence d'un anticorps anti-BTLA ou d'un anticorps isotypique pendant 24h et l'expression de CD69 et de CD25 ont été déterminées par cytométrie en flux. Chaque point représente une souris et les valeurs sont exprimées en pourcentage moyen  $\pm$  SEM.

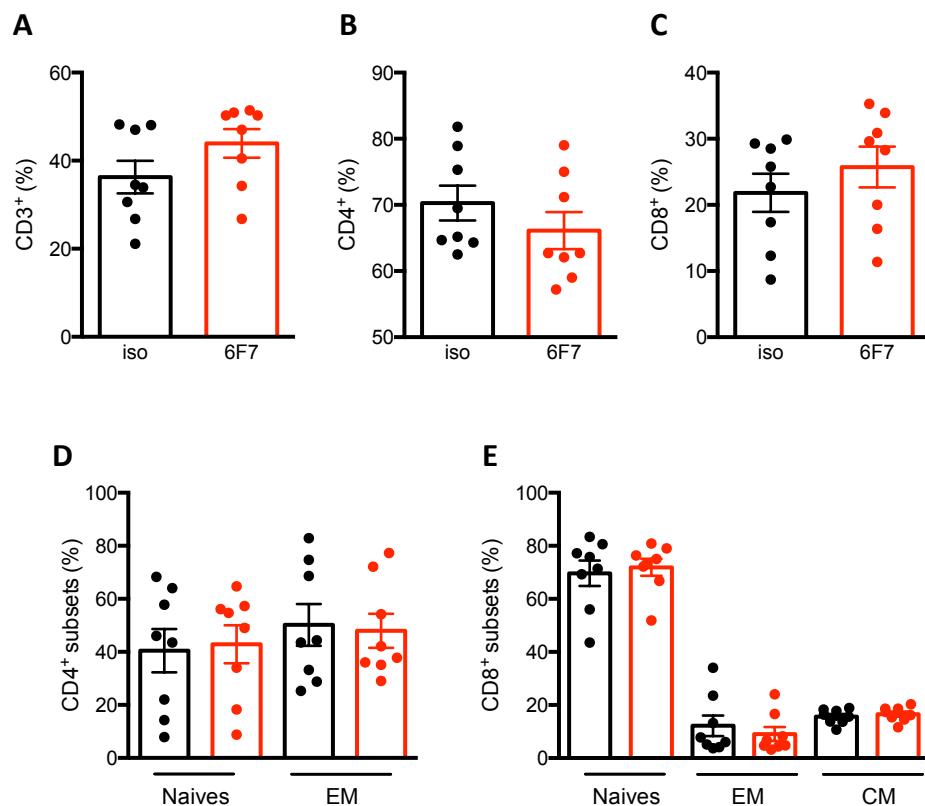
Ces résultats confirment que le défaut de fonctionnalité de BTLA se développe au cours de la maladie et est spécifique aux NZB/W puisque l'inhibition de l'activation et de la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> de souris contrôles BALB/W jeunes est similaire à celle des souris contrôles âgées (**Figure 3**).

En résumé, nous avons montré que BTLA est globalement exprimé de façon similaire à la surface des LT et des LB chez les souris NZB/W et BALB/W, excepté à la surface des PL où l'expression de BTLA est diminuée chez les souris NZB/W âgées. Toutefois, nous avons observé une augmentation de l'expression de BTLA sur certaines populations lymphocytaires avec l'âge, à la fois chez les souris lupiques, et chez les souris contrôles. Nous avons également mis en évidence un défaut de fonctionnalité de la voie de BTLA restreint aux LT CD4<sup>+</sup> mémoires de souris NZB/W malades. Le profil phénotypique et fonctionnel observé chez la souris NZB/W présente donc de nombreuses similitudes avec celui retrouvé chez les patients lupiques. C'est pourquoi nous avons entrepris d'évaluer le potentiel thérapeutique du ciblage de BTLA *in vivo* dans ce modèle murin spontané de lupus, la souris NZB/W.

## 2) Évaluation du potentiel thérapeutique du ciblage de BTLA *in vivo*

Nous avons donc administré l'anticorps anti-BTLA 6F7 ou un anticorps isotypique à des souris NZB/W âgées de 20 à 22 semaines, âge auquel les souris n'ont pas encore développé les symptômes cliniques de la maladie, mais où les auto-Ac commencent à être détectés dans le sérum. L'administration de l'anticorps anti-BTLA a induit un retard de l'apparition de la protéinurie, une diminution des dommages tissulaires rénaux, ainsi qu'une augmentation de la survie de ces souris (**Figure 6**). De plus, nous avons observé une diminution de la fréquence des LB circulants au cours du traitement, mais pas des LT CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> (**Figure 7**). Par ailleurs, nous n'avons pas observé de différence concernant les taux d'auto-Ac anti-ADN ou anti-chromatine entre les souris traitées par l'anticorps anti-BTLA et les souris traitées par un anticorps isotypique (**Figure 7**). L'augmentation de la survie et le retard d'apparition de la protéinurie est de 10 semaines chez les souris traitées avec l'anticorps anti-BTLA comparées à celles ayant reçu l'isotype. Ce décalage correspond à la durée des administrations, suggérant que ce traitement nécessiterait une administration continue pour être efficace dans le temps.

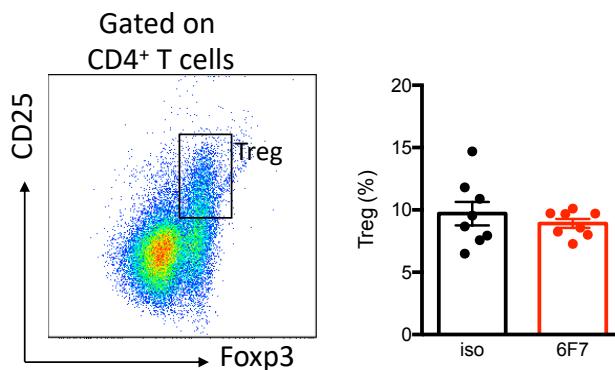
Afin de savoir si l'administration de l'anticorps anti-BTLA modifie la distribution des populations lymphocytaires dans la rate ou les ganglions, nous avons analysé la fréquence de différentes populations dans ces organes par cytométrie en flux. La fréquence des LT CD3<sup>+</sup> totaux (**Figure 46A**), CD4<sup>+</sup> (totaux, naïfs et effecteurs/mémoires, **Figure 46 B et D**), ou CD8<sup>+</sup> (totaux, naïfs, effecteurs/mémoires, et centraux mémoires, **Figure 46 C et E**) est similaire entre les souris ayant reçu l'anticorps anti-BTLA et les souris ayant reçu l'anticorps isotypique, que ce soit dans la rate (**Figure 46**) ou dans les ganglions (résultats non montrés). Toutefois, nous avons remarqué que l'expression de BTLA semble diminuer à la surface des LT CD3<sup>+</sup> et des LT CD4<sup>+</sup>, alors qu'elle reste stable à la surface des LT CD8<sup>+</sup> (résultats non montrés).



**Figure 46.** La fréquence des LT ne semble pas modifiée chez les souris ayant reçu l'anticorps anti-BTLA. (A) Fréquence de LT CD3<sup>+</sup> totaux, (B) de LT CD4<sup>+</sup> parmi les LT CD3<sup>+</sup>, (C) de LT CD8<sup>+</sup> parmi les LT CD3<sup>+</sup>, (D) des sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> parmi les LT CD4<sup>+</sup>, et (E) des sous-populations de LT CD8<sup>+</sup> parmi les LT CD8<sup>+</sup> dans la rate des souris NZB/W ayant reçu un anticorps isotypique (barres noires, n=8) ou l'anticorps anti-BTLA (barres rouges, n=8) pendant 10 semaines, deux fois par semaine. Chaque point représente une souris et les valeurs sont exprimées en pourcentage moyen ± SEM. EM : Effecteur/mémoires ; CM : Centraux mémoires.

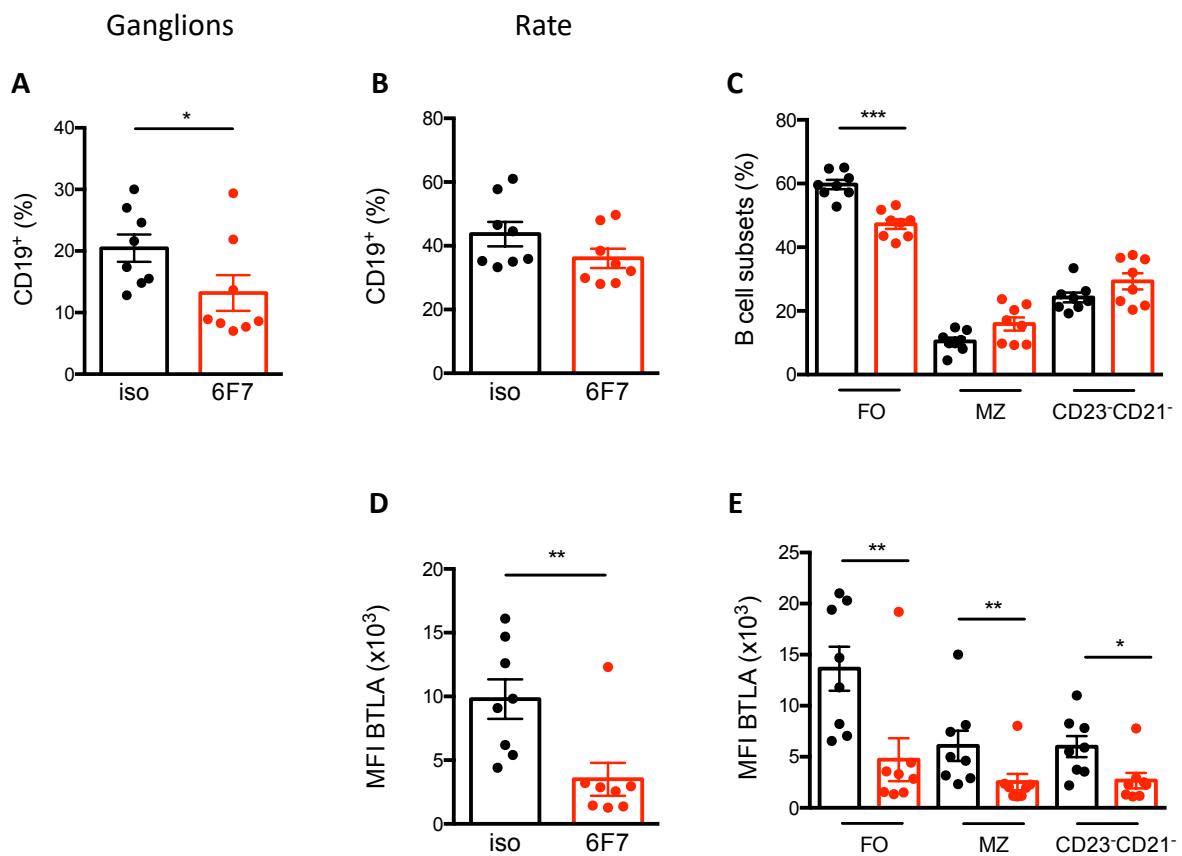
Comme indiqué précédemment, l'administration du clone 6F7 de l'anticorps anti-BTLA à des souris NOD induit une déplétion des LB qui expriment fortement BTLA. Ce traitement

engendre également une augmentation de la fréquence des Tregs dans la rate car ces cellules expriment peu BTLA et pourraient donc être moins ciblées par l'anticorps anti-BTLA (**Truong et al., 2009**). De même, l'administration de l'anticorps agoniste de BTLA 3C10 dans un contexte d'allogreffe, augmente la proportion de Tregs dans la rate (**Uchiyama et al., 2014**). Cependant dans notre modèle, nous n'avons pas observé d'augmentation de la fréquence des Tregs dans la rate ( $8,9\% \pm 0,4$  vs  $9,7\% \pm 0,9$ , **Figure 47**), ni dans les ganglions des animaux ayant reçu l'anticorps anti-BTLA.



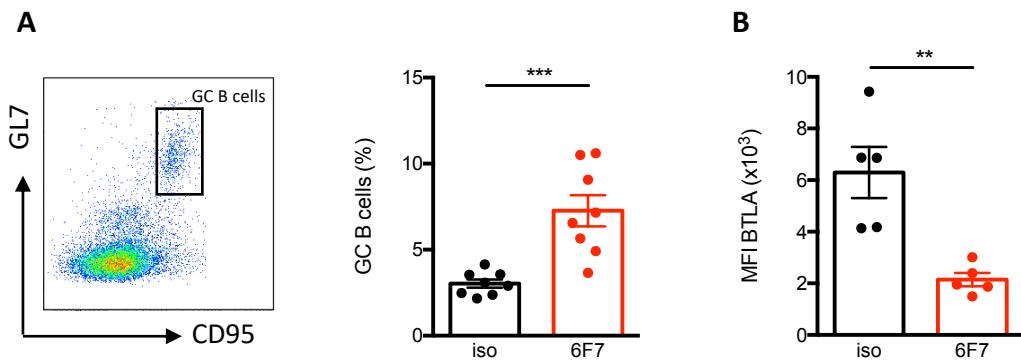
**Figure 47. La fréquence des Tregs n'est pas modifiée par le traitement anti-BTLA.** Exemple de marquage (à gauche) et fréquence des Tregs parmi les LT CD4<sup>+</sup> (à droite) déterminés par cytométrie en flux dans la rate de souris NZB/W ayant reçu un anticorps isotypique (barres noires,  $n=8$ ) ou l'anticorps anti-BTLA (barres rouges,  $n=8$ ) pendant 10 semaines, deux fois par semaine. Chaque point représente une souris et les valeurs sont exprimées en pourcentage moyen  $\pm$  SEM.

Au cours du traitement, nous avons observé une diminution de la fréquence des LB circulants (**Figure 7**). Après euthanasie des souris, nous avons mis en évidence une diminution significative de la fréquence des LB dans les ganglions ( $13,2\% \pm 2,9$  vs  $20,5\% \pm 2,2$ , **Figure 48A**) et une tendance à la diminution dans la rate ( $36,1\% \pm 3$  vs  $43,7\% \pm 3,8$ , **Figure 48B**) chez les souris traitées avec l'anticorps anti-BTLA. Même si la fréquence des LB totaux n'est pas significativement diminuée dans la rate, nous avons observé une diminution significative de la fréquence des LB FO ( $47,2\% \pm 1,5$  vs  $59,7\% \pm 1,4$ , **Figure 48C**) qui expriment fortement BTLA. Ce résultat est corrélé avec une forte diminution de l'expression de BTLA par LB totaux (MFI =  $3501 \pm 1287$  vs  $9791 \pm 1543$ ) (**Figure 48D**), mais également par les trois sous-populations de LB (**Figure 48E**).



**Figure 48.** L’administration de l’anticorps anti-BTLA induit une déplétion partielle des LB et la diminution de l’expression de BTLA par les LB. (A-B) Fréquence des LB dans les ganglions (A) ou dans la rate parmi les cellules CD45<sup>+</sup> (B). (C) Fréquence des sous-populations de LB parmi les LB dans la rate. (D) Expression de BTLA par les LB totaux ou (E) par les sous-populations de LB dans la rate des souris NZB/W ayant reçu un anticorps isotypique (barres noires, n=8) ou l’anticorps anti-BTLA (barres rouges, n=8) pendant 10 semaines, deux fois par semaine. La fréquence des cellules et l’expression de BTLA ont été déterminés par cytométrie en flux. Chaque point représente une souris et les valeurs sont exprimées en pourcentage moyen ou MFI moyenne  $\pm$  SEM. \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001, Mann-Whitney test.

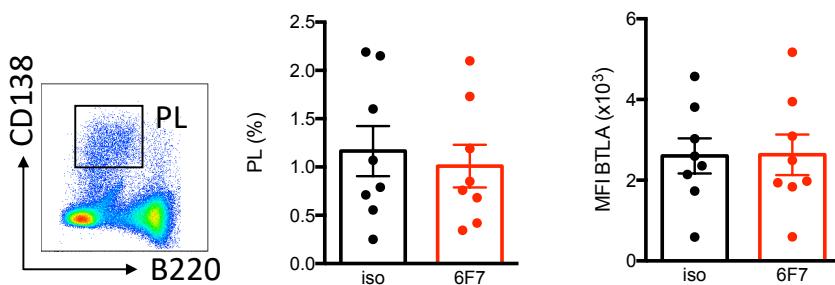
De façon surprenante, nous avons observé une augmentation de la fréquence des LB du centre germinatif (LB GC, CD95<sup>+</sup>GL7<sup>+</sup>) dans la rate ( $7,3\% \pm 0,9$  vs  $3,0 \pm 0,2$ , **Figure 49A**) et les ganglions (résultats non montrés) des souris ayant reçu l’anticorps anti-BTLA. De plus, l’expression de BTLA à la surface de ces cellules est fortement diminuée, comme observé pour les autres sous-populations de LB (MFI=  $2100 \pm 259$  vs MFI=  $6294 \pm 990$ , **Figure 49B**). Ce résultat est décevant puisque nous espérions mettre en lumière une diminution de la fréquence de ces cellules particulièrement pathogènes dans le LES. En effet, les LB du GC correspondent aux LB qui se différencient en cellules sécrétrices d’auto-Ac à forte affinité.



**Figure 49.** L’administration de l’anticorps anti-BTLA induit l’augmentation de la fréquence des LB du centre germinatif. (A) Exemple de marquage (à gauche), fréquence de LB du GC parmi les LB (à droite) et (B) expression de BTLA par les LB du GC dans la rate de souris NZB/W ayant reçu un anticorps isotypique (barres noires, n=5-8) ou l’anticorps anti-BTLA (barres rouges, n=5-8) pendant 10 semaines, deux fois par semaine. La fréquence des cellules et l’expression de BTLA ont été déterminés par cytométrie en flux. Chaque point représente une souris et les valeurs sont exprimées en pourcentage moyen ou MFI moyenne  $\pm$  SEM. \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001, Mann-Whitney test.

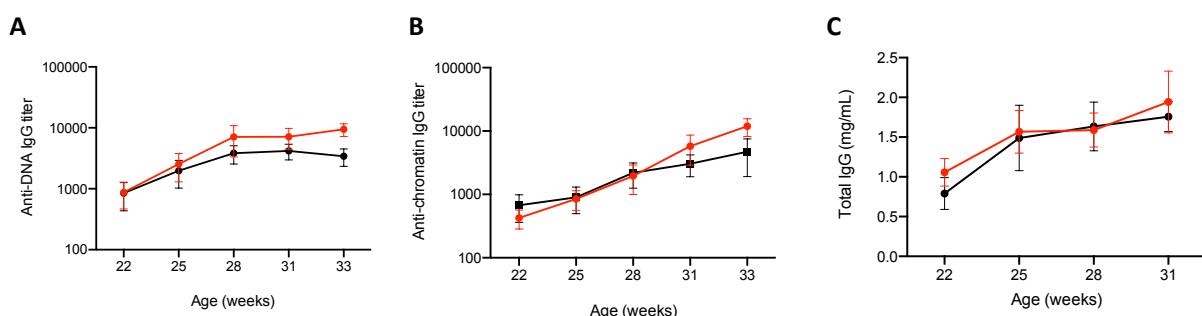
Toutefois, l’augmentation de la fréquence des LB du GC pourrait traduire d’un phénomène de compensation entre les différentes sous-populations de LB. Il sera donc intéressant de vérifier l’état d’activation de ces cellules afin de savoir si elles sont fonctionnelles ou anergiques. De plus, nous pourrions également étudier la fréquence et l’état d’activation des T<sub>FH</sub>, puisque ces cellules sont impliquées dans la différenciation des LB du GC en LB mémories ou en PL. Chez la souris, BTLA est fortement exprimé par les T<sub>FH</sub> (**Kashiwakuma et al., 2010**). De plus, il a été montré récemment que l’engagement de BTLA exprimé par les T<sub>FH</sub> via HVEM exprimé par les LB du GC, inhibe l’activation de la voie de signalisation du TCR des T<sub>FH</sub>, et ainsi l’expression de CD40L à leur surface. Ce phénomène réduit alors la co-stimulation apportée aux LB et inhibe la prolifération de ces cellules (**Mintz et al., 2019**). Dans notre étude, nous avons remarqué que l’anticorps 6F7 cible particulièrement les cellules exprimant fortement BTLA en réduisant l’expression de ce récepteur à leur surface. La liaison de l’anticorps 6F7 à BTLA exprimé par les T<sub>FH</sub>, conduisant à la réduction de l’expression de BTLA par ces cellules, pourrait expliquer l’augmentation de la fréquence des LB du GC chez les souris ayant reçu l’anticorps anti-BTLA. En effet, l’interaction entre HVEM à la surface des LB et BTLA à la surface des T<sub>FH</sub> se trouverait limitée, et n’induirait plus de réduction de la co-stimulation *via* l’axe CD40/CD40L, entraînant ainsi la prolifération des LB du GC.

Au vu des résultats obtenus sur les LT et les LB, l'anticorps anti-BTLA semble cibler particulièrement les cellules exprimant fortement BTLA. Chez la souris, les PL expriment assez faiblement BTLA par rapport aux LB FO. De façon décevante, mais non surprenante au regard du niveau d'expression de BTLA par ces cellules, nous n'avons pas observé de diminution de la fréquence des PL ( $1\% \pm 0,2$  vs  $1,2\% \pm 0,3$ ), ni de diminution de l'expression de BTLA (MFI=  $2631 \pm 502$  vs  $2604 \pm 435$ ) par ces cellules dans la rate des souris traitées par l'anticorps anti-BTLA (**Figure 50**).



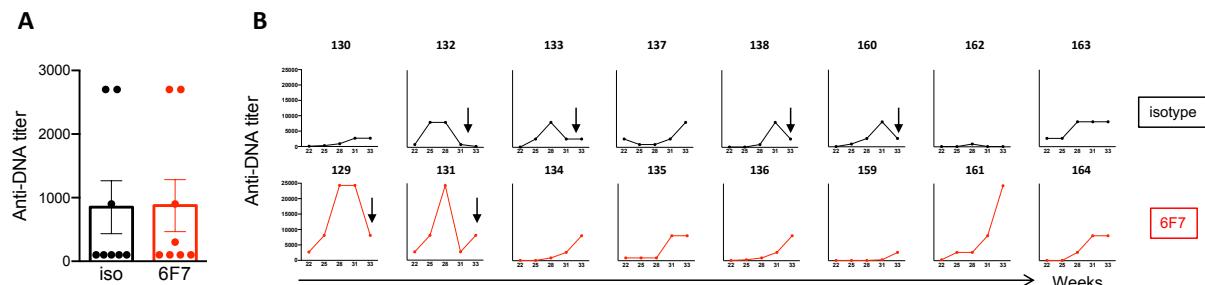
**Figure 50.** La fréquence des PL n'est pas modifiée dans la rate des animaux traités. Exemple de marquage (à gauche), fréquence des PL parmi les cellules CD45<sup>+</sup> (au milieu), et expression de BTLA par les PL (à droite) déterminés par cytométrie en flux dans la rate de souris NZB/W ayant reçu un anticorps isotypique (barres noires,  $n=8$ ) ou l'anticorps anti-BTLA (barres rouges,  $n=8$ ) pendant 10 semaines, deux fois par semaine. Chaque point représente une souris et les valeurs sont exprimées en pourcentage moyen ou MFI moyenne  $\pm$  SEM.

En accord avec ces résultats, nous n'avons pas observé de différence concernant les titres sériques d'auto-Ac anti-ADNdb (**Figure 51A**), anti-chromatine (**Figure 51B**), ni au niveau de la concentration en IgG total entre les deux groupes de souris euthanasiées une semaine après la fin des administrations (**Figure 51C**).



**Figure 51.** L'administration de l'anticorps anti-BTLA n'induit pas de diminution de la production d'auto-anticorps dans le sérum. (A) Titre d'auto-anticorps IgG anti-ADNdb, (B) titre d'auto-anticorps IgG anti-chromatine, ou (C) concentration en IgG total dans le sérum de souris NZB/W ayant reçu un anticorps isotypique (barres noires,  $n=8$ ) ou l'anticorps anti-BTLA (barres rouges,  $n=8$ ) pendant 10 semaines, deux fois par semaine. Les titres en auto-anticorps et la concentration en IgG total ont été déterminés par ELISA. Chaque point représente une souris et les valeurs sont exprimées en titre moyen ou concentration moyenne  $\pm$  SEM.

Ces résultats indiquent que notre protocole thérapeutique pourrait être insuffisant pour éliminer les PL à longue durée de vie qui peuvent déjà s'être différenciés chez des souris âgées de 20 à 22 semaines. En effet, deux des souris traitées par l'anticorps anti-BTLA (n°129 et n°131) présentaient des titres en auto-Ac anti-ADN déjà conséquents (titre de 2700) avant le début du traitement (**Figure 52A**). En revanche, si l'on analyse en détail la cinétique des titres d'auto-Ac anti-ADNdb dans les deux groupes de souris, on remarque que plusieurs souris ayant reçu l'anticorps isotypique (n°132, n°133, n°138 et n°160) voient leur titre chuter à l'âge de 31 à 33 semaines (**Figure 52B**), âge auquel la protéinurie commence à se déclarer. De plus, nous avons remarqué que les titres d'auto-Ac anti-ADNdb diminuent chez les deux seules souris (n°129 et n°131) ayant reçu l'anticorps anti-BTLA, ayant des titres d'auto-Ac élevés avant le début des administrations et ayant déclaré de la protéinurie avant euthanasie (**Figure 52C**). La majorité des autres souris de ce groupe ont en revanche un titre en auto-Ac anti-ADN assez stable au cours du traitement.

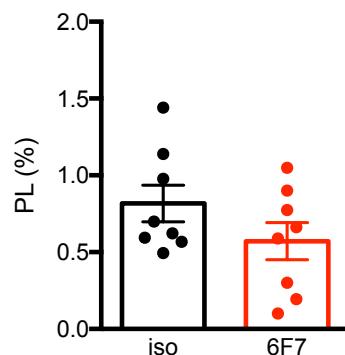


**Figure 52.** Le titre en auto-anticorps anti-ADNdb reste stable chez les souris NZB/W traitées par l'anticorps anti-BTLA. (A) Titre en auto-anticorps anti-ADNdb avant le début des administrations. (B) Titre en auto-anticorps anti-ADNdb chez les souris NZB/W ayant reçu un anticorps isotypique (en haut en noir, n=8) ou l'anticorps anti-BTLA (en bas, en rouge, n=8) au cours du traitement. Les flèches représentent la chute du taux sérique en auto-anticorps. Les titres en auto-anticorps ont été déterminés par ELISA. Chaque point représente une souris et les valeurs sont exprimées en titre moyen ± SEM.

La diminution du titre d'auto-Ac chez les souris contrôles ou chez les deux souris administrées avec l'anticorps anti-BTLA ayant développé de la protéinurie, est un résultat intéressant car il est suggéré que les auto-Ac se déposent dans les reins au cours de la maladie et que ce phénomène induit la diminution du taux d'auto-Ac détectable dans le sérum (**Wang et al., 2003**). Nos résultats suggèrent que chez les souris traitées par l'anticorps anti-BTLA, les auto-Ac qui restent détectables dans le sérum, ne se déposent pas (ou moins) dans les reins, ce qui participerait à la diminution des dommages tissulaires observés au niveau de cet organe

(**Figure 6**). Cette hypothèse reste cependant à vérifier en réalisant un marquage des IgG dans les reins des souris par microscopie.

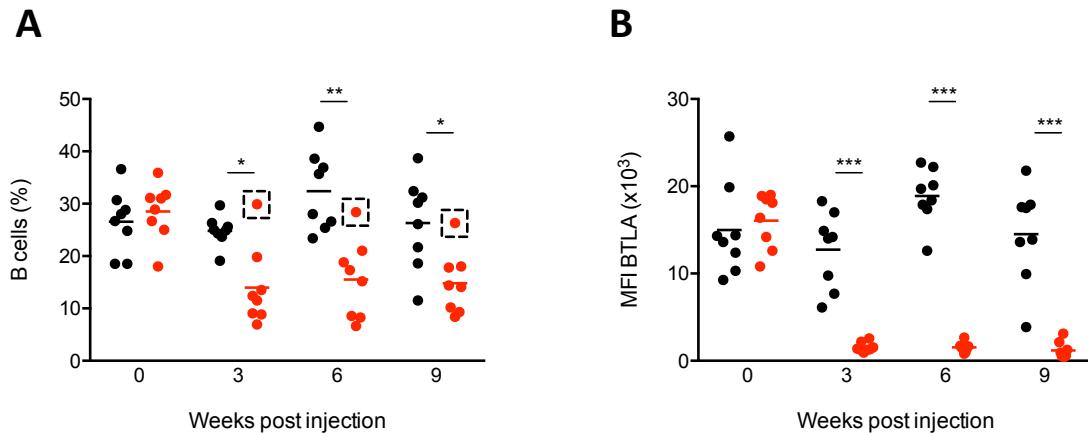
Par ailleurs, il a été montré que les auto-Ac pathogènes sont en grande partie produits localement par des PL sécréteurs d'auto-Ac au niveau des reins (**Espeli et al., 2011**). Nous avons donc évalué la présence de PL dans les reins dans nos deux groupes de souris par cytométrie. De façon intéressante, la fréquence de PL parmi les cellules hématopoïétiques CD45<sup>+</sup> présentes au niveau des reins, semble plus faible chez les souris traitées par l'anticorps anti-BTLA que chez les souris traitées par l'anticorps isotypique (valeurs allant de 0,10% à 1,05%, et moyenne de  $0,57\% \pm 0,12$  pour les souris ayant reçu le 6F7 vs valeurs allant de 0,49% à 1,44%, et moyenne de  $0,82\% \pm 0,12$  pour les souris ayant reçu le contrôle isotypique), bien que la fréquence ne soit pas significativement différente entre les deux groupes ( $p=0,3231$ , **Figure 53**). Ce résultat encourageant sera à confirmer en incluant notamment un plus grand nombre de souris à notre étude.



**Figure 53.** La fréquence des PL semble diminuer dans les reins de souris NZB/W traitées par l'anticorps anti-BTLA. Un demi-rein de chaque animal a été finement coupé et digéré pendant 45 min à 37°C par de la collagénase D (0,5 mg/ml, Roche) et de la DNase I (0,05 mg/ml, Roche) dans du milieu RPMI complet. Les fragments de reins ont ensuite été broyés mécaniquement et filtrées sur un tamis de 40µm, lavées, et resuspendus dans une solution de Percoll 36%. Cette solution a été déposée sur une solution de Percoll 72%, puis les cellules ont été isolées par centrifugation à 400g pendant 30 min. La phase enrichie en leucocytes a ensuite été prélevée, lavée, et les PL ont été marqués et analysés par cytométrie en flux parmi les cellules CD45<sup>+</sup>. Chaque point représente une souris et les valeurs sont exprimées en pourcentage moyen  $\pm$  SEM.

Comme présenté précédemment, deux souris traitées par l'anticorps anti-BTLA présentaient des titres élevés d'auto-Ac anti-ADNdb avant le début des administrations. Parmi ces deux souris, l'une d'elle (souris NZB/W n°129, encadrée en pointillés dans les figures ci-après) n'a pas vu sa fréquence de LB circulants diminuer (26,3% pour la souris 129, 9 semaines

après le début des injections vs  $14,8\% \pm 2,1$  pour les autres souris du même groupe, **Figure 54A**).

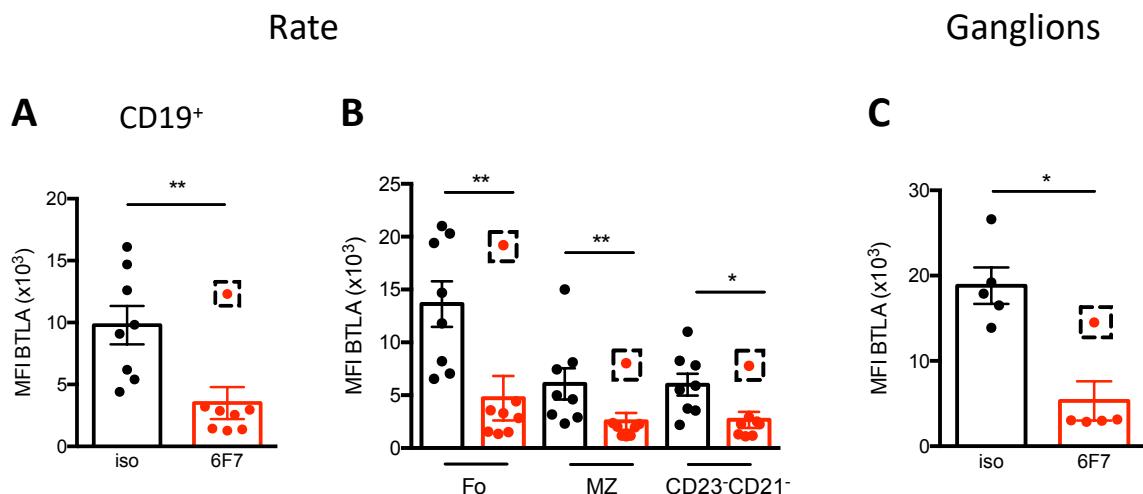


**Figure 54.** La souris 129 ne semble pas avoir réagi au traitement. (A) Fréquence des LB parmi les cellules CD45<sup>+</sup> dans le sang et (B) expression de BTLA par ces cellules au cours du traitement chez les souris NZB/W ayant reçu un anticorps isotypique (points noirs,  $n=8$ ) ou l'anticorps anti-BTLA (points rouges,  $n=8$ ) pendant 10 semaines, deux fois par semaine. La fréquence des cellules et l'expression de BTLA ont été déterminées par cytométrie en flux. Chaque point représente une souris et les valeurs sont exprimées en pourcentage moyen ou MFI moyenne  $\pm$  SEM \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ , Mann-Whitney test. La souris 129 est encadrée.

Toutefois, le niveau d'expression de BTLA à la surface des LB de cette souris est diminué de façon similaire aux autres souris traitées par l'anticorps anti-BTLA (**Figure 54B**), suggérant que l'anticorps s'est fixé à sa cible, tout du moins en périphérie.

Le phénotypage de la rate et des ganglions après euthanasie des souris, a montré que l'expression de BTLA par les LB totaux (MFI=  $3501 \pm 1287$  vs MFI=  $9791 \pm 1543$ , **Figure 55A**), et par les trois sous-populations de LB (MFI=  $4723 \pm 2106$  vs MFI=  $13630 \pm 2152$  pour les LB FO ; MFI=  $2523 \pm 808$  vs MFI=  $6073 \pm 1473$  pour les LB MZ ; MFI=  $2669 \pm 767$  vs MFI=  $5998 \pm 1027$  pour les LB CD21<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup>, **Figure 55B**) est plus faible chez les souris ayant reçu l'anticorps anti-BTLA que chez les souris ayant reçu l'anticorps isotypique. Cependant, nous avons observé que les LB de la souris 129 dans la rate (**Figure 55 A-B**) et les ganglions (**Figure 55C**), expriment BTLA de façon similaire aux souris ayant reçu l'anticorps isotypique (MFI= 12300 dans la rate, et MFI= 14500 dans les ganglions). En conclusion, bien que nous ayons observé une diminution de l'expression de BTLA à la surface des LB périphériques, l'expression de BTLA

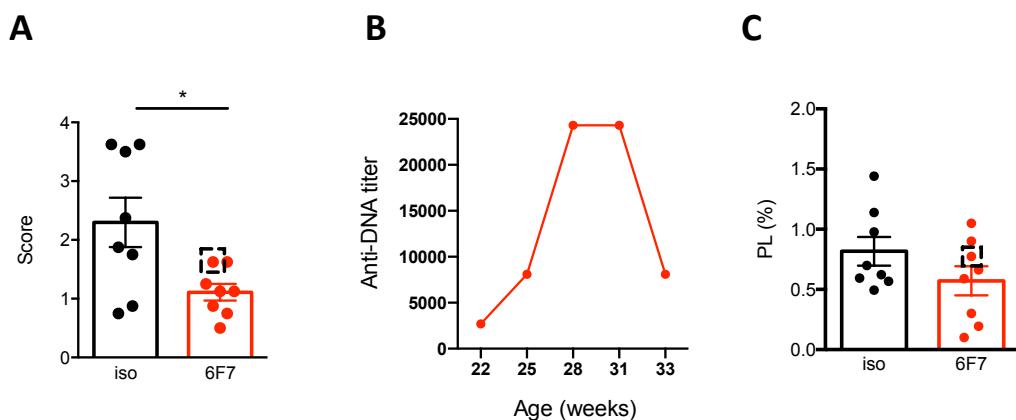
et la fréquence des LB ne sont pas réduites chez la souris 129 dans les OLS, indiquant que cette souris ne semble pas avoir réagi au traitement.



**Figure 55.** La souris 129 ne voit pas son expression de BTLA par les LB diminuer dans les OLS. (A) Expression de BTLA par les LB de la rate, (B) par les sous-populations de LB dans la rate, ou (C) par les LB des ganglions des souris NZB/W ayant reçu un anticorps isotypique (points noirs,  $n=8$ ) ou l'anticorps anti-BTLA (points rouges,  $n=8$ ) pendant 10 semaines, deux fois par semaine. L'expression de BTLA a été déterminée par cytométrie en flux. Chaque point représente une souris et les valeurs sont exprimées en MFI moyenne  $\pm$  SEM. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ , Mann-Whitney test. La souris 129 est encadrée.

L'un des objectifs de notre protocole était d'empêcher ou d'améliorer les atteintes rénales. Comme présenté précédemment, et contrairement aux souris ayant reçu l'anticorps isotypique, les tissus rénaux des souris NZB/W ayant reçu l'anticorps anti-BTLA semblent globalement intacts, et leurs glomérules ont une taille similaire à celle retrouvée chez une souris BALB/W contrôle (Figure 6). En revanche, en accord avec les résultats précédents, la taille des glomérules et les lésions glomérulaires sont augmentées chez la souris 129, lui conférant un score plus important que celui des autres souris ayant reçu l'anticorps anti-BTLA (Score souris 129 = 1,625 vs Score moyen souris anti-BTLA =  $1,1 \pm 0,1$ , Figure 56A). Toutefois, puisque cette souris a développé une protéinurie en moyenne plus tardivement que les souris ayant reçu l'anticorps isotypique, le score de la souris 129 reste plus faible que le score moyen des souris administrées par l'anticorps isotypique (Score souris 129 = 1,625 vs Score moyen souris iso =  $2,3 \pm 0,4$ , Figure 56A). De plus, de façon similaire à plusieurs souris ayant reçu l'anticorps isotypique, le taux d'auto-Ac anti-ADNdb dans le sérum de la souris 129 chute au cours du traitement (Figure 56B), et la fréquence de PL dans les reins de cette souris est similaire à la moyenne de la fréquence de PL présents dans les reins des souris ayant reçu

l'anticorps isotypique (0,78% pour la souris 129 vs  $0,82\% \pm 0,12$  pour les souris ayant reçu l'isotype contrôle, **Figure 56C**).



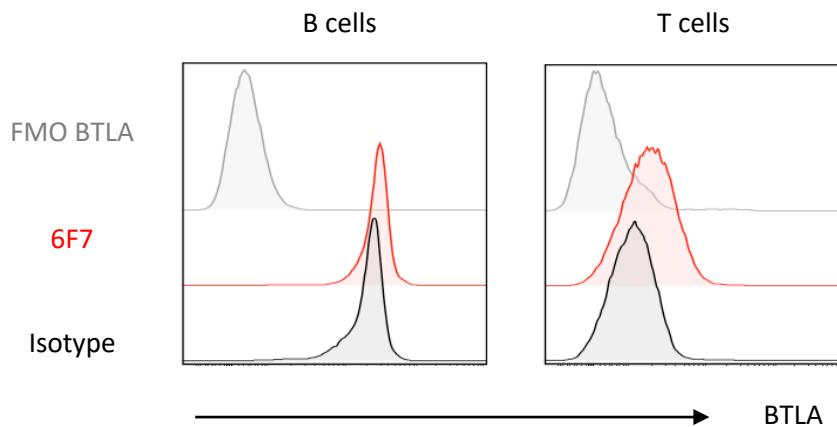
**Figure 56.** La souris 129 traitée par l'anticorps anti-BTLA présente une atteinte rénale plus importante que les autres souris du même groupe. **(A)** Un score moyen traduisant les atteintes tubulaires et glomérulaires a été calculé pour chacune des souris ayant reçu un anticorps isotypique (points noirs, n=8) ou l'anticorps anti-BTLA (points rouges, n=8) et une comparaison a été effectuée entre les deux groupes. **(B)** Titre en anticorps anti-ADN dans le sérum de la souris 129. **(C)** Pourcentage de plasmocytes dans les reins. Chaque point représente une souris et les valeurs sont exprimées en score moyen  $\pm$  SEM. \*p>0,05, Mann-Whitney test. La souris 129 est encadrée.

Pour conclure, l'administration de l'anticorps anti-BTLA 6F7 à des souris NZB/W de 20 à 22 semaines retarde l'apparition de la protéinurie, prolonge la survie des souris, et diminue les atteintes rénales. Ces résultats encourageants sont accompagnés d'une diminution de la fréquence des LB circulants suggérant que cet anticorps pourrait avoir un rôle déplétant *in vivo*, tout du moins partiellement. Toutefois, il sera intéressant de vérifier si cet anticorps présente également une activité agoniste *in vivo* puisque notre étude concernant le rôle de l'administration d'un anticorps anti-BTLA sur le développement du lupus, présente de nombreuses similitudes avec une étude réalisée dans un modèle d'athérosclérose. En effet, chez un modèle d'athérosclérose murin traité par un anticorps anti-BTLA agoniste (clone 3C10), la fréquence de LB FO est diminuée, les lésions aortiques sont réduites, mais le taux de cholestérol dans le sérum des souris est inchangé par rapport aux souris ayant reçu un anticorps isotypique (**Douna et al., 2020**). Par ailleurs, les auteurs ont mis en évidence une augmentation de la fréquence des Bregs, cellules impliquées dans la tolérance périphérique notamment grâce à leur production d'IL-10, diminuant ainsi la réponse inflammatoire. Il sera donc intéressant de vérifier si l'administration du clone 6F7 chez les souris NZB/W peut également mener à l'augmentation de cette population de LB.

L'une des caractéristiques du LES est la production d'auto-Ac pathogènes. De façon décevante, nous n'avons pas observé de diminution du titre d'auto-Ac anti-ADNdb et anti-chromatine, alors que d'autres études ciblant des récepteurs inhibiteurs tels que PD-1 (**Kasagi et al., 2010**) ou CTLA-4 (**Mihara et al., 2000**) relatent une diminution de la production des auto-Ac anti-ADNdb chez les souris traitées. L'une de nos hypothèses est que notre protocole n'est pas suffisant pour éliminer les plasmocytes à longue durée de vie situés dans la moelle osseuse lorsque le traitement est débuté chez des souris de 20 à 22 semaines. Nous pourrions dans le futur, vérifier la fréquence de ces cellules dans la moelle osseuse chez les souris traitées par l'anticorps 6F7. Notre deuxième hypothèse suggère que les auto-Ac des souris traitées par l'anticorps anti-BTLA se déposent moins dans les reins et sont donc davantage détectables dans le sérum. Ce résultat serait cohérent avec la diminution des atteintes rénales mise en évidence par étude histologique. Toutefois, pour confirmer cette hypothèse, nous devrons quantifier le dépôt d'IgG et du complément (C3) dans les reins par microscopie, car ce sont deux caractéristiques des atteintes rénales chez la souris NZB/W.

Les données concernant les mécanismes d'action des anticorps anti-BTLA *in vivo* dans la littérature sont assez contradictoires selon les clones utilisés. En effet, le clone 6A6 est décrit comme bloquant mais non déplétant (**Albring et al., 2010**) et les clones BYK-1, 3C10 et 4G12b comme agonistes (**del Rio et al., 2011; Sakoda et al., 2011; Uchiyama et al., 2014**). Concernant le clone 6F7, une étude a montré que ce clone possède des propriétés agonistes *in vivo* (**Steinberg et al., 2008**), alors qu'une autre étude a observé un effet déplétant de ce clone *in vivo* (**Truong et al., 2009**). Toutefois, même si cet anticorps anti-BTLA est déplétant *in vivo*, son administration à un modèle murin de diabète retarde le développement de la maladie et possède donc des propriétés thérapeutiques (**Truong et al., 2009**). De plus, puisque nous avons montré que le clone 6F7 de l'anticorps anti-BTLA est agoniste *in vitro*, nous avons choisi de traiter des souris NZB/W avec ce même clone. Comme précisé dans la **publication n°2**, nous avons utilisé le clone 6F7 de l'anticorps anti-BTLA dans nos expériences de fonctionnalité, et administré *in vivo* ce clone à des souris NZB/W, alors que le clone 8F4 a été utilisé pour réaliser un phénotypage des cellules immunitaires. Afin de confirmer, comme décrit dans la littérature (**Truong et al., 2009**), que l'engagement de BTLA par le clone 6F7 n'empêche pas sa détection par le clone 8F4, nous avons incubé pendant 45 min des splénocytes de souris BALB/c avec une concentration saturante de 6F7 ou d'isotype contrôle,

puis nous avons marqué les cellules avec le clone 8F4 par cytométrie en flux. L'analyse du marquage de BTLA par le clone 8F4 a montré une expression de BTLA similaire entre les deux conditions (6F7 et isotype) au niveau des LB et au niveau des LT (**Figure 57**).

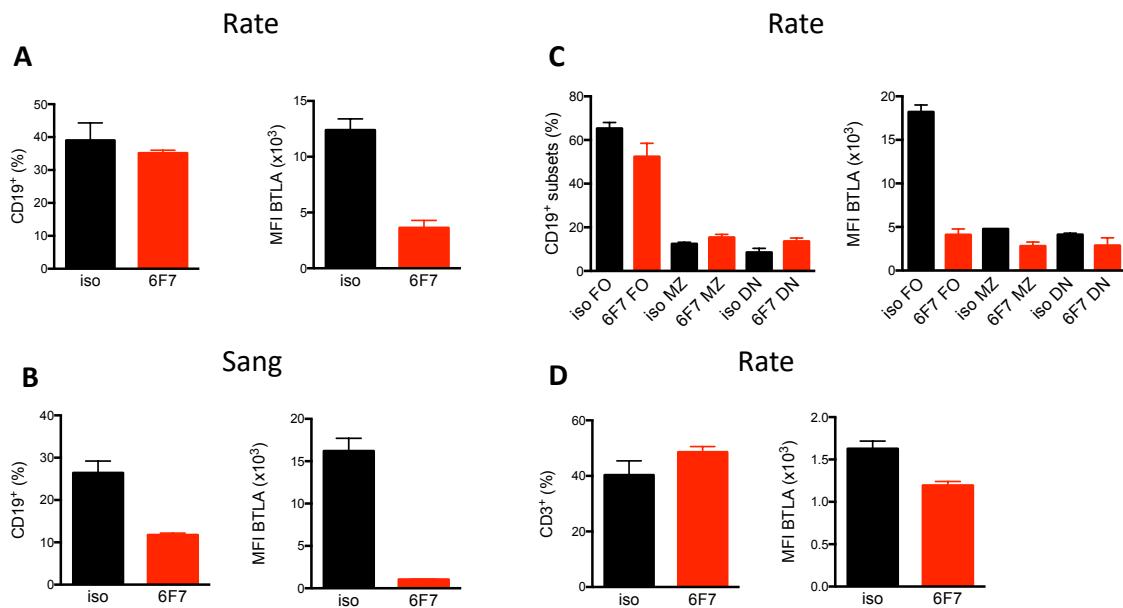


**Figure 57.** L'expression de BTLA par des splénocytes incubés en présence du clone 6F7 est détectable par le clone 8F4. Des splénocytes de souris BALB/c ont été incubés en présence de l'anticorps anti-BTLA 6F7 (5 $\mu$ g/ml) pendant 45 min à 4°C, puis les cellules ont été marquées par l'anticorps anti-BTLA 8F4. L'expression de BTLA par les LB et les LT a été déterminée par cytométrie en flux.

Ces résultats indiquent que les deux anticorps lient des épitopes différents de BTLA et que le clone 8F4 peut être utilisé pour étudier l'expression de BTLA par les cellules immunitaires des souris ayant reçu le clone 6F7.

Comme indiqué précédemment, les résultats obtenus dans le modèle NOD par Truong *et al.*, suggèrent que le clone 6F7 de l'anticorps anti-BTLA est déplétant *in vivo*. Afin de déterminer le mécanisme d'action *in vivo* de cet anticorps sur le nombre de lymphocytes et leur phénotype, les auteurs ont utilisé un modèle de transfert adoptif. Après injection de splénocytes de souris NOD dans des souris NOD-RAG-KO, l'administration du clone 6F7 induit une déplétion des LB et des LT proportionnelle à l'expression de BTLA par ces cellules. En effet, les LB exprimant plus fortement BTLA que les LT, sont davantage déplétés (**Truong et al., 2009**). Nous avons donc cherché à savoir si, dans nos conditions, le clone 6F7 était également déplétant. Pour cela, nous avons administré 500 $\mu$ g d'anticorps anti-BTLA ou d'anticorps isotypique à des souris contrôles BALB/W âgées de 21 semaines et nous avons euthanasié ces souris 5 jours plus tard. En accord avec les résultats obtenus par Truong *et al.*, et puisque les LB sont les cellules exprimant le plus BTLA, nous avons observé une diminution (mais pas une

déplétion totale) de la fréquence des LB dans la rate ( $35,2\% \pm 0,9$  vs  $39\% \pm 5,3$ , **Figure 58A**), les ganglions ( $12,6\% \pm 0,7$  vs  $17,6\% \pm 0,3$ , résultats non montrés) et le sang ( $11,8\% \pm 0,5$  vs  $26,4\% \pm 2,8$ , **Figure 58B**). Cette réduction est associée à une forte diminution de l'expression de BTLA par les LB (MFI=  $3634 \pm 665$  vs MFI=  $12400 \pm 1000$  dans la rate, MFI=  $1049 \pm 24$  vs MFI=  $16200 \pm 1500$  dans le sang, **Figure 58 A-B**).



**Figure 58.** L'administration de forte quantité d'anticorps 6F7 induit une diminution de la fréquence des LB. **(A-D)** Des souris BALB/W de 21 semaines ont été administrées par 500 $\mu$ g d'anticorps isotypique (barres noires, n=2) ou d'anticorps anti-BTLA (barres rouges, n=2), puis les souris ont été sacrifiées 5 jours plus tard. **(A-B)** Fréquence de LB parmi les cellules CD45<sup>+</sup> (à gauche) et expression de BTLA par ces cellules (à droite) dans la rate (**A**) ou dans le sang (**B**). **(C)** Fréquence des sous-populations de LB parmi les LB (à gauche) et expression de BTLA par ces cellules dans la rate (à droite). **(D)** Fréquence de LT parmi les cellules CD45<sup>+</sup> (à gauche) et expression de BTLA par les LT (à droite) dans la rate. La fréquence des cellules et l'expression de BTLA ont été déterminées par cytométrie en flux. Les valeurs sont exprimées en pourcentage moyen ou MFI moyenne  $\pm$  SEM.

Parmi les LB, on remarque que seule la fréquence des LB FO qui sont les LB exprimant le plus BTLA, semble être diminuée ( $52,4\% \pm 6,2$  vs  $65,3\% \pm 2,7$  pour les LB FO ;  $15,35\% \pm 1,5$  vs  $12,5\% \pm 0,8$  pour les LB MZ ;  $13,6\% \pm 1,6$  vs  $8,5\% \pm 1,9$  pour les LB CD21<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>, **Figure 58C**). De plus, l'expression de BTLA est très fortement réduite à la surface des LB FO chez les souris ayant reçu l'anticorps anti-BTLA par rapport aux souris ayant reçu l'anticorps isotypique (MFI=  $4102 \pm 675$  vs MFI=  $18200 \pm 800$ , **Figure 58C**). En revanche, nous n'avons pas observé de réduction de la fréquence des LT dans la rate (**Figure 58D**), les ganglions ou le sang (résultats non montrés). Toutefois, l'expression de BTLA par les LT est légèrement diminuée dans la rate (MFI=  $1194 \pm 48$  vs MFI=  $1627 \pm 91$ , **Figure 58D**) et le sang (résultats non montrés).

L'anticorps 6F7 administré aux souris est une IgG1 de souris. Cette sous-classe d'immunoglobuline présente une forte affinité pour le récepteur Fc<sub>Y</sub>RIIIa exprimé par les cellules NK, connu pour induire la lyse de cellules opsonisées par des IgG1 (**Bruhns, 2012**). Il semble donc que la réduction de la fréquence lymphocytaire observée après administration des souris par l'anticorps 6F7 pourrait être due à un mécanisme de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Toutefois, bien que l'anticorps 6F7 semble engendrer une réduction de la fréquence des cellules exprimant fortement BTLA dans ces conditions (forte dose), et soit en partie déplétant, il sera également intéressant de vérifier son activité agoniste *in vivo*.

Bien que des analyses plus approfondies doivent être effectuées, et que le mécanisme d'action de l'anticorps anti-BTLA 6F7 *in vivo* reste à déterminer, nos premiers résultats encourageants semblent indiquer que le ciblage de BTLA est une stratégie thérapeutique intéressante dans le cadre du LES.

# **DISCUSSION**



L'étude de l'expression et de la fonctionnalité de BTLA sur différentes populations lymphocytaires jouant un rôle clé dans la pathologie lupique, à la fois chez l'Homme et chez la souris, a fait l'objet de mon travail de thèse. Avant mon arrivée au laboratoire, il a été mis en évidence un défaut de fonctionnalité de BTLA dans les LT CD4<sup>+</sup> de patients lupiques dû au faible recrutement de ce récepteur au niveau des clusters de TCR après activation (**Sawaf et al., 2018**). Cette étude était la première à s'intéresser au rôle fonctionnel de BTLA dans l'auto-immunité chez l'Homme, et particulièrement dans le LES. Dans ce contexte, nous avons souhaité approfondir nos connaissances et poursuivre l'étude du rôle de BTLA dans la physiopathologie du lupus. **Le premier objectif de mon travail de thèse était de définir si une altération de la voie de signalisation de BTLA participait à la pathogénèse lupique.** Pour répondre à cette problématique, nous nous sommes intéressés à l'expression et/ou la fonctionnalité de ce récepteur dans les populations cellulaires considérées comme pathogènes (T<sub>FH</sub> et LB) ou régulatrices (Tregs).

### **L'expression de BTLA par les Treg, les T<sub>FH</sub> et les LB est-elle altérée chez les patients lupiques ?**

Deux de ces populations jouent un rôle pathogène dans le LES, à savoir les LB qui produisent des auto-Ac pathogènes, et les T<sub>FH</sub> qui régulent positivement la différenciation des LB en cellules sécrétrices d'anticorps.

#### *a) Expression de BTLA par les LB et les T<sub>FH</sub>: implication dans la réponse extra-folliculaire ?*

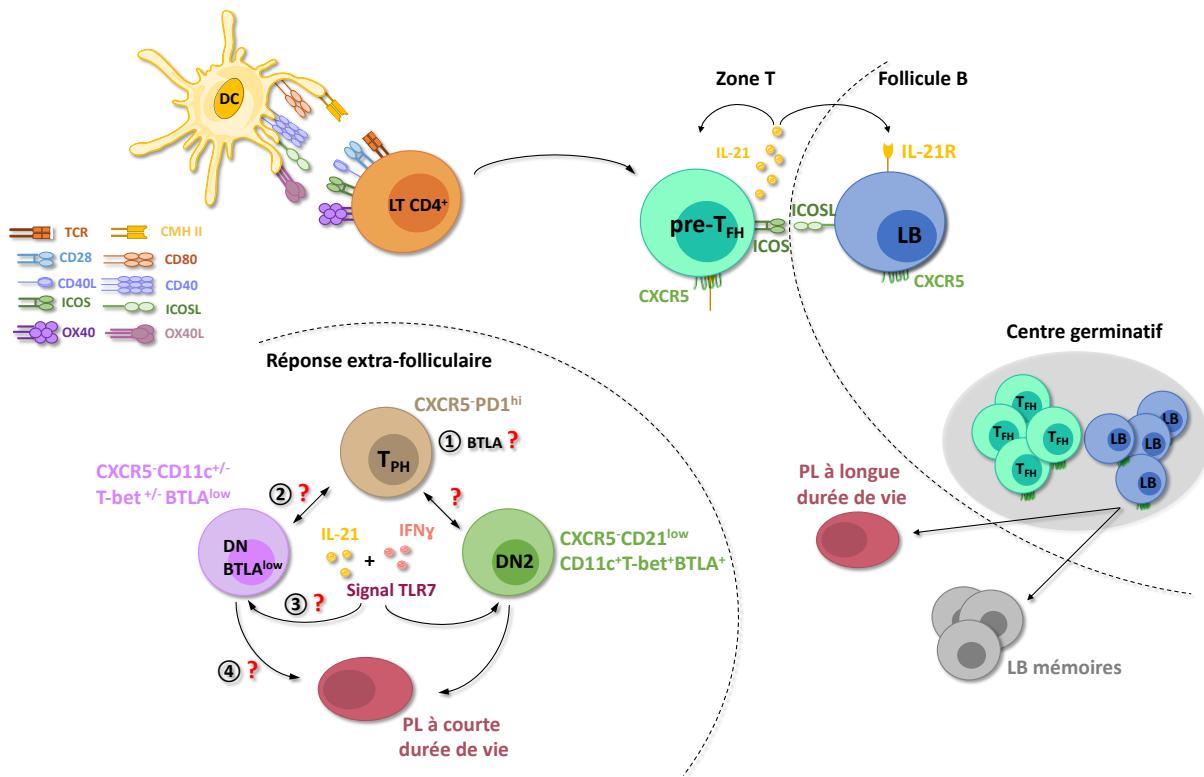
Comme décrit dans la **publication n°1**, nous avons mis en évidence que l'expression de BTLA est identique à la surface des différentes sous-populations de T<sub>FH</sub> chez les patients lupiques et les individus sains. Puisqu'il avait précédemment été montré au laboratoire une augmentation de la fréquence des cT<sub>FH</sub>2 chez les patients (**Le Coz et al., 2013**), nous aurions pu nous attendre à une diminution de l'expression de BTLA à la surface de cette sous-population cellulaire. En effet, une diminution de l'expression de BTLA et ainsi des signaux inhibiteurs reçus par les cT<sub>FH</sub>2, auraient pu engendrer une augmentation de la fréquence de ces cellules. L'augmentation de la fréquence des cT<sub>FH</sub>2 étant restreinte aux patients

présentant une pathologie lupique active, nous avons analysé l'expression de BTLA par les cT<sub>FH</sub>2 en fonction de ce paramètre. Toutefois, la séparation des patients en fonction de l'activité de leur maladie n'a révélé aucune différence d'expression (résultats non montrés). Bien que BTLA soit correctement exprimé par les cT<sub>FH</sub> chez les patients lupiques, rien n'est connu quant au rôle fonctionnel de BTLA à la surface de ces cellules chez l'Homme, et comme nous l'avons montré sur l'ensemble des LT CD4<sup>+</sup>, la voie de signalisation de BTLA peut être défectueuse chez les patients malgré un taux d'expression similaire à celui observé chez les individus sains. L'étude de l'implication de BTLA dans l'interaction T<sub>FH</sub>-LB dans un contexte lupique chez l'Homme reste donc à déterminer.

En 2017, une nouvelle population de LT CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup>PD<sup>hi</sup> présentant des similitudes avec les T<sub>FH</sub> de par leur expression de CXCL13 et PD-1, ou la production d'IL-21, a été décrite en périphérie chez des patients atteints de PR. La fréquence de ces cellules nommées T<sub>PH</sub> pour « peripheral helper T cells », est augmentée dans le sang et les articulations des patients atteints de PR (**Rao et al., 2017**). Ces cellules ont aussi été identifiées dans le LES et leur fréquence est également augmentée dans le sang des patients (**Bocharknikov et al., 2019**). A l'inverse des T<sub>FH</sub>, les T<sub>PH</sub> n'expriment pas le marqueur CXCR5 suggérant que ces cellules sont impliquées dans une réponse extra-folliculaire. L'interaction entre les T<sub>FH</sub> et les LB au niveau des GC des OLS induit la maturation des LB et cette interaction au niveau des follicules a donc longtemps été considérée comme essentielle dans la pathogénèse lupique. Toutefois, les LT et les LB peuvent également interagir en dehors des GC dans les OLS, mais aussi au niveau des tissus inflammés, comme les reins par exemple dans le cas du LES. Il a longtemps été admis que les auto-Ac anti-ADN ne pouvaient être générés qu'au sein des GC puisqu'ils proviennent de LB ayant subi la commutation de classe isotypique et présentant de forts taux d'hypermutations somatiques. Toutefois, ce dogme a été remis en question lorsque des études dans le modèle MRL<sup>Ipr/Ipr</sup> ont mis en évidence que des LB et des PL auto-réactifs pouvaient se développer au niveau des zones T des OLS (**Jacobson et al., 1995**). En effet, chez des souris MRL<sup>Ipr/Ipr</sup> AM14 dans lesquelles des LB sont spécifiques pour le facteur rhumatoïde (RF), la majorité de ces LB RF<sup>+</sup> se concentrent dans des zones dépourvues de FDC, mais présentent des capacités prolifératives élevées, sont capables de produire des anticorps (**William et al., 2002**), et de subir la commutation de classe isotypique et des hypermutations somatiques en dehors des GC. Il est important de noter que la dérégulation de voies connues

pour induire une réponse extra-folliculaire peut conduire au développement du LES. Par exemple, une sur-expression du TLR7 peut entraîner ou accélérer le développement de la pathologie dans de nombreuses lignées de souris, et la sur-expression du TLR7 dans les LB conduit au développement de LB auto-réactifs extra-folliculaires (**Giltiay et al., 2013**). De façon intéressante, une étude récente démontre que dans le modèle de souris déficientes pour la DNASE1L3, les auto-Ac anti-ADN sont générés par des PL à courte durée de vie dont la différenciation T-dépendante s'effectue dans des zones extra-folliculaires (**Soni et al., 2020**). Chez les patients lupiques, les LB DN2 décrits comme hyper-réactifs à une stimulation *via* le TLR7, n'expriment pas CXCR5 suggérant une implication dans une réponse extra-folliculaire (**Jenks et al., 2018**). Au cours de ma thèse, nous avons décrit une population de LB DN BTLA<sup>low</sup> qui semble s'apparenter à une population de cellules sécrétrices d'anticorps. Les LB DN BTLA<sup>low</sup> ne correspondent pas aux LB DN2 car elles n'expriment pas les marqueurs CD11c et T-bet, mais de façon analogue à ces cellules, elles n'expriment pas le marqueur CXCR5 suggérant qu'elles seraient elles aussi, impliquées dans une réponse extra-folliculaire. De plus, les LB DN BTLA<sup>low</sup> présentent des caractéristiques communes avec une nouvelle population de LB DN (DN3) décrite récemment dans le contexte d'une infection par le SARS-CoV-2 (**Sosa-Hernández et al., 2020; Woodruff et al., 2020**) qui est également dépourvue d'expression du marqueur CXCR5 et est proposée comme étant impliquée dans une réponse extra-folliculaire (**Sosa-Hernández et al., 2020; Woodruff et al., 2020**). De façon intéressante, les T<sub>PH</sub> de patients lupiques sont capables d'induire la différenciation de LB en PL par un mécanisme dépendant de l'IL-21. De plus, la fréquence des T<sub>PH</sub> chez les patients lupiques est fortement corrélée à la fréquence des LB atypiques mémoires CD11c<sup>+</sup> qui n'expriment pas CXCR5, appuyant l'hypothèse que les T<sub>PH</sub> et les LB atypiques mémoires peuvent interagir en dehors des follicules (**Bocharkov et al., 2019**). Toutes ces données mettent en lumière une contribution de la réponse extra-folliculaire dans la physiopathologie du lupus et soulignent l'importance d'identifier les éléments, qu'ils soient cellulaires ou moléculaires, conduisant à sa mise en place. A cet égard, nous émettons l'hypothèse qu'une dérégulation de l'expression et/ou de la fonction de BTLA dans les cellules impliquées puisse participer à l'expansion de cette réponse extra-folliculaire (**Figure 59**) et nous prévoyons de définir *i)* le niveau d'expression de BTLA par les T<sub>PH</sub>, *ii)* si les LB DN BTLA<sup>low</sup> que nous décrivons dans un contexte lupique sont bien impliquées dans une réponse extra-folliculaire, *iii)* si ces cellules sont capables de produire des auto-Ac et *iv)* quelles sont les modalités d'activation de ces cellules

LB DN BTLA<sup>low</sup>. Nous pourrions notamment réaliser des co-cultures entre des LB DN BTLA<sup>low</sup> et des T<sub>PH</sub>, ou cultiver les LB DN BTLA<sup>low</sup> en présence d'IL-21, d'IFN $\gamma$  et/ou d'un agoniste du TLR7 qui sont des *stimulus* connus pour induire la différenciation des LB atypiques pathogènes en PL sécréteurs d'auto-Ac (Jenks et al., 2018; Wang et al., 2018).



**Figure 59.** Les LB DN BTLA<sup>low</sup> sont-ils impliqués dans une réponse extra-folliculaire au cours du LES ? L'interaction entre les T<sub>FH</sub> et les LB au niveau des centres germinatifs induisent la génération de LB mémoires et de PL à longue durée de vie producteurs d'auto-Ac. Toutefois, il est aujourd'hui connu que des auto-Ac peuvent être générés via une réponse extra-folliculaire. Au cours de ma thèse, nous avons mis en évidence une population de LB DN BTLA<sup>low</sup> n'exprimant pas CXCR5, suggérant que ces cellules sont impliquées dans une réponse extra-folliculaire. Plusieurs questions se posent à l'heure actuelle quant au rôle de ces cellules et du récepteur BTLA dans la réponse extra-folliculaire au cours du lupus : ① quel est le niveau d'expression de BTLA à la surface des T<sub>PH</sub> ? ② Les T<sub>PH</sub> peuvent-ils activer les LB DN BTLA<sup>low</sup> ? ③ L'IL-21, l'IFN $\gamma$  ou une stimulation via le TLR7 peuvent-ils conduire à l'activation des LB DN BTLA<sup>low</sup> comme c'est le cas des LB DN2 ? ④ Les LB DN BTLA<sup>low</sup> peuvent-ils se différencier en PL sécréteurs d'auto-Ac ?

- b) Expression de BTLA par les Tregs : une altération en lien avec la réduction de la fréquence de ces cellules et des capacités suppressives réduites ?

Outre les cellules qualifiées de pathogènes dans le LES, qu'en est-il de l'expression de BTLA à la surface de cellules régulatrices ? Pour répondre à cette question, nous avons analysé l'expression de ce récepteur à la surface des Tregs, cellules indispensables à la régulation de

la réponse immunitaire. Nous avons mis en évidence (**publication n°1**) une augmentation de l'expression de BTLA à la surface des aTregs dont la fréquence est particulièrement diminuée chez les patients présentant une pathologie active. Dans le cadre de l'auto-immunité, une seule autre étude a montré une augmentation de la fréquence des Tregs BTLA<sup>+</sup> chez des patients atteints de SEP, et particulièrement chez ceux ayant une forme de SEP récurrente-rémittante caractérisée par des phases de poussée et de rémission comme dans le cas du LES (**Tapia-Maltos et al., 2021**). Nous avons également observé que comme chez la souris, BTLA est faiblement exprimé par les Tregs chez l'Homme. Dans le modèle murin, il a été montré que les Tregs exercent leurs fonctions suppressives *via* la liaison de HVEM présent à leur surface à BTLA exprimé par les LT CD4<sup>+</sup> par exemple (**Tao et al., 2008**). Par ailleurs, BTLA et HVEM interagissent préférentiellement en *cis* à la surface de la même cellule. Cette interaction participe au maintien des cellules dans un état quiescent, inhibant ainsi l'activation cellulaire dépendante de HVEM. Quel pourrait être donc la conséquence de l'augmentation de l'expression de BTLA à la surface des aTregs de patients lupiques ? Dans ce contexte, nous proposons que le complexe *cis* BTLA-HVEM pourrait être maintenu. En effet, nous avons montré que le ratio d'expression de HVEM et BTLA par les aTregs est plus faible chez les patients lupiques que chez les individus sains suggérant que l'accessibilité de HVEM pour une interaction en *trans* avec BTLA pourrait être réduite. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier et de quantifier la colocalisation et l'interaction en *cis* de BTLA et HVEM à la surface des aTregs de patients lupiques grâce à des techniques de ligation de proximité (ou PLA pour « proximity ligation assay »).

L'ensemble de ces résultats, et de ceux obtenus précédemment (**Sawaf et al., 2018**) montrent donc un défaut d'expression de BTLA dans les LT CD4<sup>+</sup> effecteurs après activation, et dans les Tregs et les LB DN de patients lupiques *ex vivo*. Le ciblage thérapeutique de BTLA à l'aide d'un anticorps agoniste par exemple, nécessite que ce récepteur soit correctement exprimé à la surface des différentes populations cellulaire. C'est pourquoi, il est nécessaire de comprendre les mécanismes à l'origine des défauts d'expression que nous avons mis en évidence.

## **Quels facteurs pourraient être impliqués dans la régulation de l'expression de ce récepteur ?**

En effet, rien n'est connu à l'heure actuelle concernant la régulation de BTLA. Nous prévoyons d'étudier différentes pistes telles que la régulation transcriptionnelle, l'influence des cytokines ou de l'interaction entre BTLA et son ligand HVEM.

### *a) Les micro-ARN*

L'expression de BTLA pourrait être régulée par des micro-ARN, soit des petits ARN régulateurs capables d'inhiber la traduction d'un ARN messager cible en protéine. En croisant les résultats obtenus à l'aide de plusieurs logiciels de prédiction différents (DIANAmT, miRanda, miRDB, miRWal, RNAhybrid, Targetscan, SUM), nous avons identifié plusieurs micro-ARN susceptibles de cibler BTLA. Dans un premier temps, il sera intéressant de valider ces prédictions informatiques grâce à des tests biologiques utilisant le gène rapporteur luciférase. Nous pourrons ensuite comparer l'expression des micro-ARN spécifiques de BTLA dans des cellules d'individus lupiques et des cellules d'individus sains et surtout, au sein des différentes populations lymphocytaires parmi lesquelles nous avons observé un défaut d'expression (aTregs et LB DN). En fonction des résultats obtenus, nous pourrons moduler leur expression grâce à des inhibiteurs ou des mimiques, et observer l'effet induit sur l'expression de BTLA. Cette approche permettra de vérifier si les défauts d'expression et/ou de fonctionnalité de BTLA que nous avons retrouvé chez les patients sont, tout du moins en partie, dus à un défaut de régulation par les micro-ARN. L'un des micro-ARN identifié par les logiciels de prédiction et suspecté d'avoir pour cible BTLA est miR-155. Chez la souris, ce micro-ARN cible la partie 3'UTR du messager de BTLA et régule négativement son expression (**Liu et al., 2016**). Récemment, une étude a mis en évidence que miR-155 cible et régule également l'expression de BTLA chez l'Homme. En effet, une inhibition de miR-155 dans des cellules de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique induit une augmentation de l'expression de BTLA à la surface de ces cellules (**Karabon et al., 2021**). Plusieurs études ont suggéré un rôle de ce micro-ARN dans la pathogénèse lupique. Des souris lupiques Fas<sup>lpr/lpr</sup> déficientes pour l'expression de miR-155 voient leur symptômes, dont l'atteinte rénale, atténués (**Thai et al., 2013; Xin et al., 2015**). De même, une délétion de ce micro-ARN dans le modèle murin de

lupus induit au pristane, réduit la sévérité de la néphrite lupique et la production d'auto-Ac chez ces souris (**Leiss et al., 2017**). De façon très intéressante, miR-155 est fortement exprimé dans les LB DN de patients atteintes de PR. De plus, l'inhibition de ce micro-ARN dans des LB de patients entraîne une moindre production d'anticorps par ces cellules (**Alivernini et al., 2016**). Il sera donc particulièrement intéressant d'étudier l'expression de miR-155 dans les LB DN de patients lupiques. En effet, la faible expression, voire l'absence d'expression de BTLA par les LB BTLA<sup>low</sup>, pourrait être en partie due à une augmentation de l'expression de ce micro-ARN dont l'une des fonctions est de réguler négativement l'expression de BTLA. Toutefois, les données concernant l'expression de miR-155 peuvent être contradictoires chez les patients lupiques, et dans les modèles murins de lupus. En effet, certaines études rapportent une augmentation de son expression dans les PBMC de patients par rapport aux individus sains (**Khoshmirsafa et al., 2019; Wen et al., 2013**), ou dans des souris lupiques (**Dai et al., 2010**), alors que d'autres observent une diminution de son expression chez les patients (**Kaga et al., 2015; Lashine et al., 2015**). Il est connu qu'un micro-ARN peut être exprimé différemment selon le type cellulaire et ces observations soulignent l'importance de l'étude des micro-ARN à l'échelle d'une population cellulaire, qui peut être représentée différemment d'un individu à l'autre, et non à l'échelle des PBMC totaux. Une étude réalisée dans le modèle MRL<sup>Ipr/Ipr</sup> a montré une augmentation de l'expression de miR-155 dans les Tregs de ces souris associée à une diminution des capacités suppressives de ces cellules (**Divekar et al., 2011**). Cette observation va à l'encontre des résultats que nous avons obtenus chez les patients puisque nous avons observé une augmentation de l'expression de BTLA à la surface des Tregs.

### *b) Les cytokines*

Nous pourrons également chercher à définir si certaines cytokines régulent l'expression de BTLA. Une étude publiée en 2011 a mis en évidence que l'IFN $\alpha$  produit par les pDC induit une diminution de l'expression de BTLA à la surface des LT CD4 $^{+}$  de patients atteints du VIH (**Zhang et al., 2011b**). Le taux d'IFN $\alpha$  sérique étant augmenté et corrélé avec l'activité de la maladie chez les patients lupiques, il serait intéressant de doser cette cytokine dans le sérum des patients et d'établir des corrélations avec l'expression de BTLA notamment sur les LB, puisque nous avons observé une diminution de l'expression de ce récepteur à la surface de ces cellules. Par ailleurs, il est connu que l'expression d'autres récepteurs inhibiteurs peut

être modulée par différentes cytokines. Chez l'Homme, par exemple, l'expression de PD-1 est induite à la surface des LT *in vitro* par l'IL-2, l'IL-7, l'IL-15 ou l'IL-21 (**Kinter et al., 2008**). D'autres cytokines que l'IFN $\alpha$  pourraient donc être impliquées dans la régulation de l'expression de BTLA.

c) *Son ligand HVEM*

Enfin, l'interaction entre BTLA et son ligand HVEM peut aussi participer à la régulation de l'expression de BTLA. Dans la littérature, il a été montré que les taux de la forme soluble de HVEM sont augmentés chez des patients atteints de maladies auto-immunes telle que la PR, ou de maladies inflammatoires telle que la dermatite atopique (**Jung et al., 2003**). Toutefois dans notre étude, nous n'avons pas observé d'augmentation de la concentration en HVEM soluble dans le sérum de patients lupiques. Ce résultat reste préliminaire et est à confirmer, notamment en augmentant le nombre de patients et en incluant plus de patients présentant une pathologie active. Le rôle de la forme soluble de HVEM sur l'expression de BTLA n'est pas encore défini, mais il a été démontré que l'expression membranaire de BTLA peut être diminuée si ce récepteur interagit avec son ligand HVEM (**Derré et al., 2010**). Nous pouvons donc imaginer que la forme soluble de HVEM pourrait moduler l'expression de BTLA *via* un mécanisme similaire. Il sera donc nécessaire de compléter notre étude afin de déterminer si des taux anormaux de HVEM soluble pourraient être corrélés à certains défauts d'expression de BTLA que nous avons observé chez les patients lupiques.

Une problématique majeure se pose dans notre étude concernant la régulation de BTLA : Pourquoi observons-nous à la fois une diminution de l'expression de BTLA à la surface des LB DN et une augmentation de l'expression de BTLA à la surface des Tregs ? A l'échelle transcriptionnelle, un même micro-ARN peut ne pas être exprimé de la même façon dans les différentes populations cellulaires. De plus, un micro-ARN peut avoir plusieurs cibles, et inversement, un ARN messager peut être la cible de plusieurs micro-ARN. En plus de miR-155 que nous avons décrit précédemment, il a récemment été montré chez l'Homme que miR-32 peut également lier la partie 3' UTR du messager de BTLA et réguler négativement son expression (**Zhang et al., 2020b**). L'identification et l'étude de divers micro-ARN capables de moduler l'expression de BTLA dans différentes populations lymphocytaires est donc une piste

intéressante pour comprendre la régulation de l'expression de ce récepteur dans le LES. Par ailleurs, toutes les populations de cellules immunitaires n'expriment pas les mêmes récepteurs aux cytokines et par conséquent, ne répondent pas de façon identique aux signaux induits par ces molécules. De même, toutes les populations cellulaires ne présentent pas les mêmes niveaux d'expression de BTLA. On peut supposer que la forme soluble de HVEM se lie préférentiellement à BTLA à la surface des LB, puisque ces cellules expriment fortement BTLA. A l'inverse, les Tregs exprimant peu BTLA seraient moins ciblés par la forme soluble de HVEM.

### **Le récepteur BTLA est-il fonctionnel chez les patients lupiques ?**

Notre étude précédente a révélé un défaut fonctionnel de la voie de signalisation de BTLA dans les LT CD4<sup>+</sup> de patients lupiques. La mise en évidence d'un défaut d'expression de BTLA par les LB DN de patients lupiques soulève logiquement la question suivante : cette expression altérée est-elle associée à un défaut de fonctionnalité de ce récepteur dans les LB de patients lupiques ? Les deux seules études relatant la fonctionnalité de BTLA dans les LB ont engagé la voie de BTLA à l'aide d'une protéine recombinante HVEM (**Thibault et al., 2013; Vendel et al., 2009**). Toutefois, puisque notre précédente étude concernant la fonctionnalité de BTLA dans les LT CD4<sup>+</sup> de patients avait été réalisée à l'aide de l'anticorps agoniste de BTLA MIH26, et que HVEM possède plusieurs autres ligands que BTLA (LIGHT, CD160) pouvant ainsi rendre l'emploi d'une protéine recombinante compliquée, nous avons souhaité mettre au point les tests de fonctionnalité dans les LB à l'aide de ce même anticorps. Cependant, nos conditions expérimentales n'ont pas permis de mettre en évidence une inhibition des LB après engagement de BTLA par un anticorps agoniste. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Werner *et al*, qui précisent que l'engagement de BTLA par ce même anticorps n'induit pas d'inhibition de la prolifération des LB après activation (**Werner et al., 2019**). Une étude récente a mis en évidence un défaut de fonctionnalité de BTLA dans les LB de patients lupiques après stimulation des LB et engagement de la voie de signalisation de BTLA à l'aide d'un anticorps agoniste de BTLA (**Wiedemann et al., 2021**). Toutefois, les auteurs ont montré que seule la différenciation des LB en PL pouvait être inhibée par un anticorps agoniste, à l'inverse de l'activation et de la prolifération des LB. L'ensemble de ces données chez l'Homme sont cohérentes avec une étude menée chez la souris montrant que la prolifération des LB ne peut pas être inhibée par un anticorps agoniste *in vitro* (**Zhang et al., 2011a**). La fonctionnalité de

BTLA dans les LB pourrait donc être étudiée à l'aide d'autres stratégies expérimentales. En effet, analyser la colocalisation de BTLA et du BCR par microscopie confocale après stimulation de LB d'individus sains et de patients lupiques apportera une information supplémentaire quant à la fonctionnalité de ce récepteur dans un contexte lupique. De plus, l'analyse des signaux précoces associés au BCR tels que le recrutement de phosphatases (SHP-1) au niveau du récepteur inhibiteur (**Lumb et al., 2016**) et la déphosphorylation des premiers acteurs de la voie du BCR (Syk, PLC $\gamma$ 2) sont des stratégies qui ont déjà été utilisées dans le cas de l'étude de la fonctionnalité du récepteur inhibiteur CD22 à l'aide de l'anticorps agoniste epratuzumab (**Sieger et al., 2013**).

En plus d'une forme membranaire, une forme soluble de BTLA (sBTLA) a été décrite. Quel impact pourrait avoir cette forme soluble de BTLA dans la pathogénèse du LES ? A l'heure actuelle, il n'existe aucune donnée de la littérature concernant l'étude de cette forme soluble dans le LES. Toutefois, les taux de sBTLA sont augmentés dans le sérum de patients ayant subi un choc septique (**Lange et al., 2017; Monaghan et al., 2018**) ou atteints de cancers (**Bian et al., 2019; Wang et al., 2019**). Par ailleurs, cette augmentation de la concentration en sBTLA est associée à un risque de mortalité plus élevé. Deux hypothèses peuvent être émises quant à la fonction de la forme soluble de BTLA. Dans un premier temps, cette forme soluble pourrait agir de façon similaire à la forme membranaire et induire des signaux activateurs à la cellule exprimant HVEM. Par ailleurs, HVEM est fortement exprimé à la surface des cellules tumorales de nombreux types de cancers tel que le mélanome et son expression est associée à une réduction du taux de survie des patients (**Malissen et al., 2019**). L'interaction entre BTLA exprimé par les LT CD8 $^{+}$  et HVEM exprimé par les cellules tumorales inhibent la prolifération et la production de cytokines par les LT CD8 $^{+}$  et favorise le développement de la tumeur (**Derré et al., 2010**). La liaison de sBTLA à HVEM exprimé par les cellules tumorales pourrait donc participer à la croissance de la tumeur. Dans le cas du LES, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une forte activation de HVEM *via* sBTLA pourrait participer à l'hyperactivation des cellules immunitaires. Dans un deuxième temps, il est proposé que sBTLA pourrait entrer en compétition avec sa forme membranaire pour la liaison de HVEM et ainsi empêcher l'induction de signaux inhibiteurs délivrés par la forme membranaire de BTLA. Une forme soluble de PD-1 a également été décrite et peut rentrer en compétition avec la forme membranaire de PD-1 pour sa liaison à PD-L1 conduisant à une réduction de l'activation de la

voie PD-1/PD-L1. De façon intéressante, la concentration de la forme soluble de PD-1 est augmentée dans le sérum de patients atteints de PR, et entraîne une hyperactivation des LT. De plus, l'administration d'une forme soluble de PD-1 à un modèle murin de PR aggrave les symptômes cliniques et biologiques de la maladie soulignant le rôle pathogène de cette forme soluble (**Liu et al., 2015**). Aujourd'hui, bien que la fonction de sBTLA ne soit pas connue, nous pourrons évaluer sa concentration dans le sérum des patients afin de déterminer si comme pour PD-1 dans la PR, sBTLA peut jouer un rôle dans la pathogénèse lupique.

L'ensemble des connaissances que nous avons acquises soulignent une implication de BTLA dans la physiopathologie du lupus. **C'est pourquoi, le second objectif de mon travail de thèse était d'évaluer le potentiel thérapeutique du ciblage de BTLA au cours du lupus, dans le modèle murin NZB/W.**

**Le ciblage de BTLA pourrait-il représenter une stratégie thérapeutique innovante dans le LES ?**

a) *Expression et fonctionnalité de BTLA chez la souris lupique NZB/W : pertinence de ce modèle murin par rapport aux données obtenues chez les patients lupiques*

Puisque nous avions précédemment mis en évidence un défaut de fonctionnalité de BTLA dans les LT CD4<sup>+</sup> de patients lupiques (**Sawaf et al., 2018**), et qu'aucune étude concernant BTLA n'avait été réalisée dans ce modèle murin, nous avons analysé en parallèle l'expression et la fonctionnalité de BTLA chez les souris NZB/W. Bien que BTLA soit exprimé de façon similaire entre les souris lupiques et des souris contrôles, nous avons montré un défaut de fonctionnalité de la voie de BTLA dans les LT CD4<sup>+</sup> totaux de souris NZB/W comme observé chez les patients lupiques. De plus, l'expression de BTLA n'est pas correctement augmentée après activation des LT CD4<sup>+</sup> des souris NZB/W. Or, BTLA doit être localisé à proximité du TCR pour induire une inhibition de la voie du TCR, et ainsi l'inhibition de l'activation de la cellule exprimant BTLA (**Owada et al., 2010**). Chez l'Homme, le défaut de fonctionnalité de BTLA dans les LT CD4<sup>+</sup> de patients lupiques est dû à un mauvais recrutement de BTLA au niveau des clusters de TCR dans les radeaux lipidiques après activation (**Sawaf et**

al., 2018). Il sera donc intéressant d'étudier si un mécanisme similaire peut rendre compte du défaut observé dans les LT CD4<sup>+</sup> de souris NZB/W.

Par ailleurs, pour que les LT soient activés, le complexe du TCR doit être recruté au niveau des radeaux lipidiques, domaines riches en sphingolipides et cholestérol. Ces radeaux lipidiques sont « préformés » dans les LT CD4<sup>+</sup> de patients lupiques, entraînant l'exclusion d'un certain nombre de molécules de signalisation de ces radeaux, et participant ainsi à l'hyperactivation des LT. De façon intéressante, la dissociation des radeaux « préformés » suffit pour restaurer une signalisation efficace (Jury et al., 2006; McDonald et al., 2014). Par exemple, l'incubation des LT CD4<sup>+</sup> *ex vivo* de patients lupiques en présence d'un inhibiteur de l'expression des sphingolipides (NB-DNJ) capable de rétablir le métabolisme lipidique, a permis de restaurer la fonctionnalité de BTLA chez les patients lupiques (Sawaf et al., 2018). De façon intéressante, les LT CD4<sup>+</sup> de souris MRL<sup>lpr/lpr</sup> et NZB/W âgées présentent des agrégats de radeaux lipidiques à l'état basal comme observé chez l'Homme. De plus, la dissociation *in vivo* de ces domaines dans le modèle murin MRL<sup>lpr/lpr</sup> induit la diminution de la production d'auto-Ac, retarde l'apparition de la protéinurie et prolonge la survie des souris (Deng and Tsokos, 2008). Nous prévoyons donc d'étudier la colocalisation de BTLA avec le TCR au niveau des radeaux lipidiques dans le modèle murin NZB/W. Dans le cas où BTLA serait exclu des radeaux lipidiques, nous pourrons vérifier que des inhibiteurs du métabolisme lipidique sont capables de restaurer la fonctionnalité de BTLA dans les LT CD4<sup>+</sup> de NZB/W âgées.

Puisque l'expression et la fonctionnalité de BTLA chez les NZB/W sont similaires à ce que nous avons observé chez les patients lupiques, ce modèle murin semble un bon modèle pour l'étude du potentiel thérapeutique du ciblage de BTLA dans le LES.

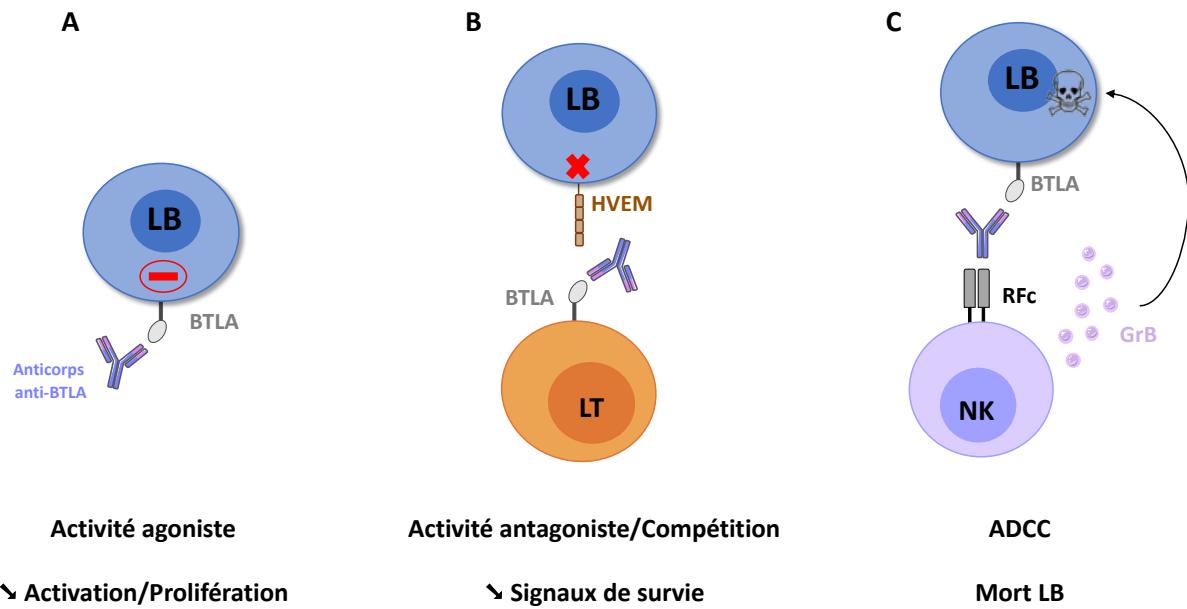
*b) Ciblage thérapeutique de BTLA : quelles pistes restent à exploiter avant d'entreprendre une transposition à l'Homme ?*

Nous avons donc administré le clone 6F7 de l'anticorps anti-BTLA (agoniste *in vitro*) à des souris NZB/W âgées de 20 à 22 semaines. De façon très intéressante, ce traitement a retardé l'apparition de la protéinurie, augmenté la durée de vie des souris, et diminué les dommages tissulaires au niveau des reins. De plus, l'administration de l'anticorps anti-BTLA a

induit une réduction de la fréquence des LB circulants ainsi qu'une diminution de l'expression de BTLA à la surface de ces cellules. Au niveau des OLS, nous avons observé une réduction de la fréquence des LB FO, suggérant que le traitement cible particulièrement les cellules exprimant fortement BTLA. La diminution de la fréquence des LB circulants et des LB FO semblent indiquer que le clone 6F7 de l'anticorps anti-BTLA pourrait être partiellement déplétant. Cependant, l'administration de l'anticorps anti-BTLA 3C10 (décrit comme non déplétant et agoniste *in vivo*) à un modèle murin d'athérosclérose entraîne, comme dans notre étude, une réduction de la fréquence des LB FO chez les souris traitées (**Douna et al., 2020**), suggérant que le clone 6F7 pourrait également être agoniste *in vivo*. De plus, comme précisé ci-dessus, l'anticorps anti-BTLA 6F7 induit une diminution de l'expression de BTLA à la surface des LB notamment. Il est connu que certains anticorps monoclonaux dirigés contre des récepteurs de surface induisent l'internalisation de ces récepteurs ou la diminution de l'expression de ces molécules. De façon intéressante, il a été montré que les anticorps anti-BTLA non déplétants 4G12b et PJ196 induisent une diminution de l'expression de BTLA à la surface de différentes populations lymphocytaires dont les LT et les LB (**del Rio et al., 2010; Truong et al., 2007**). Puisque l'administration de ces clones a permis d'empêcher un rejet de greffe, les auteurs proposent que ces anticorps soient également agonistes *in vivo* (**del Rio et al., 2011; Truong et al., 2007**). Nous prévoyons donc dans le futur, de définir précisément le mécanisme d'action de l'anticorps 6F7 *in vivo* (**Figure 60**), en étudiant les capacités agonistes ou antagonistes de cet anticorps *in vivo* (en analysant les voies de signalisation induites après administration de l'anticorps), ou en cherchant à savoir si cet anticorps pourrait induire une lyse cellulaire *via* un mécanisme d'ADCC (en évaluant par exemple l'effet de l'administration de l'anticorps 6F7 sur la fréquence des LB dans des souris dépourvues de NK).

Enfin, bien que le traitement de souris NZB/W âgées de 20-22 semaines par l'anticorps 6F7 a permis de retarder le développement de la maladie, serait-il suffisant pour inverser les symptômes une fois la maladie déclarée ? En effet, dans notre étude, notre protocole thérapeutique est considéré comme prophylactique, les souris étant âgées de 20 à 22 semaines au début des administrations. Bien que des anomalies cellulaires puissent exister à cet âge, les animaux ne développent aucun symptôme clinique. Or, afin d'envisager une transposition à l'Homme, il sera nécessaire d'évaluer l'effet du traitement chez des souris ayant déjà développé la maladie puisque les patients lupiques sont diagnostiqués lorsque la

pathologie est déjà déclarée. Récemment, une étude a évalué le potentiel thérapeutique du ciblage de CD40 dans le modèle NZB/W (**Perper et al., 2019**). Les auteurs ont administré deux doses différentes (3mg/kg, dose identique à celle que nous avons utilisé dans notre protocole, et 15mg/kg) d'un anticorps antagoniste de CD40 à des souris NZB/W ayant déjà développé de la protéinurie et ont montré que la dose de 15mg/kg était la plus efficace puisque 87% des souris malades se sont rétablies contre 53% ayant reçu la dose de 3mg/kg (**Perper et al., 2019**). Nous prévoyons donc d'évaluer l'efficacité du traitement anti-BTLA chez des souris NZB/W malades, peut-être en ajustant la quantité d'anticorps, ou bien en améliorant sa vectorisation. L'étude de l'efficacité d'un tel traitement chez des souris NZB/W malades sera une étape clé dans l'évaluation du potentiel thérapeutique du ciblage de BTLA dans le LES.



**Figure 60.** Mécanismes d'action potentiels de l'anticorps anti-BTLA 6F7 *in vivo*. (A) L'anticorps anti-BTLA pourrait avoir des propriétés agonistes et induire des signaux inhibiteurs à la cellule exprimant BTLA réduisant ainsi son activation et sa prolifération. (B) Cet anticorps pourrait également être antagoniste ou entrer en compétition avec le ligand de BTLA, HVEM, et ainsi réduire les signaux de survie apportées à la cellule exprimant HVEM. (C) Enfin, l'anticorps 6F7 pourrait induire la mort cellulaire via un mécanisme d'ADCC.

Il existe toutefois une limite majeure à notre traitement. En effet, nous avons montré chez l'Homme un défaut de fonctionnalité de la voie de BTLA dans les LT CD4<sup>+</sup> de patients lupiques (**Sawaf et al., 2018**), et rien n'est connu quant à sa signalisation dans les LB de patients. Cibler la voie de BTLA à l'aide d'un anticorps agoniste s'avère donc difficile et la réussite du traitement pourrait être limitée. Concernant les LT, puisque nous avons

précédemment montré au laboratoire que l'incubation de LT CD4<sup>+</sup> en présence de NB-DNJ restaure la fonctionnalité de BTLA dans ces cellules, nous pouvons imaginer une stratégie thérapeutique en deux étapes où il conviendrait dans un premier temps, de restaurer le métabolisme lipidique à l'aide par exemple du miglustat (inhibiteur de la glucosyl-céramide synthétase), traitement déjà prescrit à l'heure actuelle dans les maladies de Gaucher et de Niemann-Pick, puis dans un deuxième temps, d'induire la voie de signalisation de BTLA à l'aide d'un anticorps agoniste. Une telle stratégie thérapeutique pourra être expérimentée dans le modèle murin NZB/W si nous mettons en évidence comme chez l'Homme, que le défaut de signalisation de BTLA dans les LT CD4<sup>+</sup> est dû à un mauvais recrutement de BTLA au niveau des radeaux lipidiques. Toutefois, notre traitement semble cibler particulièrement les LB. Il est donc nécessaire de vérifier que l'engagement de BTLA à la surface des LB de patients lupiques induit une signalisation similaire à celle retrouvée chez des individus sains. Dans le cas contraire, nous devrons déterminer l'origine du défaut pour pouvoir rétablir la fonctionnalité de BTLA dans les LB et envisager dans le futur, l'administration d'un anticorps agoniste chez les patients lupiques. De plus, nous avons mis en évidence un défaut d'expression de BTLA à la surface des LB DN, cellules pathogènes dans le LES. Il est donc une nouvelle fois, nécessaire de comprendre les mécanismes de régulation de l'expression de BTLA pour pouvoir éventuellement rétablir son expression à la surface des LB DN et ainsi permettre le ciblage de ce récepteur. En fonction de nos résultats, et de façon similaire à ce que nous proposons ci-dessus, nous pourrions envisager une stratégie thérapeutique en deux étapes, à savoir dans un premier temps, le rétablissement de l'expression de BTLA en modulant l'expression de micro-ARN ou de cytokines influant sur l'expression de BTLA, puis dans un deuxième temps, l'administration d'un anticorps agoniste de BTLA.

Pour conclure, les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis d'améliorer les connaissances quant à l'expression et la fonctionnalité du récepteur co-inhibiteur BTLA dans le LES à la fois chez l'Homme, et dans un modèle murin spontané de lupus. Ces données ouvrent de nouvelles perspectives d'étude de ce récepteur dans le LES que ce soit au niveau de sa régulation, de sa fonction ou de son potentiel thérapeutique.



# **BIBLIOGRAPHIE**



Adler, G., Steeg, C., Pfeffer, K., Murphy, T.L., Murphy, K.M., Langhorne, J., and Jacobs, T. (2011). B and T lymphocyte attenuator restricts the protective immune response against experimental malaria. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 187, 5310–5319.

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

Alivernini, S., Kurowska-Stolarska, M., Tolusso, B., Benvenuto, R., Elmesmari, A., Canestri, S., Petricca, L., Mangoni, A., Fedele, A.L., Di Mario, C., et al. (2016). MicroRNA-155 influences B-cell function through PU.1 in rheumatoid arthritis. *Nat. Commun.* 7, 12970.

Almaani, S., Meara, A., and Rovin, B.H. (2017). Update on Lupus Nephritis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 12, 825–835.

Alvarado-Sánchez, B., Hernández-Castro, B., Portales-Pérez, D., Baranda, L., Layseca-Espinosa, E., Abud-Mendoza, C., Cubillas-Tejeda, A.C., and González-Amaro, R. (2006). Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmun.* 27, 110–118.

Amend, A., Wickli, N., Schäfer, A.-L., Sprenger, D.T.L., Manz, R.A., Voll, R.E., and Chevalier, N. (2021). Dual Role of Interleukin-10 in Murine NZB/W F1 Lupus. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1347.

Anders, H.-J., Vielhauer, V., Eis, V., Linde, Y., Kretzler, M., Perez de Lema, G., Strutz, F., Bauer, S., Rutz, M., Wagner, H., et al. (2004). Activation of toll-like receptor-9 induces progression of renal disease in MRL-Fas(lpr) mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 534–536.

Andrade, D., Redecha, P.B., Vukelic, M., Qing, X., Perino, G., Salmon, J.E., and Koo, G.C. (2011). Engraftment of peripheral blood mononuclear cells from systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome patient donors into BALB-RAG-2/- IL-2Rγ/- mice: a promising model for studying human disease. *Arthritis Rheum.* 63, 2764–2773.

Andrews, B.S., Eisenberg, R.A., Theofilopoulos, A.N., Izui, S., Wilson, C.B., McConahey, P.J., Murphy, E.D., Roths, J.B., and Dixon, F.J. (1978). Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J. Exp. Med.* 148, 1198–1215.

Anolik, J.H., Campbell, D., Felgar, R.E., Young, F., Sanz, I., Rosenblatt, J., and Looney, R.J. (2003). The relationship of FcgammaRIIIa genotype to degree of B cell depletion by rituximab in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 48, 455–459.

Aringer, M., and Johnson, S.R. (2020). Classifying and diagnosing systemic lupus erythematosus in the 21st century. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 59, v4–v11.

Aringer, M., Costenbader, K., Daikh, D., Brinks, R., Mosca, M., Ramsey-Goldman, R., Smolen, J.S., Wofsy, D., Boumpas, D.T., Kamen, D.L., et al. (2019). 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* 71, 1400–1412.

Arkatkar, T., Du, S.W., Jacobs, H.M., Dam, E.M., Hou, B., Buckner, J.H., Rawlings, D.J., and Jackson, S.W. (2017). B cell-derived IL-6 initiates spontaneous germinal center formation during systemic autoimmunity. *J. Exp. Med.* **214**, 3207–3217.

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

Arnson, Y., Shoenfeld, Y., and Amital, H. (2010). Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *J. Autoimmun.* **34**, J258–265.

Aten, J., Roos, A., Claessen, N., Schilder-Tol, E.J.M., Ten Berge, I.J.M., and Weening, J.J. (2000). Strong and selective glomerular localization of CD134 ligand and TNF receptor-1 in proliferative lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **11**, 1426–1438.

Axelsson, S., Magnuson, A., Lange, A., Alshamari, A., Hörnquist, E.H., and Hultgren, O. (2020). A combination of the activation marker CD86 and the immune checkpoint marker B and T lymphocyte attenuator (BTLA) indicates a putative permissive activation state of B cell subtypes in healthy blood donors independent of age and sex. *BMC Immunol.* **21**, 14.

Bagnara, D., Squillario, M., Kipling, D., Mora, T., Walczak, A.M., Da Silva, L., Weller, S., Dunn-Walters, D.K., Weill, J.-C., and Reynaud, C.-A. (2015). A Reassessment of IgM Memory Subsets in Humans. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **195**, 3716–3724.

Bag-Ozbek, A., and Hui-Yuen, J.S. (2021). Emerging B-Cell Therapies in Systemic Lupus Erythematosus. *Ther. Clin. Risk Manag.* **17**, 39–54.

Bai, M., Xu, L., Zhu, H., Xue, J., Liu, T., Sun, F., Yao, H., Zhao, Z., Wang, Z., Yao, R., et al. (2021). Impaired granzyme B-producing regulatory B cells in systemic lupus erythematosus. *Mol. Immunol.* **140**, 217–224.

Barber, M.R.W., and Clarke, A.E. (2020). Systemic lupus erythematosus and risk of infection. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **16**, 527–538.

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

Barbhaiya, M., and Costenbader, K.H. (2016). Environmental Exposures and the Development of Systemic Lupus Erythematosus. *Curr. Opin. Rheumatol.* **28**, 497–505.

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

Baumann, I., Kolowos, W., Voll, R.E., Manger, B., Gaapl, U., Neuhuber, W.L., Kirchner, T.,

Kalden, J.R., and Herrmann, M. (2002). Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *46*, 191–201.

Bekiaris, V., Šedý, J.R., Macauley, M.G., Rhode-Kurnow, A., and Ware, C.F. (2013). The Inhibitory Receptor B and T Lymphocyte Attenuator Controls  $\gamma\delta$  T cell Homeostasis and Inflammatory Responses. *Immunity* *39*, 1082–1094.

Bertsias, G.K., Nakou, M., Choulaki, C., Raptopoulou, A., Papadimitraki, E., Goulielmos, G., Kritikos, H., Sidiropoulos, P., Tzardi, M., Kardassis, D., et al. (2009). Genetic, immunologic, and immunohistochemical analysis of the programmed death 1/programmed death ligand 1 pathway in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *60*, 207–218.

Bian, B., Fanale, D., Dusetti, N., Roque, J., Pastor, S., Chretien, A.-S., Incorvaia, L., Russo, A., Olive, D., and Iovanna, J. (2019). Prognostic significance of circulating PD-1, PD-L1, pan-BTN3As, BTN3A1 and BTLA in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Oncoimmunology* *8*, e1561120.

Blair, P.A., Noreña, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2010). CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity* *32*, 129–140.

Blanco, P., Palucka, A.K., Gill, M., Pascual, V., and Banchereau, J. (2001). Induction of Dendritic Cell Differentiation by IFN- $\alpha$  in Systemic Lupus Erythematosus. *Science*.

Blomberg, S., Eloranta, M.L., Cederblad, B., Nordlind, K., Alm, G.L., and Rönnblom, L. (2001). Presence of cutaneous interferon- $\alpha$  producing cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* *10*, 484–490.

Bocharnikov, A.V., Keegan, J., Wacleche, V.S., Cao, Y., Fonseka, C.Y., Wang, G., Muise, E.S., Zhang, K.X., Arazi, A., Keras, G., et al. (2019). PD-1hiCXCR5- T peripheral helper cells promote B cell responses in lupus via MAF and IL-21. *JCI Insight* *4*, 130062.

Boliar, S., Murphy, M.K., Tran, T.C., Carnathan, D.G., Armstrong, W.S., Silvestri, G., and Derdeyn, C.A. (2012). B-lymphocyte dysfunction in chronic HIV-1 infection does not prevent cross-clade neutralization breadth. *J. Virol.* *86*, 8031–8040.

Bonasio, R., Scimone, M.L., Schaerli, P., Grabie, N., Lichtman, A.H., and von Andrian, U.H. (2006). Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat. Immunol.* *7*, 1092–1100.

Bonelli, M., von Dalwigk, K., Savitskaya, A., Smolen, J.S., and Scheinecker, C. (2008). Foxp3 expression in CD4+ T cells of patients with systemic lupus erythematosus: a comparative phenotypic analysis. *Ann. Rheum. Dis.* *67*, 664–671.

Botto, M., Dell’Agnola, C., Bygrave, A.E., Thompson, E.M., Cook, H.T., Petry, F., Loos, M.,

Pandolfi, P.P., and Walport, M.J. (1998). Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat. Genet.* **19**, 56–59.

Brick, J.E., Ong, S.H., Bathon, J.M., Walker, S.E., O'Sullivan, F.X., and DiBartolomeo, A.G. (1990). Anti-histone antibodies in the serum of autoimmune MRL and NZB/NZW1 F1 mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **54**, 372–381.

Bruhns, P. (2012). Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* **119**, 5640–5649.

Bulati, M., Buffa, S., Martorana, A., Candore, G., Lio, D., Caruso, C., and Colonna-Romano, G. (2014). Trafficking phenotype and production of granzyme B by double negative B cells (IgG(+)-IgD(-)CD27(-)) in the elderly. *Exp. Gerontol.* **54**, 123–129.

Butte, M.J., Keir, M.E., Phamduy, T.B., Sharpe, A.H., and Freeman, G.J. (2007). Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* **27**, 111–122.

Cai, G., Nie, X., Li, L., Hu, L., Wu, B., Lin, J., Jiang, C., Wang, H., Wang, X., and Shen, Q. (2013). B and T lymphocyte attenuator is highly expressed on intrahepatic T cells during chronic HBV infection and regulates their function. *J. Gastroenterol.* **48**, 1362–1372.

Cai, X., Ge, N., Rong, R., Lu, Y., Zhang, J., and Xu, J. (2019). High expression of BTLA and B7-H4 on the surface of myeloid dendritic cells has a negative regulatory effect on their anti-tuberculosis immunity activity in pleural tuberculosis patients. *Tuberc. Edinb. Scotl.* **119**, 101877.

Cao, R., Tang, W., and Chen, S. (2020). Association between BTLA polymorphisms and susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma in the Chinese population. *J. Clin. Lab. Anal.* **34**, e23221.

Carreño, L.J., Pacheco, R., Gutierrez, M.A., Jacobelli, S., and Kalergis, A.M. (2009). Disease activity in systemic lupus erythematosus is associated with an altered expression of low-affinity Fcγ receptors and costimulatory molecules on dendritic cells. *Immunology* **128**, 334–341.

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

Casciola-Rosen, L.A., Anhalt, G., and Rosen, A. (1994). Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J. Exp. Med.* **179**, 1317–1330.

Ceccarelli, F., Perricone, C., Borgiani, P., Ciccacci, C., Rufini, S., Cipriano, E., Alessandri, C., Spinelli, F.R., Sili Scavalli, A., Novelli, G., et al. (2015). Genetic Factors in Systemic Lupus Erythematosus: Contribution to Disease Phenotype. *J. Immunol. Res.* **2015**, 745647.

Centuori, S.M., Gomes, C.J., Kim, S.S., Putnam, C.W., Larsen, B.T., Garland, L.L., Mount, D.W.,

and Martinez, J.D. (2018). Double-negative (CD27–IgD–) B cells are expanded in NSCLC and inversely correlate with affinity-matured B cell populations. *J. Transl. Med.* **16**, 30.

Chan, O.T., Hannum, L.G., Haberman, A.M., Madaio, M.P., and Shlomchik, M.J. (1999). A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J. Exp. Med.* **189**, 1639–1648.

Chen, Y.-L., Lin, H.-W., Chien, C.-L., Lai, Y.-L., Sun, W.-Z., Chen, C.-A., and Cheng, W.-F. (2019). BTLA blockade enhances Cancer therapy by inhibiting IL-6/IL-10-induced CD19<sup>high</sup> B lymphocytes. *J. Immunother. Cancer* **7**, 313.

Cheng, T., Bai, J., Chung, C.-S., Chen, Y., Biron, B.M., and Ayala, A. (2016). Enhanced Innate Inflammation Induced by Anti-BTLA Antibody in Dual Insult Model of Hemorrhagic Shock/Sepsis. *Shock Augusta Ga* **45**, 40–49.

Cheung, T.C., and Ware, C.F. (2011). The Canonical and Unconventional Ligands of the Herpesvirus Entry Mediator. *Adv. Exp. Med. Biol.* **691**, 353–362.

Cheung, T.C., Humphreys, I.R., Potter, K.G., Norris, P.S., Shumway, H.M., Tran, B.R., Patterson, G., Jean-Jacques, R., Yoon, M., Spear, P.G., et al. (2005). Evolutionarily divergent herpesviruses modulate T cell activation by targeting the herpesvirus entry mediator cosignaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 13218–13223.

Cheung, T.C., Oborne, L.M., Steinberg, M.W., Macauley, M.G., Fukuyama, S., Sanjo, H., D’Souza, C., Norris, P.S., Pfeffer, K., Murphy, K.M., et al. (2009a). T cell intrinsic heterodimeric complexes between HVEM and BTLA determine receptivity to the surrounding microenvironment. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 7286–7296.

Cheung, T.C., Steinberg, M.W., Oborne, L.M., Macauley, M.G., Fukuyama, S., Sanjo, H., D’Souza, C., Norris, P.S., Pfeffer, K., Murphy, K.M., et al. (2009b). Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 6244–6249.

Chi, M., Ma, K., Li, Y., Quan, M., Han, Z., Ding, Z., Liang, X., Zhang, Q., Song, L., and Liu, C. (2021). Immunological Involvement of MicroRNAs in the Key Events of Systemic Lupus Erythematosus. *Front. Immunol.* **12**, 699684.

Choi, J.-Y., Ho, J.H., Pasoto, S.G., Bunin, V., Kim, S., Carrasco, S., Borba, E.F., Gonçalves, C.R., Costa, P.R., Kallas, E.G., et al. (2015). Circulating Follicular Helper-Like T Cells in Systemic Lupus Erythematosus: Association with Disease Activity. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **67**, 988–999.

Christensen, S.R., Shupe, J., Nickerson, K., Kashgarian, M., Flavell, R.A., and Shlomchik, M.J. (2006). Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity* **25**, 417–428.

Chung, Y., Tanaka, S., Chu, F., Nurieva, R.I., Martinez, G.J., Rawal, S., Wang, Y.-H., Lim, H.,

Reynolds, J.M., Zhou, X., et al. (2011). Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat. Med.* **17**, 983–988.

Claes, N., Fraussen, J., Vanheusden, M., Hellings, N., Stinissen, P., Van Wijmeersch, B., Hupperts, R., and Somers, V. (2016). Age-Associated B Cells with Proinflammatory Characteristics Are Expanded in a Proportion of Multiple Sclerosis Patients. *J. Immunol. Baltim. Md* **1950** **197**, 4576–4583.

Clowse, M.E.B., Wallace, D.J., Furie, R.A., Petri, M.A., Pike, M.C., Leszczyński, P., Neuwelt, C.M., Hobbs, K., Keiserman, M., Duca, L., et al. (2017). Efficacy and Safety of Epratuzumab in Moderately to Severely Active Systemic Lupus Erythematosus: Results From Two Phase III Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trials. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **69**, 362–375.

Cojocaru, M., Cojocaru, I.M., Silosi, I., and Vrabie, C.D. (2011). Manifestations of systemic lupus erythematosus. *Maedica* **6**, 330–336.

Colonna-Romano, G., Bulati, M., Aquino, A., Pellicanò, M., Vitello, S., Lio, D., Candore, G., and Caruso, C. (2009). A double-negative (IgD-CD27-) B cell population is increased in the peripheral blood of elderly people. *Mech. Ageing Dev.* **130**, 681–690.

Compaan, D.M., Gonzalez, L.C., Tom, I., Loyet, K.M., Eaton, D., and Hymowitz, S.G. (2005). Attenuating Lymphocyte Activity THE CRYSTAL STRUCTURE OF THE BTLA-HVEM COMPLEX. *J. Biol. Chem.* **280**, 39553–39561.

Costenbader, K.H., Kim, D.J., Peerzada, J., Lockman, S., Nobles-Knight, D., Petri, M., and Karlson, E.W. (2004). Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Arthritis Rheum.* **50**, 849–857.

Couzi, L., Merville, P., Deminière, C., Moreau, J.-F., Combe, C., Pellegrin, J.-L., Viallard, J.-F., and Blanco, P. (2007). Predominance of CD8+ T lymphocytes among periglomerular infiltrating cells and link to the prognosis of class III and class IV lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* **56**, 2362–2370.

Crispin, J.C., Martínez, A., and Alcocer-Varela, J. (2003). Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmun.* **21**, 273–276.

Crispín, J.C., Oukka, M., Bayliss, G., Cohen, R.A., Van Beek, C.A., Stillman, I.E., Kyttaris, V.C., Juang, Y.-T., and Tsokos, G.C. (2008). Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J. Immunol. Baltim. Md* **1950** **181**, 8761–8766.

Cunningham Graham, D.S., Graham, R.R., Manku, H., Wong, A.K., Whittaker, J.C., Gaffney, P.M., Moser, K.L., Rioux, J.D., Altshuler, D., Behrens, T.W., et al. (2008). Polymorphism at the TNF superfamily gene TNFSF4 confers susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* **40**, 83–89.

Dai, R., Zhang, Y., Khan, D., Heid, B., Caudell, D., Crasta, O., and Ahmed, S.A. (2010).

Identification of a Common Lupus Disease-Associated microRNA Expression Pattern in Three Different Murine Models of Lupus. PLOS ONE 5, e14302.

Decker, P., Kötter, I., Klein, R., Berner, B., and Rammensee, H.-G. (2006). Monocyte-derived dendritic cells over-express CD86 in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 45, 1087–1095.

Deng, G.-M., and Tsokos, G.C. (2008). Cholera toxin B accelerates disease progression in lupus-prone mice by promoting lipid raft aggregation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 181, 4019–4026. Deng, Y., and Tsao, B.P. (2010). Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat. Rev. Rheumatol.* 6, 683–692.

Deppong, C., Juehne, T.I., Hurchla, M., Friend, L.D., Shah, D.D., Rose, C.M., Bricker, T.L., Shornick, L.P., Crouch, E.C., Murphy, T.L., et al. (2006). Cutting edge: B and T lymphocyte attenuator and programmed death receptor-1 inhibitory receptors are required for termination of acute allergic airway inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 176, 3909–3913.

Deppong, C., Degnan, J.M., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Green, J.M. (2008). B and T lymphocyte attenuator regulates T cell survival in the lung. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 181, 2973–2979.

Derré, L., Rivals, J.-P., Jandus, C., Pastor, S., Rimoldi, D., Romero, P., Michelin, O., Olive, D., and Speiser, D.E. (2010). BTLA mediates inhibition of human tumor-specific CD8+ T cells that can be partially reversed by vaccination. *J. Clin. Invest.* 120, 157–167.

Divekar, A.A., Dubey, S., Gangalum, P.R., and Singh, R.R. (2011). Dicer insufficiency and microRNA-155 overexpression in lupus regulatory T cells: an apparent paradox in the setting of an inflammatory milieu. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 186, 924–930.

Dixon, F.J., Andrews, B.S., Eisenberg, R.A., McConahey, P.J., Theofilopoulos, A.N., and Wilson, C.B. (1978). Etiology and pathogenesis of a spontaneous lupus-like syndrome in mice. *Arthritis Rheum.* 21, S64-67.

Dolff, S., Quandt, D., Feldkamp, T., Jun, C., Mitchell, A., Hua, F., Specker, C., Kribben, A., Witzke, O., and Wilde, B. (2014). Increased percentages of PD-1 on CD4+ T cells is associated with higher INF- $\gamma$  production and altered IL-17 production in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand. J. Rheumatol.* 43, 307–313.

Domeier, P.P., Chodisetti, S.B., Soni, C., Schell, S.L., Elias, M.J., Wong, E.B., Cooper, T.K., Kitamura, D., and Rahman, Z.S.M. (2016). IFN- $\gamma$  receptor and STAT1 signaling in B cells are central to spontaneous germinal center formation and autoimmunity. *J. Exp. Med.* 213, 715–732.

Douna, H., Amersfoort, J., Schaftenaar, F.H., Kröner, M.J., Kiss, M.G., Slütter, B., Depuydt, M.A.C., Bernabé Kleijn, M.N.A., Wezel, A., Smeets, H.J., et al. (2020). B- and T-lymphocyte attenuation protects against atherosclerosis by regulating follicular B cells.

*Cardiovasc. Res.* **116**, 295–305.

Duchosal, M.A., McConahey, P.J., Robinson, C.A., and Dixon, F.J. (1990). Transfer of human systemic lupus erythematosus in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *J. Exp. Med.* **172**, 985–988.

Duhen, T., Pasero, C., Mallet, F., Barbarat, B., Olive, D., and Costello, R.T. (2004). LIGHT costimulates CD40 triggering and induces immunoglobulin secretion; a novel key partner in T cell-dependent B cell terminal differentiation. *Eur. J. Immunol.* **34**, 3534–3541.

Durcan, L., O'Dwyer, T., and Petri, M. (2019). Management strategies and future directions for systemic lupus erythematosus in adults. *Lancet Lond. Engl.* **393**, 2332–2343.

Eisenberg, R.A., and Via, C.S. (2012). T cells, murine chronic graft-versus-host disease and autoimmunity. *J. Autoimmun.* **39**, 240–247.

Eisenberg, R.A., Tan, E.M., and Dixon, F.J. (1978). Presence of anti-Sm reactivity in autoimmune mouse strains. *J. Exp. Med.* **147**, 582–587.

Enyedy, E.J., Nambiar, M.P., Liossis, S.N., Dennis, G., Kammer, G.M., and Tsokos, G.C. (2001). Fc epsilon receptor type I gamma chain replaces the deficient T cell receptor zeta chain in T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **44**, 1114–1121.

Espeli, M., Bokers, S., Giannico, G., Dickinson, H.A., Bardsley, V., Fogo, A.B., and Smith, K.G.C. (2011). Local Renal Autoantibody Production in Lupus Nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **22**, 296–305.

Farkas, L., Beiske, K., Lund-Johansen, F., Brandtzaeg, P., and Jahnson, F.L. (2001). Plasmacytoid Dendritic Cells (Natural Interferon- $\alpha/\beta$ -Producing Cells) Accumulate in Cutaneous Lupus Erythematosus Lesions. *Am. J. Pathol.* **159**, 237–243.

Farres, M.N., Al-Zifzaf, D.S., Aly, A.A., and Abd Raboh, N.M. (2011). OX40/OX40L in systemic lupus erythematosus: Association with disease activity and lupus nephritis. *Ann. Saudi Med.* **31**, 29–34.

Felten, R., Dervovic, E., Chasset, F., Gottenberg, J.-E., Sibilia, J., Scher, F., and Arnaud, L. (2018). The 2018 pipeline of targeted therapies under clinical development for Systemic Lupus Erythematosus: a systematic review of trials. *Autoimmun. Rev.* **17**, 781–790.

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

Felten, R., Lipsker, D., Sibilia, J., Chasset, F., and Arnaud, L. (2020). The history of lupus throughout the ages. *J. Am. Acad. Dermatol.* **S0190-9622(20)30772-6**.

Fillatreau, S., Sweenie, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., and Anderton, S.M. (2002). B cells

regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* **3**, 944–950.

Finck, B.K., Linsley, P.S., and Wofsy, D. (1994). Treatment of murine lupus with CTLA4Ig. *Science* **265**, 1225–1227.

Finckh, A., Cooper, G.S., Chibnik, L.B., Costenbader, K.H., Watts, J., Pankey, H., Fraser, P.A., and Karlson, E.W. (2006). Occupational silica and solvent exposures and risk of systemic lupus erythematosus in urban women. *Arthritis Rheum.* **54**, 3648–3654.

Fiore, N., Castellano, G., Blasi, A., Capobianco, C., Loverre, A., Montinaro, V., Netti, S., Torres, D., Manno, C., Grandaliano, G., et al. (2008). Immature myeloid and plasmacytoid dendritic cells infiltrate renal tubulointerstitium in patients with lupus nephritis. *Mol. Immunol.* **45**, 259–265.

Fleischer, S.J., Giesecke, C., Mei, H.E., Lipsky, P.E., Daridon, C., and Dörner, T. (2014). Increased frequency of a unique spleen tyrosine kinase bright memory B cell population in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **66**, 3424–3435.

Flores-Borja, F., Kabouridis, P.S., Jury, E.C., Isenberg, D.A., and Mageed, R.A. (2007). Altered lipid raft-associated proximal signaling and translocation of CD45 tyrosine phosphatase in B lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **56**, 291–302.

Fourcade, J., Sun, Z., Pagliano, O., Guillaume, P., Luescher, I.F., Sander, C., Kirkwood, J.M., Olive, D., Kuchroo, V., and Zarour, H.M. (2012). CD8(+) T cells specific for tumor antigens can be rendered dysfunctional by the tumor microenvironment through upregulation of the inhibitory receptors BTLA and PD-1. *Cancer Res.* **72**, 887–896.

Frasca, D., Diaz, A., Romero, M., and Blomberg, B.B. (2021). Phenotypic and Functional Characterization of Double Negative B Cells in the Blood of Individuals With Obesity. *Front. Immunol.* **12**, 616650.

Fu, Z., Li, D., Jiang, W., Wang, L., Zhang, J., Xu, F., Pang, D., and Li, D. (2010). Association of BTLA gene polymorphisms with the risk of malignant breast cancer in Chinese women of Heilongjiang Province. *Breast Cancer Res. Treat.* **120**, 195–202.

Furie, R., Petri, M., Zamani, O., Cervera, R., Wallace, D.J., Tegzová, D., Sanchez-Guerrero, J., Schwarting, A., Merrill, J.T., Chatham, W.W., et al. (2011). A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **63**, 3918–3930.

Gao, N., Dresel, J., Eckstein, V., Gellert, R., Störch, H., Venigalla, R.K.C., Schwenger, V., Max, R., Blank, N., Lorenz, H.-M., et al. (2014). Impaired suppressive capacity of activation-induced regulatory B cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **66**, 2849–2861.

Gavrieli, M., and Murphy, K.M. (2006). Association of Grb-2 and PI3K p85 with phosphotyrosine peptides derived from BTLA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**, 1440–1445.

Gavrieli, M., Watanabe, N., Loftin, S.K., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2003). Characterization of phosphotyrosine binding motifs in the cytoplasmic domain of B and T lymphocyte attenuator required for association with protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 1236–1243.

Gertner-Dardenne, J., Fauriat, C., Orlanducci, F., Thibult, M.-L., Pastor, S., Fitzgibbon, J., Bouabdallah, R., Xerri, L., and Olive, D. (2013). The co-receptor BTLA negatively regulates human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell proliferation: a potential way of immune escape for lymphoma cells. *Blood* **122**, 922–931.

Gies, V., Schickel, J.-N., Jung, S., Joublin, A., Glauzy, S., Knapp, A.-M., Soley, A., Poindron, V., Guffroy, A., Choi, J.-Y., et al. (2018). Impaired TLR9 responses in B cells from patients with systemic lupus erythematosus. *JCI Insight* **3**, 96795.

Giltiay, N.V., Chappell, C.P., Sun, X., Kolhatkar, N., Teal, T.H., Wiedeman, A.E., Kim, J., Tanaka, L., Buechler, M.B., Hamerman, J.A., et al. (2013). Overexpression of TLR7 promotes cell-intrinsic expansion and autoantibody production by transitional T1 B cells. *J. Exp. Med.* **210**, 2773–2789.

Golinski, M.-L., Demeules, M., Derambure, C., Riou, G., Maho-Vaillant, M., Boyer, O., Joly, P., and Calbo, S. (2020). CD11c+ B Cells Are Mainly Memory Cells, Precursors of Antibody Secreting Cells in Healthy Donors. *Front. Immunol.* **11**, 32.

Gonzalez, L.C., Loyet, K.M., Calemine-Fenaux, J., Chauhan, V., Wranik, B., Ouyang, W., and Eaton, D.L. (2005). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 1116–1121.

Grabmeier-Pfistershammer, K., Stecher, C., Zettl, M., Rosskopf, S., Rieger, A., Zlabinger, G.J., and Steinberger, P. (2017). Antibodies targeting BTLA or TIM-3 enhance HIV-1 specific T cell responses in combination with PD-1 blockade. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **183**, 167–173.

Gross, J.A., Johnston, J., Mudri, S., Enselman, R., Dillon, S.R., Madden, K., Xu, W., Parrish-Novak, J., Foster, D., Lofton-Day, C., et al. (2000). TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature* **404**, 995–999.

Grossman, J.M. (2009). Lupus arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **23**, 495–506.

Guerra, S.G., Vyse, T.J., and Cunningham Graham, D.S. (2012). The genetics of lupus: a functional perspective. *Arthritis Res. Ther.* **14**, 211.

Guéry, J.-C. (2019). Why Is Systemic Lupus Erythematosus More Common in Women? *Joint Bone Spine* **86**, 297–299.

Gunawan, M., Her, Z., Liu, M., Tan, S.Y., Chan, X.Y., Tan, W.W.S., Dharmaraaja, S., Fan, Y., Ong, C.B., Loh, E., et al. (2017). A Novel Human Systemic Lupus Erythematosus Model in Humanised Mice. *Sci. Rep.* **7**, 16642.

Haas, K.M., Watanabe, R., Matsushita, T., Nakashima, H., Ishiura, N., Okochi, H., Fujimoto, M.,

and Tedder, T.F. (2010). Protective and Pathogenic Roles for B Cells During Systemic Autoimmunity in NZB/W F1 Mice. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 184, 4789–4800.

Hakkim, A., Fürnrohr, B.G., Amann, K., Laube, B., Abed, U.A., Brinkmann, V., Herrmann, M., Voll, R.E., and Zychlinsky, A. (2010). Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 9813–9818.

Han, L., Wang, W., Fang, Y., Feng, Z., Liao, S., Li, W., Li, Y., Li, C., Maitituoheti, M., Dong, H., et al. (2009). Soluble B and T lymphocyte attenuator possesses antitumor effects and facilitates heat shock protein 70 vaccine-triggered antitumor immunity against a murine TC-1 cervical cancer model in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 183, 7842–7850.

Han, P., Goularte, O.D., Rufner, K., Wilkinson, B., and Kaye, J. (2004). An inhibitory Ig superfamily protein expressed by lymphocytes and APCs is also an early marker of thymocyte positive selection. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 172, 5931–5939.

Hao, Y., O'Neill, P., Naradikian, M.S., Scholz, J.L., and Cancro, M.P. (2011). A B-cell subset uniquely responsive to innate stimuli accumulates in aged mice. *Blood* 118, 1294–1304.

Harley, J.B., and James, J.A. (2010). Everyone Comes from Somewhere: Systemic lupus erythematosus (SLE) and Epstein-Barr Virus, induction of host interferon (INF) and humoral anti-EBNA1 immunity. *Arthritis Rheum.* 62, 1571–1575.

Harry, O., Yasin, S., and Brunner, H. (2018). Childhood-Onset Systemic Lupus Erythematosus: A Review and Update. *J. Pediatr.* 196, 22-30.e2.

Hassanalilou, T., Khalili, L., Ghavamzadeh, S., Shokri, A., Payahoo, L., and Bishak, Y.K. (2017). Role of vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus incidence and aggravation. *Auto-Immun. Highlights* 9, 1.

Haymaker, C.L., Wu, R.C., Ritthipichai, K., Bernatchez, C., Forget, M.-A., Chen, J.Q., Liu, H., Wang, E., Marincola, F., Hwu, P., et al. (2015). BTLA marks a less-differentiated tumor-infiltrating lymphocyte subset in melanoma with enhanced survival properties. *Oncoimmunology* 4, e1014246.

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

He, J., Zhang, X., Wei, Y., Sun, X., Chen, Y., Deng, J., Jin, Y., Gan, Y., Hu, X., Jia, R., et al. (2016). Low-dose interleukin-2 treatment selectively modulates CD4(+) T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *Nat. Med.* 22, 991–993.

Heinemann, K., Wilde, B., Hoerning, A., Tebbe, B., Kribben, A., Witzke, O., and Dolff, S. (2016). Decreased IL-10(+) regulatory B cells (Bregs) in lupus nephritis patients. *Scand. J. Rheumatol.* 45, 312–316.

Helyer, B.J., and Howie, J.B. (1963). Renal disease associated with positive lupus

erythematosus tests in a cross-bred strain of mice. *Nature* **197**, 197.

Herber, D., Brown, T.P., Liang, S., Young, D.A., Collins, M., and Dunussi-Joannopoulos, K. (2007). IL-21 has a pathogenic role in a lupus-prone mouse model and its blockade with IL-21R.Fc reduces disease progression. *J. Immunol. Baltim. Md* **178**, 3822–3830.

Herrada, A.A., Escobedo, N., Iruretagoyena, M., Valenzuela, R.A., Burgos, P.I., Cuitino, L., and Llanos, C. (2019). Innate Immune Cells' Contribution to Systemic Lupus Erythematosus. *Front. Immunol.* **10**, 772.

Herrmann, M., Voll, R.E., Zoller, O.M., Hagenhofer, M., Ponner, B.B., and Kalden, J.R. (1998). Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **41**, 1241–1250.

Herrmann, M., Schulte, S., Wildner, N.H., Wittner, M., Brehm, T.T., Ramharter, M., Woost, R., Lohse, A.W., Jacobs, T., and Schulze zur Wiesch, J. (2020). Analysis of Co-inhibitory Receptor Expression in COVID-19 Infection Compared to Acute Plasmodium falciparum Malaria: LAG-3 and TIM-3 Correlate With T Cell Activation and Course of Disease. *Front. Immunol.* **11**, 1870.

Hobo, W., Norde, W.J., Schaap, N., Fredrix, H., Maas, F., Schellens, K., Falkenburg, J.H.F., Korman, A.J., Olive, D., van der Voort, R., et al. (2012). B and T lymphocyte attenuator mediates inhibition of tumor-reactive CD8+ T cells in patients after allogeneic stem cell transplantation. *J. Immunol. Baltim. Md* **189**, 39–49.

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

Hong, S.-M., Liu, C., Yin, Z., Wu, L., Qu, B., and Shen, N. (2020). MicroRNAs in Systemic Lupus Erythematosus: a Perspective on the Path from Biological Discoveries to Clinical Practice. *Curr. Rheumatol. Rep.* **22**, 17.

Howie, J.B., and Helyer, B.J. (1968). The immunology and pathology of NZB mice. *Adv. Immunol.* **9**, 215–266.

Hron, J.D., and Peng, S.L. (2004). Type I IFN protects against murine lupus. *J. Immunol. Baltim. Md* **173**, 2134–2142.

Hsu, H., Solovyev, I., Colombero, A., Elliott, R., Kelley, M., and Boyle, W.J. (1997). ATAR, a novel tumor necrosis factor receptor family member, signals through TRAF2 and TRAF5. *J. Biol. Chem.* **272**, 13471–13474.

Huang, W., Sinha, J., Newman, J., Reddy, B., Budhai, L., Furie, R., Vaishnaw, A., and Davidson, A. (2002). The effect of anti-CD40 ligand antibody on B cells in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **46**, 1554–1562.

Hughes, G.C., and Choubey, D. (2014). Modulation of autoimmune rheumatic diseases by oestrogen and progesterone. *Nat. Rev. Rheumatol.* **10**, 740–751.

Humrich, J.Y., Morbach, H., Undeutsch, R., Enghard, P., Rosenberger, S., Weigert, O., Kloke, L., Heimann, J., Gaber, T., Brandenburg, S., et al. (2010). Homeostatic imbalance of regulatory and effector T cells due to IL-2 deprivation amplifies murine lupus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 204–209.

Hurchla, M.A., Sedy, J.R., Gavrieli, M., Gavrielli, M., Drake, C.G., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2005). B and T lymphocyte attenuator exhibits structural and expression polymorphisms and is highly induced in anergic CD4+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 3377–3385.

Hutloff, A., Büchner, K., Reiter, K., Baelde, H.J., Odendahl, M., Jacobi, A., Dörner, T., and Kroczek, R.A. (2004). Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *50*, 3211–3220.

Hwang, H.J., Lee, J.J., Kang, S.H., Suh, J.K., Choi, E.S., Jang, S., Hwang, S.-H., Koh, K.-N., Im, H.J., and Kim, N. (2021). The BTLA and PD-1 signaling pathways independently regulate the proliferation and cytotoxicity of human peripheral blood  $\gamma\delta$  T cells. *Immun. Inflamm. Dis.* *9*, 274–287.

Isenberg, D., Gordon, C., Licu, D., Copt, S., Rossi, C.P., and Wofsy, D. (2015). Efficacy and safety of atacicept for prevention of flares in patients with moderate-to-severe systemic lupus erythematosus (SLE): 52-week data (APRIL-SLE randomised trial). *Ann. Rheum. Dis.* *74*, 2006–2015.

Ishida, H., Muchamuel, T., Sakaguchi, S., Andrade, S., Menon, S., and Howard, M. (1994). Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W F1 mice. *J. Exp. Med.* *179*, 305–310.

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

Iwata, S., Yamaoka, K., Niiro, H., Nakano, K., Wang, S.-P., Akashi, K., and Tanaka, Y. (2012). Amplification of Toll-like receptor-mediated signaling through spleen tyrosine kinase in human B-cell activation. *J. Allergy Clin. Immunol.* *129*, 1594–1601.e2.

Jacobi, A.M., Odendahl, M., Reiter, K., Bruns, A., Burmester, G.R., Radbruch, A., Valet, G., Lipsky, P.E., and Dörner, T. (2003). Correlation between circulating CD27high plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *48*, 1332–1342.

Jacobi, A.M., Reiter, K., Mackay, M., Aranow, C., Hiepe, F., Radbruch, A., Hansen, A., Burmester, G.-R., Diamond, B., Lipsky, P.E., et al. (2008). Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95. *Arthritis Rheum.* *58*, 1762–1773.

Jacobson, B.A., Panka, D.J., Nguyen, K.A., Erikson, J., Abbas, A.K., and Marshak-Rothstein, A. (1995). Anatomy of autoantibody production: dominant localization of antibody-producing

cells to T cell zones in Fas-deficient mice. *Immunity* 3, 509–519.

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

Jacquemin, C., Augusto, J.-F., Scherlinger, M., Gensous, N., Forcade, E., Douchet, I., Levionnois, E., Richez, C., Lazaro, E., Duffau, P., et al. (2018). OX40L/OX40 axis impairs follicular and natural Treg function in human SLE. *JCI Insight* 3, 122167.

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

Jin, O., Kavikondala, S., Mok, M.-Y., Sun, L., Gu, J., Fu, R., Chan, A., Yeung, J., Nie, Y., and Lau, C.-S. (2010). Abnormalities in circulating plasmacytoid dendritic cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 12, R137.

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

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

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

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

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

Kaga, H., Komatsuda, A., Omokawa, A., Ito, M., Teshima, K., Tagawa, H., Sawada, K., and Wakui, H. (2015). Downregulated expression of miR-155, miR-17, and miR-181b, and upregulated expression of activation-induced cytidine deaminase and interferon- $\alpha$  in PBMCs from patients with SLE. *Mod. Rheumatol.* 25, 865–870.

Kannan, S., Kurupati, R.K., Doyle, S.A., Freeman, G.J., Schmader, K.E., and Ertl, H.C.J. (2015). BTLA expression declines on B cells of the aged and is associated with low responsiveness to the trivalent influenza vaccine. *Oncotarget* 6, 19445–19455.

Karabon, L., Partyka, A., Ciszak, L., Pawlak-Adamska, E., Tomkiewicz, A., Bojarska-Junak, A., Roliński, J., Wołowiec, D., Wrobel, T., Frydecka, I., et al. (2020). Abnormal Expression of BTLA and CTLA-4 Immune Checkpoint Molecules in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients. *J. Immunol. Res.* **2020**, 6545921.

Karabon, L., Andrzejczak, A., Ciszak, L., Tomkiewicz, A., Szteblich, A., Bojarska-Junak, A., Roliński, J., Wołowiec, D., Wróbel, T., and Kosmaczewska, A. (2021). BTLA Expression in CLL: Epigenetic Regulation and Impact on CLL B Cell Proliferation and Ability to IL-4 Production. *Cells* **10**, 3009.

Karpouzas, G.A., La Cava, A., Ebling, F.M., Singh, R.R., and Hahn, B.H. (2004). Differences between CD8+ T cells in lupus-prone (NZB × NZW) F1 mice and healthy (BALB/c × NZW) F1 mice may influence autoimmunity in the lupus model. *Eur. J. Immunol.* **34**, 2489–2499.

Kasagi, S., Kawano, S., Okazaki, T., Honjo, T., Morinobu, A., Hatachi, S., Shimatani, K., Tanaka, Y., Minato, N., and Kumagai, S. (2010). Anti-Programmed Cell Death 1 Antibody Reduces CD4+PD-1+ T Cells and Relieves the Lupus-Like Nephritis of NZB/W F1 Mice. *J. Immunol.* **184**, 2337–2347.

Kashiwakuma, D., Suto, A., Hiramatsu, Y., Ikeda, K., Takatori, H., Suzuki, K., Kagami, S., Hirose, K., Watanabe, N., Iwamoto, I., et al. (2010). B and T lymphocyte attenuator suppresses IL-21 production from follicular Th cells and subsequent humoral immune responses. *J. Immunol. Baltim. Md* **185**, 2730–2736.

Kasturi, S., and Sammaritano, L.R. (2016). Corticosteroids in Lupus. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **42**, 47–62, viii.

Kehrl, J.H., Riva, A., Wilson, G.L., and Thévenin, C. (1994). Molecular mechanisms regulating CD19, CD20 and CD22 gene expression. *Immunol. Today* **15**, 432–436.

Khadhraoui, C., Kaabachi, W., Tritar, F., Daghfous, H., Hamzaoui, K., and Hamzaoui, A. (2020). Association of BTLA rs1982809 polymorphism with lung cancer risk in Tunisian population. *Int. J. Immunogenet.*

Khoshmirsafo, M., Kianmehr, N., Falak, R., Mowla, S.J., Seif, F., Mirzaei, B., Valizadeh, M., and Shekarabi, M. (2019). Elevated expression of miR-21 and miR-155 in peripheral blood mononuclear cells as potential biomarkers for lupus nephritis. *Int. J. Rheum. Dis.* **22**, 458–467.

Kim, J.-M., Park, S.-H., Kim, H.-Y., and Kwok, S.-K. (2015). A Plasmacytoid Dendritic Cells-Type I Interferon Axis Is Critically Implicated in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 14158–14170.

Kinter, A.L., Godbout, E.J., McNally, J.P., Sereti, I., Roby, G.A., O'Shea, M.A., and Fauci, A.S. (2008). The Common γ-Chain Cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 Induce the Expression of Programmed Death-1 and Its Ligands. *J. Immunol.* **181**, 6738–6746.

Kiriakidou, M., and Ching, C.L. (2020). Systemic Lupus Erythematosus. *Ann. Intern. Med.* **172**,

ITC81–ITC96.

Kivity, S., Agmon-Levin, N., Zandman-Goddard, G., Chapman, J., and Shoenfeld, Y. (2015). Neuropsychiatric lupus: a mosaic of clinical presentations. *BMC Med.* **13**, 43.

Knight, J.S., Carmona-Rivera, C., and Kaplan, M.J. (2012). Proteins derived from neutrophil extracellular traps may serve as self-antigens and mediate organ damage in autoimmune diseases. *Front. Immunol.* **3**, 380.

Kobayashi, Y., Iwata, A., Suzuki, K., Suto, A., Kawashima, S., Saito, Y., Owada, T., Kobayashi, M., Watanabe, N., and Nakajima, H. (2013). B and T lymphocyte attenuator inhibits LPS-induced endotoxic shock by suppressing Toll-like receptor 4 signaling in innate immune cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 5121–5126.

Koga, T., Ichinose, K., and Tsokos, G.C. (2017). T cells and IL-17 in lupus nephritis. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **185**, 95–99.

Krieg, C., Han, P., Stone, R., Goularte, O.D., and Kaye, J. (2005). Functional analysis of B and T lymphocyte attenuator engagement on CD4+ and CD8+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* **175**, 6420–6427.

Krishnan, S., Nambiar, M.P., Warke, V.G., Fisher, C.U., Mitchell, J., Delaney, N., and Tsokos, G.C. (2004). Alterations in lipid raft composition and dynamics contribute to abnormal T cell responses in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md* **172**, 7821–7831.

Kristjansdottir, H., Steinsson, K., Gunnarsson, I., Gröndal, G., Erlendsson, K., and Alarcón-Riquelme, M.E. (2010). Lower expression levels of the programmed death 1 receptor on CD4+CD25+ T cells and correlation with the PD-1.3A genotype in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **62**, 1702–1711.

Kurata, I., Mikami, N., Ohyama, A., Osada, A., Kondo, Y., Tsuboi, H., Sumida, T., and Matsumoto, I. (2021). Impaired function of PD-1+ follicular regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* **206**, 28–35.

Kurien, B.T., and Scofield, R.H. (2006). Autoantibody Determination in the Diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus. *Scand. J. Immunol.* **64**, 227–235.

Kwon, B.S., Tan, K.B., Ni, J., Oh, K.O., Lee, Z.H., Kim, K.K., Kim, Y.J., Wang, S., Gentz, R., Yu, G.L., et al. (1997). A newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily with a wide tissue distribution and involvement in lymphocyte activation. *J. Biol. Chem.* **272**, 14272–14276.

La Cava, A. (2015). Putting together the autoimmunity puzzle. *J. Clin. Invest.* **125**, 2184–2186.

Lacotte, S., Dumortier, H., Décossas, M., Briand, J.-P., and Muller, S. (2010). Identification of new pathogenic players in lupus: autoantibody-secreting cells are present in nephritic kidneys of (NZBxNZW)F1 mice. *J. Immunol. Baltim. Md* **184**, 3937–3945.

Lacotte, S., Decossas, M., Le Coz, C., Brun, S., Muller, S., and Dumortier, H. (2013). Early differentiated CD138(high) MHCII+ IgG+ plasma cells express CXCR3 and localize into inflamed kidneys of lupus mice. *PLoS One* 8, e58140.

Lange, A., Sundén-Cullberg, J., Magnuson, A., and Hultgren, O. (2017). Soluble B and T Lymphocyte Attenuator Correlates to Disease Severity in Sepsis and High Levels Are Associated with an Increased Risk of Mortality. *PLoS One* 12, e0169176.

Lashine, Y.A., Salah, S., Aboelenein, H.R., and Abdelaziz, A.I. (2015). Correcting the expression of miRNA-155 represses PP2Ac and enhances the release of IL-2 in PBMCs of juvenile SLE patients. *Lupus* 24, 240–247.

Laurent, L., Le Fur, A., Bloas, R.L., Néel, M., Mary, C., Moreau, A., Poirier, N., Vanhove, B., and Fakhouri, F. (2017). Prevention of lupus nephritis development in NZB/NZW mice by selective blockade of CD28. *Eur. J. Immunol.* 47, 1368–1376.

Le Coz, C., Joublin, A., Pasquali, J.-L., Korganow, A.-S., Dumortier, H., and Monneaux, F. (2013). Circulating TFH Subset Distribution Is Strongly Affected in Lupus Patients with an Active Disease. *PLoS ONE* 8.

Leffler, J., Martin, M., Gullstrand, B., Tydén, H., Lood, C., Truedsson, L., Bengtsson, A.A., and Blom, A.M. (2012). Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J. Immunol. Baltim. Md* 190, 3522–3531.

Leiss, H., Salzberger, W., Jacobs, B., Gessl, I., Kozakowski, N., Blüml, S., Puchner, A., Kiss, A., Podesser, B.K., Smolen, J.S., et al. (2017). MicroRNA 155-deficiency leads to decreased autoantibody levels and reduced severity of nephritis and pneumonitis in pristane-induced lupus. *PLoS One* 12, e0181015.

Lepenies, B., Pfeffer, K., Hurchla, M.A., Murphy, T.L., Murphy, K.M., Oetzel, J., Fleischer, B., and Jacobs, T. (2007). Ligation of B and T lymphocyte attenuator prevents the genesis of experimental cerebral malaria. *J. Immunol. Baltim. Md* 179, 4093–4100.

Li, F., Yang, Y., Zhu, X., Huang, L., and Xu, J. (2015). Macrophage Polarization Modulates Development of Systemic Lupus Erythematosus. *Cell. Physiol. Biochem.* 37, 1279–1288.

Li, S., Zhang, M., Xiang, F., Zhao, J., Jiang, C., and Zhu, J. (2011). Dendritic cells expressing BTLA induces CD8+ T cell tolerance and attenuates the severity of diabetes. *Vaccine* 29, 7747–7751. Li, W.-X., Pan, H.-F., Chen, G.-P., Tao, J.-H., Li, X.-P., and Ye, D.-Q. (2012). Expression of inducible co-stimulator on peripheral blood T lymphocytes in patients with lupus nephritis. *Rheumatol. Int.* 32, 2051–2055.

Liang, B., Gee, R.J., Kashgarian, M.J., Sharpe, A.H., and Mamula, M.J. (1999). B7 costimulation in the development of lupus: autoimmunity arises either in the absence of B7.1/B7.2 or in the presence of anti-b7.1/B7.2 blocking antibodies. *J. Immunol. Baltim. Md* 163, 2322–2329.

Liang, B., Gardner, D.B., Griswold, D.E., Bugelski, P.J., and Song, X.Y.R. (2006). Anti-interleukin-6 monoclonal antibody inhibits autoimmune responses in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Immunology* **119**, 296–305.

Lin, S.-C., Kuo, C.-C., and Chan, C.-H. (2006). Association of a BTLA gene polymorphism with the risk of rheumatoid arthritis. *J. Biomed. Sci.* **13**, 853–860.

Lin, S.-C., Chen, K.-H., Lin, C.-H., Kuo, C.-C., Ling, Q.-D., and Chan, C.-H. (2007). The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *Eur. J. Clin. Invest.* **37**, 987–996.

Linker-Israeli, M., Deans, R.J., Wallace, D.J., Prehn, J., Ozeri-Chen, T., and Klinenberg, J.R. (1991). Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis. *J. Immunol. Baltim. Md* **1950** **147**, 117–123.

Linterman, M.A., Pierson, W., Lee, S.K., Kallies, A., Kawamoto, S., Rayner, T.F., Srivastava, M., Divekar, D.P., Beaton, L., Hogan, J.J., et al. (2011). Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat. Med.* **17**, 975–982.

Liossis, S.N., Kovacs, B., Dennis, G., Kammer, G.M., and Tsokos, G.C. (1996). B cells from patients with systemic lupus erythematosus display abnormal antigen receptor-mediated early signal transduction events. *J. Clin. Invest.* **98**, 2549–2557.

Liu, C., Jiang, J., Gao, L., Wang, X., Hu, X., Wu, M., Wu, J., Xu, T., Shi, Q., and Zhang, X. (2015). Soluble PD-1 aggravates progression of collagen-induced arthritis through Th1 and Th17 pathways. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 340.

Liu, C., Wang, D., Song, Y., Lu, S., Zhao, J., and Wang, H. (2018a). Increased circulating CD4+CXCR5+FoxP3+ follicular regulatory T cells correlated with severity of systemic lupus erythematosus patients. *Int. Immunopharmacol.* **56**, 261–268.

Liu, M.-F., Wang, C.-R., Fung, L.-L., and Wu, C.-R. (2004). Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand. J. Immunol.* **59**, 198–202.

Liu, Q., Lu, Y., An, L., and Li, C.-S. (2018b). B- and T-Lymphocyte Attenuator Expression on Regulatory T-Cells in Patients with Severe Sepsis. *Chin. Med. J. (Engl.)* **131**, 2637–2639.

Liu, Y., Liu, A., Iikuni, N., Xu, H., Shi, F.-D., and La Cava, A. (2014). Regulatory CD4+ T cells promote B cell anergy in murine lupus. *J. Immunol. Baltim. Md* **1950** **192**, 4069–4073.

Liu, Y., Nie, W., Jin, Y., Zhuo, A., Zang, Y., and Xiu, Q. (2016). B and T Lymphocyte Attenuator is a Target of miR-155 during Naïve CD4+ T Cell Activation. *Iran. J. Immunol. IJI* **13**, 89–99.

Llinàs, L., Lázaro, A., de Salort, J., Matesanz-Isabel, J., Sintes, J., and Engel, P. (2011). Expression profiles of novel cell surface molecules on B-cell subsets and plasma cells as analyzed by flow cytometry. *Immunol. Lett.* **134**, 113–121.

Lopez Velazquez, M., and Highland, K.B. (2018). Pulmonary manifestations of systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Curr. Opin. Rheumatol.* *30*, 449–464.

Loyet, K.M., Ouyang, W., Eaton, D.L., and Stults, J.T. (2005). Proteomic profiling of surface proteins on Th1 and Th2 cells. *J. Proteome Res.* *4*, 400–409.

Lumb, S., Fleischer, S.J., Wiedemann, A., Daridon, C., Maloney, A., Shock, A., and Dörner, T. (2016). Engagement of CD22 on B cells with the monoclonal antibody epratuzumab stimulates the phosphorylation of upstream inhibitory signals of the B cell receptor. *J. Cell Commun. Signal.* *10*, 143–151.

Lyssuk, E.Y., Torgashina, A.V., Soloviev, S.K., Nassonov, E.L., and Bykovskaia, S.N. (2007). Reduced number and function of CD4+CD25highFoxP3+ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv. Exp. Med. Biol.* *601*, 113–119.

Mackay, M., Stanevsky, A., Wang, T., Aranow, C., Li, M., Koenig, S., Ravetch, J.V., and Diamond, B. (2006). Selective dysregulation of the FcγIIB receptor on memory B cells in SLE. *J. Exp. Med.* *203*, 2157–2164.

Mahajan, A., Herrmann, M., and Muñoz, L.E. (2016). Clearance Deficiency and Cell Death Pathways: A Model for the Pathogenesis of SLE. *Front. Immunol.* *7*, 35.

Malissen, N., Macagno, N., Granjeaud, S., Granier, C., Moutardier, V., Gaudy-Marqueste, C., Habel, N., Mandavit, M., Guillot, B., Pasero, C., et al. (2019). HVEM has a broader expression than PD-L1 and constitutes a negative prognostic marker and potential treatment target for melanoma. *Oncoimmunology* *8*, e1665976.

Malkiel, S., Jeganathan, V., Wolfson, S., Orduño, N.M., Marasco, E., Aranow, C., Mackay, M., Gregersen, P.K., and Diamond, B. (2016). Checkpoints for Autoreactive B Cells in the Peripheral Blood of Lupus Patients Assessed by Flow Cytometry. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* *68*, 2210–2220.

Mallavarapu, R.K., and Grimsley, E.W. (2007). The history of lupus erythematosus. *South. Med. J.* *100*, 896–898.

Manku, H., Langefeld, C.D., Guerra, S.G., Malik, T.H., Alarcon-Riquelme, M., Anaya, J.-M., Bae, S.-C., Boackle, S.A., Brown, E.E., Criswell, L.A., et al. (2013). Trans-Ancestral Studies Fine Map the SLE-Susceptibility Locus TNFSF4. *PLOS Genet.* *9*, e1003554.

Margery-Muir, A.A., Bundell, C., Nelson, D., Groth, D.M., and Wetherall, J.D. (2017). Gender balance in patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmun. Rev.* *16*, 258–268.

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

Mauri, D.N., Ebner, R., Montgomery, R.I., Kochel, K.D., Cheung, T.C., Yu, G.L., Ruben, S., Murphy, M., Eisenberg, R.J., Cohen, G.H., et al. (1998). LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity* 8, 21–30.

McDonald, G., Deepak, S., Miguel, L., Hall, C.J., Isenberg, D.A., Magee, A.I., Butters, T., and Jury, E.C. (2014). Normalizing glycosphingolipids restores function in CD4+ T cells from lupus patients. *J. Clin. Invest.* 124, 712–724.

Merrill, J.T., Neuwelt, C.M., Wallace, D.J., Shanahan, J.C., Latinis, K.M., Oates, J.C., Utset, T.O., Gordon, C., Isenberg, D.A., Hsieh, H.-J., et al. (2010). Efficacy and Safety of Rituximab in Moderately-to-Severely Active Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 62, 222–233.

M'Hidi, H., Thibault, M.-L., Chetaille, B., Rey, F., Bouadallah, R., Nicollas, R., Olive, D., and Xerri, L. (2009). High expression of the inhibitory receptor BTLA in T-follicular helper cells and in B-cell small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.* 132, 589–596.

Miceli-Richard, C. (2015). Epigenetics and lupus. *Joint Bone Spine* 82, 90–93.

Mihara, M., Takagi, N., Takeda, Y., and Ohsugi, Y. (1998). IL-6 receptor blockage inhibits the onset of autoimmune kidney disease in NZB/W F1 mice. *Clin. Exp. Immunol.* 112, 397–402.

Mihara, M., Tan, I., Chuzhin, Y., Reddy, B., Budhai, L., Holzer, A., Gu, Y., and Davidson, A. (2000). CTLA4Ig inhibits T cell-dependent B-cell maturation in murine systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 106, 91–101.

Miner, J.J., and Kim, A.H.J. (2014). Cardiac manifestations of systemic lupus erythematosus. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 40, 51–60.

Mintz, M.A., Felce, J.H., Chou, M.Y., Mayya, V., Xu, Y., Shui, J.-W., An, J., Li, Z., Marson, A., Okada, T., et al. (2019). The HVEM-BTLA Axis Restrains T Cell Help to Germinal Center B Cells and Functions as a Cell-Extrinsic Suppressor in Lymphomagenesis. *Immunity* 51, 310–323.e7.

Miyara, M., Amoura, Z., Parizot, C., Badoual, C., Dorgham, K., Trad, S., Nochy, D., Debré, P., Piette, J.-C., and Gorochov, G. (2005). Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 175, 8392–8400.

Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., et al. (2009). Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4+ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity* 30, 899–911.

Mohammadi, S., Saghaeian-Jazi, M., Sedighi, S., and Memarian, A. (2017). Immunomodulation in systemic lupus erythematosus: induction of M2 population in monocyte-derived macrophages by pioglitazone. *Lupus* 26, 1318–1327.

Moir, S., Ho, J., Malaspina, A., Wang, W., DiPoto, A.C., O'Shea, M.A., Roby, G., Kottilil, S.,

Arthos, J., Proschan, M.A., et al. (2008). Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J. Exp. Med.* 205, 1797–1805.

Mok, C.C. (2013). Vitamin D and systemic lupus erythematosus: an update. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 9, 453–463.

Monaghan, S.F., Banerjee, D., Chung, C.-S., Lomas-Neira, J., Cygan, K.J., Rhine, C.L., Fairbrother, W.G., Heffernan, D.S., Levy, M.M., Cioffi, W.G., et al. (2018). Changes in the process of alternative RNA splicing results in soluble B and T lymphocyte attenuator with biological and clinical implications in critical illness. *Mol. Med.* 24.

Monneaux, F., Dumortier, H., Steiner, G., Briand, J.P., and Muller, S. (2001). Murine models of systemic lupus erythematosus: B and T cell responses to spliceosomal ribonucleoproteins in MRL/Fas(lpr) and (NZB x NZW)F(1) lupus mice. *Int. Immunol.* 13, 1155–1163.

Monneaux, F., Lozano, J.M., Patarroyo, M.E., Briand, J.-P., and Muller, S. (2003). T cell recognition and therapeutic effect of a phosphorylated synthetic peptide of the 70K snRNP protein administered in MR/lpr mice. *Eur. J. Immunol.* 33, 287–296.

Montgomery, R.I., Warner, M.S., Lum, B.J., and Spear, P.G. (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87, 427–436.

Morel, L., Rudofsky, U.H., Longmate, J.A., Schiffenbauer, J., and Wakeland, E.K. (1994). Polygenic control of susceptibility to murine systemic lupus erythematosus. *Immunity* 1, 219–229.

Morita, R., Schmitt, N., Bentebibel, S.-E., Ranganathan, R., Bourdery, L., Zurawski, G., Foucat, E., Dullaers, M., Oh, S., Sabzghabaei, N., et al. (2011). Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 34, 108–121.

Moulton, V.R., Suarez-Fueyo, A., Meidan, E., Li, H., Mizui, M., and Tsokos, G.C. (2017). Pathogenesis of Human Systemic Lupus Erythematosus: A Cellular Perspective. *Trends Mol. Med.* 23, 615–635.

Mullard, A. (2021). FDA approves AstraZeneca's anifrolumab for lupus. *Nat. Rev. Drug Discov.* 20, 658.

Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2010). Slow down and survive: Enigmatic immunoregulation by BT LA and HVEM. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 389–411.

Murphy, K.A., Bhamidipati, K., Rubin, S.J.S., Kipp, L., Robinson, W.H., and Lanz, T.V. (2019). Immunomodulatory receptors are differentially expressed in B and T cell subsets relevant to autoimmune disease. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 209, 108276.

Nakagomi, D., Suzuki, K., Hosokawa, J., Kobayashi, Y., Suto, A., Takatori, H., Watanabe, N.,

Matsue, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., et al. (2013). Therapeutic potential of B and T lymphocyte attenuator expressed on CD8+ T cells for contact hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 702–711.

Nambiar, M.P., Enyedy, E.J., Fisher, C.U., Krishnan, S., Warke, V.G., Gilliland, W.R., Oglesby, R.J., and Tsokos, G.C. (2002). Abnormal expression of various molecular forms and distribution of T cell receptor zeta chain in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **46**, 163–174.

Nambiar, M.P., Fisher, C.U., Kumar, A., Tsokos, C.G., Warke, V.G., and Tsokos, G.C. (2003). Forced expression of the Fc receptor gamma-chain renders human T cells hyperresponsive to TCR/CD3 stimulation. *J. Immunol. Baltim. Md* **170**, 2871–2876.

Nan, X.-P., Zhang, Y., Yu, H.-T., Li, Y., Sun, R.-L., Wang, J.-P., and Bai, X.-F. (2010). Circulating CD4+CD25high regulatory T cells and expression of PD-1 and BTLA on CD4+ T cells in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Viral Immunol.* **23**, 63–70.

Naradikian, M.S., Myles, A., Beiting, D.P., Roberts, K.J., Dawson, L., Herati, R.S., Bengsch, B., Linderman, S.L., Stelekatit, E., Spolski, R., et al. (2016). Cutting Edge: IL-4, IL-21, and IFN- $\gamma$  Interact To Govern T-bet and CD11c Expression in TLR-Activated B Cells. *J. Immunol. Baltim. Md* **197**, 1023–1028.

Navarra, S.V., Guzmán, R.M., Gallacher, A.E., Hall, S., Levy, R.A., Jimenez, R.E., Li, E.K.-M., Thomas, M., Kim, H.-Y., León, M.G., et al. (2011). Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* **377**, 721–731.

Nickerson, K.M., Christensen, S.R., Shupe, J., Kashgarian, M., Kim, D., Elkorn, K., and Shlomchik, M.J. (2010). TLR9 Regulates TLR7- and MyD88-Dependent Autoantibody Production and Disease in a Murine Model of Lupus. *J. Immunol.* **184**, 1840–1848.

Nie, Y.J., Mok, M.Y., Chan, G.C.F., Chan, A.W., Jin, O.U., Kavikondala, S., Lie, A.K.W., and Lau, C.S. (2010). Phenotypic and functional abnormalities of bone marrow-derived dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* **12**, R91.

Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., and Honjo, T. (1999). Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 Gene Encoding an ITIM Motif-Carrying Immunoreceptor. *Immunity* **11**, 141–151.

Niu, X.-L., Feng, D., Hao, S., Kuang, X.-Y., Wu, Y., Zhu, G.-H., and Huang, W.-Y. (2019). The significance of M1/M2 macrophage-like monocytes in children with systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Inflamm.* **17**, 2058739218824463.

Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., et al. (2008). Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* **29**, 138–149. Odendahl, M., Jacobi, A., Hansen, A., Feist, E., Hiepe, F., Burmester, G.R., Lipsky, P.E.,

Radbruch, A., and Dörner, T. (2000). Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **165**, 5970–5979.

Ohl, K., and Tenbrock, K. (2015). Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Immunol.* **45**, 344–355.

Ohmura, K. (2021). Which is the best SLE activity index for clinical trials? *Mod. Rheumatol.* **31**, 20–28.

Okano, M., Otsuki, N., Azuma, M., Fujiwara, T., Kariya, S., Sugata, Y., Higaki, T., Kino, K., Tanimoto, Y., Okubo, K., et al. (2008). Allergen-specific immunotherapy alters the expression of B and T lymphocyte attenuator, a co-inhibitory molecule, in allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* **38**, 1891–1900.

Okazaki, T., Maeda, A., Nishimura, H., Kurosaki, T., and Honjo, T. (2001). PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13866–13871.

Oki, M., Watanabe, N., Owada, T., Oya, Y., Ikeda, K., Saito, Y., Matsumura, R., Seto, Y., Iwamoto, I., and Nakajima, H. (2011). A functional polymorphism in B and T lymphocyte attenuator is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis. *Clin. Dev. Immunol.* **2011**, 305656.

Østensen, M., and Villiger, P.M. (2001). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **10**, 135–139.

Oster, C., Wilde, B., Specker, C., Sun, M., Kribben, A., Witzke, O., and Dolff, S. (2019). BTLA Expression on Th1, Th2 and Th17 Effector T-Cells of Patients with Systemic Lupus Erythematosus Is Associated with Active Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **20**.

Otsuki, N., Kamimura, Y., Hashiguchi, M., and Azuma, M. (2006). Expression and function of the B and T lymphocyte attenuator (BTLA/CD272) on human T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **344**, 1121–1127.

Owada, T., Watanabe, N., Oki, M., Oya, Y., Saito, Y., Saito, T., Iwamoto, I., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Nakajima, H. (2010). Activation-induced accumulation of B and T lymphocyte attenuator at the immunological synapse in CD4+ T cells. *J. Leukoc. Biol.* **87**, 425–432.

Oya, Y., Watanabe, N., Owada, T., Oki, M., Hirose, K., Suto, A., Kagami, S.-I., Nakajima, H., Kishimoto, T., Iwamoto, I., et al. (2008). Development of autoimmune hepatitis-like disease and production of autoantibodies to nuclear antigens in mice lacking B and T lymphocyte attenuator. *Arthritis Rheum.* **58**, 2498–2510.

Oya, Y., Watanabe, N., Kobayashi, Y., Owada, T., Oki, M., Ikeda, K., Suto, A., Kagami, S., Hirose, K., Kishimoto, T., et al. (2011). Lack of B and T lymphocyte attenuator exacerbates autoimmune disorders and induces Fas-independent liver injury in MRL-lpr/lpr mice. *Int.*

Immunol. 23, 335–344.

Ozaki, K., Spolski, R., Ettinger, R., Kim, H.-P., Wang, G., Qi, C.-F., Hwu, P., Shaffer, D.J., Akilesh, S., Roopenian, D.C., et al. (2004). Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J. Immunol. Baltim. Md* 173, 5361–5371.

Paluch, C., Santos, A.M., Anzilotti, C., Cornall, R.J., and Davis, S.J. (2018). Immune Checkpoints as Therapeutic Targets in Autoimmunity. *Front. Immunol.* 9, 2306.

Pan, L., Lu, M.-P., Wang, J.-H., Xu, M., and Yang, S.-R. (2020). Immunological pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus. *World J. Pediatr. WJP* 16, 19–30.

Partyka, A., Tupikowski, K., Kolodziej, A., Zdrojowy, R., Halon, A., Malkiewicz, B., Dembowski, J., Frydecka, I., and Karabon, L. (2016). Association of 3' nearby gene BTLA polymorphisms with the risk of renal cell carcinoma in the Polish population. *Urol. Oncol.* 34, 419.e13-19.

Pasero, C., Speiser, D., Derré, L., and Olive, D. (2012). The HVEM network: new directions in targeting novel costimulatory/co-inhibitory molecules for cancer therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.*

Patschan, S., Dolff, S., Kribben, A., Dürig, J., Patschan, D., Wilde, B., Specker, C., Philipp, T., and Witzke, O. (2006). CD134 expression on CD4+ T cells is associated with nephritis and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 145, 235–242.

Pawar, R.D., Patole, P.S., Zecher, D., Segerer, S., Kretzler, M., Schlöndorff, D., and Anders, H.-J. (2006). Toll-Like Receptor-7 Modulates Immune Complex Glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 141–149.

Peng, S.L., Moslehi, J., Robert, M.E., and Craft, J. (1998). Perforin protects against autoimmunity in lupus-prone mice. *J. Immunol. Baltim. Md* 160, 652–660.

Perper, S.J., Westmoreland, S.V., Karman, J., Twomey, R., Seagal, J., Wang, R., McRae, B.L., and Clarke, S.H. (2019). Treatment with a CD40 Antagonist Antibody Reverses Severe Proteinuria and Loss of Saliva Production and Restores Glomerular Morphology in Murine Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol. Author Choice* 203, 58–75.

Peterson, E., Robertson, A.D., and Emlen, W. (1996). Serum and urinary interleukin-6 in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 5, 571–575.

Petri, M., Orbai, A.-M., Alarcón, G.S., Gordon, C., Merrill, J.T., Fortin, P.R., Bruce, I.N., Isenberg, D., Wallace, D.J., Nived, O., et al. (2012). Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 64, 2677–2686.

Piancone, F., Saresella, M., Marventano, I., La Rosa, F., Zoppis, M., Agostini, S., Longhi, R., Caputo, D., Mendoza, L., Rovaris, M., et al. (2016). B Lymphocytes in Multiple Sclerosis: Bregs

and BTLA/CD272 Expressing-CD19+ Lymphocytes Modulate Disease Severity. *Sci. Rep.* **6**, 29699.

Pieterse, E., and van der Vlag, J. (2014). Breaking Immunological Tolerance in Systemic Lupus Erythematosus. *Front. Immunol.* **5**, 164.

Pisitkun, P., Deane, J.A., Difilippantonio, M.J., Tarasenko, T., Satterthwaite, A.B., and Bolland, S. (2006). Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science* **312**, 1669–1672.

Pons-Estel, G.J., Ugarte-Gil, M.F., and Alarcón, G.S. (2017). Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **13**, 799–814.

Portugal, S., Tipton, C.M., Sohn, H., Kone, Y., Wang, J., Li, S., Skinner, J., Virtaneva, K., Sturdevant, D.E., Porcella, S.F., et al. (2015). Malaria-associated atypical memory B cells exhibit markedly reduced B cell receptor signaling and effector function. *ELife* **4**.

Priatel, J.J., Utting, O., and Teh, H.S. (2001). TCR/self-antigen interactions drive double-negative T cell peripheral expansion and differentiation into suppressor cells. *J. Immunol.* Baltim. Md **1950** *167*, 6188–6194.

Probst, H.C., McCoy, K., Okazaki, T., Honjo, T., and van den Broek, M. (2005). Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat. Immunol.* **6**, 280–286.

Proietto, A.I., Dommelen, S. van, Zhou, P., Rizzitelli, A., D'Amico, A., Steptoe, R.J., Naik, S.H., Lahoud, M.H., Liu, Y., Zheng, P., et al. (2008). Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 19869–19874.

Puliaev, R., Puliaeva, I., Welniak, L.A., Ryan, A.E., Haas, M., Murphy, W.J., and Via, C.S. (2008). CTL-Promoting Effects of CD40 Stimulation Outweigh B Cell-Stimulatory Effects Resulting in B Cell Elimination and Disease Improvement in a Murine Model of Lupus. *J. Immunol.* **181**, 47–61.

Rabani, M., Wilde, B., Hübbers, K., Xu, S., Kribben, A., Witzke, O., and Dolff, S. (2018). IL-21 dependent Granzyme B production of B-cells is decreased in patients with lupus nephritis. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **188**, 45–51.

Ramanujam, M., Wang, X., Huang, W., Schiffer, L., Grimaldi, C., Akkerman, A., Diamond, B., Madaio, M.P., and Davidson, A. (2004). Mechanism of action of transmembrane activator and calcium modulator ligand interactor-Ig in murine systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* Baltim. Md **1950** *173*, 3524–3534.

Rankin, A.L., Guay, H., Herber, D., Bertino, S.A., Duzanski, T.A., Carrier, Y., Keegan, S., Senices, M., Stedman, N., Ryan, M., et al. (2012). IL-21 Receptor Is Required for the Systemic Accumulation of Activated B and T Lymphocytes in MRL/MpJ-Faslpr/lpr/J Mice. *J. Immunol.* **188**, 1656–1667.

Rao, D.A., Gurish, M.F., Marshall, J.L., Slowikowski, K., Fonseka, C.Y., Liu, Y., Donlin, L.T., Henderson, L.A., Wei, K., Mizoguchi, F., et al. (2017). Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature* **542**, 110–114.

del Rio, M.-L., Kaye, J., and Rodriguez-Barbosa, J.-I. (2010). Detection of protein on BTLA<sup>low</sup> cells and in vivo antibody-mediated down-modulation of BTLA on lymphoid and myeloid cells of C57BL/6 and BALB/c BTLA allelic variants. *Immunobiology* **215**, 570–578.

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

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

Ritthipichai, K., Haymaker, C.L., Martinez, M., Aschenbrenner, A., Yi, X., Zhang, M., Kale, C., Vence, L.M., Roszik, J., Hailemichael, Y., et al. (2017). Multifaceted Role of BTLA in the Control of CD8+ T-cell Fate after Antigen Encounter. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **23**, 6151–6164.

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

Rodríguez-Bayona, B., Ramos-Amaya, A., Pérez-Venegas, J.J., Rodríguez, C., and Brieva, J.A. (2010). Decreased frequency and activated phenotype of blood CD27 IgD IgM B lymphocytes is a permanent abnormality in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Res. Ther.* **12**, R108.

Rosenblum, M.D., Remedios, K.A., and Abbas, A.K. (2015). Mechanisms of human autoimmunity. *J. Clin. Invest.* **125**, 2228–2233.

Roubinian, J.R., Talal, N., Greenspan, J.S., Goodman, J.R., and Siiteri, P.K. (1978). Effect of castration and sex hormone treatment on survival, anti-nucleic acid antibodies, and glomerulonephritis in NZB/NZW F1 mice. *J. Exp. Med.* **147**, 1568–1583.

Rovin, B.H., Furie, R., Latinis, K., Looney, R.J., Fervenza, F.C., Sanchez-Guerrero, J., Maciuca, R., Zhang, D., Garg, J.P., Brunetta, P., et al. (2012). Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: the Lupus Nephritis Assessment with Rituximab study. *Arthritis Rheum.* **64**, 1215–1226.

Rowland, S.L., Riggs, J.M., Gilfillan, S., Bugatti, M., Vermi, W., Kolbeck, R., Unanue, E.R., Sanjuan, M.A., and Colonna, M. (2014). Early, transient depletion of plasmacytoid dendritic

cells ameliorates autoimmunity in a lupus model. *J. Exp. Med.* **211**, 1977.

Rubtsov, A.V., Rubtsova, K., Fischer, A., Meehan, R.T., Gillis, J.Z., Kappler, J.W., and Marrack, P. (2011). Toll-like receptor 7 (TLR7)-driven accumulation of a novel CD11c+ B-cell population is important for the development of autoimmunity. *Blood* **118**, 1305–1315.

Rubtsov, A.V., Rubtsova, K., Kappler, J.W., Jacobelli, J., Friedman, R.S., and Marrack, P. (2015). CD11c-Expressing B Cells Are Located at the T Cell/B Cell Border in Spleen and Are Potent APCs. *J. Immunol.* **195**, 71–79.

Rubtsova, K., Rubtsov, A.V., Thurman, J.M., Mennona, J.M., Kappler, J.W., and Marrack, P. (2017). B cells expressing the transcription factor T-bet drive lupus-like autoimmunity. *J. Clin. Invest.* **127**, 1392–1404.

Rudofsky, U.H., Evans, B.D., Balaban, S.L., Mottironi, V.D., and Gabrielsen, A.E. (1993). Differences in expression of lupus nephritis in New Zealand mixed H-2z homozygous inbred strains of mice derived from New Zealand black and New Zealand white mice. Origins and initial characterization. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **68**, 419–426.

Saadoun, D., Terrier, B., Bannock, J., Vazquez, T., Massad, C., Kang, I., Joly, F., Rosenzwajg, M., Sene, D., Benech, P., et al. (2013). Expansion of autoreactive unresponsive CD21-/low B cells in Sjögren's syndrome-associated lymphoproliferation. *Arthritis Rheum.* **65**, 1085–1096.

Sage, P.T., Paterson, A.M., Lovitch, S.B., and Sharpe, A.H. (2014). The Coinhibitory Receptor CTLA-4 Controls B Cell Responses by Modulating T Follicular Helper, T Follicular Regulatory, and T Regulatory Cells. *Immunity* **41**, 1026–1039.

Sakoda, Y., Park, J.-J., Zhao, Y., Kuramasu, A., Geng, D., Liu, Y., Davila, E., and Tamada, K. (2011). Dichotomous regulation of GVHD through bidirectional functions of the BTLA-HVEM pathway. *Blood* **117**, 2506–2514.

Satoh, M., and Reeves, W.H. (1994). Induction of lupus-associated autoantibodies in BALB/c mice by intraperitoneal injection of pristane. *J. Exp. Med.* **180**, 2341–2346.

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

Sawaf, M., Dumortier, H., and Monneaux, F. (2016). Follicular Helper T Cells in Systemic Lupus Erythematosus: Why Should They Be Considered as Interesting Therapeutic Targets? *J. Immunol. Res.* **2016**, 5767106.

Sawaf, M., Fauny, J.-D., Felten, R., Sagez, F., Gottenberg, J.-E., Dumortier, H., and Monneaux, F. (2018). Defective BTLA functionality is rescued by restoring lipid metabolism in lupus CD4+ T cells. *JCI Insight* **3**.

Scalapino, K.J., Tang, Q., Bluestone, J.A., Bonyhadi, M.L., and Daikh, D.I. (2006). Suppression

of disease in New Zealand Black/New Zealand White lupus-prone mice by adoptive transfer of ex vivo expanded regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 177, 1451–1459.

Scherlinger, M., Guillotin, V., Douchet, I., Vacher, P., Boizard-Moracchini, A., Guegan, J.-P., Garreau, A., Merillon, N., Vermorel, A., Ribeiro, E., et al. (2021). Selectins impair regulatory T cell function and contribute to systemic lupus erythematosus pathogenesis. *Sci. Transl. Med.* 13, eabi4994.

Schneider, H., and Rudd, C.E. (2014). Diverse Mechanisms Regulate the Surface Expression of Immunotherapeutic Target CTLA-4. *Front. Immunol.* 5, 619.

Schultheiß, C., Paschold, L., Simnica, D., Mohme, M., Willscher, E., von Wenserski, L., Scholz, R., Wieters, I., Dahlke, C., Tolosa, E., et al. (2020). Next-Generation Sequencing of T and B Cell Receptor Repertoires from COVID-19 Patients Showed Signatures Associated with Severity of Disease. *Immunity* 53, 442-455.e4.

Scofield, R.H., and Oates, J. (2009). The place of William Osler in the description of systemic lupus erythematosus. *Am. J. Med. Sci.* 338, 409–412.

Sedy, J.R., Gavrieli, M., Potter, K.G., Hurchla, M.A., Lindsley, R.C., Hildner, K., Scheu, S., Pfeffer, K., Ware, C.F., Murphy, T.L., et al. (2005). B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat. Immunol.* 6, 90–98.

Serriari, N.-E., Gondois-Rey, F., Guillaume, Y., Remmerswaal, E.B.M., Pastor, S., Messal, N., Truneh, A., Hirsch, I., Lier, R.A.W. van, and Olive, D. (2010). B and T Lymphocyte Attenuator Is Highly Expressed on CMV-Specific T Cells during Infection and Regulates Their Function. *J. Immunol.* 185, 3140–3148.

Sharif-Askari, N.S., Sharif-Askari, F.S., Mdkhana, B., Heialy, S.A., Alsafer, H.S., Hamoudi, R., Hamid, Q., and Halwani, R. (2021). Enhanced expression of immune checkpoint receptors during SARS-CoV-2 viral infection. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 20, 109–121.

Shen, X., Zhang, J., Tang, P., Song, H., Liu, X., Huang, Z., Zhang, X., Wang, X., and Wu, M. (2019). Expression and clinical significance of B and T lymphocyte attenuator on CD4+ and CD8+ T cells from patients with pulmonary tuberculosis. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 62, 232–238.

Shivakumar, S., Tsokos, G.C., and Datta, S.K. (1989). T cell receptor alpha/beta expressing double-negative (CD4-/CD8-) and CD4+ T helper cells in humans augment the production of pathogenic anti-DNA autoantibodies associated with lupus nephritis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 143, 103–112.

Shubin, N.J., Chung, C.S., Heffernan, D.S., Irwin, L.R., Monaghan, S.F., and Ayala, A. (2012). BTLA expression contributes to septic morbidity and mortality by inducing innate inflammatory cell dysfunction. *J. Leukoc. Biol.* 92, 593–603.

Shubin, N.J., Monaghan, S.F., Heffernan, D.S., Chung, C.-S., and Ayala, A. (2013). B and T lymphocyte attenuator expression on CD4+ T-cells associates with sepsis and subsequent

infections in ICU patients. Crit. Care Lond. Engl. 17, R276.

Sieber, J., Daridon, C., Fleischer, S.J., Fleischer, V., Hiepe, F., Alexander, T., Heine, G., Burmester, G.R., Fillatreau, S., and Dörner, T. (2014). Active systemic lupus erythematosus is associated with a reduced cytokine production by B cells in response to TLR9 stimulation. Arthritis Res. Ther. 16, 477.

Sieger, N., Fleischer, S.J., Mei, H.E., Reiter, K., Shock, A., Burmester, G.R., Daridon, C., and Dörner, T. (2013). CD22 ligation inhibits downstream B cell receptor signaling and Ca(2+) flux upon activation. Arthritis Rheum. 65, 770–779.

Simon, Q., Pers, J.-O., Cornec, D., Le Pottier, L., Mageed, R.A., and Hillion, S. (2016). In-depth characterization of CD24(high)CD38(high) transitional human B cells reveals different regulatory profiles. J. Allergy Clin. Immunol. 137, 1577-1584.e10.

Simpson, N., Gatenby, P.A., Wilson, A., Malik, S., Fulcher, D.A., Tangye, S.G., Manku, H., Vyse, T.J., Roncador, G., Huttley, G.A., et al. (2010). Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 62, 234–244.

Sims, G.P., Ettinger, R., Shirota, Y., Yarboro, C.H., Illei, G.G., and Lipsky, P.E. (2005). Identification and characterization of circulating human transitional B cells. Blood 105, 4390–4398.

Singla, S., Wenderfer, S.E., Muscal, E., Sagcal-Gironella, A.C.P., Orange, J.S., and Makedonas, G. (2017). Changes in Frequency and Activation Status of Major CD4+ T-Cell Subsets after Initiation of Immunosuppressive Therapy in a Patient with New Diagnosis Childhood-Onset Systemic Lupus Erythematosus. Front. Pediatr. 5, 104.

Sisirak, V., Sally, B., D'Agati, V., Martinez-Ortiz, W., Özçakar, Z.B., David, J., Rashidfarrokhi, A., Yeste, A., Panea, C., Chida, A.S., et al. (2016). Digestion of Chromatin in Apoptotic Cell Microparticles Prevents Autoimmunity. Cell 166, 88–101.

Skiljevic, D., Jeremic, I., Nikolic, M., Andrejevic, S., Sefik-Bukilica, M., Stojimirovic, B., and Bonaci-Nikolic, B. (2013). Serum DNase I activity in systemic lupus erythematosus: correlation with immunoserological markers, the disease activity and organ involvement. Clin. Chem. Lab. Med. 51, 1083–1091.

Solhjoo, M., Bansal, P., Goyal, A., and Chauhan, K. (2021). Drug-Induced Lupus Erythematosus. In StatPearls, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.

Soni, C., Perez, O.A., Voss, W.N., Pucella, J.N., Serpas, L., Mehl, J., Ching, K.L., Goike, J., Georgiou, G., Ippolito, G.C., et al. (2020). Plasmacytoid Dendritic Cells and Type I Interferon Promote Extrafollicular B Cell Responses to Extracellular Self-DNA. Immunity 52, 1022–1038.e7.

Sosa-Hernández, V.A., Torres-Ruiz, J., Cervantes-Díaz, R., Romero-Ramírez, S., Páez-Franco, J.C., Meza-Sánchez, D.E., Juárez-Vega, G., Pérez-Fragoso, A., Ortiz-Navarrete, V., Ponce-de-León, A., et al. (2020). B Cell Subsets as Severity-Associated Signatures in COVID-19 Patients. *Front. Immunol.* **11**, 3244.

von Spee-Mayer, C., Siegert, E., Abdirama, D., Rose, A., Klaus, A., Alexander, T., Enghard, P., Sawitzki, B., Hiepe, F., Radbruch, A., et al. (2016). Low-dose interleukin-2 selectively corrects regulatory T cell defects in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 1407–1415.

Stefanski, A.-L., Wiedemann, A., Reiter, K., Hiepe, F., Lino, A.C., and Dörner, T. (2019). Enhanced Programmed Death 1 and Diminished Programmed Death Ligand 1 Up-Regulation Capacity of Post-Activated Lupus B Cells. *Arthritis Rheumatol.* **71**, 1539–1544.

Steinberg, M.W., Turovskaya, O., Shaikh, R.B., Kim, G., McCole, D.F., Pfeffer, K., Murphy, K.M., Ware, C.F., and Kronenberg, M. (2008). A crucial role for HVEM and BTLA in preventing intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **205**, 1463–1476.

Steinberg, M.W., Huang, Y., Wang-Zhu, Y., Ware, C.F., Cheroutre, H., and Kronenberg, M. (2013). BTLA interaction with HVEM expressed on CD8(+) T cells promotes survival and memory generation in response to a bacterial infection. *PloS One* **8**, e77992.

Stohl, W., Jacob, N., Quinn, W.J., Cancro, M.P., Gao, H., Puttermann, C., Gao, X., Pricop, L., and Koss, M.N. (2008). Global T cell dysregulation in non-autoimmune-prone mice promotes rapid development of BAFF-independent, systemic lupus erythematosus-like autoimmunity. *J. Immunol.* **181**, 833–841.

Suárez, A., López, P., Gómez, J., and Gutiérrez, C. (2006). Enrichment of CD4+ CD25high T cell population in patients with systemic lupus erythematosus treated with glucocorticoids. *Ann. Rheum. Dis.* **65**, 1512–1517.

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

Suffner, J., Hochweller, K., Kühnle, M.-C., Li, X., Kroczeck, R.A., Garbi, N., and Häammerling, G.J. (2010). Dendritic Cells Support Homeostatic Expansion of Foxp3+ Regulatory T Cells in Foxp3.LuciDTR Mice. *J. Immunol.* **184**, 1810–1820.

Sun, Y., Brown, N.K., Ruddy, M.J., Miller, M.L., Lee, Y., Wang, Y., Murphy, K.M., Pfeffer, K., Chen, L., Kaye, J., et al. (2009). B and T lymphocyte attenuator tempers early infection immunity. *J. Immunol. Baltim. Md* **183**, 1946–1951.

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

Talaat, R.M., Mohamed, S.F., Bassyouni, I.H., and Raouf, A.A. (2015). Th1/Th2/Th17/Treg

cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. *Cytokine* 72, 146–153.

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

Tan, E.M., Cohen, A.S., Fries, J.F., Masi, A.T., McShane, D.J., Rothfield, N.F., Schaller, J.G., Talal, N., and Winchester, R.J. (1982). The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25, 1271–1277.

Tan, Y., Song, D., Wu, L., Yu, F., and Zhao, M. (2013). Serum levels and renal deposition of C1q complement component and its antibodies reflect disease activity of lupus nephritis. *BMC Nephrol.* 14, 63.

Tao, R., Wang, L., Han, R., Wang, T., Ye, Q., Honjo, T., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Hancock, W.W. (2005). Differential effects of B and T lymphocyte attenuator and programmed death-1 on acceptance of partially versus fully MHC-mismatched cardiac allografts. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 175, 5774–5782.

Tao, R., Wang, L., Murphy, K.M., Fraser, C.C., and Hancock, W.W. (2008). Regulatory T cell expression of herpesvirus entry mediator suppresses the function of B and T lymphocyte attenuator-positive effector T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 180, 6649–6655.

Tapia-Maltos, M., Treviño-Frenk, I., García-González, H., Rosetti, M., Barriga-Maldonado, V., Morales-Ramírez, F., López-Hernández, D., Rosetti, F., and Crispín, J. (2021). Identification of regulatory T cell molecules associated with severity of multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* 27, 1695–1705.

Teichmann, L.L., Ols, M.L., Kashgarian, M., Reizis, B., Kaplan, D.H., and Shlomchik, M.J. (2010). Dendritic Cells in Lupus Are Not Required for Activation of T and B Cells but Promote Their Expansion, Resulting in Tissue Damage. *Immunity* 33, 967–978.

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

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

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

Tian, Ch., Liu, Y.-G., Yan, J.-K., Liu, S.-D., Zhao, S.-T., and Wang, H.-W. (2013). B- and T-Lymphocyte Attenuator/Herpes Virus Entry Mediator as Early Indicators for Acute Rejection

Following Kidney Transplantation. *Transplant. Proc.* **45**, 157–162.

Tilstra, J.S., John, S., Gordon, R.A., Leibler, C., Kashgarian, M., Bastacky, S., Nickerson, K.M., and Shlomchik, M.J. (2020). B cell–intrinsic TLR9 expression is protective in murine lupus. *J. Clin. Invest.* **130**, 3172–3187.

Tipton, C.M., Fucile, C.F., Darce, J., Chida, A., Ichikawa, T., Gregoretti, I., Schieferl, S., Hom, J., Jenks, S., Feldman, R.J., et al. (2015). Diversity, cellular origin and autoreactivity of antibody-secreting cell population expansions in acute systemic lupus erythematosus. *Nat. Immunol.* **16**, 755–765.

Tivol, E.A., Borriello, F., Schweitzer, A.N., Lynch, W.P., Bluestone, J.A., and Sharpe, A.H. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* **3**, 541–547.

Tran, D.Q., Ramsey, H., and Shevach, E.M. (2007). Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* **110**, 2983–2990.

Trez, C.D., Schneider, K., Potter, K., Droin, N., Fulton, J., Norris, P.S., Ha, S., Fu, Y.-X., Murphy, T., Murphy, K.M., et al. (2008). The Inhibitory HVEM-BTLA Pathway Counter Regulates Lymphotoxin  $\beta$  Receptor Signaling to Achieve Homeostasis of Dendritic Cells. *J. Immunol.* **180**, 238–248.

Truong, W., Plester, J.C., Hancock, W.W., Kaye, J., Merani, S., Murphy, K.M., Murphy, T.L., Anderson, C.C., and Shapiro, A.M.J. (2007). Negative and positive co-signaling with anti-BTLA (PJ196) and CTLA4Ig prolongs islet allograft survival. *Transplantation* **84**, 1368–1372.

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

Tsang-A-Sjoe, M.W.P., and Bultink, I.E.M. (2021). New developments in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **60**, vi21–vi28.

Tucci, M., Quatraro, C., Lombardi, L., Pellegrino, C., Dammacco, F., and Silvestris, F. (2008). Glomerular accumulation of plasmacytoid dendritic cells in active lupus nephritis: Role of interleukin-18. *Arthritis Rheum.* **58**, 251–262.

Uchiyama, M., Jin, X., Matsuda, H., Bashuda, H., Imazuru, T., Shimokawa, T., Yagita, H., and Niimi, M. (2014). An agonistic anti-BTLA mAb (3C10) induced generation of IL-10-dependent regulatory CD4+ T cells and prolongation of murine cardiac allograft. *Transplantation* **97**, 301–309.

Valencia, X., Yarboro, C., Illei, G., and Lipsky, P.E. (2007). Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md*

1950 178, 2579–2588.

Vargas-Rojas, M.I., Crispín, J.C., Richaud-Patin, Y., and Alcocer-Varela, J. (2008). Quantitative and qualitative normal regulatory T cells are not capable of inducing suppression in SLE patients due to T-cell resistance. *Lupus* 17, 289–294.

Vendel, A.C., Calemine-Fenaux, J., Izrael-Tomasevic, A., Chauhan, V., Arnott, D., and Eaton, D.L. (2009). B and T lymphocyte attenuator regulates B cell receptor signaling by targeting Syk and BLNK. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 182, 1509–1517.

Venigalla, R.K.C., Tretter, T., Krienke, S., Max, R., Eckstein, V., Blank, N., Fiehn, C., Ho, A.D., and Lorenz, H.-M. (2008). Reduced CD4+,CD25- T cell sensitivity to the suppressive function of CD4+,CD25high,CD127 -/low regulatory T cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 58, 2120–2130.

Voelkl, S., Gary, R., and Mackensen, A. (2011). Characterization of the immunoregulatory function of human TCR- $\alpha\beta+$  CD4–CD8– double-negative T cells. *Eur. J. Immunol.* 41, 739–748. Wang, H., Wu, B., Li, L., Hu, L., Lin, J., Jiang, C., Cai, G., and Shen, Q. (2017a). Hepatic expansion of virus-specific CD8+BTLA+ T cells with regulatory properties in chronic hepatitis B virus infection. *Cell. Immunol.* 311, 36–45.

Wang, Q., Zhang, J., Tu, H., Liang, D., Chang, D.W., Ye, Y., and Wu, X. (2019). Soluble immune checkpoint-related proteins as predictors of tumor recurrence, survival, and T cell phenotypes in clear cell renal cell carcinoma patients. *J. Immunother. Cancer* 7, 334.

Wang, S., Wang, J., Kumar, V., Karnell, J.L., Naiman, B., Gross, P.S., Rahman, S., Zerrouki, K., Hanna, R., Morehouse, C., et al. (2018). IL-21 drives expansion and plasma cell differentiation of autoreactive CD11c hi T-bet + B cells in SLE. *Nat. Commun.* 9, 1758.

Wang, T., Li, Z., Li, X., Chen, L., Zhao, H., Jiang, C., and Song, L. (2017b). Expression of CD19+CD24highCD38high B cells, IL-10 and IL-10R in peripheral blood from patients with systemic lupus erythematosus. *Mol. Med. Rep.* 16, 6326–6333.

Wang, W.-D., Gao, Y.-C., Lu, Y.-B., Zhang, J.-A., Liu, G.-B., Kong, B., Xiang, W.-Y., Dai, Y.-C., Yu, S.-Y., Jia, Y., et al. (2017c). BTLA-expressing CD11c antigen presenting cells in patients with active tuberculosis exhibit low capacity to stimulate T cell proliferation. *Cell. Immunol.* 311, 28–35.

Wang, X., Huang, W., Schiffer, L.E., Mihara, M., Akkerman, A., Hiromatsu, K., and Davidson, A. (2003). Effects of anti-CD154 treatment on B cells in murine systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 48, 495–506.

Wang, Y., Subudhi, S.K., Anders, R.A., Lo, J., Sun, Y., Blink, S., Wang, Y., Wang, J., Liu, X., Mink, K., et al. (2005). The role of herpesvirus entry mediator as a negative regulator of T cell-mediated responses. *J. Clin. Invest.* 115, 711–717.

Wangriatisak, K., Thanadetsuntorn, C., Krittayapoositpot, T., Leepiyasakulchai, C., Suangtamai,

T., Ngamjanyaporn, P., Khowawisetsut, L., Khaenam, P., Setthaudom, C., Pisitkun, P., et al. (2021). The expansion of activated naive DNA autoreactive B cells and its association with disease activity in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Res. Ther.* **23**, 179.

Watanabe, H., Garnier, G., Circolo, A., Wetsel, R.A., Ruiz, P., Holers, V.M., Boackle, S.A., Colten, H.R., and Gilkeson, G.S. (2000). Modulation of Renal Disease in MRL/lpr Mice Genetically Deficient in the Alternative Complement Pathway Factor B. *J. Immunol.* **164**, 786–794.

Watanabe, N., Gavrieli, M., Sedy, J.R., Yang, J., Fallarino, F., Loftin, S.K., Hurchla, M.A., Zimmerman, N., Sim, J., Zang, X., et al. (2003). BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat. Immunol.* **4**, 670–679.

Wei, C., Anolik, J., Cappione, A., Zheng, B., Pugh-Bernard, A., Brooks, J., Lee, E.-H., Milner, E.C.B., and Sanz, I. (2007). A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md* **178**, 6624–6633.

Wen, Z., Xu, L., Chen, X., Xu, W., Yin, Z., Gao, X., and Xiong, S. (2013). Autoantibody induction by DNA-containing immune complexes requires HMGB1 with the TLR2/microRNA-155 pathway. *J. Immunol. Baltim. Md* **190**, 5411–5422.

Werner, K., Dolff, S., Dai, Y., Ma, X., Brinkhoff, A., Korth, J., Gäckler, A., Rohn, H., Sun, M., Cohen Tervaert, J.W., et al. (2019). The Co-inhibitor BTLA Is Functional in ANCA-Associated Vasculitis and Suppresses Th17 Cells. *Front. Immunol.* **10**.

Wiedemann, A., Lettau, M., Weißenberg, S.Y., Stefanski, A.-L., Schrezenmeier, E.-V., Rincon-Arevalo, H., Reiter, K., Alexander, T., Hiepe, F., Lino, A.C., et al. (2021). BTLA Expression and Function Are Impaired on SLE B Cells. *Front. Immunol.* **12**, 1402.

William, J., Euler, C., Christensen, S., and Shlomchik, M.J. (2002). Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. *Science* **297**, 2066–2070. Wise, L.M., and Stohl, W. (2020). Belimumab and Rituximab in Systemic Lupus Erythematosus: A Tale of Two B Cell-Targeting Agents. *Front. Med.* **7**, 303.

Wong, M., Cava, A.L., and Hahn, B.H. (2013). Blockade of Programmed Death-1 in Young (New Zealand Black × New Zealand White)F1 Mice Promotes the Suppressive Capacity of CD4+ Regulatory T Cells Protecting from Lupus-like Disease. *J. Immunol.* **190**, 5402–5410.

Woodruff, M.C., Ramonell, R.P., Nguyen, D.C., Cashman, K.S., Saini, A.S., Haddad, N.S., Ley, A.M., Kyu, S., Howell, J.C., Ozturk, T., et al. (2020). Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nat. Immunol.* **21**, 1506–1516.

Wu, X., Ye, Y., Niu, J., Li, Y., Li, X., You, X., Chen, H., Zhao, L., Zeng, X., Zhang, F., et al. (2014). Defective PTEN regulation contributes to B cell hyperresponsiveness in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* **6**, 246ra99.

Xiao, G., and Zuo, X. (2016). Epigenetics in systemic lupus erythematosus. *Biomed. Rep.* **4**,

135–139.

Xin, H., Zhu, J., Miao, H., Gong, Z., Jiang, X., Feng, X., and Tong, Y. (2017). Adenovirus-Mediated CCR7 and BTLA Overexpression Enhances Immune Tolerance and Migration in Immature Dendritic Cells. *BioMed Res. Int.* **2017**, 3519745.

Xin, Q., Li, J., Dang, J., Bian, X., Shan, S., Yuan, J., Qian, Y., Liu, Z., Liu, G., Yuan, Q., et al. (2015). miR-155 Deficiency Ameliorates Autoimmune Inflammation of Systemic Lupus Erythematosus by Targeting S1pr1 in Faslpr/lpr Mice. *J. Immunol.* **194**, 5437–5445.

Xu, A., Liu, Y., Chen, W., Wang, J., Xue, Y., Huang, F., Rong, L., Lin, J., Liu, D., Yan, M., et al. (2016). TGF- $\beta$ -Induced Regulatory T Cells Directly Suppress B Cell Responses through a Noncytotoxic Mechanism. *J. Immunol. Baltim. Md* **195** *196*, 3631–3641.

Xu, B., Wang, S., Zhou, M., Huang, Y., Fu, R., Guo, C., Chen, J., Zhao, J., Gaskin, F., Fu, S.M., et al. (2017). The ratio of circulating follicular T helper cell to follicular T regulatory cell is correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **183**, 46–53.

Xu, X., Hou, B., Fulzele, A., Masubuchi, T., Zhao, Y., Wu, Z., Hu, Y., Jiang, Y., Ma, Y., Wang, H., et al. (2020). PD-1 and BTLA regulate T cell signaling differentially and only partially through SHP1 and SHP2. *J. Cell Biol.* **219**.

Xu, X.-S., Zhang, Z., Gu, L.-L., and Wang, F.-S. (2009). [BTLA Characterization and its association with disease progression in patients with chronic HIV-1 infection.]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi Chin. J. Cell. Mol. Immunol.* **25**, 1158–1160.

Yang, B., Huang, Z., Feng, W., Wei, W., Zhang, J., Liao, Y., Li, L., Liu, X., Wu, Z., Cai, B., et al. (2016). The Expression of BTLA Was Increased and the Expression of HVEM and LIGHT Were Decreased in the T Cells of Patients with Rheumatoid Arthritis [corrected]. *PloS One* **11**, e0155345.

Yang, C.-H., Tian, L., Ling, G.-S., Trendell-Smith, N.J., Ma, L., Lo, C.-K., Stott, D.I., Liew, F.Y., and Huang, F.-P. (2008). Immunological mechanisms and clinical implications of regulatory T cell deficiency in a systemic autoimmune disorder: roles of IL-2 versus IL-15. *Eur. J. Immunol.* **38**, 1664–1676.

Yang, J.-H., Zhang, J., Cai, Q., Zhao, D.-B., Wang, J., Guo, P.-E., Liu, L., Han, X.-H., and Shen, Q. (2005). Expression and function of inducible costimulator on peripheral blood T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **44**, 1245–1254.

Yang, X., Yang, J., Chu, Y., Xue, Y., Xuan, D., Zheng, S., and Zou, H. (2014). T Follicular Helper Cells and Regulatory B Cells Dynamics in Systemic Lupus Erythematosus. *PLOS ONE* **9**, e88441.

Yokogawa, M., Takaishi, M., Nakajima, K., Kamijima, R., Fujimoto, C., Kataoka, S., Terada, Y., and Sano, S. (2014). Epicutaneous application of toll-like receptor 7 agonists leads to systemic autoimmunity in wild-type mice: a new model of systemic Lupus erythematosus. *Arthritis*

Rheumatol. Hoboken NJ 66, 694–706.

You, X., Zhang, R., Shao, M., He, J., Chen, J., Liu, J., Zhang, X., Liu, X., Jia, R., Sun, X., et al. (2020). Double Negative B Cell Is Associated With Renal Impairment in Systemic Lupus Erythematosus and Acts as a Marker for Nephritis Remission. *Front. Med.* 7.

Yurasov, S., Wardemann, H., Hammersen, J., Tsuji, M., Meffre, E., Pascual, V., and Nussenzweig, M.C. (2005). Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* 201, 703–711.

Zhang, J., Zhang, H., Wang, Z., Yang, H., Chen, H., Cheng, H., Zhou, J., Zheng, M., Tan, R., and Gu, M. (2019). BTLA suppress acute rejection via regulating TCR downstream signals and cytokines production in kidney transplantation and prolonged allografts survival. *Sci. Rep.* 9.

Zhang, J.-A., Lu, Y.-B., Wang, W.-D., Liu, G.-B., Chen, C., Shen, L., Luo, H.-L., Xu, H., Peng, Y., Luo, H., et al. (2020a). BTLA-Expressing Dendritic Cells in Patients With Tuberculosis Exhibit Reduced Production of IL-12/IFN- $\alpha$  and Increased Production of IL-4 and TGF- $\beta$ , Favoring Th2 and Foxp3+ Treg Polarization. *Front. Immunol.* 11, 518.

Zhang, M., Howard, K., Winters, A., Steavenson, S., Anderson, S., Smelt, S., Doellgast, G., Sheelo, C., Stevens, J., Kim, H., et al. (2011a). Monoclonal antibodies to B and T lymphocyte attenuator (BTLA) have no effect on in vitro B cell proliferation and act to inhibit in vitro T cell proliferation when presented in a cis, but not trans, format relative to the activating stimulus. *Clin. Exp. Immunol.* 163, 77–87.

Zhang, R.-R., Wang, L.-M., and Shen, J.-J. (2020b). Overexpression of miR-32 inhibits the proliferation and metastasis of ovarian cancer cells by targeting BTLA. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 24, 4671–4678.

Zhang, Z., Xu, X., Lu, J., Zhang, S., Gu, L., Fu, J., Jin, L., Li, H., Zhao, M., Zhang, J., et al. (2011b). B and T lymphocyte attenuator down-regulation by HIV-1 depends on type I interferon and contributes to T-cell hyperactivation. *J. Infect. Dis.* 203, 1668–1678.

Zimmer, R., Scherbarth, H.R., Rillo, O.L., Gomez-Reino, J.J., and Muller, S. (2013). Lupuzor/P140 peptide in patients with systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb clinical trial. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 1830–1835. Lupus érythémateux.

# **PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES**



## I) Publications scientifiques

**Aubergeon, L.**, Sawaf, M., Felten, R., Gottenberg, J.-E., Dumortier, H., and Monneaux, F. (2021). High BTLA Expression Likely Contributes to Contraction of the Regulatory T Cell Subset in Lupus Disease. *Front Immunol* 12, 767099.

## II) Communications orales

### Congrès : Bench and Bed Immunology , Mars 2020, Strasbourg, France

“Altered expression and function of the inhibitory receptor BTLA on immune cells during Systemic Lupus Erythematosus”, **Lucie Aubergeon**, Matthieu Sawaf, Renaud Felten, Jacques-Eric Gottenberg, Hélène Dumortier, Fanny Monneaux

### Congrès : ED Days, Avril 2021, Online, France

“Expression and function of the co-inhibitory receptor BTLA in the NZB/W lupus mouse model”, **Lucie Aubergeon**, Léa Gherardi, Fanny Monneaux

### Congrès : URI meeting, Octobre 2021, Freiburg, Allemagne

« Altered BTLA expression on lupus regulatory T cells”, **Lucie Aubergeon**, Matthieu Sawaf, Renaud Felten, Jacques-Eric Gottenberg, Hélène Dumortier, Fanny Monneaux

### Congrès : Bench and Bed Immunology, Octobre 2021, Freiburg, Allemagne

« Altered BTLA expression on lupus regulatory T cells”, **Lucie Aubergeon**, Matthieu Sawaf, Renaud Felten, Jacques-Eric Gottenberg, Hélène Dumortier, Fanny Monneaux

## III) Posters

### Congrès : URI meeting, Octobre 2019, Bâle, Suisse

“Altered expression of BTLA on B cells during Systemic Lupus Erythematosus”, **Lucie Aubergeon**, Matthieu Sawaf, Renaud Felten, Jacques-Eric Gottenberg, Hélène Dumortier, Fanny Monneaux

**Congrès : 2<sup>nd</sup> International Symposium « B cell responses in immunity and autoimmunity »,**

**Septembre 2019, Freiburg, Allemagne**

“Altered expression of BTLA on B cells during Systemic Lupus Erythematosus” **Lucie**

**Aubergeon**, Matthieu Sawaf, Renaud Felten, Jacques-Eric Gottenberg, Hélène Dumortier,

Fanny Monneaux



**Implication du récepteur co-inhibiteur BTLA dans  
la régulation de la réponse immunitaire au cours  
du Lupus Érythémateux Systémique**

## Résumé

Le lupus érythémateux systémique est une maladie auto-immune caractérisée par une production d'auto-anticorps. Le dialogue entre lymphocytes T (LT) et LB entraînant la différenciation des LB auto-réactifs en plasmocytes sécrétaires d'auto-anticorps, joue un rôle crucial dans la pathogénèse lupique. Cette interaction est notamment régulée grâce aux molécules co-inhibitrices exprimées par les cellules immunitaires. Mon projet de thèse a consisté à étudier l'expression et la fonction du récepteur inhibiteur B and T lymphocyte attenuator (BTLA) au cours du lupus. Chez les patients, nous avons mis en évidence un défaut d'expression de BTLA à la surface des LT régulateurs et d'une population de LB mémoires, pouvant expliquer l'hyperactivité lymphocytaire observée au cours du lupus. Dans le modèle murin, nous avons montré *i)* un défaut fonctionnel de BTLA dans les LT CD4<sup>+</sup> de souris lupiques et que *ii)* l'administration d'un anticorps anti-BTLA à ces souris retarde l'apparition des signes de la maladie et prolonge la durée de vie des animaux. Ces résultats encourageants indiquent que BTLA pourrait être considéré comme une piste thérapeutique intéressante dans le lupus.

**Mots-clés :** Lupus, BTLA, auto-immunité, lymphocytes B, lymphocytes T régulateurs, thérapie

## Résumé en anglais

Systemic Lupus Erythematosus is an autoimmune disease characterized by the production of autoantibodies which contribute to tissue inflammation by depositing in target organs such as skin or kidneys. T-B crosstalk leading to B cell differentiation into plasma cells, plays a crucial role in lupus pathogenesis. One mechanism that regulates this crosstalk is the balance between costimulatory and coinhibitory receptors expressed by immune cells. The aim of my thesis project was to analyze the inhibitory receptor B and T lymphocyte attenuator (BTLA) expression and functionality in lupus settings. In lupus patients, we evidenced an altered BTLA expression in two cell subsets, i.e. memory B cells and regulatory T cells, which may in part explain the abnormal lymphocyte activation. Moreover, we observed in the NZB/W lupus mouse model, an impaired capacity of BTLA to inhibit CD4<sup>+</sup> T cell activation. Finally, we showed that the administration of an anti-BTLA antibody to NZB/W lupus mice delays the onset of symptoms of the disease and prolongs survival. Together, these promising results suggest that BTLA could be considered as a new interesting therapeutic target in lupus.

**Keywords:** Lupus, BTLA, autoimmunity, B cells, regulatory T cells, therapy