

ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la vie et de la santé

INSERM U1109

THÈSE présentée par :

Quentin REUSCHLÉ

soutenue le : **13 septembre 2022**

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

Discipline/ Spécialité : Immunologie

**Rôle de la mutation IRE1- α R594C dans
l'homéostasie lymphocytaire et le développement
d'une auto-immunité**

THÈSE dirigée par :

Mme SOULAS-SPRAUEL Pauline PU-PH, INSERM U1109, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. BELOT Alexandre PU-PH, INSERM U1111, Université de Lyon

M. GUÉRY Jean-Charles Directeur de recherche, INSERM U1291, Université Toulouse III

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme DUMORTIER Hélène Directrice de recherche, CNRS UPR3572, Université de Strasbourg

Mme MESSAI Yosra Responsable Scientifique, ARTHRITIS R&D, Paris

Remerciements

Je remercie d'abord Dr. Hélène Dumortier, Pr. Alexandre Belot et Dr. Jean-Charles Guéry d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse et d'avoir donné de leur temps pour juger ce travail. C'est un honneur pour moi de présenter ce mémoire devant vous.

Je tiens à remercier particulièrement Pr. Pauline Soulas-Sprauel d'avoir accepté d'être ma directrice de thèse, après avoir été ma professeure d'immunologie. Ton soutien sans faille dans ce travail, ainsi qu'au laboratoire est d'une grande valeur. J'ai appris énormément à tes côtés humainement et professionnellement. Ton enthousiasme à toute épreuve même dans les moments délicats m'ont permis de continuer et de persévérer dans ce projet de thèse. Merci de ta confiance accordée lors de ma cinquième année de pharmacie, grâce à laquelle je suis maintenant en chemin vers la soutenance de ma thèse de doctorat en immunologie.

Je remercie la fondation ARTHRITIS et ARTHRITIS R&D de m'avoir fait confiance dans la réalisation de ce projet et d'avoir accepté de le financer, merci à tous le personnel de la fondation ainsi qu'aux partenaires, sans qui rien ne serait possible. Et tout particulièrement, merci et bravo à Yosra Messai et Lionel Comole pour leur travail et leur enthousiasme à développer cette fondation. Je souhaite le meilleur à la Fondation Arthritis pour continuer de grandir, prospérer et ainsi apporter son aide aux patients et à la recherche scientifique

À tous mes amis et collègues de paillasse, en premier lieu Sabine et Nadège, pour leur aide et leurs conseils, leur patience et leur enthousiasme (sans failles, oh oui !), j'en ai eu tellement besoin dans ce projet. Les étudiants de cette équipe savent tous ce que l'on vous doit. Je vous souhaite le meilleur pour la suite et surtout ne changez rien, vous êtes au top ! Je remercie ensuite les « chefs » de l'équipe PS : Anne-Sophie, Thierry, Aurélien, Fred, Sophie et Vincent. Également, les « anciens » de l'équipe : Virginia (avec qui tout a commencé), Delphine (qui m'a tout appris), Florent et Anne-Marie (la reine indétrônable des ELISA). Et puis tous les étudiants (ou plus exactement le 5^{ème} étage du CRBS) avec qui j'ai passé de sacrés moments à rire (et à parler de science également, bien sûr) : Yannick (l'ancien) et Damien (la team PS World Tour), Quentin F, Julie, Stéphane, Olivier, Phillipe, Émilie et Léa. Aux « petits » nouveaux, Julien et Elodie, je vous souhaite bon courage pour vos projets de thèse et encore bravo ! Longue vie à cette équipe, continuez à garder cette ambiance et cette folie, qui

permettent à tous de se dépasser. Je complète ces remerciements par ces quelques mots d'un célèbre médecin strasbourgeois : « On n'a pas de résultats, mais on a de l'humour à revendre » (Y.D. 2021).

Merci aux amis de l'unité U1109. Et merci aux anciens de l'IBMC, je pense à Romain et Alex, Sophia, Quentin M, Abdou, Loyal, Chris, Vincent, Astrid, Fabien, Delphine, Wacym, Chloé et Ingrid et tant d'autres ; et aux « nouveaux » aussi : Léa (avec une petite dédicace à Nathan, #les pitres), Armelle, Annaïck, Alice et Zina. J'en oublie sûrement beaucoup dans cette liste et je m'en excuse. Ça a été des moments géniaux à vos côtés et je vous souhaite à tous le meilleur. Merci à Rym et Malick, je vous souhaite tout le bonheur pour la suite.

Merci à tous mes anciens instituteurs et professeurs, de l'école à la faculté en passant par le collège et le lycée, qui m'ont donné les clés pour arriver jusqu'ici. Aux copains de la faculté (Léone et Ben, Pauline et Valentin, Thomas et Perrine et tous les autres) pour les très belles années de formation passées à vos côtés et les excellents souvenirs emportés avec moi. Merci également à tous mes amis de Barr, de Strasbourg et d'ailleurs, Ben, Mélanie, Nils, Juliette, Matthieu, Claire, Margaux et Camille. Merci à Line, Christophe, Julie, Nicolas, Mamie, Jacquot et Marco.

À toute ma famille, Maman, Thibaut, Nicole, à Papi Edy et Mamie, à Papi Raymond et à ma regrettée Mamie, d'un soutien tellement important, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. À Papa, mention particulière pour les nombreuses corrections (de mes devoirs-maisons au collège jusqu'à ce manuscrit de thèse). À la petite dernière, Diane, pour avoir tellement égayé ces derniers mois de rédaction.

Et enfin merci à toi, Lucie, pour tout, pour ce que tu m'as apporté durant ces quatre très belles années à tes côtés, et encore de très nombreuses à venir. Pour être le pilier essentiel dans les moments les plus durs et ma meilleure amie à chaque instant. J'ai tellement hâte de voir ce que l'avenir nous réserve, toi et moi.

« Nous piétinerons éternellement aux frontières de l'Inconnu, cherchant à comprendre ce qui restera toujours incompréhensible. Et c'est précisément cela qui fait de nous des Hommes. »

Isaac Asimov

Abréviations

AAN (ou ANA) : Anticorps anti-nucléaires (*Antinuclear Antibodies*)

ABC : *Age Associated B cell*

Ac : Anticorps

ACR : *American College of Rheumatology*

ADCC : *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity* (Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps)

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNsb : Acide Désoxyribonucléique simple brin

ADNdb (ou dsDNA) : Acide Désoxyribonucléique double brin

Ag : Antigène

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

APL : Antiphospholipides

APS : Antipaludéen de synthèse

ARN : Acide Ribonucléique

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

BCR : *B-Cell Receptor*

C57BL/6 : C57 Black6 (lignée de souris)

CD : Cluster de Différenciation

CMH (MHC) : Complexe Majeur d'Histocompatibilité (*Major Histocompatibility Complex*)

CMV : Cytomégalovirus

CPAg : Cellule Présentatrice d'Antigène

CYC : Cyclophosphamide

DC : Cellule Dendritique (*Dendritic Cell*)

DNase : Desoxyribonucléase

EAE : Encéphalite Auto-immune Expérimentale

EBV : *Epstein-Barr virus*

ELISA : *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

EULAR : *European Alliance of Associations for Rheumatology*

FDA : *Food and Drug Administration*

GC : Glucocorticoïdes

GWAS : *Genome Wide Association Studies*

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IgM : Immunoglobuline de type M

IgG : Immunoglobuline de type G

IL : Interleukine

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

KI : Knock-In

KO : Knock-Out

LB : Lymphocyte B

LES (ou SLE) : Lupus Erythémateux Systémique (*Systemic Lupus Erythematosus*)

LPS : LipoPolySaccharide

LT : Lymphocyte T

LTh : Lymphocyte T helper

LTreg : Lymphocyte T régulateur

MAI : Maladie Auto-Immune

miR : micro-ARN

NETs : Neutrophil Extracellular Traps

NK : Natural Killer

PB : Plasmablaste

PBMC : *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (Cellules mononucléées du sang)

PC : Plasmocyte

pDC : *plasmacytoid Dendritic Cell* (cellule dendritique plasmacytoïde)

PNDS : Protocole National de Diagnostic et de Soins

PR ou RA : Polyarthrite Rhumatoïde (*Rheumatoid Arthritis*)

PRR : Pattern Recognition Receptor (Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires)

RA ou PR : *Rheumatoid Arthritis* (Polyarthrite Rhumatoïde)

RE : Réticulum Endoplasmique

SAPL : Syndrome des anti-phospholipides

SEP : Sclérose en plaques

SLE (ou LES) : *Systemic Lupus Erythematosus* (Lupus Erythémateux Systémique)

SLICC : *Systemic Lupus Erythematosus International Collaborating Clinics*

SNC : *Système Nerveux Central*

SS : *Syndrome de Sjögren*

TACI : *Transmembrane activator and calcium modulator ligand interactor*

TCR : *T-cell receptor*

TLR : *Toll-Like Receptor*

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

UPR : *Unfolded Protein Response*

UV : *Ultraviolet*

WES : *Whole Exome Sequencing*

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
1 Le lupus érythémateux systémique	3
1.1 Introduction	3
1.2 Aspects cliniques	3
1.3 Classification.....	5
1.4 Score d'activité et score de réponse	8
2 Aspects épidémiologiques.....	9
2.1 Incidence et prévalence en France.....	9
2.2 Incidence et prévalence dans le monde	9
2.3 Ratio Homme/Femme et âge de diagnostic	10
2.4 Mortalité	11
3 Les acteurs de la physiopathologie du LES.....	12
3.1 Tolérance B centrale et tolérance B périphérique.....	13
3.1.1 Rappels sur la recombinaison VDJ	14
3.1.2 Tolérance centrale.....	15
3.1.3 Tolérance périphérique	17
3.2 Anomalies de l'apoptose au cours du lupus	19
3.3 Défaut de clairance des complexes immuns.....	23
3.4 Rôle des cellules de l'immunité innée dans la physiopathologie du lupus	24
3.4.1 Les cellules dendritiques.....	24
3.4.2 Les interférons de type I	26
3.4.3 Les polynucléaires neutrophiles	31
3.4.4 Les monocytes/macrophages	31
3.5 Rôle des cellules de l'immunité adaptative dans la physiopathologie du lupus	32
3.5.1 Anomalies des LT	32
3.5.2 Anomalies des LB.....	36
4 Étiologie génétique du LES.....	38
4.1 Introduction	38
4.2 Gènes impliqués dans l'apoptose/autophagie et clairance des acides nucléiques	40
4.3 Gènes de la voie des interférons de type I.....	42
4.4 Gènes de la voie NF-κB (inflammation)	42
4.5 Gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse adaptative.....	43
4.5.1 Gènes liés à la présentation antigénique	43
4.5.2 Gènes liés à la fonction des LT.....	43

4.5.3	Gènes liés à la fonction des LB.....	44
4.5.4	Conclusion	44
5	<i>Étiologie environnementale du LES</i>	46
5.1	Les agents infectieux.....	46
5.2	Les médicaments	47
5.3	Les facteurs hormonaux	49
5.4	Les rayonnements UV	49
5.5	Autres facteurs	50
5.6	Conclusion	51
6	<i>Modèles murins d'étude du lupus</i>	52
7	<i>Famille multiplex : une stratégie d'étude des causes génétiques du LES.....</i>	53
8	<i>Stress du réticulum endoplasmique et mécanismes de protection cellulaire.....</i>	58
8.1	Le stress du réticulum endoplasmique.....	58
8.2	Contrôle qualité et dégradation des protéines mal repliées.....	61
8.2.1	ERAD	61
8.2.2	Autophagie	61
8.3	Unfolded protein response (UPR)	61
8.4	Découverte de IRE1- α chez la levure et caractérisation chez l'Homme	64
8.5	Introduction aux voies PERK, ATF6 et IRE1- α chez les mammifères.....	66
8.5.1	IRE1- α	67
8.5.2	PERK.....	68
8.5.3	ATF6.....	68
9	<i>IRE1-α : structure, régulation et fonction</i>	69
9.1	Structure de IRE1- α chez les mammifères	69
9.2	Activation de IRE1- α	71
9.3	Régulation de IRE1- α	74
9.3.1	Inhibiteurs cytosoliques.....	75
9.3.2	Modulateurs positifs.....	75
9.3.3	Modifications post-traductionnelles	76
9.3.4	Contrôle de la stabilité de IRE1- α	76
9.4	Voies de signalisation médiées par IRE1- α chez les mammifères	77
9.4.1	XBP1s	77
9.4.2	RIDD.....	80
9.4.3	Activation de JNK et NF- κ B.....	81
9.4.4	Activité séquentielle de IRE1- α	82
10	<i>IRE1-α et système immunitaire</i>	83
10.1	IRE1- α et cellules immunitaires	83

10.2	IRE1- α et cellules dendritiques	85
10.3	IRE1- α et lymphocytes T.....	86
10.4	IRE1- α et lymphocytes B.....	87
10.5	IRE1- α : implications dans les réponses immunitaires	89
11	IRE1-α et pathologies auto-immunes	91
12	IRE1-α et lupus érythémateux systémique.....	95
	AVANT-PROPOS DE MON PROJET DE THÈSE	97
	MATÉRIEL ET MÉTHODES	101
1	Validation du modèle murin IRE1-α R594C.....	103
1.1	Génération du modèle murin IRE1- α R594C Knock-In par TACONIC®	103
1.2	Extraction de l'ADN génomique de queue de souris	104
1.3	PCR de génotypage	104
1.4	Séquençage Sanger du gène <i>Ern1</i>	105
1.5	Extraction d'ARN et préparation des ADNc	105
1.6	Étude de l'expression de l'allèle <i>Ern1</i> muté.....	105
1.7	Extraction et analyse des protéines	106
2	Analyse du phénotype des souris IRE1-α R594C.....	108
2.1	Récupération des cellules immunitaires à partir des organes.....	108
2.2	Analyse des cellules lymphoïdes par cytométrie en flux	108
2.2.1	Marqueurs membranaires.....	108
2.2.2	Marqueurs intranucléaires	108
2.3	Isolement des cellules lymphocytaires (tri magnétique)	112
2.4	Tri cellulaire par cytométrie en flux	112
2.5	Stimulation des cellules immunitaires <i>in vitro</i>	112
2.6	Récupération du sérum des souris et des surnageants de culture	113
2.7	Dosage des immunoglobulines totales <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	113
3	Immunsation des souris IRE1-α R594C.....	115
3.1	Injection <i>in vivo</i> d'agoniste TLR4.....	115
3.2	Injection <i>in vivo</i> d'agoniste TLR9.....	115
4	Analyse des signes auto-immuns	115
4.1	Dosage des auto-anticorps	115
4.1.1	ELISA anti-ADNdb	115
4.1.2	ELISA anti-ADNsb	116
4.1.3	ELISA IgM FR	116

4.1.4	ELISA anti-nucléosome	116
4.2	Détection des auto-anticorps sériques (<i>Antigen microarray</i>)	116
4.3	Analyse des reins	117
4.3.1	Histologie conventionnelle	117
4.3.2	Immunohistochimie	117
5	<i>Impact de la mutation IRE1-α R594C sur l'UPR</i>	118
5.1	Stimulation des lymphocytes et induction d'un stress du RE.....	118
5.2	Analyse par RT-PCR quantitative en temps réel (<i>TaqMan</i> [®]).....	118
5.3	Analyse par RT-PCR quantitative en temps réel (<i>SYBR</i> [®] <i>Green</i>).....	119
6	<i>Marquage des LB autoréactifs anti-nucléosomes</i>	120
6.1	Marquage des nucléosomes natifs avec du maléimide AF488.....	120
6.2	Marquage des LB anti-nucléosomes par cytométrie en flux.....	120
7	<i>Séquençage de l'ARN (RNAseq)</i>.....	121
8	<i>Séquençage des gènes V, D et J</i>.....	122
9	<i>Analyses statistiques</i>	122
	RÉSULTATS.....	123
1	<i>Génération du modèle murin IRE1-α R594C</i>.....	125
1.1	Mise en évidence du site de restriction MfeI chez les souris IRE1- α R594C.....	125
1.2	Mise en évidence de l'expression de l'allèle muté de IRE1- α	126
1.3	Expression protéique d'IRE1- α	128
2	<i>Caractérisation de la fonction de la protéine IRE1-α mutée</i>	129
2.1	Analyse de la fonction ribonucléase d'IRE1-α	129
2.1.1	Mesure de l'expression de la protéine XBP1s par cytométrie en flux dans les LB	129
2.1.2	Mesure de l'expression de la protéine XBP1s par cytométrie en flux dans les LT.....	131
2.1.3	Mesure de l'épissage de XBP1s	133
2.1.4	Mesure de l'expression des gènes cibles de XBP1s	134
2.1.5	Regulated IRE1 Dependant Decay (Fonction RIDD).....	135
2.2	Analyse de la fonction kinase de IRE1-α	137
2.2.1	Phosphorylation de IRE1- α	137
2.2.2	Activation de la voie JNK.....	137
2.3	Impact du mutant R594C sur l'expression des gènes <i>CHOP</i> et <i>ATF6</i>	138
3	<i>Analyse transcriptomique des souris R594C/+</i>	140
4	<i>Étude phénotypique du modèle IRE1-α R594C à l'état basal</i>	144
4.1	Immunophénotypage des organes lymphoïdes du modèle IRE1-α R594C	144
4.1.1	Répartition des cellules immunitaires dans les organes lymphoïdes primaires	144
4.1.2	Répartition des cellules immunitaires dans les organes lymphoïdes secondaires	146

4.1.3	Répartition des cellules immunitaires présentes dans le péritoine	149
4.1.4	Age-associated B cell	150
4.2	État basal d'activation des LB périphériques	151
4.3	Dosage des immunoglobulines sériques	151
4.4	Étude <i>in vitro</i> du phénotype des LB porteurs de la mutation IRE1-α R594C	152
4.4.1	Activation des LB in vitro	152
4.4.2	Prolifération des LB activés in vitro	153
4.4.3	Différenciation plasmocytaire in vitro	155
4.4.4	Production d'immunoglobulines in vitro	156
5	<i>Manifestations auto-immunes dans le modèle murin IRE1-α R594C.....</i>	157
5.1	Détection d'une sélection d'auto-anticorps par ELISA	157
5.2	Recherche globale d'auto-anticorps (<i>Antigen microarray</i>)	158
5.3	Recherche de dommages tissulaires	161
6	<i>Étude de la réponse auto-immune humorale après induction in vivo</i>	163
6.1	Induction d'une réponse auto-immune humorale par injection d'un agoniste du TLR4163	
6.2	Induction d'une réponse auto-immune humorale par injection d'un agoniste du TLR9164	
6.2.1	Recherche globale d'auto-anticorps (<i>Antigen microarray</i>)	166
6.2.2	Évaluation des atteintes rénales.....	169
7	<i>Répertoire des chaînes légères et des chaînes lourdes du BCR</i>	170
7.1	Expression des chaînes légères kappa/lambda	170
7.2	Analyse des résultats du séquençage des chaînes lourdes	171
8	<i>IRE1-α R594C et modèle 56R : étude de la tolérance centrale</i>	173
8.1	Dosage des auto-anticorps anti-ADN	173
8.2	Immunophénotypage des souris 56R portant la mutation d'intérêt R594C	174
	<i>DISCUSSION</i>	179
	Retour sur le projet de thèse	181
	Perte de fonction du mutant IRE1- α R594C	182
	Impact du mutant R594C sur le système immunitaire	186
	Rupture de tolérance et développement d'une auto-immunité dans le modèle IRE1- α R594C	189
	Conclusion et perspectives	193
	<i>BIBLIOGRAPHIE.....</i>	195

Liste des tableaux et des figures

Tableau 1. Manifestations cliniques du lupus érythémateux systémique.	5
Tableau 2. Principaux médicaments impliqués dans le développement du lupus érythémateux.....	48
Tableau 3 Séquences des sondes TaqMan® utilisées pour l'analyse de l'expression de l'allèle <i>Ern1</i> muté dans les LB.	106
Tableau 4. Anticorps primaires utilisés en western blot	107
Tableau 5. Liste des anticorps utilisés en cytométrie en flux	111
Tableau 6. Anticorps utilisés lors des tests ELISA	114
Tableau 7. Liste des anticorps utilisés pour les marquages d'immunohistochimie des reins.....	117
Tableau 8. Gènes d'intérêt analysés par technique de RT-qPCR TaqMan® et références des sondes.	118
Tableau 9. Gènes cibles d'intérêt analysés par RT-qPCR (SYBR®) et séquences des amorces.....	119
Tableau 10. Gènes différentiellement exprimés dans les lymphocytes des souris R594C/+ par rapport aux souris +/- (n=5 souris par groupe)..	140
Figure 1. Nouveaux critères EULAR/ACR de classification du lupus érythémateux systémique (LES) publiés en 2019.....	7
Figure 2. Carte représentant la prévalence du LES en fonction du pays.....	10
Figure 3. Schéma simplifié de la physiopathologie du lupus et de l'atteinte d'organe la plus importante du lupus : la glomérulonéphrite lupique..	12
Figure 4. Mécanismes de tolérance centrale des LB dans la moelle osseuse, en fonction de la force du signal autoréactif (+, ++, +++).	13
Figure 5. La partie variable des gènes des immunoglobulines.....	15
Figure 6. Élimination des LB autoréactifs par les mécanismes de tolérance périphérique à différents points de contrôle.....	18
Figure 7. Le processus d'élimination des cellules mortes par les phagocytes grâce à la recherche de cellules apoptotiques, la reconnaissance de leurs signaux et l'internalisation des cellules.	20
Figure 8. Déficience de clairance des corps apoptotiques dans l'étiologie du LES.	22
Figure 9. Les cellules dendritiques lient l'immunité innée à l'immunité adaptative.....	25

Figure 10. La production d'interférons de type I est régulée par les interactions entre les cellules dendritiques plasmacytoïdes et les autres types de cellules.	28
Figure 11. IFN et rupture de tolérance conduisant à une auto-immunité.	30
Figure 12. Trouble de l'équilibre entre les LTregs et LTh17 dans le LES.	34
Figure 13. Schéma de développement des LB et les différents points de contrôle.	36
Figure 14. Gènes ayant été associés au LES, par GWAS ou études d'association.	39
Figure 15. Gènes de susceptibilité au développement du LES et voies biologiques impliquées.	45
Figure 16. Résumé de l'ensemble des facteurs environnementaux suspectés de participer à la rupture de tolérance du système immunitaire conduisant au développement du lupus érythémateux systémique.	51
Figure 17. Symptômes cliniques, manifestations biologiques et présence de la mutation chez les membres de la famille multiplex à l'origine du projet ERN1.	54
Figure 18. Arbre généalogique et séquençage d'ERN1 dans la famille A.	56
Figure 19. Inducteurs du stress du RE.	60
Figure 20. Les trois voies de l'Unfolded Protein Response (UPR).	63
Figure 21. Évolution de l'UPR. Ire1 est le transducteur de l'UPR le plus ancien et le mieux conservé dans l'évolution.	65
Figure 22. Voies de réponse au stress du réticulum endoplasmique.	66
Figure 23. Aperçu de la structure moléculaire de IRE1- α (A) et des changements structuraux survenant lors de son activation (B).	70
Figure 24. Détection du stress du RE par IRE1- α (modèle indirect et modèle direct).	72
Figure 25. Les différentes voies de régulation de l'activité de IRE1- α	74
Figure 26. Séquence intronique épissée par IRE1- α dans l'ARNm de XBP1.	77
Figure 27. Épissage de XBP par IRE1- α	78
Figure 28. Gènes cibles de XBP1s.	79
Figure 29. Le stress du RE favorise l'activation de JNK dépendante de IRE1- α	81
Figure 30. La signalisation du TLR4 et de l'UPR coordonnent les réponses immunitaires dans les macrophages.	84
Figure 31. XBP1 joue un rôle crucial dans la différenciation et la fonction des DC.	86
Figure 32. XBP1 joue un rôle crucial dans la différenciation des plasmocytes.	87
Figure 33. Rôles possibles du stress du réticulum endoplasmique dans les maladies rhumatismales.	91

Figure 34. Mécanismes potentiels par lesquels l'UPR pourrait favoriser le développement d'une auto-immunité.....	94
Figure 35. Représentation schématique du programme de PCR utilisé pour le génotypage des souris IRE1- α KI ainsi que la séquence des amorces sens et anti-sens utilisées pour amplifier le fragment de 599 pb du gène <i>Ern1</i>	104
Figure 36. Stratégie de production du modèle murin et validation de la mutation.	126
Figure 37. Quantification de l'allèle sauvage et de l'allèle muté (donnant la mutation R594C) par technologie TaqMan® (Custom TaqMan Genotyping Assay) <i>Ern1</i> (1780C>T).	127
Figure 38. Mise en évidence de l'expression d'IRE1- α par western blot.	128
Figure 39. Analyse de l'expression de XBP1s dans les LB par cytométrie en flux.	130
Figure 40. Structure schématique de la protéine IRE1- α et localisation de la mutation R594C.....	130
Figure 41. Analyse de l'expression de XBP1s dans les LT CD4 ⁺ et CD8 ⁺ par cytométrie en flux..	132
Figure 42. Diminution de l'épissage de XBP1 dans les LB purifiés de souris IRE1- α KI/+ après induction d'un stress du réticulum endoplasmique.	133
Figure 43. Mesure de l'expression des gènes cibles de XBP1s.....	134
Figure 44. Mesure de l'expression des gènes cibles du RIDD.....	136
Figure 45. Analyse de la phosphorylation de IRE1- α dans les LB portant la mutation R594C.	137
Figure 46. Analyse de la phosphorylation de JNK induite par IRE1- α dans des LB spléniques.	138
Figure 47. Mesure de l'expression de <i>Chop</i> et <i>Atf6</i> dans les LB CD43 ⁻ triés de souris.	139
Figure 48. Gene-Set Enrichment Analysis (GSEA) des données de RNAseq sur la population de LB (B220 ⁺ IgM ⁺) des souris R594C/+ versus +/+.	142
Figure 49. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) des données de RNAseq sur la population de A) LT CD4 ⁺ et B) LT CD8 ⁺ des souris R594C/+ versus +/+.	143
Figure 50. Répartition des populations de LT doubles positifs (DP) et simples positifs (CD4 ⁺ ou CD8 ⁺) dans le thymus des souris +/+, R594C/+ et R594C/R594C.	145
Figure 51. Répartition des populations de LB dans la moelle osseuse des souris +/+, R594C/+ et R594C/R594C.	145
Figure 52. Diminution du nombre et de la fréquence des LT CD4 ⁺ et CD8 ⁺ naïfs dans la rate des souris R594C/R594C.	147
Figure 53. Répartition des populations de LB et de LT dans les ganglions lymphatiques (inguinaux et axiaux).	148
Figure 54. Répartition des populations de LB dans le péritoine.....	149

Figure 55. La fréquence des cellules ABC n'est pas modifiée dans la rate des souris R594C/+ et R594C/R594C.	150
Figure 56. La présence de la mutation IRE1- α R594C n'induit pas de modification de l'activation basale des LB spléniques.	151
Figure 57. La mutation IRE1- α R594C n'impacte pas la production d'anticorps.	152
Figure 58. La présence de la mutation IRE1- α R594C ne modifie pas l'activation des LB <i>in vitro</i>	153
Figure 59. La mutation IRE1- α n'affecte pas la prolifération des LB.	154
Figure 60. La mutation R594C affecte la différenciation plasmocytaire <i>in vitro</i> au bout de 7 jours de stimulation..	155
Figure 61. La concentration en IgM et en IgG2b n'est pas affectée par la mutation R594C.	156
Figure 62. La mutation R594C induit une diminution de la sécrétion d'IgM après 7 jours de stimulation <i>in vitro</i>	156
Figure 63. La mutation R594C n'impacte pas la production d'auto-anticorps.....	157
Figure 64. Détection de la présence d'autoanticorps dans le sérum des souris IRE1- α R594C.	159
Figure 65. <i>Heatmaps</i> représentant l'ensemble des résultats de l' <i>antigen microarray</i> pour chaque échantillon.	160
Figure 66. Analyse immunohistochimique des reins de souris IRE1- α R594C.	162
Figure 67. Dosage des auto-anticorps anti-ADNdb.	164
Figure 68. Tableau récapitulatif des populations de cellules immunitaires.....	165
Figure 69. Dosage des IgM et des IgG totales par ELISA dans le sérum des souris IRE1- α +/+ (points noirs), R594C/+ (points rouges) et R594C/R594C (points verts) traitées au CpG-DNA à J42.	166
Figure 70. Détection de la présence d'autoanticorps dans le sérum des souris IRE1- α R594C injectées avec du CpG-DNA.....	167
Figure 71. <i>Heatmaps</i> représentant les résultats de l' <i>antigen microarray</i>	168
Figure 72. Analyse immunohistochimique des reins de souris IRE1- α R594C.	169
Figure 73. Mesure de l'expression des chaînes légères kappa et lambda sur les populations de LB.	170
Figure 74. Résultats d'analyse du répertoire des chaînes lourdes du BCR des souris R594C/R594C (n=5) <i>versus</i> des souris +/+ (n=5).	171
Figure 75. Impact du mutant R594C sur l'utilisation des familles de gènes V, D et J dans les plasmocytes CD138 ⁺	172
Figure 76. Dosage des auto-anticorps	174

Figure 77. Analyse des populations de LB présents dans la rate des souris 56RxR594C/+.....	175
Figure 78. Fréquence de populations de cellules marquées aux nucléosomes.	176
Figure 79. Aucun impact de la mutation IRE1- α R594C sur l'utilisation des chaînes légères du BCR.	176
Figure 80. Fonction du modèle ERAI XBP1-VenusFP rapporteur.	183
Figure 81. Impact de la substitution R594C sur la fonction de IRE1 α	186

INTRODUCTION

1 Le lupus érythémateux systémique

1.1 Introduction

Les maladies auto-immunes (MAI) sont des pathologies se développant lorsqu'une réponse immunitaire est induite vis-à-vis des composants du soi (c'est-à-dire de l'organisme), ce qui correspond à une perte de tolérance au soi. Les MAI ont une forte prévalence dans la population humaine (~3 à 5 %). Elles affectent majoritairement les femmes, peuvent parfois débiter dès les premiers âges de la vie et ont une forte incidence sur la morbidité et la mortalité dans le monde (Cooper and Stroehla, 2003; Cooper et al., 2009). Les mécanismes effecteurs des MAI sont les mêmes que dans une réponse immunitaire normale, cependant ils ne ciblent pas les corps étrangers mais les cellules et les antigènes du soi. Ils font intervenir des auto-anticorps (anticorps dirigés contre le soi), des lymphocytes T (LT) autoréactifs, et l'immunité innée, notamment des cytokines (inflammation). Ces pathologies présentent une forte hétérogénéité liée à de multiples facteurs génétiques et environnementaux. Ainsi, les MAI sont définies comme des maladies multifactorielles. De nombreuses études génétiques ont permis de déterminer plus de 300 loci de gènes de susceptibilité dans les maladies auto-immunes, mais les mécanismes effecteurs sous-jacents à ces variants de gènes ne sont pas encore bien définis. De plus, l'importance des facteurs environnementaux et épigénétiques reste à déterminer.

Le lupus érythémateux systémique (LES) est une des maladies auto-immunes les plus fréquentes dans le monde. Le développement des connaissances sur cette maladie a permis de nombreuses avancées dans la compréhension des mécanismes immunopathologiques conduisant à une auto-immunité. Le lupus est une affection polymorphe et multifactorielle. La description et le diagnostic sont restés pendant longtemps majoritairement cliniques et l'apparition de marqueurs biologiques n'est que récente dans l'histoire de la médecine. Aujourd'hui, la compréhension des événements se produisant dans le système immunitaire pour parvenir au dérèglement observé pendant la maladie reste toujours parcellaire.

1.2 Aspects cliniques

Les manifestations cliniques et biologiques du LES varient fortement d'un sujet à l'autre. Elles peuvent varier aussi bien au début de la maladie que durant son évolution, caractérisée par des

phases de poussées spontanées ou déclenchées notamment par une mauvaise observance des traitements, suivies ou non de phases de rémission. Ainsi, l'examen clinique des patients doit être complet et régulier. Le **Tableau 1** est un résumé des principales caractéristiques cliniques du LES. Les informations mentionnées ont été obtenues d'après le *Protocole National de Diagnostic et de Soins* (PNDS) édité par la Haute Autorité de Santé française en 2017, mis à jour en février 2020, disponible sur le site de la Haute Autorité de Santé (https://www.has-sante.fr/jcms/c_2751894/fr/lupus-systemique).

Manifestations cliniques	Caractéristiques des atteintes
Signes généraux	Fièvre (50 à 80 % des cas) : recherche de complications infectieuses à effectuer ; Amaigrissement, asthénie (indices de poussées lupiques).
Manifestations cutanées	Concerne 25 % des patients en poussée ; Aiguës, subaiguës ou chroniques ; Érythème en ailes de papillons ; Lésions vasculaires : nécroses cutanées ; Érosion des muqueuses.
Manifestations rhumatologiques	Au début de la maladie chez 50 % des patients et présentes à un moment quelconque de la pathologie chez 90 % des patients ; Arthralgies, arthrites non érosives (50 % des patients) ; Ruptures tendineuses, myalgies.
Manifestations uronéphrologiques	Essentiellement les manifestations rénales, qui font la gravité de la pathologie lupique : glomérulonéphrite essentiellement, élément mettant en jeu le pronostic vital (survie à 10 ans diminuée de 94 % à 88 % en cas de néphropathie) ; Il existe des critères de classification des glomérulonéphrites lupiques en fonction de la gravité et de l'activité, impactant la survie du patient et donc la prise en charge thérapeutique (critères édités en 2003 par l' <i>International Society of Neurology</i> et la <i>Renal Pathology Society</i>).
Manifestations neurologiques et psychiatriques	3 ^{ème} cause de mortalité du lupus. Fréquence : 15 à 40 % ; Généralement peu spécifiques du lupus. Exemples : méningite aseptique, convulsions, céphalées, accidents vasculaires cérébraux (AVC) ou atteintes démyélinisantes, anxiété.
Manifestations respiratoires	Atteintes pleurales uni- ou bilatérales chez 25 à 50 % des patients. Souvent récidivantes (10 %). Souvent de gravité faible (anomalie aux épreuves fonctionnelles respiratoires) ; Atteintes parenchymateuses rares mais parfois graves : hémorragie intra-alvéolaire.
Manifestations cardiovasculaires	Péricardite (20 à 30 % des patients), myocardite (troubles du rythme), valvulopathie ; Atteintes des coronaires ; Hypertension artérielle, syndrome de Raynaud (20 à 30 % des patients) ; Thromboses.
Manifestations hématologiques	Splénomégalie, adénopathies (20 à 60 % des patients), témoignant de l'évolution de la maladie ;

	Cytopénies le plus souvent auto-immunes : Anémie (25 à 50 % des patients), leucopénie (20 à 80 % des patients), thrombopénie (10 à 50 % des cas).
Manifestations hépatiques et digestives	Sérites (ascite), atteintes digestives d'origine vasculaire ; Anorexie, nausées, vomissements lors des poussées. Atteintes hépatiques rares.
Complications infectieuses	Fréquentes et sévères chez les patients lupiques. À évoquer devant toute fièvre, signes généraux. Responsables de 50 % de la morbidité. 33 % des décès de patients sont imputables à une infection (15 % pour les atteintes rénales). Souvent infections par des germes opportunistes favorisées par les traitements immunosuppresseurs.
Syndrome des anticorps antiphospholipides (SAPL)	Manifestations cliniques et biologiques associées à la présence d'anticorps anti-phospholipides et/ou de leurs co-facteurs. 10-20 % d'associations au LES, on parle de SAPL secondaire. Accidents thrombotiques veineux et artériels, atteintes du système nerveux central (SNC) (répétition d'accidents ischémiques), valvulopathies, embolies pulmonaires, manifestations cutanées et rénales, pertes fœtales et fausses couches.

Tableau 1. Manifestations cliniques du lupus érythémateux systémique. D'après le Protocole National de Diagnostic et de Soins édité par l'HAS en 2017, mis à jour en 2020.

1.3 Classification

Le grand nombre de profils cliniques et biologiques du LES a nécessité l'élaboration de critères recouvrant la majorité des manifestations observables chez les patients. Ces critères sont au nombre de 11 et la mise en évidence de 4 critères sur les 11 est nécessaire et suffisante pour définir un patient comme atteint d'un lupus érythémateux systémique. Ces critères ont été élaborés par l'*American College of Rheumatology* (ACR ou Collège Américain de Rhumatologie) en 1982 et ont été actualisés en 1997 pour tenir compte des avancées scientifiques des tests immunologiques. Ces critères ne sont pas limités dans le temps ; ainsi une manifestation telle qu'un purpura thrombopénique auto-immun survenu 10 ans avant une polyarthrite rhumatoïde avec éruption cutanée et anticorps anti-nucléaires peut constituer un critère ACR bien qu'il soit antérieur dans le temps.

La présence d'au moins 4 des 11 critères « de classification » proposés par l'ACR permet d'affirmer l'existence d'un LES avec une sensibilité de 83 % et une spécificité de 94 %. Ces critères sont des critères de classification et ne doivent pas être utilisés dans un but diagnostique à l'échelon individuel (par exemple : le diagnostic de lupus systémique pourra être retenu par le clinicien chez un patient avec une polyarthrite, des anticorps anti-nucléaires et des anticorps anti-Sm alors qu'il n'a que 3 critères ACR). Une nouvelle classification a été proposée plus récemment par le *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC). La présence d'au moins 4 critères, dont au moins 1 critère

clinique et 1 critère biologique, ou une histologie de glomérulonéphrite lupique avec des AAN (anticorps anti-nucléaires) et/ou des anticorps anti-ADN natifs, permet d'affirmer l'existence d'un lupus avec une sensibilité de 94 % et une spécificité de 92 % (Petri et al., 2012).

Ces classifications restent des outils pour les études épidémiologiques et les essais cliniques pour définir des groupes homogènes de patients et représentent des guides pour les praticiens mais, en pratique, ne représentent pas des critères de diagnostic au sens propre. Le diagnostic du lupus représente toujours un défi, mais demeure largement fondé sur un jugement clinique, fonction de l'expérience du personnel soignant. Cependant, même sa classification est encore difficile à ce jour. En effet, bien que la classification du lupus semble être plus sensible et spécifique avec les critères du SLICC de 2012 qu'avec les précédents critères de l'ACR de 1997, ces critères pourraient encore être améliorés. En particulier, les critères de diagnostic et de classification devraient être applicables à n'importe quel sujet dans le monde et, par conséquent, ils devraient inclure des variables immunologiques validées dans différentes populations à l'échelle mondiale, ce qui n'est pas encore le cas (Cf. II. Aspects Épidémiologiques) (Larosa et al., 2016).

En 2019, de nouveaux critères diagnostiques ont été publiés conjointement par l'*American College of Rheumatology* et l'*European League Against Rheumatism* (EULAR). Ces critères ont montré une spécificité de 96,1 % et une sélectivité de 93,4 %, ils sont encore peu utilisés en pratique (Aringer et al., 2019). La présence d'anticorps anti-nucléaires (ANA, *Anti-Nuclear Antibodies*) est obligatoire pour classer la pathologie en tant que lupus. Ces nouveaux critères diagnostiques sont utilisés dans tous les nouveaux essais cliniques (**Figure 1**).

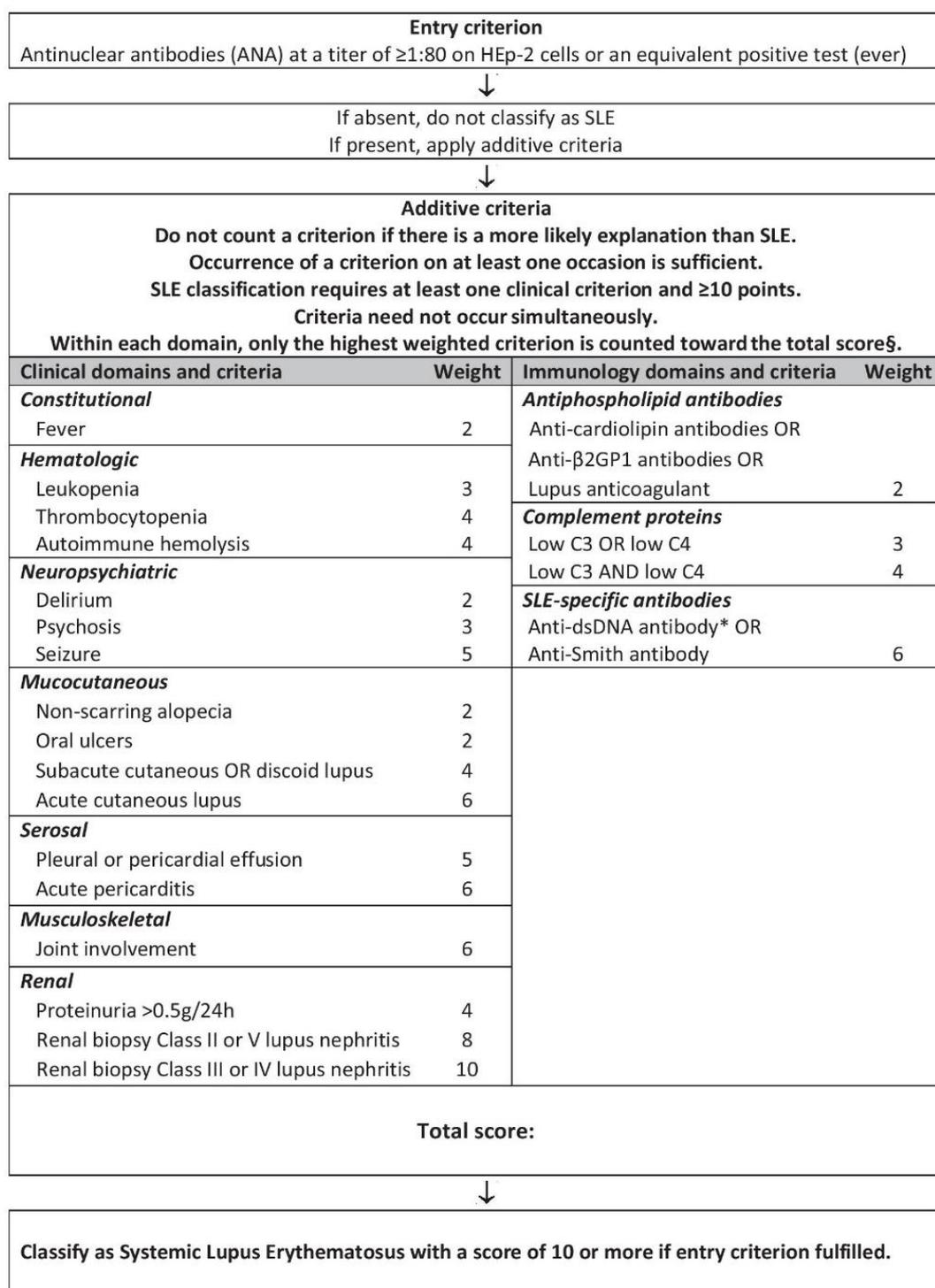


Figure 1. Nouveaux critères EULAR/ACR de classification du lupus érythémateux systémique (LES) publiés en 2019. § = les critères supplémentaires dans le même domaine ne seront pas pris en compte ; * = dans un essai avec une spécificité de 90 % par rapport à des contrôles de la maladie pertinents. Anti- $\beta 2$ GPI = anti- $\beta 2$ -glycoprotéine I ; anti-dsDNA = anti-ADN double brin.

(Aringer et al, 2019)

1.4 Score d'activité et score de réponse

La grande quantité d'essais cliniques mis en place pour le LES a nécessité le développement de scores d'activité et de scores de réponse aux traitements afin de pouvoir comparer l'efficacité des essais thérapeutiques. La mesure de l'activité d'une pathologie aussi complexe que le LES n'est pas une chose facile ; différentes approches ont tenté de répondre à ce besoin de standardisation.

On peut distinguer deux principaux scores d'activité : le BILAG (*British Isles Lupus Assessment Group Index*) et le SLEDAI (*SLE Disease Activity Index*).

Le BILAG est constitué d'une centaine d'items couvrant plusieurs domaines (signes généraux, atteintes cutanée, neurologique, articulaire, cardiaque, respiratoire, rénale et hématologique). Il évalue l'activité sur le mois précédant l'évaluation. Pour chaque domaine, un score variant de A (haut niveau d'activité) à E (le plus faible niveau d'activité) est obtenu. Le BILAG est considéré comme un excellent score pour détecter les poussées (Lipsker and Sibilia, 2013).

Le SLEDAI est un score qui évalue globalement l'activité de la maladie. Il comporte 24 items couvrant 9 domaines. Il mesure l'activité dans les dix jours précédant l'évaluation. Les items sont pondérés et après addition, on obtient ainsi un score. Un score >20 correspond à une forte activité de la maladie. Ce score n'est pas un bon indicateur de la gravité de la maladie. En effet, deux patients avec un score identique peuvent présenter des symptômes très différents. Un patient peut avoir une atteinte grave (neurologique par exemple pour un score de 8) alors qu'un autre peut avoir plusieurs manifestations légères (cutanées par exemple, d'un score de 1 à 2) mais un score final identique au premier. Ce score est cependant généralement bien capable de détecter des modifications d'activité. On parle d'amélioration à partir d'un score diminué de 4 points et de poussée à partir d'un score augmenté de 3.

Ces scores (BILAG et SLEDAI) ont été mis à jour régulièrement en fonction des nouveaux essais thérapeutiques (Thanou and Merrill, 2013). De nouvelles approches ont été développées visant à combiner les avantages des scores d'activité (le BILAG détectant bien les poussées, le SLEDAI détectant mieux les améliorations) ; on parle de score de réponse. Deux index principaux sont ainsi utilisés pour évaluer la réponse aux traitements : le SRI (*SLE Responder Index*) et le BICLA (*BILAG-Based Combined Lupus Assessment*). Ces scores combinent plusieurs critères (diminution du score SLEDAI, absence de nouvelles atteintes BILAG, diminution des atteintes BILAG déjà présentes) afin

d'obtenir des scores de réponse lors des essais thérapeutiques. On détermine ensuite un pourcentage de « répondeurs » (Lipsker and Sibilia, 2013; Thanou et al., 2019).

Il est important de rappeler ici que ces scores ont leur utilité lors des essais cliniques afin de standardiser les méthodologies de réponse aux traitements. Ces scores ne sont pas utilisés en pratique clinique courante.

2 Aspects épidémiologiques

2.1 Incidence et prévalence en France

Les études de prévalence (nombre de cas dans la population à un instant donné) et d'incidence (nombre de nouveaux cas dans une population pendant une période donnée) du LES sont difficiles à comparer entre elles à cause du manque d'une « méthodologie universelle » (Fortuna and Brennan, 2013). Si l'on se base sur les critères ACR de 1997, il existe plus de 330 types de lupus différents (Saeed, 2017). Néanmoins, les données indiquent que le LES constitue une des MAI les plus répandues, sa prévalence étant évaluée à 47,1 personnes pour 100000 en France, les femmes représentant 90 % des patients diagnostiqués (Mathian et al., 2014). Si le lupus se déclare en majorité chez des femmes adultes, 15 à 20 % des cas sont diagnostiqués chez des enfants (Fortuna and Brennan, 2013).

2.2 Incidence et prévalence dans le monde

De nombreuses études montrent une stabilité dans les nouveaux cas de lupus diagnostiqués ces vingt dernières années (Alonso et al., 2011; Ingvarsson et al., 2016) même si certaines données d'incidence et de prévalence ont augmenté depuis les premières études épidémiologiques de la décennie 1960, comme le montrent les données épidémiologiques aux USA (Uramoto et al., 1999). Cette augmentation peut s'expliquer par la meilleure prise en charge des patients lupiques donc l'augmentation d'espérance de vie des patients, ainsi qu'à un meilleur diagnostic lié à l'apparition de nouveaux dosages des marqueurs de la maladie.

La disparité de l'incidence et de la prévalence en fonction des pays et des études est une caractéristique majeure du LES (**Figure 2**). Une différence importante concernant l'incidence et la

prévalence en fonction de l'ethnie ou du pays d'origine est validée par de nombreuses études. Les patients d'origine sud-américaine, africaine et asiatique ont un plus grand risque de développer un LES (Barber et al., 2021). Les sujets diagnostiqués à un jeune âge ou dans les populations d'origine africaine présentent une fréquence plus élevée de complications sévères et notamment rénales (Cervera et al., 2014). Ces résultats ont été confirmés depuis par de nombreuses études internationales en Europe entière (Cervera et al., 2014) et en Chine (Mok et al., 2008).

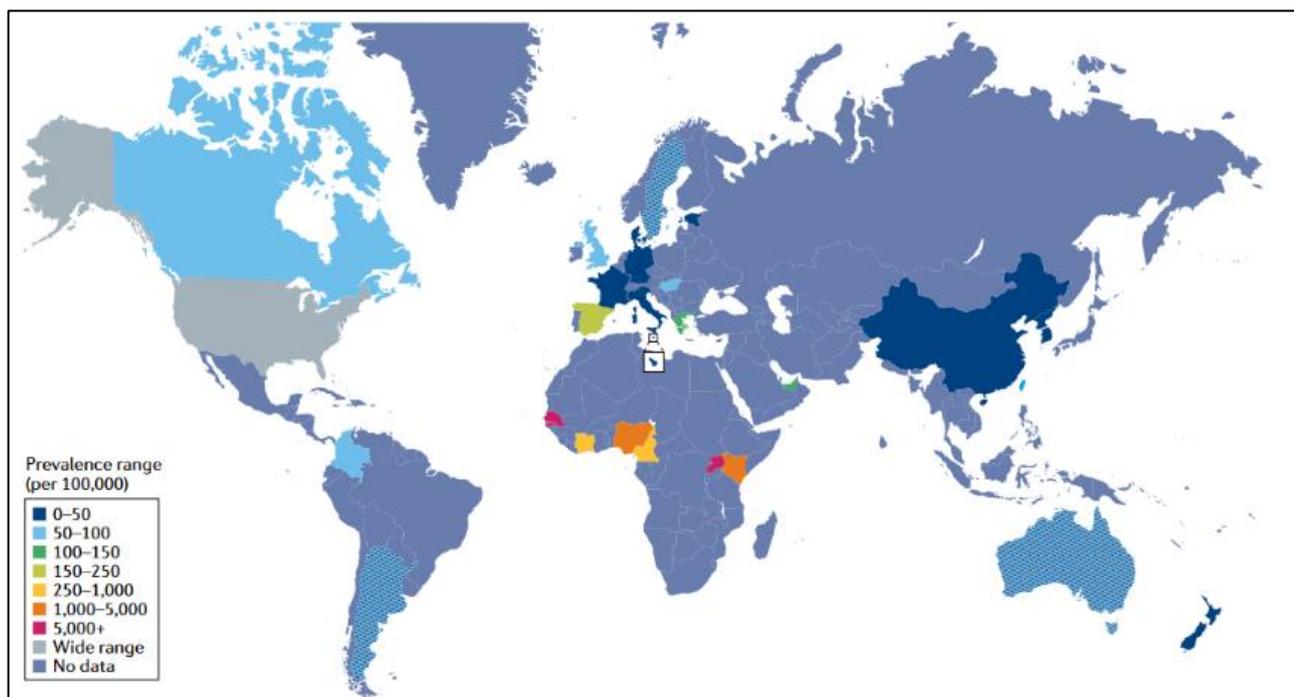


Figure 2. Carte représentant la prévalence du LES en fonction du pays.

(Barber et al, 2021)

2.3 Ratio Homme/Femme et âge de diagnostic

Le LES touche plus souvent les femmes que les hommes, avec un ratio d'environ 9 femmes pour 1 homme. Mais il existe également une disparité régionale de ce ratio. En effet, le ratio est de 5,3 au Curaçao (Amérique du Sud) (Nossent, 1992), il monte à 23 en Oman (Péninsule arabique) (Al-Maini et al., 2003) et aux Philippines (Villamin and Navarra, 2008). Dans toutes les études, l'incidence est supérieure chez les femmes, et le ratio est plus faible aux âges extrêmes (Rees et al., 2017). Une étude faite sur 500 patients suivis pendant 30 ans montre peu de différences entre les sexes au niveau de la sévérité des symptômes et de leurs conséquences sur l'espérance de vie des patients (Renau and Isenberg, 2012). Le LES est classiquement décrit comme une maladie de la femme adulte,

mais les hommes peuvent aussi être touchés. Le LES peut également, dans 10-20 % des cas, toucher l'enfant ou l'adolescent. Cliniquement, le lupus pédiatrique est plus grave au niveau de l'évolution et des atteintes d'organes. Le lupus pédiatrique est généralement plus fortement lié à des facteurs génétiques. L'identification de mutations rares causant des phénotypes lupiques chez les jeunes enfants (les lupus monogéniques) a permis en retour d'augmenter les connaissances sur le LES en général (Lo, 2018).

2.4 Mortalité

Le taux de survie général à 10 ans est de 92 %. La principale cause de mortalité est l'infection dans les 5 premières années de diagnostic. Dans les 5 années suivantes, ce sont les manifestations thrombotiques qui sont les principales causes de mortalité (Cervera et al., 2009). La mortalité a globalement diminué durant les dernières décennies. Par exemple, à Toronto (Canada), le ratio de mortalité standardisé (SMR : *Standardised Mortality Ratio*) qui correspond au nombre de morts observés sur le nombre de morts attendus dans la population générale, a évolué de 12,6 dans les années 1970 à 3,46 dans la dernière décennie. Les patients lupiques ont toujours un taux de mortalité supérieur à celui de la population générale (Urowitz et al., 2008). La mortalité liée au lupus est également plus faible dans les pays les plus développés que dans les pays les plus pauvres, en lien probable avec de meilleures conditions de diagnostic et de prise en charge (Vasudevan and Krishnamurthy, 2010).

3 Les acteurs de la physiopathologie du LES

Après quelques rappels sur les mécanismes de tolérance, nous aborderons en trois sous-chapitres les principaux mécanismes de la physiopathologie du lupus décrits dans la littérature (**Figure 3**) : les anomalies de l'apoptose, les dérégulations au niveau des cellules de l'immunité innée (macrophages, cellules dendritiques...) et des cellules de l'immunité adaptative (LB et LT).

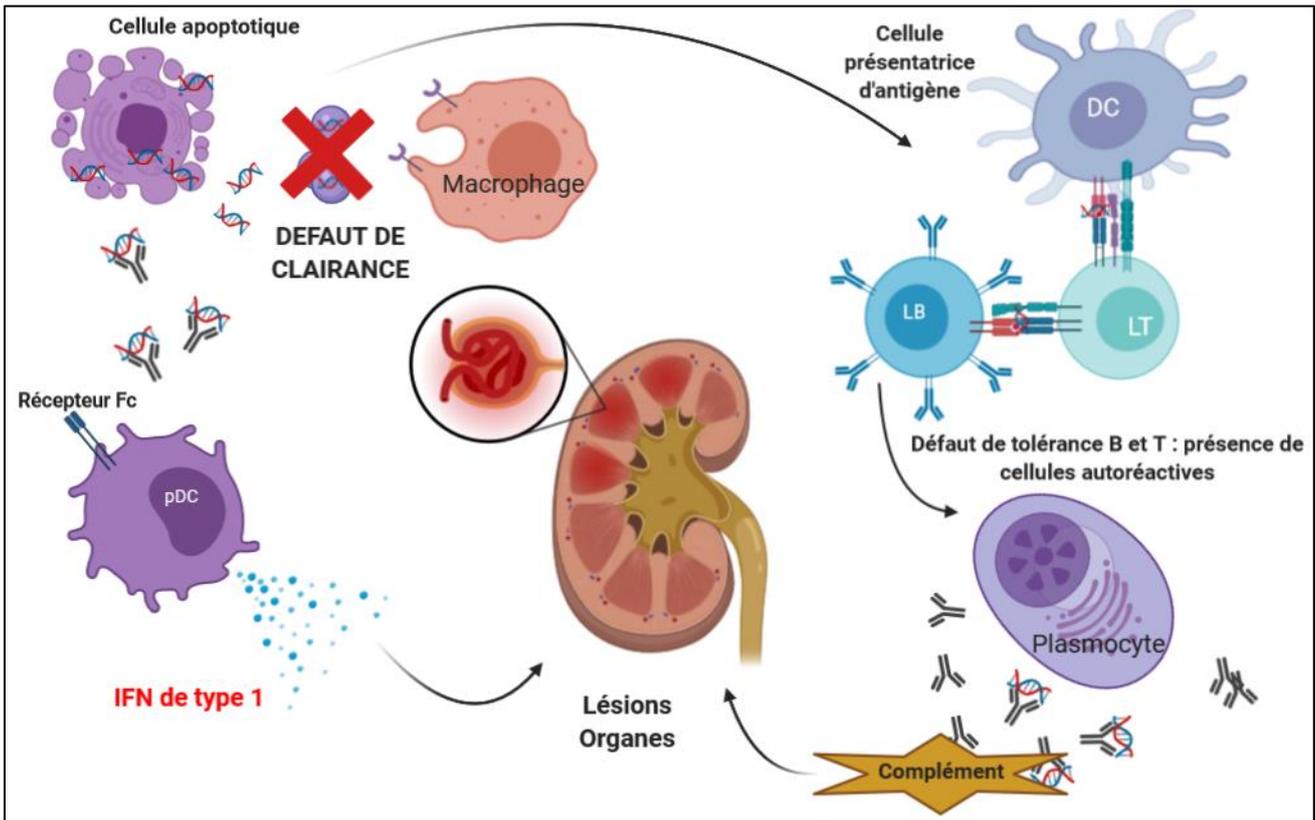


Figure 3. Schéma simplifié de la physiopathologie du lupus et de l'atteinte d'organe la plus importante du lupus : la glomérulonéphrite lupique. Une anomalie de la clairance physiologique des corps apoptotiques et/ou une augmentation de leur production entraîne/nt leur accumulation. Ces corps apoptotiques peuvent être présentés par des cellules présentatrices d'antigènes à des LT autoréactifs ayant échappé aux mécanismes de tolérance, entraînant l'activation de ces LT. Les LT vont ensuite aider les LB autoréactifs à se différencier en plasmocytes sécrétant d'auto-anticorps qui se déposeront dans les tissus en formant des complexes avec les auto-antigènes et entraînant l'activation des cascades du complément et ainsi les lésions tissulaires. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes vont également être activées par les complexes immuns via la liaison au récepteur Fc de la partie constante des anticorps. Cette stimulation entraîne la production inappropriée d'IFN de type I (IFN- α et IFN- β) activant des mécanismes inflammatoires et l'immunité innée, aggravant les dommages tissulaires. IFN (interféron) ; LB (lymphocyte B) ; LT (lymphocyte T) ; DC (cellule dendritique) ; pDC (cellule dendritique plasmacytoïde) ; Récepteur Fc (Récepteur à la fraction cristallisable des immunoglobulines).

Figure personnelle

3.1 Tolérance B centrale et tolérance B périphérique

Le développement d'une auto-immunité est un risque inhérent au fonctionnement du système immunitaire. En effet, le système immunitaire distingue, dans un état normal, les composants de l'organisme (le « soi ») des composants étrangers (le « non-soi »). Lors du développement des lymphocytes, des récepteurs (BCR, TCR) spécifiques d'auto-antigènes c'est-à-dire des antigènes du « soi », peuvent être produits. Si ces cellules dites autoréactives persistent et se multiplient, elles reconnaîtront ces auto-antigènes et déclencheront une réaction immunitaire vis-à-vis de l'organisme (**Figure 4**, illustration pour les LB).

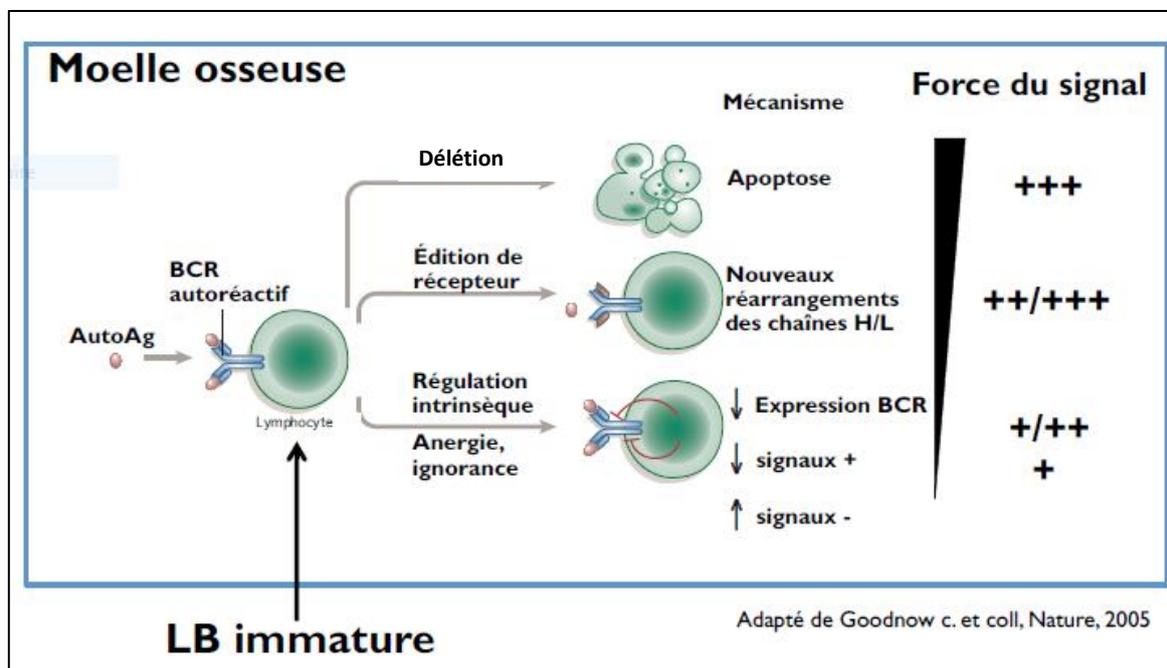


Figure 4. Mécanismes de tolérance centrale des LB dans la moelle osseuse, en fonction de la force du signal autoréactif (+, ++, +++). La délétion aboutit à la mort de la cellule autoréactive par apoptose. L'édition de récepteur permet la synthèse d'un nouveau récepteur à l'antigène (BCR), non autoréactif. L'anergie et l'ignorance permettent d'éviter une réponse de la cellule autoréactive face à l'auto-antigène.

(adaptée de Goodnow et al, 2005)

Des mécanismes de tolérance « centrale » (ayant lieu dans la moelle osseuse (MO) pour les lymphocytes B (LB) et le thymus pour les lymphocytes T (LT)), ou « périphérique » (ayant lieu dans les organes lymphoïdes périphériques tels que la rate ou les ganglions lymphatiques) vont prévenir la maturation de lymphocytes autoréactifs en les inactivant ou en les détruisant (Goodnow et al., 2005). Plusieurs défauts de ces mécanismes ont été associés au LES et seront développés dans la

suite du chapitre. Nous décrivons ci-dessous brièvement les mécanismes de tolérance centrale et périphérique des LB. Les mécanismes moléculaires à l'origine de la rupture de tolérance au cours du lupus chez l'Homme sont très mal connus .

3.1.1 Rappels sur la recombinaison VDJ

Le réarrangement des gènes codant pour les régions variables des immunoglobulines est un phénomène précoce, indispensable au développement des LB dans la moelle osseuse (**Figure 5**). Il consiste en une recombinaison de segments géniques appelée « recombinaison VDJ », codant pour les régions variables des chaînes lourdes et légères. La région variable de la chaîne lourde est composée de 3 segments : V_H , D_H et J_H , et la région variable de la chaîne légère de 2 segments : V et J, de sous-type κ ou λ . Le complexe protéique composé des endonucléases Rag (Recombination Activating Gene) 1 et Rag2, est l'initiateur de la recombinaison VDJ. Ce complexe est capable de reconnaître des séquences signal de recombinaison (RSS) spécifiques, situées en amont ou en aval de chaque segment V, D ou J, pour ensuite conduire à leur rapprochement par recombinaison.

Le premier événement consiste en une reconnaissance d'une première séquence RSS, par le complexe RAG associé à la protéine HMGB1 (High Mobility Group protein B1) et à la « capture » de la deuxième séquence RSS pour former une synapse entre les deux segments. Les enzymes Rag introduisent alors des doubles cassures d'ADN entre chaque gène amené à être recombiné et sa séquence RSS associée. Puis les protéines RAG et les facteurs de réparation de l'ADN de la famille du NHEJ (*Non homologous end joining*), spécifique des cassures d'ADN double brin, s'associent afin de joindre les extrémités des séquences d'ADN. Pendant cette étape, des modifications sont introduites au niveau des extrémités des gènes. Des nucléotides peuvent être ajoutés par la TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase) ou supprimés par certaines exonucléases. Enfin, la dernière étape est réalisée par l'ADN ligase IV qui permet la ligation finale des deux segments.

Le réarrangement des gènes aux premiers stades du développement des LB génère une immense diversité de BCR, due à deux mécanismes. Tout d'abord, il existe de multiples copies pour chaque segment V, D et J. Chez l'Homme par exemple, on dénombre, pour la chaîne lourde, une quarantaine de segments géniques V, une vingtaine de segments géniques D et environ 6 segments géniques J, ce qui offre un très grand nombre de combinaisons possibles pour la constitution de la région variable. À ceci s'ajoute le fait que l'association aléatoire des chaînes lourdes aux chaînes

légères augmente le nombre déjà considérable de possibilités. Cet ensemble de possibilités représente la diversité combinatoire. De plus, il existe une diversité jonctionnelle qui résulte en l'addition et/ou la suppression aléatoire de nucléotides entre les différents segments lors de leur assemblage, par la TdT et des exonucléases respectivement, comme évoqué plus haut. Additionnés les uns aux autres, ces mécanismes permettraient l'émergence d'au moins 10^{11} BCR différents, exprimés à la surface des LB naïfs à raison d'un seul type de BCR par cellule. À cela, s'ajoutera le processus d'hypermutation somatique dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires, qui concerne les LB matures activés par l'antigène et consiste à augmenter l'affinité qu'ils ont pour leur antigène, en générant des mutations dans les régions variables du BCR (Chi et al., 2020; Nemazee, 2017).

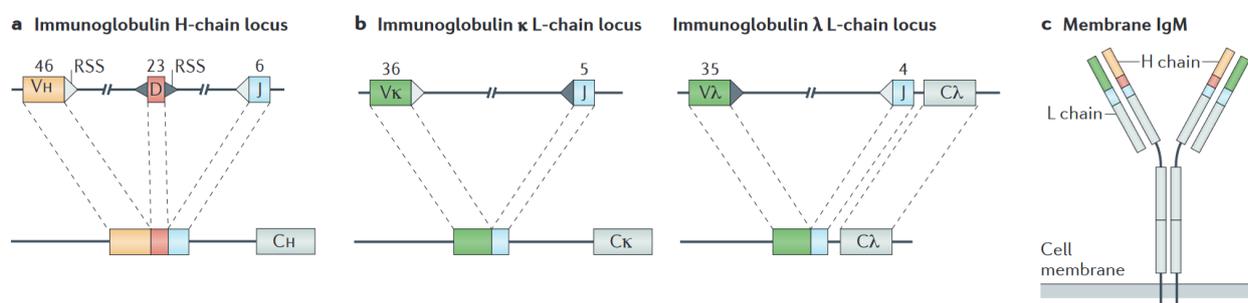


Figure 5. La partie variable des gènes des immunoglobulines est composée d'éléments variables (V), de diversité (D) et de jonction (J) sur le locus codant la chaîne lourde (H) (a), et d'éléments V et J sur chacun des deux loci codant les chaînes L, λ et κ (b). Les triangles montrent les séquences de signaux de recombinaison (RSS) adjacentes aux segments de gènes. Les nombres au-dessus de chaque élément indiquent les nombres estimés des éléments génétiques indiqués, disposés le long des loci 165-168 de l'immunoglobuline humaine. Chaque élément V, D et J peut se recombinaison comme indiqué pour générer de nombreuses combinaisons d'éléments dans un locus. Sur le locus de la chaîne H, les réarrangements de gènes D avec J se produisent en premier, suivis par la recombinaison de V avec DJ. Le schéma de la protéine membranaire IgM (c) montre l'emplacement approximatif des résidus d'acides aminés codés par chaque élément.

(Nemazee, 2017)

3.1.2 Tolérance centrale

- La délétion

Dans le cas où le BCR est autoréactif avec une très forte affinité pour un antigène du soi, un programme de mort cellulaire, appelé délétion clonale, est induit au stade immature dans la MO, lorsque le LB exprime une IgM de surface complète (Nemazee, 2017). La délétion clonale résulte de la suppression de certains signaux de survie et cela provoque le déclenchement de la mort programmée par apoptose. L'apoptose y est induite par sa voie intrinsèque (ou mitochondriale), par

suite du relargage de facteurs pro-apoptotiques tels que Bim, Bak et Bad, capables d'inhiber les facteurs anti-apoptotiques de la famille des BCL-2 (cf. INTRODUCTION 3.2).

- **L'édition de récepteur**

L'édition de récepteur est le mécanisme prédominant de la tolérance centrale. Il a également lieu dans la MO, au stade immature. Dans le cas où ce LB présente un récepteur avec une forte affinité pour un antigène du soi mais moindre que dans le cas de la délétion clonale, le BCR est rapidement internalisé et la cellule met en pause temporairement sa maturation. Cela induit plusieurs évènements au niveau de la cellule : tout d'abord les récepteurs de « homing » (ex : CD62L) ne sont plus exprimés, empêchant ainsi l'attraction du LB vers les organes lymphoïdes secondaires ; puis l'expression des récepteurs de BAFF (B-cell Activating Factor), cytokine importante pour la survie des LB, est diminuée ; enfin, les gènes Rag1 et Rag2, codant pour les enzymes responsables de la recombinaison VDJ, restent exprimés, permettant la mise en place de réarrangements VDJ secondaires (Goodnow et al., 2005). Ces réarrangements secondaires permettent, dans la plupart des cas, d'éliminer le locus réarrangé de la région variable de la chaîne légère et plus rarement de la chaîne lourde responsable de l'autoréactivité, et de le remplacer par un nouveau locus réarrangé. Le réarrangement continue jusqu'à ce qu'un récepteur non autoréactif soit produit ou jusqu'à ce que plus aucun segment génique ne soit disponible pour une recombinaison secondaire (Nemazee, 2017). La proportion de LB autoréactifs restant après délétion/édition de récepteur est estimée à 40 % (Bonasia et al., 2021).

- **L'anergie**

L'anergie se produit lorsque le BCR autoréactif est engagé avec une force de signal plus faible (affinité plus faible pour l'antigène ou antigène quantitativement moins présent exprimé dans la MO). L'anergie est définie comme un état d'inactivation de la cellule et concerne les LB présentant une autoréactivité d'intensité faible à intermédiaire. L'état de non-réponse du LB anergique serait la conséquence d'une expression augmentée de molécules inhibitrices des LB (CD22 et CD72, par exemple), d'une diminution de l'expression de molécules activatrices ou d'une diminution de l'expression du BCR. Les LB anergiques vont donc être retrouvés en périphérie et sont exclus des centres germinatifs par compétition avec les LB non autoréactifs, et ont ainsi une durée de vie plus

courte (Gros et al., 2018; Yarkoni et al., 2010). L'expression des marqueurs d'activation est retrouvée modifiée dans les LB de patients (cf. INTRODUCTION 3.4.2)

- **L'ignorance**

Un autre état de tolérance, appelé ignorance, consiste en l'incapacité des LB à répondre à leur auto-antigène en raison de la trop faible affinité qu'ils ont pour celui-ci. Ils ont des caractéristiques proches des LB anergiques, mais à l'inverse de ces derniers, ces cellules peuvent être activées par une voie indépendante du BCR (voie des TLR par exemple). Ces cellules sont presque considérées comme non autoréactives et ainsi présentent une demi-vie et une maturation normales, mais peuvent devenir pathogéniques en cas d'activation et potentiellement de maturation d'affinité de leur BCR (INTRODUCTION 3.5.2) (Aplin et al., 2003). De plus, ces LB produisent des auto-anticorps dits « naturels » de type IgM et pour la plupart polyréactifs qui pourraient jouer un rôle de premières barrières contre les infections (Fereidan-Esfahani et al., 2019).

3.1.3 Tolérance périphérique

L'anergie et l'ignorance sont des états réversibles et en cas d'une stimulation suffisamment forte délivrée par les LT, les LB pourraient subir dans certains cas une hypermutation somatique (modification des gènes de la région variable du BCR augmentant l'affinité du récepteur pour son antigène) et donc gagner en affinité pour l'auto-antigène. Dans ce cas, il existe des mécanismes de tolérance périphérique (**Figure 6 A et B**), certains similaires à la tolérance centrale comme la délétion clonale et l'anergie (exclusion folliculaire des LB autoréactifs). Les LTreg et les LBreg vont également participer à la régulation des LB autoréactifs en supprimant les signaux activateurs ou en induisant des signaux inhibiteurs. Il est important de noter que le LB autoréactif aura besoin d'une aide par un LT autoréactif pour se différencier en plasmocyte sécréteur d'auto-anticorps. Le contrôle des LB autoréactifs en périphérie est ainsi médié par une tolérance T efficace (Bonasia et al., 2021; Gros et al., 2018).

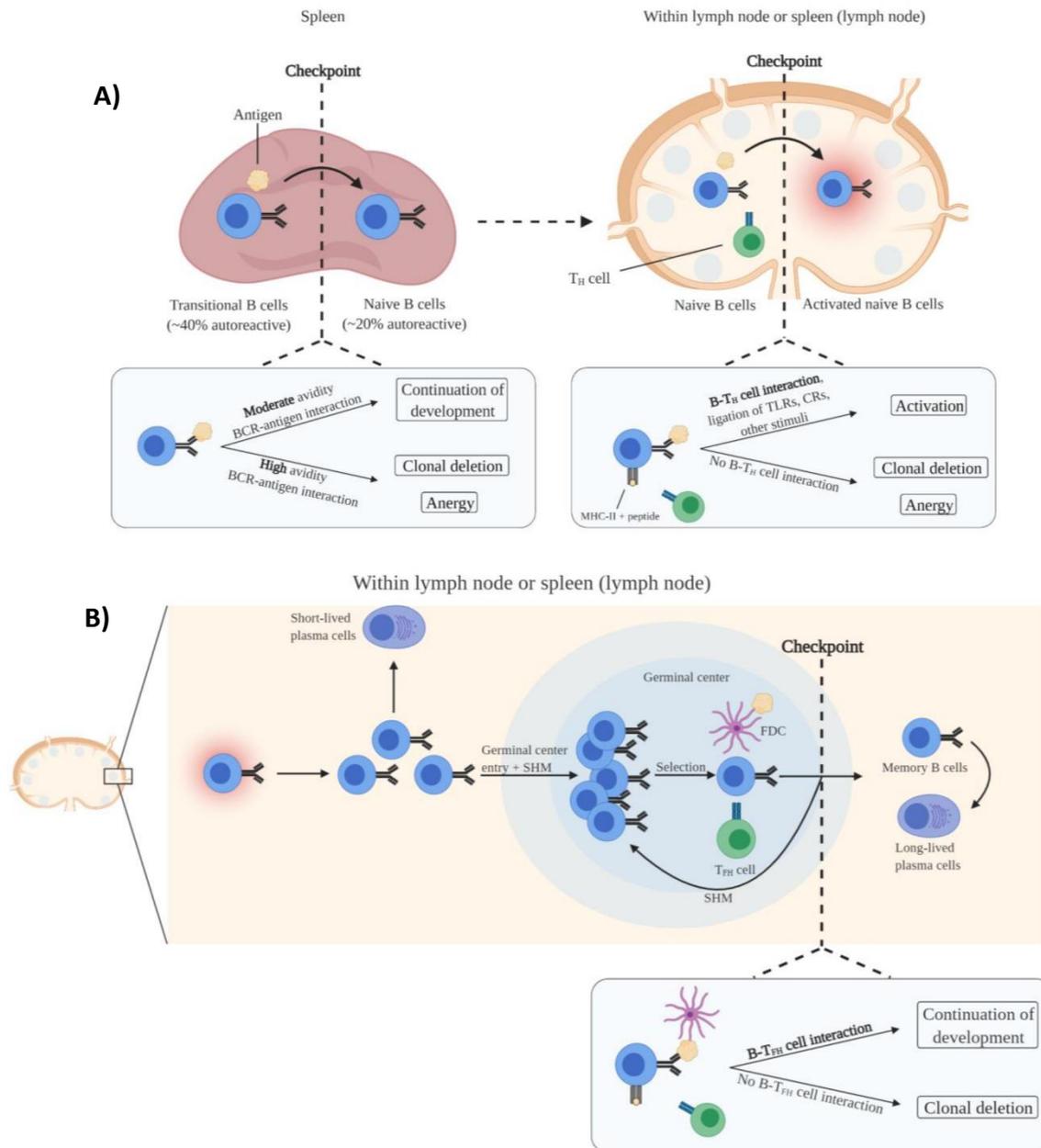


Figure 6. Élimination des LB autoréactifs par les mécanismes de tolérance périphérique à différents points de contrôle. (A) Dans la rate, les LB transitionnels qui se lient fortement aux auto-antigènes présents dans la rate subissent une délétion clonale ou une anergie, ce qui réduit la fréquence des LB autoréactifs. Les LB transitoires qui se lient modérément aux auto-antigènes deviennent des LB naïfs. Les LB naïfs rencontrent principalement des antigènes dans les ganglions lymphatiques et la rate. L'activation des LB naïfs dépend de la fixation d'antigènes et de l'interaction avec les L_{Th} (T_H cell) CD4⁺ ayant la même spécificité antigénique que les LB qui reçoivent des signaux de costimulation. Les LB naïfs qui n'interagissent pas avec les L_{Th} subissent une délétion clonale ou une anergie, ce qui réduit encore la fréquence des LB autoréactifs. (B) Les LB activés pénètrent dans les centres germinatifs des ganglions lymphatiques et de la rate, subissent une hypermutation somatique (SHM) et un changement d'isotype, et finissent par se différencier en LB mémoire et en plasmocytes à longue durée de vie. Ces processus de maturation dépendent des signaux de costimulation émis par les LT auxiliaires folliculaires (TFH) CD4⁺ ayant la même spécificité antigénique. Une délétion clonale est induite dans les LB qui ne reçoivent pas de signaux de costimulation des LTFH, ce qui entraîne l'élimination des LB autoréactifs du pool de LB.

(Bonasia et al, 2021)

3.2 Anomalies de l'apoptose au cours du lupus

L'apoptose est un mécanisme physiologique de mort cellulaire programmée, décrite pour la première fois par Kerr et son équipe (Kerr et al., 1972) se déroulant durant le développement et le vieillissement, permettant la conservation de l'homéostasie tissulaire en renouvelant les cellules. L'apoptose peut également être activée en tant que mécanisme de défense (cellules infectées par exemple). On distingue classiquement deux voies différentes de l'apoptose, la voie extrinsèque et la voie intrinsèque, qui ne font pas intervenir les mêmes signaux d'activation mais les dernières recherches ont montré que ces deux mécanismes pouvaient être liés au niveau de leurs voies de signalisation (Elmore, 2007).

La voie extrinsèque implique l'interaction de récepteurs transmembranaires dits récepteurs de mort (*death receptors*). Ces récepteurs de mort, tels que le récepteur Fas, font partie de la superfamille des récepteurs au TNF (*tumor necrosis factor*). Dans ce modèle, le ligand de Fas, Fas-L, se lie au récepteur et entraîne la liaison d'une protéine adaptatrice FADD, au niveau cytosolique du récepteur. FADD active la cascade de caspases débutant par l'activation de la caspase 8 qui elle-même active les caspases « effectrices » en les clivant (caspases 6, 7 et 3). À l'opposé, la voie intrinsèque fait intervenir la libération de cytochrome c par les mitochondries (situées dans le cytoplasme) à la suite d'une agression de la cellule (stress oxydant, réactif chimique...). Le cytochrome c permet l'activation de l'apoptosome contenant la pro-caspase 9 et son clivage en caspase 9. Cette caspase 9 va ensuite activer les caspases « effectrices » en les clivant (caspases 6, 7 et 3). La caspase 3 dégrade plus de 500 protéines cytoplasmiques et est l'acteur clé de la mort cellulaire programmée (Elmore, 2007).

Après la dégradation de la cellule orchestrée par la caspase 3, les constituants cellulaires doivent être éliminés. Le processus de clairance des cellules mortes, appelé efferocytose, se déroule normalement selon un mécanisme actif dans le corps humain tout au long de la vie. Grâce à des signaux libérés par les cellules mortes, les cellules professionnelles (macrophages et cellules dendritiques) et non professionnelles (cellules épithéliales et fibroblastes) participent activement à l'identification des corps apoptotiques et à leur englobement pour les dégrader. Le processus d'efferocytose peut être divisé en quatre étapes (**Figure 7**) : (1) l'émission du signal "trouve-moi" (« *find me* ») par les cellules mortes pour recruter des phagocytes, (2) l'identification par les phagocytes et sa contribution aux signaux "mange-moi" (« *eat me* ») émis par la cellule, (3)

l'internalisation des cellules mortes, et enfin (4) la dégradation des cellules internalisées (Abdolmaleki et al., 2018).

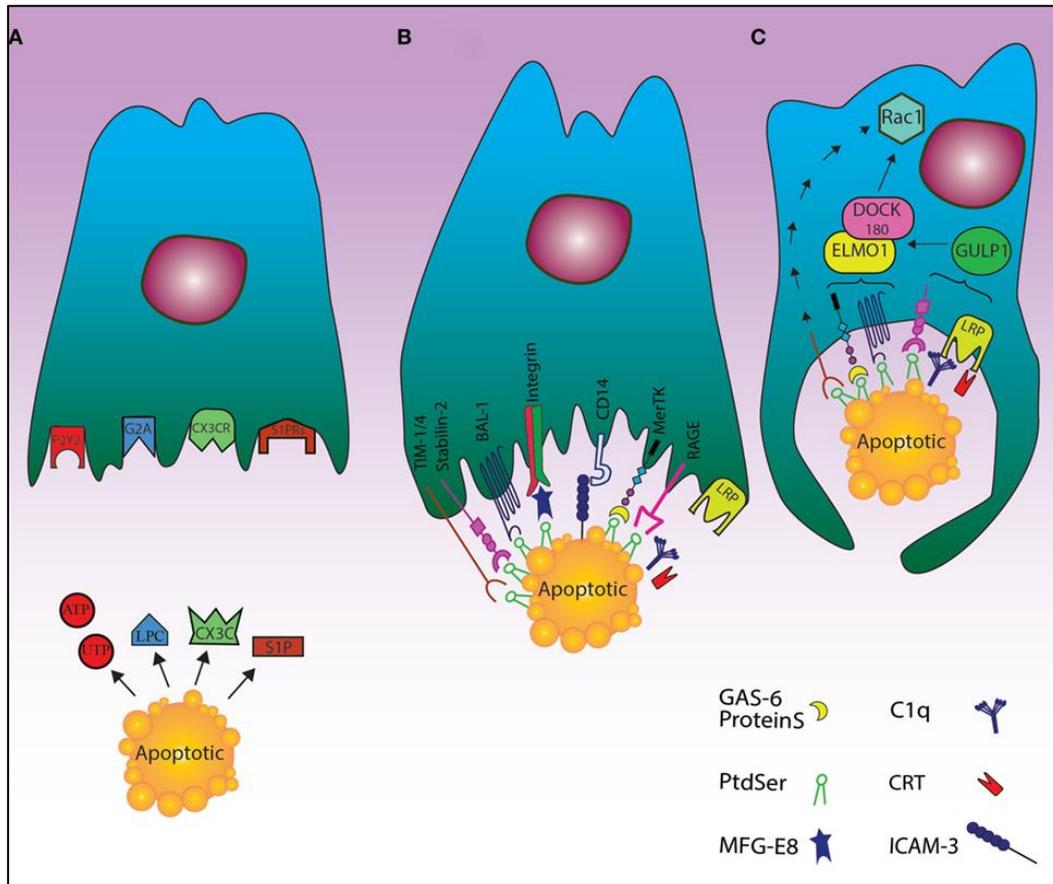


Figure 7. Le processus d'élimination des cellules mortes par les phagocytes grâce à la recherche de cellules apoptotiques, la reconnaissance de leurs signaux et l'internalisation des cellules. (A) Le signal "find me" : les cellules apoptotiques libèrent des signaux tels que l'UTP, l'ATP, la sphingosine-1-phosphate (S1P), et la lysophosphatidylcholine (LPC) ou fractalkine. Les phagocytes peuvent ainsi détecter le signal "find me" pour repérer les cellules apoptotiques à l'aide de récepteurs apparentés, notamment le récepteur de sphingosine-1-phosphate (S1PR), les récepteurs purinergiques (P2Y2), le récepteur couplé aux protéines G (G2A) et CXCR3. (B) Le signal "eat me" : les cellules mourantes exposent des signaux "eat me" à leur surface, de sorte que les phagocytes peuvent reconnaître et englober les cellules apoptotiques en recrutant un complexe de récepteurs et de molécules pontantes. Les principaux signaux comprennent l'expression de la phosphatidylsérine (PtdSer) à la surface de la cellule en apoptose, de l'inhibiteur de l'angiogenèse spécifique du cerveau 1, du récepteur de mucine des LT (TIM1, TIM3, TIM4) et de RAGE, et la stabilisation avec les molécules pontantes spécifiques des PS, ainsi que Gas6, le facteur EGF 8 (MFG-E8) et la protéine S à la surface des phagocytes. La calréticuline (CRT) et l'ICAM3, qui peuvent moduler l'identification et l'englobement des cellules apoptotiques par les récepteurs LRP (via C1q) et CD14 situés sur les phagocytes constituent d'autres signaux "eat me". (C) Le processus d'englobement : après le recrutement des récepteurs d'englobement par l'activité de la voie Rac, la polymérisation de l'actine et le réarrangement du cytosquelette commencent.

(Abdolmaleki et al., 2018)

L'apoptose est utile à plusieurs stades dans la régulation du système immunitaire et son développement. Au niveau du thymus (tolérance centrale) lors du développement des LT (élimination des LT autoréactifs) ou au niveau de la moelle osseuse lors du développement des LB, ou encore en périphérie (régulation de la prolifération lymphocytaire après stimulation du système immunitaire, par exemple après résolution d'une infection). De nombreux travaux ont démontré un rôle majeur des corps apoptotiques dans le développement du lupus. Ils constitueraient les « auto-antigènes » impliqués dans la rupture de tolérance contre les antigènes nucléaires. Un excès d'apoptose et/ou un défaut qualitatif et/ou une anomalie de la clairance (élimination) des corps apoptotiques sont des causes de la pathologie (Nagata and Tanaka, 2017; Yang et al., 2019).

Plusieurs anomalies de l'apoptose ont été décrites au cours du lupus. Les monocytes et les lymphocytes montrent une apoptose accélérée au cours du LES. Cette apoptose augmentée pourrait être la cause de l'accroissement de la quantité de nucléosomes circulants (amas de protéines et d'ADN, constituant principal de la chromatine) retrouvés dans le sérum des patients lupiques (Yang et al., 2019). Les rayonnements UV induisent également une apoptose importante des kératinocytes, or la photosensibilité des lésions est un critère de diagnostic du LES (Tsokos et al., 2016). Les rayonnements UV représentent de plus un facteur environnemental clairement démontré. L'augmentation de l'apoptose entraîne une saturation des mécanismes de clairance physiologique de ces corps apoptotiques circulants. Les antigènes présents dans ces vésicules peuvent également être modifiés par clivage enzymatique (par les caspases), par oxydation par les radicaux libres et les dérivés du NO, ou par phosphorylation par les kinases. Ces modifications augmenteraient l'immunogénicité de certains antigènes et pourraient expliquer en partie l'apparition d'une rupture de tolérance vis-à-vis de certains auto-antigènes (Lightfoot et al., 2017; Wu et al., 2016).

Par ailleurs, de nombreux travaux ont montré un défaut de l'activité des macrophages chez les patients lupiques, mais également un défaut de maturation de ces cellules ou un défaut d'expression de certains récepteurs permettant la clairance des corps apoptotiques (Nagata and Tanaka, 2017) (**Figure 8**).

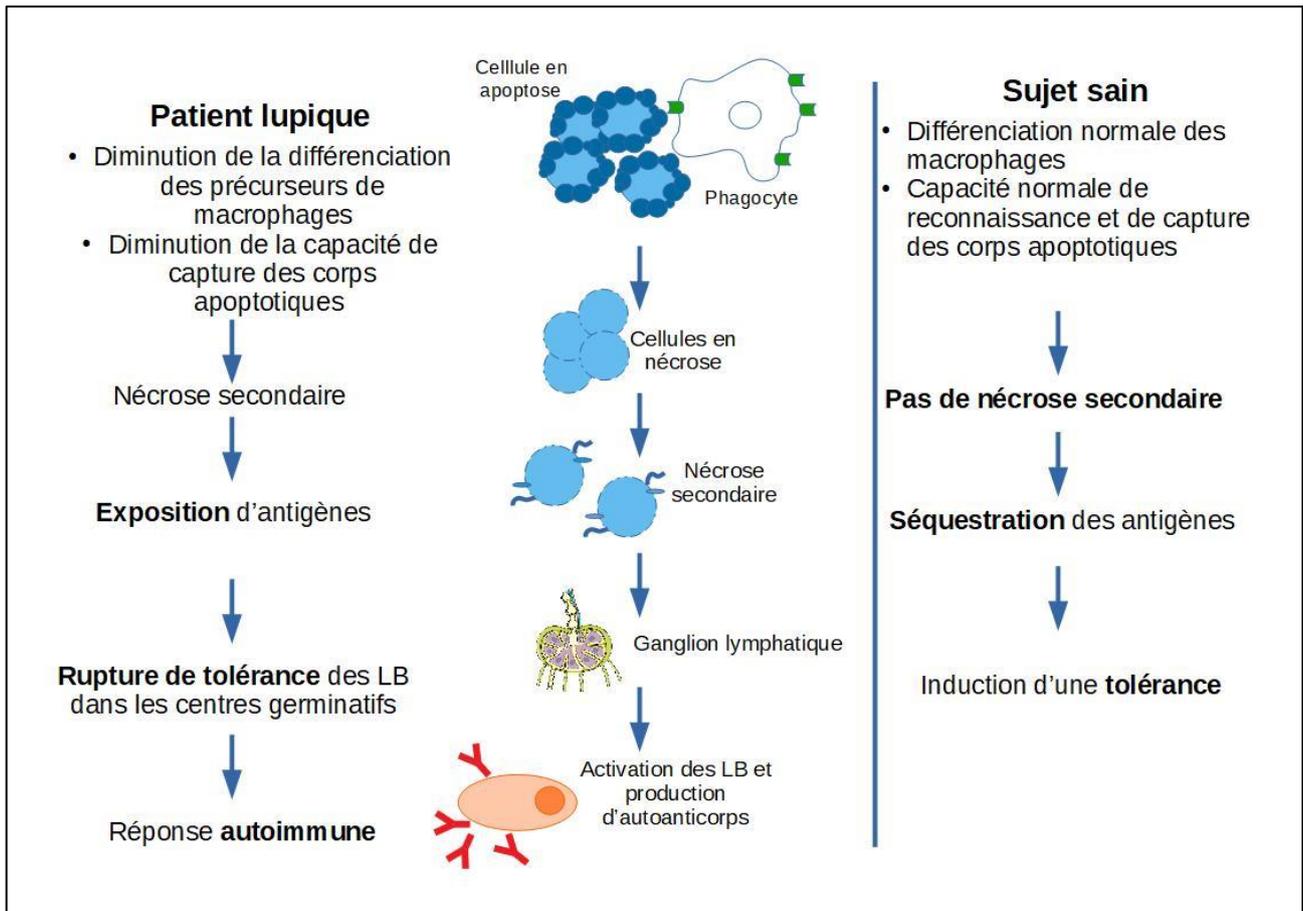


Figure 8. Déficience de clairance des corps apoptotiques dans l'étiologie du LES. Chez le sujet sain, les cellules apoptotiques sont efficacement éliminées par les macrophages et les opsonines, évitant ainsi l'exposition aux auto-antigènes et favorisant la tolérance. Chez les patients atteints de LES, l'altération de la clairance des cellules mortes et mourantes due à des macrophages moins efficaces, à une carence en opsonines et à la présence d'anticorps anti-opsonine, conduit à une exposition aux auto-antigènes par formation de cellules nécrotiques secondaires (SNECs). L'accumulation de SNECs dans les centres germinatifs facilite la présentation d'auto-antigènes par les cellules dendritiques folliculaires aux LB autoréactifs. En conséquence, la tolérance immunologique est compromise et la réponse auto-immune est initiée.

Figure personnelle

L'opsonisation a pour principe de recouvrir un corps à éliminer (cellule ou bactérie) par une molécule (nommée « opsonine ») favorisant ainsi la reconnaissance de ces corps par les cellules (phagocytes) dotées de récepteurs pour ces opsonines. La clairance des cellules apoptotiques ne dépend pas uniquement des phagocytes mais également de ces protéines solubles qui permettent l'opsonisation physiologique : nous pouvons citer la protéine C réactive (CRP), les protéines du complément (C3, C4, C1q), la protéine SAP (*serum amyloid P component*), les IgM, la MBL (*mannose binding lectin*). Les corps apoptotiques vont fixer ces opsonines via des récepteurs spécifiques ou non (C1q-R, CD14, CD68, annexines...). Ces opsonines fixées à la surface des corps apoptotiques pourront

être reconnues par des récepteurs spécifiques présents à la surface des macrophages et des cellules dendritiques immatures (Gordon and Plüddemann, 2018). En cas de déficit fonctionnel ou quantitatif en opsonines, par exemple des défauts génétiques en complément (C1q, MBL...), ou de neutralisation de ces opsonines par des anticorps (anti-C1q, anti-CRP...), il existe un risque d'accumulation de corps apoptotiques susceptibles de se transformer en corps nécrotiques, alors capables d'induire une réaction inflammatoire avec production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF- α et IL-12). S'ensuivra une différenciation des cellules dendritiques en cellules présentatrices d'antigènes qui vont activer les LT auto-réactifs via l'intervention de nombreuses molécules de costimulation, ces LT pouvant alors activer des LB autoréactifs (Abdolmaleki et al., 2018).

Un autre élément peut être à l'origine d'un défaut de clairance des corps apoptotiques : une baisse d'activité de la DNase I circulante (enzyme dégradant l'ADN libéré en excès). Ce type d'anomalie congénitale (mutation du gène codant la DNase I), peu fréquent, a été associé à des formes familiales de lupus. Les sérums de patients pourraient également contenir des anticorps capables de bloquer l'activité de l'enzyme et ainsi augmenter la charge en corps apoptotiques (Mahajan et al., 2016).

3.3 Défaut de clairance des complexes immuns

Lors d'une réponse immunitaire, des complexes immuns circulants se forment de façon transitoire. Ces complexes immuns sont composés d'anticorps fixés à leurs antigènes. Chez un sujet sain, il existe un système de clairance de ces complexes immuns. En revanche, dans certaines maladies, notamment dans le LES, des auto-anticorps se fixant à ces auto-antigènes présents dans les tissus et dans la circulation sanguine sont responsables de la formation de complexes immuns circulants (Mustelin et al., 2019a). Ces complexes immuns peuvent se maintenir plus longtemps, ils peuvent être moins reconnus et éliminés par des systèmes de capture tels que les récepteurs au complément (CR1, *Complement Receptor type 1*) par exemple, entraînant ainsi des répercussions pathologiques. La présence constante d'auto-antigènes, par exemple du fait d'une anomalie de clairance physiologique des corps apoptotiques, peut être responsable de la formation continue de complexes immuns circulants. La corrélation entre le taux de complexes immuns et l'activité de la maladie lupique a depuis longtemps été démontrée (Toong et al., 2011).

La majorité des patients présente des auto-anticorps ciblant des antigènes nucléaires, nommés ANA (pour *anti-nuclear antibody* ou anticorps anti-nucléaires). La détection des ANA est un test courant de diagnostic d'auto-immunité. Ces auto-anticorps peuvent cibler de nombreux composants intracellulaires tels que la chromatine, l'ADN double-brin, les protéines liées aux acides nucléiques (histones), etc.

Ce taux élevé de complexes immuns a pour conséquence l'apparition de lésions tissulaires, notamment de type glomérulonéphrite lupique. Les complexes immuns se déposent au niveau des glomérules, activent le système du complément, déclenchant l'inflammation et causant des lésions tissulaires. Ils vont aussi entraîner l'activation de cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) et d'autres cellules du système immunitaire, via la reconnaissance des immunoglobulines présentes dans ces complexes immuns par des récepteurs spécifiques (récepteurs aux domaines constants des immunoglobulines : récepteurs Fc γ , Fc α ...).

3.4 Rôle des cellules de l'immunité innée dans la physiopathologie du lupus

3.4.1 Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques représentent un élément clé du système immunitaire, à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (**Figure 9**). Les cellules dendritiques analysent continuellement leur environnement, présentent des antigènes aux LT afin de déclencher leur activation et ainsi celle de la réponse humorale, c'est-à-dire la production d'anticorps par les plasmocytes issus des LB. Elles participent aussi aux phénomènes de tolérance périphérique (sécrétion de cytokines inhibitrices de la réaction immunitaire) ou au déclenchement d'une réaction immune en fonction de leur état d'activation (production de cytokines activatrices du système immunitaire) (Worbs et al., 2017).

Il existe des cellules dendritiques immatures résidant dans les tissus qui vont capturer les antigènes mais ont une faible capacité de présentation, et des cellules matures migrant dans les organes lymphoïdes secondaires, caractérisées par une capacité optimale de présenter les antigènes. En effet, dans les organes lymphoïdes secondaires va se dérouler l'activation du système immunitaire adaptatif (LT et LB). Chez l'Homme, plusieurs types de cellules dendritiques sont décrits : les cellules dendritiques conventionnelles (ou myéloïdes), les cellules dendritiques dérivées de monocytes, les

cellules de Langerhans et les pDC (cellules dendritiques plasmacytoïdes) (Hilligan and Ronchese, 2020).

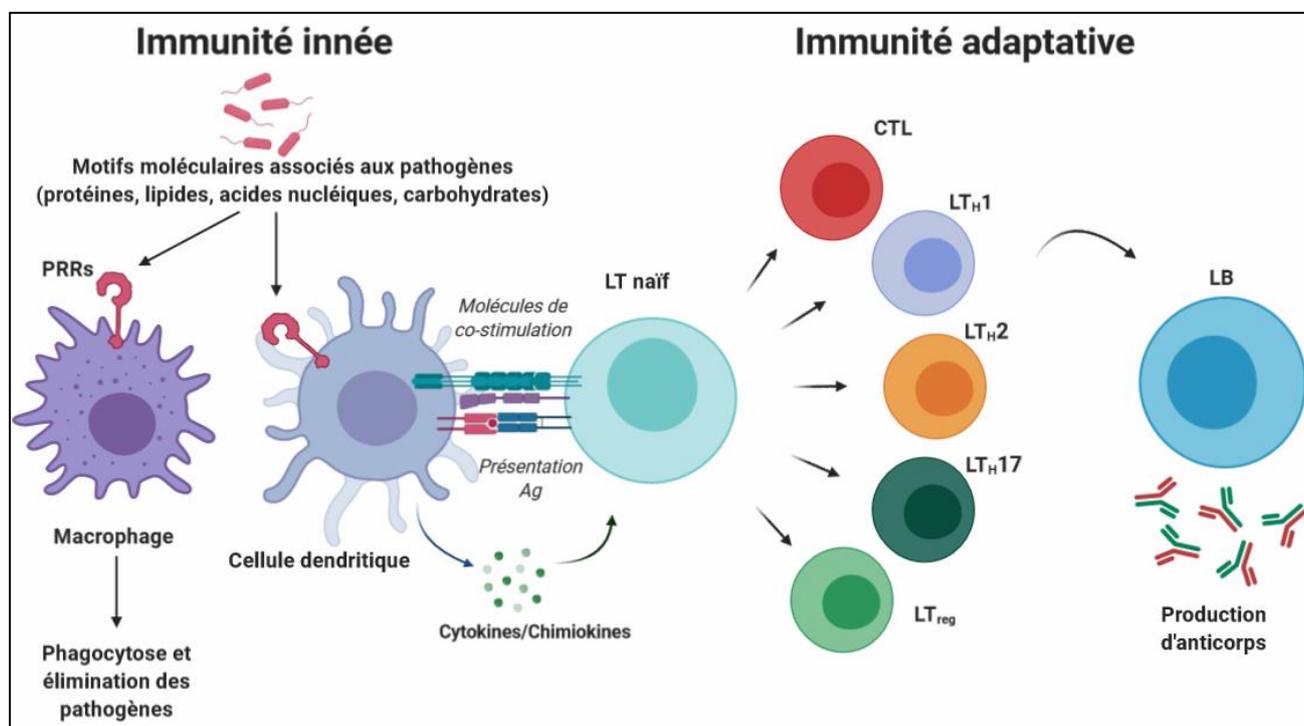


Figure 9. Les cellules dendritiques lient l'immunité innée à l'immunité adaptative. Une fois en contact avec des antigènes microbiens, qu'elles reconnaissent via des récepteurs appelés PRR (Pattern Recognition Receptors), les cellules dendritiques mûrissent et migrent vers les ganglions lymphatiques drainants où ils présentent des antigènes aux lymphocytes T naïfs. Différents pathogènes déclenchent des profils de maturation distincts pour les cellules dendritiques, ce qui conduit à la polarisation de différents sous-ensembles de lymphocytes T (LT). La réponse immunitaire adaptative est donc modulée, dans une certaine mesure, pour correspondre à la nature du pathogène. Ag : antigène ; CTL : lymphocyte T cytotoxique ; LT_H : LT helper (LT auxiliaire) ; LT_{reg} : LT régulateur.

Figure personnelle

Une présentation antigénique prolongée ou défectueuse et une augmentation de la production de cytokines par les cellules dendritiques sont importantes dans la rupture de tolérance et le développement d'une auto-immunité (Moulton et al., 2017). Les cellules dendritiques ont un rôle important dans la clairance des corps apoptotiques (elles peuvent capturer les corps apoptotiques au même titre que les macrophages) et la production de cytokines anti-inflammatoires, essentielles aux mécanismes de tolérance (Kim and Diamond, 2015). Des récepteurs situés à la surface des cellules dendritiques tels que Scarf1, ou des molécules de la cascade du complément, par exemple C1q, ont été impliqués dans la clairance des cellules apoptotiques (Shao and Cohen, 2011). Il a été proposé qu'une carence de ces molécules pourrait déclencher ou favoriser l'auto-immunité, avec, dans certains cas, le développement d'une maladie semblable au lupus (Leffler et al., 2014;

Ramirez-Ortiz et al., 2013). Ceci a été démontré par de nombreuses études chez la souris (Moulton et al., 2017).

Enfin, les pDC sont capables de sécréter de grandes quantités d'interférons (IFN) de type I, des IFN- α notamment, acteurs essentiels du lupus, comme expliqué dans le paragraphe suivant (Worbs et al., 2017). Diverses études ont montré une accumulation de pDC dans la rate de souris développant un lupus ainsi que chez des patients atteints de lupus (Sang et al., 2014). Des infiltrations massives de pDC ont également été observées dans les lésions rénales et cutanées des patients atteints de LES, ce qui suggère qu'elles contribuent aux lésions tissulaires locales (Farkas et al., 2001). Les stratégies ciblant les cellules dendritiques pour limiter leur autoréactivité et promouvoir leurs fonctions tolérogènes sont considérées comme des outils thérapeutiques potentiels mais il reste encore beaucoup de recherches à faire pour mieux comprendre le fondement moléculaire et la contribution précise de ces cellules à la pathogenèse du LES (Moulton et al., 2017).

3.4.2 Les interférons de type I

Les IFNs sont apparus au cours de l'évolution afin de permettre une réponse rapide face aux pathogènes. Ils font partie de la ligne de défense de l'immunité innée, la première à se mettre en place lors d'une infection. Leur rôle a ensuite été étudié dans de nombreux processus biologiques (survie cellulaire, prolifération, différenciation...). Il y a trois types d'IFNs : type I, type II et type III. Chaque type se lie à un récepteur cellulaire spécifique. La voie des IFN de type I inclut, chez l'Homme, treize IFN- α , l'IFN- β et plusieurs produits monogéniques mal définis (IFN ϵ , IFN τ , IFN κ , IFN ω , IFN δ et IFN ζ). Chaque sous-type est produit par des cellules spécifiques en réponse à des stimuli précis (Pestka et al., 2004). La production d'IFN- α et - β est strictement contrôlée mais augmente rapidement lorsque de l'ADN viral ou bactérien est détecté par des PRRs (*pattern recognition receptors*), tels que les TLR (*Toll like receptors*), ou des senseurs cytoplasmiques des acides nucléiques. La voie de signalisation activée dépend ensuite du PRR lié, de la cellule activée et de la localisation de l'acide nucléique détecté. Les TLR impliqués dans la production d'IFN de type I sont présents en majorité dans les cellules immunitaires, ils sont localisés dans les compartiments endosomaux détectant les ARN double brin (TLR3), les ARN simple brin (TLR7/8) et les ADN double brin hypométhylés (TLR9) (Bengtsson and Rönnblom, 2017; Kawai and Akira, 2010).

Le rôle du TLR7 dans la physiopathologie du LES fait l'objet de nombreuses recherches. La gravité de la maladie chez les souris prédisposées au lupus dépend de l'activité du gène *Tlr7* (Pisitkun

et al., 2006; Souyris et al., 2018a; Subramanian et al., 2006). La déficience en TLR7 protège les souris contre le lupus en diminuant la production d'auto-anticorps dirigés contre les ribonucléoprotéines et atténue les maladies rénales associées au lupus. En revanche, la surexpression de Tlr7 induit une auto-immunité systémique, même dans un fond génétique non prédisposé au lupus. La signalisation TLR7 intrinsèque aux LB est essentielle au développement des centres germinatifs et à la production d'auto-anticorps. La détection de l'ARN par TLR7 représente donc un mécanisme central d'activation chronique des LB dans le LES et des travaux ont déterminé que l'inactivation imparfaite du chromosome X, où se situe le gène *Tlr7* expliquerait le sex ratio dans le LES (Guéry, 2019; Souyris et al., 2018b; Youness et al., 2021). Des mutations gain de fonction du gènes *Tlr7* ont également été décrites récemment (Brown et al., 2022).

La voie des IFN de type I est responsable de multiples effets sur les réponses immunitaires, notamment l'activation des monocytes et la différenciation des pDC, l'activation des LT / LB autoréactifs, la stimulation de la production d'auto-anticorps et l'induction de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines. Cette voie est définie comme centrale dans la pathogenèse du LES (Muskardin and Niewold, 2018).

Les monocytes et les pDC sont les cellules sécrétant la majorité de l'IFN- α et - β en réponse aux infections virales et bactériennes. Cette production est régulée par l'interaction entre les pDC et les autres types de cellules immunitaires (**Figure 10**). Les pDC expriment le TLR7 et le TLR9 et ont un niveau basal élevé d'IRF7 (*interferon regulatory factor 7*), trois médiateurs essentiels de la production d'IFN- α . De nombreux récepteurs cytosoliques à l'ADN ont été décrits récemment, par exemple le DAI (*DNA-dependent activator of IFN-regulatory factor 1*) et la cGMP-AMP synthase (*cGAS*), suggérant leur rôle dans la reconnaissance d'ADN de pathogène et notamment d'ADN du soi mal éliminé. Dans l'ensemble, il semble y avoir une redondance des récepteurs immunitaires détectant les acides nucléiques, et il reste à clarifier comment ceux-ci sont impliqués dans la reconnaissance de l'ADN et de l'ARN d'origine endogène et quelles sont les conséquences dans le développement d'une auto-immunité s'ils ne sont pas correctement régulés (Bengtsson and Rönnblom, 2017).

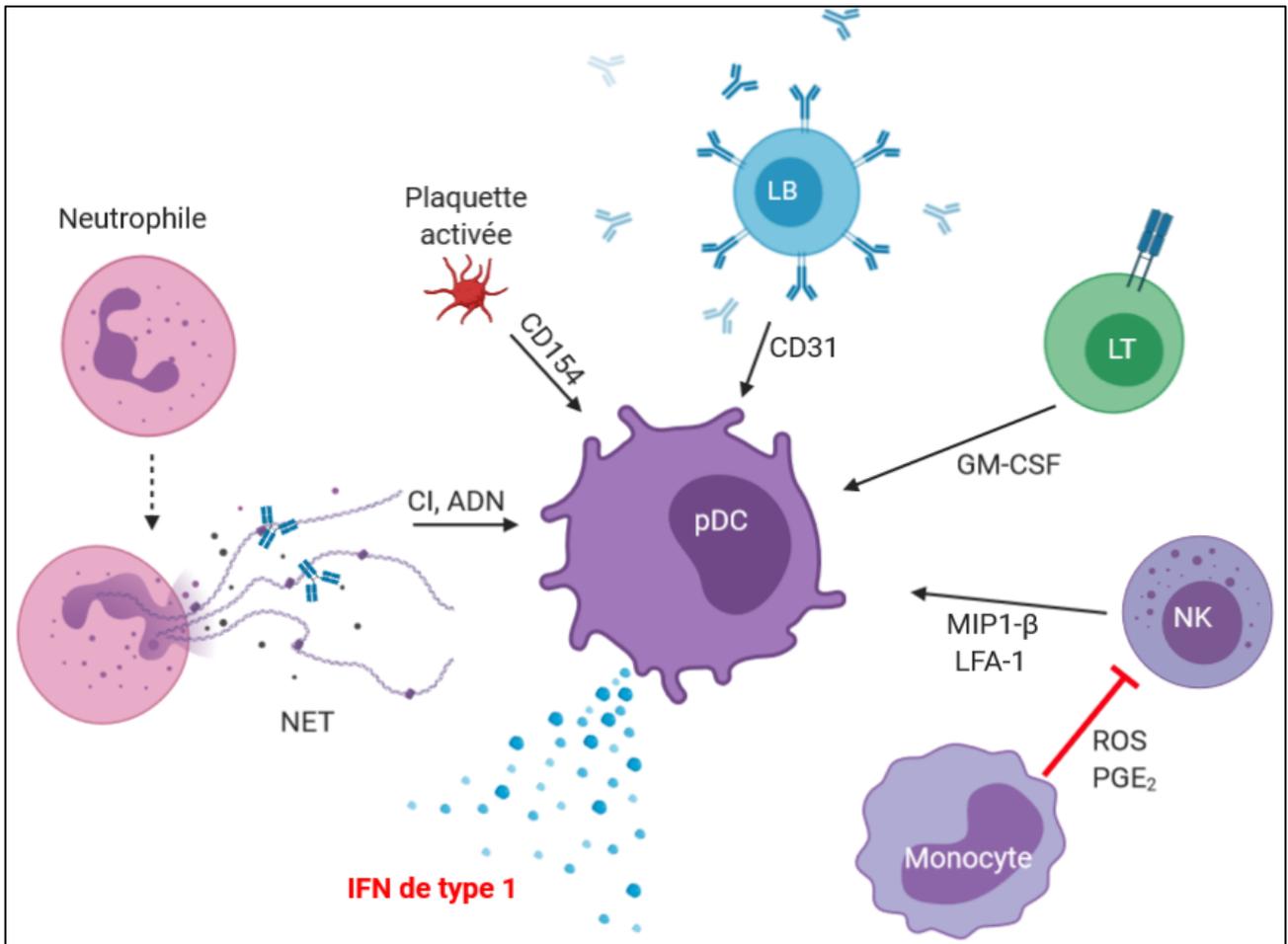


Figure 10. La production d'interférons de type I est régulée par les interactions entre les cellules dendritiques plasmacytoïdes et les autres types de cellules. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) produisent des interférons de type I (IFN) lorsqu'elles sont stimulées par des complexes immuns contenant des acides nucléiques (CI) et des composants des NET (neutrophil extracellular traps) produits par les neutrophiles. De plus, les plaquettes activées exprimant le CD154 peuvent stimuler les pDC à produire des IFN de type I en se liant au CD40 sur les pDC. Les cellules NK augmentent la production d'IFN de type I par les pDC activées grâce à l'antigène associé aux lymphocytes (LFA)-1 et à la sécrétion de MIP1-β. En revanche, les monocytes/macrophages activés suppriment la capacité des pDC à produire des IFN de type I (via une régulation négative des cellules NK) en libérant des espèces réactives oxygénées (ROS) et de la prostaglandine E2 (PGE2). De plus, les LB et les LT activés augmentent la production d'IFN de type I par les pDC stimulées par les CI par des mécanismes impliquant respectivement le CD31 et le GM-CSF soluble.

Figure personnelle

Les patients atteints de LES ont une production continue d'IFN de type I qui donne lieu à la « signature interféron » consistant en une augmentation sensible de l'expression des gènes induits par les IFNs (ISGs pour *interferon-stimulated genes*). Cette signature peut être retrouvée chez 50 à 75 % des patients adultes et jusqu'à 90 % des enfants atteints de LES (Bennett et al., 2003; Iwamoto et al., 2022; Wahadat et al., 2022). Plusieurs études ont trouvé une association entre la signature IFN

et de multiples manifestations cliniques, telles que la néphrite et la maladie du SNC (Crow, 2014). La recherche de cette signature peut être proposée pour suivre la sévérité de la maladie et l'efficacité des traitements (Pescarmona et al., 2019). Le LES touchant le SNC a longtemps été méconnu, mais récemment, des travaux ont montré que la dérégulation du système IFN de type I pourrait être liée aux phénotypes comportementaux et à la perte synaptique dans les modèles de lupus murin. Cette signature est également présente dans d'autres pathologies auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde, sclérodémie systémique...) (Bengtsson and Rönnblom, 2017; Sim et al., 2022).

Les complexes immuns constitués des corps apoptotiques ou de nucléosomes liés aux auto-anticorps sont capables d'induire de grandes quantités d'IFN- α via leur fixation à certains récepteurs capables de reconnaître la fraction Fc des immunoglobulines (Fc γ RIIIa ou CD32a). Ceci va entraîner l'internalisation et l'acheminement des auto-antigènes vers les TLR endosomaux tels que TLR9 et/ou TLR7. Une fois activées, les pDC vont migrer vers les organes cibles. Dans le sang des patients lupiques, il existe ainsi une baisse importante des pDC circulantes, elles sont en effet recrutées vers les lésions cutanées spécifiques du LES mais aussi vers les organes lymphoïdes secondaires, afin d'initier la réponse adaptative et la production d'anticorps (Bengtsson and Rönnblom, 2017).

Les IFN- α sont donc sécrétés en grande quantité par les pDC. Les IFN de type I vont activer les cellules dendritiques conventionnelles capables de phagocyter les corps apoptotiques. Il y aura ensuite présentation de ces antigènes aux LT autoréactifs, à l'origine d'une réponse immunitaire autoréactive. On aboutit ainsi à une production d'auto-anticorps par les LB, différenciés en plasmocytes à longue durée de vie : ces auto-anticorps sont dirigés contre les antigènes nucléaires et permettent la formation de complexes immuns qui vont à leur tour activer les pDC et ainsi réenclencher un cycle de production d'IFN- α (**Figure 11**).

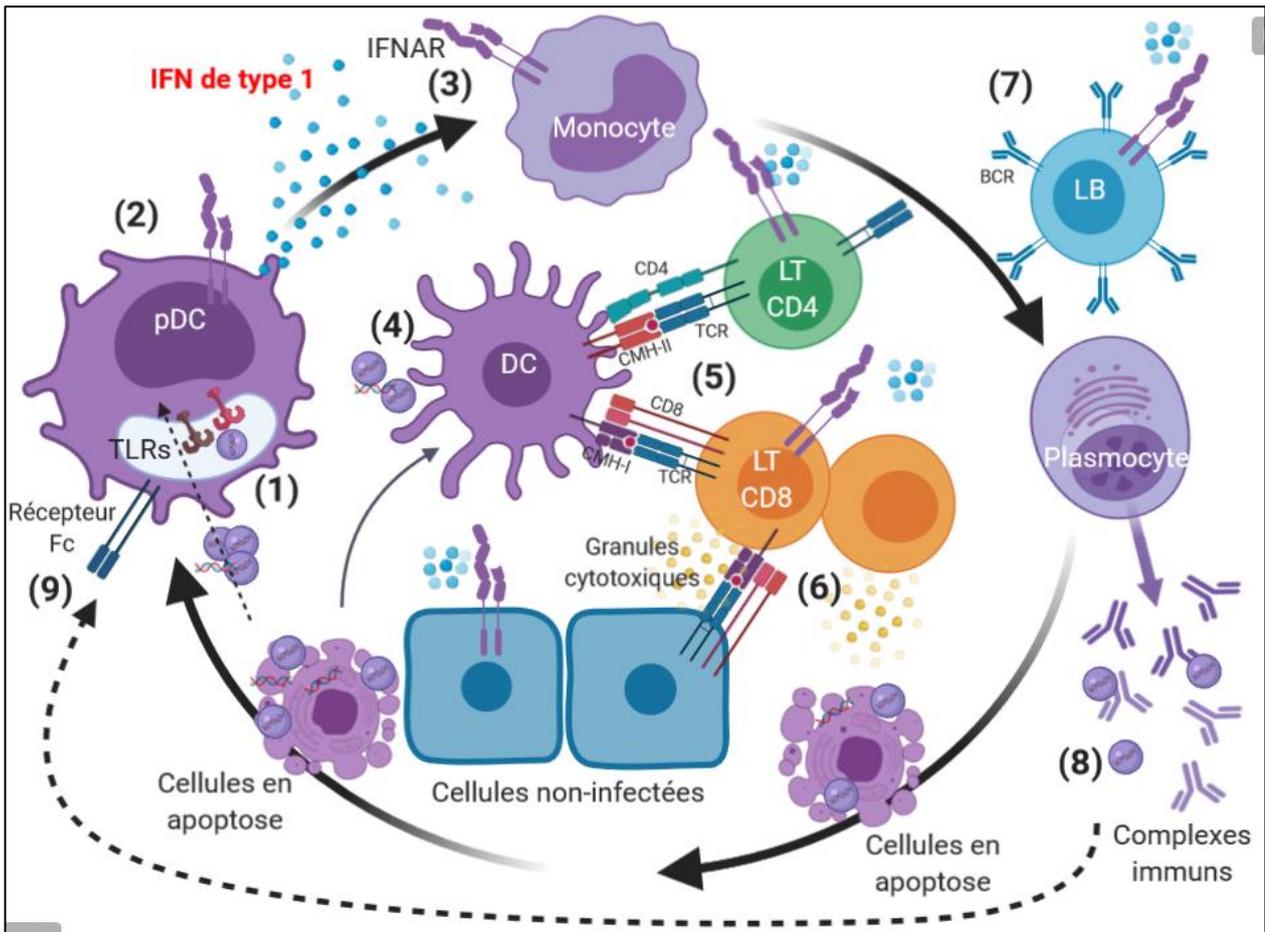


Figure 11. IFN et rupture de tolérance conduisant à une auto-immunité (1) La reconnaissance des acides nucléiques dans les débris apoptotiques par les pDC induit une production rapide de grandes quantités d'IFN de type I. (2) Les IFN de type I induisent à la fois une auto-amplification de la voie TLR dans les pDC et un état d'alerte dans les cellules cibles. (3) Les IFN de type I influencent la différenciation monocytaire et l'activation ultérieure des DC, qui (4) traitent et présentent les antigènes du soi dérivés des cellules apoptotiques. (5) Les lymphocytes T CD4+ et CD8+ autoréactifs sont activés par les DC présentant des auto-antigènes, et la signalisation par le récepteur IFN de type I favorise leur survie et améliore l'activité cytotoxique des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). (6) Les CTL détruisent les cellules hôtes non infectées, qui expriment des niveaux élevés d'auto-antigènes, par la voie des granules cytotoxiques. Les débris de cellules apoptotiques sont internalisés par les DC et présentés pour reconnaissance par les LT dans une boucle d'auto-amplification. (7) Les IFN de type I induisent également la différenciation des LB autoréactifs en plasmocytes, et favorisent la production d'auto-anticorps. (8) Les auto-anticorps peuvent former des complexes immuns avec les molécules des débris cellulaires qui (9) lient les récepteurs Fc et les TLR sur les pDC, amplifiant ainsi la production d'IFN de type I. BCR (récepteur des LB) ; CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) ; CTL (lymphocyte T cytotoxique) ; DC (cellule dendritique) ; IFN (interféron) ; IFNAR (récepteur de l'interféron- α) ; pDC (cellule dendritique plasmacytoïde) ; TCR (récepteur des LT) ; TLR (récepteur de la famille Toll).

(Adaptée de Felten et al, 2018)

3.4.3 Les polynucléaires neutrophiles

Des propriétés fonctionnelles modifiées des neutrophiles ont été observées dans le LES, y compris une diminution de l'activité phagocytaire et lysosomale, une surexpression des molécules d'adhésion comme la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) et la molécule d'adhésion vasculaire-1 (VCAM-1) permettant une agrégation cellulaire accrue, et une activation intravasculaire *in vivo*. De plus, la présence de neutrophiles infiltrant les tissus est une caractéristique de l'atteinte rénale du lupus (Georgakis et al., 2021).

Un mécanisme spécifique de mort des neutrophiles a été récemment démontré, consistant en une extrusion de pièges extracellulaires appelés NETs (*neutrophil extracellular traps*), un réseau de fibres chromatiniques composées principalement d'ADN. Le rôle de ces NETs est principalement de piéger les pathogènes extracellulaires afin de faciliter leur élimination, mais la présence d'acides nucléiques entraîne également la production de cytokines inflammatoires par les autres cellules en contact. Des études ont lié la formation de NETs à la source de l'auto-antigène ADNdb (double brin) dans le lupus. Des expériences réalisées sur des modèles murins de lupus ont montré un impact de la production de NETs sur l'évolution de la maladie. Chez les patients, des défauts d'élimination de ces NETs (Leffler et al., 2015), une accumulation de neutrophiles dans les tissus lésés et la présence d'auto-anticorps visant les composants des NETs suggèrent un rôle important des NETs dans le développement de la pathologie. Les NETs représentent de nouvelles cibles potentielles de traitements. Des inhibiteurs de la formation de NETs sont envisagés ainsi que des traitements ciblant directement les neutrophiles (Lee et al., 2017; Sule et al., 2021; Wang et al., 2022).

3.4.4 Les monocytes/macrophages

Les monocytes et les macrophages sont tous deux de puissants phagocytes nécessaires à l'élimination des débris apoptotiques. Les défauts de ce processus conduisent à la rupture de la tolérance en fournissant des auto-antigènes. À l'appui de ce concept, une réduction du nombre ou de la fonction (altération de l'absorption des cellules apoptotiques) des macrophages, concomitante à une accumulation de cellules apoptotiques près des centres germinatifs, a été signalée chez des patients atteints de LES, ainsi que dans des modèles murins de lupus (Cuda et al., 2016). De plus, l'examen splénique de plusieurs modèles de souris lupiques et de patients atteints de LES a révélé une perte progressive de la fonction phagocytaire et de la survie d'une population cellulaire distincte de macrophages de la zone marginale de la rate (MZM) possédant une capacité forte à éliminer les

cellules apoptotiques et à induire des signaux tolérogènes, notamment la production de TGF- β et d'IL-10. Ces résultats suggèrent un potentiel thérapeutique pour des agents restaurant ces macrophages spécifiques (Moulton et al., 2017).

3.5 Rôle des cellules de l'immunité adaptative dans la physiopathologie du lupus

3.5.1 Anomalies des LT

De multiples sous-populations de LT (CD4+, CD8+, double négatif) provenant de patients lupiques sont activées de façon aberrante dans le lupus. Ces LT déclenchent des réponses inflammatoires, activent les LB, et sont incapables de produire suffisamment de cytokines telles que l'IL-2, essentielles à la régulation du système immunitaire. Tels que décrits ci-dessous, les défauts biochimiques et moléculaires de régulation des gènes des LT peuvent mener à ce phénotype anormal dans le LES (Tenbrock and Rauen, 2022).

Les LT CD8 se différencient en LT cytotoxiques qui contrôlent les infections, les cellules tumorales et les cellules autoréactives en étant capables de lyser ces cellules en relarguant des protéines cytotoxiques telles que des perforines ou des granzymes. Les LT CD8 des patients lupiques ont une fonction cytotoxique atténuée qui peut entraîner un risque accru d'infection (Fors Nieves and Izmirly, 2016; Gravano and Hoyer, 2013). Des études récentes ont montré des réponses CD8 défectueuses aux antigènes viraux chez les patients lupiques. Il est connu que les infections peuvent jouer le rôle de déclencheur d'une rupture de tolérance (activation des pDC, prolifération des LT et LB, production d'IFN de type I...). L'étude du rôle des LT CD8 dans la physiopathologie du lupus est en plein essor actuellement (Maria and Davidson, 2018).

Les LT CD4 auxiliaires (LTh) contribuent de façon importante à la production d'anticorps et à l'inflammation des tissus, et sont couramment liés au développement du LES et des atteintes rénales (Tenbrock and Rauen, 2022). Les LT de patients lupiques présentent plusieurs altérations. Notamment, le complexe TCR est modifié à la surface des LT de patients, la chaîne commune Fc γ R remplaçant la chaîne classique CD3 ζ . Ceci entraîne une activation des voies de signalisation précoces et une modification de la signalisation en aval du TCR. (Tenbrock et al., 2007). Par exemple, la production augmentée ou diminuée de différentes cytokines (IL-2, IL-17 et IL-21 dans les LTh par exemple), l'activation de certaines voies de signalisation (notamment Syk, recrutée par la chaîne Fc γ R

à la place de ZAP70 en aval du TCR) conduisent à une activation accrue du TCR et au contournement des mécanismes de tolérance périphérique (Tenbrock and Rauen, 2022). Les LT des patients lupiques présentent également une hyperpolarisation des mitochondries, un épuisement du principal antioxydant intracellulaire, le glutathion, et une réduction de la synthèse d'ATP, ce qui entraîne une diminution de la mort cellulaire induite par l'activation du TCR (Perl, 2016). De plus, une accumulation de LT effecteurs/mémoires a été décrite chez ces patients, qui résulterait de l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR, conférant à ces cellules une résistance à la mort cellulaire (Katsuyama et al., 2018).

En plus de l'accumulation des LT effecteurs/mémoires, il y a un biais vers la production des LT auxiliaires Th17 avec une régulation à la baisse des cytokines inhibitrices produites par les LTh1 et les LT régulateurs (LTreg, exposés plus loin), à savoir l'IFN- γ et le TGF- β respectivement, et la régulation à la hausse des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-17 (Rother and van der Vlag, 2015; Talaat et al., 2015). L'augmentation des LTh17 et de la cytokine IL-17 produite par ces cellules est liée au lupus et en particulier à la néphrite lupique (**Figure 12**). En effet, l'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire puissante, dont les taux sont en corrélation avec le développement d'une néphrite de type lupique dans plusieurs modèles de souris. De plus, la proportion de LTh17 et la quantité d'IL-17 sont augmentées dans le sang des patients lupiques, en particulier chez les patients atteints d'insuffisance rénale (Suárez-Fueyo et al., 2016).

Les LT doubles négatifs (DN), qui n'expriment ni le CD4, ni le CD8, peuvent se différencier à partir de LT CD8 autoréactifs ou stimulés en continu, par exemple lors d'infections chroniques. Dans des conditions normales, un rôle immunosuppresseur a été attribué à ces cellules, tant chez la souris que chez l'Homme. Cependant, chez les patients atteints de LES, ces cellules sont liées aux atteintes rénales, où elles s'accumulent et produisent la cytokine proinflammatoire IL-17 (Katsuyama et al., 2018).

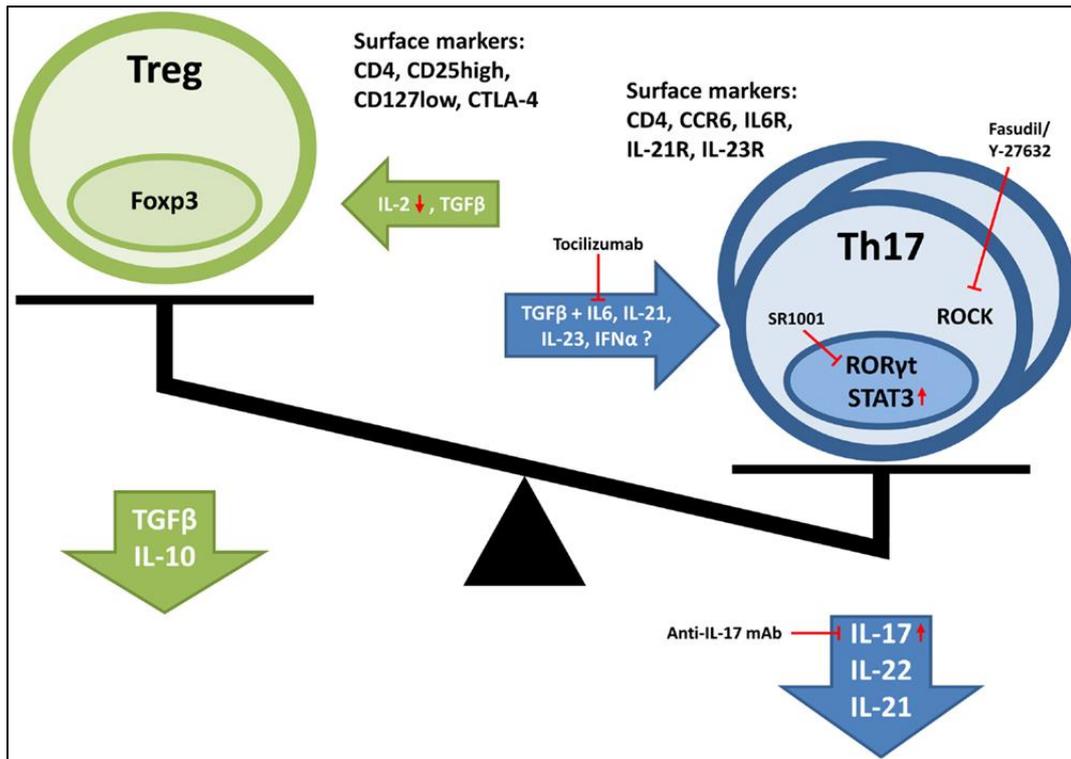


Figure 12. Trouble de l'équilibre entre les LTregs et LTh17 dans le LES. Des cytokines importantes dans l'induction et la prolifération des types cellulaires respectifs sont représentées. En outre, les marqueurs de surface caractéristiques, les facteurs de transcription et les cytokines produites sont également illustrés. Les flèches indiquent les changements d'expression observés chez les patients atteints de lupus. Les possibilités de traitement sont représentées en rouge.

(Rother, 2015)

Le LES est caractérisé par la production d'auto-anticorps de haute affinité contre les antigènes nucléaires, dont l'anti-ADNdb qui a été le plus corrélé avec l'activité de la maladie. L'isotype IgG et la présence de mutations somatiques dans les régions variables de ces auto-anticorps indiquent que les LB sont activés de manière dépendante des LT. L'activation des LB dépend de l'interaction avec les LT folliculaires (Tfh), un sous-type de LT CD4, positifs pour l'expression de CXCR5, PD-1, ICOS et CD40L et agissant dans les follicules lymphoïdes des organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques...), dans les centres germinatifs, où se passe la différenciation des LB en plasmocytes, sécréteurs d'anticorps, et en LB mémoires. De plus, ces cellules expriment des niveaux élevés d'IL-21 et d'IL-10 qui stimulent les LB à se différencier en LB mémoires et en plasmablastes, sécréteurs d'auto-anticorps (Suárez-Fueyo et al., 2016).

Plusieurs études ont montré une augmentation significative des LT avec un phénotype folliculaire dans le sang périphérique de patients atteints de LES (Choi et al., 2017). Ces cellules sont caractérisées par l'expression de CXCR5. Ces cellules expriment également ICOS, PD-1, CD57, BTLA, et produisent IL-21, confirmant la nature Tfh-like de ces cellules. Le nombre de ces cellules est en corrélation avec les titres d'auto-anticorps, en particulier les anticorps anti-ADN et les plasmocytes dans le sang périphérique des patients atteints de lupus (Suárez-Fueyo et al., 2016).

Les lymphocytes régulateurs (LTreg) comprennent plusieurs sous-ensembles de LT jouant un rôle essentiel dans le contrôle du système immunitaire. Bien qu'il soit bien accepté qu'il y ait une dérégulation dans le contrôle de la réponse immunitaire par les LTreg chez les patients lupiques, l'étiologie demeure méconnue. Il est admis que la quantité de LTreg diminue dans les modèles murins de lupus et dans le sang périphérique des patients lupiques. Leurs fonctions sont altérées, ils produisent moins de signaux inhibiteurs tels que l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire limitant l'expression du CMH-II, réduisant l'activation de mTOR dans les APCs (Tenbrock and Rauen, 2022). De plus, les cellules cibles des LTreg (LB et LT activés) semblent moins réceptives aux signaux inhibiteurs produits. Il est intéressant de noter que les études portant sur le nombre de LTreg dans le sang périphérique des patients atteints de lupus, ainsi que sur leur fonction, peuvent parfois être contradictoires. Certaines études observent une augmentation des populations LTreg, d'autres une diminution. Les LTreg humains sont encore une population mal caractérisée et dont l'étude est en pleine expansion (Mizui and Tsokos, 2018; Ohl and Tenbrock, 2015).

Des essais cliniques effectués chez les patients atteints de lupus ont montré que de faibles doses d'IL-2 réduisaient l'activité de la maladie, en favorisant l'expansion des LTreg et la diminution des concentrations d'auto-anticorps anti-ADNdb (He et al., 2016; Humrich et al., 2015). Le traitement des LT de patients par la rapamycine *in vitro* (un immunosuppresseur bloquant la voie mTOR, présente notamment au niveau de la signalisation du récepteur de l'IL-2, activatrice des LT) entraîne l'expansion des LTreg avec une activité suppressive soutenue, et un essai clinique utilisant la N-acétylcystéine, un autre inhibiteur de mTOR, a également montré une réponse à l'IL-2 réduite et des populations accrues de LTreg, faisant de ces cellules des cibles thérapeutiques potentiellement importantes (Ballesteros-Tato and Papillion, 2019).

3.5.2 Anomalies des LB

Les patients atteints de lupus et les modèles murins de lupus présentent de multiples anomalies des LB, généralement une lymphopénie associée à une hyperactivation des LB, avec une production accrue d'immunoglobulines ; la modulation de la fonction des LB a donc toujours été considérée comme une approche thérapeutique intéressante pour traiter le LES (Ma et al., 2019).

De plus, les patients atteints de LES actif présentent de nombreuses anomalies de populations de LB tels qu'une lymphopénie profonde des LB naïfs ($CD19^+CD27^-$), une augmentation des LB transitionnels ($CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$), des LB mémoires switchés ($CD19^+CD27^+IgD^-$), des LB doubles négatifs ($CD19^+CD27^-IgD^-$) et des plasmocytes ($CD27^{high}CD38^+CD19^{low}CD20^+CD138^+$). Ces augmentations sont corrélées à l'activité et à la progression de la maladie (Crispín et al., 2010). De plus, la fraction des LB humains sécrétant de l'IL-10 (cytokine inhibitrice) et appelés LB régulateurs ($CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$: LBreg) est diminuée chez les patients atteints de LES (Blair et al., 2010). Leurs fonctions immunosuppressives seraient également altérées chez les patients lupiques, notamment leur capacité d'inhiber l'expression de l'IFN- γ et du TNF- α par les LT $CD4^+$ (Zhu et al., 2021). Chez les patients atteints de lupus, les LB autoréactifs anti-ADN sont également plus susceptibles de se développer, de participer aux réactions du centre germinatif et de subir une différenciation en plasmocytes sécréteurs d'auto-anticorps (**Figure 13**) (Ma et al., 2019).

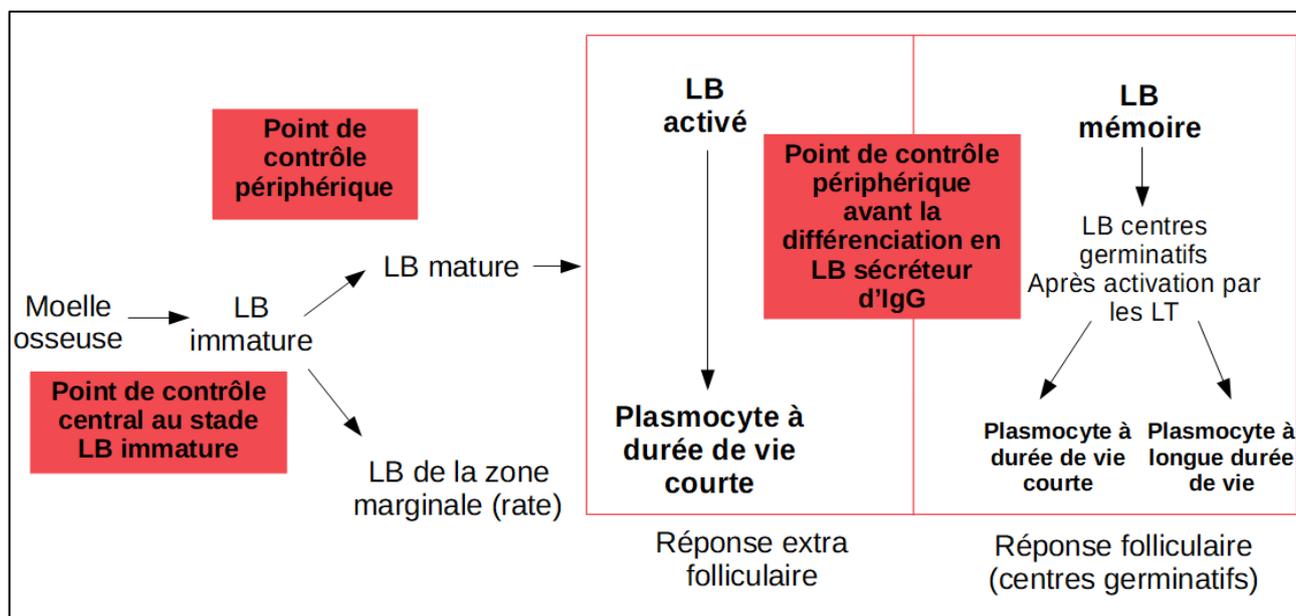


Figure 13. Schéma de développement des LB et les différents points de contrôle (encadrés rouges) contre l'auto-réactivité (mécanismes de tolérance), dont un défaut peut déclencher une auto-immunité.

Figure personnelle

Des données récentes sur certaines fonctions des LB dans le LES, comme la production de cytokines et de chimiokines, et sur la signalisation du BCR (récepteur à l'antigène des lymphocytes B), ont révélé de nouvelles perspectives. Plusieurs gènes de susceptibilité dans la signalisation en aval du BCR ont été associés au lupus, tels que *PTPN22*, codant pour une phosphatase médiant la transduction du signal du BCR, et également *PXK* qui code pour une protéine impliquée dans la régulation de la transmission synaptique. Le knockdown de *PXK* entraîne une réduction de l'internalisation du BCR, ce qui implique une relation directe de *PXK* avec le trafic du BCR (Vaughn et al., 2015). *CSK* est une protéine kinase interagissant avec *PTPN22* pour réguler le signal en aval du BCR. Un allèle à risque associé au LES dans le gène codant la protéine *CSK* est lié à une expression plus élevée de la protéine *CSK*, à une phosphorylation accrue de *LYN* en aval, à une activation accrue des LB matures médiée par le BCR et à une expansion des LB transitionnels, caractéristiques du lupus (Deng and Tsao, 2014; Manjarrez-Orduño et al., 2012). Le BCR est un régulateur crucial de la sélection négative et positive et une activation continue du BCR est essentielle à la survie des LB. Ainsi, une phosphorylation prononcée de *SYK* et de *BTK*, voies de signalisation du BCR et des TLR notamment, a été observée dans les LB de patients présentant un LES actif comparativement aux LB d'individus sains, contribuant potentiellement à leur état hyperactif (Iwata and Tanaka, 2016).

D'autres travaux ont porté sur les voies de signalisation du BCR, des TLR et de JAK/STAT dans les LB dans la pathogenèse du lupus, et pourraient mener à des cibles thérapeutiques potentielles. Enfin, les cytokines, telles que BAFF et/ou les IFN de type I, sont capables de moduler les réponses lymphocytaires. Par exemple, Blys est crucial pour la survie des LB et favorise la phosphorylation directe des molécules de signalisation du BCR telles que Syk, via le BAFF-R, alors que les IFN de type I augmentent la sensibilité du BCR aux antigènes. Ainsi, les deux cytokines pourraient aussi avoir la capacité de déréguler la signalisation du BCR dans le développement d'une auto-immunité (Rose and Dörner, 2017).

4 Étiologie génétique du LES

4.1 Introduction

L'importance du terrain génétique et de l'hérédité dans le LES est aujourd'hui bien définie. De nombreuses études ont mis en évidence l'importance de l'origine ethnique au niveau génétique et immunologique dans le LES (Ko et al., 2012; Lewis and Jawad, 2017).

La prédisposition génétique a également été démontrée par le taux de concordance du LES entre des jumeaux homozygotes, qui est de 20 à 40 %, avec un risque environ 10 fois supérieur de développer un lupus pour un jumeau homozygote de patient lupique que pour deux jumeaux hétérozygotes (Grennan et al., 1997). De plus, des études effectuées dans des familles de patients lupiques ont montré une augmentation majeure du risque de développement d'un lupus chez les frères et sœurs d'un patient lupique par rapport à la population générale (Alarcón-Segovia et al., 2005), et ceci a été confirmé par une étude de cohorte réalisée au Danemark entre 1977 et 2013 (Ulf-Møller et al., 2017). On peut estimer que ce risque est 20 fois plus élevé au premier degré de parenté entre le patient et son entourage (Harley et al., 2006).

Des formes monogéniques du LES existent mais elles sont rares (Omarjee et al., 2019). Le LES est dans la majeure partie des cas une maladie multigénique, comme la plupart des MAI. L'étude de modèles murins développant spontanément un LES (tels que le modèle NZB/W F1), ainsi que des études d'association pangénomique chez l'Homme (GWAS : *Genome-Wide Association Studies*) ont permis d'identifier plus de 100 loci génétiques (**Figure 14**) associés au LES (gènes impliqués dans l'immunité innée, dans le développement ou la fonction des LB et LT, ou encore dans la cascade du complément) (Ortiz-Fernández et al., 2022; Saeed, 2017). Il reste encore à déterminer et à comprendre complètement l'impact réel des différents variants alléliques identifiés sur la ou les fonctions des protéines codées.

Le but des études cherchant à identifier les facteurs génétiques du LES est de mieux expliquer l'hétérogénéité du lupus, et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques personnalisées. Notre propos se concentrera ici sur une illustration des acteurs de la physiopathologie décrits précédemment à l'aide de variants géniques démontrés dans la littérature.

	APOPTOSIS		CYTOKINES		INTERFERON		TRANSCRIPTION			
Innate Immunity	<i>AFF1</i>	22291604	<i>IL10</i>	19838195	<i>IFIH1</i>	22046141	<i>HAND1</i>	23740238	<i>MYO18B</i>	23740238
	<i>ATG5</i>	21622776	<i>IL21</i>	21425124	<i>IRF3</i>	25130328	<i>HIPK1</i>	23740238	<i>RASGRP3</i>	23249952
	<i>ATG7</i>	21622776	<i>IL8</i>	21179067	<i>IRF5</i>	24697319	<i>IKBKE</i>	21179067	<i>SOS1</i>	23740238
	<i>PDCD1</i>	19220647	<i>SPP1</i>	15692970	<i>IRF7</i>	21360504	<i>IRAK1</i>	19329491	<i>STAT4</i>	24697319
	<i>REL</i>	21905002	<i>IL12A</i>	26502338	<i>IRF8</i>	22046141	<i>JAZF1</i>	23740937	<i>TRAF6</i>	22231568
	<i>TREX1</i>	17660818	<i>SOCS1</i>	26502338	<i>PRDM1</i>	19838195	<i>MECP2</i>	22904263	<i>TNIP1</i>	23249952
	<i>RAD51B</i>	26502338			<i>TYK2</i>	22046141	<i>MIR146a</i>	21738483	<i>TCF7</i>	26502338
	B-CELL SIGNALING		T-CELL SIGNALING		ANTIGEN PRESENTATION		OTHERS			
Adaptive Immunity	<i>BANK1</i>	21408207	<i>CD44</i>	21194677	<i>ERBB3</i>	20962850				
	<i>BLK</i>	21480188	<i>CTLA4</i>	20962850	<i>ICA1</i>	20962850				
	<i>CD40</i>	21914625	<i>PTPN22</i>	21078766						
	<i>CSK</i>	23042117	<i>TNFAIP3</i>	21905002	CELL SIGNALING		MEMBRANE PROTEIN		UBIQUITINATION	
	<i>LYN</i>	19369946	<i>TNFSF4</i>	21905002	<i>SPRED2</i>	26502338	<i>C3orf21 [XXYLT1]</i>	23740238	<i>SMURF1</i>	23740238
	<i>PRKCB</i>	21134959	<i>TRAF1</i>	21905002	<i>NADSYN1</i>	26502338	<i>CADPS</i>	23740238	<i>UBE2L3</i>	20962850
	<i>IKZF1</i>	23249952	<i>ELF1</i>	21044949	<i>SH2B3</i>	26502338	<i>SCUBE1</i>	22039224	<i>SKP1</i>	26502338
<i>IKZF2</i>	26502338	<i>ETS1</i>	23249952	<i>CIITA</i>	26502338	<i>DHCR7</i>	26502338			
<i>IKZF3</i>	22464253			<i>SLCSA11</i>	24925725	<i>PLD2</i>	26502338			
	PHAGOCYTOSIS		COMPLEMENT		CELL ADHESION		UNKNOWN			
Immune Complexes	<i>CRP</i>	24574329	<i>CFB</i>	21792837	<i>TBL1XR1</i>	23740238	<i>CXORF21</i>	26502338	<i>TMEM39A</i>	22464253
	<i>FCGR2A</i>	15895258	<i>CR2</i>	25180293	<i>PECAM-1</i>	25201689	<i>FAM78B</i>	23740238	<i>TNPO3</i>	25205108
	<i>FCGR2B</i>	16227149	<i>CR5</i>	25167769	<i>ARHGAP26</i>	23740238	<i>KIAA0319L</i>	23740937	<i>TRAJ50</i>	23740238
	<i>FCGR3A</i>	17596285	<i>CSMD1</i>	23740238	<i>DIAPH3</i>	23740238	<i>KIAA1542</i>	21792837	<i>UHRF1BP1</i>	19838195
	<i>FCGR3B</i>	22551723	<i>MBL2</i>	21792837	<i>PDGFRA</i>	24925725	<i>LRRC18</i>	23249952	<i>WDFY4</i>	20169177
	<i>ITGAM</i>	18204098			<i>HAS2</i>	24925725	<i>PEXSL</i>	23740238	<i>XKR6</i>	20962850
	<i>ITGAX</i>	18204098					<i>PXK</i>	18204446	<i>ZBTB20</i>	23740238
<i>NCF2</i>	22046141					<i>SLC15A4</i>	23249952	<i>ZPBP2</i>	22464253	

Figure 14. Gènes ayant été associés au LES, par GWAS ou études d'association. Les gènes sont regroupés selon leur fonction dans une voie biologique particulière. Les nombres indiquent l'identité PMID pour référencer les études.

(Saeed, 2017)

Les familles multiplex et les formes monogéniques sporadiques sont de très bons modèles d'études car ils permettent de découvrir des gènes ayant un pouvoir de susceptibilité très fort. Ces modèles peuvent donc potentiellement être transposés aux formes multigéniques avec des variants moins sévères, et ainsi communiquer des informations importantes sur les voies biologiques impliquées dans la physiopathologie du lupus. Ces informations pourront ensuite être appliquées aux formes polygéniques. Les lupus héréditaires monogéniques sont relativement rares mais leur étude a permis une meilleure compréhension de la pathogénicité de la maladie (Costa-Reis and Sullivan,

2017). Par exemple le syndrome d'Aicardi-Goutieres est une pathologie se développant en période néonatale, caractérisée par une inflammation systémique avec une encéphalopathie, une atrophie cérébrale avec calcifications des ganglions de la base du cerveau et détérioration neuronale progressive. Il y a un très fort risque de handicap physique et intellectuel sévère (Crow and Manel, 2015). Plusieurs mutations de transmission récessive ou dominante dans les gènes *TREX1*, *RNASEH2A*, *RNASEH2B* et *RNASEH2C* mais aussi *AMHD1*, *ADAR* et *IFIH1*, sont impliquées dans cette pathologie (Crow et al., 2015). Elle a des caractéristiques cliniques et sérologiques communes avec le LES, comme la présence de lésions cutanées inflammatoires, d'arthrite, de cytopénies et la production d'auto-anticorps antinucléaires. En ce sens, elle est considérée comme un « prototype de syndrome lupique monogénique » (Picard and Belot, 2018; Saeed, 2017). L'étude de la génétique de ce syndrome a permis de déterminer plusieurs gènes potentiellement impliqués dans le développement de lupus polygénique. D'autres formes monogéniques existent tels que les déficiences génétiques des composants précoces de la voie classique C1q/r/s qui prédisposent fortement au LES, avec une pénétrance pouvant atteindre 90 % (Macedo and Isaac, 2016). Des défauts génétiques dans le gène *DNASE1L3*, codant pour une enzyme importante dans la dégradation des corps apoptotiques, constituent également des formes monogéniques de lupus (Al-Mayouf et al., 2011; Tusseau et al., 2022). Un défaut génétique de la protéine kinase PKC- δ (codée par le gène *PRKCD*), une enzyme pro-apoptotique essentielle dans la survie et l'apoptose des LB, serait également impliqué dans le développement du LES. En effet, une mutation homozygote faux sens a été associée à une forme monogénique de lupus. De plus, les souris KO pour PKC- δ développent une auto-immunité systémique. (Belot et al., 2013; Omarjee et al., 2019; Sisirak et al., 2016)

4.2 Gènes impliqués dans l'apoptose/autophagie et clairance des acides nucléiques

Plusieurs mutations impliquant des enzymes de l'apoptose, des récepteurs ou des mécanismes de dégradation et de réparation des acides nucléiques ont été mises en évidence dans les formes monogéniques de lupus. Le système immunitaire permet d'évacuer les déchets cellulaires dans l'organisme et ainsi d'éliminer les auto-antigènes produits. Les débris apoptotiques sont une source d'auto-antigènes : ainsi, des mutations dans des gènes codant pour des protéines appartenant aux voies d'élimination des corps apoptotiques, tels que la *DNASE1L3* (Al-Mayouf et al.,

2011; Tusseau et al., 2022), peuvent entraîner la non-séquestration d'auto-antigènes et donc le développement d'une auto-immunité (Mustelin et al., 2019a).

Le système du complément consiste en une trentaine de protéines solubles ou fixées aux membranes cellulaires. Ces protéines sont pour la plupart circulantes sous forme inactive et peuvent être activées en cascade de trois façons : la voie classique, la voie alternative et la voie des lectines. L'activation de la cascade du complément est essentielle à la clairance des débris apoptotiques, l'activation des LB, la clairance des complexes immuns et la lyse des cellules infectées notamment. L'activation du complément est importante lors d'une réponse à une infection mais elle peut aussi contribuer aux lésions inflammatoires liées aux dépôts d'auto-anticorps dans les tissus lors d'une réaction auto-immune. De manière paradoxale, des défauts de facteurs du complément de la voie classique tels que les facteurs C1q et C4 sont fortement associés au développement d'un LES : 91 % des sujets déficients en facteur C1q développent un LES et 75 % des sujets déficients en facteur C4. Un défaut de C1q entraînerait un défaut de clairance des corps apoptotiques et une accumulation de complexes immuns dans les tissus, ce qui expliquerait l'apparition d'une auto-immunité (Mathian et al., 2014). Le LES est plus sévère lorsqu'il est associé à un déficit en facteurs de la voie classique du complément, surtout chez les jeunes patients. La compréhension de la prévalence des déficits en complément et de l'association avec le LES n'est pas encore complète à l'heure actuelle (Macedo and Isaac, 2016).

Les mutations de *TREX1*, retrouvées dans le syndrome d'Aicardi-Goutières, sont des exemples de mutations impliquées dans les mécanismes de l'apoptose. *TREX1* est une DNase intracellulaire dégradant les ADN simples brins pendant l'apoptose, évitant ainsi le relargage d'ADN dans les tissus et donc une réaction anti-ADN du soi. Des études de séquençage, dans des formes précoces de lupus, ont identifié plusieurs variants pathogènes de *TREX1* et ont déterminé que ce gène était essentiel dans le développement du lupus (Crow et al., 2015).

La dérégulation d'autres DNases serait également impliquée dans le lupus, par exemple de la protéine codée par le gène *DNASE1L3* (Al-Mayouf et al., 2011; Tusseau et al., 2022). Le séquençage de ce gène a permis de décrire des mutations pouvant conduire à une diminution de l'activité de l'enzyme codée, voire à la non-expression de la protéine et l'association de ces déficits en *DNASE1L3* avec le LES est de mieux en mieux caractérisée (Sisirak et al., 2016; Tusseau et al., 2022). Des mutations de *DNASE1*, un gène codant pour une DNase extracellulaire majoritaire, sont également

associées au lupus. *POLB* code pour l'ADN polymérase β et répare les cassures dans l'ADNsb. Des études GWAS ont mis en évidence des polymorphismes de ce gène chez des patients lupiques (Sheng et al., 2011). L'introduction de certaines de ces mutations chez la souris conduisent au développement de pathologies lupus-like (Senejani et al., 2014; Sisirak et al., 2016).

4.3 Gènes de la voie des interférons de type I

La majorité des patients lupiques présente un profil cytokinique modifié, reflet d'une dysfonction des cellules immunitaires, qui participe à la physiopathologie. Un des marqueurs du LES est la signature interféron. Une exposition accrue des récepteurs endosomaux (par exemple, TLR7) ou des capteurs cytosoliques (par exemple, IFIH1) à des acides nucléiques, contenus dans des complexes immuns (complexes antigène-anticorps) ou des débris nécrotiques/apoptotiques, pourrait représenter un événement déclencheur majeur de la production d'IFN de type I dans le LES. Des études sur des modèles de souris lupiques et dans les cellules immunitaires des patients lupiques ont clairement démontré le rôle important de la surexpression de TLR7 dans la progression de la maladie lupique et la surexpression des IFN de type I (Das et al., 2017; Souyris et al., 2018a). Les facteurs de transcription en aval des TLR endosomaux (IRF5, IRF7 et IRF8) contrôlent essentiellement l'induction des gènes de la voie des IFN de type I. Des variants dans ces gènes ou aux environs de ces trois gènes sont associés au LES, et des variants causaux probables dans les gènes IRF5 et IRF7 ont été décrits (Deng and Tsao, 2014).

4.4 Gènes de la voie NF- κ B (inflammation)

IRAK1 (IL-1 receptor-associated kinase-1) code pour une sérine-thréonine kinase impliquée dans la régulation de plusieurs voies de signalisation intracellulaires, notamment la voie NF- κ B. Cette protéine est activée par les TLR ou l'IL-1R (récepteur à l'IL-1), et va phosphoryler le complexe d'ubiquitination (UBC13/UEV1E2) et ainsi l'activer. L'activation de ce complexe UBC13/UEV1E2 entraîne celle de la voie du NF- κ B, sa translocation dans le noyau et la transcription de gènes cibles pro-inflammatoires. Plusieurs polymorphismes dans le gène *IRAK1* ont été associés au LES (Kaufman et al., 2013).

Des gènes de susceptibilité au LES codent pour des protéines jouant un rôle régulateur dans la voie NF- κ B. Par exemple, *TNFAIP3* (Adrianto et al., 2011; Graham et al., 2008) code pour une

enzyme (A20) ayant une activité ubiquitine ligase et dé-ubiquitinase, qui va conduire à l'inhibition de NF- κ B, à l'apoptose médiée par le TNF et à l'induction de l'inflammasome NLRP3. Des études chez des souris A20 knock-out ont montré que des défauts d'expression ou de fonction de l'enzyme A20 prédisposent à l'auto-immunité par divers mécanismes (Malynn and Ma, 2019).

4.5 Gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse adaptative

4.5.1 Gènes liés à la présentation antigénique

OX40 est exprimé à la surface des LT après leur activation et interagit avec OX40L, présent sur les cellules présentatrices d'antigène (CPAg) également après activation. Leur interaction induit un signal de costimulation, responsable de l'activation des LT effecteurs, de l'activation et de la différenciation des LB, de l'inhibition des fonctions des LT régulateurs (LTreg, producteurs d'IL-10) et de l'activation de la production d'IL-17 (Ito et al., 2006). Plusieurs études de criblage génomique ont mis en évidence des polymorphismes du gène *TNFSF4* (codant OX40L) qui provoquent, notamment, une expression accrue d'OX40L. Les causes et les implications fonctionnelles de ces variants ne sont pas bien décrites pour l'instant mais des recherches sont en cours afin de déceler une éventuelle nouvelle cible thérapeutique (Gensous et al., 2017a).

4.5.2 Gènes liés à la fonction des LT

Le gène *PTPN22* est pléiotrope car impliqué dans un grand nombre de pathologies auto-immunes. Ce gène code pour une tyrosine phosphatase intracellulaire (*PTPN22* ou *protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22*) exprimée dans les LT et les LB. Elle exerce une régulation négative de la cellule. Un variant (1858T), correspondant au remplacement d'une arginine par un tryptophane en position 620, a été associé au LES. Cette association a été confirmée dans plusieurs études. D'autres ont montré le rôle de ce gène dans la production de cytokines, dans la réponse médiée par les TLR et dans la voie des IFN de type I. La protéine *PTPN22* est exprimée dans d'autres populations leucocytaires. Ainsi il est probable que le rôle de ce gène dans le LES soit plus complexe que simplement lié à l'activité des LT (Kariuki et al., 2008; Mustelin et al., 2019b).

4.5.3 Gènes liés à la fonction des LB

Le gène *BANK1* (*B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1*) code pour la protéine BANK1, qui régule le couplage direct entre les Src-tyrosine kinases et le canal calcique IP(3)R, facilitant la libération de calcium intracellulaire et modifiant le seuil d'activation des LB. Il a été montré dans des modèles de souris que BANK1 régule la signalisation du TLR7 dans les LB, or la réponse immunitaire innée des cellules via TLR7 est importante dans le développement d'une auto-immunité (Walsh et al., 2012; Yokoyama et al., 2002). Des polymorphismes de ce gène ont été retrouvés chez certains patients lupiques (Jiang et al., 2019).

BLK (*B lymphoid tyrosine kinase*) code pour une kinase de la famille des Src jouant un rôle important dans la signalisation intracellulaire et la régulation de la prolifération, de la différenciation et de la tolérance des LB. Les variants associés au LES sont localisés au niveau du promoteur de BLK et conduisent à une réduction de l'activité du promoteur dans les précurseurs des LB, ce qui suggère qu'une expression réduite de BLK peut affecter le développement et les réponses fonctionnelles des LB (Deng and Tsao, 2014).

Le polymorphisme sur le gène *PTPN22* (évoqué plus haut), entraînant une modification de la signalisation via PTPN22, avec une diminution de la phosphorylation des protéines dans la voie du BCR, pourrait causer une diminution de la tolérance au niveau des LB immatures (Suurmond et al., 2016).

4.5.4 Conclusion

Nous avons présenté dans cette partie des exemples de gènes permettant d'illustrer les principales voies physiopathologiques associées à la génétique du lupus érythémateux systémique. La **Figure 15** illustre la grande complexité de la génétique du lupus et son implication dans le déclenchement et le développement de la maladie.

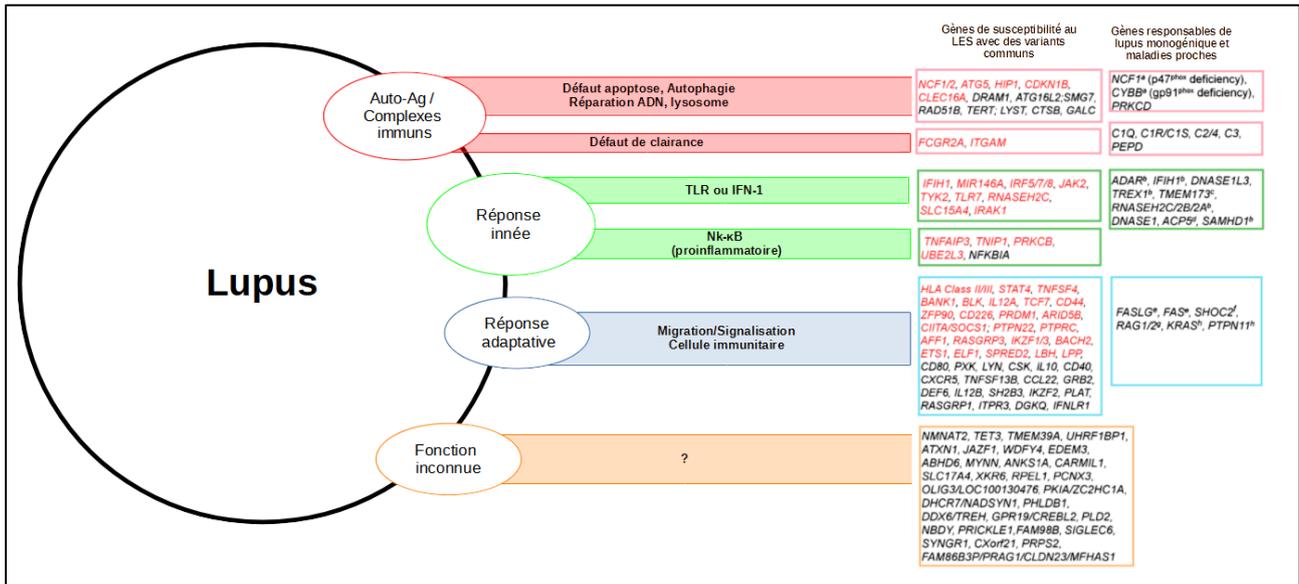


Figure 15. Gènes de susceptibilité au développement du LES et voies biologiques impliquées. Les gènes de susceptibilité au LES avec des variants communs sont identifiés par GWAS, méta-analyse, cartographie fine, ou des études de réplication avec $p < 5 \times 10^{-8}$ dans au moins une ascendance. Les gènes marqués en rouge montrent une association avec le LES chez plusieurs ascendances, tandis que les gènes en noir montrent une association unique à une ascendance. Dièse : les gènes présentant une déficience ou des mutations rares sont associés à des formes monogéniques de LED et/ou de maladies apparentées au LED. Expositant « a » : Défauts de *NCF1* et *CYBB* causant la maladie granulomateuse chronique (CGD). Expositant « b » : défauts d'*ADAR*, *IFIH1*, *TREX1*, *RNASEH2C/2B/2A*, et *SAMHD1* causant le syndrome d'Aicardi-Goutières (AGS). Expositant « c » : Défauts de *TMEM173* à l'origine de la vasculopathie associée à STING et apparaissant dans la petite enfance (SAVI). Expositant « d » : Défauts d'*ACP5* entraînant une dysplasie immuno-osseuse spondyloenchondrodysplasie (SPENCD). Expositant « e » : Défauts d'*FAS* et *FASLG* à l'origine du syndrome lymphoprolifératif auto-immun (ALPS). Expositant « f » : défauts de *SHOC2* provoquant le syndrome de Noonan-like avec cheveux anagènes caducs. Expositant « g » : Défauts de *RAG1/2* provoquant une immunodéficience combinée sévère (SCID). Expositant « h » : Défauts de *KRAS* et *PTPN11* causant le syndrome de Noonan (NS).

(Adaptée de Deng and Tsao, 2017)

5 Étiologie environnementale du LES

De nombreuses études de prévalence et d'incidence du lupus ont montré des différences importantes au sein de populations génétiquement proches (Borchers et al., 2007; Durán et al., 2007)). Cela témoigne de l'importance des facteurs environnementaux, socio-démographiques et culturels dans le développement de la maladie (Yelin et al., 2017a, 2017b). Parmi les facteurs environnementaux exogènes, on peut citer les agents infectieux, les médicaments et les rayonnements ultra-violet. Les facteurs hormonaux constituent le facteur endogène dominant.

5.1 Les agents infectieux

L'implication d'agents infectieux transmissibles a été évoquée à partir d'études épidémiologiques montrant des « épidémies » de lupus érythémateux dans des régions bien définies, notamment au Nevada (Balluz et al., 2001). Il a été également décrit de plus fortes anomalies dysimmunitaires chez des individus et des animaux vivant au même endroit que des patients lupiques (Jones et al., 1992; van der Linden et al., 2001). Par ailleurs, des infections virales pourraient favoriser les poussées de la maladie. Des modèles murins ont permis de mettre en évidence de façon indirecte des virus, tels que le virus Epstein-Barr, le parvovirus B19, le cytomegalovirus et certains rétrovirus, capables de provoquer chez l'animal une glomérulonéphrite à complexes immuns ou la production d'auto-anticorps antinucléaires. Ces découvertes ont stimulé les recherches sur des facteurs étiologiques viraux de la maladie lupique (Rigante and Esposito, 2015).

Les études les plus nombreuses impliquent particulièrement le virus Epstein-Barr (EBV) (Li et al., 2019). À noter que l'infection par le virus EBV est très fréquente dans la population mais que seule une minorité de sujets infectés développe la maladie lupique. Il y a donc implication de multiples facteurs évoluant chez un sujet génétiquement prédisposé à développer un lupus. Un mimétisme moléculaire entre les antigènes du virus (EBNA-1 et EBNA-2) et des antigènes nucléaires a été décrit (Gross et al., 2005; Peters et al., 2010). Ainsi, la réponse humorale dirigée contre l'EBV est modifiée chez les patients lupiques, avec production d'auto-anticorps anti-nucléaires par réaction croisée, ce qui traduit une perte de tolérance au soi (Poole et al., 2008). L'EBV peut activer, via les TLR7 et TLR9, les cellules dendritiques plasmacytoïdes, sécrétrices d'IFN de type I, signature de la pathologie lupique (Harley and James, 2010).

D'autres virus tels que le parvovirus, ou le cytomégalovirus (CMV) ont également été associés au LES. Le parvovirus B19 induirait la formation d'auto-anticorps et les manifestations de son infection peuvent faire penser à un LES en phase aiguë, les critères diagnostics de l'ACR permettant de différencier les deux pathologies. Le CMV est un pathogène répandu dans la population et des études de corrélation ont mis en évidence un lien probable entre infection par CMV et LES. La possibilité de réaction croisée (antigène viral - auto-antigène) après infection par ces virus est très étudiée (Illescas-Montes et al., 2019).

Les infections bactériennes constituent une cause importante de morbi-mortalité, notamment dans les 10 premières années de diagnostic du lupus, et contribuent directement à l'aggravation de la maladie (Danza and Ruiz-Irastorza, 2013). Au-delà de ce rôle pathogène direct, les bactéries peuvent également générer et entretenir une réponse auto-immune par le biais de réactions croisées à partir d'antigènes bactériens, ou via des dégâts tissulaires, libérateurs d'auto-antigènes circulants. La toxine B cholérique induit une production d'auto-anticorps et une glomérulonéphrite lupique dans un modèle murin de lupus (Rigante et al., 2014). Les composants bactériens pourraient également interagir avec les TLR (notamment TLR-7 et TLR-9), lors d'une infection, et ainsi générer la production de cytokines pro-inflammatoires. Les études épidémiologiques associeraient notamment la tuberculose avec le LES. À l'inverse, une infection à *Helicobacter pylori* serait négativement associée au LES, indiquant un potentiel rôle protecteur (Illescas-Montes et al., 2019).

5.2 Les médicaments

L'induction *de novo* de manifestations biologiques et cliniques du lupus par la prise de médicaments est bien démontrée aujourd'hui. Plus de 120 médicaments différents ont été impliqués dans les lupus dits « médicamenteux » ou « induits » (Lipsker and Sibilio, 2013).

L'association entre un médicament et le développement de la maladie n'est pas facile à démontrer. Pour certaines molécules, la littérature apporte des preuves convaincantes mais, pour la grande majorité des médicaments, le risque est considéré comme faible ou très faible. Le procainamide, la minocycline, l'hydralazine, la méthylidopa et certaines biothérapies ciblant le TNF- α sont connus pour leur potentiel d'induction de poussées lupiques (**Tableau 2**) (Pretel et al., 2014).

Les mécanismes impliqués dans l'apparition du lupus médicamenteux restent mal compris et multifactoriels. L'absence de réaction d'hypersensibilité est certifiée par : l'absence d'anticorps anti-médicament ou de LT spécifiques de la molécule ; la nécessité d'une exposition prolongée à la drogue et la réapparition de symptômes 24 à 48 heures après la réexposition, ce qui est trop long pour un effet de sensibilisation de type hypersensibilité (Borchers et al., 2007).

Molécules	Indication	Prévalence auto-anticorps antinucléaires (%)	Prévalence manifestations cliniques (%)
Procaïnamide	Arythmie cardiaque	75	15-20
Minocycline	Infections	90	10-15
Hydralazine	Vasodilatateur (Hypertension artérielle)	15-45	5-10
Isoniazide	Infections	20	<1
Methyldopa	Hypertension artérielle	19	<2
Chlorpromazine	Schizophrénie	20-50	<1
Sulfasalazine	Polyarthrite rhumatoïde	10	<1
Carbamazépine	Épilepsie	1-25	<1
IFNα	Hépatite B et C	11-53	<1
Anti-TNF	Polyarthrite rhumatoïde	18-72	0.1-2.1

Tableau 2. Principaux médicaments impliqués dans le développement du lupus érythémateux. (Adapté de Kaul et al., 2016)

L'un des mécanismes les mieux décrits du lupus induit par le procaïnamide ou l'hydralazine serait une hypométhylation de l'ADN, à l'origine d'une dérégulation de l'expression des gènes (Deng et al., 2003; Zhao et al., 2015). La quinidine entrainerait une altération de la clairance physiologique des corps apoptotiques (Ablin et al., 2005). Les anti-TNF modifieraient l'apoptose des cellules exprimant le TNF et limiteraient la clairance de ces corps apoptotiques formés (Williams et al., 2009).

Les anti-TNF peuvent également favoriser la maturation des pDC et ainsi déréguler la sécrétion d'IFN- α (Palucka et al., 2005).

5.3 Les facteurs hormonaux

Le lupus touche les femmes dans 85-90 % des cas en moyenne, avec une prévalence maximale entre 15-45 ans, c'est-à-dire en période d'activité génitale (Costenbader et al., 2007). Le rythme des poussées est temporellement associé à la période prémenstruelle (Colangelo et al., 2011). Cela évoque fortement une implication des facteurs hormonaux dans la physiopathologie du lupus, notamment les œstrogènes. L'effet immunomodulateur des œstrogènes est bien établi, et reflète la présence de récepteurs à ces hormones sur les cellules du système immunitaire. Ils auraient un rôle important dans la survie des LB autoréactifs et la sécrétion d'IFN- α par les pDC (Kovats, 2015)

L'utilisation d'oestroprogestatifs était déconseillée chez la patiente lupique par crainte de déclenchement de poussées. La littérature ne montre pourtant pas d'augmentation du risque de poussée, cela pour aucune méthode contraceptive (Benagiano et al., 2019). Il reste évident que la prescription de contraceptifs doit se faire avec prudence, dans le respect des contre-indications et après information éclairée de la patiente (Gensous et al., 2017b). La question des risques thrombotiques artériels et/ou veineux se pose également chez les patientes, surtout s'il y a présence d'anticorps anti-phospholipides. La contraception hormonale peut être une possibilité pour les patientes mais le choix de la molécule est important et une plus grande vigilance doit être demandée (Gensous et al., 2017b).

La question d'une augmentation du risque de poussée lupique lors d'une grossesse reste un sujet de débat et la littérature est contradictoire. Il semblerait que le risque de poussée dépende surtout de l'âge de la patiente et de l'activité de la maladie au début de la grossesse (Davis-Porada et al., 2020; Eudy et al., 2018).

5.4 Les rayonnements UV

L'exposition aux rayonnements solaires est un facteur connu et amplement démontré du LES et l'ACR a placé la photosensibilité des lésions parmi les 11 critères de diagnostic du lupus. Les UV de la bande B (295-320 nm) sont les plus érythématogènes, mais les UVA2 (320-340 nm) sont également à risque (Barbhaiya and Costenbader, 2014). L'exposition aux rayonnements des lampes à bronzer

est fortement déconseillée en cas de lupus. La lumière d'éclairage pourrait également avoir un impact, notamment les lampes à halogènes et les lampes fluorescentes capables d'émettre des UVB, UVC et UVA2 à des taux potentiellement importants (Klein et al., 2009).

Au niveau de l'épiderme, les UV dénaturent l'ADN cellulaire et augmentent la translocation des antigènes nucléaires SSA/Ro, SSB et Sm à la surface des cellules, libérant ainsi des auto-antigènes. L'exposition des kératinocytes (cellules de l'épiderme) aux UV induit leur apoptose, entraîne l'activation des pDC et stimule la production de cytokines pro-inflammatoires. L'irradiation directe aux UVA1 provoque l'expression de molécules d'adhésion ICAM à la surface des kératinocytes et facilite ainsi le recrutement des LT par la fixation d'ICAM-1 au récepteur LFA-1 des LT. La production d'IL-10 par les kératinocytes exposés aux UV active également les LB et la production d'anticorps (Kuhn et al., 2014).

Il est important de noter que la vitamine D a un rôle direct sur le contrôle des populations lymphocytaires, de l'immunité innée et adaptative, par la régulation de l'expression des TLR, de l'activité des cellules dendritiques et des LB (Schneider et al., 2014). De nombreuses études ont montré une corrélation entre des taux faibles de vitamine D et le développement de maladies auto-immunes. La supplémentation en vitamine D semble donc être importante pour les patients atteints de lupus (Islam et al., 2019).

5.5 Autres facteurs

Le tabac est un facteur de risque du fait de son action pro-inflammatoire. Plusieurs études ont démontré un risque supérieur de développer un lupus parmi les fumeurs. Le tabagisme a également un effet sur le risque de développer des atteintes neurologiques, cutanées et séreuses (Parisis et al., 2019).

L'exposition à la silice, aux solvants et à certains agents chimiques (pesticides...) peut aussi constituer un facteur de risque (Parks et al., 2011). Une étude cas-contrôles a démontré une association significative entre l'exposition solaire, la manipulation de solvants, de teintures et de vernis, le contact avec la céramique, et le risque de développer un LES (Cooper et al., 2010). Le rôle inducteur des « perturbateurs endocriniens » est toujours discuté.

5.6 Conclusion

L'importance des facteurs environnementaux (**Figure 16**) dans le développement du lupus et des maladies auto-immunes en général reste pour l'instant discutée mais leur impact est clairement établi par plusieurs études. De nombreuses recherches sont encore à mener pour déterminer les mécanismes biologiques impliqués mais la difficulté d'établir des relations entre les facteurs et la maladie réside dans la rareté relative de la pathologie à travers le monde et la grande disparité d'incidence et de prévalence entre les populations. Identifier les facteurs environnementaux sera utile à la compréhension de la physiopathologie de la maladie lupique.

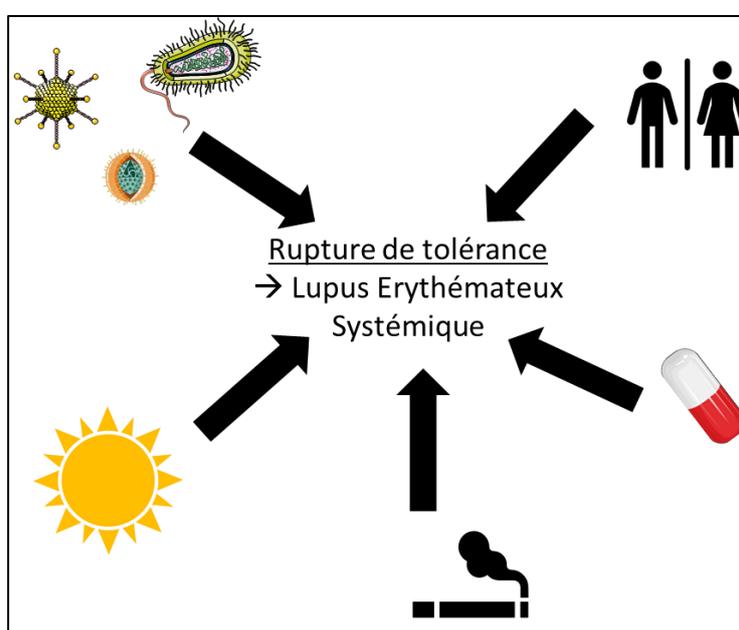


Figure 16. Résumé de l'ensemble des facteurs environnementaux suspectés de participer à la rupture de tolérance du système immunitaire conduisant au développement du lupus érythémateux systémique.

Figure personnelle

6 Modèles murins d'étude du lupus

Le caractère multifactoriel complexe du LES et la rareté de la maladie rendent difficiles l'étude directe sur les sujets humains. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de la maladie a été rendue possible en particulier par le biais d'études de modèles murins lupiques. Ces modèles murins représentent des modèles simplifiés du LES humain. Ils présentent notamment une production d'auto-anticorps et généralement le développement d'une glomérulonéphrite induite par les complexes immuns auto-anticorps-auto-antigènes (Perry et al., 2011a). Il existe des lignées de souris consanguines développant spontanément un syndrome lupique au cours de leur existence (on citera le modèle NZB/NZW F1 et le modèle MRL/lpr). Des modèles dits « inductibles » ont également été développés, par exemple le modèle pristane, qui consiste à administrer du pristane (une huile minérale) par voie intrapéritonéale dans des souris de la lignée Balb/c. Des modèles transgéniques présentant divers délétions ou mutations dans diverses gènes suspectés d'être impliqués dans le LES ont été publiés, et ont participé à l'augmentation des connaissances sur la physiopathologie du lupus (Richard and Gilkeson, 2018; Rottman and Willis, 2010)

7 Famille multiplex : une stratégie d'étude des causes génétiques du LES

Le but du projet d'étude de familles multiplex est d'identifier et de caractériser de nouveaux variants monogéniques impliqués dans le développement du LES afin de développer de nouvelles méthodes de stratifications des patients lupiques ainsi que d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour participer au développement de traitements plus ciblés. L'hypothèse est que les formes familiales et pédiatriques du LES sont associées à un risque génétique beaucoup plus important, ce qui peut faciliter l'identification de nouvelles causes de prédisposition.

Partant de cette hypothèse, l'équipe du Dr. Rieux-Laucat à l'Institut Imagine à Paris, porteur du projet ANR LUMUGENE auquel notre équipe a participé, a recruté une cohorte de patients atteints de lupus à début précoce ou de formes familiales. L'origine de ce travail de thèse est l'étude d'une famille multiplex (voir plus bas). Les causes connues de syndromes associés au lupus ont le plus souvent été préalablement exclues. Les patients ont été analysés par *Whole Exome Sequencing* (WES, séquençage d'exome entier). Le WES permet d'identifier entre 20 000 et 5031000 variants candidats chez un individu. Plusieurs filtres ont ensuite été appliqués afin de diminuer le nombre de variants candidats. Un premier filtre a été réalisé sur la fréquence du variant dans la population mondiale. Par comparaison avec des bases de données telles que dbSNP, EVS, le projet 1000 génomes ainsi que la base de données de l'Institut Imagine comprenant les variants déjà décrits dans l'institut, les variants dont la fréquence de l'allèle mineur (MAF – Minor Allele Frequency) est inférieure à 1 % ont été sélectionnés. Puis les variants situés dans les séquences codantes du génome ainsi que ceux provoquant un changement non-synonyme, un décalage du cadre de lecture, l'apparition d'un codon stop ou la perte d'un codon ont été privilégiés.

La liste des variants restants a ensuite été croisée avec l'arbre généalogique de la famille s'ils satisfont une hypothèse d'hérédité probable. Enfin, les variants ont été sélectionnés en fonction du gène dans lequel ils sont situés ainsi qu'en fonction de l'impact de la mutation sur la protéine prédit par les analyses *in silico*. Ce système de filtrage favorise la découverte de mutations à fort impact sur les propriétés de la protéine et dans le système immunitaire.

La famille à l'origine de ce projet de thèse est composée de dix individus répartis sur deux générations. Parmi eux, cinq personnes présentent un phénotype auto-immun avec : un lupus chez

la patiente à l'origine de l'étude, un syndrome de Gougerot-Sjögren chez une sœur, un purpura thrombocytopénique idiopathique (PTI) chez un frère, une thyroïdite d'Hashimoto (TH) chez la mère dont le diagnostic est pédiatrique (6 ans)[1-2] et une sclérose systémique cutanée limitée (SSCL). Tous les patients hormis le frère atteint du PTI présentent des auto-anticorps anti-antigène nucléaires (ANA), ainsi que d'autres auto-anticorps, mais non systématiquement tels que des anti-ADN, SSA, SSB, TPO, M2, GP210 et des anti-centromères. L'agrégation familiale ainsi que le diagnostic à l'âge de 6 ans d'une thyroïdite d'Hashimoto chez la mère suggèrent fortement une origine génétique à ces phénomènes auto-immuns (**Figure 17**).

	Patiente LES	Soeur	Frère	Mère	Tante
Arbre généalogique	II-2	II-3	II-1	I-2	I-1
Âge au moment du diagnostic	32	25	16	6	54
Symptômes cutanés	-	Xérostomie	Purpura	-	Télangiectasie Sclérodermie
Hématologie	-	-	ITP	Hemolytic anemia	
Troubles musculo-squelettique	Arthralgia	Arthritus	-	-	Raynaud's phenomenon
Autoanticorps	ANA, DNA, SSA	ANA, SSA, SSB	-	ANA, TPO, M2, GP210	ANA, centromere
Maladie diagnostiquée	Lupus	Sjögren	PTI	Thyroïdite d'Hashimoto	Sclérose systémique cutanée limitée
ERN1 c.1780 C>T	Hétérozygote	Hétérozygote	WT	Hétérozygote	Hétérozygote

Figure 17. Symptômes cliniques, manifestations biologiques et présence de la mutation chez les membres de la famille multiplex à l'origine du projet ERN1.

Nos collaborateurs de l'ANR LUMUGENE (Équipe du Dr. Frédéric Rieux-Laucat, Institut Imagine, Paris) ont réalisé un WES chez le sujet lupique, la mère et la sœur. Ils ont appliqué des filtres de sélection et ainsi retenu trois gènes présentant un variant hétérozygote : *ERN1* (c.1780C>T ; p.R594C), *IRAK4* (c.1336A>T ; p.D422V) et *GMPS* (c.1097A>G ; p.Q366R).

Les scores PolyPhen, SIFT et CADD obtenus par analyse *in silico* de ces trois mutations sont rapportés dans le tableau (**Figure 18 D**). Les résultats montrent que la mutation d'*ERN1* est potentiellement la plus néfaste à la fonction protéique, tandis que la mutation *IRAK4* serait potentiellement tolérée. La base de données génomique gnomAD (Genome Aggregation Database)

qui répertorie les données publiées de séquençage d'exomes ou de génomes entiers provenant d'individus non apparentés montre que l'allèle muté d'*ERN1* sélectionné dans cette famille n'a été rapporté qu'une seule fois.

La ségrégation familiale de chacun de ces allèles varie également dans la famille. La mutation *ERN1* est présente chez cinq individus, quatre sujets malades (de sexe féminin) et un porteur sain (de sexe masculin). Cette répartition soutient un modèle de mutation autosomale dominante avec une pénétrance incomplète. L'absence de la mutation n'explique en revanche pas le développement du PTI observé chez un des frères (II-1). Toutefois, il est possible que le PTI soit associé à un fond génétique ou environnemental partagé entre les individus augmentant leur susceptibilité à l'auto-immunité (**Figure 18 A et B**).

ERN1 est impliqué dans la régulation du stress du réticulum endoplasmique (RE), un processus permettant de rétablir l'homéostasie de cet organe. Le stress du RE, bien que sans rapport apparent avec l'immunologie, est pourtant intrinsèquement lié à l'auto-immunité. La mutation découverte dans ce gène semblait donc être un bon candidat pour expliquer la pathogenèse du LES chez la patiente., et a été l'objet de ce travail de thèse.

La mutation *IRAK4* est restreinte aux patients présentant des auto-anticorps, soutenant un modèle de mutation autosomale dominante à pénétrance complète (**Figure 18 C**). La protéine IRAK4 étant un composant majeur de la signalisation IL-1, cette mutation semble être un bon candidat. Toutefois, les mutations d'*IRAK4* déjà décrites dans la littérature provoquent l'apparition d'un phénotype d'immunodéficience et sont récessives. En effet les mutations inactivatrices d'*IRAK4* provoquent une perte de réponse au LPS et à l'IL-1, induisant une plus forte susceptibilité aux infections bactériennes, causant des infections mortelles chez les patients sans autres symptômes apparents. L'analyse *in silico* indique une potentielle tolérance de la mutation observée (**Figure 18 D**). De plus, il faudrait éventuellement faire l'hypothèse d'une mutation gain de fonction qui entrainerait éventuellement une hypersensibilité des cellules à l'IL-1. Les pathologies associées à une dérégulation de la voie de l'IL-1 sont généralement des maladies rhumatologiques inflammatoires. L'hypothèse que ce variant peut participer secondairement au développement de la pathologie n'est pas à exclure.

Enfin, le variant *GMPS* est observable chez tous les membres de la famille malades mais également chez un individu sain, l'un des frères de la patiente (**Figure 18 C et D**). La mutation *GMPS* soutient donc le même modèle que la mutation *ERN1*. *GMPS* est un gène codant pour la GMP synthase, une protéine impliquée dans la synthèse de la guanine. La GMP est donc nécessaire pour la synthèse d'ADN et d'ARN mais également la production de GTP, une molécule essentielle à la transduction de signaux de nombreuses voies cellulaires. Aucun lien direct entre la protéine *GMPS* et l'auto-immunité n'a été décrit à l'heure actuelle dans la littérature. Un seul mécanisme indirect peut relier *GMPS* et auto-immunité : la localisation nucléaire ou cytoplasmique de *GMPS* médiée par son ubiquitinylation par TRIM21. Or, TRIM21 est une protéine reconnue comme auto-antigène dans le Sjögren et le LES (Yoshimi et al., 2012), mais le lien avec l'apparition d'une auto-immunité à la suite d'un défaut de *GMPS* reste peu évident.

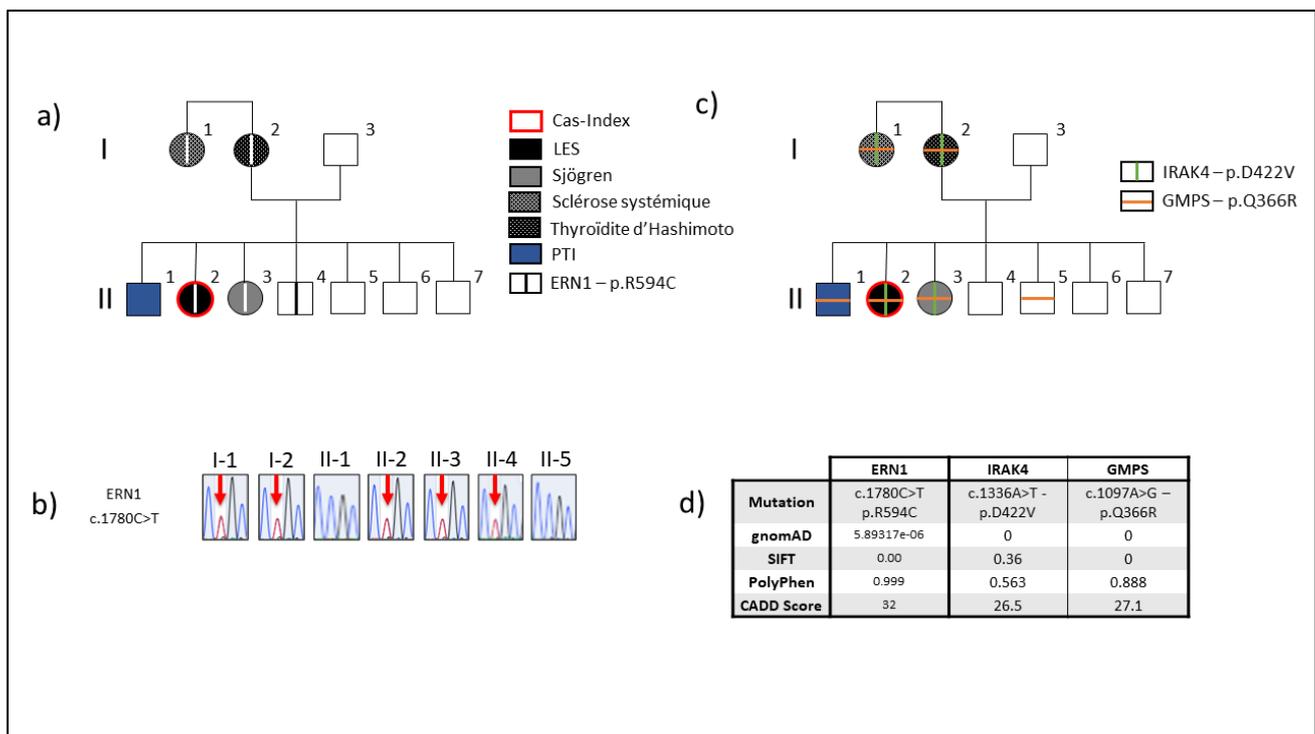


Figure 18. Arbre généalogique et séquençage d'ERN1 dans la famille A. (a) Arbre généalogique de la famille A. (b) Séquençage de Sanger du gène *ERN1* montrant le variant observé chez les divers membres de la famille séquencés. La flèche rouge vise le nucléotide muté. (c) Arbre généalogique de la famille A représentant les deux mutations non sélectionnées au final. (d) Analyse *in silico* des mutations sélectionnées par WES.

Nos collaborateurs ont conclu que l'analyse *in silico* des mutations retrouvées par WES, la pertinence des modèles pour la répartition des mutations et des phénotypes auto-immuns ainsi que les liens observés dans la littérature entre les gènes impliqués et l'auto-immunité tendent à présenter

le variant *ERN1* (c.1780C>T ; p.R594C) comme le meilleur candidat pour l'étude. Toutefois, ce modèle étant basé sur une hypothèse de pénétrance incomplète et n'expliquant pas l'apparition d'un PTI chez un patient non muté, la présence dans cette famille d'un autre facteur environnemental ou génétique (le variant d'*IRAK4* notamment) participant au développement d'une auto-immunité n'est pas à exclure.

8 Stress du réticulum endoplasmique et mécanismes de protection cellulaire

8.1 Le stress du réticulum endoplasmique

La transcription de l'information génétique contenue dans l'ADN en ARN puis la traduction de cette information génétique en protéines forme l'axe essentiel de la vie cellulaire. Les mécanismes de réplication, de transcription et de traduction sont sujets à de nombreuses erreurs. Grâce à des mécanismes de réparation d'ADN, les erreurs de réplication du génome sont rares. D'une certaine manière, les mutations dans la séquence d'ADN peuvent être tolérées et apporter une contribution essentielle au processus d'évolution, à condition qu'elles n'entraînent pas le remplacement de résidus essentiels à l'activité biologique de la protéine ou n'empêchent pas la maturation de la protéine (Hebert and Molinari, 2007).

La synthèse protéique est réalisée au niveau des ribosomes. Les ribosomes peuvent être libres dans le cytosol ou dans les mitochondries ou associés à la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Le RE est une organelle essentielle présente dans la majorité des cellules eucaryotes. Environ un tiers des protéines est synthétisé au niveau de la membrane du RE. C'est un lieu de modifications post-traductionnelles, d'assemblage des protéines en complexes multiprotéiques, de délivrance des protéines à des compartiments intracellulaires précis ou de sécrétion des protéines dans l'environnement extracellulaire (Hebert and Molinari, 2007). La majorité des protéines sécrétées ou résidant dans le RE, l'appareil de Golgi, les lysosomes et la membrane cellulaire sont traduites au niveau des ribosomes associés à la membrane du RE et sont transloquées ensuite dans la lumière du RE (Hetz et al., 2015).

Dans la lumière du RE, les protéines vont acquérir une conformation 3D adéquate indispensable à leur fonction. Les polypeptides synthétisés destinés à être sécrétés portent généralement une séquence N-terminale particulière (*Signal Recognition Peptide, SNP*) qui facilite leur adressage au RE à travers le complexe translocon. Dans la lumière du RE, le SNP va être clivé par une peptidase et le polypeptide va subir des transformations (N-glycosylation par exemple), un repliement tridimensionnel de la chaîne polypeptidique (avec l'aide de protéines spécialisées telles

que les protéines chaperonnes) et un assemblage avec d'autres peptides ou protéines pour former des complexes et ainsi obtenir une protéine mature et fonctionnelle (Wang and Kaufman, 2016).

Le transfert d'information de l'ADN à l'ARNm (transcription), de l'ARNm à une chaîne d'acides aminés (traduction) et la conversion de cette chaîne en une protéine correctement repliée et biologiquement active sont sujets à des erreurs. Il existe des mécanismes de contrôles rigoureux au niveau du RE permettant une surveillance du système de synthèse protéique et régulant l'apparition de protéines mal conformées. Des protéines chaperonnes, diverses enzymes (oxydoréductases, glycosylases ...) ont pour mission d'assurer les modifications post-traductionnelles des protéines (assemblage en complexes protéiques, structure tridimensionnelle, glycosylation ...) avant leur transit vers leurs compartiments d'adressage. Environ un tiers des polypeptides transloqués dans la lumière du RE n'arrive pas à passer les étapes de contrôle de la qualité du repliement de la chaîne d'acides aminés, et pour certaines protéines, ce score est encore inférieur (Hetz et al., 2015; Schubert et al., 2000).

Les cellules travaillent souvent à la limite de leur capacité et l'homéostasie du RE est constamment remise en tension par les signaux physiologiques et des dommages pathologiques, impactant ses fonctions multiples (réservoir de calcium intracellulaire, usine de production des protéines, lieu de synthèse lipidique et plateforme de signalisation et de communication intracellulaire). L'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE entraîne un blocage de l'organelle et de la synthèse protéique, connu sous le nom de « stress du RE ». Un stress oxydatif, une mauvaise activité du protéasome, des défauts génétiques entraînant la formation d'agrégats protéiques, une modification des flux autophagiques, des signaux inflammatoires et une perturbation de l'homéostasie calcique peuvent entraîner des conditions de stress du RE (**Figure 19**). Dans les cellules du pancréas, par exemple, c'est le mauvais repliement de la molécule d'insuline qui peut entraîner le blocage de la synthèse protéique. Dans les neurones, l'expression chronique de protéines mal repliées entraîne une surtension de la chaîne de production protéique que l'on nomme un stress du RE « chronique » (Hetz and Papa, 2018).

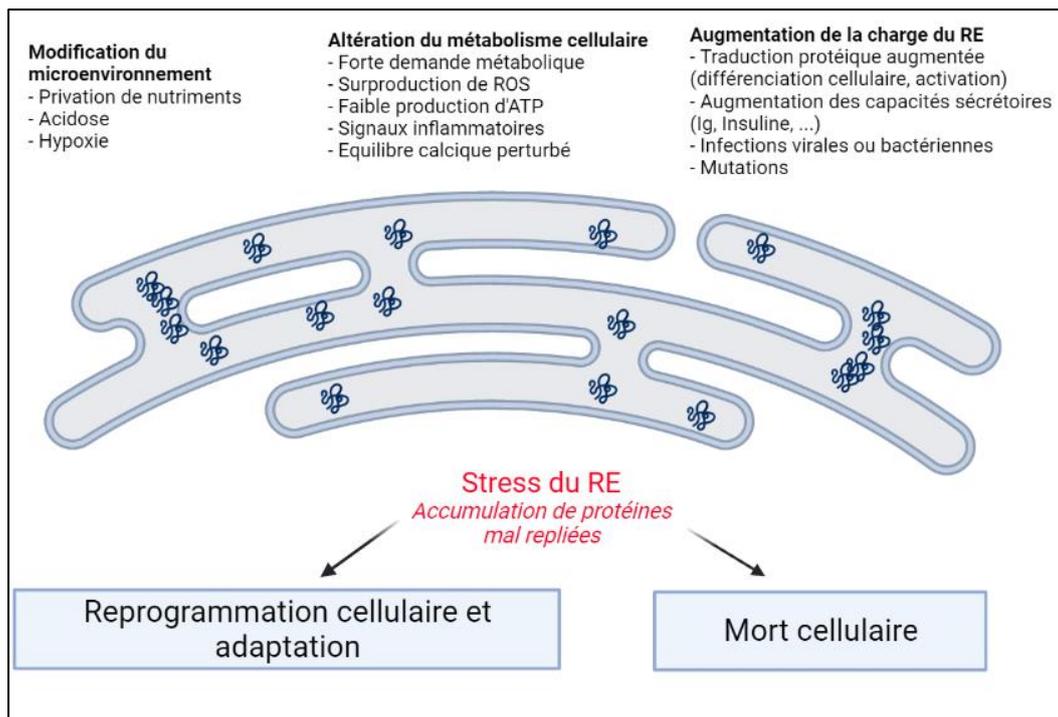


Figure 19. Inducteurs du stress du RE. La modification du microenvironnement cellulaire, l'altération du métabolisme cellulaire et l'augmentation de la charge du RE peuvent entraîner une accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE. La cellule peut soit activer des mécanismes de protection tels que l'Unfolded Protein Response ou la dégradation des protéines mal repliées, soit s'engager dans la voie de l'apoptose cellulaire.

(Chen and Cubillos-Ruiz, 2021)

Les cellules ayant le potentiel de produire de grandes quantités de protéines sont capables de le faire parce qu'elles contiennent un RE important et bien développé. Par exemple, chaque cellule β du pancréas endocrine est capable de synthétiser et de sécréter jusqu'à un million de molécules d'insuline par minute. Dans les états insulino-résistants, cette grande charge protéique synthétique devient encore plus importante. Les plasmocytes, cellules sécrétrices d'immunoglobulines, peuvent sécréter chaque jour leur propre poids en anticorps (Hetz and Papa, 2018)

Au cours de l'évolution, les cellules procaryotes et eucaryotes ont développé des systèmes de plus en plus complexes capables de détecter et de répondre à ce stress du RE pouvant engendrer une menace pour la survie cellulaire. La cellule va continuellement contrôler la charge de protéines dans le RE et corriger les accumulations de protéines mal repliées afin que les capacités de la lumière du RE à accepter de nouvelles protéines synthétisées ne soient pas dépassées. Lorsque l'accumulation de protéines mal repliées dépasse un certain seuil, un mécanisme complexe de signalisations

intracellulaires s'active, que l'on nomme *Unfolded Protein Response* (UPR) ou réponse aux protéines mal repliées (Hetz et al., 2020).

8.2 Contrôle qualité et dégradation des protéines mal repliées

8.2.1 ERAD

Les protéines mal repliées ne sont pas tolérées par la cellule et sont détruites via des mécanismes de dégradation tels que le processus ERAD (*ER-associated degradation*). Ce processus conservé dans l'évolution entraîne le transport rétrograde des protéines mal repliées du RE vers le cytosol. Les substrats de l'ERAD sont sélectionnés par des protéines chaperonnes (telles que BiP, HSP70, la Calnexine, ...) qui identifient les protéines incapables de se replier, qui se replient trop lentement ou contiennent un domaine mal replié, ou celles qui manquent de partenaires protéiques spécifiques. Les protéines ciblées sont ensuite en majorité ubiquitinylées grâce à l'ubiquitine ligase E3. L'ubiquitine est un peptide de 76 acides aminés qui entraîne l'adressage des protéines au protéasome, une grande protéase multi catalytique résidant dans le cytoplasme et capable de dégrader les protéines via sa sous-unité 26S (Vembar and Brodsky, 2008).

8.2.2 Autophagie

Le processus d'autophagie permet à la cellule de séquestrer ses propres composants dans des vésicules intracellulaires. Ces vésicules (autophagosomes) vont ensuite fusionner avec des lysosomes, ce qui va entraîner la digestion et le recyclage de leur contenu. Il existe plusieurs types d'autophagie mais leur description n'est pas l'objet de cette revue de la littérature. En revanche, un type d'autophagie nommé l'ER-phagie est particulièrement intéressant dans le contexte du maintien de l'homéostasie du RE. La digestion et le recyclage de fragments du RE permettent la régulation de la fonction de cette organelle et selon toute probabilité de réguler la présence de protéines mal repliées, bien que la finalité du processus d'ER-phagie reste encore mal définie actuellement (Beese et al., 2020).

8.3 Unfolded protein response (UPR)

L'UPR est constituée d'un réseau complexe de voies de signalisation entraînant une reprogrammation de la transcription de gènes impliqués dans la traduction et le repliement des

protéines afin de baisser la charge de protéines mal ou non repliées et restaurer l'homéostasie du RE (Hetz et al., 2015). La découverte de l'UPR résulte d'un long processus de découvertes scientifiques. En 1977, un article a montré que des gènes étaient induits lors d'une privation de glucose dans le milieu de culture de fibroblastes (Shiu et al., 1977). En 1988, Kozutsumi *et al* ont observé que l'accumulation de protéines mal repliées induit la synthèse de ces mêmes gènes et de leurs protéines, localisées dans la lumière du RE (Kozutsumi et al., 1988). Ces résultats ont fourni des preuves de l'existence de mécanismes de signalisation qui détectent l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE et qui conduisent à l'activation de gènes, dont beaucoup codent pour des protéines résidant dans le RE (Hetz et al., 2020). Cette voie de signalisation a été nommée « *Unfolded Protein Response* » ou réponse aux protéines mal repliées. Ces premières observations ont ensuite été caractérisées génétiquement dans la levure *S.cerevisiae*. Une voie de signalisation linéaire régie par un senseur de stress du RE nommé *Inositol-requiring protein-1* (Ire1p) et un facteur de transcription en aval connu sous le nom de HAC1 ont ainsi été identifiés (Cox and Walter, 1996; Mori et al., 1993). Dans la levure, le stress du RE entraîne une activation d'un large panel de gènes impliqués dans le contrôle qualité, le repliement et la sécrétion des protéines.

L'activation de l'UPR entraîne deux événements distincts :

- Une première action réduisant la synthèse protéique et stimulant la dégradation des protéines mal repliées ;
- Une seconde action plus tardive de régulation transcriptionnelle de centaines de gènes cibles impliqués dans le contrôle de la protéostasie intracellulaire ;

Dans les organismes supérieurs (vertébrés), l'UPR a évolué vers un réseau complexe de voies de signalisation interconnectées permettant à la cellule de s'adapter à un stress du RE. Trois voies de signalisation de l'UPR ont ainsi été caractérisées chez les vertébrés (**Figure 20**) :

- Le récepteur *Protein Kinase RNA (PKR)-like ER kinase* (PERK) et la protéine *Eukaryotic translation Initiation Factor 2 α* (eIF2 α) ;
- Le récepteur *Inositol Requiring protein 1 α* (IRE1- α) et le facteur de transcription X-box-binding protein 1 (XBP1) ;
- Le récepteur *Activating transcription factor 6 α* (ATF6).

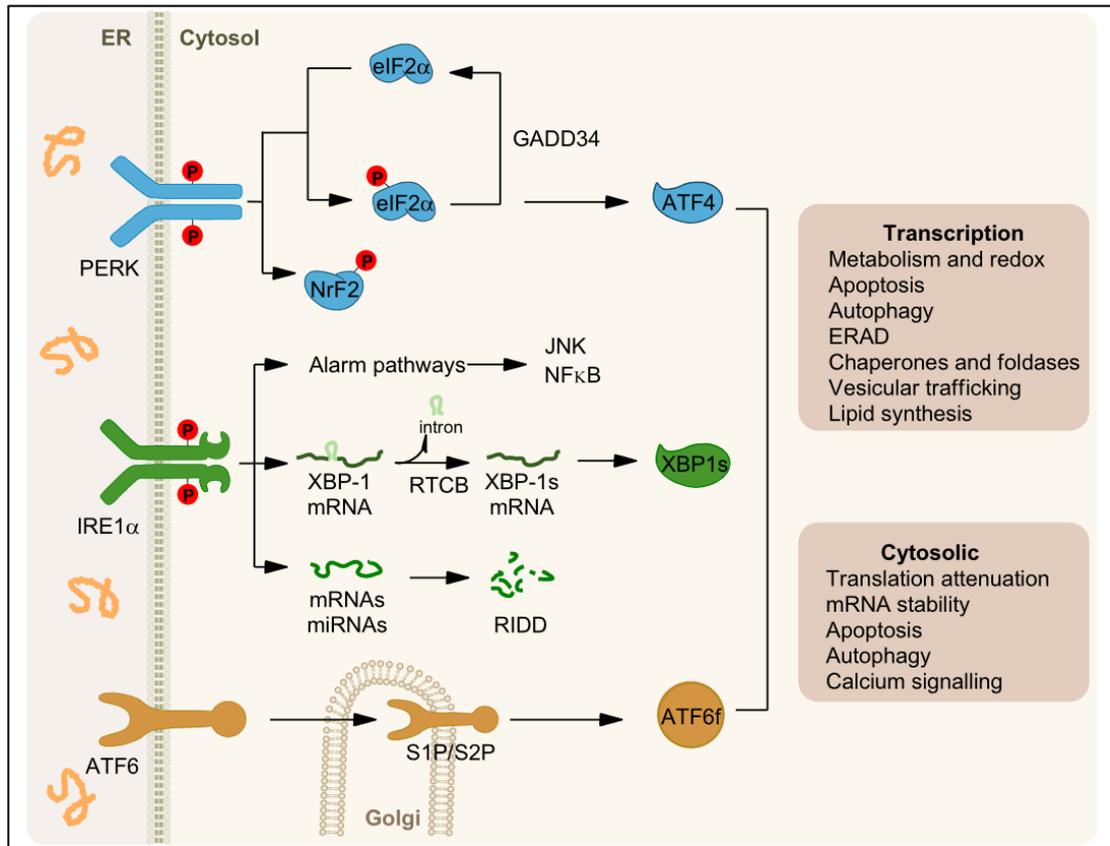


Figure 20. Les trois voies de l'Unfolded Protein Response (UPR). La présence de protéines mal conformées induit l'activation d'IRE1- α , PERK et ATF6. Une fois activée, IRE1- α va se dimériser et s'auto-phosphoryler, activant les voies XBP1, JNK, NF- κ B et le RIDD. En effet, l'activité RNase d'IRE1- α va épisser l'ARNm d'XBP1 en retirant un intron de 26 nucléotides. L'ARNm d'XBP1 est relié par RTCB pour donner l'ARNm de XBP1s. Cet ARNm code pour le facteur de transcription XBP1s. L'activité RNase d'IRE1- α provoque également le clivage d'ARNm et de miARNs. L'activité kinase d'IRE1- α active les voies JNK et NF- κ B. PERK s'active de façon similaire par dimérisation et auto-transphosphorylation. Son activation lui confère une activité kinase permettant de phosphoryler eIF2 α . eIF2 α phosphorylée va bloquer la traduction des ARNm sauf celui codant pour ATF4 dont la synthèse est activée. Le facteur de transcription ATF4, normalement réprimé à l'état basal, est ainsi traduit. GADD34, une protéine induite par ATF4, agit comme un rétrocontrôle en induisant la déphosphorylation d'eIF2 α . ATF6 est adressée au Golgi lors de sa dissociation avec BiP puis clivée par S1P et S2P.

(Hetz et Papa, 2018)

8.4 Découverte de IRE1- α chez la levure et caractérisation chez l'Homme

Une première description de l'homologue d'IRE1- α chez la levure, nommée Ire1p (*Inositol Requiring Enzyme 1 protein*) a été faite en 1992. Les auteurs travaillaient sur une espèce de levure, *S.cerevesiae*, auxotrophe pour les inositols, dans le cadre d'une étude visant à identifier des gènes impliqués dans le métabolisme des phosphatidylinositol (PPDI), des phospholipides constituants majeurs des membranes cellulaires. Les auteurs déterminèrent que la structure de la protéine était similaire à celle du récepteur EGF (Epidermal Growth Factor), ils posèrent l'hypothèse que cette protéine kinase était essentielle pour l'activation ou l'expression d'un facteur impliqué dans la synthèse des lipides (Nikawa and Yamashita, 1992). Cox *et al* ont ensuite déterminé que la protéine Ire1p était l'acteur majeur de la réponse UPR chez la levure, détecteur d'un signal de stress du RE et transmetteur d'un signal de réponse intra-cellulaire permettant la résolution du stress (Cox et al., 1993).

Plusieurs études sur la levure ont permis ensuite de décrire la structure et la fonction d'Ire1p. C'est une protéine transmembranaire du RE exprimée sous forme de monomère inactif. L'accumulation de protéines mal repliées va entraîner son oligomérisation et son activation par trans-autophosphorylation via son domaine kinase cytosolique. L'activation du domaine kinase va permettre l'induction de son activité ribonucléase, capable d'épisser l'ARNm du gène *HAC1* exprimé chez la levure sous deux formes : induite ($HAC1p^i$) et non induite ($HAC1p^u$). L'ARNm de la forme induite n'est pas détectable en l'absence de stress du RE. L'ARNm $HAC1p^u$ contient un intron dit « non conventionnel » dont l'épissage est indépendant de l'activité du spliceosome. Lorsque cet intron est épissé, il y a un décalage du cadre de lecture modifiant la structure C-ter de la protéine *HAC1*. Cette modification de structure permet à la protéine *HAC1* d'être pleinement active et capable d'induire l'UPR (Bashir et al., 2020).

Ire1 est bien conservé sous la forme Ire1 chez le ver (*C. elegans*) et IRE1 chez la mouche (*D. melanogaster*). L'homologue d'Ire1 chez les mammifères a été identifié par deux équipes (Tirasophon et al., 1998; Wang et al., 1998) qui ont caractérisé la structure de deux protéines différentes : IRE1- α et IRE1- β (IRE1- α est exprimée de manière ubiquitaire, tandis que IRE1- β est exprimée uniquement dans l'intestin) (**Figure 21**). L'absence de l'expression d'IRE1- α chez la souris (Knock-out ou KO) est létale au stade embryonnaire, le modèle IRE1- β KO constitutif est viable (Bertolotti et al., 2001).

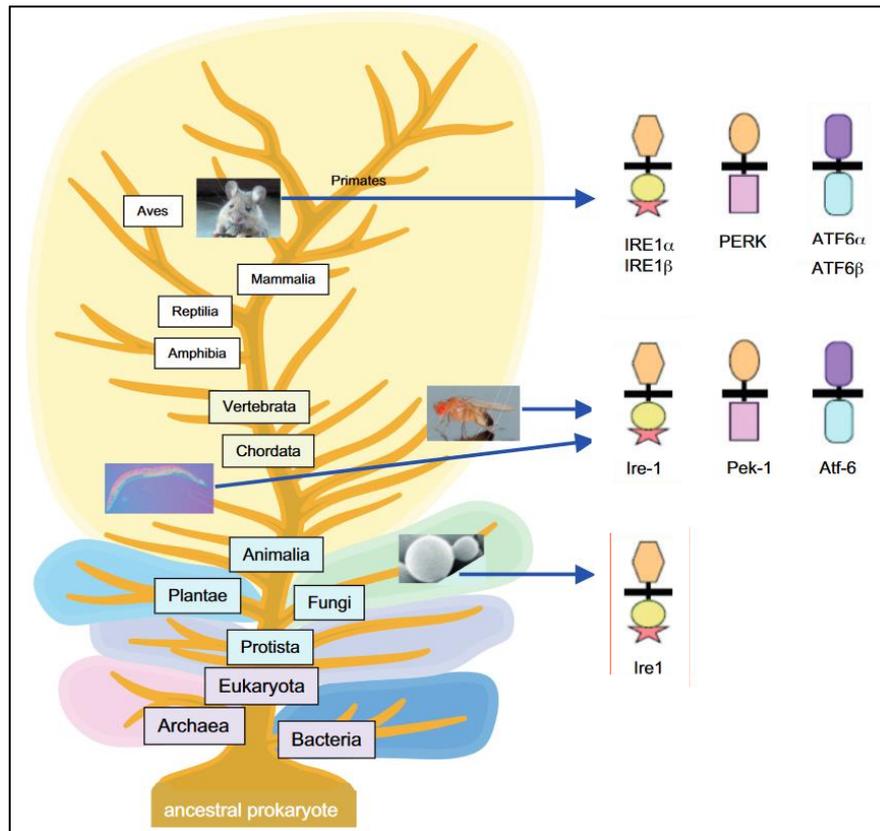


Figure 21. Évolution de l'UPR. Ire1 est le transducteur de l'UPR le plus ancien et le mieux conservé dans l'évolution. Chez les mammifères, Ire1 a évolué en deux homologues IRE1- α ubiquitaire et IRE1- β (retrouvé dans la lumière intestinale uniquement).

(Mori et al, 2009)

Il est à noter que le facteur de transcription en aval d'IRE1- α n'est pas HAC1 mais XBP1 dans les cellules métazoaires. Bien que HAC1 et XBP1 codent tous deux pour un facteur de transcription de type bZIP (basic leucine zipper) et que leur ARNm soit soumis à un épissage non conventionnel médié par IRE1- α en réponse au stress du RE, leurs séquences primaires d'acides aminés ne sont pas identiques (Bashir et al., 2020; Mori, 2009).

La voie unique Ire1/Hac1 de l'UPR décrite chez la levure a évolué vers trois voies différentes et complémentaires : les voies d'IRE1- α , PERK et ATF6. Ces trois voies sont présentes chez les vers (*C. elegans*), les insectes (*D. melanogaster*) et les mammifères (Mori, 2009).

8.5 Introduction aux voies PERK, ATF6 et IRE1- α chez les mammifères

La **Figure 22** décrit les voies de réponse au stress du RE, qui seront développées dans ce chapitre.

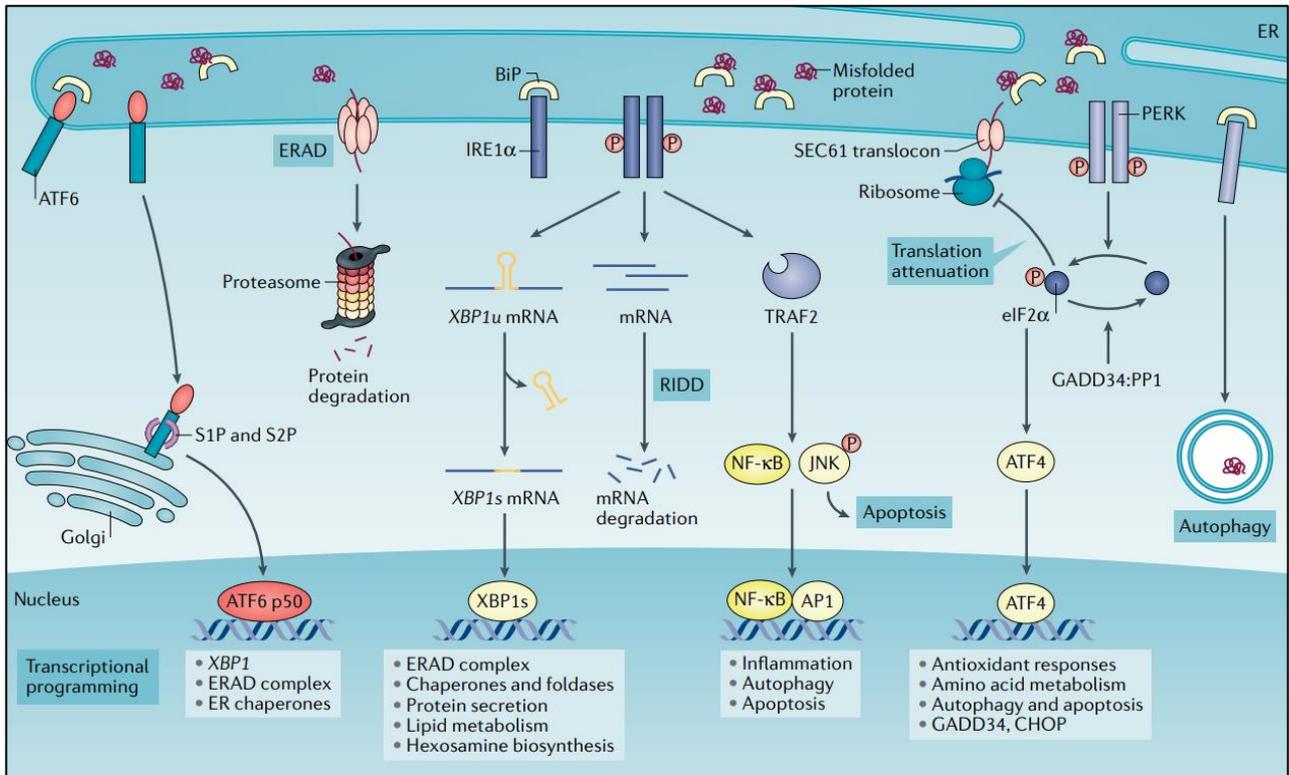


Figure 22. Voies de réponse au stress du réticulum endoplasmique. Les trois protéines transmembranaires de l'UPR, que sont ATF6, IRE1- α et PERK, sont activées par la libération de BiP, une protéine chaperonne, lorsqu'il y a accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du réticulum endoplasmique (stress cellulaire). ATF6 est adressée au Golgi où les protéases S1P et S2P libèrent la partie active de la protéine qui va ensuite activer la transcription de gènes cibles de l'UPR dans le noyau. IRE1- α , activée après libération de BiP, s'autophosphoryle puis forme des oligomères permettant l'activation de la fonction ribonucléasique de la protéine. La protéine clive ainsi l'ARNm codant pour XBP1, permettant la synthèse de la forme épissée (spliced XBP1 ou XBP1s) active de XBP1, un facteur de transcription ciblant de nombreux gènes de réponse au stress du réticulum. IRE1- α clive aussi d'autres ARNm, processus nommé RIDD (Regulated Ire1 Dependent Decay). Le domaine kinase d'IRE1- α peut également lier TRAF2 et activer la voie JNK. Enfin, PERK s'autophosphoryle et active une cascade de signalisation via EIF2 α conduisant à l'arrêt de la traduction protéique et à l'activation de gènes de réponse au stress, notamment l'autophagie mais aussi l'activation de la voie CHOP, proapoptotique.

(Chen et al, Nature Reviews Cancer, 2021)

8.5.1 IRE1- α

IRE1- α est la voie de réponse au stress du RE la plus conservée dans l'évolution et la plus anciennement décrite. C'est une protéine transmembranaire de type 1. Elle est constituée d'un domaine luminal senseur du stress du RE et de deux domaines effecteurs cytoplasmiques : un domaine kinase ainsi qu'un domaine ribonucléase. Après activation d'IRE1- α à la suite d'un stress du RE, la protéine va se dimériser puis s'oligomériser. La dimérisation entrainera l'activation du domaine kinase par autophosphorylation. L'activation du domaine kinase permettra enfin l'activation du domaine ribonucléase de la protéine.

La forme active d'IRE1- α a pour principale fonction l'épissage alternatif de l'ARNm de XBP1, c'est-à-dire l'excision d'une séquence de 26 nucléotides au niveau du C-terminal de la chaîne d'acides aminés de la protéine XBP1. L'ARNm épissé de XBP1 (XBP1s) code pour un facteur de transcription stable et régulant de nombreux gènes impliqués dans la synthèse protéique, les mécanismes de repliement des protéines, la dégradation des protéines mal repliées et l'augmentation de la taille du RE (Calfon et al., 2002; Hetz and Papa, 2018).

Le domaine ribonucléase de IRE1- α peut aussi cliver de nombreux autres ARNm localisés à proximité de la membrane du RE, mais ce clivage va entrainer leur destruction et donc la régulation négative de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. Ce processus est nommé RIDD (*Regulated IRE1 Dependant Decay*) et a pour principal but la diminution de la quantité d'ARNm adressée aux ribosomes et donc une diminution mécanique de la synthèse protéique (Hollien et al., 2009).

Enfin, IRE1- α peut recruter via son domaine kinase de nombreux partenaires protéiques et notamment ASK1. Le domaine kinase d'IRE1- α participe à la phosphorylation de ASK1 et ainsi à l'activation de voies pro-inflammatoires telles que la voie JNK et la voie NF- κ B (Abdullah and Ravanan, 2018) (**Figure 22**).

La structure et les fonctions d'IRE1- α , protéine centrale dans ce travail de thèse, seront précisées plus loin.

8.5.2 PERK

En conditions de stress du RE, PERK (protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase) est une protéine transmembranaire de type I qui peut s'oligomériser et s'autophosphoryler au niveau de son domaine kinase cytosolique. Le domaine kinase de la protéine a pour principale fonction la régulation négative de la translation des protéines à travers la phosphorylation d'eIF2 α (eukaryotic translation initiator factor-2) au niveau de la sérine 51. La phosphorylation d'eIF2 α réduit l'induction de la traduction de nombreuses protéines et donc entraîne mécaniquement une baisse de la charge de protéines entrant dans le RE d'une cellule stressée. Cette phosphorylation permet également l'activation de la production du facteur de transcription ATF4. ATF4 active la synthèse de nombreux gènes impliqués dans l'équilibre oxydatif, le métabolisme des acides aminés, la synthèse protéique, l'apoptose et l'autophagie (Harding et al., 2000; Hetz and Papa, 2018). ATF4 participe également au rétablissement de la synthèse protéique à travers une boucle de rétrocontrôle activant GADD34, une phosphatase qui va participer à la déphosphorylation d'eIF2 α et ainsi rétablir la traduction des ARNm en protéines après que le stress du RE soit résolu (**Figure 22**).

8.5.3 ATF6

En cas de stress du RE, la protéine ATF6 (activating transcription factor 6) migre de la membrane du RE à l'appareil de Golgi via des vésicules contenant COP-II. Dans l'appareil de Golgi, le domaine cytoplasmique d'ATF6 est phosphorylé et clivé par deux protéases (S1P et S2P) pour libérer un fragment basic leucine zipper (bZIP), facteur de transcription actif appelé ATF6p50 qui est transloqué dans le noyau et induit l'expression de nombreux gènes. Ces gènes codent notamment pour des protéines chaperonnes (GRP94, PDIA4) et des enzymes permettant la dégradation des protéines mal repliées (HERPUD1), activant la translocation dans le RE, la maturation et le repliement des protéines. ATF6p50 entraîne également une augmentation de la taille du RE et de l'appareil de Golgi dans le but de faire face au stress du RE. De nombreux gènes cibles d'ATF6p50 sont également régulés par XBP1s, le facteur de transcription en aval d'IRE1- α , ATF6p50 activant notamment la transcription du gène de XBP1 démontrant ainsi l'interconnectivité des voies de l'UPR (**Figure 22**). Les souris déficientes en ATF6 sont viables contrairement aux souris Ire1- α ou Xbp1 déficientes qui meurent à un stade embryonnaire précoce (Hetz and Papa, 2018; Shoulders et al., 2013).

9 IRE1- α : structure, régulation et fonction

9.1 Structure de IRE1- α chez les mammifères

La structure de IRE1- α est composée de trois domaines de fonctions distinctes. Un domaine N-ter orienté dans la lumière du RE, un segment transmembranaire, et enfin un domaine cytosolique subdivisé en un domaine Sérine/Thréonine (Ser/Thr) kinase et un domaine C-ter endoribonucléasique. Le domaine luminal de IRE1- α contient deux interfaces : la première crée un dimère doublement symétrique contenant un sillon profond, tandis que la deuxième permet une oligomérisation du récepteur. Le sillon formé à travers la première interface constitue la région centrale de détection du stress du dimère qui présente une symétrie architecturale avec le CMH-I (complexe majeur d'histocompatibilité de type I). Cette configuration permettrait la liaison directe de peptides non repliés au domaine luminal de IRE1- α , participant ainsi à son activation (**Figure 23**) (Siwecka et al., 2021).

La région cytosolique de IRE1- α se compose de deux parties principales : le domaine kinase et le domaine ribonucléase structurellement continu localisé à l'extrémité C-ter de la molécule. Le domaine de la protéine kinase (résidus 571-832) a un repliement bilobal avec un site de liaison à l'ATP situé dans la fente entre le feuillet β en N-ter et le lobe α -hélicoïdal en C-ter, il comprend également une hélice C (résidus 603-623) et le segment d'activation (résidus : 711-741). Les résidus centraux (720-729) du segment d'activation de la kinase contiennent un site de phosphorylation potentiel en Ser724, tandis que le domaine RNase (résidus 835-963) a une conformation hélicoïdale (**Figure 23**) (Lee et al., 2008; Siwecka et al., 2021).

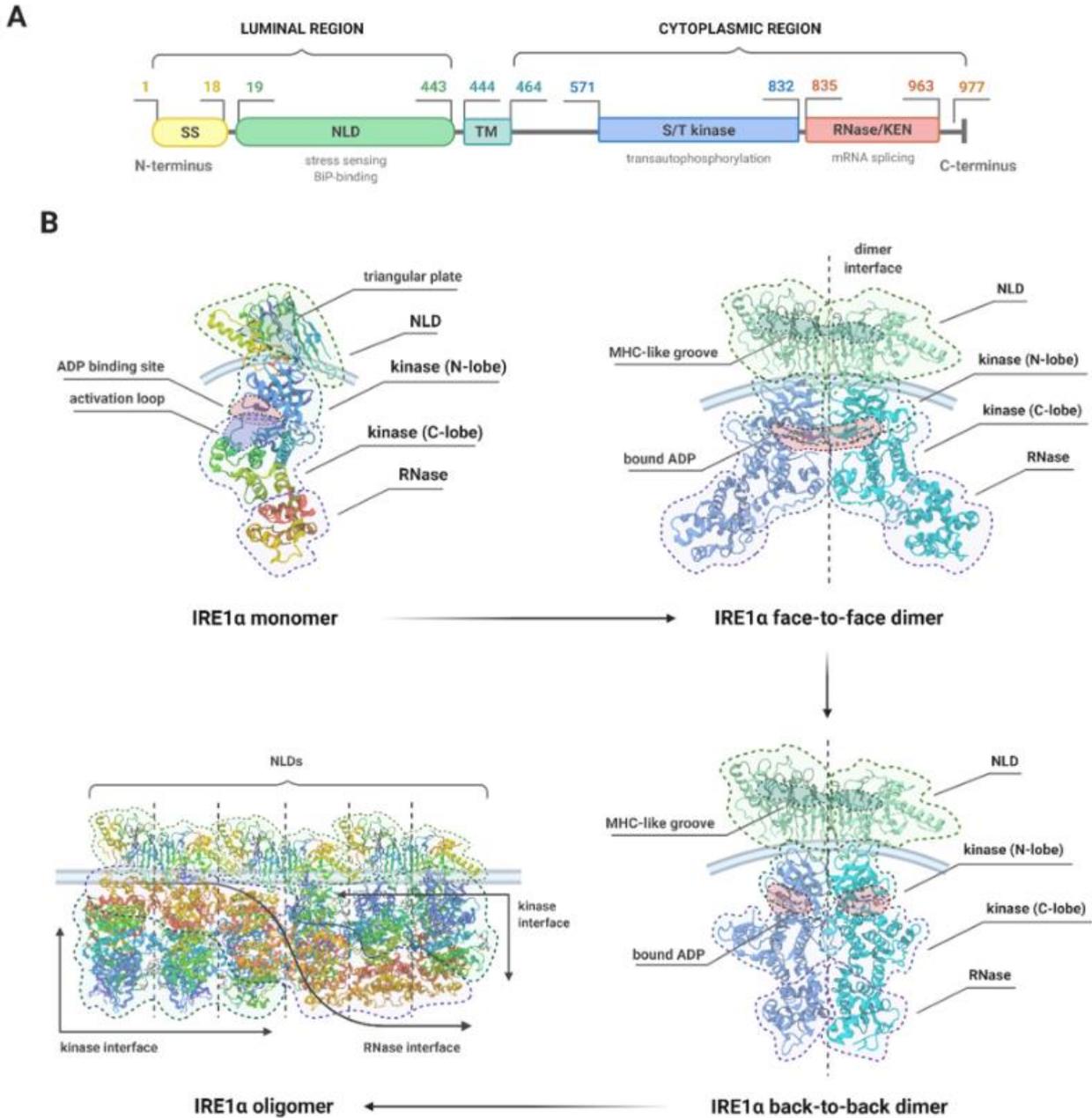


Figure 23. Aperçu de la structure moléculaire de IRE1- α (A) et des changements structuraux survenant lors de son activation (B). (A) À l'extrémité N-terminale, on trouve une séquence signal (SS) de 18 acides aminés et le domaine luminal N-terminal (NLD) constitué de trois feuillets β formant une plaque triangulaire. La région transmembranaire (TM) et les domaines sérine/thréonine kinase (S/T kinase) et endoribonucléase (RNase) de la région cytoplasmique se composent principalement d'hélices α , et le domaine RNase s'étend jusqu'à l'extrémité C-terminale de la protéine IRE1- α . (B) Lors de l'activation, les domaines luminaux s'oligomérisent, amenant les domaines kinase cytosoliques en juxtaposition, permettant ainsi la trans-autophosphorylation de IRE1- α et la liaison des cofacteurs. Il en résulte l'activation de la protéine kinase, un changement de conformation de « face à face » à « dos à dos », et l'induction de l'activité ribonucléase. Les dimères activés s'oligomérisent ensuite.

(Siwecka et al, 2021)

9.2 Activation de IRE1- α

Depuis la découverte de Ire-1 chez la levure et de son homologue IRE1- α chez les mammifères, un modèle d'activation unique était proposé. Dans ce modèle indirect, la protéine chaperonne BiP (aussi connue sous le nom Grp78 et HSPA5) était le médiateur principal de l'activation de l'UPR et des trois voies de réponse (IRE1- α , PERK et ATF-6). Ainsi, dans ce premier modèle (**Figure 24 à gauche**), l'association de BiP au domaine luminal de IRE1- α empêche la dimérisation spontanée des monomères de IRE1- α et maintient donc la protéine dans un état inactif. L'affinité de BiP étant plus forte pour les protéines mal repliées accumulées que pour le domaine luminal de IRE1- α , une situation de stress du RE entraîne la libération de BiP, permettant ainsi la dimérisation du récepteur IRE1- α et l'activation des domaines kinases par autophosphorylation. Dans un modèle indirect alternatif plus récent, BiP agirait comme un détecteur. En effet, la liaison des protéines mal repliées à son domaine de liaison au substrat (*Signal Binding Domain* ou SBD) pourrait transmettre, par l'intermédiaire de son domaine ATPase, des signaux à IRE1- α . Une fois dissociée de IRE1- α , BiP participerait alors au repliement des protéines et à la résolution du stress du RE (Carrara et al., 2015; Kopp et al., 2018).

Ce modèle relativement simple et indirect de la régulation de IRE1- α par BiP a évolué récemment et il est maintenant suggéré que IRE1- α est couplée à un réseau complexe de protéines chaperonnes dans la lumière du RE. Dans ce modèle, toujours indirect, la liaison de BiP à IRE1- α est médiée par la co-chaperonne ERdj4 (ou DNAJB9) et fonctionne comme une boucle de recyclage afin de garder IRE1- α dans une configuration monomère inactive (**Figure 24 au milieu en bleu**). Des études d'interactome ont aussi permis d'identifier HSP47 (SERPINH1), une chaperonne spécifique du collagène, en tant que partenaire d'IRE1- α qui faciliterait la dissociation de BiP et l'activation de IRE1- α (Urrea et al., 2020; Woehlbier and Hetz, 2011). Un autre partenaire, l'enzyme disulfure isomérase PDIA6, modifierait la signalisation de IRE1- α via une interaction avec des résidus cystéine oxydés spécifiques dans la lumière du RE. Récemment, il a été montré que la protéine PDI phosphorylée (également connue sous le nom de PDIA1) interagit directement avec le domaine luminal de IRE1- α , réduisant ainsi son activité en cas de stress du RE (Yu et al., 2020). Ces résultats suggèrent que l'activation de IRE1- α est médiée par de nombreuses chaperonnes situées dans la lumière du RE,

permettant une fine régulation de la capacité du RE à répondre au stress (Urrea et al., 2020) (**Figure 24**).

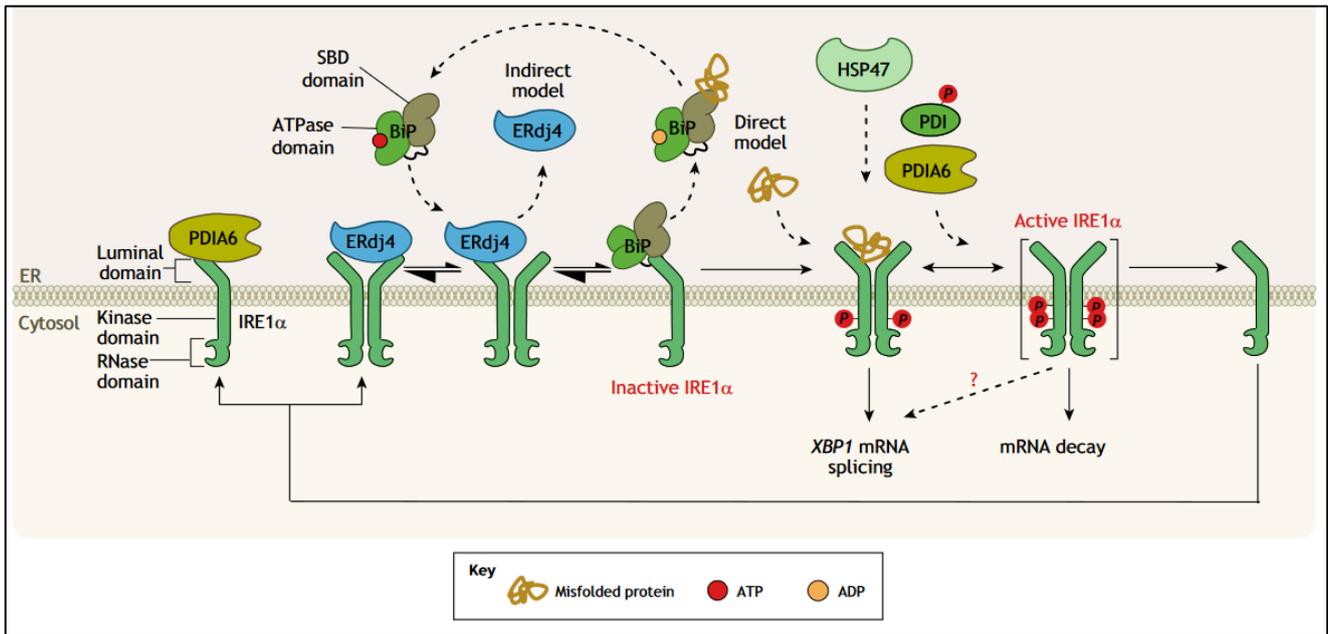


Figure 24. Détection du stress du RE par IRE1- α (modèle indirect et modèle direct). IRE1- α est maintenue dans un état réprimé et monomérique par son association avec le domaine ATPase de BiP (vert clair) par un mécanisme de recyclage qui implique ERdj4. ERdj4 peut se lier au domaine luminal de IRE1- α , ce qui entraîne le recrutement de BiP. L'interaction entre ERdj4 et le domaine de liaison au substrat (SBD) de BiP (en vert kaki) entraîne l'activation du domaine ATPase de BiP et la dissociation de ERdj4. Ensuite, BiP est libérée du domaine luminal de IRE1- α permettant son interaction avec les protéines mal repliées lors d'un stress du RE. Les protéines mal repliées vont alors s'arrimer au SBD de BiP, déclenchant la dissociation de IRE1- α par régulation allostérique (modèle indirect). De plus, les protéines mal repliées peuvent interagir directement avec le domaine luminal de IRE1- α , favorisant la dimérisation de IRE1- α (modèle direct). Ces événements entraînent l'auto-transphosphorylation du domaine kinase de IRE1- α , ce qui induit un changement conformationnel de son domaine RNase permettant son activation. En plus du mécanisme de régulation médié par BiP et ERdj4, l'activation de IRE1- α pourrait être régulée par d'autres chaperonnes, telles que HSP47 et PDIA6, qui pourraient renforcer la signalisation de IRE1- α , ou par PDIA1 (également connue sous le nom de PDI) qui pourrait inhiber l'activité de IRE1- α . HSP47 peut également se lier à BiP et la déplacer du domaine luminal de IRE1- α , permettant ainsi la liaison de protéines mal repliées.

(Urrea et al, 2020)

Le deuxième modèle d'activation est un modèle direct (**Figure 24 à droite**) : il fait intervenir la structure particulière du domaine luminal de IRE1- α qui partage des similarités avec la structure du CMH de type I lorsqu'il est associé sous forme de dimère. D'après les travaux de cristallographie, cette structure ne permet pas la liaison d'un peptide en termes de volume et de positionnement. Cependant, des études *in vitro* ont démontré que les protéines mal repliées peuvent se lier au domaine luminal de IRE1- α , induisant un réarrangement de la structure tridimensionnelle et facilitant la dimérisation du récepteur. Il a été démontré que des mutations spécifiques d'un fragment hydrophobe (WLLI³⁵⁹⁻³⁶² vers GSGS³⁵⁹⁻³⁶²) à l'interface du dimère perturbaient le processus de liaison et d'oligomérisation, et que cela entraînait l'abolition de l'activation de IRE1- α (Karagöz et al., 2017; Siwecka et al., 2021). Pour appuyer cette théorie, il est intéressant de noter qu'une récente étude suggère que le domaine luminal de PERK serait aussi capable de lier des peptides directement (Wang et al., 2018b). Ces modèles restent âprement discutés, des travaux contradictoires contredisant l'un ou l'autre modèle (Oikawa et al., 2009; Urra et al., 2020).

Une dernière voie d'activation de IRE1- α impliquerait le métabolisme des bicouches lipidiques (non représenté sur la **Figure 24**). Les premières études à l'origine de la découverte de cette protéine ont montré que IRE1- α était impliquée dans le métabolisme de l'inositol. Une composition aberrante des membranes du RE activerait IRE1- α (Halbleib et al., 2017). Le domaine transmembranaire de IRE1- α est indispensable à l'activation du récepteur en cas de perturbation du métabolisme des bicouches lipidiques. *A contrario*, le domaine luminal n'est pas nécessaire à son activation. Un mécanisme similaire existerait pour l'activation de ATF6. En plus du domaine transmembranaire d'IRE1- α , une hélice amphipathique adjacente serait nécessaire pour détecter le stress lipidique. Les mécanismes d'activation de l'UPR seraient donc couplés à d'autres fluctuations du métabolisme cellulaire et iraient au-delà de sa fonction de réponse à l'accumulation de protéines mal repliées (Radanović and Ernst, 2021; Siwecka et al., 2021; Urra et al., 2020).

9.3 Régulation de IRE1- α

Plusieurs mécanismes de régulation de l'activité de IRE1- α ont été décrits dans la littérature, mais ces mécanismes restent souvent discutés notamment du fait que la majorité des études ont été réalisées dans des modèles de surexpression *in vitro* d'IRE1- α . Près de 95 % des interactants décrits dans la littérature ont été définis à l'aide de systèmes de surexpression. Cependant, 48 % d'entre eux ont également été validés au niveau des protéines endogènes ou dans des systèmes sans cellules avec des composants purifiés pour détecter les interactions directes (Urrea et al., 2020). Les différents régulateurs de l'activité de IRE1- α ont fait l'objet de plusieurs revues de la littérature (Hetz et al., 2020; Urrea et al., 2020). Nous allons brièvement décrire certains mécanismes de régulation (**Figure 25**).

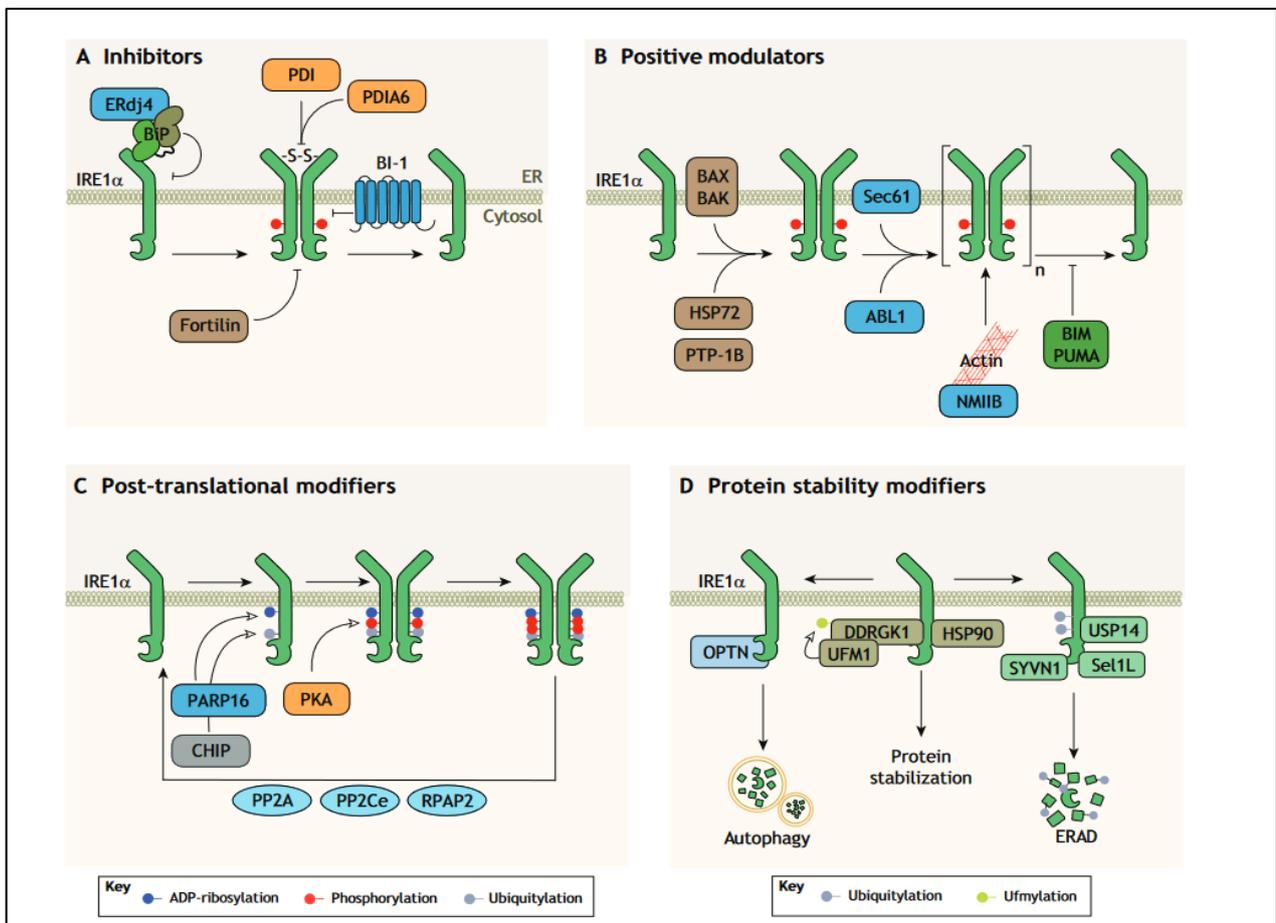


Figure 25. Les différentes voies de régulation de l'activité de IRE1- α . L'activité de IRE1- α est régulée par de nombreuses protéines qui interagissent avec elle et forment des complexes protéiques. A) Inhibiteurs de IRE1- α , diminution de l'activité et modification de l'oxydation de résidus. B) Régulateurs positifs, notamment inducteurs de l'oligomérisation du récepteur. C) Modificateurs post-traductionnels (phosphorylation, déphosphorylation, ubiquitinylation (CHIP), ADP-ribosylation (PARP16)). D) Régulation de la stabilité de la protéine.

(Hetz et Papa, 2018)

9.3.1 Inhibiteurs cytosoliques

Bax inhibitor-1 (TMBIM6) est un régulateur négatif de IRE1- α qui s'associe à son domaine cytosolique pour former un complexe inhibant son activation. La protéine Fortilin (TPT1) est un autre régulateur cytosolique, elle peut interagir directement avec les domaines kinase et/ou ribonucléase d'IRE1- α pour les inhiber et réduire la susceptibilité des cellules à entrer en apoptose. Une caractéristique commune des régulateurs négatifs de IRE1- α est qu'ils bloquent son activation prolongée, empêchant l'engagement dans des processus d'apoptose sous stress du RE chronique (Urrea et al., 2020) (**Figure 25A**).

9.3.2 Modulateurs positifs

BAX et BAK (membres de la famille BCL-2) faciliteraient la dimérisation de IRE1- α pendant son activation, BIM et PUMA stabiliseraient le dimère et la prolongation de la réponse IRE1- α . Ces données ont été confirmées dans des modèles *in vivo*. Sec61, un des composants de la machinerie du translocon, forme un complexe avec IRE1- α au niveau de la membrane du RE, et recrute l'ARNm non épissé de XBP1 (XBP1u) grâce à un pseudo-domaine présent dans la chaîne protéique en cours de synthèse. Sec61 régulerait aussi l'équilibre structural entre dimère et oligomère de IRE1- α (Sundaram et al., 2018). Un article récent de la même équipe a montré que IRE1- α forme un complexe indépendant du stress du RE avec le complexe Sec61 et que ce complexe est indispensable à la liaison de BiP au domaine luminal de IRE1- α . Sec61 régulerait l'activation de IRE1- α en recrutant BiP. Ainsi, dans un modèle cellulaire Sec63 déficient, IRE1- α reste actif lors d'un stress du RE prolongé (Li et al., 2020). Une étude d'interactome a montré que IRE1- α se lie à plusieurs protéines et ARN ribosomiques qui font partie d'un complexe appelé particule de reconnaissance du signal (PRS), ce complexe se lie à la séquence signal d'un peptide nouvellement synthétisé lorsqu'il émerge du ribosome. Cette liaison entraîne le ralentissement de la synthèse protéique connu sous le nom d'"arrêt de l'élongation", ce qui facilite le couplage des processus de traduction et de translocation des protéines. (Acosta-Alvear et al., 2018). Ces travaux indiquent que IRE1- α est à proximité immédiate et en interaction avec la machinerie de la traduction protéique afin de finement réguler le stress du RE (**Figure 25B**).

9.3.3 Modifications post-traductionnelles

La phosphorylation de IRE1- α est essentielle à son activité. Plusieurs sites de phosphorylation existent dans la structure de la protéine : au niveau du domaine transmembranaire, de la boucle d'activation et du domaine RNase. La phosphorylation de résidus au niveau de la boucle d'activation permet d'améliorer l'accessibilité des substrats ARN au domaine RNase et facilite ainsi l'épissage de XBP1s et la fonction RIDD. La protéine kinase A peut phosphoryler IRE1- α au niveau du résidu Ser724 indépendamment d'un stress du RE. Le niveau de phosphorylation de IRE1- α est régulé par de nombreuses phosphatases telles que PP2A (Phosphatase protein 2A) ou PP2Ce. Certaines modifications post-traductionnelles telles que la S-nitrosylation de IRE1- α au niveau des résidus cystéines réguleraient l'activation du domaine RNase, l'ubiquitinylation activerait la voie JNK et certaines caspases pourraient réguler l'expression de IRE1- α (**Figure 25C**). Ces données restent parcellaires, surtout obtenues *in vitro* et sont donc à confirmer dans des modèles *in vivo* plus complexes (Hetz et al., 2020).

9.3.4 Contrôle de la stabilité de IRE1- α

La régulation de la stabilité de IRE1- α est aussi un moyen de réguler son activité (**Figure 25D**). Par exemple, la synoviline peut ubiquitinyler IRE1- α et induire sa dégradation (Gao et al., 2008). L'ubiquitine D (UBD) peut également s'associer à IRE1- α et de ce fait impacter l'activation de la voie JNK (Brozzi et al., 2014). Un des composants du complexe Ufm1 capable également d'ubiquitinylation interagit aussi avec la protéine IRE1- α et altère sa stabilité par des modifications non covalentes de type ufmylation (Liu et al., 2017). IRE1- α peut être une cible des mécanismes de l'ERAD (*Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*) via USP14 ou l'optineurin. L'ERAD désigne une voie cellulaire qui cible les protéines mal repliées du réticulum endoplasmique en vue de leur ubiquitination puis de leur dégradation par le protéasome (Qi et al., 2017). Dans certains modèles de cancer, IRE1- α peut être clivée par des caspases. Enfin, HSP90 peut stabiliser la protéine en interagissant avec son domaine cytosolique (Hetz and Papa, 2018).

9.4 Voies de signalisation médiées par IRE1- α chez les mammifères

9.4.1 XBP1s

L'ARNm de XBP1 est le principal substrat de IRE1- α dans les cellules de mammifères, et représente l'homologue de Hac1 chez la levure. L'ARNm de XBP1 non épissé (XBP1u) code pour une protéine très instable et c'est la forme épissée de l'ARNm (XBP1s) qui va être traduite en un facteur de transcription actif XBP1. Contrairement à Hac1, la forme non épissée de XBP1 est capable d'être traduite à un faible degré. Plusieurs études de mutagenèse dirigée ont permis de décrire les mécanismes d'épissage de XBP1, la caractéristique de la séquence signal de six nucléotides CUGCAG et de la séquence intronique de 26 nucléotides qui est épissée. À la suite du retrait de la séquence de 26 nucléotides (**Figure 26**) par le domaine ribonucléase d'IRE1- α , la ligase RtcB, une enzyme située à proximité du RE, est recrutée afin de terminer l'épissage (Yoon et al., 2019).

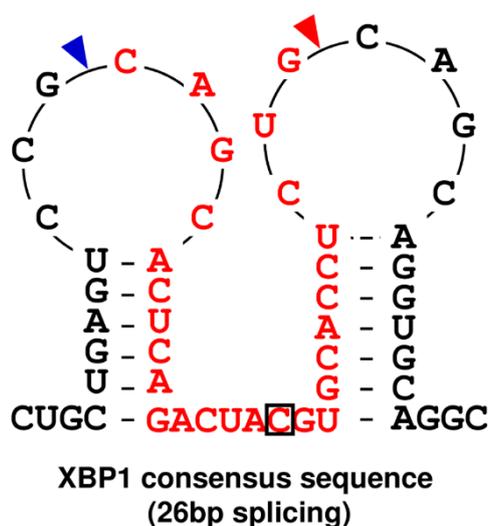


Figure 26. Séquence intronique épissée par IRE1- α dans l'ARNm de XBP1.

(Yoon et al, 2019)

Un cofacteur du complexe ARNt, l'archeaise, s'est révélé être un élément important dans l'épissage de XBP1. La suppression combinée de RtcB et de l'archeaise est nécessaire afin de bloquer l'épissage de XBP1. Un modèle est proposé aujourd'hui dans lequel la protéine XBP1u forme un complexe avec RtcB et IRE1- α , permettant le clivage de l'ARNm de XBP1, puis RtcB procéderait à la ligation des deux extrémités. XBP1u posséderait un domaine hydrophobe HR2, important pour son association à la membrane du RE et essentiel à l'épissage de l'ARNm de XBP1 en permettant le

recrutement du complexe Sec61/Sec63 mentionné précédemment, régulant ainsi l'activation d'IRE1- α et l'épissage de l'ARNm de XBP1 (**Figure 27**) (Bashir et al., 2020; Yanagitani et al., 2009).

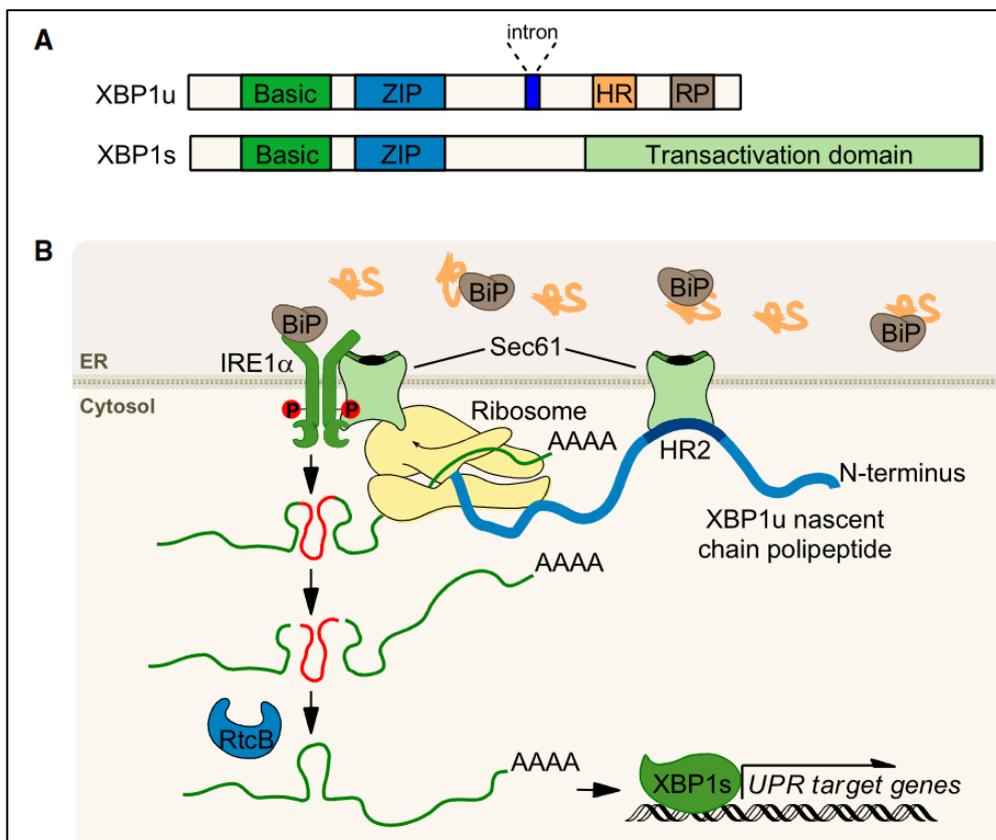


Figure 27. Épissage de XBP par IRE1- α . (A) Structure primaire de XBP1u et XBP1s. La région hydrophobe (HR) et la séquence "ribosome pausing" (RP) sont mises en évidence, en plus des domaines impliqués dans la régulation transcriptionnelle. (B) Lorsque l'ARNm de XBP1 non épissé est traduit chez les mammifères, une HR sur le peptide naissant permet l'adressage de l'ARNm de XBP1u en train d'être traduit vers la membrane du RE, favorisant sa transformation par IRE1- α active. Cette réaction est complétée par la RtcB ligase. Le ciblage de l'ARNm de XBP1u vers la membrane du RE dépend de l'interaction physique entre IRE1 et le translocon Sec61.

(Hetz et Papa, 2018)

XBP1s est un facteur de transcription transloqué au niveau du noyau et active de nombreux gènes impliqués dans l'homéostasie cellulaire (**Figure 28**) (Park et al., 2021). Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans les mécanismes de dégradation des protéines (*EDEM1* notamment), de la synthèse des lipides, de repliement et de maturation des protéines (*DNAJB9* par exemple) ou pour des chaperons (par exemple, p58IPK codée par le gène *DNAJC3*) mais aussi des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-4). XBP1 est aussi un régulateur de la voie IRE1- α . XBP1 est un gène maître de la différenciation plasmocytaire agissant en aval de Blimp-1 et indispensable à la sécrétion

d'immunoglobulines (Martinon et al., 2010; Reimold et al., 2001; Shaffer et al., 2004). L'absence de XBP1 est létale au stade embryonnaire chez la souris *Xbp1* ^{-/-}. Si la fonction principale de XBP1 semble être de résoudre le stress du RE à travers la liaison à une séquence promotrice TGACGTGG, il semble qu'une activation prolongée du stress du RE et l'accumulation de XBP1 dans le noyau entraînent sa liaison à une autre séquence promotrice non canonique TGACGTGA présente dans le gène *KLF9*. Cette liaison entraîne des modifications de l'équilibre calcique de la cellule et l'activation de l'apoptose (Fink et al., 2018). Des virus tels que le VSV et le HSV utilisent XBP1 pour induire la mort cellulaire. XBP1 est un élément indispensable à la survie cellulaire et au développement de l'organisme (Bashir et al., 2020).

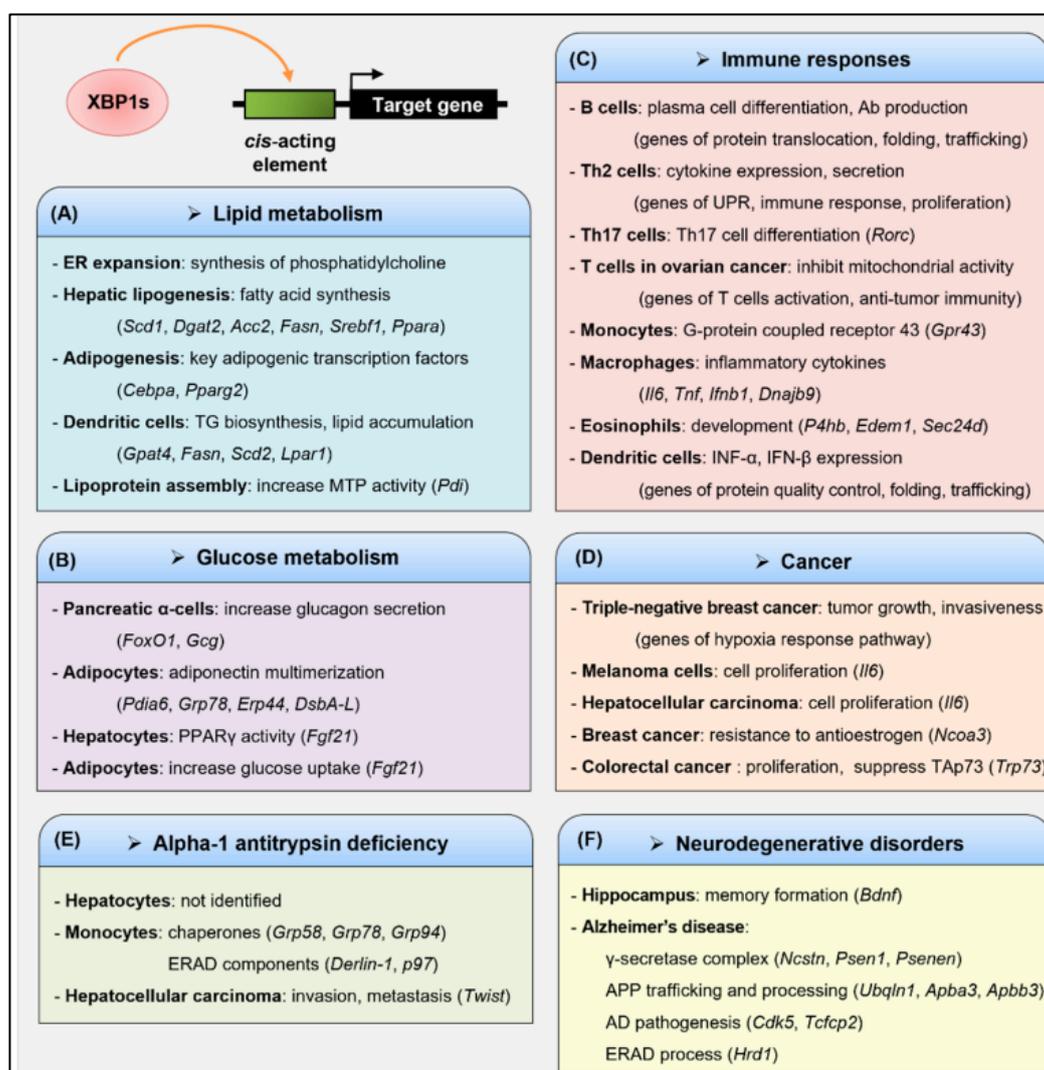


Figure 28. Gènes cibles de XBP1s. XBP1s régule la transcription de nombreux gènes impliqués dans des voies de signalisation différentes spécifiques des stimuli et du type cellulaire. XBP1 joue un également rôle dans de nombreuses pathologies. Les voies de signalisation et les gènes représentés ici ont été associés de manière directe ou indirecte à la fonction de XBP1 dans la littérature.

(Park et al, 2021)

9.4.2 RIDD

La voie RIDD reste encore mal connue et son impact sur l'homéostasie du RE est encore à éclaircir. Il a cependant été démontré qu'elle régule de nombreux processus cellulaires de manière spécifique à la cellule et au stimulus. Les deux isoformes IRE1- α et IRE1- β peuvent activer la voie RIDD, mais IRE1- β activerait plus facilement cette voie que son paralogue. IRE1- β possède un acide aminé au niveau de son domaine kinase qui empêcherait la phosphorylation et l'oligomérisation du récepteur (Grey et al., 2020). Le clivage par IRE1- α dépend d'un motif commun CUGCAG présent dans l'ARNm codant XBP1, mais aussi sur toutes les autres cibles du RIDD, au niveau d'une séquence de nucléotides formant une boucle. Plus de 37 substrats du RIDD ont été décrits dans la littérature, la majorité des substrats représentent des protéines localisées au niveau du RE, certaines cibles sont des protéines co-chaperonnes (ERGIC3, BLOC1S1), d'autres sont impliquées dans la présentation antigénique du CMH-I (Tapasine et TAP-1). L'ARNm μ S de la chaîne lourde des IgM sécrétés est également une cible connue du RIDD (Tang et al., 2018). L'activation du RIDD entrainerait la diminution mécanique de la synthèse protéique et donc éviterait l'accumulation de ces protéines dans le RE en cas de stress (Maurel et al., 2014). Il est intéressant de noter que l'efficacité du ciblage de RIDD montre une corrélation spécifique au type de cellule et également avec le type d'inducteur de stress du RE. Par exemple, l'ARNm de *Blos1* est dégradé avec plus d'efficacité dans les cellules traitées au DTT (dithiothréitol, agent réducteur formant des ponts disulfures) que celles traitées à la thapsigargine (inhibiteur de la SERCA, perturbant l'équilibre calcique du RE). Son niveau de dégradation est également différent entre des cellules HEK293T et des cellules HepG2 (Moore and Hollien, 2015).

Récemment, la nécessité de la présence de l'endomotif CUGCAG dans les séquences des ARNm dégradés par la fonction ribonucléase de IRE1- α a été remise en question. En effet, grâce à une technique de séquençage de nouvelle génération permettant de distinguer les ARNm fraîchement transcrits du pool total d'ARNm cellulaire, les auteurs de l'étude ont observé que IRE1- α dégrade non seulement les substrats RIDD contenant l'endomotif classique, mais aussi de multiples ARNm ne possédant pas de telles séquences consensus, identifiés comme cibles d'un processus qu'ils ont appelé "RIDD lacking endomotif" (RIDDLE) (Le Thomas et al., 2021). Cette dernière découverte accentue encore la complexité de la réponse de IRE1- α et des voies métaboliques régulées par cette protéine.

9.4.3 Activation de JNK et NF- κ B

La dernière voie de signalisation de IRE1- α est médiée par le domaine kinase de la protéine. L'autophosphorylation de IRE1- α permet son interaction avec la protéine adaptatrice TRAF2 (TNFR-associated factor 2) activant ASK1 (Apoptosis signal regulating kinase 1) et la voie JNK (c-Jun N terminal kinase), entraînant l'engagement de la cellule vers l'apoptose en cas de stress prolongé du RE (Arshad et al., 2013; Nishitoh et al., 2002; Urano et al., 2000) (**Figure 29**). IRE1- α interagit également avec la protéine NCK, induisant l'activation de la voie NF- κ B et renforçant le signal d'apoptose de la cellule en cas de stress prolongé (Nguyễn et al., 2004). Ces voies de signalisation participeraient principalement au stade terminal de la réponse UPR, lorsque le stress du RE persiste sans résolution (Darling and Cook, 2014; Hetz and Papa, 2018). Mais il a été montré que l'activation de la voie JNK médiée par IRE1- α peut aussi activer l'autophagie et ainsi participer à la résolution du stress du RE en éliminant les agrégats protéiques intra-cellulaires, illustrant ici encore la dualité du rôle d'IRE1- α (positif ou négatif) dans la survie cellulaire (Ogata et al., 2006; Wu et al., 2021).

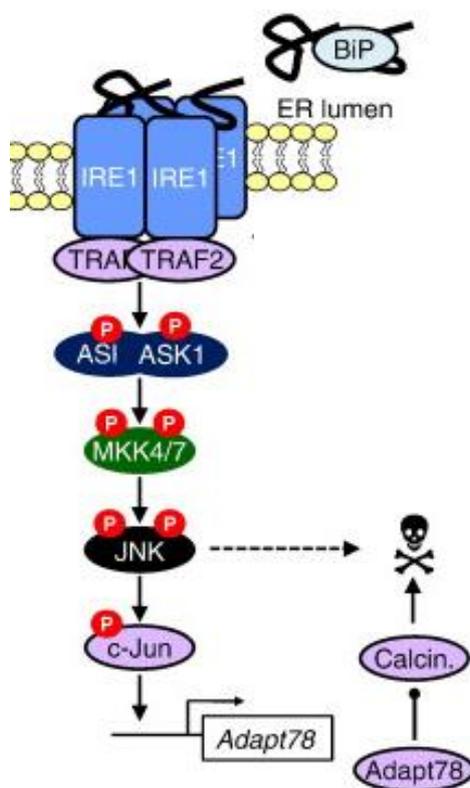


Figure 29. Le stress du RE favorise l'activation de JNK dépendante de IRE1- α . L'oligomérisation de TRAF2 dépendante d'IRE1- α active la signalisation ASK1-MKK4/7-JNK, qui peut favoriser la survie par l'expression de Adapt78 dépendante de c-Jun et l'inhibition de la calcineurine (calcin.) ou au contraire peut favoriser la mort cellulaire.

(Darling and Cook, 2014)

9.4.4 Activité séquentielle de IRE1- α

Une hypothèse actuelle relate que l'UPR et IRE1- α seraient régulées de manière séquentielle en fonction de la durée et de la sévérité du stress du RE (van Anken et al., 2021; Hetz, 2012; Hetz and Papa, 2018; Hetz et al., 2020; Woehlbier and Hetz, 2011). Ce modèle reste parcellaire et est largement débattu aujourd'hui.

Une première phase est régie par les mécanismes de réduction de la charge du RE. Durant cette phase, la quantité de protéines mal conformées est réduite par la dégradation des nouveaux ARNm à destination du RE par le RIDD, et la dégradation des protéines mal conformées du RE par induction de l'autophagie via la voie JNK. La seconde phase intervient par l'activation du facteur de transcription XBP1s. Il va induire la production de lipides pour augmenter la taille du RE afin d'augmenter sa capacité de stockage de protéines et va permettre d'augmenter l'expression des protéines chaperonnes et des protéines impliquées dans l'ERAD. Ces premières phases visent à rétablir l'homéostasie du RE.

Lorsque le stress du RE perdure malgré les contre-mesures induites par l'UPR, une phase de transition intervient. Cette troisième phase permettrait d'induire « l'UPR terminal », un changement de transcription destiné à induire l'apoptose de la cellule où l'épissage de XBP1 est diminué mais où le RIDD persiste. Il a été démontré que l'oligomérisation de IRE1- α en cas de stress du RE prolongé induit l'activation d'un certain nombre de protéines pro-inflammatoires et pro-apoptotiques. Par exemple, lorsque IRE1- α est hyperactivée, son domaine RNase clive certains microARN dont la fonction est de réprimer des gènes cibles pro-apoptotiques, comme la protéine pro-oxydante TXNIP (thioredoxin-interacting protein) (Upton et al., 2012). Le clivage de ces microARN entraîne l'augmentation rapide des niveaux de TXNIP, ce qui active alors l'inflammasome NLRP3 et sa voie pro-apoptotique dépendante de la Caspase-1 (Lerner et al., 2012a). La persistance de l'activation de IRE1- α entrainerait également l'activation conjointe des voies JNK et NF- κ B favorisant l'induction des voies de l'apoptose intrinsèque de la cellule (Hetz and Papa, 2018). La voie JNK favorise l'activation des caspases 3 et 9 en régulant les protéines de la famille Bcl-2. L'activation de NF- κ B promeut également par exemple la production autocrine de TNF- α et l'apoptose (Junjappa et al., 2018).

10 IRE1- α et système immunitaire

10.1 IRE1- α et cellules immunitaires

La protéine IRE1- α joue un rôle essentiel dans de nombreuses cellules immunitaires. Les cellules immunitaires ont souvent des fonctions sécrétrices importantes, avec une taille de RE conséquente et une susceptibilité plus importante aux toxines, pathogènes et pathologies, inducteurs de stress du RE. L'UPR joue notamment un rôle important dans les cellules dendritiques et les LB, mais d'autres cellules immunitaires ont également besoin d'une fonction complète de IRE1- α . IRE1- α et XBP1s sont des régulateurs importants du cycle cellulaire et de la différenciation des cellules hématopoïétiques (Junjappa et al., 2018; Reimold et al., 2001; Zhang et al., 2005).

La délétion conditionnelle de XBP1s au niveau hématopoïétique (à l'aide du promoteur Vav1-Cre) chez la souris entraîne une diminution de la maturation des éosinophiles et une diminution de leur viabilité (Bettigole et al., 2015). La fonction de IRE1- α est requise pour l'infiltration des neutrophiles et l'inhibition de XBP1s dans les neutrophiles altère la fonction pro-inflammatoire de ces cellules (Hu et al., 2015). IRE1- α et XBP1s sont essentiels à la production optimale et soutenue de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages (**Figure 30**). En effet, la perte de XBP1s dans les macrophages altère la production d'IL-6, de TNF- α , d'IFN- β , d'IL1- β et de CCL2 (C-C motif chemokine ligand 2). IRE1- α jouerait également un rôle important dans la polarisation des macrophages, tandis que XBP1s et BiP sont impliqués dans la différenciation des monocytes en macrophages (Martinon et al., 2010). De plus, la voie IRE1- α /XBP1s a une importance dans le développement des monocytes en ostéoclastes en réponse à RANKL.

Un article récent a montré que la voie IRE1- α /XBP1s médie la prolifération des cellules NK par la régulation directe de c-Myc. En outre, XBP1s favorise la phosphorylation oxydative des cellules NK. Cela indique que XBP1s serait essentiel pour une fonction cytotoxique optimale des cellules NK (Dong et al., 2019).

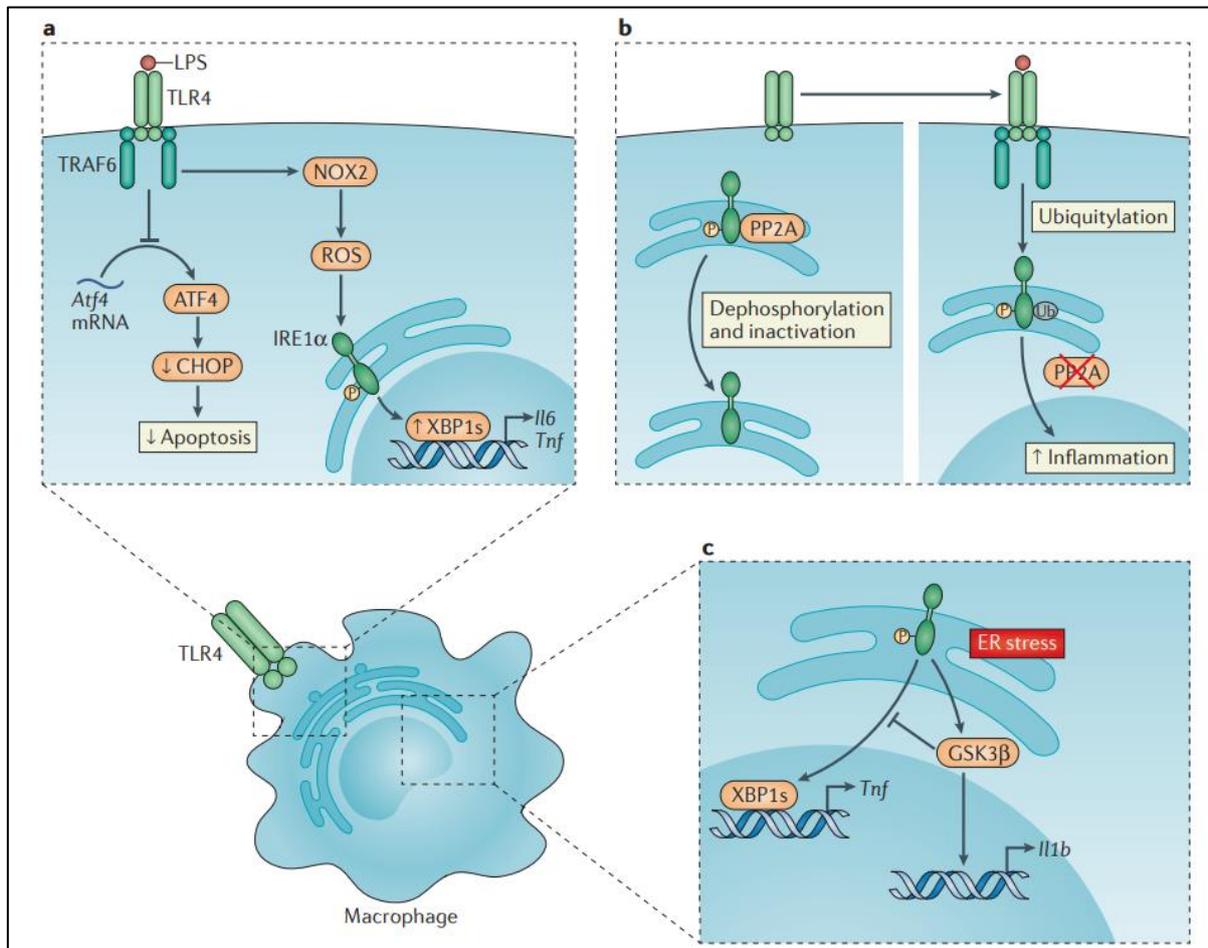


Figure 30. La signalisation du TLR4 et de l'UPR coordonne les réponses immunitaires dans les macrophages.

a) Lors de l'activation du récepteur TLR4, IRE1- α est activée par un mécanisme qui nécessite le recrutement de TRAF6 au TLR4 et la production de ROS par NOX2. XBP1s fonctionne comme un facteur de transcription pour les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF α . Dans une voie distincte, l'activation de ATF4 est inhibée par le TLR4, ce qui diminue les niveaux de la protéine CHOP et l'apoptose dans les macrophages activés. Cela favorise la survie des macrophages et facilite ainsi la réponse immunitaire. b) En l'absence de signalisation TLR4, IRE1- α phosphorylée est soumise à une déphosphorylation et une inactivation médiée par PP2A. Cependant, lors de l'activation du TLR4, TRAF6 interagit avec IRE1- α et catalyse son ubiquitination, ce qui empêche la déphosphorylation et l'inactivation d'IRE1- α par PP2A, amplifiant ainsi l'inflammation. c) A l'inverse, l'activation de IRE1- α induite par le stress du réticulum endoplasmique peut également induire la transcription d'IL-1 β par l'intermédiaire de GSK3 β , qui inhibe l'épissage de XBP1 et donc la transcription des gènes cibles de XBP1s, y compris TNF α , agissant comme un rétrocontrôle.

(Grootjans et al, 2016)

10.2 IRE1- α et cellules dendritiques

IRE1- α joue un rôle particulièrement important dans les cellules dendritiques (**Figure 31**). En effet, la voie IRE1- α /XBP1s est constitutivement active et la perte de XBP1s entraîne une baisse du nombre de DC en activant l'apoptose de ces cellules. La perte d'expression de XBP1s est particulièrement délétère dans la sous-population des pDC mais affecte également le développement des DC conventionnelles, que l'on nommera DC dans ce chapitre. En effet, Iwakoshi *et al.* ont montré que la délétion spécifique de XBP1 dans les DC provoque une réduction globale du nombre de DC avec un effet plus sévère chez les pDC, probablement due à une sensibilité accrue à l'apoptose pendant la différenciation (Iwakoshi *et al.*, 2007). De plus, la surexpression de XBP1s, par transduction lentivirale de progéniteurs hématopoïétiques, améliore le développement des DC dans des souris WT mais rétablit également le nombre et la fonction des DC chez les souris XBP1 KO conditionnelles, confirmant l'importance de la voie pour leur survie et leur développement. L'observation de la présence d'une production forte de XBP1s dans les DC WT permet de poser l'hypothèse selon laquelle la voie XBP1 permettrait d'inhiber l'apoptose naturelle des DC en cours de développement. Dans les DC CD8a⁺, l'absence de IRE1- α et de XBP1s provoque des anomalies structurelles qui ne semblent pas affecter leur fonction sécrétoire. En revanche, leur fonction de présentation croisée des antigènes aux LT CD8⁺ est fortement impactée (Grootjans *et al.*, 2016; Osorio *et al.*, 2018; So, 2018). De façon similaire aux LB, l'activation de la voie XBP1s dans les pDC semble permettre le développement du système de sécrétion de la cellule en augmentant la taille du RE avant que la différenciation en pDC ne soit terminée. Un défaut d'activation de cette voie provoque donc une diminution de la production d'IFN de type I par ces pDC (Hu *et al.*, 2011; Tavernier *et al.*, 2017).

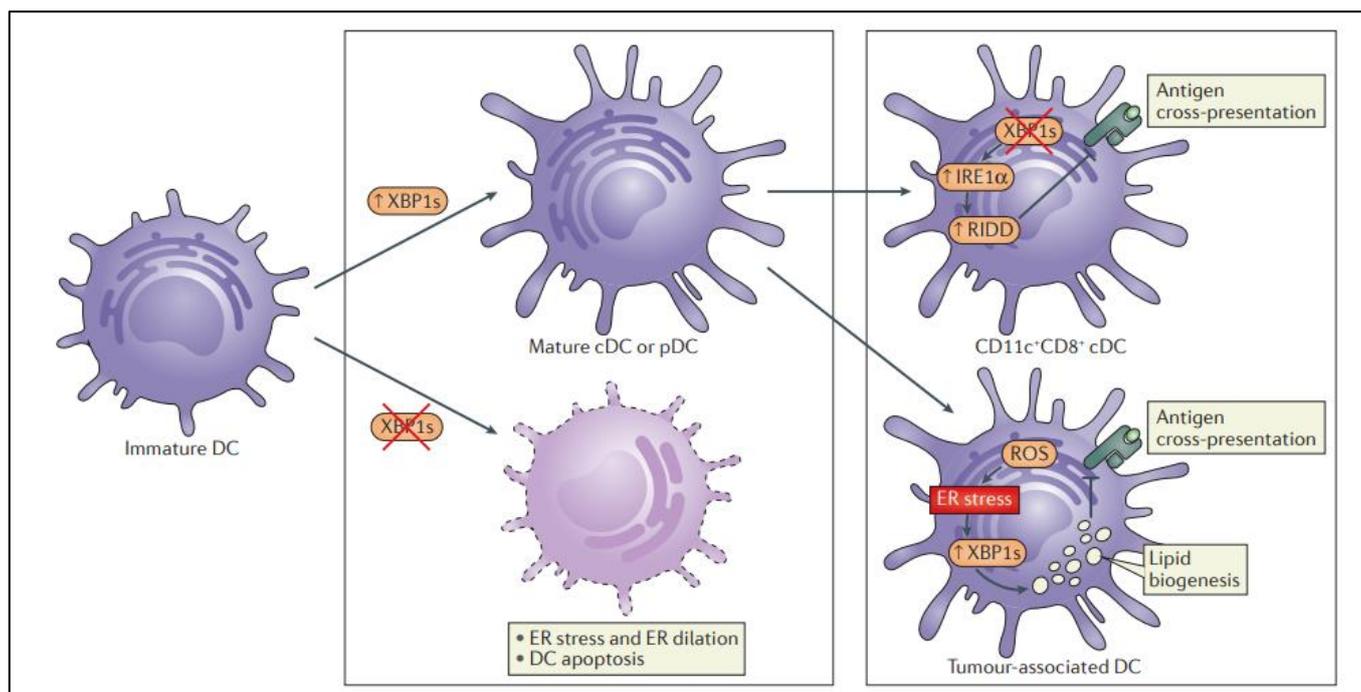


Figure 31. XBP1s joue un rôle crucial dans la différenciation et la fonction des DC. XBP1s est nécessaire à la différenciation des cellules dendritiques conventionnelles (cDC) et des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) à partir de progéniteurs immatures. La perte de XBP1s dans les cellules progénitrices abroge la maturation et diminue la survie des DC. La délétion de XBP1 dans les DC CD11c⁺ matures entraîne une hyperactivation de IRE1- α , l'activation du RIDD et la dégradation des composants de la machinerie de présentation croisée des antigènes médiée par le CMH de classe I ; ainsi le stress du RE dans les DC interfère avec leur fonction. En revanche, l'augmentation de XBP1s en réponse à la production de ROS dans les DC conduit à une augmentation de la biogénèse des lipides qui est associée à l'augmentation de l'activité des DC.

(Grootjans et al, 2016)

10.3 IRE1- α et lymphocytes T

IRE1- α et XBP1s sont actifs aux premiers stades de développement de différentes sous-populations de LT, les LT CD4⁺, les LT CD8⁺, et les LT cytotoxiques. XBP1s serait également nécessaire à la différenciation terminale des LT CD8⁺ effecteurs (Kamimura and Bevan, 2008). Le rôle de l'UPR et de IRE1- α dans les LT restent pour l'heure moins clairement identifiés que dans les lymphocytes B, mais il est désormais démontré que la phosphorylation de PERK et l'activation de sa voie de signalisation jouent un rôle dans la différenciation des LT CD4⁺ en LTh2 (Pramanik et al., 2018; Scheu et al., 2006). XBP1s a, quant à lui, un rôle important dans la différenciation en LTh17 et ce type de LT auxiliaire est souvent associé aux maladies inflammatoires et auto-immunes (So, 2018). En effet, la délétion conditionnelle de XBP1 dans les lymphocytes B et T (modèle Rag1 conditionnel Rag1^{Cre}XBP1^{fl/fl}) empêche le développement d'une auto-immunité dépendante des LTh17 dans un modèle murin d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (Brucklacher-Waldert et al., 2017).

10.4 IRE1- α et lymphocytes B

Le rôle de IRE1- α et XBP1s dans les lymphocytes B et les plasmocytes est décrit depuis très longtemps (**Figure 32**). IRE1- α est nécessaire au développement des LB dans la moelle osseuse à un stade précoce mais aussi lors de la différenciation plasmocytaire, comme montré par les travaux de Zhang *et al* en 2005, à l'aide d'un modèle Rag2 déficient reconstitué avec des CSH de souris IRE1- α déficientes (Zhang et al., 2005). D'après cette étude, le domaine cytoplasmique d'IRE1- α contenant le domaine kinase et le domaine ribonucléase est essentiel à la différenciation des LB. Le rôle de IRE1- α dans les LB s'est grandement complexifié et de nouvelles hypothèses proposent maintenant que IRE1- α pourrait jouer un rôle directement dans la sélection des LB en favorisant la survie lors des mécanismes de sélection des progéniteurs (van Anken et al., 2021).

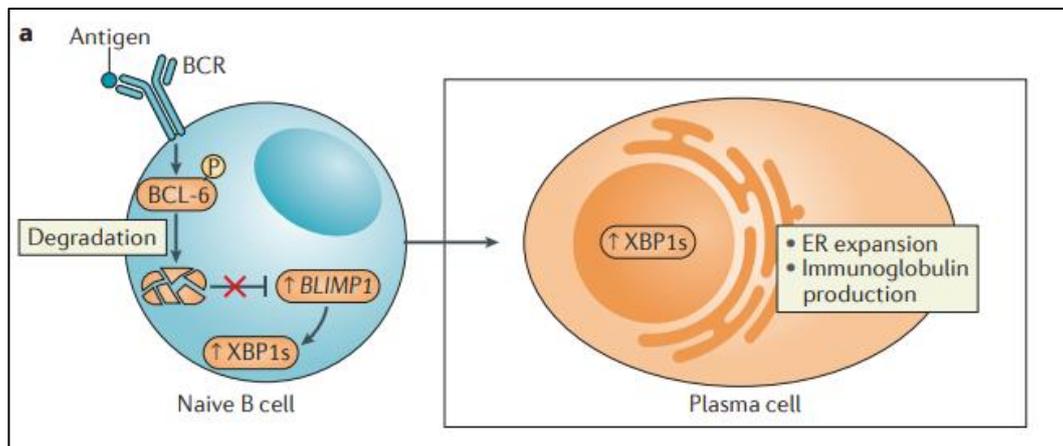


Figure 32. XBP1s joue un rôle crucial dans la différenciation des plasmocytes L'activation du BCR induit la phosphorylation de BCL-6, puis son ubiquitinylation et sa dégradation. La dégradation de BCL-6 active la synthèse de BLIMP1 dans les LB naïfs et active les voies de signalisation essentielles au développement des plasmocytes. Ces programmes comprennent l'UPR et l'épissage de XBP1s, nécessaires à l'expansion du réticulum endoplasmique (RE) et à l'augmentation de la synthèse des protéines (immunoglobulines).

(Grootjans et al, 2016)

Concernant la différenciation plasmocytaire, une ancienne hypothèse proposait que l'axe IRE1- α /XBP1s était nécessaire à ce processus du fait de l'augmentation de synthèse des immunoglobulines. La première description du rôle essentiel de XBP1s dans les plasmocytes a été réalisée en 2001 par l'équipe du Pr. Glimcher (Reimold et al., 2001). Dans cette étude, ils ont pu observer que le KO complet de XBP1 n'était pas viable. Ils ont ainsi étudié un modèle de souris Rag2 KO reconstituées avec des cellules souches hématopoïétiques XBP1s déficientes et observé un blocage quasi-complet de la différenciation plasmocytaire. Ils ont aussi observé que l'induction de

l'expression de XBP1s dans une lignée de LB active la différenciation plasmocytaire. En 2003, l'équipe de Laurie Glimcher a observé que la voie IRE1- α /XBP1s est activée après le début de la différenciation plasmocytaire et que l'absence d'expression de la chaîne lourde des Ig entraîne une diminution de l'expression de XBP1 *in vitro* : ils en ont conclu que la synthèse d'Ig mal repliées pourrait activer la synthèse de XBP1s (Iwakoshi et al., 2003). Cependant, XBP1 serait déjà activé antérieurement à la synthèse d'immunoglobulines d'après les travaux de Gass *et al.* réalisés *in vitro* dans une lignée cellulaire de LB (CH12) (Gass et al., 2002). De plus, XBP1 a été décrit comme un gène agissant en aval de Blimp-1 dans la cascade de gènes maîtres de la différenciation plasmocytaire (Shaffer et al., 2004). Tandis que les LB déficients en XBP1s se développent normalement et forment des centres germinatifs après activation, ils sont cependant incapables de sécréter des immunoglobulines (Reimold et al., 2001; Taubenheim et al., 2012). Des travaux ultérieurs ont confirmé que l'augmentation de XBP1s était antérieure à la synthèse d'immunoglobulines et que l'absence de synthèse d'Ig (dans un modèle murin KO pour la chaîne lourde des IgM) n'empêchait pas l'augmentation de l'épissage de XBP1 (Hu et al., 2009). La diminution de la synthèse d'immunoglobulines en cas de déficit en XBP1s serait en fait liée à une hyperactivation de la fonction RIDD de IRE1- α qui entraîne une dégradation de l'ARNm de la chaîne lourde de la forme sécrétée des IgM (μ S) (van Anken et al., 2014; Benhamron et al., 2014).

Des mutations ponctuelles de IRE1- α ont déjà été étudiées dans la littérature. Une étude récente a montré que l'absence de XBP1 dans les LB induisait la phosphorylation de IRE1- α au niveau du résidu S729. La mutation S729A de cette protéine augmente l'expression de l'ARNm μ S dans les LB et la production d'IgM chez les souris immunisées, indiquant un rôle important de la phosphorylation du résidu S729 sur la fonction RIDD de la protéine IRE1- α (Tang et al., 2018). L'activation de la voie IRE1- α /XBP1s dans les plasmocytes en cours de différenciation provoquerait également la répression spécifique de la voie PERK, montrant que des signaux immunitaires pouvaient réguler les inducteurs de l'UPR (Ma et al., 2010). L'axe PERK n'est, quant à lui, pas indispensable à la différenciation plasmocytaire (Gass et al., 2008) et XBP1s favoriserait la différenciation plasmocytaire en antagonisant PERK et en donnant la possibilité à la cellule d'augmenter en taille et en production (Shaffer et al., 2004).

10.5 IRE1- α : implications dans les réponses immunitaires

IRE1- α est impliqué dans de nombreuses voies de régulation du système immunitaire, elle module la sécrétion de nombreuses cytokines et chimiokines. L'activation de IRE1- α dans les cellules immunitaires et les cellules stromales peut réguler la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et l'IL-6 particulièrement, mais aussi l'IL-23, l'IFN- β et le TNF- α (Junjappa et al., 2018). IRE1- α participe ainsi au processus inflammatoire, potentiellement de façon pathologique. Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans ce processus. En effet, la fonction kinase de IRE1- α peut recruter TRAF2 et ainsi activer la voie JNK (Urano et al., 2000). Cette voie est connue pour être pro-inflammatoire, notamment en stimulant la production d'IL-6. IRE1- α active également les récepteurs NOD1/2, des récepteurs de l'immunité innée détecteurs de motifs bactériens qui induisent aussi la libération de l'IL-6 par interaction avec la sérine/thréonine-protéine kinase 2 (RIPK2) (Keestra-Gounder et al., 2016). De plus, l'activation de IRE1- α déclenche la phosphorylation d'I κ B α kinase (IKK) (l'inhibiteur de NF- κ B), ce qui entraîne sa dégradation, l'activation de NF- κ B et la libération de TNF- α et d'interleukines pro-inflammatoires (Tam et al., 2012). Une étude a observé que l'inhibition de IRE1- α a réduit la production d'IL-1 β dans un modèle *in vitro* de cellules épithéliales pulmonaires. Enfin, dans un modèle murin d'athérosclérose, le modèle ApoE déficient, l'inhibition de IRE1- α par le composé 4 μ 8c a réduit la sécrétion d'IFN- γ et la réponse LTh1 en inhibant directement l'activation de l'inflammasome NLRP3 et a ainsi réduit l'inflammation et la progression de la maladie (Tufanli et al., 2017).

L'activité RIDD de IRE1- α activerait la production d'IFN de type I via la production de fragments d'ARN activant la protéine RIG-I (Eckard et al., 2014; Lencer et al., 2015). Mais l'action du RIDD dégrade aussi miR-17, un micro-ARN qui a pour cible l'ARNm codant pour TXNIP. Cela entraîne une augmentation de la stabilité de TXNIP, participe à l'activation de l'inflammasome NLRP3 et induit finalement la production d'IL-1 β et d'IL-18. Cette voie de signalisation est impliquée dans des pathologies inflammatoires et métaboliques variées (Junjappa et al., 2018; Lerner et al., 2012a).

Les voies du RIDD et de XBP1s jouent également un rôle dans la présentation antigénique via le CMH-I par les DC (Osorio et al., 2018). Par exemple, l'ARNm du gène TAPBP est une cible du RIDD et cette protéine est un composant important des mécanismes de la présentation antigénique. Par ailleurs, la synthèse de XBP1s, induite par IRE1- α , dans les cellules épithéliales des voies respiratoires augmente la quantité de miRNA-346 (microARN-346), qui lui-même inhibe la traduction du

transporteur de peptides antigéniques 1 (TAP1), une protéine impliquée dans l'assemblage des sous-unités du CMH de classe I et des peptides (Bartoszewski et al., 2011). La réduction de TAP1 affecte la présentation antigénique liée au CMH-I. IRE1- α affecte donc l'activité des LT CD8⁺, en modifiant la présentation des peptides à ces cellules par le CMH-I au cours du processus de lyse cytotoxique (Junjappa et al., 2018; Osorio et al., 2018).

11 IRE1- α et pathologies auto-immunes

Le stress du RE a été associé aux manifestations auto-immunes et inflammatoires plusieurs fois dans la littérature (**Figure 33**) (Navid and Colbert, 2017), et plusieurs mécanismes pourraient entrer en jeu.

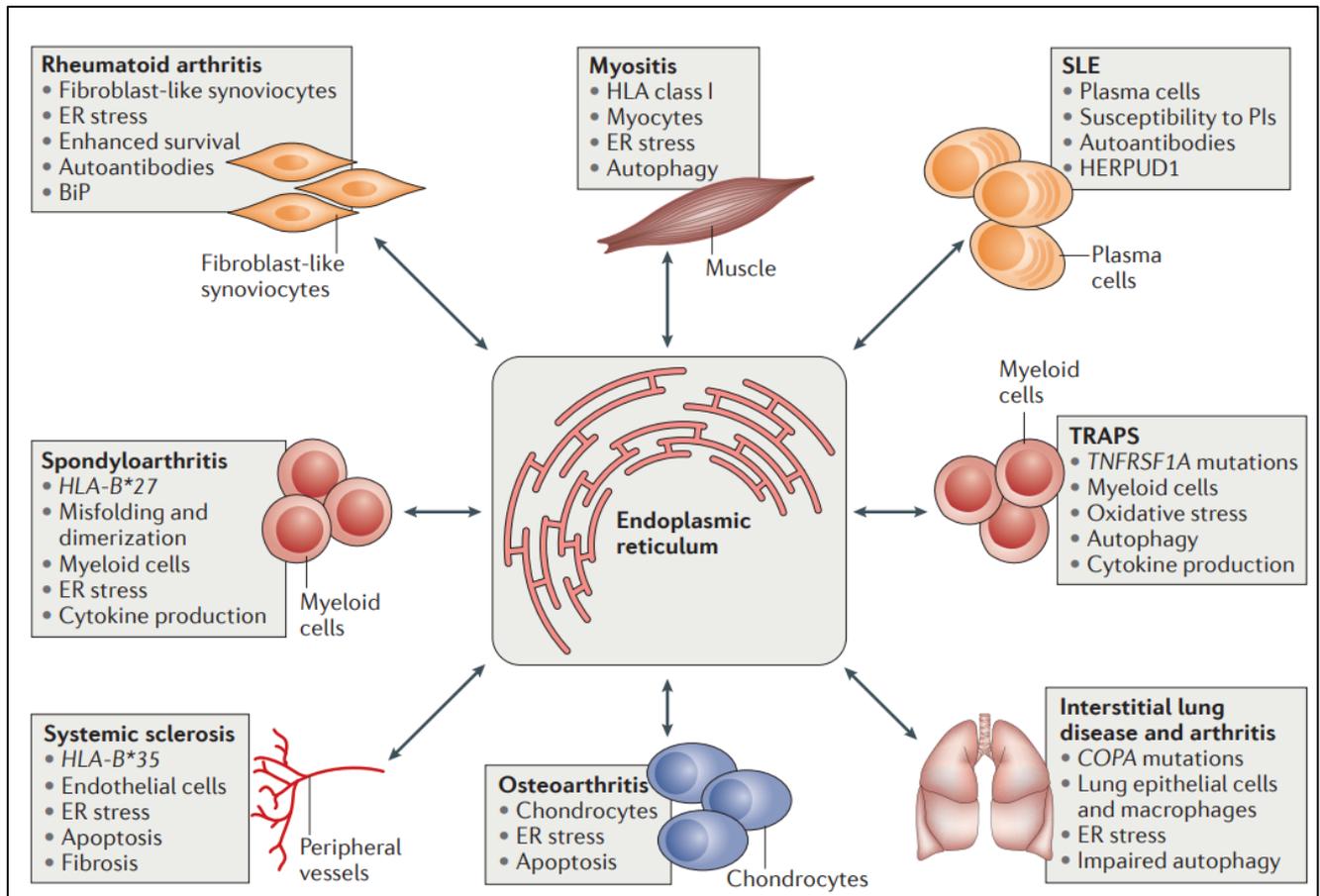


Figure 33. Rôles possibles du stress du réticulum endoplasmique dans les maladies rhumatismales. Les voies de signalisation du stress du réticulum endoplasmique (RE) entraînent des conséquences diverses sur les maladies. Sous chaque maladie rhumatismale, le produit du gène (le cas échéant), le type de cellule affecté et toute conséquence du stress du RE potentiellement pertinente pour la pathogenèse sont énumérés. HERPUD1, homocysteine-responsive ER-resident ubiquitin-like domain member 1 protein ; PIs, protease inhibitors ; SLE, systemic lupus erythematosus ; TRAPS, TNF receptor-associated periodic syndrome.

(Navid et al, 2016.)

Le premier mécanisme, dans lequel des protéines mal repliées peuvent générer une réponse auto-immune, a été observé chez les souris Akita, un modèle expérimental du diabète de type 1, diabète auto-immun. Une mutation ponctuelle dans le gène de l'insuline (Ins2, C96Y) entraîne un mauvais repliement de la proinsuline, un précurseur de l'insuline, et son accumulation dans les

cellules β du pancréas, ce qui conduit à l'activation de l'UPR, à l'inflammation et finalement à l'apoptose des cellules β . L'inhibition de IRE1- α préserve la survie cellulaire et réduit la perte des cellules β (Ghosh et al., 2014). Dans le cas de la spondylarthrite ankylosante, la protéine HLA-B27 est susceptible d'être mal repliée dans certaines formes de la maladie (**Figure 34 a**). La protéine HLA-B27 anormalement repliée est impliquée dans l'auto-immunité de deux manières : soit elle est exprimée à la surface des cellules en tant qu'auto-antigène, induisant une réponse auto-immune, soit elle provoque une réponse immunitaire pro-inflammatoire en activant l'UPR intracellulaire (Colbert et al., 2014; Junjappa et al., 2018). En cas d'UPR prolongée, l'apoptose médiée par IRE1- α pourrait contribuer également à la réponse auto-immune, car les cellules apoptotiques contenant des auto-antigènes induiraient la production d'auto-anticorps (Guo et al., 2015; Kuhn et al., 2014)

Un second mécanisme possible serait que la protéine chaperon GRP78 (ou BiP) agirait comme un auto-antigène (**Figure 34 b**). L'axe IRE1- α /XBP1s peut contribuer à ce processus en augmentant le niveau d'expression de GRP78 pendant le stress du RE. Dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde (PR), une forte expression de BiP dans la synovie activerait de manière sélective les LT et participerait aux dommages tissulaires (Yoo et al., 2012). De manière intéressante, des auto-anticorps anti-GRP78 ont été observés chez 30 à 80 % des patients atteints de PR (Corrigall et al., 2001; Navid and Colbert, 2017).

Un troisième mécanisme consisterait à réguler la présentation des antigènes et à affecter la fonction des cellules LTh1. Le RE joue un rôle très important dans la présentation antigénique par le CMH-I. Comme évoqué plus haut, IRE1- α régule la tapasine et la protéine TAP, protéines essentielles dans les mécanismes de présentation de peptides au CMH-I. Une perturbation de la présentation antigénique par le CMH-I peut entraîner le développement d'une maladie auto-immune (Riedhammer and Weissert, 2015). De façon intéressante, IRE1- α pourrait également être impliquée dans la pathogenèse de l'athérosclérose par la production d'IL-18 et d'IL-1 β . Les cytokines IL-1 β et IL-18 jouent un rôle important dans la polarisation de la réponse LTh-1. L'infiltration de ces LTh-1 producteurs d'IFN- γ a été impliquée dans le développement de l'activité auto-immune dans des modèles murins d'athérosclérose, de sclérose en plaques et de diabète de type 1 auto-immun (**Figure 34 c**) (Junjappa et al., 2018; Liu et al., 2019).

Un quatrième mécanisme impliquerait une augmentation de l'efficacité de l'ERAD dans les cellules autoréactives et ainsi favoriserait leur survie, renforçant la réponse auto-immune (**Figure 34**

d). La voie IRE1- α /XBP1s augmente l'expression de plusieurs protéines associées au RE et contribue au rétablissement de l'homéostasie, améliorant ainsi la survie cellulaire. La suractivation de IRE1- α et XBP1s régulent à la hausse les gènes de l'ERAD et les gènes importants pour le repliement des protéines, comme EDEM1 et la protéine disulfure isomérase-P5, ce qui favoriserait la survie de cellules autoréactives dans des modèles d'arthrite inflammatoire ou auto-immune. Par exemple, dans un modèle murin présentant une surexpression de la synovioline (enzyme participant à la dégradation des protéines mal repliées dans le RE), une arthropathie avec hyperplasie synoviale se déclare. A l'inverse, dans un modèle induit d'arthrite (injection de collagène), la diminution de l'expression de la synovioline via un modèle KO hétérozygote présente un effet protecteur et une diminution des symptômes. L'hypothèse serait qu'un excès d'élimination des protéines mal repliées favoriserait la croissance cellulaire des synoviocytes dans les articulations (Gao et al., 2008; Yamasaki et al., 2005).

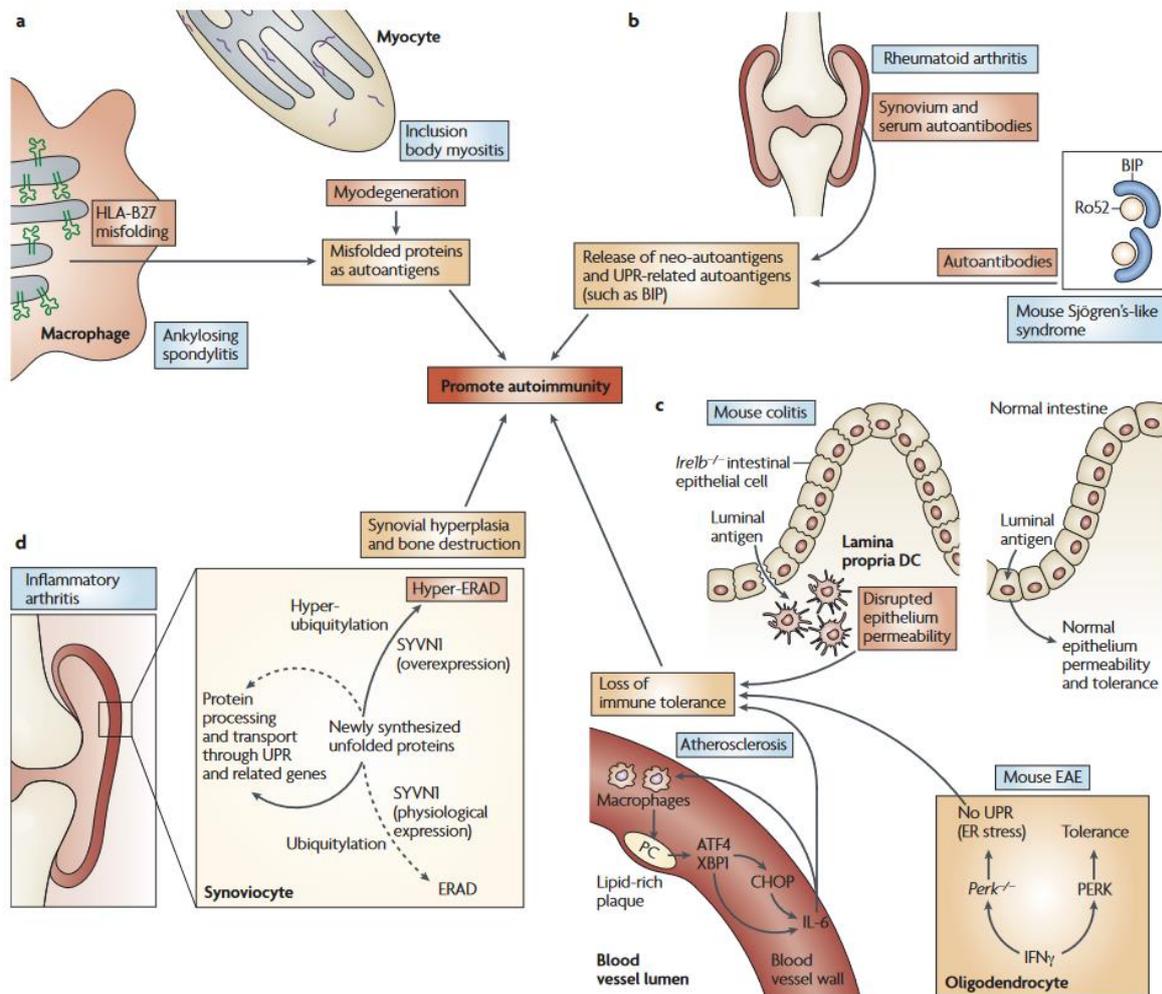


Figure 34. Mécanismes potentiels par lesquels l'UPR pourrait favoriser le développement d'une auto-immunité. a) Les protéines mal repliées peuvent elles-mêmes agir comme des auto-antigènes dans des modèles murins de spondylarthrite ankylosante et de myosite à inclusions associés au HLA-B27. En surchargeant l'UPR et en permettant l'accumulation de protéines mal repliées, les cellules peuvent déclencher une auto-immunité. b) Les gènes liés à l'UPR peuvent eux-mêmes agir comme des auto-antigènes, comme le suggère la présence d'auto-anticorps spécifiques de BIP (Binding Immunoglobulin Protein) chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et dans un modèle murin du syndrome de Sjögren. c) Les voies défectueuses de l'UPR dans les cellules non immunitaires peuvent encore permettre l'auto-immunité en surchargeant les mécanismes normaux de tolérance. Cela peut être le cas au niveau de l'épithélium intestinal, du système nerveux central et de l'endothélium vasculaire, où il a été démontré que des voies UPR défectueuses chez la souris participent au développement de colites, d'athérosclérose et d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE). d) La régulation à la hausse de l'ERAD peut permettre aux cellules autoréactives d'échapper à l'apoptose médiée par l'UPR ou leur conférer un avantage de survie. Un tel mécanisme, appelé "hyper-ERAD", a été proposé dans un modèle murin d'arthrite inflammatoire dans lequel la synovioline (SYVN1) est surexprimée de manière ubiquitaire.

ATF4, facteur de transcription activateur 4 ; CHOP, protéine homologue de la protéine de liaison CCAAT/enhancer ; DC, cellule dendritique ; IL-6, interleukine-6 ; IFN, interféron ; Ire1, inositol-requiring transmembrane kinase/endonuclease 1 ; PC, phosphorylcholine ; PERK, pancreatic ER kinase ; XBP1, X-box binding protein 1.

(Todd, Glimcher et al. 2008)

12 IRE1- α et lupus érythémateux systémique

Récemment, plusieurs études ont tenté d'établir un lien entre le stress du RE et la physiopathologie du LES. HERP, une protéine associée au stress du RE, semble avoir une activité immunogène et activer la production d'auto-anticorps anti-ADNdb chez les patients lupiques. Une caractérisation par PCR quantitative des gènes liés au stress du RE dans les cellules immunitaires (PBMCs) de patients atteints de LES a mis en évidence une perturbation des gènes de l'UPR avec une augmentation de l'expression de XBP1 et une baisse de l'expression de CHOP et de IRE1- α (Wang et al., 2014b). Par ailleurs, l'apoptose des cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse de patients atteints de LES s'est avérée être médiée par la voie IRE1- α /JNK/Bax alors que le blocage du stress du RE inhibe l'apoptose de ces cellules chez les patients lupiques (Guo et al., 2015).

Trois publications récentes ont montré que l'axe IRE1- α /XBP1s peut jouer un rôle important dans la physiopathologie du LES et qu'il pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique d'intérêt. Dans un premier article, les auteurs ont utilisé le modèle pristane, un modèle murin de lupus inductible. Ce modèle consiste à injecter par voie intrapéritonéale une dose d'huile minérale (le pristane) qui induit la lyse cytotoxique des cellules et la libération massive d'auto-antigènes, la production d'IFN de type I et d'auto-anticorps entraînant ainsi des lésions tissulaires, en particulier au niveau des reins (Freitas et al., 2017). Les auteurs ont traité les souris malades avec un inhibiteur de la fonction ribonucléase de IRE1- α , le STF083010, à raison d'une injection deux fois par semaine pendant 4 mois. Ce traitement a permis de diminuer significativement le nombre de cellules productrices d'anticorps (CD138⁺) et l'expression de marqueurs d'activation des LB (BAFF et CD40). Des réductions de la quantité d'auto-anticorps et des atteintes rénales ont également été observées dans le groupe traité au STF083010 (Xiang et al., 2020).

Dans une deuxième étude, les auteurs ont exploré le métabolisme des lipides dans les LB de patients lupiques et ils ont observé une accumulation de lipides dans les LB corrélée à une activité accrue de la voie IRE1- α /XBP1s. La suppression de IRE1- α dans le modèle murin spontané de lupus MRL.Fas^{lpr} diminue la sévérité de la maladie (diminution des auto-anticorps, réduction des atteintes viscérales) et cette diminution serait liée à une modification du métabolisme lipidique. De manière intéressante, les auteurs ont traité les souris MRL.Fas^{lpr} à l'aide d'un inhibiteur sélectif de IRE1- α

(Bl09, (Tang et al., 2014)) et ce traitement a permis de réduire significativement les symptômes d'atteintes glomérulaires et la production d'auto-anticorps (Zhang et al., 2021).

Une troisième équipe s'est intéressée à l'homéostasie des neutrophiles chez les patients lupiques. En effet, les neutrophiles sont connus pour jouer un rôle important dans la physiopathologie du lupus, notamment via le mécanisme de la NETose, qui correspond à un relargage de chromatine par les neutrophiles piégeant les pathogènes extracellulaires notamment. Il a été montré chez les patients atteints de LES que les neutrophiles peuvent être suractivés et que la NETose peut contribuer à l'exposition d'auto-antigènes et la production d'auto-anticorps. L'équipe de J.S. Knight a observé que les neutrophiles activés par le sérum de patients lupiques surexpriment IRE1- α et que l'activité de IRE1- α est corrélée à l'activité de la maladie (score SLEDAI). De plus, l'inhibition de IRE1- α permet de limiter la NETose médiée par les complexes immuns. Enfin, le traitement du modèle murin MRL.Fas^{lpr} avec un inhibiteur d'IRE1- α diminue l'expansion des plasmocytes, la production d'auto-anticorps mais aussi la production de radicaux oxygénés par les neutrophiles circulants (Sule et al., 2021).

Ces études indiquent que des anomalies de l'axe IRE1- α /XBP1s peuvent contribuer à la pathogenèse du LES et que cette voie pourrait représenter une cible intéressante pour le traitement de la maladie. Cependant, des travaux supplémentaires doivent être menés pour mieux apprécier le rôle d'IRE1- α dans la pathogenèse du LES.

AVANT-PROPOS DE MON PROJET DE THÈSE

La thématique globale de mon laboratoire d'accueil s'inscrit dans la recherche de l'étiologie génétique des maladies auto-immunes et du lupus en particulier. Le LES est une maladie auto-immune multi-systémique complexe et sévère, hétérogène sur le plan clinique et biologique, se caractérisant par la présence d'auto-anticorps, dont des auto-anticorps anti-nucléaires. L'étiologie génétique du LES est encore très mal connue. C'est dans cette optique que mon laboratoire d'accueil a travaillé en collaboration avec le laboratoire du Dr. F. Rieux-Laucat (Institut Imagine, Paris), dans le cadre d'un projet ANR (LUMUGENE).

L'équipe du Dr. Rieux-Laucat a identifié dans une famille comportant cinq membres présentant des pathologies auto-immunes et notamment un cas de LES, une mutation hétérozygote (C1780T, conduisant à la substitution R594C) dans l'exon 15 du gène *ERN1* codant pour la protéine IRE1- α (pour Inositol Requiring Enzyme 1 α). Cette mutation est présente chez quatre des sujets malades. L'hypothèse d'une transmission autosomale dominante a été retenue.

Comme présenté dans l'introduction, IRE1- α est une protéine transmembranaire du RE, possédant un domaine luminal senseur du stress du RE et deux domaines effecteurs cytoplasmiques kinase et ribonucléase. IRE1- α participe à la réponse UPR (pour Unfolded Protein Response ou réponse aux protéines mal repliées). Cette protéine est importante pour l'homéostasie des cellules à fortes activités sécrétrices, tels que les plasmocytes sécréteurs d'anticorps. Le stress du RE et l'UPR ont été associés à de nombreuses pathologies chez l'Homme, tels que des maladies neurodégénératives, des maladies pulmonaires, des atteintes cardiaques, mais aussi certains cancers, les diabètes de type 1 et 2, et des maladies inflammatoires. Un rôle de l'UPR dans les maladies rhumatismales telles que la polyarthrite rhumatoïde a déjà été identifié et il est fortement suspecté dans la sclérodermie et le LES (Junjappa et al., 2018; Navid and Colbert, 2017).

La mutation R594C est située dans le domaine kinase de la protéine IRE1- α (très homologue entre l'Homme et la souris) et des travaux *in silico* et *in vitro* réalisés par nos collaborateurs ont montré un effet délétère sur l'activité kinase et ribonucléase de IRE1- α .

Nous avons donc généré un modèle murin porteur de la mutation ponctuelle R594C, de façon à permettre une meilleure compréhension du rôle de ce mutant sur le système immunitaire et l'homéostasie lymphocytaire en particulier et finalement, sur le rôle que peuvent jouer IRE1- α et l'UPR dans le développement d'une auto-immunité systémique.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de la mutation R594C et de son impact sur la signalisation médiée par IRE1- α . Nous avons analysé l'activité kinase et ribonucléase de la protéine dans les lymphocytes murins spléniques.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé l'impact de la mutation sur l'homéostasie du système immunitaire. Nous avons analysé les populations de cellules des organes lymphoïdes primaires et secondaires. Ensuite, nous avons caractérisé l'impact de la mutation sur l'activation des LB, la différenciation plasmocytaire et la sécrétion d'immunoglobulines. Enfin, nous avons recherché des manifestations auto-immunes dans le modèle murin IRE1- α R594C (recherche d'auto-anticorps sériques, analyse des reins).

Enfin, dans un troisième temps, nous avons essayé de caractériser le rôle que pourrait jouer la substitution R594C de IRE1- α dans les mécanismes de tolérance centrale et périphérique. Nous avons étudié la réponse anticorps à l'injection d'agonistes TLR4 et TLR9, nous avons analysé le répertoire des chaînes lourdes et légères du BCR et enfin, nous avons croisé notre modèle IRE1- α R594C avec un modèle transgénique 56R, exprimant un BCR autoréactif vis-à-vis de l'ADN, utilisé pour étudier les mécanismes de tolérance centrale (Sekiguchi et al., 2006).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 Validation du modèle murin IRE1- α R594C

1.1 Génération du modèle murin IRE1- α R594C Knock-In par TACONIC®

La mutation C1780T dans le gène *Ern1* (correspondant à la mutation R594C dans la chaîne protéique de IRE1- α) a été introduite dans le locus *Ern1* à l'aide d'une procédure d'édition du génome par CRISPR (Taconic Biosciences, Allemagne). La construction du gène modifié a reposé sur le remplacement de la séquence AACCGA (Asparagine-Arginine) codant les acides aminés 593 (N) et 594 (R) par la séquence AATTGC (Asparagine N-Cystéine C). Cette modification engendre également l'apparition d'un site de restriction MfeI grâce à une mutation silencieuse. En résumé, après administration d'hormones, des souris femelles C57BL/6NJ en superovulation ont été accouplées avec des souris mâles de la même souche. Les embryons fécondés au stade unicellulaire ont été placés dans une goutte de milieu M2 sous huile minérale. Une pipette de micro-injection d'un diamètre interne de 0,5 mm a été utilisée pour injecter la préparation nucléotidique mixte contenant la protéine Cas9 et l'ARN-guide spécifique dans le pronucléus de chaque embryon. Après l'injection, 35 embryons au stade unicellulaire ont été transférés dans l'un des oviductes de femelles NMRI pseudo-gestantes. Les animaux fondateurs ont été identifiés en analysant la PCR du locus ciblé après digestion par MfeI. Les échantillons PCR des fondateurs ont été sous-clonés et les clones multiples ont été analysés par séquençage d'ADN pour confirmer la présence de la séquence mutée AATTGC et exclure la présence de mutations supplémentaires près de la séquence cible. Un animal fondateur a ensuite été sélectionné pour une procédure de fécondation *in vitro* afin de générer des souris hétérozygotes F1. Les sites hors-cibles potentiels prédits *in silico* ont été analysés chez les animaux F1 hétérozygotes en utilisant le séquençage ciblé (Bouis et al., 2019).

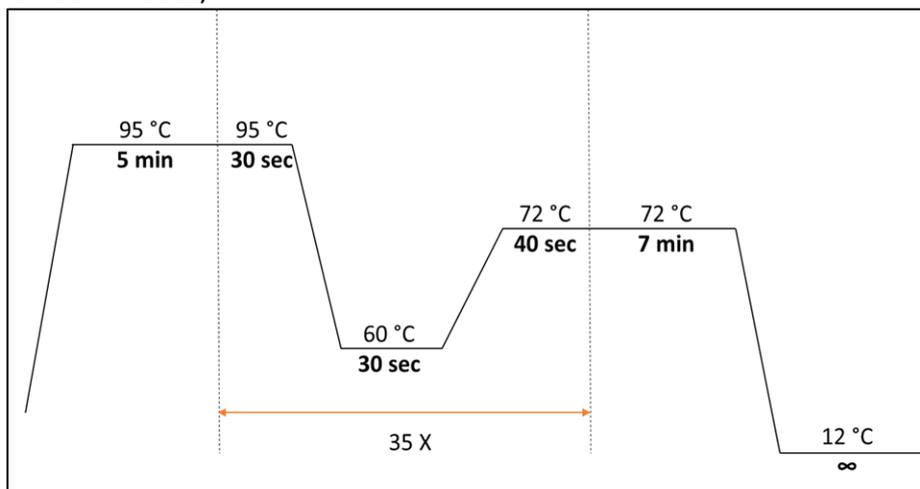
Les souris d'intérêt (IRE1- α R594C/+, hétérozygotes pour la mutation et IRE1- α R594C/R594C, homozygotes pour la mutation) sont identifiées par PCR de génotypage (sur biopsie de queue de souris) à la suite d'une digestion par l'enzyme de restriction MfeI. Dans toutes les expériences, les souris dites « contrôles » sont des souris issues de la même portée (*littermate*) que les souris IRE1- α transgéniques R594C/+ ou R594C/R594C et dont la PCR de génotypage est négative pour la mutation. À chaque expérience, le génotype des souris a été vérifié une nouvelle fois sur un prélèvement d'ADN *post-mortem*.

1.2 Extraction de l'ADN génomique de queue de souris

L'ADN génomique (ADNg) est extrait à partir d'environ 5 mm de biopsie de queue de souris, grâce à l'utilisation d'un kit d'extraction d'ADN (Sigma®). Les biopsies de queues contenues dans des tubes 1,5 mL sont incubées 10 min à température ambiante (TA) dans un mélange composé de 75 µL de solution d'extraction (« extraction solution A », Sigma®) et 25 µL de solution de préparation de tissu (« tissue preparation », Sigma®). Après 5 min d'incubation à 95 °C, 100 µL de solution neutralisante (« neutralization solution B », Sigma®) sont ajoutés à l'ensemble. L'ADN est ensuite conservé à -20 °C.

1.3 PCR de génotypage

Un volume de 23 µL de mix contenant 12,5 µL de Gotaq(r) Green Master Mix, 6,5 µL d'H₂O, 1 µL d'amorces (amorce sens et anti-sens fournies par Eurogentec, séquences décrites en **Figure 35**) est ajouté à 2 µL de la solution d'ADN extrait de la queue de souris. La PCR est réalisée selon le programme également présenté en **Figure 35**. Le produit de PCR est ensuite traité par l'enzyme de restriction MfeI (10 U/mL, New England Biolabs®) pendant 1 h à 37 °C, puis déposé sur gel d'agarose (Sigma®) à 1,5 % dans du TAE (pH8 ; 40 mM Tris Acétate; 1 mM EDTA, Sigma®) (migration à 100 V pendant environ 30 minutes).



Amorce sens : 5' AGCCATGGAGAAGTGCTGC 3'

Amorce anti-sens : 5' AGCTAGACCCACCTCTTGTAGG 3'

Figure 35. Représentation schématique du programme de PCR utilisé pour le génotypage des souris IRE1- α KI ainsi que la séquence des amorces sens et anti-sens utilisées pour amplifier le fragment de 599 pb du gène *Ern1*.

1.4 Séquençage Sanger du gène *Ern1*

De façon à séquencer l'ADN génomique, l'ADN est extrait et amplifié de la même manière que pour le génotypage. Le produit de PCR obtenu est ensuite déposé sur gel d'agarose (Sigma®) à 1 % dans du TAE. Après migration par électrophorèse à 100 V pendant 30 minutes, le fragment d'ADN révélé sur le gel de taille correspondant au transcrit d'intérêt est ensuite prélevé (par découpage de la bande sous UV) et purifié grâce au kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen®) puis envoyé à l'entreprise GATC® pour être séquençé selon la méthode Sanger (GATC Eurofins).

1.5 Extraction d'ARN et préparation des ADNc

L'extraction des ARN est réalisée grâce au kit Nucleospin RNA plus (Macherey-Nagel®) à partir de culots de 2×10^6 LB CD43⁻ triés (MATÉRIEL & MÉTHODES cf.2.3) et stockés à -80 °C. Ce kit permet de lyser le culot cellulaire et de purifier l'ARN par l'utilisation de colonnes de purification. Une première étape de passage sur colonne suivi de deux lavages va permettre de retirer l'ADN et les protéines de l'échantillon. L'ARNm extrait est ensuite dosé à l'aide du NanoDrop2000c (ThermoScientific®) avant d'être transformé en ADNc. Les ADNc sont synthétisés à partir d'ARN extraits grâce au kit Maxima First Strand cDNA Synthesis (ThermoScientific®) selon les recommandations du fabricant. Après amplification (10 min à 25 °C, 120 min à 37 °C, 5 min à 85 °C), l'ADNc peut être utilisé directement ou peut être conservé à -20 °C.

1.6 Étude de l'expression de l'allèle *Ern1* muté

Les tests de génotypage SNP TaqMan de Applied Biosystems (Custom TaqMan SNP Genotyping Assay®) utilisent l'enzyme 5'-nucléase TaqMan pour amplifier et détecter des polymorphismes spécifiques dans des échantillons d'ADN purifié. Chaque test permet le génotypage pour un seul polymorphisme nucléotidique (SNP) et se compose de deux amorces spécifiques à la séquence et de deux sondes TaqMan minor groove binder (MGB) avec quencher non fluorescents (NFQ). Une sonde est marquée avec un colorant VIC pour détecter la séquence de l'allèle 1 ; la seconde sonde est marquée avec un colorant FAM pour détecter la séquence de l'allèle 2 (**Tableau 3**).

Le principe de l'essai est le même que pour une analyse par RT-PCR quantitative en temps réel. Le taux de cDNA est quantifié par RT-PCR quantitative en temps réel grâce à la technologie TaqMan. La réaction d'amplification est réalisée dans des plaques 96 puits (Applied Biosystems®) où sont déposés par puits : 4 µL d'ADNc à 2,5 ng/µL, 5 µL de mix TaqMan (Applied Biosystems®), 0,25 µL de chaque sonde et 0,75 µL d'H₂O stérile. La plaque est centrifugée puis placée dans l'appareil StepOnePlus (Applied Biosystems®). L'amplification est réalisée par le programme suivant : 2 min à 50 °C et 40 cycles : 5 s à 95 °C et 1 min à 60 °C. L'expression des gènes d'intérêt est calculée de façon comparative grâce au logiciel StepOnePlus, par rapport au gène de ménage ActB, selon la méthode des $\Delta\Delta C_t$.

Amorce sens	TGAGGGCACAATTGTATACAAAGGT	
Amorce anti-sens	ACTCAGGGAGGATCCTCTTCAC	
Sonde allèle sauvage	VIC	5'-CCACATCTCGGTTGTCA-3'
Sonde allèle muté	FAM	5'-ACATCGCAATTGTCA-3'

Tableau 3. Séquences des sondes TaqMan® utilisées pour l'analyse de l'expression de l'allèle *Ern1* muté dans les LB. En gras et rouge sont représentés les nucléotides spécifiques de la séquence sauvage et de la séquence mutée.

1.7 Extraction et analyse des protéines

Les cellules sont récoltées, lavées avec du PBS froid et centrifugées pendant 5 minutes à 1500 rpm. Le culot cellulaire est repris dans du tampon de lyse RIPA (Tris HCl pH8 50 mM, NP-40 1 %, Na desoxycholate 0,5 %, SDS 0,1 %, NaCl 150 mM) supplémenté d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases et d'inhibiteurs de phosphatases (EasyPack, Roche®). Le tout est incubé 15 minutes sur glace puis centrifugé 10 minutes à 4 °C à 11000 g. Le surnageant contenant les protéines est récolté, puis la concentration protéique est dosée par la technique BCA (Thermo Scientific®). Ensuite les protéines sont ajoutées à un volume de bleu de dépôt 5x (0,6 M Tris HCl pH 6.8, 50 % (v/v) glycérol, 170 mM SDS, 50 mM DTT, bleu de bromophénol), puis les échantillons sont chauffés pendant 5 minutes à 85 °C. Un marqueur de poids moléculaire PageRuler Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific®) ainsi que chaque échantillon sont déposés sur un gel de polyacrylamide à gradient de 4-15 % (Biorad®). La migration est réalisée à 150 V pendant environ 1h dans un tampon

de migration (25mM Tris pH 8,3, 192 mM Glycine, 0,1 % (v/v) SDS). Une fois l'électrophorèse terminée, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF ou de nitrocellulose (Biorad®) par un transfert à 1,3 A pendant 7 minutes (ThermoFisher®). La membrane est ensuite incubée dans un tampon de saturation (5 % lait, 100 mM Tris-HCl pH 7,2, 50mM NaCl, 0.1 % (v/v) Tween 20) à température ambiante pendant 1 heure afin de bloquer les sites aspécifiques. La membrane est ensuite incubée pendant la nuit avec l'anticorps primaire dans le tampon de saturation, puis, après 3x5 minutes de lavages dans du tampon TBST (100 mM Tris-HCl pH 7,2, 50 mM NaCl, 0.1 % (v/v) Tween 20), l'anticorps secondaire couplé à la HRP est ajouté : anticorps de souris anti-chaines légères de lapin (CST, 7076S, 1/10000) ou anticorps de chèvre anti-IgG de souris (CST, 7074S, 1/20000), selon l'anticorps primaire. Ce second marquage est réalisé pendant une incubation d'une heure à température ambiante. Les membranes sont à nouveau lavées dans du TBST pendant 3x5 minutes puis l'immunoempreinte est révélée grâce à une solution d'ECL (Enhanced ChemiLuminescence) (GE Healthcare) et la lecture est faite grâce à l'appareil iBright (Invitrogen). Les anticorps utilisés sont listés dans le **Tableau 4** ci-dessous.

Cible	Référence	Fournisseur
IRE1- α phosphorylée (Ser724)	PA1-16927 (anticorps de lapin, IgG, polyclonal) PA5-85738 (anticorps de lapin, IgG, polyclonal)	ThermoFisher Scientific
IRE1- α	3294 anticorps de lapin, IgG, polyclonal	Cell Signaling Technology
JNK1/2 phosphorylée (Thr183/Tyr185)	4468, Clone : 81E11 anticorps de lapin, IgG, monoclonal	Cell Signaling Technology
JNK2	9258, Clone : 53G8 anticorps de lapin, IgG, monoclonal	Cell Signaling Technology
β actine	sc-47778 HRP, clone C4 anticorps monoclonal de lapin, IgG1 κ monoclonal	Santa Cruz
GAPDH	3683 Clone : 14C10 anticorps de lapin, IgG couplé à l'HRP	Cell Signaling Technology

Tableau 4. Anticorps primaires utilisés en western blot

2 Analyse du phénotype des souris IRE1- α R594C

2.1 Récupération des cellules immunitaires à partir des organes

Les organes lymphoïdes primaires (thymus et MO) et secondaires (rate, ganglions (GG) inguinaux et axillaires) sont prélevés puis dilacérés et écrasés sur un tamis de 70 μm . La totalité des cellules est récupérée dans du RPMI 1640 puis le culot des splénocytes est repris dans un tampon composé de NH_4Cl et Tris 1M pH 7,6 afin de lyser les globules rouges. Après un dernier lavage, les cellules sont reprises dans du RPMI pour être comptées au microscope grâce à une cellule de Neubauer, et après avoir rajouté du bleu Trypan[®] (Sigma[®]) pour éliminer les cellules mortes du comptage.

2.2 Analyse des cellules lymphoïdes par cytométrie en flux

2.2.1 Marqueurs membranaires

Le marquage des cellules est réalisé avec des anticorps couplés à des fluorochromes en plaque 96 puits (Nunc), chaque puits contenant 1.10^6 cellules. Les cellules sont incubées avec différentes combinaisons d'anticorps anti-souris (parmi lesquels : anti-B220, -CD44, -CD86, -CD19, -CMHII, -CD3, -CD8, -CD4, -CD21, -CD23, -CD24, -GL7, -IgM, -IgG1, BD Biosciences) couplés à un fluorochrome (FITC, PE, PE-CF, PerCp-Cy5.5, PE-Cy7, APC, APC-AF700 ou APC-Cy7), à raison de 100 μL d'anticorps dilués (les dilutions ont été testées au préalable sur des cellules de souris sauvages). Après 15 min d'incubation à 4 °C, la plaque est centrifugée pendant 5 min à 400 g, puis le culot cellulaire est lavé avec 150 μl de FACS Wash (PBS, BSA 1 %). Les cellules sont ensuite reprises dans 200 μL de FACS Wash puis sont analysées par le cytomètre en flux FACS Gallios (Beckman Coulter[®]) ou Attune (ThermoFisher[®]). Avant le passage au cytomètre, 200 μL de solution de DAPI 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma[®]) sont ajoutés afin de marquer les cellules mortes et permettre de les soustraire de l'analyse. L'analyse des données a été réalisée grâce au logiciel FlowJo 10. L'ensemble des anticorps utilisés est listé dans le **Tableau 5**.

2.2.2 Marqueurs intranucléaires

Après un marquage membranaire classique, les cellules sont fixées et perméabilisées avec 100 μL de la solution de fixation du kit « FoxP3 nuclear transcription factor » (BD Biosciences[®]) durant

20 minutes à 4 °C. Après deux lavages avec la solution « permwash », les cellules sont incubées avec la solution « permwash » additionnée de l'anticorps d'intérêt (anti-FoxP3 ou anti-XBP1s, BD Biosciences®). Les cellules sont à nouveau lavées puis reprises dans 200 µL de tampon FACS Wash. Les deux références d'anticorps utilisés sont indiquées au bas du **Tableau 5**.

Cible	Fluorochrome	Clone	Isotype	Reference	Fournisseur
CD3e	FITC	145-2C11	Armenian Hamster IgG1, κ	731979	Beckman Coulter
CD3e	PeCy7	145-2C11	Armenian Hamster IgG1, κ	552774	BD Pharmingen
CD4	FITC	RM4-4	Rat SD IgG2b, κ	553055	BD Pharmingen
CD4	PE	GK1.5	Rat (Lewis) IgG2b, κ	733259	Beckman Coulter
CD4	APC	RM-4-5	Rat DA IgG2a, κ	553051	BD Pharmingen
CD4	AF700	RM4-5	Rat DA IgG2a, κ	557956	BD Pharmingen
CD8a	FITC	53-6.7	Rat (Lou/Ws1/M) IgG2a, κ	732022	Beckman Coulter
CD8a	PE	53-6.7	Rat Lou IgG2a, κ	553032	BD Pharmingen
CD8a	PE-CF594	53-6/7	Rat Lou IgG2a, κ	562315	BD Horizon
CD8a	APC	53-6.7	Rat Lou IgG2a, κ	553035	BD Pharmingen
CD11b	AF700	M1/70	Rat DA IgG2b, κ	557960	BD Bioscience
CD19	FITC	1D3	Rat Lewis IgG2a, κ	553785	BD Pharmingen
CD19	PeCy7	1D3	Rat Lewis IgG2a, κ	552854	BD Pharmingen
CD19	APC	1D3	Rat Lewis IgG2a, κ	550992	BD
CD24	AF700			564237	BD Pharmingen
CD25	PE	3C7	Rat LEW IgG2b, κ	553075	BD Pharmingen
CD44	PE	IM7	Rat IgG2b, κ	553134	BD Pharmingen
CD44	APC	IM7	Rat IgG2b, κ	559250	BD Pharmingen
CD45RB	FITC	16A	Rat IgG2a, κ	553100	Becton Dickinson
CD45R/B220	PerCP-Cy5.5	RA3-6B2	Rat IgG2a, κ	552771	BD Pharmingen
CD45R/B220	PE	RA3-6B2	Rat IgG2a, κ	553090	BD Pharmingen
CD45R/B220	APC	RA3-6B2	Rat IgG2a, κ	553092	BD Pharmingen

CD49b	FITC	DX5	Rat (LEW) IgM, κ	553857	BD Pharmingen
CD62L	PerCP-Cy5.5	MEL-14	Rat (F344) IgG2a, κ	560513	BD Bioscience
CD62L	PE	MEL-14	Rat CDF IgG2a, κ	553151	BD Pharmingen
CD69	PE	H1.2F3	Armenian Hamster IgG1, λ3	553237	BD Pharmingen
CD86	PE	GL1	Rat IgG2a	732211	Beckman Coulter
CD86	APC		Rat Lou IgG2a, κ	558703	BD Pharmingen
CD138	PE	281-2	Rat CDF IgG2a, κ	553714	BD Pharmingen
CD138	APC	281-2	Rat CDF IgG2a, κ	558626	BD Pharmingen
Ly-6G and C	PeCy7	RB6-8C5	Rat IgG2b, κ	565033	BD Bioscience
I-A/I-E	AF700	M5/114.15.2	Rat IgG2b,κ	107622	Biolegend
Ig λ1,λ2,λ3 light chain	Biotine	R26-46	Rat IgG2a, κ	553433	BD Pharmingen
Ig k light chain	APC-Cy7	187.1	Rat SD IgG1, κ	559940	BD Pharmingen
IgD	FITC	11-26c2a		02214D	Becton Dickinson
IgG1	FITC		Goat	1070-01	Southern Biotech
IgMa	Biotine	DS-1	Mouse C57BL/6 IgG1, κ	553515	BD Pharmingen
IgM(b)	Biotine	AF6-78	Mouse BALB/c IgG1, κ	553519	Becton Dickinson
IgM(b)	Biotine	AF6-78	Mouse BALB/c IgG1, κ	553519	Becton Dickinson
TCRβ	APC-Cy7	H57-597		560656	BD Pharmingen
XBP1S	AF647	Q3695	Mouse IgG1, κ	562821	BD Pharmingen
FoxP3	APC	FJK-16s	Rat IgG2a, κ	17-5773-80	eBioscience

Tableau 5. Liste des anticorps utilisés en cytométrie en flux.

2.3 Isolement des cellules lymphocytaires (tri magnétique)

Les LB matures naïfs de la rate sont triés grâce à l'utilisation d'un anticorps anti-CD43 couplé à des billes magnétiques CD43 (Ly-48) microbeads mouse (Miltenyi Biotec®). Pour cela, les splénocytes totaux, déplétés des globules rouges, sont incubés 15 minutes avec des billes magnétiques couplées à l'anticorps anti-CD43, à raison de 10 µL de billes et 90 µL de PBE (PBS, BSA 0.5 %, EDTA 2mM) pour 10.10⁶ cellules pendant 15 min à 4 °C. Après un lavage au PBE, les cellules sont déposées sur une colonne MACS Large Separation (LS), fixée à un aimant (Miltenyi Biotec®). Les cellules CD43+ marquées par l'anticorps (LT, monocytes, granulocytes, NK, LB B1) sont retenues dans la colonne grâce à l'aimant. Les cellules non marquées (LB matures naïfs) sont éluées dans le PBE dans la première fraction. Les cellules sont lavées puis centrifugées. Une efficacité de tri supérieure à 95 % est généralement obtenue par cette méthode. La vérification sera faite à l'aide d'un marquage de cytométrie anti-B220 (PECF, BD), anti-CD19 (APC, BD).

2.4 Tri cellulaire par cytométrie en flux

Les splénocytes de souris IRE1-α R594C/+ (n = 5) et de souris témoins (n = 5) ont été marqués avec des anticorps anti CD3-FITC, anti CD4-AF700, anti CD8-PE, anti B220-PE Cy7, anti CD19-APC (BD Biosciences) et du DAPI (Sigma®) avant le tri positif des lymphocytes T CD3+ CD4+, T CD3+ CD8+, et des lymphocytes B CD3- B220+ CD19+, vivants (DAPI-), à l'aide d'un trieur de cellules BD FACSAria II (IGBMC, Strasbourg, France). Les cellules isolées étaient pures à au moins 97 %.

2.5 Stimulation des cellules immunitaires *in vitro*

Les splénocytes totaux ou LB CD43- triés sont repris à une concentration de 2.10⁶ cellules par mL dans un milieu de culture complet (RPMI 1640® (avec ultraglutamine, BioWhittaker®)) additionné de 10 % de sérum de veau fœtal (Lonza®), 1 % de gentamycine (Lonza®), 1 % d'HEPES (BioWhittaker, Lonza®) et 0,1 % de β-mercaptoéthanol (Gibco®). Les cellules sont ensuite réparties dans des plaques 6 puits, 12 puits, 24 puits ou 48 puits (Falcon®) à une concentration finale de 1.10⁶ cellules/mL par puits, puis sont incubées avec un anticorps anti-IgM (5 µg/mL, anticorps F(ab')₂ de chèvre anti-IgM de souris, Jackson Immunoresearch®) ; du LPS (1 µg/mL ou 10 µg/mL, produit par Salmonella typhosa, Sigma®) ; une combinaison de LPS de Salmonella typhosa (1 µg/mL, Sigma®) et d'IL-4 (10 ng/mL, Sigma®) ; un agoniste du TLR9 (1 µg/mL, ODN2395, Invivogen®) ; un agoniste du TLR7 (1µg/mL, R848,

Invivogen®) ou du milieu de culture seul. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C pour une durée variable de 24 h, 48 h, 72 h ou 96 h selon les expériences.

2.6 Récupération du sérum des souris et des surnageants de culture

Le prélèvement est réalisé en ponction sub-mandibulaire (environ 150 µL de sang). Le sérum est récupéré après une centrifugation du sang total à 10000 g pendant 10 minutes. Le sérum, correspondant au surnageant après centrifugation, est isolé dans un nouveau tube puis conservé à -20 °C. Les surnageants de culture sont récupérés après stimulation *in vitro*, centrifugés afin de les débarrasser des cellules, et stockés à -20 °C.

2.7 Dosage des immunoglobulines totales *in vivo* et *in vitro*

Pour le dosage d'IgM et d'IgG totales, la première étape, consistant au coating des 96 puits de la plaque ELISA (Nunc® Maxisorp) correspond à une incubation de 50 µL d'anticorps anti-IgG murines (5 µg/mL) ou anti-IgM murines (5 µg/mL) dilués en tampon carbonate/bicarbonate pendant 1 h à 37 °C. Après lavage des plaques au PBS, les puits sont saturés avec 100 µL de PBS BSA 1 % (BSA : albumine sérique bovine, Euromedex®) pendant 45 min à 37 °C. Des dilutions croissantes d'échantillons (sérum de souris ou surnageants de culture) et d'IgG ou d'IgM de concentrations connues, servant de courbe standard, sont réalisées en tampon PBS-Tween 0,1 %, gélatine 1 %. Cinquante µL de ces dilutions sont déposés par puits puis les plaques sont incubées pendant 1 nuit à +4 °C. Après lavage au PBS-Tween 0,1 % (PBS-T) un anticorps de chèvre anti-IgG ou anti-IgM murin couplé à la peroxydase, dilué au 1/10000e dans du PBS-T, est incubé 1 heure à 37 °C. Les plaques sont à nouveau lavées au PBS-T puis révélées en ajoutant un des substrats de la peroxydase, l'OPD (Otho-Phénylène-Diamine, Sigma®), pendant 20 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. La réaction enzymatique entre la peroxydase et son substrat est arrêtée par l'ajout d'une solution de H₂SO₄-2N-Sulfite de Na 0,5 %. Enfin, l'absorbance est mesurée à 492 nm par le lecteur Multiskan FC (ThermoFisher®). Les taux d'IgG totales et IgM sont calculés à partir des courbes d'étalonnage.

Pour les sous-classes d'IgG, les étapes sont les mêmes mais utilisent des anticorps différents : pour le coating, les anticorps sont utilisés à des concentrations de 2,5 µg/mL pour l'anticorps de chèvre anti-IgG1 de souris, et de 5 µg/mL pour les anticorps de chèvre anti-IgG2b et anti-IgG3 de

souris. Quant aux révélations, elles sont réalisées avec des anticorps de chèvre anti-IgG1, -IgG2b ou -IgG3 de souris, couplés à la peroxydase, dilués respectivement au 1/20000e, 1/15000e et 1/10000e, dans du PBS-T. Les anticorps utilisés sont listés dans le **Tableau 6**.

Cible	Référence	Fournisseur
IgG de souris (courbe d'étalonnage)	015-000-003	Jackson ImmunoResearch
IgM de souris (courbe d'étalonnage)	M-5170	Sigma
Anti-IgG de souris (chèvre)	115-006-071	Jackson ImmunoResearch
Anti-IgM de souris (chèvre)	115-006-075	Jackson ImmunoResearch
Anti-IgG de souris couplé à l'HRP (chèvre)	115-035-071	Jackson ImmunoResearch
Anti-IgM de souris couplé à l'HRP (chèvre)	115-006-075	Jackson ImmunoResearch
IgG1 de souris (courbe d'étalonnage)	0102-01	Southern Biotech
IgG2b de souris (courbe d'étalonnage)	0104-01	Southern Biotech
IgG3 de souris (courbe d'étalonnage)	1100-01	Southern Biotech
Anti-IgG1 de souris (chèvre)	1070-01	Southern Biotech
Anti-IgG2b de souris (chèvre)	1090-01	Southern Biotech
Anti-IgG3 de souris (chèvre)	1100-01	Southern Biotech
Anti-IgG1 de souris couplé à l'HRP (chèvre)	1070-05	Southern Biotech
Anti-IgG2b de souris couplé à l'HRP (chèvre)	1090-05	Southern Biotech
Anti-IgG3 de souris couplé à l'HRP (chèvre)	1100-05	Southern Biotech

Tableau 6. Anticorps utilisés lors des tests ELISA.

3 Immunisation des souris IRE1- α R594C

3.1 Injection *in vivo* d'agoniste TLR4

Du LPS de *Salmonella typhimurium* (Sigma®) dilué dans du PBS a été injecté à des souris âgées de 6 à 12 mois en IP à raison de 50 μ g par souris à J0, et 25 μ g aux J7 et J14. Des souris contrôles ont été injectées avec du PBS. Un prélèvement sanguin a été effectué avant chaque injection ainsi qu'au jour 28. Les souris ont été euthanasiées au jour 28.

3.2 Injection *in vivo* d'agoniste TLR9

Du CpG DNA (ODN 2395, tcgtcgttttcggcgcgcgccg, Invivogen) dilué dans du PBS a été injecté à des souris âgées de 6 à 12 mois en IP à raison de 40 μ g par souris tous les 2 jours pendant 14 jours. Des souris contrôles ont été injectées avec du PBS seul. Un prélèvement sanguin a été effectué avant le début du traitement puis une fois par semaine jusqu'au sacrifice, 6 semaines après la première injection.

4 Analyse des signes auto-immuns

4.1 Dosage des auto-anticorps

4.1.1 ELISA anti-ADNdb

Pour la détection des auto-anticorps anti-ADN double brin (db), le coating est réalisé avec 50 μ L d'ADN de thymus de veau (Calf Thymus DNA, 100 ng/mL ; D4764, Sigma®) dilué dans un tampon constitué de Tris HCl 50 mM et d'EDTA 10 mM à pH 7,5 pendant 1 heure à 37 °C. Une étape de digestion avant l'étape de saturation à la BSA est nécessaire pour dégrader l'ADN simple brin (sb). Pour cela, une solution contenant la S1 nucléase (0,001 U/ μ L ; Promega®) diluée en Tampon Na acétate (50 mM Na Acétate, 50 mM NaCl, 1 mM ZnSO₄, 5 % Glycerol, pH 4,5) est incubée pendant 1 heure à 37 °C, puis la plaque est lavée plusieurs fois au PBS. Les dernières étapes de dépôt des échantillons et de révélation sont réalisées dans les mêmes conditions qu'en 2.7, excepté le fait que les échantillons sont incubés sur la nuit à température ambiante.

4.1.2 ELISA anti-ADNsb

Pour la détection des auto-anticorps anti-ADNsb, le coating est réalisé avec 50 µL d'ADNsb de thymus de veau (Calf Thymus DNA, 100ng/mL ; D8899, Sigma®) dilué dans un tampon constitué de Tris HCl 50 mM et d'EDTA 10 mM à pH 7,5 pendant 1 heure à 37 °C. Puis les étapes suivantes de saturation, de dépôt des échantillons et de révélation sont réalisées dans les mêmes conditions qu'en 2.7., excepté le fait que les échantillons sont incubés sur la nuit à température ambiante.

4.1.3 ELISA IgM FR

Pour la détection des auto-anticorps de type facteurs rhumatoïdes (anti-Fc des IgG) de classe IgM, le coating est réalisé avec 50 µL d'IgG à 50 µg/mL (015 000 003, Jackson ImmunoResearch) dilué dans du tampon carbonate/bicarbonate (cf. 2.7) pendant 1 heure à 37 °C. Puis les étapes suivantes de saturation, de dépôt des échantillons et de révélation sont réalisées dans les mêmes conditions qu'en 2.7., excepté le fait que les échantillons sont incubés 4 heures à 37 °C.

4.1.4 ELISA anti-nucléosome

Pour la détection des auto-anticorps anti-nucléosome, le coating est réalisé avec 50 µL de nucléosomes natifs purifiés à 50 µg/mL dilué dans du tampon PBS pendant 1 heure à 37 °C. Puis les étapes suivantes de saturation, dépôt des échantillons et de révélation sont réalisées dans les mêmes conditions qu'en 2.7, excepté le fait que les échantillons sont incubés 4 heures à 37 °C. Ce protocole est issu d'une publication du laboratoire et la solution mère de nucléosomes natifs purifiés a été produite au laboratoire (Gies et al., 2017a).

4.2 Détection des auto-anticorps sériques (*Antigen microarray*)

Le sérum des souris a été prélevé par ponction sub-mandibulaire. Le sérum est récupéré à la suite d'une centrifugation du sang total à 10000 rpm pendant 10 minutes. Le sérum, correspondant au surnageant après centrifugation, est isolé dans un nouveau tube puis conservé à -80 °C. Ces sérums ont été envoyés au laboratoire du département d'immunologie et de médecine interne (Texas South Western Medical Center, Dallas, USA) où les échantillons ont été analysés selon la technique de puce à antigène développée sur place (Zhu et al., 2015).

4.3 Analyse des reins

4.3.1 Histologie conventionnelle

Les reins sont prélevés et placés dans du para-formaldéhyde 4 % pour être fixés. Après passage dans différents bains de concentration croissante d'alcool afin de les déshydrater, les reins sont imprégnés de paraffine et sont inclus dans un bloc de paraffine. Des coupes de 4 µm sont ensuite faites à partir de ces blocs. Après déparaffinage et réhydratation, les coupes sont colorées à l'hématoxyline/éosine. Elles ont été réalisées au service d'anatomo-pathologie de l'hôpital de Hautepierre (Strasbourg). L'observation des lames a été réalisée par le Dr. Jérôme Olagne au service d'anatomo-pathologie de l'hôpital de Hautepierre.

4.3.2 Immunohistochimie

Les reins sont prélevés et placés dans des moules remplis de Tissue-Tek et congelés rapidement dans du 2-méthyl-butane refroidi à -60 °C/-70 °C grâce à de l'azote liquide. Des coupes de 5 µm sont réalisées au cryostat puis fixées à l'acétone. Ces coupes sont ensuite marquées avec des anticorps spécifiques couplés à un fluorochrome et observées au microscope à fluorescence. Les échantillons ont été analysés par un anatomo-pathologiste, le Dr. Jérôme Olagne du service d'anatomo-pathologie de l'hôpital de Hautepierre (Strasbourg). Les anticorps utilisés pour marquer les dépôts dans les reins sont indiqués ci-dessous (**Tableau 7**).

Cible – Fluorochrome	Référence
IgG-FITC (ψ)	Jackson 115-095-164
IgM-FITC (μ)	Jackson 115-095-020
IgG1 –FITC (λ)	Jackson 115-095-205
IgG2a – FITC	Jackson 115-095-206
IgG3 – FITC	Jackson 115-095-209
C3-FITC	MPbio 085500
C1q-FITC	ThermoFisher MA1-40313

Tableau 7. Liste des anticorps utilisés pour les marquages d'immunohistochimie des reins.

5 Impact de la mutation IRE1- α R594C sur l'UPR

5.1 Stimulation des lymphocytes et induction d'un stress du RE

Les splénocytes totaux ou LB CD43- triés sont repris à une concentration de $2 \cdot 10^6$ cellules par mL dans un milieu de culture complet (RPMI 1640[®] (avec ultraglutamine, BioWhittaker) additionné de 10 % de sérum de veau fœtal (Lonza), 1 % de gentamycine (Lonza), 1 % d'HEPES (BioWhittaker, Lonza) et 0,1 % de β -mercaptoéthanol (Gibco). Les cellules sont ensuite réparties dans des plaques 6 puits, 12 puits, 24 puits ou 48 puits (Falcon) à une concentration finale de $1 \cdot 10^6$ cellules/mL par puits, puis sont incubées avec du LPS (10 μ g/mL, produit par *Salmonella typhosa*, Sigma[®]) ; une combinaison de LPS de *Salmonella typhosa* (10 μ g/mL, Sigma[®]) et de thapsigargine (0,5 μ M, Tocris[®]), une combinaison de LPS de *Salmonella typhosa* (10 μ g/mL, Sigma[®]) et de tunicamycine (1 μ M, Tocris[®]) ou du milieu de culture seul. Les cellules sont ensuite incubées à 37 °C pour une durée variable de 16 h, 24 h ou 48 h selon les expériences.

5.2 Analyse par RT-PCR quantitative en temps réel (TaqMan[®])

Le taux de cDNA est quantifié par RT-PCR quantitative en temps réel grâce à la technologie TaqMan[®]. La réaction d'amplification est réalisée dans des plaques 96 puits (Applied Biosystems[®]) où sont déposés par puits : 4 μ L d'ADNc à 2,5 ng/ μ L, 5 μ L de mix TaqMan (Applied Biosystems[®]), 0,25 μ L de sonde et 0,75 μ L d'H₂O stérile. La plaque est centrifugée puis placée dans l'appareil StepOnePlus (Applied Biosystems[®]). L'amplification est réalisée par le programme suivant : 2 min à 50 °C et 40 cycles : 15 s à 95 °C et 1 min à 60 °C. L'expression des gènes d'intérêt (**Tableau 8**) est calculée de façon comparative grâce au logiciel StepOnePlus, par rapport au gène de ménage *ActB*, selon la méthode des $\Delta\Delta C_t$.

Cible	Référence (TaqMan [®])
<i>Chop</i>	Mm01135937_g1
<i>Atf6</i>	Mm01135937_g1
<i>ActB (Actine Bêta)</i>	Mm02619580_g1

Tableau 8. Gènes d'intérêt analysés par technique de RT-qPCR TaqMan[®] et références des sondes.

5.3 Analyse par RT-PCR quantitative en temps réel (SYBR® Green)

La réaction d'amplification est réalisée dans des plaques 96 puits (Applied Biosystems). Quatre µL soit 10 ng de cDNA (à 2,5 ng/µL) ainsi que 12,5 µL de mix SYBR® Green Rox FAST MasterMix, 1 µL d'amorces sens et anti-sens à 10 µg/mL (Eurogentec®), et 6,5 µL H₂O sont déposés dans chaque puits. La réaction est réalisée dans le thermocycleur (StepOne Plus, Applied Biosystem®) selon le programme suivant : 10 min à 95 °C puis 40 cycles : 15 s à 95 °C, 1 min à 60 °C. L'expression des gènes d'intérêt étudiés (**Tableau 9**) est calculée de façon comparative au gène de ménage *Actb*, selon la méthode des $\Delta\Delta C_t$.

Gènes cibles	Amorces (Fw : sens / Rv : anti-sens)
<i>Tapbp (tapasine)</i>	FW : ACCATTCCCAGGAACTCAA RV : GAGAAGAAGGCTGTTGTTCTGG
<i>Ergic 3</i>	FW : GTTCAAGAAACGACTAGACAAGGA RV : ACCTCGACTTTCCCAAGCTC
<i>Itgb2</i>	FW : AACGAGATCACCGAGTCTGG RV : CAGGCCTTCTCCTTGTTGG
<i>Edem1</i>	FW : GCTACGACAACATACATGGCTC RV : GACTTGGACGGTGAATCTTT
<i>Il6</i>	FW : GAGGATACCACTCCCAACAGACC RV : AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
<i>Dnasejb9</i>	FW : CTTAGGTGTGCCAAAGTCTGC RV : GGCATCCGAGAGTGTTTCATA
<i>P58ipk</i>	FW : GTGGCATCCAGATAATTTCCAG RV : GAGTTCCAACCTTCTGTGGAAGG
<i>Gapdh</i>	FW : GGTGTGAACGGATTTGGCCGTATTG RV : CCGTTGAATTTGCCGTGAGTGGAGT
<i>Actb</i>	FW : ATGAGCTGCCTGACGGCCAGGTCATC RV : TGGTACCACCAGACAGCACTGTGTTG

Tableau 9. Gènes cibles d'intérêt analysés par RT-qPCR (SYBR®) et séquences des amorces

6 Marquage des LB autoréactifs anti-nucléosomes

6.1 Marquage des nucléosomes natifs avec du maléimide AF488

Le protocole de marquage des nucléosomes natifs a été développé au laboratoire par Vincent Gies et publié en 2017 (Gies et al., 2017a). Succinctement, 200 μ L de nucléosomes natifs ont été mélangés doucement avec 250 μ L de tampon (10 mM Tris-HCl, 0,7 mM EDTA, 3,6 M NaCl). Un excès molaire de 5 fois d'AlexaFluor488 C5-maléimide (Molecular Probes) a été ajouté et le mélange a été incubé pendant 3 heures dans l'obscurité, à température ambiante. Après cela, la solution a été dialysée (3,5 kDa MWCO) dans l'obscurité à 4 °C contre 500 mL de solution contenant 10 mM de Tris-HCl, 0,7 mM d'EDTA et des concentrations décroissantes de NaCl : 2 M pendant 2 heures, 1,5 M pendant 12 heures, 1 M pendant 24 heures, 0,75 M pendant 12 heures, 0,5 M pendant 24 heures, 0,4 M pendant 12 heures et une dernière dialyse avec un nouveau MWCO (20 kDa MWCO) contre 0,4 M de NaCl pendant 12 heures. La concentration d'ADN a été mesurée et l'intégrité des nucléosomes vérifiée après migration sur gel d'agarose, et sur un gel de polyacrylamide après dénaturation dans un tampon SDS dénaturant (0,06 M Tris-HCl, pH 6,8, 2 % (v/v) SDS, 5 % (v/v) β -mercaptoethanol, 25 % (v/v) glycérol et 0,01 % (v/v) bleu de bromophénol). Les échantillons ont été conservés à -20 °C.

6.2 Marquage des LB anti-nucléosomes par cytométrie en flux

Un million de cellules ont été resuspendues dans 50 μ L de tampon PBE. Un volume de 50 μ L de nucléosomes marqués (2 μ g d'ADN/mL) a été ajouté et incubé pendant 20 min dans l'obscurité à 4 °C. Les cellules ont été lavées deux fois dans du PBE puis marquées avec les anticorps classiques tels que décrit précédemment (2.2.1).

7 Séquençage de l'ARN (RNAseq)

L'ARN total des lymphocytes B, lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ triés par cytométrie en flux a été extrait à l'aide du kit RNeasy Plus Micro (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Les analyses RNAseq ont été réalisées par la plateforme Genomax (INSERM U1109, ImmunoRhumatologie Moléculaire, Université de Strasbourg, France). Les bibliothèques ont été préparées à partir de 10 ng d'ARN à l'aide du kit SMARTer Stranded Total RNA-Seq, Pico Input Mammalian (Takara) en suivant les instructions du fabricant. En résumé, des amorces aléatoires ont été utilisées pour la synthèse du premier brin, et l'ADNc ribosomal a été clivé par ZapR V.2 en présence de sondes R mammaliennes V.2. Les bibliothèques ont été regroupées et séquencées sur un NextSeq500 selon les instructions du fabricant (Illumina). Pour chaque échantillon, un contrôle de qualité a été effectué et évalué avec le Core Tools FastQC. Les lectures ont été alignées sur le génome de référence *Mus musculus* à l'aide du logiciel TopHat 2 Aligner et les niveaux d'expression des gènes ont été estimés à l'aide du logiciel Cufflinks V.2.1.1.31 L'analyse de l'expression différentielle a été réalisée avec le logiciel Cuffdiff V.2.1.1 après exclusion des valeurs de fragments par million de kilobases (fpkm) inférieures à 9.

L'analyse GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) ou analyse d'enrichissement des ensembles de gènes (également appelée analyse d'enrichissement fonctionnel ou analyse d'enrichissement des voies) est une méthode permettant d'identifier des classes de gènes ou de protéines qui sont surreprésentées dans un grand ensemble de gènes ou de protéines, et qui peuvent avoir une association avec des processus cellulaires, des voies de signalisation ou des phénotypes de maladies. La méthode utilise des approches statistiques pour identifier les groupes de gènes significativement enrichis ou appauvris. Le logiciel GSEA Software (UC San Diego, Broad Institute) a été utilisé afin de réaliser l'analyse selon les recommandations fournies par les développeurs en comparant les valeurs de fpkm de chaque groupe d'échantillons (échantillons R594C/+ versus échantillons +/+).

8 Séquençage des gènes V, D et J

Les cellules CD138+ de la moelle osseuse de 5 souris +/+ et 5 souris R594C/R594C ont été triées à l'aide du kit « EasySep Mouse CD138 positive Selection », selon les recommandations du fabricant (StemCell). Les cellules CD138+ ont été lysées et l'ADN a été extrait grâce au kit QIAamp DNA micro kit (Qiagen). Le test immunoSEQ utilise une PCR multiplex (en utilisant des amorces spécifiques à un segment de gène) suivie d'un séquençage de nouvelle génération afin de permettre l'identification des séquences CDR3 des loci de récepteurs d'antigènes recombinés. Les échantillons d'ADN purifiés ont été envoyés aux installations d'Adaptive Biotechnologies (Seattle, Washington, États-Unis) conformément à leurs instructions. Nous avons utilisé le logiciel en ligne immunoSEQ pour l'extraction et l'analyse des données.

9 Analyses statistiques

Excepté pour l'analyse des données du RNAseq réalisée selon les recommandations décrites précédemment (cf. MATÉRIEL & MÉTHODES 7), les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel GraphPad Prism 8.0 avec des tests non-paramétriques bilatéraux. Le test de Mann-Whitney est appliqué lorsque l'analyse concerne des échantillons indépendants. Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

RÉSULTATS

1 Génération du modèle murin IRE1- α R594C

1.1 Mise en évidence du site de restriction MfeI chez les souris IRE1- α R594C

Ce projet de thèse a consisté à développer un nouveau modèle de souris transgénique sur fond C57BL/6, et portant la mutation IRE1- α R594C à l'état hétérozygote (qui sera nommée R594C/+) et homozygote (qui sera nommée R594C/R594C). Ce modèle a été produit par la technologie CRISPR/Cas9 par l'entreprise Taconic® (cf MATÉRIELS ET MÉTHODES 1.1)

Afin de confirmer aisément par génotypage la présence de l'allèle muté chez la souris IRE1- α R594C/+, une stratégie faisant apparaître un site de restriction MfeI grâce à une mutation silencieuse (sur le codon 593) a été choisie (**Figure 36 A**). Une analyse par PCR a été faite sur de l'ADN génomique (ADNg) purifié à partir d'une biopsie de queue de souris. Nous utilisons pour cela deux amorces qui vont s'hybrider en amont et en aval des sites de mutation. Après digestion du produit de PCR par l'enzyme MfeI, on obtient en théorie deux fragments de 189 pb et 410 pb pour l'allèle muté, au lieu de 599pb pour l'allèle sauvage. Nous obtenons, comme attendu, trois bandes, respectivement de 599 pb, 410 pb et 189 pb après migration sur gel d'agarose, pour l'ADN des souris KI hétérozygotes (IRE1- α R594C/+). Une seule bande de 599 pb est présente chez les souris contrôles sauvages (+/+). Comme attendu, deux bandes de 410 pb et 189 pb sont présentes chez les souris homozygotes pour la mutation R594C d'IRE1- α (R594C/R594C) (**Figure 36 B**). **La présence du site de restriction est donc confirmée dans l'ADN génomique des souris portant la mutation R594C.**

Afin de vérifier l'insertion correcte des mutations dans le génome des souris R594C, nous avons séquencé (technique Sanger) le produit de PCR obtenu à partir d'une extraction d'ADNg de LB CD43neg (LB naïfs) purifiés à partir de la rate de 3 souris +/+ et de 3 souris R594C/+. Le résultat présenté sous forme d'histogramme (**Figure 36 C**) a confirmé le remplacement de la séquence AACCGA (Asparagine-Arginine) codant les acides aminés 593 et 594 par la séquence AATTGC (Asparagine-Cystéine). Les histogrammes (doubles pics) montrent le caractère hétérozygote de la mutation. **Nous avons ainsi confirmé la présence des mutations ponctuelles.**

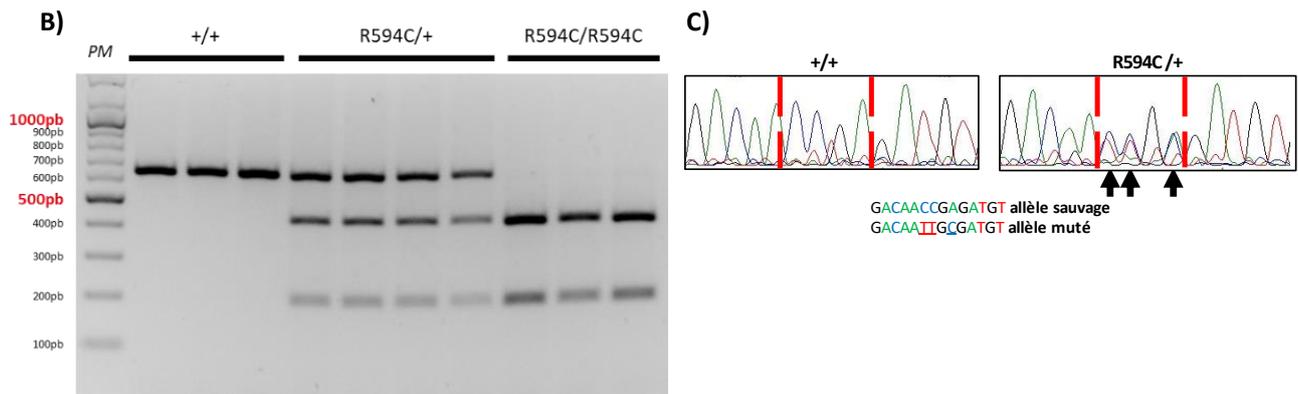
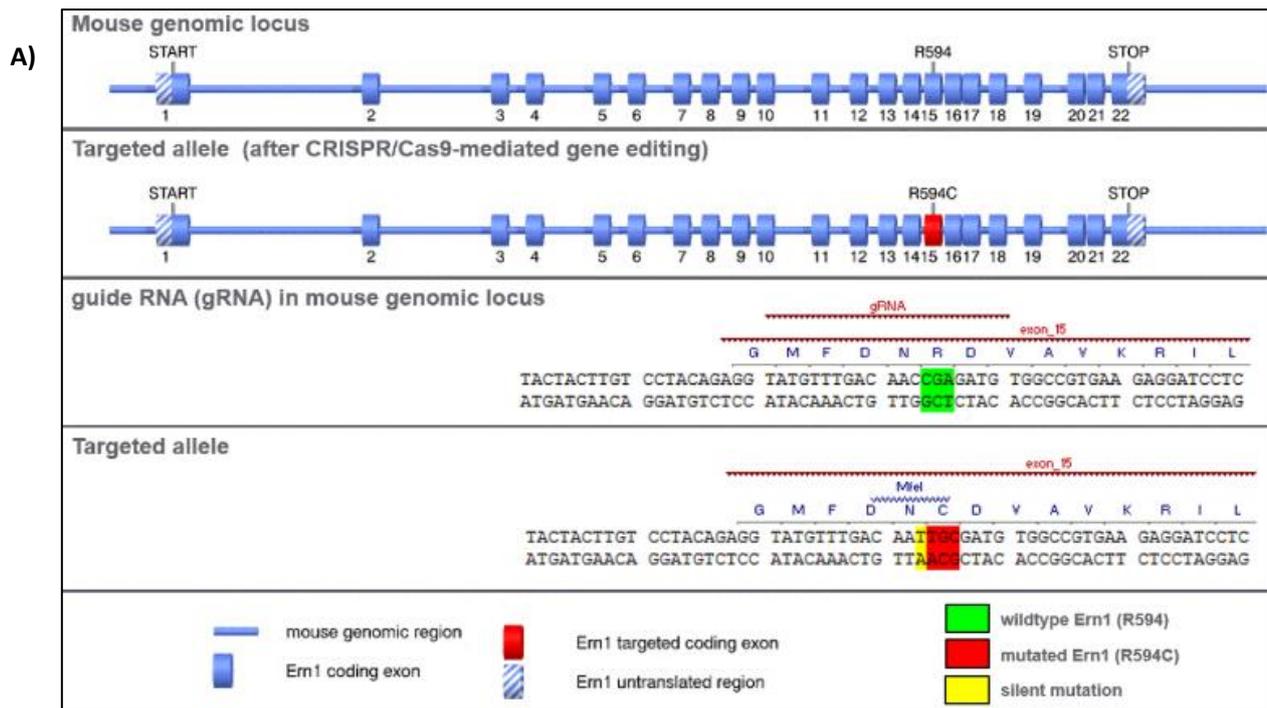


Figure 36. Stratégie de production du modèle murin et validation de la mutation. A) Introduction de la mutation R594C dans l'exon 15 du gène *Ern1* et d'une mutation ponctuelle silencieuse permettant l'apparition d'un site de restriction pour l'enzyme MfeI. B) Résultats de la PCR d'amplification d'un fragment du gène *Ern1* entourant les mutations, après digestion par l'enzyme MfeI puis migration sur gel d'agarose. On observe les 3 bandes à 599, 410 et 189 pb. Les deux bandes les plus petites correspondent à la digestion de l'allèle muté, possédant le site de restriction MfeI. La bande la plus haute correspond à l'allèle sauvage, ne portant pas le site de restriction MfeI. C) Visualisation de la mutation hétérozygote *Ern1* C1780T (correspondant à la substitution R594C) et des mutations introduites pour l'ajout d'un site de restriction MfeI, par séquençage Sanger de l'ADN génomique d'une souris contrôle (gauche) et R594C/+ (droite).

1.2 Mise en évidence de l'expression de l'allèle muté de IRE1- α

L'expression de l'allèle muté a été évaluée par la technique de RT-qPCR associée à la détection des SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) développée par TaqMan[®]. Succinctement, une première sonde couplée avec un fluorochrome VIC est spécifique de l'allèle muté, une deuxième sonde est spécifique de l'allèle sauvage et est couplée avec un fluorochrome FAM. La mesure différentielle de

l'émission de fluorescence des deux sondes permet de déterminer la quantité d'ARNm spécifique de chaque allèle extraite des LB et rétrotranscrite en ADNc (Gaedigk et al., 2015).

D'après la **Figure 37**, l'allèle muté est bien exprimé à la fois dans les cellules hétérozygotes et homozygotes. D'après les valeurs de RFU (*Relative Fluorescence Units*), les expressions de l'allèle sauvage et de l'allèle muté sont équivalentes dans les cellules hétérozygotes. **L'allèle muté est bien exprimé dans les cellules homozygotes et hétérozygotes et la présence de la mutation n'influence donc pas l'expression de l'ARNm codant pour IRE1- α .**

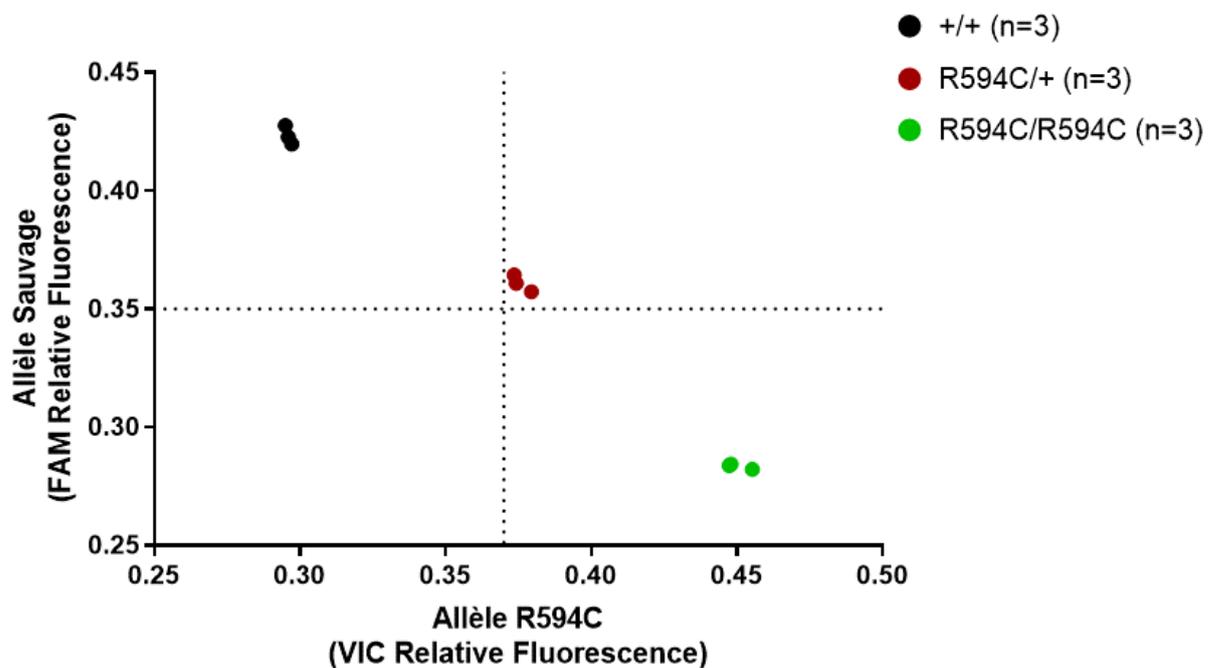


Figure 37. Quantification de l'allèle sauvage et de l'allèle muté (donnant la mutation R594C) par technologie TaqMan® (Custom TaqMan Genotyping Assay) de *Ern1* (1780C>T). Les lignes en pointillés correspondent à la moitié de la différence de valeur de fluorescence relative entre l'allèle muté et l'allèle sauvage.

1.3 Expression protéique d'IRE1- α

Afin de vérifier si la mutation du gène *Ern1* affecte ou non l'expression de la protéine, l'expression protéique de IRE1- α a été évaluée par la technique du western blot à l'aide d'un anticorps commercial (Cell Signaling Technology). D'après la **Figure 38**, l'expression de IRE1- α est similaire dans les splénocytes totaux des souris R594C/R594C, R594C/+ et +/+. **Ainsi, la mutation R594C n'affecte pas l'expression totale de IRE1- α .**

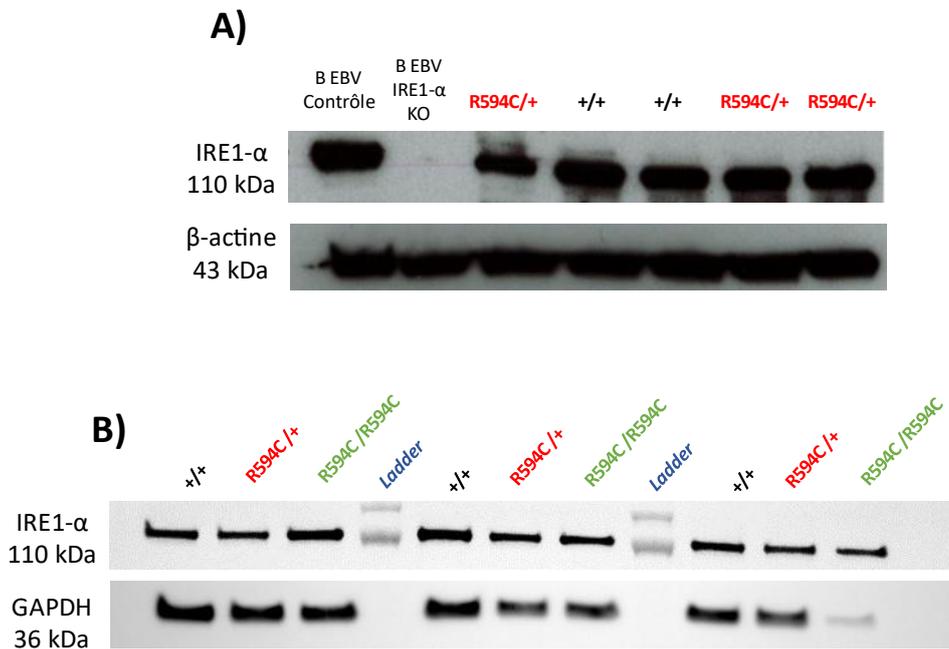


Figure 38. Mise en évidence de l'expression d'IRE1- α par western blot dans les splénocytes de souris (IRE1- α R594C/R594C, R594C/+ ou +/+) ou dans des cellules contrôles, après migration des protéines sur un gel de polyacrylamide, et révélation par un anticorps anti-IRE1- α . A) Expérience 1, lysats de splénocytes de souris +/+ et de souris R594C/+ comparés à un lysat LB-EBV contrôle et un lysat LB-EBV IRE1- α KO. B) Expérience 2, lysats de splénocytes de souris +/+, de souris R594C/+ et de souris R594C/R594C. L'intensité du signal a été quantifiée et normalisée par rapport à l'expression de la chaîne β de l'actine et n'a pas montré de différence entre les 2 populations de souris. (B EBV contrôle : lymphocytes B humains immortalisés ; B EBV IRE1- α KO : lymphocytes B humains modifiés par CRISPR/Cas9, KO pour IRE1- α). L'anticorps 14C10 réagit avec la protéine murine et la protéine humaine d'après le fournisseur (Cell Signaling Technology).

2 Caractérisation de la fonction de la protéine IRE1- α mutée

L'un des premiers objectifs de ce travail était d'analyser l'impact de la mutation R594C sur la fonction de la protéine IRE1- α .

2.1 Analyse de la fonction ribonucléase d'IRE1- α

2.1.1 Mesure de l'expression de la protéine XBP1s par cytométrie en flux dans les LB

La principale fonction de la protéine IRE1- α activée est l'épissage non conventionnel de l'ARNm du gène *Xbp1*. L'ARNm épissé de *Xbp1* code pour une protéine XBP1s qui est un facteur de transcription actif permettant la réponse au stress du RE et à l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE (Han et al., 2009; Hetz et al., 2020). XBP1s est également un facteur de transcription important dans la différenciation plasmocytaire et l'homéostasie des LB (Shaffer et al., 2004; Todd et al., 2009). Nous avons donc analysé par cytométrie en flux l'expression de XBP1s dans les LB des souris R594C homozygotes et hétérozygotes et nous l'avons comparé à des souris contrôles. L'expression de XBP1s a été analysée après stimulation des LB à l'aide d'un agoniste du TLR4 (LPS, *S. Typhosa*, Sigma®) à la concentration de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pendant 48 h, puis induction d'un stress du RE à l'aide de la thapsigargine (2,5 μM , Tocris®). La thapsigargine est un bloqueur de SERCA, un canal calcique du RE. Le blocage du canal calcique modifie l'équilibre ionique dans le RE et a pour effet de perturber le repliement des protéines, et donc provoque l'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE et ainsi l'activation de l'UPR. Ce protocole a été décrit précédemment dans un article publié en 2018 (Tang et al., 2018).

Nous avons pu observer que l'expression de XBP1s est diminuée dans les LB des souris R594C/R594C par rapport aux souris contrôles dans le cas d'un stress du RE après activation, et que la baisse d'expression de XBP1s dans les LB des souris R594C/+ est intermédiaire (Figure 39).

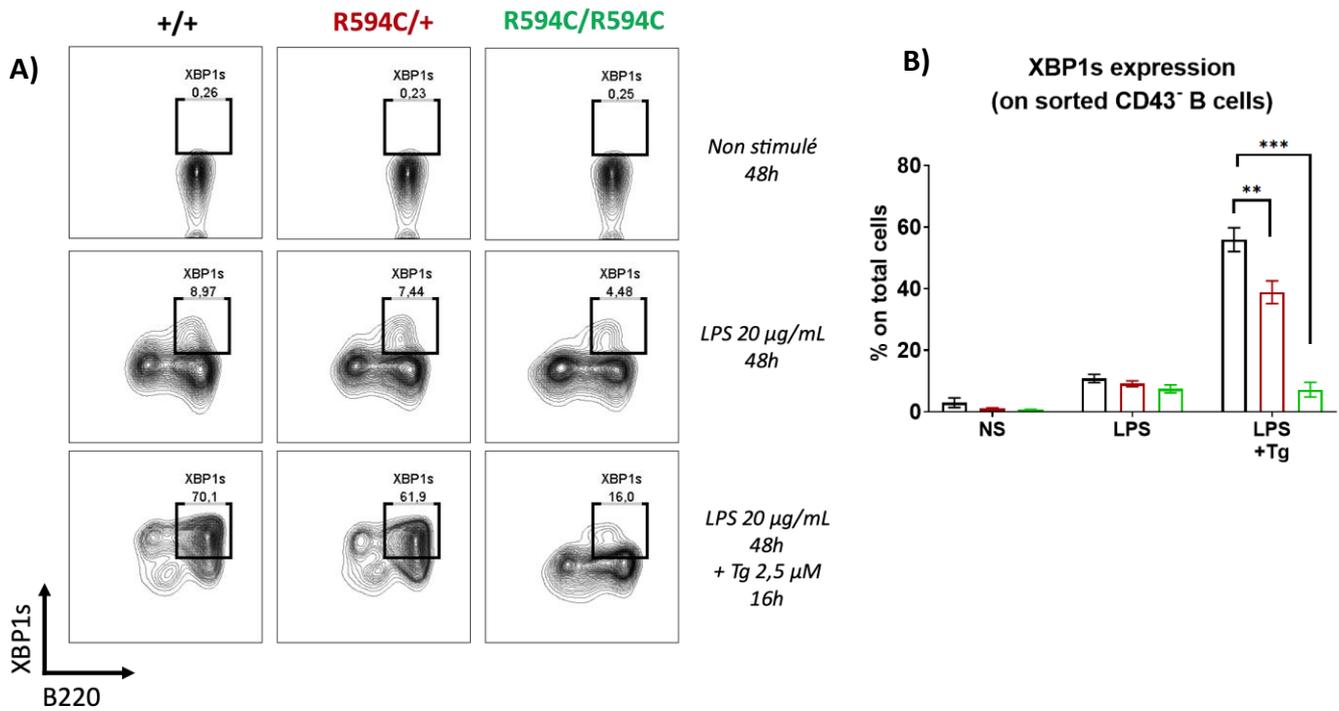


Figure 39. Analyse de l'expression de XBP1s dans les LB par cytométrie en flux. A) Exemples de marquage de XBP1s dans les LB CD43- triés (cellules vivantes, DAPI-) par cytométrie en flux. B) Pourcentage de cellules XBP1s positives parmi les LB CD43- triés des souris +/+ (colonnes noires, n = 16), R594C/+ (colonnes rouges, n = 14), R594C/R594C (colonnes vertes, n = 7). NS (non stimulés, 48 h), LPS (20 µg/mL, 48 h) et LPS + thapsigargine (Tg) (20 µg/mL LPS, 48 h suivies de 16 h d'incubation avec la thapsigargine, 2,5 µM) (Moyenne ± SEM ; Statistiques : Test de Mann & Whitney ; ** : p < 0.01, *** : p < 0.001)

Ces résultats suggèrent que l'épissage de XBP1s par IRE1-α est perturbé dans les LB des souris porteuses de la mutation, de manière dose-dépendante. **La fonction ribonucléase de la protéine est donc impactée par cette mutation localisée dans le domaine kinase** (rappel de la structure d'IRE1-α en Figure 40).

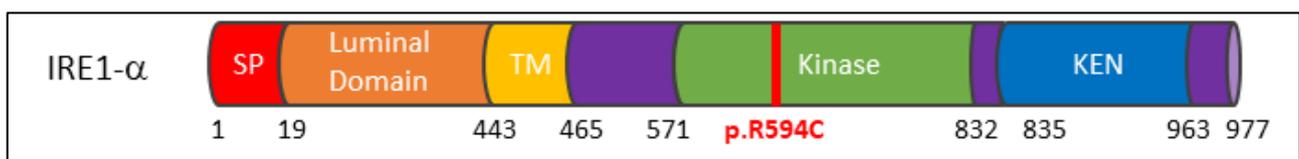


Figure 40. Structure schématique de la protéine IRE1-α et localisation de la mutation R594C. La mutation R594C est située dans le domaine kinase de la protéine. SP (Séquence Peptide Signal), TM (domaine transmembranaire), KEN (domaine endoribonucléasique), les domaines de liaison (*linker*) sont représentés en violet.

2.1.2 Mesure de l'expression de la protéine XBP1s par cytométrie en flux dans les LT

Le rôle de XBP1s est bien décrit dans les LB et ces cellules sont des acteurs majeurs de la physiopathologie du lupus puisque ce sont les cellules productrices des auto-anticorps. Cependant, les LT sont également des acteurs essentiels du système immunitaire et de la physiopathologie du lupus (Suárez-Fueyo et al., 2016). De plus, IRE1- α joue un rôle important dans l'activation et la polarisation des LT, notamment les LTh2 et LTh17 (Junjappa et al., 2018). Nous avons donc décidé d'étudier l'expression de XBP1s dans les LT CD4⁺ et CD8⁺ à l'aide de la même technique que précédemment, en stimulant les LT à l'aide d'un cocktail d'anticorps anti-CD3/anti-CD28 (5 μ g/mL, BD Biosciences) pendant 48 h puis en induisant un stress du RE par ajout de la thapsigargine (2,5 μ M, Tocris) pendant 16 h (**Figure 41 A**). De la même manière que dans les LB, nous avons pu observer une diminution de la quantité de XBP1s par cytométrie en flux dans les LT CD4⁺ et CD8⁺ des souris mutées homozygotes et une expression intermédiaire dans les LT des souris hétérozygotes (**Figure 41 B et C**). **La diminution de synthèse de XBP1s dans les cellules porteuses de la mutation IRE1- α R594C est donc également observable dans les LT.**

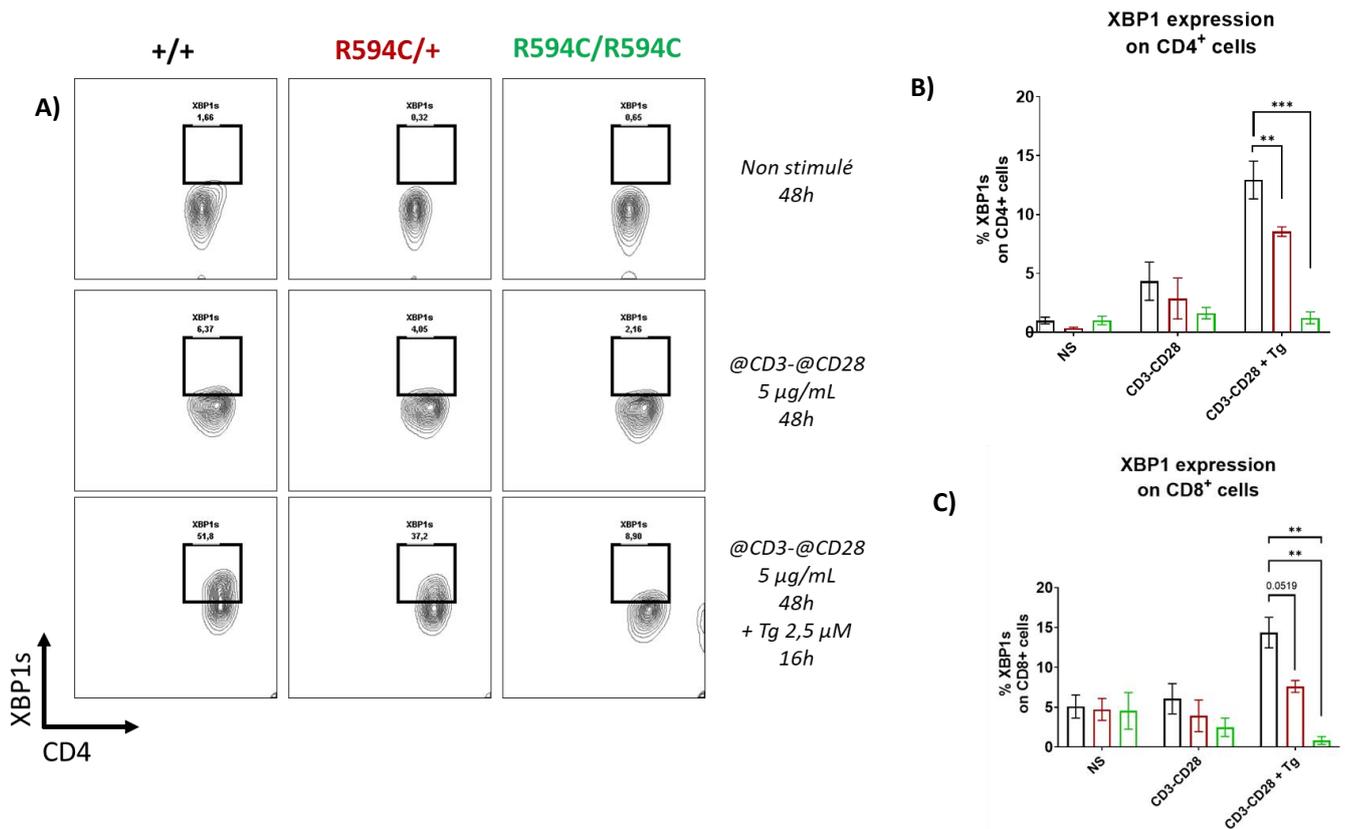


Figure 41. Analyse de l'expression de XBP1s dans les LT CD4⁺ et CD8⁺ par cytométrie en flux. A) Exemples de marquage de XBP1s dans les cellules CD4⁺ vivantes (DAPI⁻) par cytométrie en flux, NS (non stimulés, 48h), @CD3-@CD28 (5 µg/mL, 48 h) et @CD3-@CD28 + thapsigargine (Tg) (5 µg/mL @CD3-@CD28, 48 h suivies de 16 h d'incubation avec la thapsigargine, 2,5 µM). B) Pourcentage de cellules XBP1s positives parmi les LT CD4⁺. C) Pourcentage de cellules XBP1s positives parmi les LT CD8⁺. Souris +/+ (colonnes noires, n = 6), R594C/+ (colonnes rouges, n = 5), R594C/R594C (colonnes vertes, n = 5). (Moyenne ± SEM ; Statistiques : Test de Mann & Whitney ; ** : p < 0,01, *** : p < 0,001).

2.1.3 Mesure de l'épissage de XBP1s

Afin d'évaluer plus précisément l'impact du mutant R594C sur la fonction ribonucléasique de la protéine IRE1- α , nous avons quantifié la quantité d'ARNm de XBP1 non épissé (XBP1u) et de XBP1 épissé (XBP1s) à l'aide d'amorces spécifiques des deux transcrits. Dans les mêmes conditions de stimulation que précédemment, **nous avons observé une diminution du ratio XBP1s/XBP1u dans les LB de souris mutantes, de manière dose-dépendante. Ceci conforte l'hypothèse d'une mutation perte de fonction (Figure 42).** Il est intéressant de noter que la diminution du ratio est déjà statistiquement significative dans le cas des cellules homozygotes non stimulées et après une stimulation à l'aide d'un agoniste TLR4 (LPS) seul.

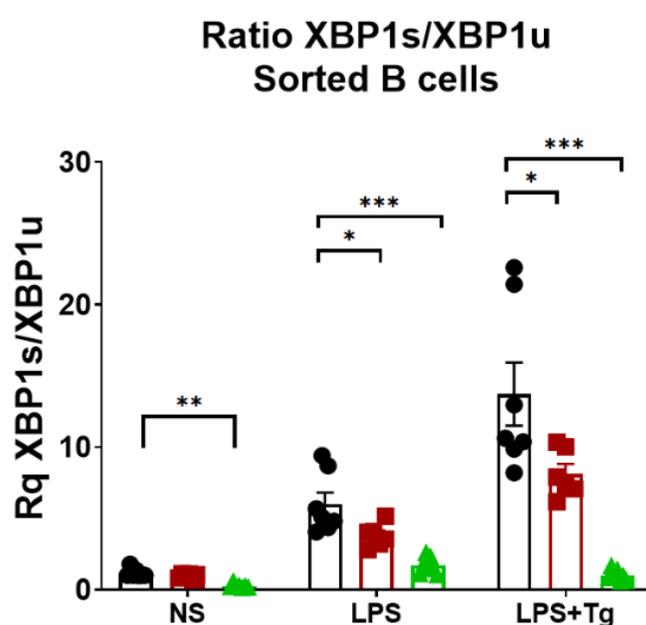


Figure 42. Diminution de l'épissage de XBP1 dans les LB purifiés de souris IRE1- α KI/+ après induction d'un stress du réticulum endoplasmique. Après stimulation, les ARN ont été extraits, rétrotranscrits en ADNc, et l'expression de *Xbp1u* et *Xbp1s* a été quantifiée à l'aide de la technique de qPCR SYBR[®]. Cette expression a été normalisée par rapport à celle du gène *Actb* (codant la chaîne β de l'actine), en utilisant les LB non stimulés comme échantillons de référence. NS (non stimulés, 48 h), LPS (20 μ g/mL, 48 h) et LPS + thapsigargine (Tg) (20 μ g/mL LPS, 48 h suivies de 16 h d'incubation avec la thapsigargine, 2,5 μ M). Souris +/+ (points noirs, n = 7), R594C/+ (points rouges, n = 5), R594C/R594C (points verts, n = 5). (Chaque point représente une souris. Moyenne \pm SEM ; Statistiques : Test de Mann & Whitney ; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001)

2.1.4 Mesure de l'expression des gènes cibles de XBP1s

Nous avons mesuré l'expression de certains gènes cibles de XBP1s dans les LB afin d'évaluer les conséquences directes de la baisse d'épissage de XBP1 sur les gènes régulés par ce facteur de transcription. Les gènes cibles choisis sont deux molécules chaperonnes (DNAJB9 et p58IPK), importantes dans la réponse au stress du RE avec pour rôle d'augmenter la capacité de repliement des protéines du RE (Park et al., 2021). La troisième cible est l'IL-6, une cytokine importante dans les processus inflammatoires et auto-immuns (dans la PR notamment) (Kang et al., 2020). D'après la **Figure 43**, la baisse des gènes cibles de XBP1s est bien associée à la baisse de l'épissage de XBP1, la mutation R594C entraîne donc une diminution de la réponse XBP1s dans les LB stimulés.

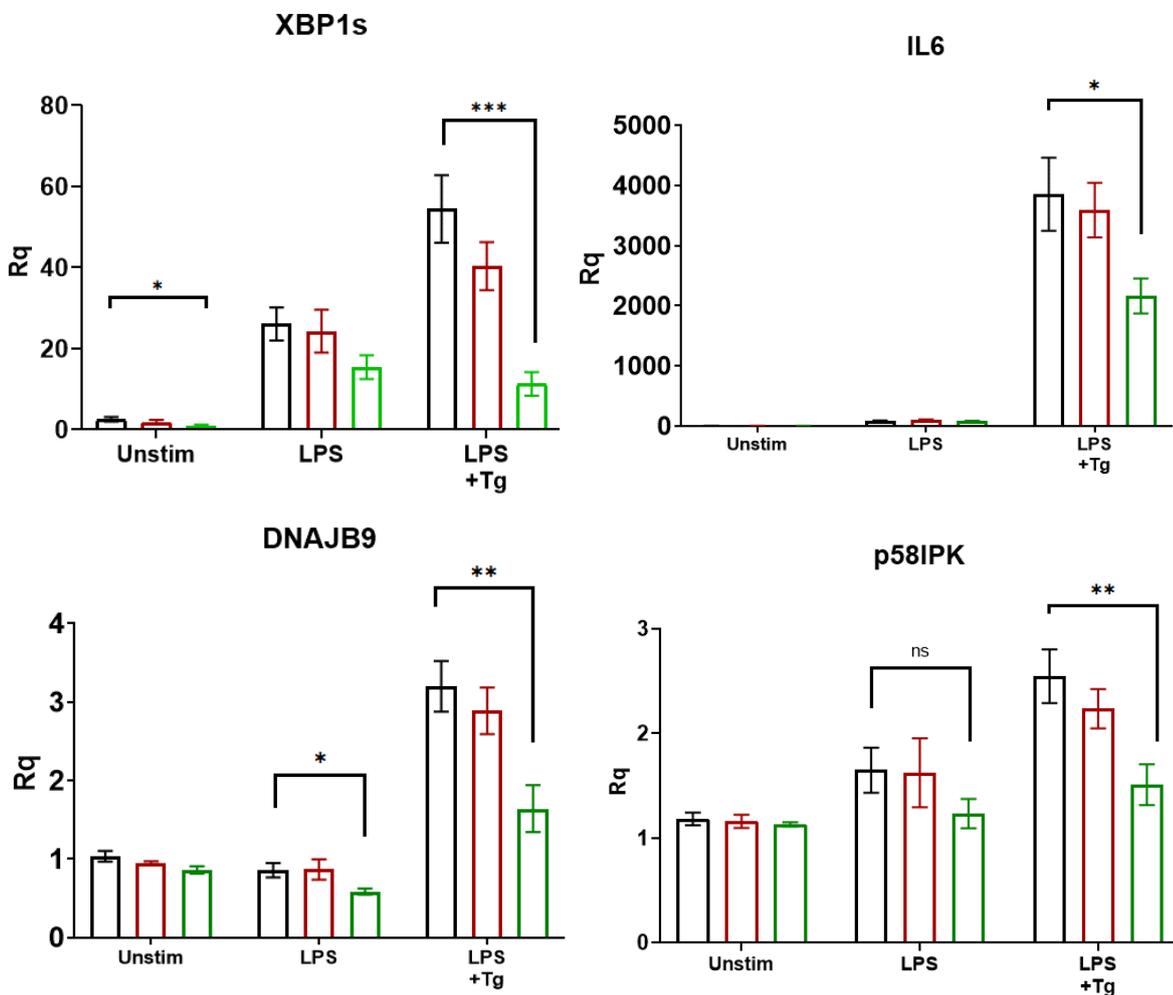


Figure 43. Mesure de l'expression des gènes cibles de XBP1s. L'expression des gènes *XBP1s*, *DNAJB9*, *p58IPK* et *Il6* a été quantifiée par RT-qPCR SYBR Green dans des LB triés CD43neg spléniques en conditions non stimulés (unstim), stimulés pendant 48 h avec du LPS (20 µg/mL, 48 h) et une combinaison de LPS + thapsigargine (Tg) (LPS, 20 µg/mL, 48h et thapsigargine, 2,5 µM, 6 h). Souris +/+ (barres noires, n = 7), R594C/+ (barres rouges, n = 5), R594C/R594C (barres vertes, n = 5). (Moyenne ± SEM ; Statistiques : Test de Mann & Whitney ; * p < 0,05, ** p < 0,01).

2.1.5 Regulated IRE1-Dependant Decay (Fonction RIDD)

Si la principale cible de IRE1- α décrite dans la littérature est la forme non épissée de l'ARNm de XBP1, son domaine ribonucléasique peut également dégrader de nombreux ARNm. Cette fonction, décrite plus récemment, se nomme le RIDD (*Regulated IRE1-Dependent Decay*) (Maurel et al., 2014). La fonction du RIDD est importante dans les cellules immunitaires, bien qu'il reste encore à décrire son rôle exact dans l'homéostasie cellulaire. D'après les travaux de van Anken (van Anken et al., 2014), l'absence de l'ARNm de XBP1 entrainerait mécaniquement une augmentation du RIDD car la protéine IRE1- α tendrait dans ce cas à suractiver sa fonction ribonucléase afin de répondre au stress du RE. Une des cibles du RIDD est l'ARNm de la chaîne sécrétée des IgM, le gène μS ; ainsi, d'après les auteurs de l'étude, l'absence de XBP1 entraîne la dégradation de l'ARNm μS et donc diminue donc la sécrétion d'IgM. Les autres gènes cibles choisis (*Itgb2*, *Tapbp*, *Ergic3*) ont été bien décrits dans la littérature (Hollien et al., 2009; Tang et al., 2018). De manière intéressante, **l'impact de la mutation R594C d'IRE1- α semble moins clair sur la fonction RIDD. D'après la Figure 44, l'expression des gènes *Tapbp* et *Ergic3* est diminuée dans les LB R594C/R594C lors d'un stress du RE, suggérant une activation du RIDD. A l'inverse, l'expression de *Itgb2* et de μS est augmentée allant dans le sens d'une diminution de l'activité RIDD.**

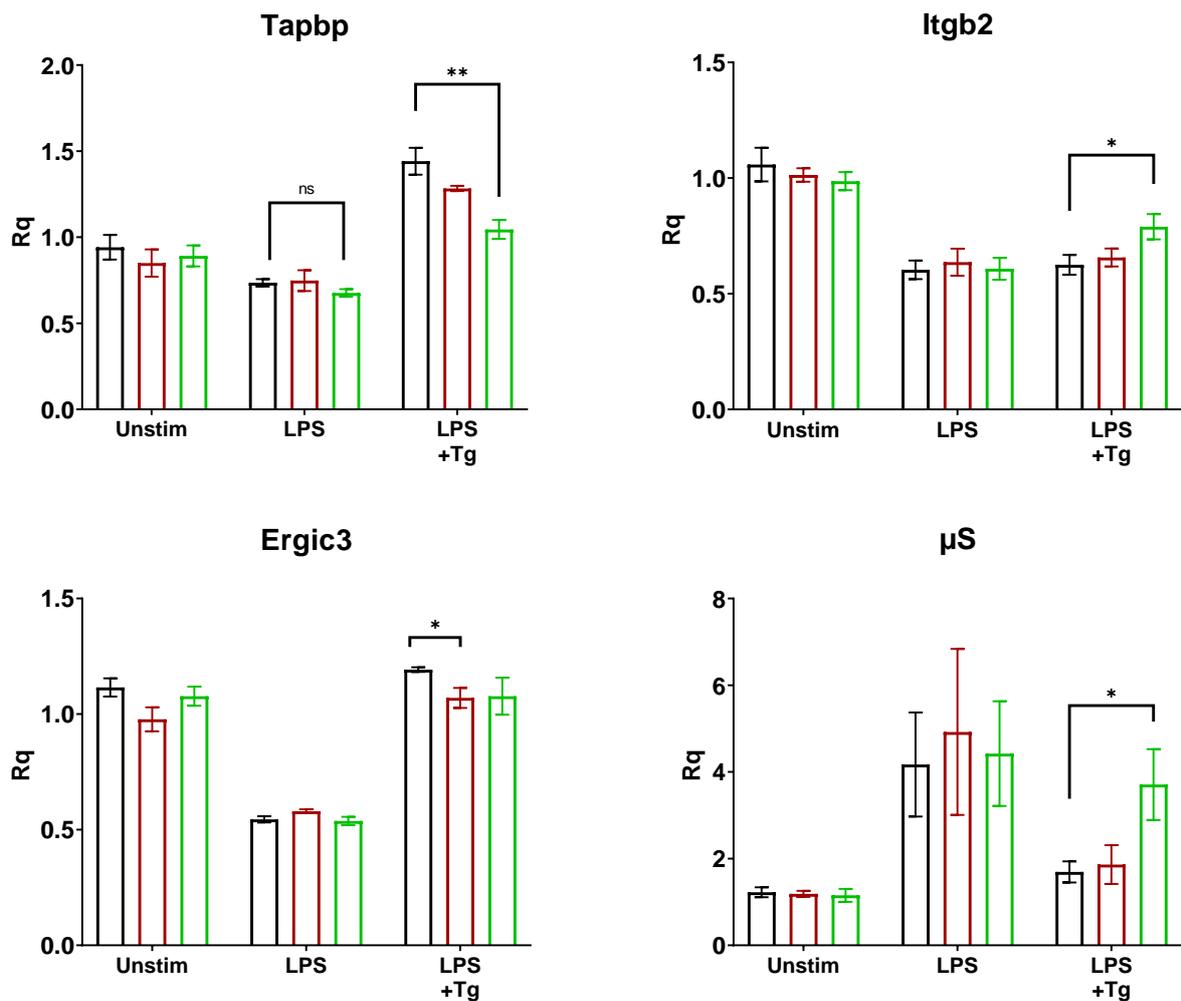


Figure 44. Mesure de l'expression des gènes cibles du RIDD. L'expression des gènes *Tapbp*, *Itgb2*, *Ergic3* et μS a été évaluée par RT-qPCR SYBR Green dans des LB triés CD43neg spléniques en conditions non stimulés (unstim), stimulés pendant 48h avec du LPS (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 48 h) et une combinaison de LPS+Tg (LPS, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 48 h et thapsigargine, 2,5 μM , 6 h). Souris +/+ (barres noires, n=7), R594C/+ (barres rouges, n = 5), R594C/R594C (barres vertes, n = 5). (Moyenne \pm SEM ; Statistiques : Test de Mann & Whitney ; * p < 0,05, ** p < 0,01).

2.2 Analyse de la fonction kinase de IRE1- α

2.2.1 Phosphorylation de IRE1- α

Nous avons voulu tester l'impact de la mutation R594C sur la fonction kinase de la protéine IRE1- α . Nous avons utilisé la technique du western blot sur des LB triés stimulés ou non par du LPS, pour détecter la phosphorylation de la protéine. D'après la **Figure 45** représentant des résultats préliminaires, **la phosphorylation de IRE1- α ne semble pas affectée par la présence de la mutation R594C**. Cependant, de nouvelles expériences sont en cours de réalisation pour confirmer ces résultats. L'anticorps anti-IRE1- α phosphorylé (référence : PA1-16927) a été en rupture de stock chez notre fournisseur. Nous avons réalisé des tests avec une deuxième référence (référence : PA5-105424) malheureusement peu concluants pour l'instant.

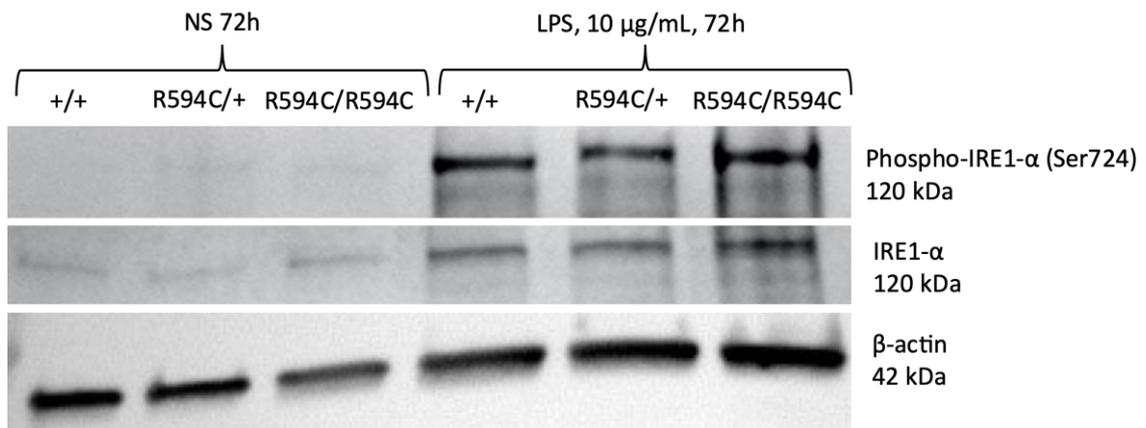


Figure 45. Analyse de la phosphorylation de IRE1- α dans les LB portant la mutation R594C. La phosphorylation de IRE1- α a été mesurée par western blot dans des LB triés CD43neg spléniques en conditions non stimulés (NS) et stimulés pendant 72 h avec du LPS (20 μ g/mL, 48 h). La concentration des protéines a été normalisée par rapport à l'expression de la chaîne β de l'actine (β -actin).

2.2.2 Activation de la voie JNK

La fonction kinase de IRE1- α est capable d'activer la voie JNK. Cette activation passe par le recrutement de TRAF2 par le domaine kinase d'IRE1- α , puis par l'activation de la cascade de signalisation ASK1/JNK (Urano et al., 2000). Nous avons testé par western blot l'état de phosphorylation de JNK après stimulation des LB porteurs de la mutation R594C par le LPS ou traitement par la tunicamycine (un antibiotique inhibant l'enzyme GlcNAc phosphotransférase et donc la N-glycosylation des protéines, induisant un stress du RE par accumulation de protéines). Nous avons montré que **la présence de la mutation ne semble pas affecter la phosphorylation de JNK**

(Figure 46). Ces résultats restent préliminaires et des analyses plus complètes sont en cours de réalisation.

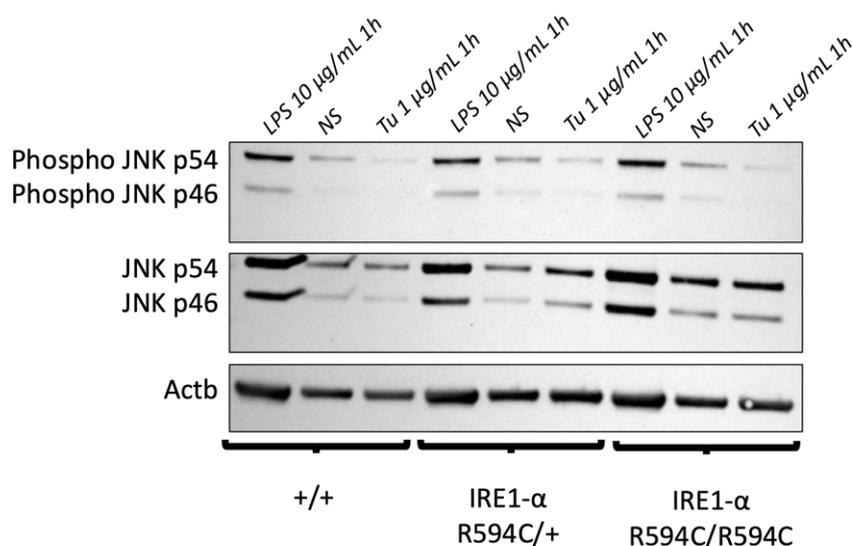


Figure 46. Analyse de la phosphorylation de JNK induite par IRE1- α dans des LB spléniques. La phosphorylation de JNK a été évaluée par la technique du Western-Blot sur des triés CD43- après stimulation au LPS (10 μ g/mL, 1 h) et à la tunicamycine (Tu, inducteur du stress du réticulum endoplasmique, 1 μ g/mL, 1 h). La concentration des protéines a été normalisée par rapport à l'expression de la chaîne β de l'actine (β -actin).

2.3 Impact du mutant R594C sur l'expression des gènes *CHOP* et *ATF6*

Afin de déterminer l'impact de la mutation IRE1- α R594C sur les deux autres voies de l'UPR que sont ATF6 et PERK, nous avons mesuré par RT-qPCR d'une part l'expression du gène *Atf6*, et d'autre part l'expression de *Chop*, principal gène régulé par PERK et dont la fonction est notamment d'activer les voies de l'apoptose en cas de stress prolongé (Harding et al., 2000). **D'après la Figure 47, l'expression des gènes *Chop* et *Atf6* n'est pas modifiée par la présence de la mutation IRE1- α R594C.**

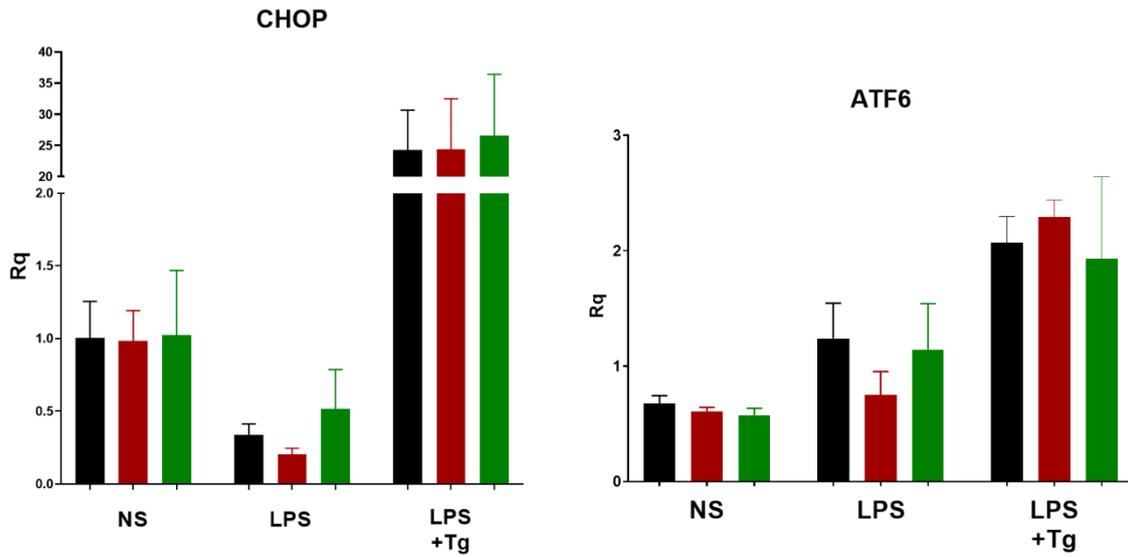


Figure 47. Mesure de l'expression de *Chop* et *Atf6* dans les LB CD43- triés de souris +/+ (barres noires, n = 4), de souris R594C/+ (barres rouges, n = 2) et de souris R594C/R594C (barres vertes, n = 5). Conditions de stimulation : NS (48 h non stimulés) LPS (48 h LPS 20 µg/mL) et LPS+Tg (48 h LPS 20 µg/mL + 16 h thapsigargine 2,5 µM). L'expression a été calculée par la technique des $\Delta\Delta Ct$ en utilisant un échantillon +/+ de référence pour chaque condition de stimulation (Moyenne \pm SEM).

3 Analyse transcriptomique des souris R594C/+

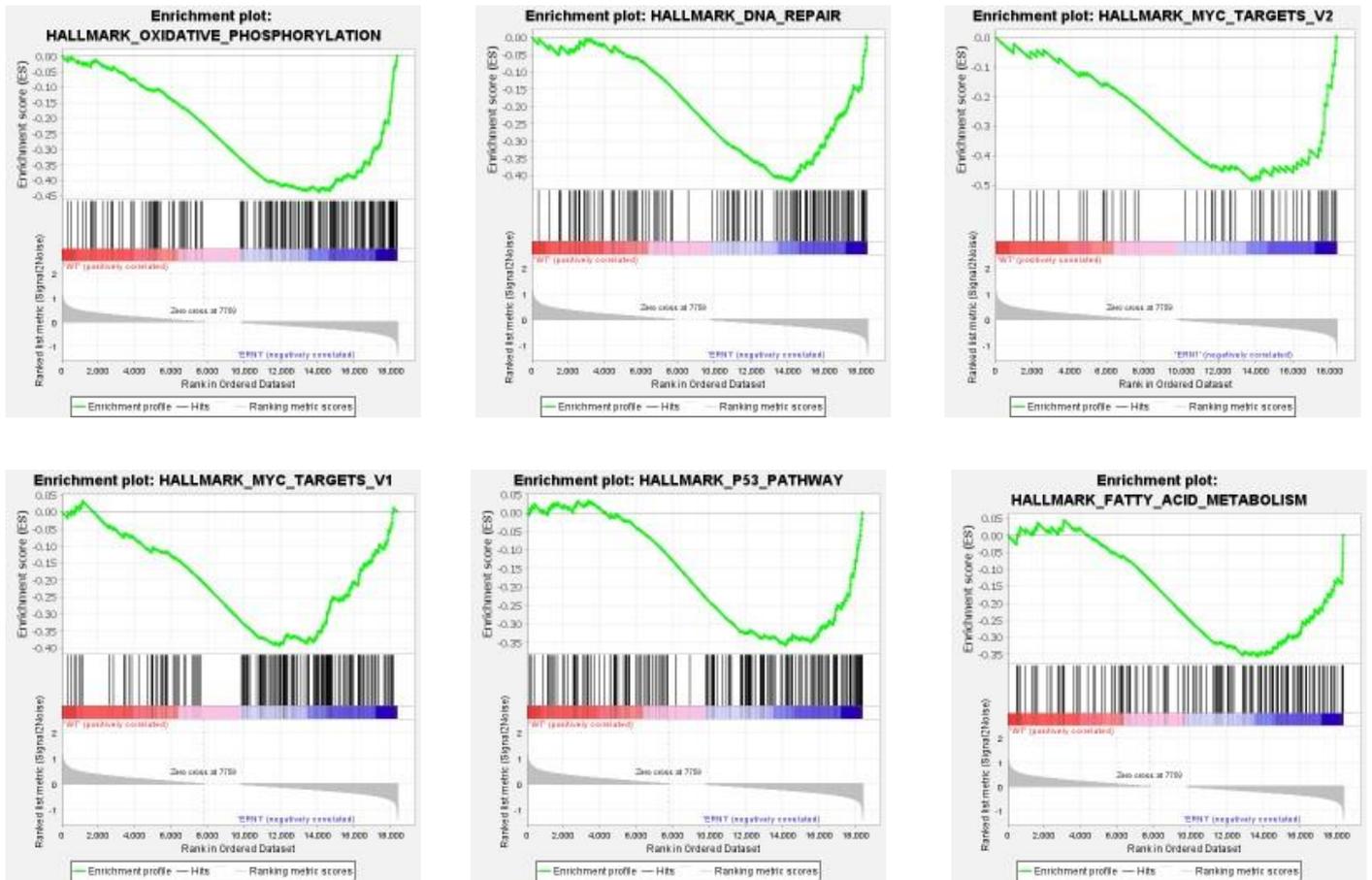
Nous avons réalisé une analyse transcriptomique des LB, des LT CD4⁺ et des LT CD8⁺ issus de souris porteuses de la mutation R594C hétérozygote âgées de 10 à 12 mois, et triés par cytométrie en flux. L'analyse du transcriptome de souris R594C/+ et sa comparaison à celui des souris +/+ présente l'avantage de rechercher des voies biologiques qui pourraient être modifiées (activées ou inhibées) dans les LB ou les LT sans *a priori*. Nous avons choisi les souris âgées de 10 à 12 mois correspondant à l'âge des souris présentant des traits de phénotype tels que la production d'auto-anticorps (voir partie RÉSULTATS 5.2). Cette analyse ayant été réalisée au début de la thèse, les souris homozygotes pour la mutation n'étaient pas encore disponibles.

L'analyse statistique globale du transcriptome a été globalement décevante. Seuls trois gènes ont été retrouvés statistiquement sous-exprimés dans les LT CD4⁺ (*Col1a2*, *Itga5* et *Acp2*), et deux gènes ont été retrouvés sur-exprimés dans les LT CD8⁺ des souris hétérozygotes (*Rbm14* et *Gm45471*). Enfin, un seul gène est sous-exprimé de façon significative dans les LB des souris hétérozygotes (*Gm8274*). Il est à noter que *Gm45471* et *Gm8274* sont des pseudogènes qui ne codent pas pour des protéines fonctionnelles. Le **Tableau 10** ci-dessous résume les gènes différentiellement exprimés entre les LB, les LT CD4⁺ et les LT CD8⁺ des souris hétérozygotes et des souris sauvages.

Cellules analysées	Gènes différentiellement exprimés	Fonction
LT CD4 ⁺	Col1a2 Log2 (Fold-change) = -5,984700721 valeur-p = 0,041570432	Code pour la chaîne alpha 2 du collagène de type 1.
	Itga5 Log2 (Fold-change) = -2,244422731 valeur-p = 0,014936812	Code pour l'intégrine alpha-5.
	Acp2 Log2 (Fold-change) = -1,038471989 valeur-p = 0,0297926	Code pour la Phosphatase acide de type 2 lysosomal.
LT CD8 ⁺	Rbm14 Log2 (Fold-change) = 1,456749846 valeur-p = 0,017717245	Code pour une protéine de liaison à l'ARN (RNA-binding protein 14).
	Gm45471 Log2 (Fold-change) = 5,228462713 valeur-p = 0,039278831	Pseudogène
LB	Gm8274 Log2 (Fold-change) = -6,210246143 valeur-p = 0,022903821	Pseudogène

Tableau 10. Gènes différentiellement exprimés dans les lymphocytes des souris R594C/+ par rapport aux souris +/+ (n = 5 souris par groupe). Les gènes en rouge sont surexprimés dans les cellules R594C/+ et les gènes en bleu sont sous-exprimés.

Malgré ces résultats décevants, une analyse GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) a tout de même été réalisée sur l'ensemble des résultats du transcriptome. Plusieurs signatures de gènes sont retrouvées sous-exprimées dans les LB, les LT CD4⁺ et les LT CD8⁺ de souris R594C/+ par rapport aux souris +/+ avec un seuil statistique du FDR de 5 % (FDR : *False Discovery Rate*). Bien que ces résultats soient à mettre en regard du faible nombre de gènes individuellement dérégulés dans les cellules immunitaires des souris IRE1- α R594C et sont donc sujets à caution, il est intéressant de noter que les signatures sous-exprimées de façon significative sont en majorité des voies de signalisation associées au stress du RE et à la réponse UPR. En effet, **la phosphorylation oxydative et la production de ROS** (*Reactive Oxygen Species* ou dérivés réactifs de l'oxygène) sont diminuées dans les LB (**Figure 48**) et les LT (**Figure 49 A et B**). Il a été montré que l'environnement tumoral favorisait l'activation de IRE1- α dans les LT et les macrophages infiltrant la tumeur afin de contrôler leur activation et de favoriser la polarisation en M2, et ainsi d'inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale (Jiang et al., 2021; Song et al., 2018). **Une signature de la voie Myc est également sous-exprimée dans les LT CD4 et les LT CD8 (Figure 49 A et B)**. c-Myc est régulée positivement par IRE1- α dans les cellules NK dont le métabolisme est proche des LT, afin de permettre la prolifération des NK activées (Dong et al., 2019). Ces résultats suggèrent donc une diminution des voies de signalisation régulées par IRE1- α dans les cellules porteuses de la mutation R594C. Dans **les LT CD8⁺, des voies pro-inflammatoires telles que la voie de l'interferon- α , la voie mTOR ainsi que la voie du TNF- α sont sous-exprimées (Figure 49 B)**. Il a été démontré que l'épissage de XBP1 induit par IRE1- α en réponse à l'activation du TLR est crucial pour la production de cytokines, car une déficience de XBP1 spécifique aux macrophages entrave la production d'IL-6, de TNF- α et d'interféron- β (Grootjans et al., 2016; Martinon et al., 2010). De plus, dans les LT CD8⁺, **la voie UPR est sous-régulée de façon significative (Figure 49 B)**; ce résultat confirme bien l'hypothèse d'une mutation perte de fonction. Il est cependant à noter que cette diminution des gènes de la voie de l'UPR n'est pas retrouvée dans les LB et LT CD4⁺.



Nom de l'ensemble de gènes	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
<u>HALLMARK_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION</u>	193	-0.44	-1.96	0,001
<u>HALLMARK_DNA_REPAIR</u>	143	-0.42	-1.78	0,002
<u>HALLMARK_MYC_TARGETS_V2</u>	54	-0.49	-1.78	0,002
<u>HALLMARK_MYC_TARGETS_V1</u>	179	-0.39	-1.74	0,003
<u>HALLMARK_P53_PATHWAY</u>	188	-0.36	-1.62	0,009
<u>HALLMARK_FATTY_ACID_METABOLISM</u>	155	-0.36	-1.57	0,014

Figure 48. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) des données de RNAseq sur la population de LB (B220⁺IgM⁺) des souris R594C/+ vs. +/+.

A)

Nom de l'ensemble de gènes	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
<u>HALLMARK_MYC_TARGETS_V1</u>	-0.42	-1.91	0.000	0.001
<u>HALLMARK_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION</u>	-0.42	-1.89	0.000	0.001
<u>HALLMARK_REACTIVE_OXYGEN_SPECIES_PATHWAY</u>	-0.45	-1.66	0.004	0.012
<u>HALLMARK_ALLOGRAFT_REJECTION</u>	-0.34	-1.56	0.000	0.032
<u>HALLMARK_P53_PATHWAY</u>	-0.34	-1.52	0.002	0.044

B)

Nom de l'ensemble de gènes	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
<u>HALLMARK_MYC_TARGETS_V1</u>	179	-0.47	-2.33	0.000
<u>HALLMARK_UV_RESPONSE_UP</u>	150	-0.39	-1.90	0.005
<u>HALLMARK_MYC_TARGETS_V2</u>	54	-0.46	-1.86	0.004
<u>HALLMARK_DNA_REPAIR</u>	143	-0.37	-1.79	0.006
<u>HALLMARK_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION</u>	193	-0.34	-1.71	0.009
<u>HALLMARK_UNFOLDED_PROTEIN_RESPONSE</u>	106	-0.35	-1.61	0.014
<u>HALLMARK_E2F_TARGETS</u>	193	-0.31	-1.58	0.019
<u>HALLMARK_MTORC1_SIGNALING</u>	187	-0.31	-1.57	0.017
<u>HALLMARK_INTERFERON_ALPHA_RESPONSE</u>	87	-0.35	-1.53	0.022
<u>HALLMARK_FATTY_ACID_METABOLISM</u>	155	-0.31	-1.52	0.021
<u>HALLMARK_PI3K_AKT_MTOR_SIGNALING</u>	102	-0.33	-1.49	0.024
<u>HALLMARK_REACTIVE_OXYGEN_SPECIES_PATHWAY</u>	47	-0.38	-1.47	0.027
<u>HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB</u>	192	-0.28	-1.40	0.049

Figure 49. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) des données de RNAseq sur la population de A) LT CD4⁺ et B) LT CD8⁺ des souris R594C/+ *versus* +/+.

4 Étude phénotypique du modèle IRE1- α R594C à l'état basal

Afin d'évaluer les conséquences de l'expression de la mutation R594C dans les cellules immunitaires des souris IRE1- α R594C, à savoir sur le développement et le phénotype de ces cellules dans les organes lymphoïdes, nous avons procédé à l'immunophénotypage des souris portant la mutation R594C (hétérozygote et homozygote) d'IRE1- α , par rapport aux souris contrôles +/+. L'analyse incluait la répartition des sous-populations lymphocytaires dans les organes lymphoïdes, l'état d'activation des LB et la production d'immunoglobulines dans le sérum. Ceci a été réalisé sur des souris âgées de 9 à 12 mois, correspondant à l'âge d'apparition des symptômes auto-immuns dans les modèles murins de lupus connus dans la littérature (Perry et al., 2011b).

4.1 Immunophénotypage des organes lymphoïdes du modèle IRE1- α R594C

Les organes lymphoïdes primaires (MO et thymus) et secondaires (rate et ganglions (GG)) ont été prélevés et leurs cellules ont été comptées puis analysées par cytométrie en flux après marquage avec différentes combinaisons d'anticorps, afin de déterminer les proportions des sous-populations lymphocytaires B et T d'une part, et d'évaluer le niveau d'activation de ces cellules d'autre part.

4.1.1 Répartition des cellules immunitaires dans les organes lymphoïdes primaires

Les tableaux présentés en **Figure 50** et **Figure 51** ne montrent pas de différences statistiquement significatives entre les pourcentages de répartition des sous-populations lymphocytaires B et T dans les organes lymphoïdes primaires (moelle osseuse pour les LB et thymus pour les LT) et le nombre absolu de cellules totales et des sous-populations (thymus) entre les souris IRE1- α R594C homozygotes, hétérozygotes et contrôles à l'âge de 9-12 mois. Le prélèvement de la moelle osseuse à partir des fémurs pouvant être variable selon les expériences, nous ne tenons pas compte des nombres absolus de cellules de la moelle osseuse.

Ainsi, l'expression de IRE1- α R594C n'affecte pas le développement des LB, ni le développement des LT, dans les organes lymphoïdes primaires respectifs.

THYMUS		+/+	R594C/+	R594C/R594C
		N = 5	N = 5	N = 4
		Moyenne ± SEM	Moyenne ± SEM	Moyenne ± SEM
Thymus (x10 ⁶)	x10 ⁶	122,8 ± 26,7	123,0 ± 23,4	125,9 ± 16,2
DP	%	79,6 ± 14,3	82,3 ± 3,1	80,1 ± 20,7
	x10 ⁶	92,4 ± 10,5	102,6 ± 21,4	103,2 ± 13,4
CD3 ⁺ CD4 ⁺	%	8,4 ± 2,1	7,0 ± 0,4	9,1 ± 2,4
	x10 ⁶	9,8 ± 1,2	8,1 ± 1,4	9,4 ± 1,1
CD3 ⁺ CD8 ⁺	%	3,4 ± 0,9	2,4 ± 0,1	2,9 ± 0,8
	x10 ⁶	4,1 ± 0,9	2,9 ± 0,6	3,3 ± 0,4

Figure 50. Répartition des populations de LT doubles positifs (DP) et simples positifs (CD4+ ou CD8+) dans le thymus des souris +/+, R594C/+ et R594C/R594C. Les cellules immunitaires de souris R594C/+ et R594C/R594C ont été analysées par cytométrie en flux en comparaison avec des souris +/+. Les nombres absolus ainsi que les pourcentages rapportés à la population cellulaire totale sont reportés. Les sous-populations définies en cytométrie en flux par différents marqueurs de surface sont les suivantes : LT CD4 simple positif (CD3⁺CD4⁺), LT CD8 simple positif (CD3⁺CD8⁺), DP : LT doubles positifs (CD3⁺CD4⁺CD8⁺).

Moelle osseuse	+/+	R594C/+	R594C/R594C
	n = 10	n = 10	n = 10
	Moyenne ± SEM	Moyenne ± SEM	Moyenne ± SEM
Immature (%)	3,2 ± 0,7	2,1 ± 0,4	5,1 ± 0,7
Mature (%)	4,4 ± 0,9	6,6 ± 2,1	3,2 ± 0,4
Pro-PreB (%)	5,7 ± 1,4	4,5 ± 0,5	8,9 ± 1,3
Progéniteur (%)	59,9 ± 4,2	65,7 ± 6,5	62,3 ± 6,2
Plasmocyte (%)	4,6 ± 0,8	3,8 ± 0,7	6,9 ± 1,0

Figure 51. Répartition des populations de LB dans la moelle osseuse des souris +/+, R594C/+ et R594C/R594C. Les nombres absolus des cellules médullaires ne sont pas reportés car la méthode de prélèvement des fémurs et de l'isolement des cellules ne permet pas un prélèvement parfaitement homogène entre les souris. Les sous-populations définies en cytométrie en flux par différents marqueurs de surface sont les suivantes : pro-preB (B220⁺IgM⁻), immature (B220^{int}IgM⁺), mature (B220^{high}IgM⁺), progéniteur (CD24⁺B220⁻IgM⁻), plasmocyte (CD19⁺CD138⁺).

4.1.2 Répartition des cellules immunitaires dans les organes lymphoïdes secondaires

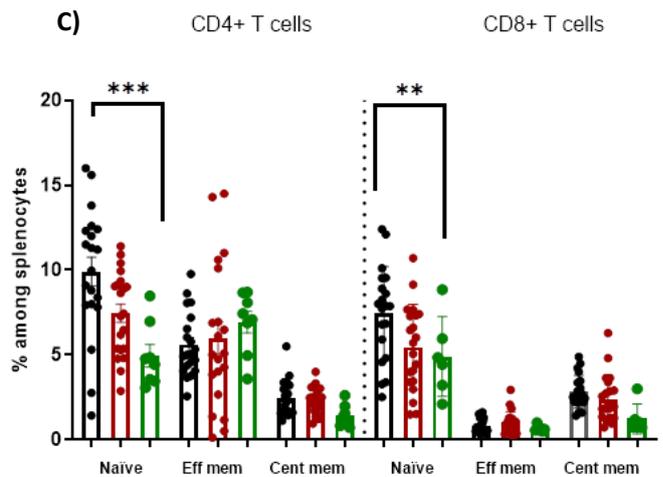
La rate et les ganglions lymphatiques (axiaux et inguinaux) ont été dilacérés et les populations de cellules immunitaires ont été analysées par cytométrie en flux. **Une légère diminution du pourcentage des LT CD4 et CD8 naïfs a pu être observée dans la rate et les ganglions (Figure 52 B, C et D et Figure 53).** Cette diminution est associée à une augmentation statistiquement non significative du pourcentage de LB matures (B220+IgM+) mais sans modification des proportions des différentes sous-populations de LB **(Figure 52 A).** **Le ratio des pourcentages de LT/LB dans la rate des souris porteuses de la mutation R594C diminue de manière significative (Figure 52 E).** Cette diminution du ratio LT/LB a déjà été associée à une rupture de tolérance dans un modèle de gain de fonction du récepteur TLR7, associée au développement d'un LES (Brown et al., 2022).

A)

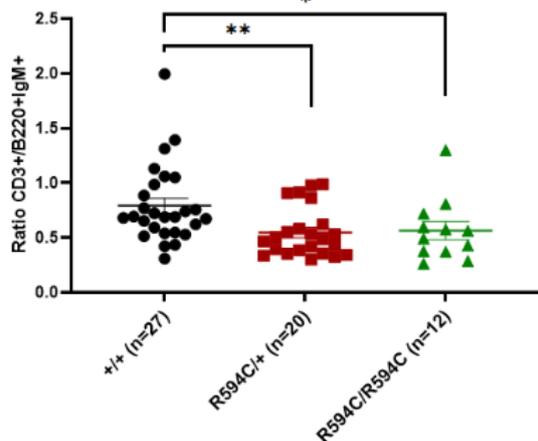
LB spléniques		+/+ n > 15 Moyenne ± SEM	R594C/+ n > 15 Moyenne ± SEM	R594C/R594C n > 15 Moyenne ± SEM
Cellules totales	x10 ⁶	98,4 ± 5,0	102,4 ± 6,8	101,1 ± 10,1
LB (B220 ⁺ IgM ⁺)	%	49,0 ± 1,4	51,4 ± 2,0	50,8 ± 3,8
	x10 ⁶	44,5 ± 3,7	50,3 ± 3,6	53,1 ± 8,1
PB	% of B220 ⁺	4,4 ± 0,7	4,6 ± 0,7	3,2 ± 0,2
	x10 ⁶	3,5 ± 0,5	3,5 ± 0,5	2,6 ± 0,4
	% of cells	8,3 ± 1,3	8,0 ± 1,1	5,6 ± 0,7
Fo	% of B220 ⁺	38,1 ± 1,9	40,7 ± 4,1	43,5 ± 1,8
	x10 ⁶	36,6 ± 4,0	36,4 ± 6,6	45,0 ± 5,8
	% of cells	18,9 ± 1,6	20,9 ± 3,0	24,5 ± 2,1
Mz	% of B220 ⁺	4,2 ± 0,6	3,7 ± 0,6	4,7 ± 0,6
	x10 ⁶	4,1 ± 0,7	3,4 ± 0,5	4,8 ± 0,9
	% of cells	5,7 ± 1,6	4,2 ± 2,3	0,1 ± 0,0
T1	% of B220 ⁺	9,7 ± 0,7	10,1 ± 1,1	10,6 ± 0,8
	x10 ⁶	4,6 ± 0,8	4,7 ± 0,9	5,5 ± 0,9
	% of cells	4,5 ± 0,6	5,1 ± 0,8	5,4 ± 0,6
T2	% of B220 ⁺	4,7 ± 0,4	5,9 ± 0,4	5,5 ± 1,1
	x10 ⁶	2,0 ± 0,3	2,6 ± 0,3	3,0 ± 0,7
	% of cells	2,0 ± 0,2	2,9 ± 0,3	2,8 ± 0,6

B)

LT spléniques		+/+ n > 15 Moyenne ± SEM	R594C/+ n > 15 Moyenne ± SEM	R594C/R594C n > 15 Moyenne ± SEM
CD3 ⁺ CD4 ⁺	%	16,4 ± 0,9	15,0* ± 0,6	13,6** ± 0,9
	x10 ⁶	14,9 ± 0,9	15,8 ± 1,4	13,7* ± 1,6
CD3 ⁺ CD8 ⁺	%	10,9 ± 0,8	10,1 ± 0,6	8,0** ± 2,1
	x10 ⁶	9,3 ± 0,7	10,4 ± 1,2	8,3* ± 2,4
LTreg CD4 ⁺	%	1,4 ± 0,2	1,5 ± 0,3	1,7 ± 0,3
	x10 ⁶	1,5 ± 0,3	1,5 ± 0,3	1,7 ± 0,4
	% of CD4 ⁺	21,1 ± 3,5	21,5 ± 5,5	24,4 ± 7,4



E) Ratio LT/LB



D) CD4+ T cells CD8+ T cells

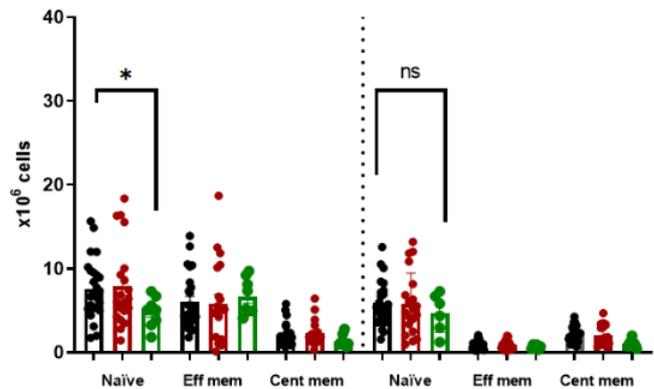


Figure 52. Diminution du nombre et de la fréquence des LT CD4⁺ et CD8⁺ naïfs dans la rate des souris R594C/R594C.

A) Répartition des populations de LB et B) de LT dans la rate. C) Fréquence et D) Nombre absolu des sous-populations de LT CD4⁺ et LT CD8⁺ dans la rate. E) Ratio LT/LB dans la rate. Les cellules immunitaires ont été analysées par cytométrie en flux en comparaison avec des souris +/+. Les nombres absolus ainsi que les pourcentages rapportés à la population cellulaire totale sont reportés. Les sous-populations définies en cytométrie en flux par différents marqueurs de surface sont les suivantes : LT CD4⁺ (CD3+CD4+), LT CD8⁺ (CD3+CD8+), T1 (transitionnels 1) (IgM+CD23-CD21-), T2 (transitionnels 2) (IgM+CD23+CD21high), Mz (LB de la zone marginale, IgM+CD23-CD21high) et Fo (folliculaires, IgM+CD23+CD21low), PB (plasmablastes, B220low CD138+). Souris +/+ (barres et points noirs, n > 15), R594C/+ (barres et points rouges, n > 15), R594C/R594C (barres et points verts, n > 10). (Chaque point représente une souris. Moyenne ± SEM ; Statistiques : Test de Mann & Whitney ; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001).

Ganglions		+/- n > 15 Moyenne ± SEM		R594C/+ n > 10 Moyenne ± SEM		R594C/R594C n > 10 Moyenne ± SEM	
Cellules totales	x10 ⁶	6,1	± 0,8	4,2	± 0,6	5,7	± 1,1
LB (B220 ⁺ IgM ⁺)	%	27,3	± 2,7	34,3	± 3,8	33,1	± 4,0
	x10 ⁶	1,7	± 0,3	1,4	± 0,2	1,9	± 0,5
CD3 ⁺ CD4 ⁺	%	27,1	± 1,9	24,2**	± 1,6	24,1*	± 1,0
	x10 ⁶	1,6	± 0,2	1,0	± 0,1	1,4	± 0,2
CD3 ⁺ CD8 ⁺	%	25,2	± 1,8	20,9**	± 1,7	19,5**	± 1,9
	x10 ⁶	1,5	± 0,2	0,9	± 0,1	1,2	± 0,3
CD4 ⁺ Naïfs	%	21,5	± 3,7	22,1	± 4,2	16,4**	± 5,4
	x10 ⁶	1,3	± 0,2	1,0	± 0,3	1,0	± 0,2
	% of CD4 ⁺	72,5	± 3,0	80,7	± 17,0	72,5	± 2,0
CD4 ⁺ Eff. Mem	%	4,8	± 0,9	5,4	± 1,1	4,3	± 1,4
	x10 ⁶	0,3	± 0,0	0,2	± 0,0	0,2	± 0,0
	% of CD4 ⁺	17,0	± 1,8	10,4	± 1,2	15,6	± 1,4
CD4 ⁺ Cent. Mem	%	2,7	± 0,5	2,5	± 0,3	2,7	± 0,5
	x10 ⁶	0,2	± 0,0	0,1	± 0,0	0,2	± 0,0
	% of CD4 ⁺	9,2	± 1,2	10,9	± 1,5	11,6	± 2,1
CD8 ⁺ Naïfs	%	19,5	± 1,7	17,0	± 4,2	17,4*	± 2,2
	x10 ⁶	1,1	± 0,2	0,6	± 0,1	1,0	± 0,3
	% of CD8 ⁺	69,7	± 3,8	75,2	± 22,9	76,4	± 7,3
CD8 ⁺ Eff. Mem	%	1,7	± 0,3	1,9	± 0,4	0,7	± 0,0
	x10 ⁶	0,1	± 0,0	0,1	± 0,0	0,0	± 0,0
	% of CD8 ⁺	6,1	± 1,0	7,8	± 1,5	3,0	± 0,2
CD8 ⁺ Cent. Mem	%	5,4	± 0,8	4,2	± 0,7	2,7	± 0,3
	x10 ⁶	0,3	± 0,1	0,2	± 0,0	0,1	± 0,0
	% of CD8 ⁺	20,7	± 3,6	18,5	± 3,6	12,0	± 1,4

Figure 53. Répartition des populations de LB et de LT dans les ganglions lymphatiques (inguinaux et axiaux). Les cellules immunitaires ont été analysées par cytométrie en flux en comparaison avec des souris +/- . Les nombres absolus ainsi que les pourcentages rapportés à la population cellulaire totale sont reportés. Les sous-populations définies en cytométrie en flux par différents marqueurs de surface sont les suivantes : LT CD4⁺ (CD3+CD4⁺), LT CD8⁺ (CD3+CD8⁺), LB (B220+IgM⁺), PB (plasmablastes, B220low CD138⁺). (Moyenne ± SEM ; Statistiques : Test de Mann & Whitney ; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001).

4.1.3 Répartition des cellules immunitaires présentes dans le péritoine

Nous avons analysé les populations de LB retrouvées dans le péritoine des souris. Les LB péritonéaux peuvent avoir une origine splénique (B2) ou une origine foétale (B1). Les LB de sous-type B1 sont une source naturelle de production d'auto-anticorps dit naturels et participent à une première ligne de défense vis-à-vis des pathogènes. Toutefois, **aucune différence statistiquement significative n'a été observée dans les populations de cellules immunitaires analysées dans le péritoine (Figure 54).**

PERITOINE		+/+ n = 5 Moyenne ± SEM		R594C/+ n = 5 Moyenne ± SEM		R594C/R594C n = 4 Moyenne ± SEM	
Cellules totales	x10 ⁶	10,8	± 2,6	10,3	± 2,2	5,8	± 1,7
B-1	%	26,8	± 3,7	33,4	± 7,6	25,4	± 2,3
	x10 ⁶	3,0	± 0,8	3,1	± 0,6	1,4	± 0,3
B-1a	%	2,1	± 0,3	2,0	± 0,5	1,9	± 0,3
	x10 ⁶	0,2	± 0,1	0,2	± 0,0	0,1	± 0,0
	% B-1 cells	7,8	± 1,1	5,9	± 0,3	7,3	± 1,0
B-1b	%	24,3	± 3,4	30,7	± 6,6	23,2	± 2,2
	x10 ⁶	2,7	± 0,7	2,9	± 0,5	1,2	± 0,3
	% B-1 cells	92,2	± 1,1	94,1	± 0,3	92,7	± 1,0
B2	%	48,0	± 3,3	43,3	± 6,0	45,8	± 5,8
	X10 ⁶	5,1	± 1,2	4,8	± 1,4	2,9	± 1,1
LT	%	11,8	± 1,8	9,9	± 2,0	13,2	± 1,4
	x10 ⁶	1,4	± 0,6	1,0	± 0,3	0,7	± 0,1

Figure 54. Répartition des populations de LB dans le péritoine. Les cellules immunitaires ont été analysées par cytométrie en flux en comparaison avec des souris +/+. Les nombres absolus ainsi que les pourcentages rapportés à la population cellulaire totale sont reportés. Les sous-populations définies en cytométrie en flux par différents marqueurs de surface sont les suivantes : B-1a (IgMhighCD5+B220low), B-1b (IgMhigh CD5- B220low), B-2 (B220+IgM+CD5-) et LT (B220-IgM-CD5high). (Moyenne ± SEM)

4.1.4 Age-associated B cell

Les ABCs (*Age-associated B cells*) ont un phénotype et une signature transcriptionnelle uniques, et leur formation et leur activation dépendent des signaux TLR7 ou TLR9 dans un contexte LTh1. La plupart d'entre elles sont des LB mémoires, qui apparaissent au cours des réponses aux infections microbiennes et jouent un rôle clé dans la clairance et le contrôle des pathogènes. Leur prévalence croissante avec l'âge contribue à plusieurs caractéristiques bien établies de l'immunosénescence, notamment la réduction de la genèse des LB et l'atténuation des réponses immunitaires. Ces cellules sont augmentées dans les maladies auto-immunes et inflammatoires et joueraient un rôle dans la production d'auto-anticorps (Cancro, 2020). Nous avons donc mesuré la fréquence des cellules ABCs dans la rate des souris IRE1- α R594C homozygotes et hétérozygotes (**Figure 55 A**), mais n'avons pas observé de **modification de la population de cellules ABCs (Figure 55 B)**.

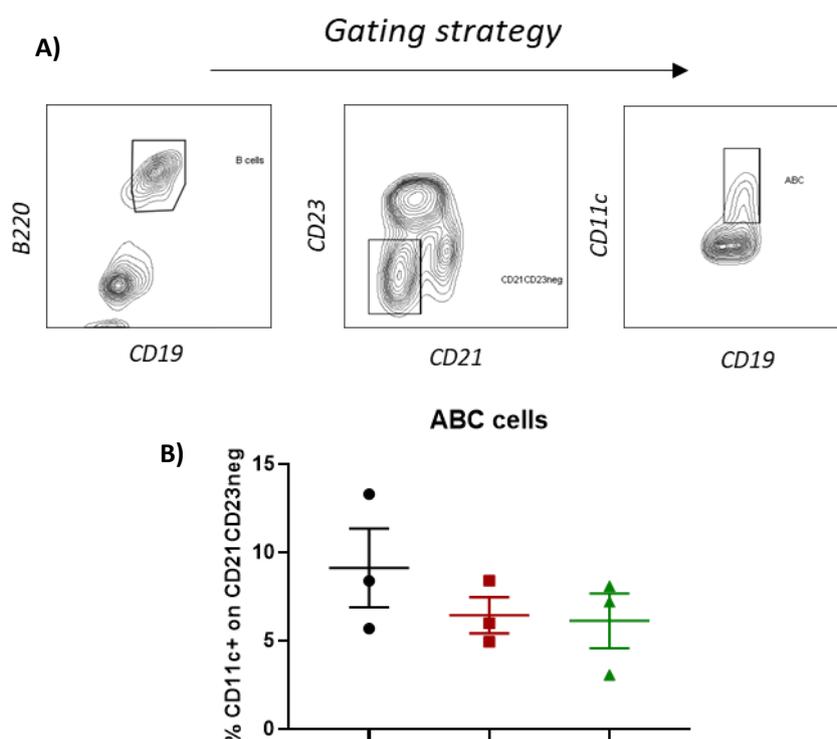


Figure 55. La fréquence des cellules ABC n'est pas modifiée dans la rate des souris R594C/+ et R594C/R594C. A) Stratégie d'analyse des cellules ABC dans la rate par cytométrie en flux. B) Fréquence de la population de cellules ABC (CD11c⁺) parmi les LB (B220⁺CD19⁺) DN (CD21⁺CD23⁻). Les cellules immunitaires ont été analysées par cytométrie en flux en comparaison avec des souris +/+. Souris +/+ (points noirs, n = 3), R594C/+ (points rouges, n = 3), R594C/R594C (points verts, n = 3). (Chaque point représente une souris. Moyenne \pm SEM)

4.2 État basal d'activation des LB périphériques

Afin d'évaluer les conséquences de l'expression de IRE1- α R594C à l'état basal sur l'activation des LB, nous avons analysé par cytométrie en flux l'expression des marqueurs d'activation CD86 et CMH de classe II (CMHII) à la surface des LB de la rate *ex vivo*. **La mutation IRE1- α R594C ne modifie pas l'état basal d'activation des LB (Figure 56).**

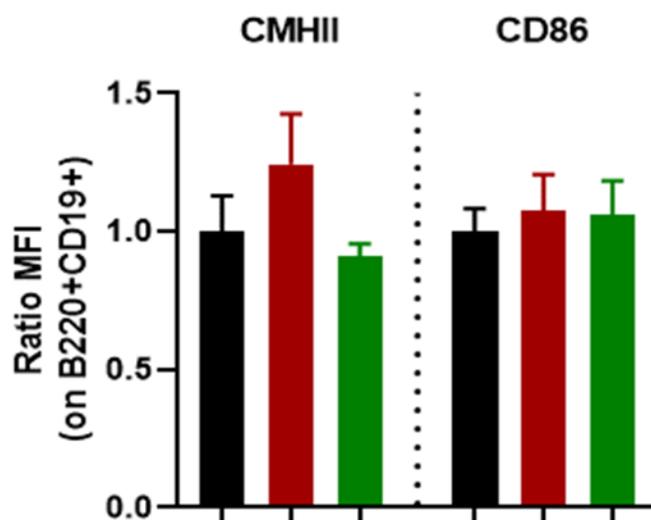


Figure 56. La présence de la mutation IRE1- α R594C n'induit pas de modification de l'activation basale des LB spléniques. Le ratio de MFI est représenté par la MFI de chaque souris rapportée à la MFI moyenne des souris contrôles. Souris +/+ (barres noires, n = 6), R594C/+ (barres rouges, n = 6), R594C/R594C (barres vertes, n = 5). (Moyenne \pm SEM)

4.3 Dosage des immunoglobulines sériques

Nous avons ensuite voulu évaluer l'impact de l'expression du mutant IRE1- α R594C sur la production d'anticorps *in vivo*. Pour cela, nous avons dosé les immunoglobulines (IgM, IgG totales, IgG1, IgG2b et IgG3) dans le sérum des souris âgées de 9 mois et plus, par la technique ELISA. La présence de la mutation R594C **n'impacte pas la production sérique d'immunoglobulines IgM et IgG**, ni chez les souris hétérozygotes, ni chez les souris homozygotes. De plus, **les concentrations d'IgG1, d'IgG2b et d'IgG3 sont similaires** dans le sérum des trois populations de souris (Figure 57). Ainsi, la présence de la mutation ne semble pas impacter la production d'Ig et la commutation de classe.

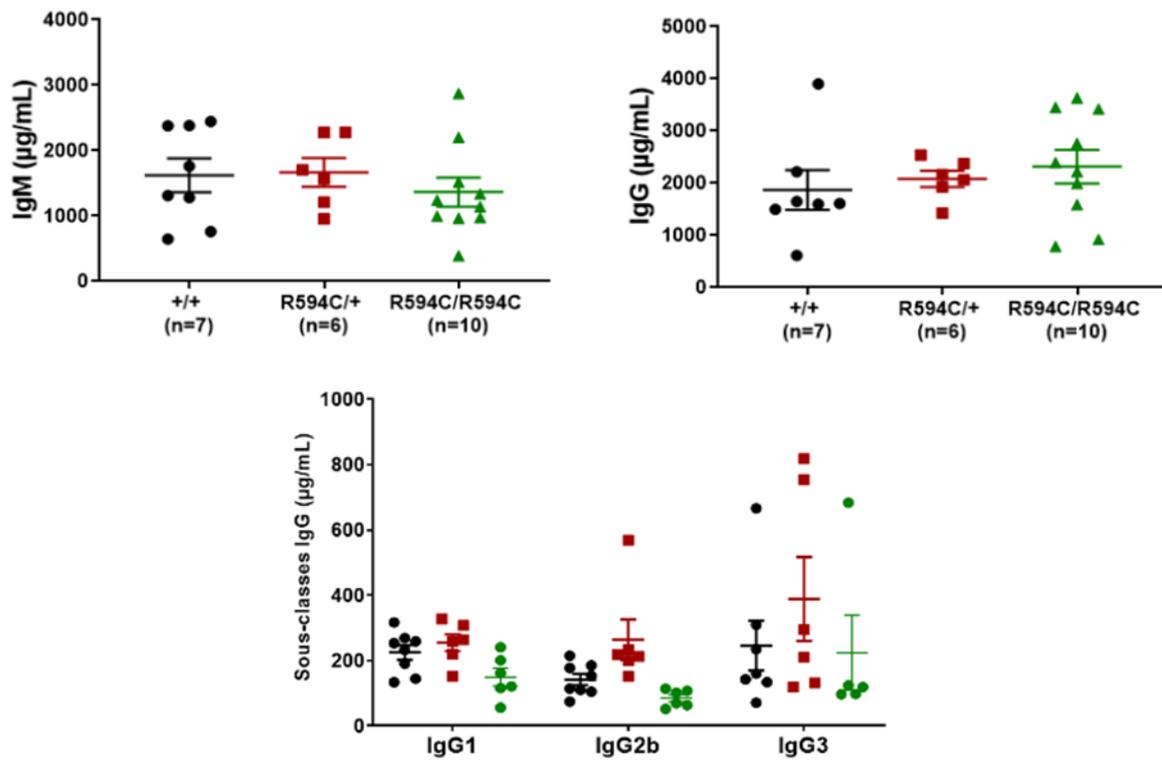


Figure 57. La mutation IRE1- α R594C n'impacte pas la production d'anticorps. Dosage des IgM, des IgG totales et des sous-classes IgG1, IgG2b et IgG3 par ELISA dans le sérum des souris IRE1- α +/+ (points noirs, $n \geq 7$), R594C/+ (points rouges, $n \geq 5$) et R594C/R594C (points verts, $n \geq 5$)  g es de 9 mois et plus. (Chaque point représente une souris. Moyenne \pm SEM)

4.4  tude *in vitro* du phénotype des LB porteurs de la mutation IRE1- α R594C

4.4.1 Activation des LB *in vitro*

Nous avons évalué la capacité d'activation *in vitro* des LB spléniques porteurs de la mutation, à l'aide de différents stimuli, pendant 48 h : 1) le LPS (ligand du TLR4), 2) le R848 (ligand du TLR7), et 3) le CpG (ligand du TLR9). L'activation des LB a été évaluée en mesurant l'expression des marqueurs CD86 et CMHII par cytométrie en flux. **D'après la Figure 58, la mutation IRE1- α R594C ne semble pas influencer sur l'activation des LB *in vitro* via ces différents TLR.**

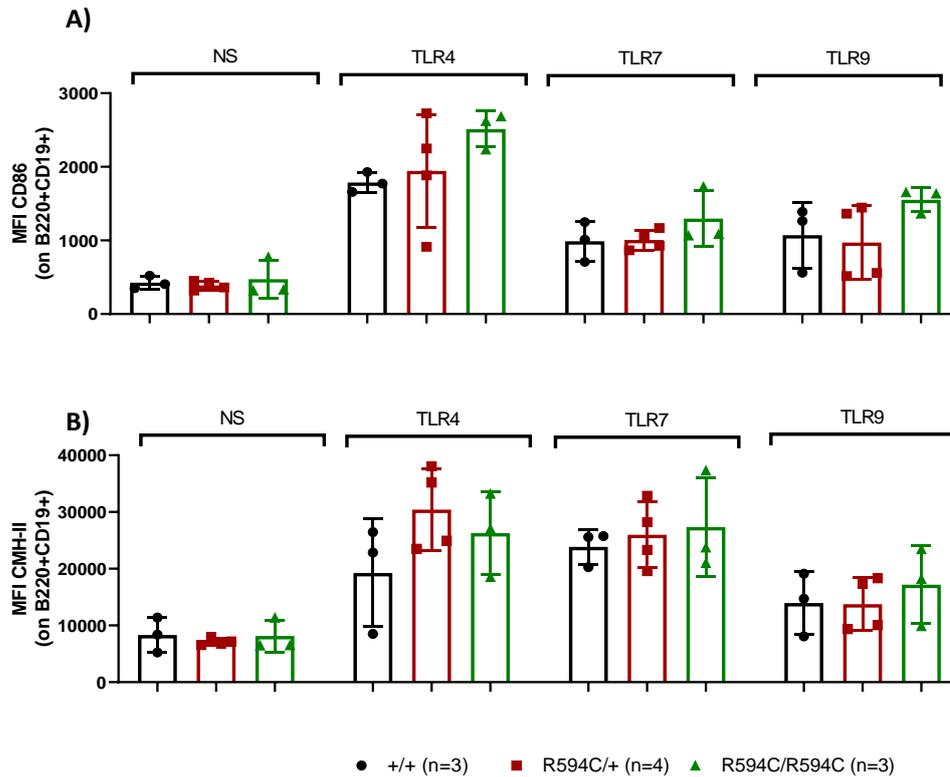


Figure 58. La présence de la mutation IRE1- α R594C ne modifie pas l'activation des LB *in vitro*. Représentation graphique des moyennes d'intensité de fluorescence de CD86 (A) et du CMH-II (B) sur les LB (B220+CD19+). Les cellules immunitaires ont été analysées par cytométrie en flux en comparaison avec des souris +/+ après 3 jours de cultures non stimulées (NS), stimulées avec du LPS (TLR4, 1 μ g/mL), du R848 (TLR7, 0,5 μ g/mL) et du CpG-DNA (TLR9, 1 μ g/mL). Souris +/+ (points noirs, n = 3), R594C/+ (points rouges, n = 4), R594C/R594C (points verts, n = 3) (Chaque point représente une souris. Moyenne \pm SEM)

4.4.2 Prolifération des LB activés *in vitro*

Nous avons évalué la capacité des LB à proliférer *in vitro* après activation via différents stimuli : le LPS (ligand du TLR4) et une combinaison de LPS et d'IL-4 pendant une durée de 5 et 7 jours. La prolifération a été évaluée à l'aide d'un marquage au CFSE. **D'après la Figure 59, la prolifération des LB n'est pas affectée par la présence de la mutation R594C.**

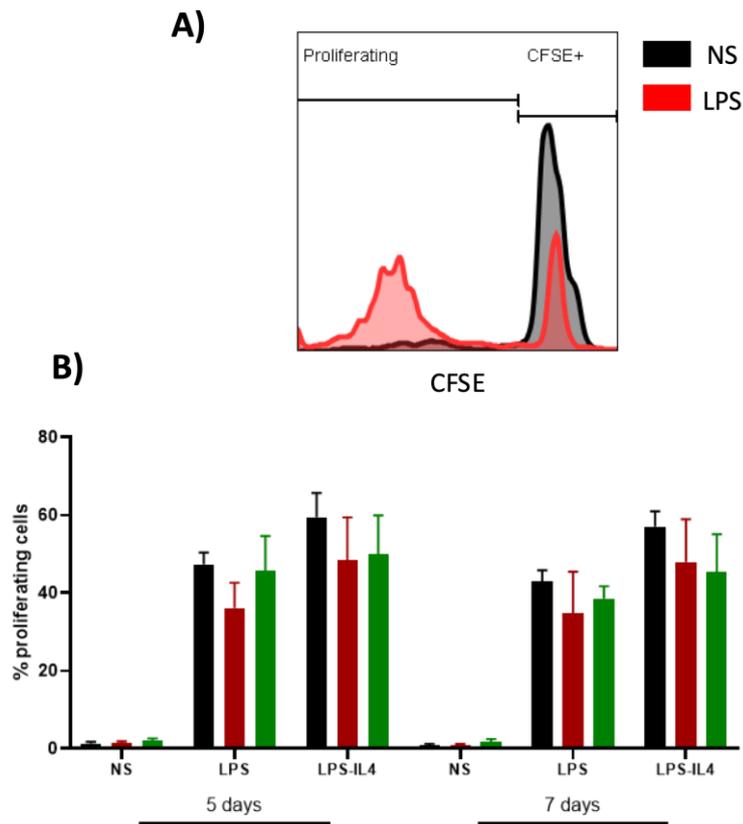


Figure 59. La mutation IRE1- α n'affecte pas la prolifération des LB. A) Stratégie d'analyse de la prolifération des cellules à l'aide d'un marquage CFSE. B) Pourcentage de cellules ayant proliféré après 5 et 7 jours de stimulations au LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) avec ou sans IL-4 (10 ng/mL). Souris +/+ (barres noires, $n = 4$), R594C/+ (barres rouges, $n = 4$), R594C/R594C (barres vertes, $n = 4$). (Moyenne \pm SEM).

4.4.3 Différenciation plasmocytaire *in vitro*

Il a été montré dans la littérature que l'axe IRE1- α /XBP1s joue un rôle important dans la différenciation plasmocytaire et la production d'immunoglobulines (van Anken et al., 2014; Benhamron et al., 2014). Nous avons également décrit une baisse de l'épissage de XBP1 observé dans le cas d'une activation par le LPS et d'un stress du RE dans notre modèle IRE1- α R594C (**Figure 39**), bien que la production *in vivo* d'immunoglobulines ne semble pas affectée (**Figure 57**). Nous avons donc décidé d'évaluer la différenciation plasmocytaire *in vitro* (**Figure 60 A et B**) ainsi que la production d'immunoglobulines en réponse à différents stimuli (**Figure 61 et Figure 62**) tels que : 1) le LPS (ligand du TLR4), 2) une combinaison du LPS et de l'IL-4 (condition mimant l'aide d'un LT pour activer la différenciation plasmocytaire), et 3) le CpG (ligand du TLR9), pendant une durée allant de 3 à 7 jours de stimulation. D'après la **Figure 60 B**, il est intéressant de noter que la **différenciation plasmocytaire est affectée de façon significative dans les LB porteurs de la mutation homozygote, après 7 jours de stimulation pour la condition LPS+IL-4 (Figure 60)**. Cette tendance n'est pas observable à 3 et 5 jours de stimulation.

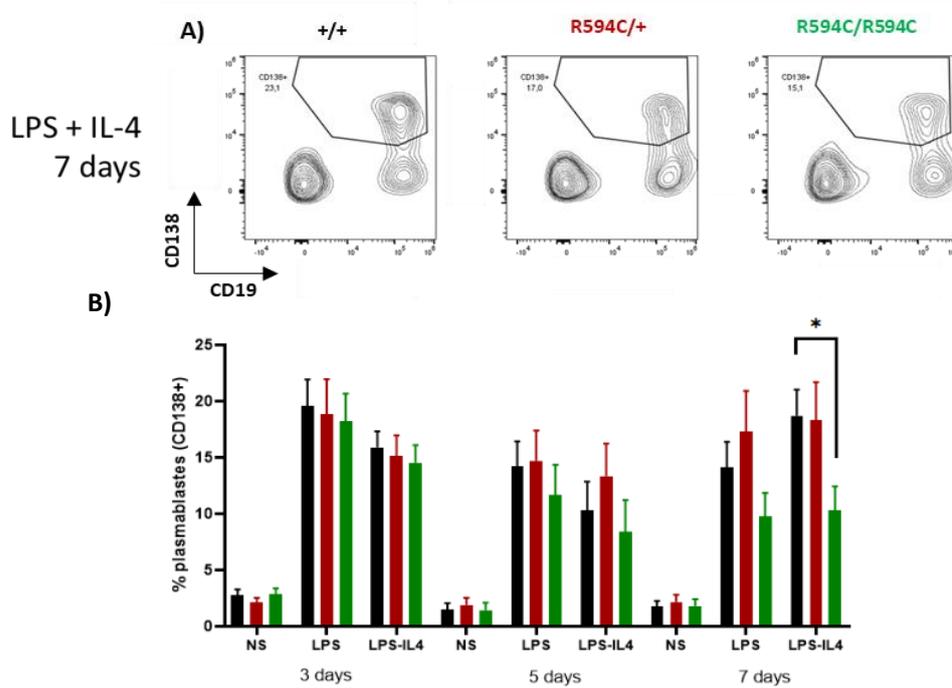


Figure 60. La mutation R594C affecte la différenciation plasmocytaire *in vitro* au bout de 7 jours de stimulation. (A) Exemple de stratégie de marquage des cellules CD138+ (ici, à 7 jours de stimulation avec une combinaison de LPS et d'IL-4) et (B) Représentation graphique des pourcentages moyens de cellules CD138+. Les cellules CD19+/CD138+ ont été marquées et analysées par cytométrie en flux en comparaison avec des souris +/+. Conditions de stimulation : NS (milieu de culture), LPS 1 μ g/mL, LPS (1 μ g/mL) + IL-4 (10 ng/mL). Souris +/+ (barres noires, n=7), R594C/+ (barres rouges, n=7), R594C/R594C (barres vertes, n=5). (Moyenne \pm SEM ; Statistiques : Test de Mann & Whitney ; * p < 0,05).

4.4.4 Production d'immunoglobulines in vitro

À la suite des résultats obtenus précédemment, nous avons mesuré la quantité d'immunoglobulines produites dans le surnageant de culture après stimulation des splénocytes. Nous avons testé la sécrétion d'IgM et d'IgG2b après 4 jours de stimulation par du LPS (1 µg/mL) mais nous n'avons pas observé de diminution de la concentration d'IgM et d'IgG2b (sous-classe d'IgG induite après stimulation au LPS) dans le surnageant de culture (**Figure 61**).

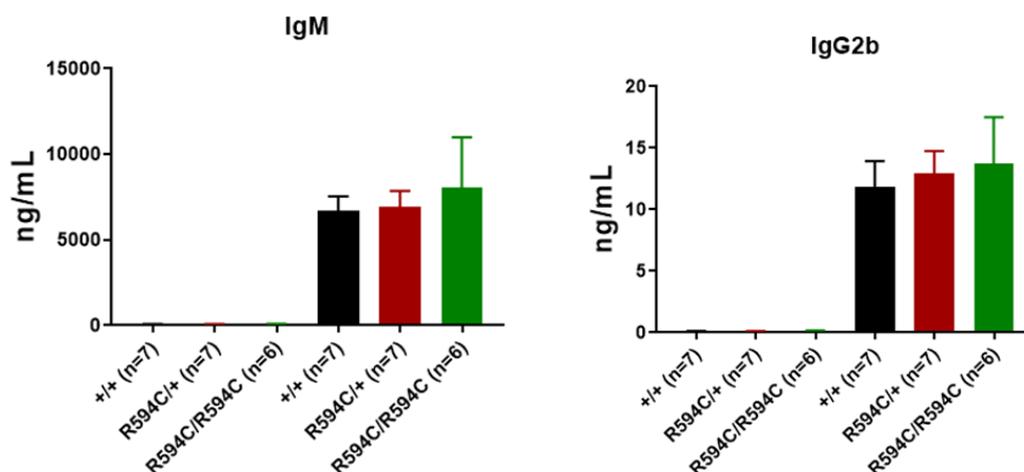


Figure 61. La concentration en IgM et en IgG2b n'est pas affectée par la mutation R594C. Mesure par technique ELISA de la concentration d'IgM et d'IgG2b dans le surnageant de culture après 4 jours de stimulation par du LPS (1 µg/mL). Souris +/+ (barres noires, n = 7), R594C/+ (barres rouges, n = 7), R594C/R594C (barres vertes, n = 6). (Moyenne ± SEM).

Nous avons également dosé le surnageant de culture à 7 jours de stimulation et nous observons une baisse de sécrétion des IgM après stimulation LPS et IL-4, associée à la diminution du pourcentage de LB CD138+ observée précédemment (**Figure 62**).

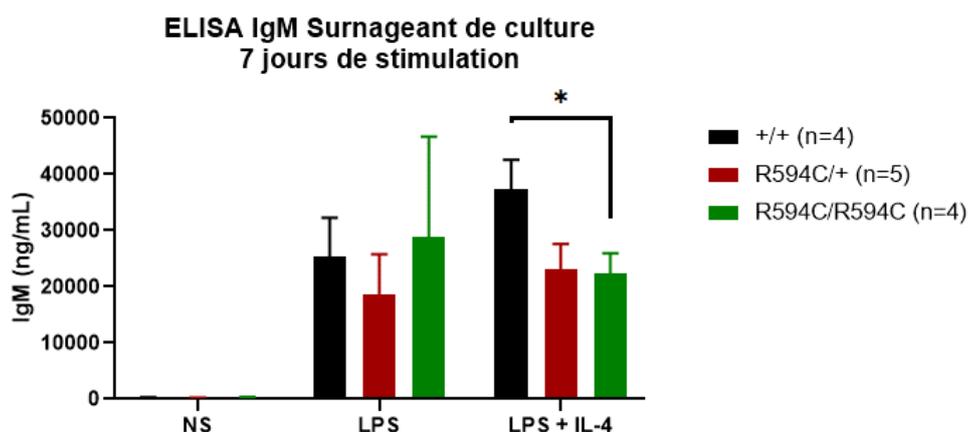


Figure 62. La mutation R594C induit une diminution de la sécrétion d'IgM après 7 jours de stimulation *in vitro*. Mesure par technique ELISA de la concentration d'IgM dans le surnageant de culture après 7 jours de stimulation par du LPS (1 µg/mL) ou une combinaison de LPS (1 µg/mL) et d'IL-4 (10 ng/mL). Souris +/+ (barres noires, n = 4), R594C/+ (barres rouges, n = 5), R594C/R594C (barres vertes, n = 4). (Moyenne ± SEM ; Statistiques : Test de Mann-Whitney, * p < 0,05).

5 Manifestations auto-immunes dans le modèle murin IRE1- α R594C

5.1 Détection d'une sélection d'auto-anticorps par ELISA

La présence d'auto-anticorps est une des principales caractéristiques des modèles murins d'auto-immunité (Richard and Gilkeson, 2018). Nous avons donc d'abord voulu évaluer la présence d'auto-anticorps dans le sérum des souris IRE1- α R594C âgées de 9 à 12 mois.

Les titres d'auto-anticorps anti-ADNdb, anti-ADNsb, anti-myosine et anti-nucléosome d'isotype IgM et IgG (**Figure 63 A, B, C et D respectivement**) ne sont pas augmentés dans le sérum des souris hétérozygotes et homozygotes. **La présence de la mutation R594C ne semble donc pas conduire à la détection par ELISA de ces sous-types d'auto-anticorps dans le sérum des souris mutées.**

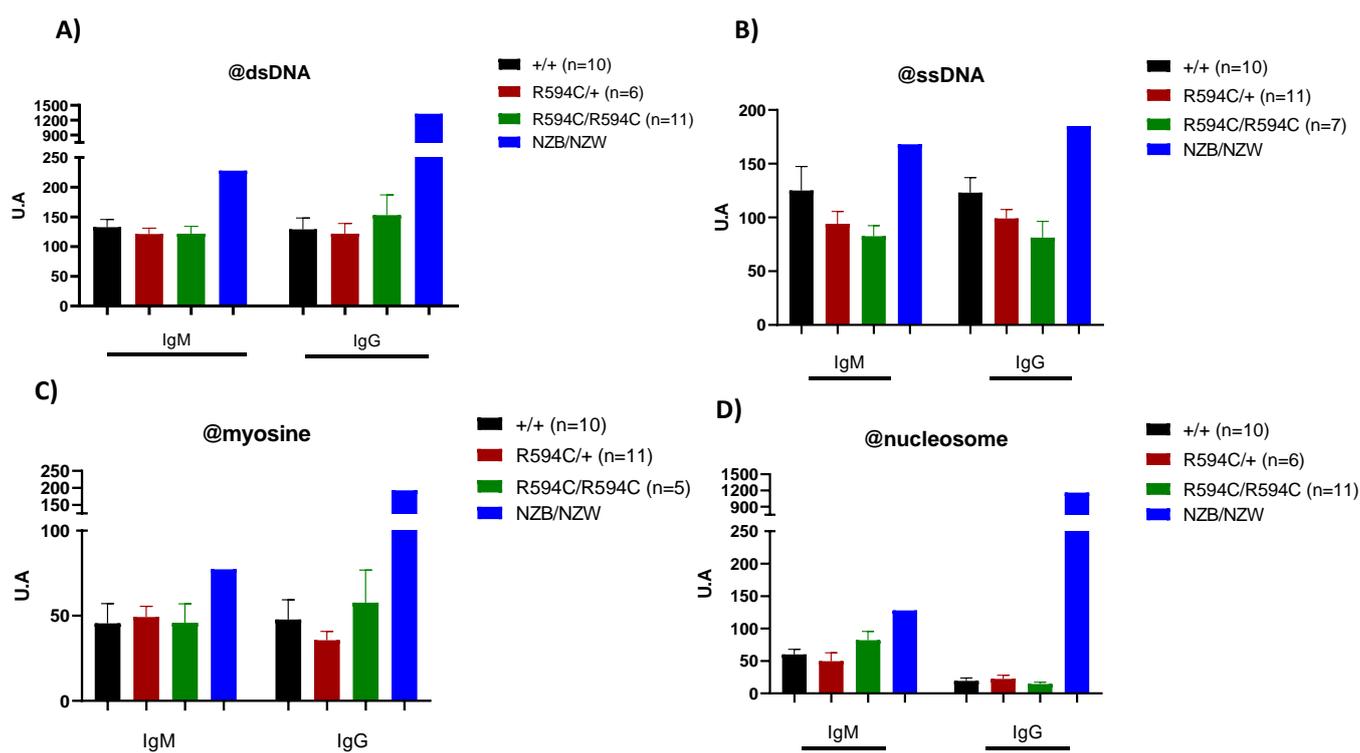


Figure 63. La mutation R594C n'impacte pas la production d'auto-anticorps. Dosage des auto-anticorps A) IgM et IgG anti-ADNdb, B) IgM et IgG anti-ADNsb, C) IgM et IgG anti-myosine et D) IgM et IgG anti-nucléosome dans le sérum des souris IRE1- α +/+ (barres noires, n = 10), R594C/+ (barres rouges, n = 6 à 11) et R594C/R594C (barres vertes, n=5 à 11) entre 9 et 12 mois. Le dosage des IgM et des IgG a été réalisé par ELISA. Le sérum d'une souris lupique (NZB/NZW)F1 (barre bleue, âge : 9 mois) a été utilisé comme contrôle positif.

5.2 Recherche globale d'auto-anticorps (*antigen microarray*)

Le développement d'une auto-immunité peut être caractérisé par la présence de nombreux autres auto-anticorps que les tests ELISA à notre disposition ne sont pas capables de détecter. L'ADN, la myosine et les nucléosomes sont des antigènes spécifiques des modèles murins de lupus érythémateux et les auto-anticorps ciblant ces composés ne sont pas obligatoirement présents dans tous les modèles d'auto-immunité. Dans cette optique et afin d'analyser un large panel d'auto-anticorps, les sérums des souris IRE1- α ont été envoyés au laboratoire américain IUT South Western Medical Center de Dallas (USA) afin de faire une analyse sur une puce à antigènes (Zhu et al., 2015). Cette technique permet en un minimum d'étapes de tester la réactivité d'un seul échantillon vis-à-vis d'un panel de 128 antigènes.

Après analyse des résultats fournis par le laboratoire, la présence d'auto-anticorps a pu être détectée dans le sérum des souris porteuses de la mutation IRE1- α R594C (**Figure 64 A, B, C et D**, représentant les antigènes pour lesquels une différence statistiquement significative a été observée). Cette augmentation n'est pas spécifique à un type d'antigène mais correspond à un modèle polyréactif. En effet, on peut observer dans la **Figure 65** (représentant l'ensemble des antigènes testés via cette technique, sans appliquer de filtres statistiques) que l'augmentation de la réactivité est dirigée contre un nombre important d'antigènes, à la fois pour les isotypes IgM et IgG. Les antigènes cibles sont des composants de la matrice extracellulaire (collagènes), des récepteurs tels que le récepteur muscarinique ou des composants intracellulaires tels que la chromatine, la topoisomérase, les histones, etc. Il y a donc **une rupture de tolérance globale vis-à-vis des antigènes du soi dans le modèle murin transgénique R594C**.

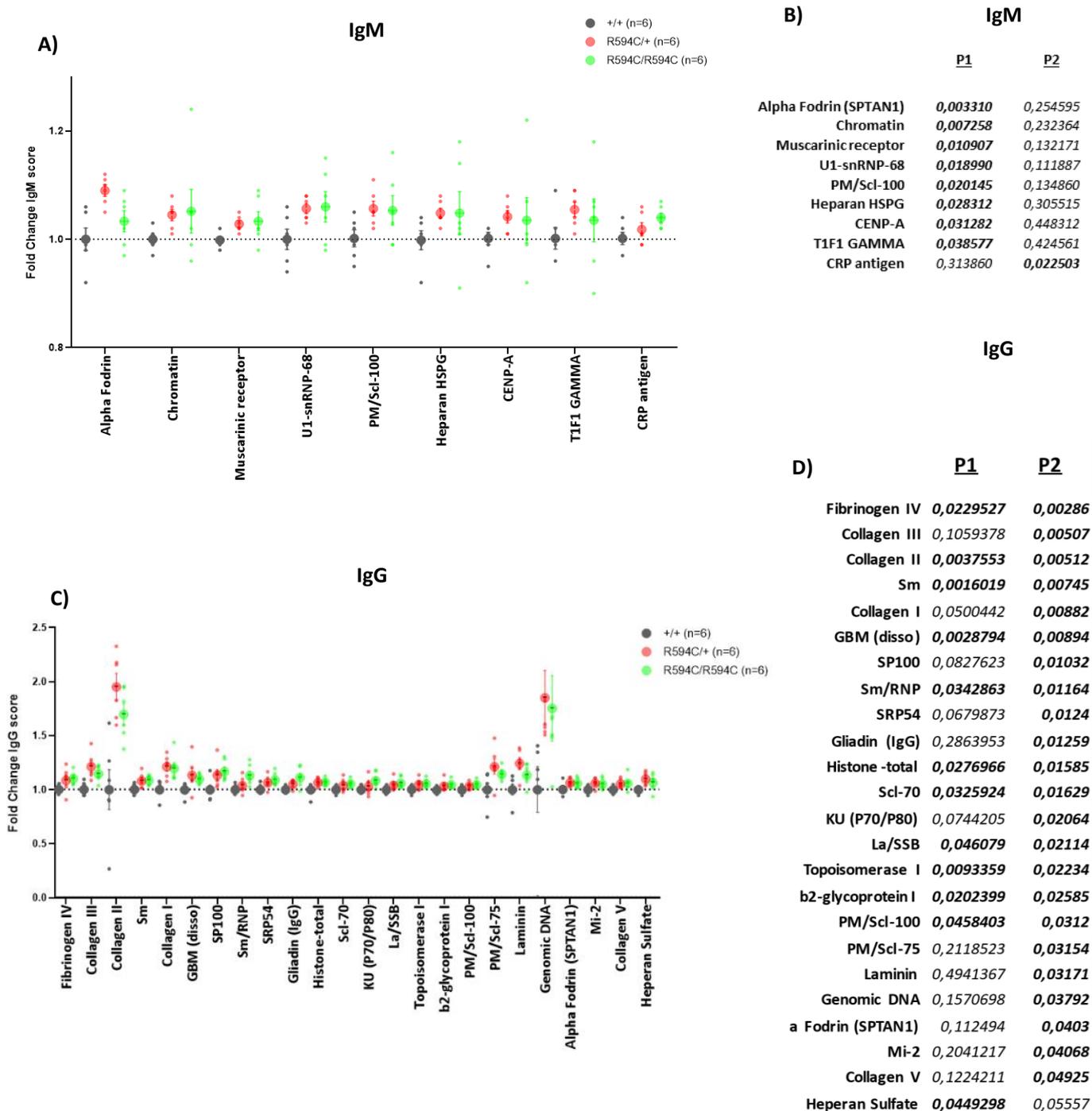


Figure 64. Détection de la présence d'autoanticorps dans le sérum des souris IRE1- α R594C. A) Auto-antigènes cibles d'auto-anticorps d'isotype IgM détectés dans le sérum des souris porteuses de la mutation R594C et B) valeur-p associée aux auto-anticorps d'isotype IgM détectés entre les souris hétérozygotes *versus* sauvages (P1) d'une part, les souris homozygotes *versus* sauvages (P2) d'autre part. C) Auto-antigènes cibles d'auto-anticorps d'isotype IgG détectés dans le sérum des souris porteuses de la mutation R594C et D) valeur-p associée aux auto-anticorps d'isotype IgG détectés entre les souris hétérozygotes *versus* sauvages (P1) d'une part, les souris homozygotes *versus* sauvages (P2) d'autre part. A) et C) Seuls les antigènes significativement différents entre les souris témoins et les souris IRE1- α sont indiqués. (Moyenne \pm SEM, multiple t-test), souris IRE1- α +/+ (points noirs), R594C/+ (points rouges) et R594C/R594C (points verts)

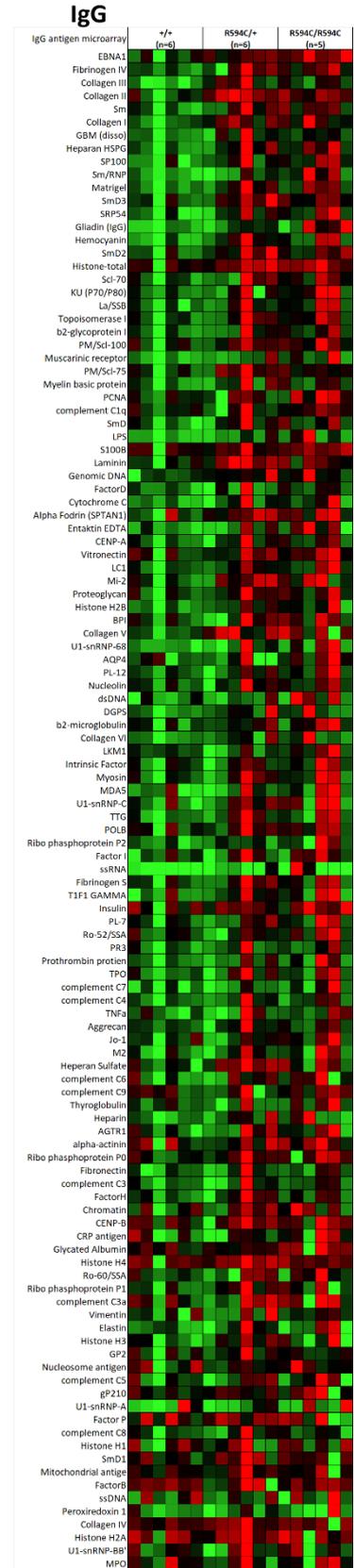


Figure 65. Heatmaps représentant l'ensemble des résultats de l'antigen microarray pour chaque échantillon (Ab-score normalisé par rapport à la concentration en IgG ou IgM totales). A gauche, la réactivité mesurée des IgM, à droite les IgG. Chaque colonne représente une souris. +/+ (n = 6), R594C/+ (n = 6) et R594C/R594C (n = 5).

5.3 Recherche de dommages tissulaires

Les souris IRE1- α R594C ne développent pas de symptômes apparents de glomérulonéphrite, tels qu'une protéinurie mesurable (utilisation de bandelettes). Dans l'hypothèse d'un tableau préclinique sans manifestations observables, nous avons analysé les reins des souris, en collaboration avec le service d'anatomopathologie de l'hôpital de Hautepierre à Strasbourg, notamment le Dr. Jérôme Olgne. L'analyse de la morphologie rénale par coloration de coupes de reins à l'hématoxyline-éosine ne montre pas d'anomalies particulières des souris R594C par rapport aux souris contrôles (données non montrées). Le dépôt d'anticorps et de complément et l'atteinte glomérulaire en résultant sont parmi les symptômes les plus fréquents chez les patients lupiques mais également dans les modèles murins de lupus (Lisnevskaja et al., 2014). **Une légère augmentation de dépôts d'IgG1 a pu être détectée dans les reins des souris porteuses de la mutation (Figure 66 A et B)** bien que la présence de dépôts d'immunoglobulines de tous les isotypes (IgM, IgG, IgG3, C3 et C1q) dans les organes des souris sauvages soit abondante (**Figure 66 A**). Ceci pourrait s'expliquer par l'âge des souris qui sur fond C57BL/6 peuvent présenter ce type de manifestation.

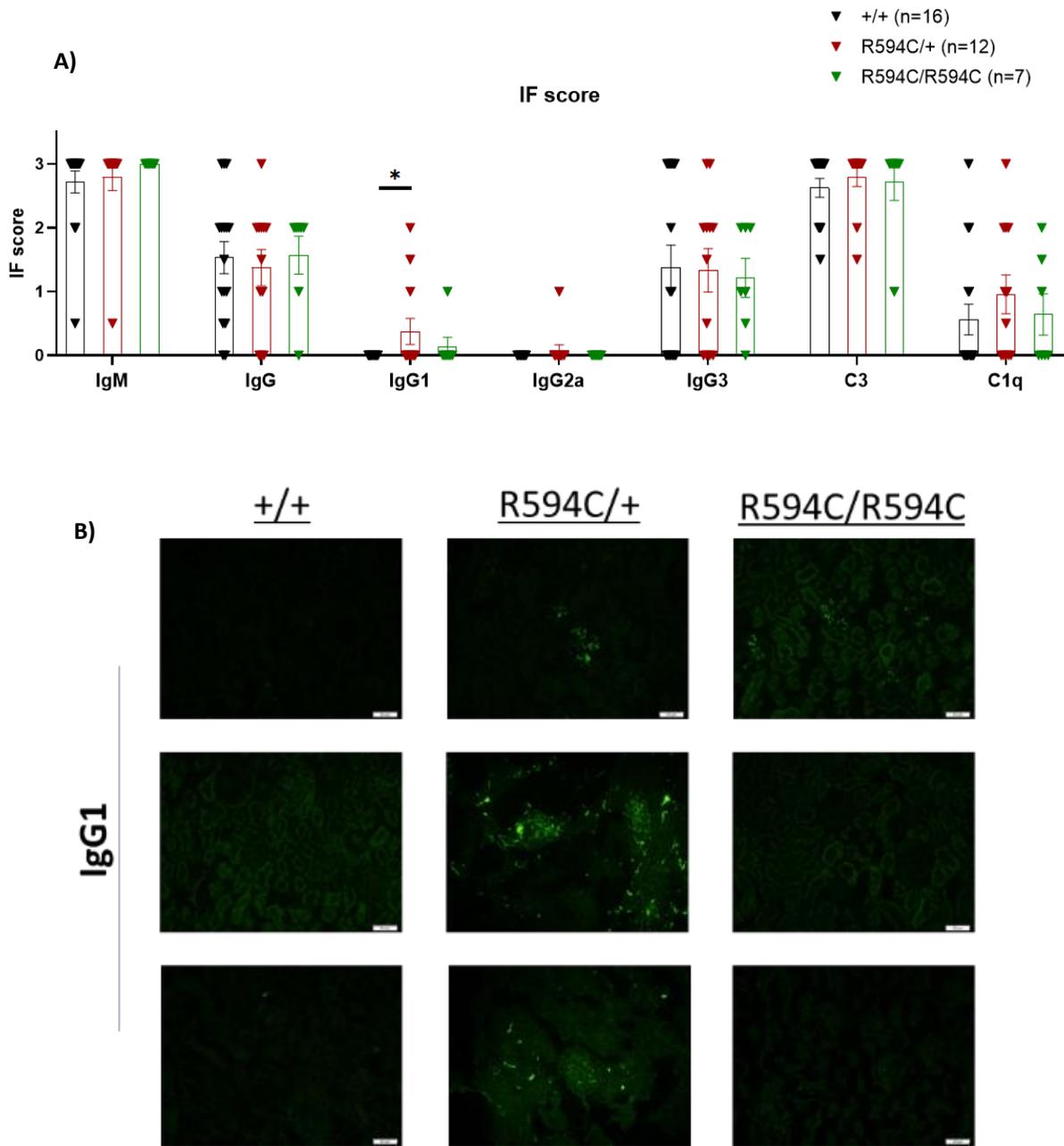


Figure 66. Analyse immunohistochimique des reins de souris IRE1- α R594C. A) Scores d'intensité des dépôts d'anticorps dans les reins des souris âgées de 12 mois. Le score a été donné par le Dr. J. Olgne (anatomopathologiste) suivant des critères précis (localisation, répartition et intensité de fluorescence). B) Exemple de marquage IgG1 des coupes de 3 souris de chaque génotype. (Moyenne \pm SEM, Statistiques : Test de Mann-Whitney, * $p < 0.05$).

6 Étude de la réponse auto-immune humorale après induction *in vivo*

6.1 Induction d'une réponse auto-immune humorale par injection d'un agoniste du TLR4

Notre lignée transgénique ne montre donc pas en ELISA d'augmentation de la production d'auto-anticorps (**Figure 67**), bien que la technique de la puce à antigènes nous ait permis de détecter la présence accrue de nombreux auto-anticorps (**Figure 65**). Par ailleurs, l'étiologie du LES est complexe et implique également des facteurs environnementaux et notamment infectieux. Ainsi, le déclenchement de manifestations auto-immunes et la perte de tolérance vis-à-vis des éléments du soi est probablement un processus en plusieurs étapes qui peut impliquer l'échappement des LB autoréactifs à la sélection négative, mais aussi des réponses anormales des LB après activation du système immunitaire inné et en particulier des voies du TLR. Nous avons alors décidé d'induire la production d'auto-anticorps par nos animaux après immunisation par un ligand de TLR, mimant un stimulus infectieux. Nous avons choisi le modèle d'immunisation par le LPS bactérien qui induit une activation polyclonale des LB (dont les LB autoréactifs) et une augmentation des anticorps anti-ADNdb d'isotype IgM dans le sérum des animaux, mais sans induire de maladie lupique complète (Fournié et al., 1974; Izui et al., 1977). Les souris IRE1- α R594C/+ et des souris +/+ contrôles ont été injectées à l'âge de 6 mois avec 50 μ g de LPS de *Salmonella typhimurium* à J0, puis 25 μ g à J7 et J14. Des souris servant de contrôles ont été injectées avec du PBS. D'après la **Figure 67**, nous observons bien l'augmentation de la concentration d'anticorps (IgM et IgG totales) et d'auto-anticorps anti-ADNdb (en particulier IgM) suite à l'injection de LPS, indiquant l'activation du système immunitaire en réponse à l'agoniste TLR4, **mais nous n'avons pas observé de modification de la concentration en anticorps (IgG et IgM) et en auto-anticorps anti-ADNdb dans le sérum des souris IRE1- α R594C/+**

par rapport aux souris +/+. Les souris homozygotes R594C/R594C n'ont pas pu être testées dans ce protocole expérimental.

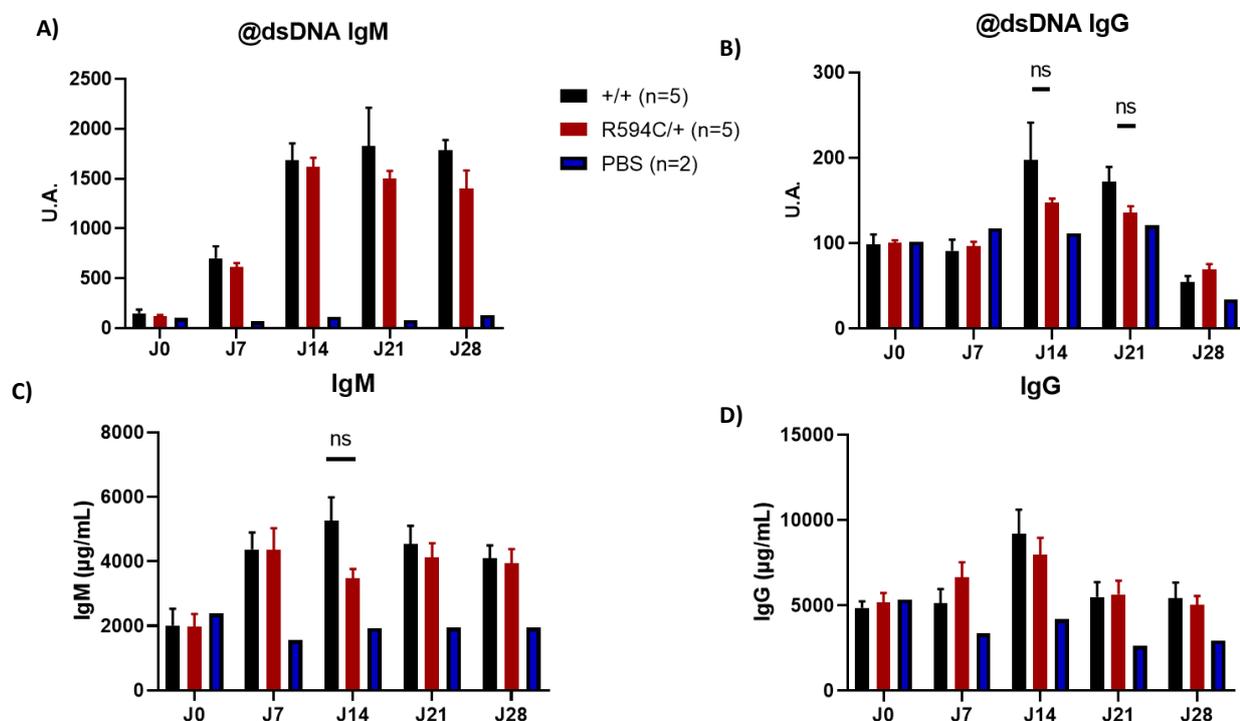


Figure 67. Dosage des auto-anticorps anti-ADNdb d'isotype A) IgM et B) IgG dans le sérum des souris IRE1- α +/+, R594C/+ et R594C/R594C traitées au LPS. Dosage des C) IgM et D) IgG totales dans le sérum des souris IRE1- α +/+, R594C/+ et R594C/R594C traitées au LPS. Les souris IRE1- α R594C/+ et des souris +/+ contrôles ont été injectées à l'âge de 6 mois avec 50 μ g de LPS de *Salmonella typhimurium* à J0, puis 25 μ g à J7 et J14. Le dosage des IgM et des IgG a été réalisé par ELISA.

6.2 Induction d'une réponse auto-immune humorale par injection d'un agoniste du TLR9

Nous avons également immunisé des souris IRE1- α R594C/+, R594C/R594C et des souris contrôles avec un agoniste TLR9 (CpG-DNA). Le CpG-DNA est un agoniste du TLR9 impliqué dans la réponse des LB à des infections par les virus à ADNdb comme l'EBV et le Parvovirus B19 et qui sont associés aux poussées de LES (Gross et al., 2005). L'injection du CpG-DNA peut aussi mimer l'infection par un agent bactérien, favorisant l'activation du système immunitaire et le déclenchement d'une auto-immunité. Enfin le CpG-DNA est connu pour induire la production d'interféron de type I qui est un facteur clé de la pathogenèse du LES (Schickel et al., 2012; Theofilopoulos et al., 2017).

Les souris ont été sacrifiées 28 jours après le début des injections (cf. Matériel & Méthodes 3.2). Une analyse des populations de cellules immunitaires a été réalisée par cytométrie en flux. Les résultats montrent que **la présence de la mutation R594C n'a pas d'impact majeur sur les populations lymphocytaires spléniques après injection d'un agoniste du TLR9 (Figure 68). On peut cependant observer une augmentation statistiquement significative du taux de plasmablastes dans la rate des souris R594C/R594C versus souris +/- après injection de CpG-DNA.**

		+/+ (n=10)	R594C/+ (n=11)	R594C/R594C (n=7)	PBS control (n=3)
		Moyenne ± SEM	Moyenne ± SEM	Moyenne ± SEM	Moyenne ± SEM
Cellules totales	x10 ⁶	97,5 ± 9,9	96,8 ± 11,1	96,0 ± 11,5	72,3 ± 11,3
LB (B220+IgM+)	%	44,3 ± 3,3	48,4 ± 2,6	44,7 ± 5,3	49,5 ± 2,7
	x10 ⁶	42,6 ± 5,1	47,0 ± 6,9	44,9 ± 7,7	36,1 ± 7,1
Plasmablastes	%	1,3 ± 0,3	1,5 ± 0,3	2,8 ± 0,9	2,4 ± 1,0
	x10 ⁶	1,3 ± 0,3	1,5 ± 0,4	2,6 ± 0,6 *	1,7 ± 0,7
LB folliculaire	% LB	69,3 ± 3,2	66,7 ± 2,2	70,9 ± 1,6	65,6 ± 7,2
	x10 ⁶	29,1 ± 3,5	31,5 ± 4,8	31,6 ± 5,2	23,8 ± 5,1
LB zone marginale	% LB	13,2 ± 1,9	13,7 ± 1,5	9,7 ± 2,2	15,9 ± 4,6
	x10 ⁶	5,7 ± 1,1	6,7 ± 1,3	5,1 ± 1,3	5,5 ± 1,4
LT CD4+	%	17,8 ± 1,6	18,3 ± 1,1	17,0 ± 1,5	19,2 ± 1,0
	x10 ⁶	17,3 ± 2,5	17,9 ± 2,1	16,9 ± 2,9	13,8 ± 2,0
LT CD4+ naïfs	% CD4+	40,0 ± 4,5	31,8 ± 3,8	33,9 ± 5,8	33,0 ± 8,3
	x10 ⁶	6,8 ± 1,2	6,2 ± 1,0	6,3 ± 1,5	4,5 ± 1,3
LT CD4+ mémoire	% CD4+	51,5 ± 5,4	59,2 ± 3,4	60,8 ± 6,2	62,0 ± 11,8
	x10 ⁶	9,1 ± 1,5	10,4 ± 1,4	10,0 ± 1,7	8,6 ± 2,3
LT CD4+ régulateurs	% CD4+	10,0 ± 0,6	12,6 ± 1,0*	14,6 ± 3,8	10,1 ± 1,9
	x10 ⁶	1,9 ± 0,3	2,4 ± 0,3	2,3 ± 0,4	1,5 ± 0,4
LT CD8+	%	9,9 ± 1,5	8,7 ± 0,9	7,9 ± 0,8	7,8 ± 3,1
	x10 ⁶	9,2 ± 1,3	8,2 ± 1,0	7,2 ± 0,7	5,5 ± 2,2
LT CD8+ naïfs	% CD8+	46,2 ± 5,1	45,5 ± 5,9	50,2 ± 10,2	60,5 ± 2,6
	x10 ⁶	4,6 ± 0,8	4,0 ± 0,6	3,6 ± 0,8	3,2 ± 1,1
LT CD8+ mémoire	% CD8+	32,8 ± 4,1	31,8 ± 3,3	32,6 ± 7,8	28,6 ± 2,7
	x10 ⁶	2,7 ± 0,4	2,6 ± 0,4	2,2 ± 0,4	1,4 ± 0,4
Monocytes	%	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,5 ± 0,4	0,8 ± 0,1
	x10 ⁶	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,2 ± 0,3 *	0,6 ± 0,1
Granulocytes	%	1,3 ± 0,3	1,0 ± 0,1	2,7 ± 1,1	1,3 ± 0,2
	x10 ⁶	1,3 ± 0,3	1,0 ± 0,2	2,2 ± 0,6	1,0 ± 0,3
Cellules NK	%	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,5	1,2 ± 0,2 *
	x10 ⁶	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,3	0,9 ± 0,2

Figure 68. Tableau récapitulatif des populations de cellules immunitaires en pourcentages et nombres absolus dans la rate des souris traitées au CpG-DNA. (Moyenne ± SEM, Statistiques : Test de Mann-Whitney, * p < 0.05).

Nous avons également mesuré la concentration d'IgM et d'IgG dans le sérum des souris à J42. L'injection de CpG-DNA ne modifie pas de manière significative la concentration d'IgM et d'IgG totales dans les souris traitées par le CpG-DNA *versus* souris contrôles (PBS) et **la présence de la mutation ne modifie pas la quantité d'anticorps totaux d'isotype IgM et IgG dans le sérum (Figure 69).**

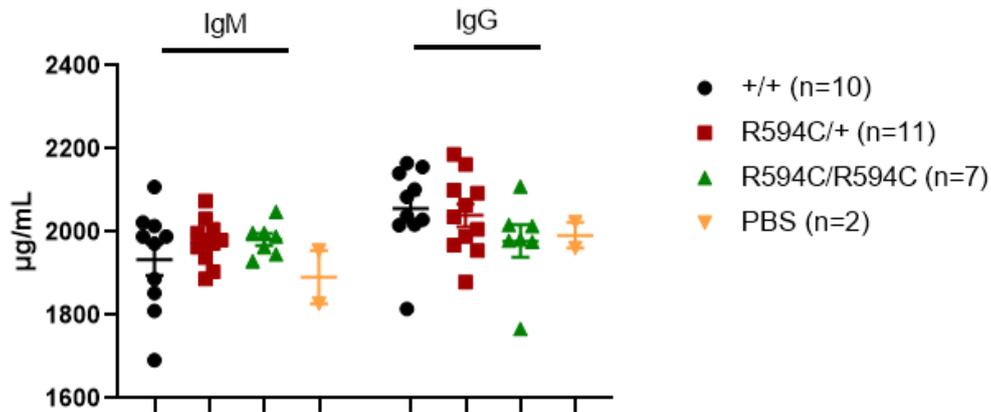


Figure 69. Dosage des IgM et des IgG totales par ELISA dans le sérum des souris IRE1- α +/+ (points noirs), R594C/+ (points rouges) et R594C/R594C (points verts) traitées au CpG-DNA à J42. (Moyenne \pm SEM)

6.2.1 Recherche globale d'auto-anticorps (Antigen microarray)

Suite aux résultats intéressants obtenus par la technique de *microarray* dans le sérum des souris homozygotes et hétérozygotes (5.2), nous avons décidé de soumettre les sérums des souris injectées au CpG-DNA à la même analyse. Nous avons donc analysé le sérum des souris à J42 après le début des injections de CpG-DNA. Après analyse des résultats fournis par le laboratoire, la présence d'auto-anticorps a pu être détectée dans le sérum des souris porteuses de la mutation IRE1- α R594C (**Figure 70 A, B, C et D**, représentant les antigènes pour lesquels une différence statistiquement significative a été observée). Comme à l'état basal, cette augmentation n'est pas spécifique à un type d'antigène mais correspond à un modèle polyréactif. En effet, on peut observer en **Figure 71** (représentant l'ensemble des antigènes testés via cette technique, sans appliquer de filtres statistiques) que l'augmentation de la réactivité est dirigée contre un nombre important d'antigènes. Aussi bien des auto-anticorps d'isotype IgM et IgG sont augmentés, et les antigènes cibles sont des composants de la matrice extracellulaire (tels que le collagène), des récepteurs tels que le récepteur muscarinique ou des composants intracellulaires tels que la chromatine, la topoisomérase, les histones, etc. Il y a donc **une rupture de tolérance globale vis-à-vis des antigènes du soi dans le modèle murin transgénique R594C après injection de CpG-DNA.**

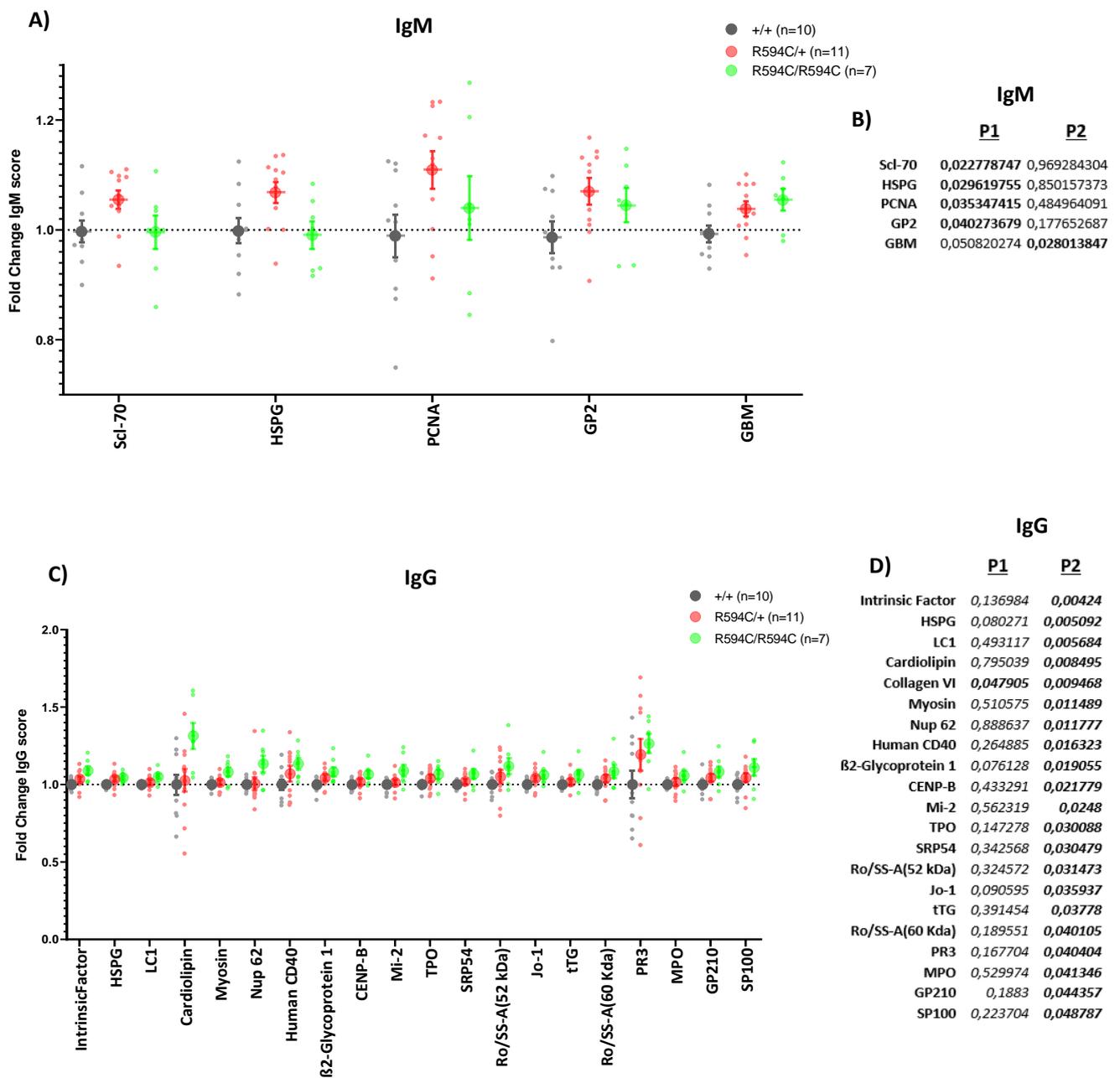


Figure 70. Détection de la présence d'autoanticorps dans le sérum des souris IRE1- α R594C injectées avec du CpG-DNA A) Auto-antigènes d'isotype IgM détectés dans le sérum des souris porteuses de la mutation R594C et B) valeur-p associée aux auto-anticorps d'isotype IgM détectés entre les souris hétérozygotes *versus* sauvages (P1) d'une part et les souris homozygotes *versus* sauvages (P2) d'autre part. C) Auto-antigènes d'isotype IgG détectés dans le sérum des souris porteuses de la mutation R594C et D) valeur-p associée aux auto-anticorps d'isotype IgG détectés entre les souris hétérozygotes *versus* sauvages (P1) d'une part et les souris homozygotes *versus* sauvages (P2) d'autre part. Seuls les antigènes significativement différents entre les souris témoins et les souris IRE1- α sont indiqués. (Moyenne \pm SEM, multiple t-test) souris IRE1- α +/+ (points noirs), R594C/+ (points rouges) et R594C/R594C (points verts)



Figure 71. Heatmaps représentant les résultats de l'antigen microarray (Ab-score normalisé par rapport à la concentration en IgG ou IgM). À gauche, la réactivité mesurée des IgM, à droite les IgG. Chaque colonne représente un échantillon de sérum. Les sérums sont regroupés par génotype, de gauche à droite : +/+ (n = 10), R594C/+ (n = 11) et R594C/R594C (n = 7). Les deux premières colonnes correspondent aux souris contrôles traitées au PBS (une souris +/+ et une souris R594C/+).

6.2.2 Évaluation des atteintes rénales

Nous avons également analysé les dépôts d'anticorps (IgM, IgG, IgG1, IgG2b et IgG3) ainsi que de complément (C3 et C1q) dans les reins des souris injectées avec du CpG DNA (**Figure 72**). Une augmentation de dépôts d'IgG d'isotype IgG3 a été détectée dans les reins des souris porteuses de la mutation (**Figure 72 A**) bien que la présence de dépôts d'immunoglobulines de tous les isotypes (IgM, IgG, IgG3, C3 et C1q) dans les organes des souris sauvages soit abondante (**Figure 72 B**). **L'injection de CpG-DNA semble donc avoir entraîné une augmentation du dépôt d'IgG3 dans les reins des souris porteuses de la mutation.**

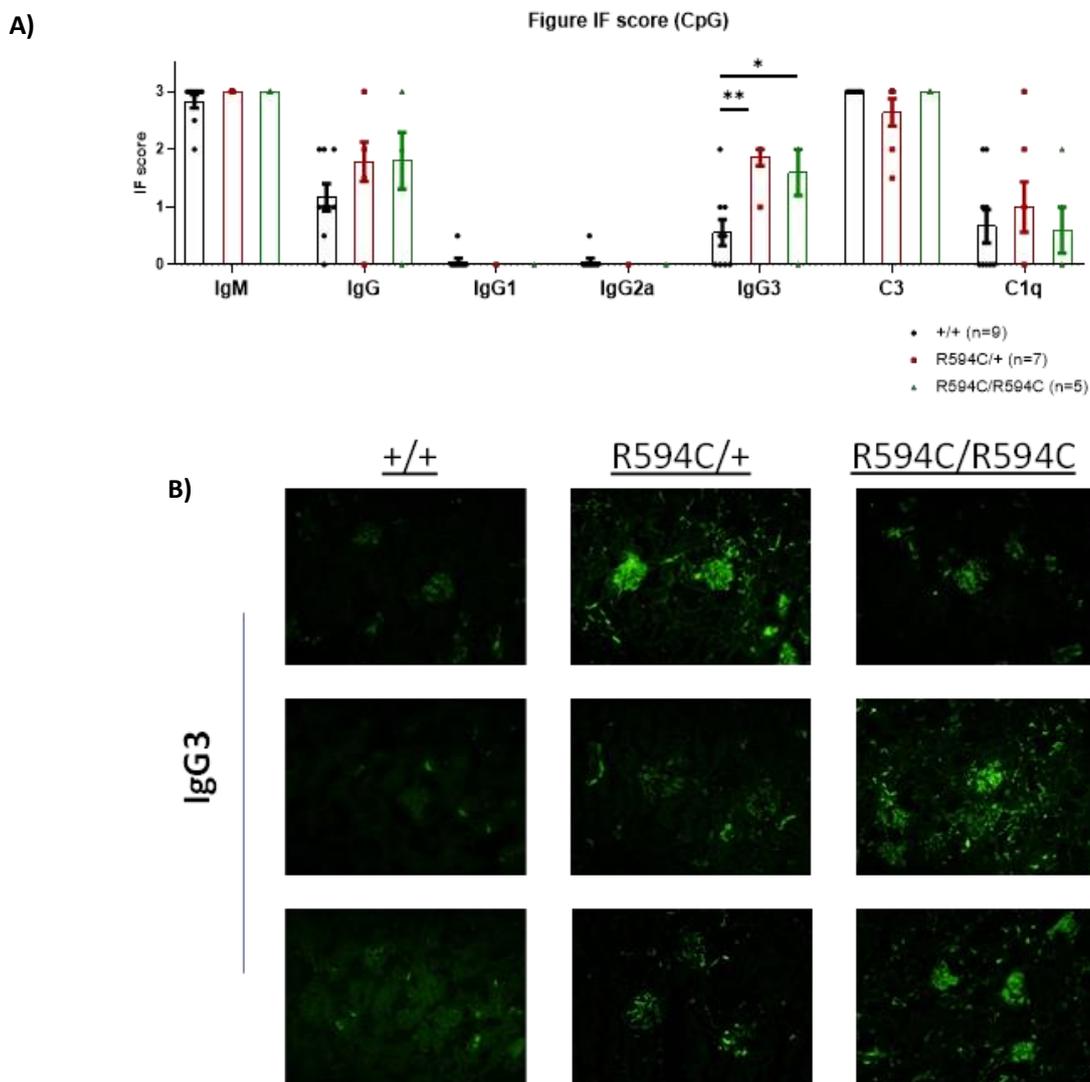


Figure 72. Analyse immunohistochimique des reins de souris IRE1- α R594C. A) Scores d'intensité des dépôts d'anticorps dans les reins des souris traitées au CpG-DNA. Le score a été donné par le Dr. J. Olgne suivant des critères cliniques (localisation, répartition et intensité de fluorescence). B) Exemple de marquage IgG3 des coupes de 3 souris de chaque génotype. (Moyenne \pm SEM, Statistiques : Test de Mann-Whitney, * $p < 0.05$).

7 Répertoire des chaînes légères et des chaînes lourdes du BCR

7.1 Expression des chaînes légères kappa/lambda

Deux types de chaînes légères existent chez la souris : la chaîne kappa et la chaîne lambda (**Figure 73 A**). Le réarrangement des chaînes légères est un des mécanismes d'édition de récepteur. Ce mécanisme permet au LB autoréactif de modifier son récepteur BCR et ainsi de passer les étapes de tolérance centrale. Une augmentation de la proportion des chaînes lambda *versus* kappa peut signaler une activation de l'édition de récepteur et donc la présence accrue de LB autoréactifs. Nous avons mesuré l'expression des chaînes kappa et lambda dans les LB spléniques (**Figure 73 B**) et les LB de la moelle osseuse (**Figure 73 C**). La présence de la mutation R594C ne modifie pas l'expression des chaînes légères dans les LB.

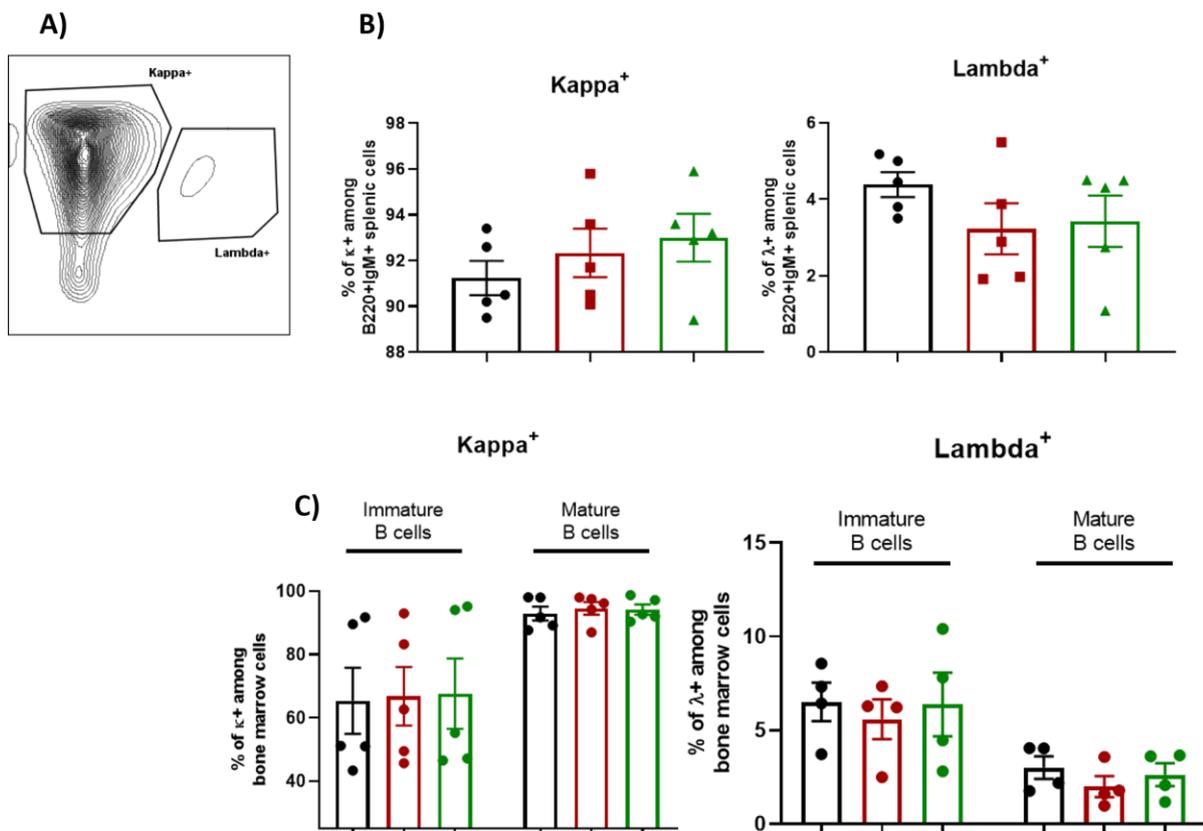


Figure 73. Mesure de l'expression des chaînes légères kappa et lambda sur les populations de LB (A) Exemple de marquage des chaînes légères kappa et lambda par cytométrie en flux. (B) Mesure de l'expression des chaînes légères kappa et lambda sur les populations LB spléniques et (C) les populations de LB de la moelle osseuse. (points noirs : +/+ ; points rouges R594C/+ et points verts : R594C/R594C) (Moyenne \pm SEM)

7.2 Analyse des résultats du séquençage des chaînes lourdes

En raison de la présence d'auto-anticorps dans le sérum des souris R594C, nous avons décidé d'étudier le répertoire des familles de gènes V, D et J des chaînes lourdes des immunoglobulines, afin de voir si un biais de répertoire pouvait être à l'origine d'une présence accrue de cellules autoréactives. Des plasmocytes CD138+ localisés dans la moelle osseuse de souris IRE1- α homozygotes et sauvages ont été purifiés et le séquençage des gènes a été réalisé par l'entreprise Adaptive Technologies®. Le séquençage des chaînes légères n'est pas proposé par l'entreprise. **Aucune différence majeure de fréquence des réarrangements (Figure 74 A) ou des longueurs des segments CDR3 (Figure 74 B et C) n'a été observée.** Une analyse de la proportion d'acides aminés basiques (Arginine, Lysine), qui a été associée dans la littérature à une reconnaissance possible de l'ADN dans les auto-anticorps anti-nucléaires, est en cours. **Le nombre d'hypermutations somatiques et leur fréquence sont similaires** entre les plasmocytes des souris R594C/R594C et des souris +/+ (Figure 74 D et E).

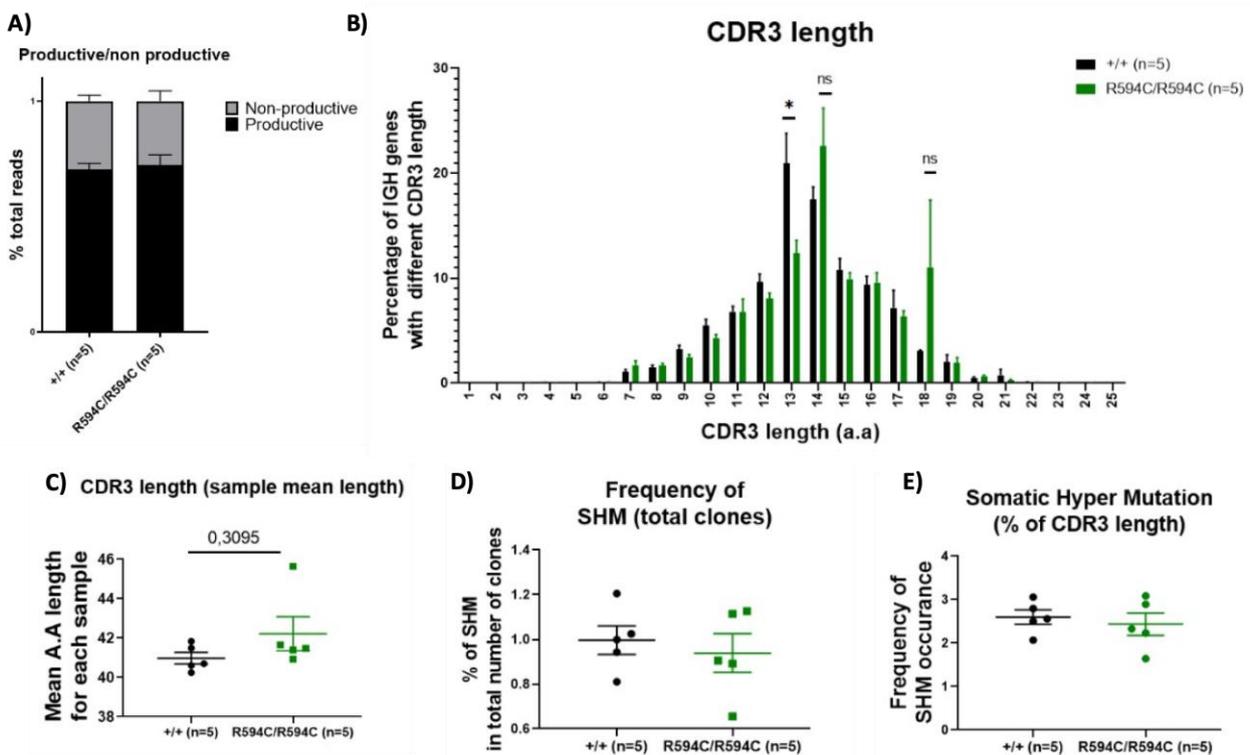


Figure 74. Résultats d'analyse du répertoire des chaînes lourdes du BCR des souris R594C/R594C (n = 5) versus des souris +/+ (n = 5) A) Fréquence de réarrangement productifs et non-productifs. B) Répartition des longueurs en acides aminés des segments CDR3 séquençés. C) Moyenne de la longueur des segments CDR3 par échantillon. D) Fréquence d'apparition d'hypermutations somatiques (SHM : somatic hypermutation) dans l'ensemble des clones. E) Fréquence d'apparition de mutations en fonction de la longueur du segment CDR3. (Moyenne \pm SEM, Statistiques : Test de Mann-Whitney, * $p < 0.05$)

Une modification (statistiquement non significative) d'utilisation des familles de gènes V, D et J est toutefois observable (Figure 75 A, B et C respectivement), suggérant que la présence de la mutation pourrait affecter le répertoire des LB matures différenciés en plasmocytes sécréteurs d'anticorps. Ainsi, on peut noter par exemple une augmentation de la proportion de gènes des sous-familles V_H particulières telles que IGHV01-76, IGHV05-04, IGHV14-04. De plus, les souris mutées présentent dans leur répertoire plasmocytaire une absence de l'utilisation de gènes IGHD06 (vert, (Figure 75 B) une baisse de l'utilisation des gènes IGHD03 (bleu, (Figure 75 B), et une baisse de IGHJ01-01 (blanc, Figure 75 C) au profit d'une augmentation des gènes IGHJ04-01 (orange, Figure 75 C).

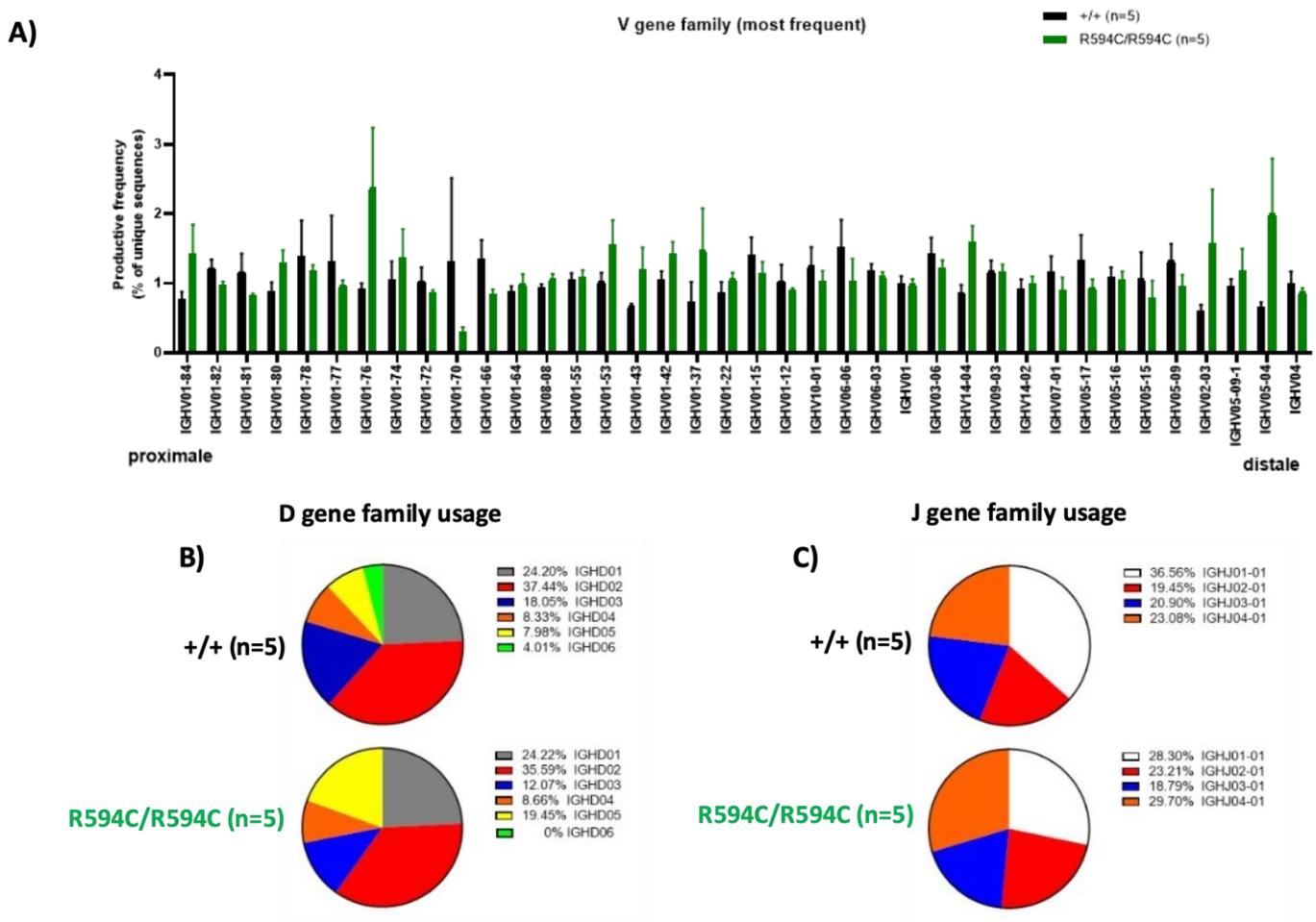


Figure 75. Impact du mutant R594C sur l'utilisation des familles de gènes V, D et J dans les plasmocytes CD138⁺. Analyse de l'utilisation (A) des familles de gènes V (ici, sont représentés les 30 les plus fréquents), (B) des familles de gènes D et (C) des familles de gènes J. Le séquençage a été réalisé par l'entreprise Adaptive Technologies® sur de l'ADN de cellules CD138⁺ triées de la moelle osseuse. (Moyenne ± SEM)

8 IRE1- α R594C et modèle 56R : étude de la tolérance centrale

Les souris C57BL/6 56R, (abrégées 56R par la suite), sont des souris Knock-In pour la chaîne lourde (3H9) d'un BCR anti-ADN portant la mutation 56R (dans CDR2). Cette chaîne lourde (d'allotype a, IgMa) est issue d'un clone de souris MRL^{lpr/lpr} qui reconnaît, lorsqu'elle est associée à des chaînes légères endogènes, l'ADNdb et l'ADNsb. Dans la souris 56R sur fond Balb/c, plusieurs mécanismes de tolérance des LB autoréactifs anti-ADN sont mis en place au niveau central : délétion, anergie et édition de récepteur. Lorsque le transgène est placé sur un fond C57BL/6, ceci rend le système immunitaire plus sensible à une rupture de tolérance et des auto-anticorps anti ADNsb et db de type IgM (IgG dans une moindre mesure) apparaissent chez des animaux âgés de 9-12 mois (Gies et al., 2017b; Sekiguchi et al., 2006). Le fond C57BL/6 étant d'allotype IgMb, nous pouvons distinguer les cellules autoréactives IgMa+ des cellules non autoréactives IgMb+. Nous avons donc décidé de croiser les souris IRE1- α R594C avec ces souris 56R sur fond C57BL/6 (les souris issues de ce croisement seront appelées 56RxR594C/+ ou 56RxR594C/R594C), afin d'analyser le devenir de ces LB autoréactifs et la production d'auto-anticorps en présence de la mutation IRE1- α R594C, et ainsi l'effet de la mutation sur la tolérance centrale

8.1 Dosage des auto-anticorps anti-ADN

La présence d'auto-anticorps plus abondants dans le sérum des animaux représenterait un signe de rupture de tolérance dans ce modèle. Nous avons donc mesuré par ELISA le titre des auto-anticorps anti-ADNdb (**Figure 76 A, B**) et anti-ADNsb (**Figure 76 C, D**) dans le sérum des souris 56RxR594C/+ et 56RxR594C/R594C, en comparaison avec des souris 56R, à l'âge de 6 à 9 mois. **Nos résultats montrent qu'il n'y a pas de modification de la quantité d'auto-anticorps anti-ADNsb ou anti-ADNdb sériques chez les souris 56R possédant la mutation R594C.**

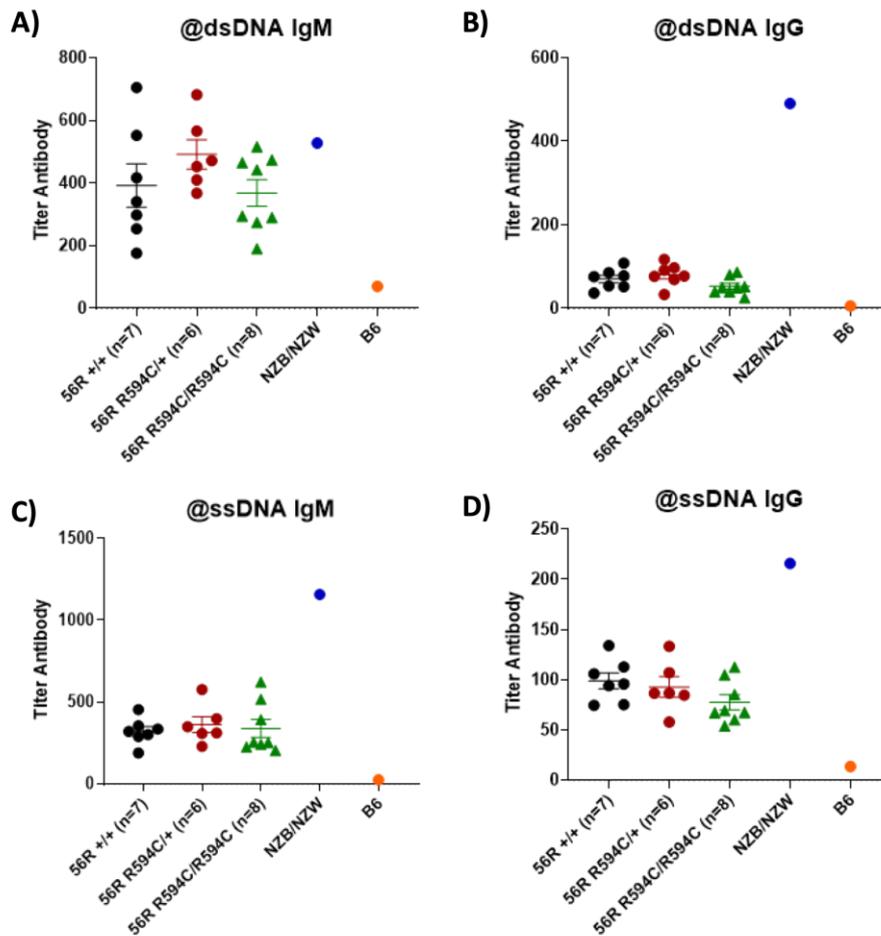


Figure 76. Dosage des auto-anticorps. A) IgM anti-ADNdb, B) IgG anti-ADNdb, C) IgM anti-ADNsb et D) IgG anti ADNsb dans le sérum de souris 56RxIRE1- α +/+ (points noirs, n = 6), 56RxR594C/+ (points rouges, n = 6) et 56RxR594C/R594C (points verts, n = 7) âgées de 6 à 9 mois. Le dosage des auto-anticorps a été réalisé par ELISA. Le sérum d'une souris (NZB/NZW) F1 (âge : 9 mois, point bleu) a été utilisé comme contrôle positif et le sérum d'une souris C57BL/6 (B6, point orange) a été utilisé comme contrôle négatif. (Moyenne \pm SEM)

8.2 Immunophénotypage des souris 56R portant la mutation d'intérêt R594C

Nous avons étudié de manière plus fine la tolérance centrale en évaluant le nombre de LB totaux et les populations de LB exprimant la chaîne lourde transgénique IgMa⁺ versus les cellules exprimant la chaîne lourde endogène IgMb⁺ (allotype du fond C57BL/6). **Nous n'avons pas observé de différence significative dans le nombre total de LB transgéniques dans la moelle osseuse ou dans la rate dans les 2 groupes d'animaux âgés de 9-12 mois (Figure 77 A, B et C).**

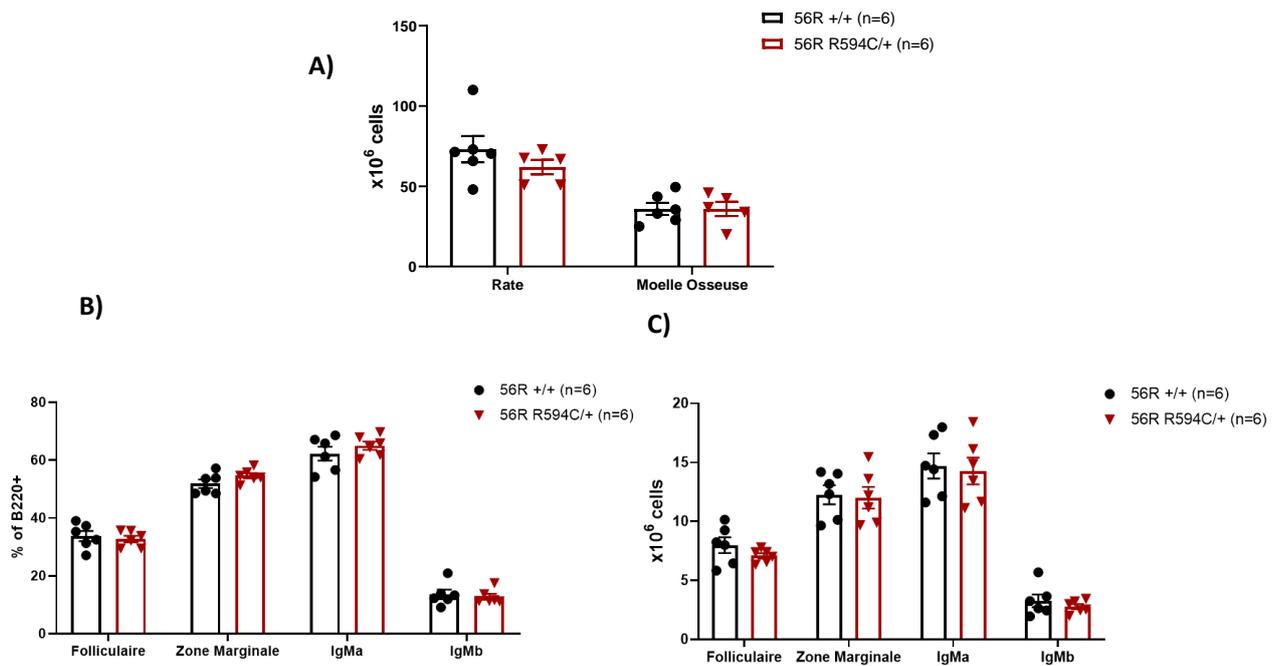


Figure 77. Analyse des populations de LB présents dans la rate des souris 56RxR594C/+. A) Nombre de cellules totales comptées dans la rate et la moelle osseuse B) Fréquence des populations de LB folliculaire, de la zone marginale, exprimant la chaîne lourde autoréactive IgMa et exprimant la chaîne lourde sauvage IgMb dans la rate et C) Nombre de cellules dans chaque population. 56RxIRE1- α +/+ (points noirs, n = 6), 56RxR594C/+ (points rouges, n = 6), souris âgées de 9 à 12 mois. (Moyenne \pm SEM)

Afin de suivre plus finement les LB autoréactifs dans ce modèle, un marquage des LB autoréactifs vis-à-vis des composants nucléaires des cellules a été mis au point au laboratoire (Gies et al., 2017a, 2017b). En effet, tous les LB exprimant le transgène 56R n'ont pas la capacité de réagir avec l'ADN car des mécanismes d'édition de récepteur vont limiter la réactivité du BCR vis-à-vis de l'ADN. La technique de marquage des LB anti-nucléosomes consiste à marquer les cellules avec des nucléosomes couplés à un fluorochrome. D'après la **Figure 78**, les LB exprimant l'allotype IgMa sont les plus susceptibles de lier le nucléosome, d'autant plus s'ils sont situés dans la zone marginale de la rate. Cependant, **la présence de la mutation R594C n'a pas de conséquence sur la réactivité des LB anti-nucléosomes dans les différentes sous-populations de LB.**

Nucleosome (IgMa ou IgMb) +

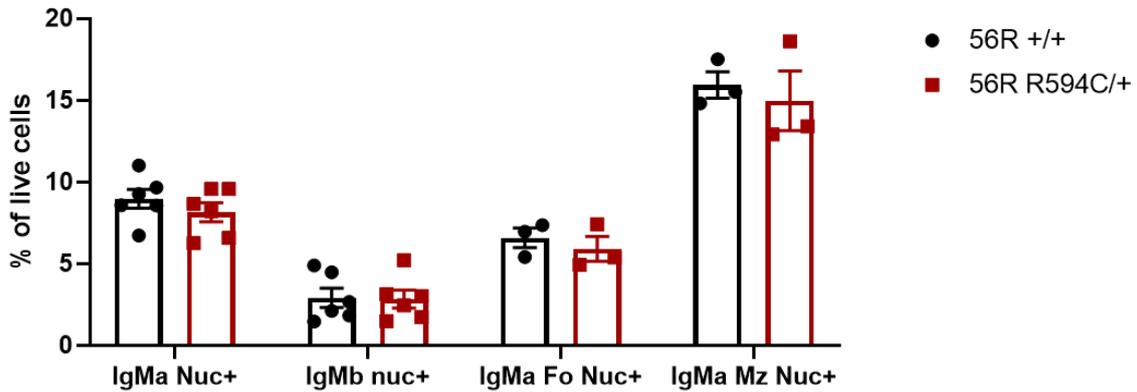


Figure 78. Fréquence des populations de cellules marquées aux nucléosomes. 56RxIRE1- α +/+ (points noirs, n = 6), 56RxR594C/+ (points rouges, n = 6), souris âgées de 9 à 12 mois. (Moyenne \pm SEM)

Nous avons également évalué l'utilisation des chaînes légères kappa et lambda du BCR. L'utilisation des chaînes légères kappa et lambda n'est pas non plus modifiée par la présence de la mutation (Figure 79).

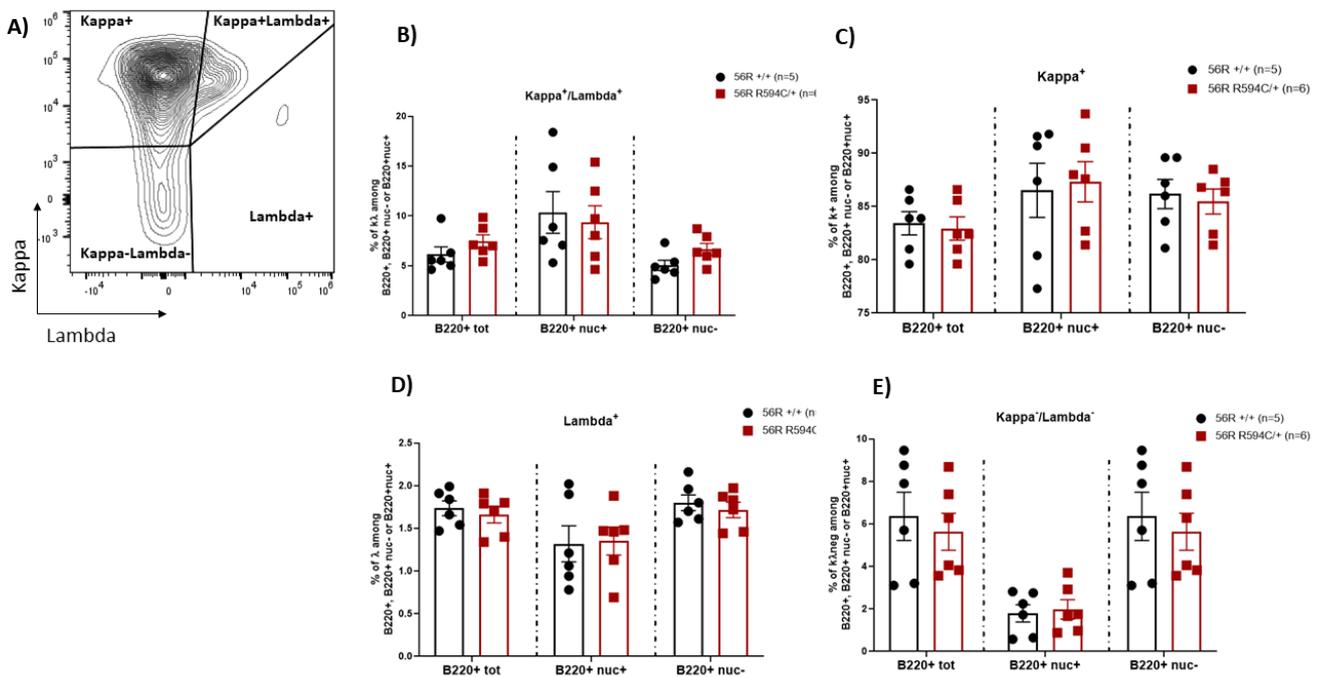


Figure 79. Aucun impact de la mutation IRE1- α R594C sur l'utilisation des chaînes légères du BCR. Fréquence des populations de LB exprimant kappa et lambda (A), kappa seule (B), lambda seule (C) ou aucune des deux chaînes (D) dans la population de LB B220+ totale, dans la population de LB B220+ nucléosomes positifs ou dans la population de LB B220+ nucléosomes négatifs. 56RxIRE1- α +/+ (points noirs, n = 6), 56RxR594C/+ (points rouges, n = 6), souris âgées de 9 à 12 mois. (Moyenne \pm SEM)

Ainsi, la mutation R594C ne semble pas modifier les mécanismes de tolérance centrale dans le modèle murin 56R. Cependant, les mêmes analyses seront réalisées sur le modèle 56RxR594C/R594C afin d'évaluer définitivement si la présence de la mutation à l'état homozygote est susceptible d'induire une modification de la tolérance centrale dans ce modèle.

DISCUSSION

Retour sur le projet de thèse

Les maladies auto-immunes représentent une des trois principales causes de morbidité dans les pays occidentaux et un enjeu majeur de santé publique. Le lupus érythémateux systémique est une des MAI les plus complexes, caractérisée par la production d'auto-anticorps et une atteinte systémique. Les facteurs génétiques et environnementaux associés à la maladie ne sont pas encore tous clairement identifiés. Afin de mieux comprendre la physiopathologie du LES et découvrir de nouveaux facteurs génétiques potentiels, notre équipe a participé à une étude des formes familiales de cette maladie dans le but de découvrir de nouvelles formes monogéniques du LES. L'étude de ces formes monogéniques permet de découvrir et de caractériser de nouvelles voies impliquées dans le développement de cette maladie. La description de nouveaux gènes associés fortement aux risques de développer un LES a pour objectif de proposer des stratégies de stratification des patients et de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques.

Ce projet a permis, en collaboration avec l'équipe du Dr. F. Rieux-Laucat (institut Imagine, Paris), de décrire un nouveau variant du gène *ERN1*, une mutation ponctuelle C1780T entraînant une modification d'un résidu arginine en position 594 en un résidu cystéine (R594C). Ce gène code pour la protéine IRE1- α , un des principaux acteurs de la réponse à l'accumulation de protéines mal repliées et au blocage de la machinerie du RE. L'activation de IRE1- α et sa régulation sont essentielles à l'homéostasie de la cellule. Un défaut de l'activation des voies IRE1- α /XBP1s a déjà été décrit dans les PBMCs de patients lupiques (Wang et al., 2014a) mais aucune mutation dans le gène *ERN1* n'a été associée au LES dans les études de cohortes de patients de type GWAS (Genome-Wide Association Study) à ce jour. Ce mutant a été identifié dans une famille présentant plusieurs syndromes auto-immuns dont un cas de lupus. D'après les données *in silico*, la mutation R594C pourrait entraîner une perturbation de la formation de complexes d'IRE1- α , essentielle à l'activation de la protéine. L'équipe du Dr. F. Rieux-Laucat a étudié le mutant IRE1- α R594C à l'aide d'une lignée de LB provenant de la patiente lupique à l'origine de l'étude et immortalisée à l'aide d'une infection par EBV. Ils ont observé dans leurs travaux une modification de l'activité ribonucléase de IRE1- α mutée et une baisse de l'épissage alternatif de XBP1. Ils ont également observé une augmentation de la dégradation de l'ARNm de Caspase-3, une des cibles du RIDD, pouvant favoriser une résistance à l'apoptose dans les LB autoréactifs. Ces travaux ont fait l'objet d'une thèse défendue par le Dr. Matthieu Moncan en

mars 2019. Ces travaux ont donc été complétés par l'étude du modèle murin transgénique porteur de la mutation IRE1- α R594C, objet de ce mémoire de thèse.

Nos résultats montrent que la principale conséquence de cette perturbation est la diminution de l'épissage de l'ARNm de XBP1 entraînant une diminution de l'expression de XBP1s actif. L'insertion de la mutation IRE1- α R594C dans un modèle murin entraîne l'apparition à un âge avancé (9 mois) d'une perte de tolérance globale sans manifestations cliniques, caractérisée par la présence accrue d'auto-anticorps d'isotype IgM et IgG ciblant de nombreux antigènes de l'organisme et par un répertoire de LB modifié.

Perte de fonction du mutant IRE1- α R594C

Ce modèle est intéressant pour l'étude de la fonction IRE1- α car c'est un mutant « physiologique », décrit d'abord chez l'Homme avant d'être transposé dans un modèle murin. A notre connaissance, aucune description de mutations du gène *ERN1* chez l'Homme n'a été transposée dans un modèle de souris. Par ailleurs, d'après la littérature, l'étude des modèles KO complets a été difficile à mettre en œuvre du fait de la mortalité embryonnaire occasionnée par l'absence de IRE1- α (Zhang et al., 2005) et de XBP1 (Reimold et al., 2001). La stratégie initialement appliquée par ces auteurs a été de reconstituer la moelle osseuse de souris Rag déficientes irradiées, avec des cellules souches hématopoïétiques issues d'embryons IRE1- α KO ou XBP1 KO. Les souris Rag2 déficientes ne présentent pas de recombinaison VDJ fonctionnelle, le BCR et le TCR ne sont pas exprimés et le développement des lymphocytes T et B s'arrête donc à un stade précoce (progéniteurs lymphocytaires) (Shinkai et al., 1992). Le développement des KO conditionnels de IRE1- α et XBP1 a permis de remédier aux limites du modèle Rag2 déficient (irradiation, lourdeur de protocole, reconstitution incomplète de la moelle osseuse). Les KO conditionnels de IRE1- α et XBP1 dans les LB (CD19-Cre) sont viables mais présentent des défauts de différenciation plasmocytaire et une baisse importante de la production d'anticorps (Benhamron et al., 2014; Todd et al., 2009). L'apport des modèles KO conditionnels dans la compréhension du rôle de IRE1- α et XBP1 est important puisqu'il permet une étude plus ciblée d'une protéine dans la physiologie de la cellule cible. Cependant, la principale limite des modèles conditionnels est que l'absence de la protéine est limitée à l'expression de son promoteur. L'intérêt de notre projet est que la mutation, reproduisant une perte au moins partielle de la fonction ribonucléase, est présente dans toutes les cellules de l'organisme et particulièrement dans toutes les cellules immunitaires. XBP1 et IRE1- α jouent un rôle important dans

les LB (Benhamron et al., 2014; Todd et al., 2009) mais aussi dans les LT (Kamimura and Bevan, 2008) et les cellules dendritiques (Guttman et al., 2022). Notre modèle permet donc d'étudier un mutant de IRE1- α décrit dans une famille de patients et son impact sur l'ensemble du système immunitaire, voire l'ensemble de l'organisme puisque des défauts de l'UPR ont été associés à des atteintes multiples telles que l'arthrite (Gao et al., 2008), des maladies hépatiques (Wang et al., 2018a), le diabète (Marré and Piganelli, 2017), des anomalies du métabolisme des lipides (Sriburi et al., 2004), etc.

Ce projet a permis de mettre en évidence une mutation entraînant une perte de fonction de la protéine IRE1- α . Cette perte de fonction du domaine ribonucléase est observée aussi bien dans les LB que les LT CD4⁺ et CD8⁺. Nous avons développé une collaboration avec le Pr. Sophie Janssens (VIB, Gand, Belgique). Son équipe a également analysé l'épissage de XBP1 dans un modèle rapporteur ERAI développé par l'équipe de Iwawaki (Iwawaki et al., 2004) (**Figure 80**). Ce modèle permet de mesurer la production de XBP1s car le gène XBP1 est couplé à un gène VenusFP. L'épissage de XBP1u en XBP1s entraîne la synthèse de XBP1s couplée à la VenusFP. Nos collaborateurs ont observé une diminution importante du signal VenusFP dans les cellules NK et les sous-populations cDC1 et cDC2 de la rate dans les souris ERA1 XBP1-VenusFP croisées avec les souris portant la mutation R594C (de manière dose-dépendante, comme observé dans nos expériences sur les LB et les LT) en comparaison avec des souris contrôles ERA1 XBP1-VenusFP littermate (données non montrées).

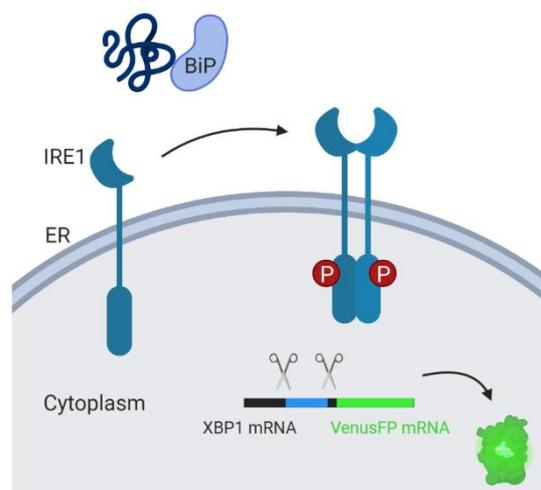


Figure 80. Fonction du modèle ERAI XBP1-VenusFP rapporteur. Les protéines non repliées dans le RE activent IRE1- α qui épisse un intron de l'ARNm XBP1. XBP1 épissé code pour le facteur de transcription XBP1s. Lors de son activation, IRE1- α peut également supprimer l'intron d'un transgène rapporteur XBP1-VenusFP. L'ARNm XBP1-VenusFP épissé code pour une protéine de fusion XBP1-VenusFP cytosolique, inactive sur le plan transcriptionnel, qui permet de suivre l'activité d'IRE1 par son signal de fluorescence.

La mutation R594C est située dans le domaine kinase de la protéine. Ce domaine est important pour l'activation d'IRE1- α et l'autophosphorylation d'IRE1- α précède l'activation du domaine ribonucléase. Les études *in silico* réalisées sur la mutation R594C suggèrent que la mutation peut modifier les interactions entre les résidus 594 et les résidus 592 et 643 d'IRE1- α . Cette modification pourrait entraîner la formation de dimères et/ou d'oligomères d'IRE1- α . La formation de dimères puis d'oligomères pourrait être une façon de réguler la fonction ribonucléase et de modifier le ratio entre l'épissage de XBP1u et la fonction RIDD de la molécule (Tam et al., 2014).

Nous avons observé dans notre modèle que l'impact était très fort sur la fonction d'épissage de XBP1 mais l'impact sur la fonction RIDD est beaucoup moins clair, certains ARN cibles semblant être plus dégradés chez le mutant, et d'autres moins. Nous avons limité l'étude des cibles du RIDD à quatre gènes cibles décrits notamment dans les travaux de Tang *et al.* (Tang et al., 2018) portant sur l'étude d'un mutant d'un résidu phosphorylé S729A. Il serait intéressant de réaliser une analyse globale du transcriptome des souris homozygotes et hétérozygotes après une stimulation du BCR ou des TLR des LB par exemple, afin de rechercher la régulation d'expression des gènes cibles du RIDD en conditions de stimulation.

La régulation de la fonction ribonucléase de IRE1- α est largement discutée dans la littérature. Plusieurs protéines interagissent directement avec IRE1- α afin de réguler sa phosphorylation (Hetz et al., 2020) mais l'équilibre entre la dimérisation du récepteur et la formation de complexes plus importants pourrait être modifié par la présence de la mutation R594C. En effet, le résidu arginine possède une charge positive tandis que le résidu cystéine est de charge neutre, ce qui pourrait modifier l'équilibre des structures des oligomères d'IRE1- α . La formation d'oligomères correspondrait à un degré d'activation supérieur d'IRE1- α et serait favorable à l'épissage de XBP1 (Tam et al., 2014). Il est à noter que cette mutation présente dans le domaine kinase pourrait déstabiliser la formation de complexes oligomériques, notamment en cas de stress du RE trop important (par exemple après traitement par un inducteur du stress du RE tel que la thapsigargine) mais la conformation dimérique serait suffisante lors de la différenciation plasmocytaire pour permettre une activité suffisante de l'épissage de XBP1. Nous aurions alors un effet partiel qui se rapprocherait de l'hypothèse décrite dans l'article de Benhamron *et al.* (Benhamron et al., 2014). En effet, les auteurs de cet article décrivent que l'absence de XBP1 dans les LB entraîne un arrêt de la différenciation plasmocytaire et de la production d'immunoglobulines mais aussi une suractivation de la phosphorylation d'IRE1- α , donc son activation. La délétion simultanée de IRE1- α et XBP1 rétablit

partiellement la sécrétion d'immunoglobulines car IRE1- α dégrade l'ARNm de la chaîne lourde des IgM, μ S. Il est intéressant de noter que la baisse de différenciation plasmocytaire et la diminution de sécrétion d'IgM que nous observons *in vitro* avec les cellules R594C homozygotes ne sont observables qu'au bout de 7 jours de culture. Ces observations suggèrent un effet tardif dans des conditions de stress importantes de la cellule. Toutefois, nous n'avons pas détecté de mortalité anormale des cellules homozygotes lors d'un stress du RE induit par la thapsigargine, ni lors de l'activation par le LPS.

Les analyses *in silico* réalisées en amont du projet par nos collaborateurs nous ont indiqué que la mutation était située dans un domaine pouvant diminuer l'interaction dos-à-dos (back to back) de la protéine. Or, la configuration face-à-face (face to face) de la protéine favorise la formation de dimères, la conformation dos-à-dos quant à elle est plutôt favorable à la formation d'oligomères d'IRE1- α . Ces deux conformations réguleraient la balance entre l'activité d'épissage de XBP1 (oligomérique) et l'activité RIDD (dimérique) (Tam et al., 2014). Ces données sont cependant très débattues dans la littérature. En effet, Hetz et Papa ont décrit un modèle où la configuration de dimères de IRE1- α en conformation face-à-face était plutôt favorable à l'épissage de XBP1 et montré que le RIDD n'était activé que dans le cas d'un stress du RE plus intense, lorsque les réserves de l'ARNm de XBP1 sont épuisées et que la suractivation de IRE1- α entraîne la formation d'oligomères (Hetz and Papa, 2018). La recherche de voies biologiques affectées par la mutation (RNAseq) a montré des résultats contrastés, mais certaines voies métaboliques intéressantes sont sous-exprimées dans les lymphocytes (phosphorylation oxydative et métabolisme des lipides). La mutation de IRE1- α pourrait modifier certaines voies du cycle cellulaire (p53 et Myc). Il serait peut-être judicieux de réaliser une étude d'interactome lors d'une activation des cellules lymphocytaires des souris IRE1- α R594C afin de déterminer quels partenaires sont associés au mutant R594C. Nos collaborateurs en Belgique ont commencé à développer une lignée cellulaire MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*) dérivée des souris IRE1- α R594C, ce qui permettra d'obtenir un matériel plus important afin de déterminer l'effet de la mutation sur l'activité basale de la protéine (RIDD et/ou XBP1s) mais également après induction d'un stress du RE. En conclusion, la mutation pourrait donc perturber cet équilibre entre oligomérisation et dimérisation (**Figure 81**).

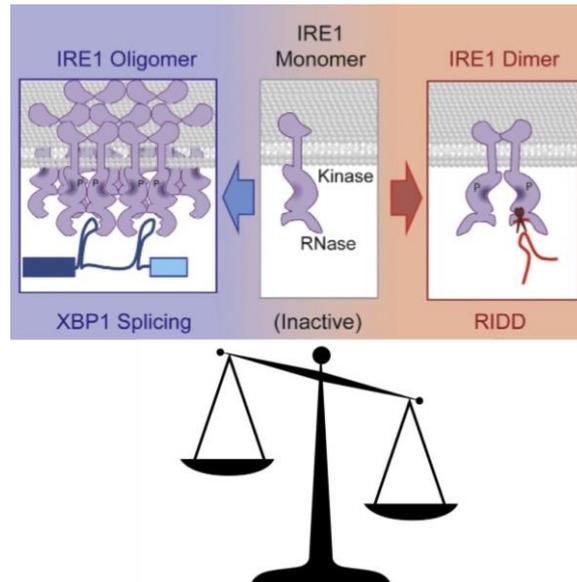


Figure 81. Impact de la substitution R594C sur la fonction de IRE1- α . La dimérisation face-à-face d'IRE1- α pourrait encore avoir lieu dans le KI, permettant peut-être à la fonction RIDD (physiologique) d'être active, ce qui pourrait être suffisant pour les fonctions de IRE1- α à l'état basal.

(Adaptée de Tam et al, 2014)

Impact du mutant R594C sur le système immunitaire

La présence de la mutation semble avoir un effet sur l'homéostasie lymphocytaire. Il est bien décrit dans la littérature que l'absence ou la diminution de IRE1- α ou XBP1 (dans des modèles conditionnels) entraîne une diminution de la différenciation plasmocytaire et de la synthèse d'immunoglobulines (Kemp et al., 2013; Reimold et al., 2001; Todd et al., 2009; Zhang et al., 2005). Par ailleurs, dans notre modèle, au niveau basal, il semble que les LT naïfs soient les cellules les plus impactées par la présence de la mutation. Dans la littérature, seules quelques études se sont intéressées au rôle de IRE1- α dans l'homéostasie des LT. Par exemple, une étude a montré un rôle de IRE1- α dans la différenciation en Th2. En effet, l'ablation de l'expression de IRE1- α dans les LT diminue la production d'IL-4 par les Th et la polarisation Th2 (Kemp et al., 2013). De plus, l'ablation de XBP1 dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale a limité le développement des LTh17 et diminué les symptômes de la maladie (Brucklacher-Waldert et al., 2017). L'analyse RNAseq des CD4 n'a pas montré de modification d'expression des gènes de polarisation des LT ; cependant, l'analyse transcriptomique a été réalisée sur un pool de LT CD4⁺ sans distinction des populations naïves et mémoires, ni des sous-populations de LTh. La recherche de modifications de la

polarisation des LTh chez les souris mutées serait d'autant plus intéressante. S'il s'avérait que la polarisation des LTh est modifiée, l'introduction de la mutation R594C dans ce modèle d'encéphalite auto-immune expérimentale serait envisageable.

L'effet de la mutation R594C le plus attendu sur les populations lymphocytaires est un impact sur les plasmocytes puisque XBP1 est un facteur de transcription essentiel à la différenciation plasmocytaire (Todd et al., 2009). Nous n'avons pas observé de modification de la sécrétion d'Ig *in vivo* en conditions d'immunisation des souris par du LPS ou du CpG, ni de modification majeure des populations de LB ou de plasmocytes dans les organes lymphoïdes. Les investigations *in vitro* ont montré un impact modéré sur la différenciation plasmocytaire à 7 jours de stimulation par une combinaison de LPS/IL-4. Ces résultats semblent en contradiction avec la littérature. Les premiers travaux montrant que l'absence de XBP1 et IRE1- α entraînait un impact majeur sur les LB ont ensuite été modérés par Benhamron *et al.* (Benhamron et al., 2014). Il semblait alors que l'effet sur la sécrétion d'immunoglobulines était dû à l'absence de XBP1 d'une part, mais aussi à la dégradation accrue de l'ARNm des IgM par IRE1- α suractivée. Pour rappel, dans notre modèle, l'expression de l'ARNm de μ S est augmentée après induction d'un stress du RE. La diminution de l'épissage de l'ARNm de XBP1 dans notre modèle pourrait donc s'accompagner d'une activité du RIDD normale ou seulement partiellement impactée. Il est intéressant de noter que dans le premier modèle décrit de perte d'IRE1- α (Rag2 déficient et reconstitué avec des CSH IRE1- α KO) (Zhang et al., 2005), il a été démontré que le domaine cytoplasmique de IRE1- α jouait un rôle indépendant de XBP1 dans le développement et la fonction des LB. Dans cet article, la surexpression de XBP1s ne restaure que partiellement la sécrétion d'IgM et d'IgG1 dans des LB exprimant une protéine IRE1- α tronquée de son domaine cytosolique entier. Le mutant R594C pourrait s'apparenter à un double Knock-down IRE1- α et XBP1, ce qui, dans les travaux de Benhamron *et al.*, permettait de rétablir une activité partielle de synthèse d'immunoglobulines. La perte de fonction d'IRE1- α et de XBP1s étant seulement partielle, une faible synthèse de XBP1 est donc suffisante à la bonne différenciation plasmocytaire et/ou IRE1- α pourrait jouer un rôle indépendant de XBP1 dans l'homéostasie des LB et l'activité des plasmocytes. Le rôle de l'axe IRE1- α /XBP1s est donc plus complexe que celui décrit dans la littérature et l'interaction du mutant IRE1- α R594C avec l'ensemble des partenaires classiques d'IRE1- α est à analyser plus en détail.

Nous avons évalué la capacité des LB IRE1- α R594C à produire des Ig après stimulation *in vitro*. Nous avons observé une diminution de la synthèse des IgM associée à la diminution de la différenciation plasmocytaire après 7 jours de stimulation avec une combinaison LPS/IL-4 mimant une réponse T-dépendante. Cette diminution de la sécrétion d'IgM n'est pas retrouvée dans le cas d'une stimulation par le LPS seul, ni par une stimulation par du CpG DNA (agoniste TLR9). Nous avons également testé des stimulations via le TLR7 (agoniste R848) et une stimulation du BCR (par anticorps anti-CD40, additionnée d'IL-4 et d'IL-21) qui n'ont pas montré de différences de différenciation plasmocytaire et de sécrétion des immunoglobulines (données non montrées). Il semblerait donc que l'impact de la perte de fonction d'IRE1- α et de la diminution d'épissage de XBP1 soit visible en conditions de stimulation longue et dans un contexte T-dépendant. Ces résultats peuvent être appuyés par la littérature ; en effet l'équipe de Laurie Glimcher a observé que dans un modèle d'absence de XBP1 dans les LB (CD19CreXBP1^{fl/fl}), les LB étaient bloqués à un stade tardif de la différenciation plasmocytaire, dans lequel ils expriment CD138 sans être capables de sécréter des immunoglobulines (Todd et al., 2009).

Nos collaborateurs en Belgique (Pr Sophie Janssens, VIB, Gand), spécialisés dans l'étude de IRE1- α et des DC, n'ont pas non plus observé d'impact majeur de la mutation R594C sur l'homéostasie des DC. Pourtant, la même diminution de l'épissage de XBP1 par IRE1- α a été observée dans les différents sous-types de DC dans notre modèle R594C. Aucun défaut majeur sur la physiologie des DC, sur la présentation antigénique ou le métabolisme lipidique n'a pu être décelé. Le défaut de production de XBP1s observé aussi bien dans les cellules hétérozygotes qu'homozygotes n'induit pas de réduction du nombre de DC conventionnelles, ni de baisse de la survie des DC après activation comme observé dans les DC KO pour XBP1 ou IRE1- α (Iwakoshi et al., 2007; Tavernier et al., 2017). Une analyse transcriptomique comparative des cellules immunitaires IRE1- α KO, XBP1-KO et IRE1- α R594C mutées pourrait permettre de trouver de nouvelles voies biologiques intéressantes régulées par IRE1- α .

Deux modèles KI pour des mutations d'IRE1- α existent dans la littérature. Comme évoqué précédemment, le premier est un mutant S724A dans lequel un résidu sérine capable de s'autophosphoryler est remplacé par un résidu alanine. Cette mutation bloque l'autophosphorylation de IRE1- α et entraîne une diminution de l'activité ribonucléase et l'arrêt de la synthèse de XBP1. L'introduction de cette mutation entraîne l'apparition de dysfonctions hépatiques après traitement

des souris avec de la tunicamycine (Li et al., 2022). Un deuxième modèle S729A a montré que la phosphorylation du résidu Serine 729 était essentielle à la fonction RIDD et à la production d'immunoglobulines par les plasmocytes (Tang et al., 2018). Ces deux mutations touchent directement deux sites de phosphorylation situés dans le domaine d'activation d'IRE1- α au niveau du domaine kinase (résidus : 711-741, **Figure 23**). Ces deux mutations bloquent directement l'activation de la protéine au niveau du domaine kinase et empêchent l'activation du domaine ribonucléase, donc les observations faites sur ces deux modèles peuvent être comparées à des KO complets d'IRE1- α . Cependant, les phénotypes sont contrastés et le défaut observé dans ces modèles ne reproduit que partiellement les effets observés dans les cellules KO. Le mutant R594C est situé en dehors de ce domaine d'activation. De plus, il est à rappeler ici que la mutation est uniquement retrouvée de manière hétérozygote dans la famille. L'effet de cette mutation est donc à dissocier d'une absence d'activité complète.

Rupture de tolérance et développement d'une auto-immunité dans le modèle IRE1- α R594C ?

Nos résultats montrent une augmentation des auto-anticorps détectés par la technique de la puce à antigènes dans le sérum des souris IRE1- α R594C (Zhu et al., 2015). Nous avons observé une augmentation globale du signal autoréactif, c'est-à-dire que plusieurs auto-anticorps sont détectés aussi bien en isotype IgM qu'IgG. Paradoxalement, nous n'avons pas détecté d'auto-anticorps par les techniques classiques d'ELISA (anti-ADN, anti-nucléosomes, anti-myosine). Nous pouvons admettre une sensibilité accrue de la technique de puce à antigènes par rapport aux techniques classiques d'ELISA, mais aussi une perte de tolérance qui s'apparente à une rupture globale vis-à-vis de nombreux auto-antigènes, avec une production d'auto-anticorps de faible à moyenne affinité, sans spécificité et sans manifestations cliniques typiques telles qu'une glomérulonéphrite ou des atteintes articulaires. L'apparition d'auto-anticorps est associée à une tendance à l'augmentation de dépôts d'anticorps dans les reins des souris porteuses de la mutation, mais seulement hétérozygote. Cette tendance est légère, la présence de dépôts d'anticorps dans les souris B6 sauvages étant abondante. Il est intéressant de noter que cette augmentation est visible concernant l'isotype IgG1. Par ailleurs, la commutation isotypique vers les IgG1 est médiée par l'IL-4, mais IRE1- α joue un rôle important dans la production d'IL-4 par les LTh. En effet, l'ablation génétique de IRE1- α mais aussi le traitement de LT avec un inhibiteur spécifique bloquent la production et la stabilité de l'IL-4 produite par les Th2

(Kemp et al., 2013). Nos résultats seraient contradictoires mais pourraient indiquer un rôle plus complexe de IRE1- α dans la polarisation des LTh mais aussi un rôle de IRE1- α dans les autres cellules immunitaires telles que les DC, très importante dans ces mécanismes de polarisation. Il n'y a cependant pas d'augmentation observable des taux d'anticorps IgG1 sériques. Il serait intéressant d'analyser l'isotype retrouvé dans l'analyse de la puce à antigènes. Une analyse plus approfondie des cibles des auto-anticorps est aussi envisagée. En effet, certains auto-anticorps retrouvés augmentés ciblent des antigènes non spécifiques de la pathologie lupique mais pourraient être impliqués dans d'autres formes de manifestations cliniques, notamment des formes d'arthroses (exemple : auto-anticorps anti-collagène de type II) (Osiecka-Iwan et al., 2018). Une analyse histologique des tissus cartilagineux est envisagée en collaboration avec le laboratoire du Pr. P. Boucher (INSERM U1109, Strasbourg).

La présence de ces auto-anticorps pourrait ainsi refléter l'existence de LB autoréactifs présents dans les organes lymphoïdes secondaires, et la présence de plasmocytes sécréteurs d'auto-anticorps dans la moelle osseuse. Nous avons analysé les populations de LB dans la rate et les ganglions. Nous avons observé une légère expansion des LB associée à une diminution des LT naïfs. Un modèle récent étudiant un mutant gain de fonction de TLR7 a observé une diminution similaire du ratio LT/LB. Ce modèle est associé à l'apparition de symptômes auto-immuns tels qu'une glomérulonéphrite et des auto-anticorps anti-ADN (Brown et al., 2022). Dans notre modèle murin IRE1- α , les sous-populations de LB spléniques et ganglionnaires ne présentent pas de modification des pourcentages et des nombres absolus. Nous avons analysé l'expression des marqueurs d'activation des LB, sans détecter de modification à l'état basal dans les organes lymphoïdes. Nous n'avons pas observé de modification de l'activation des LB *in vitro* après différentes stimulations via des TLR ou le BCR. De plus, l'injection *in vivo* d'agonistes de TLR4 (LPS) et de TLR9 (CpG DNA) n'a pas non plus entraîné une modification de la sécrétion d'Ig, ni une activation particulière des LB. Cependant, l'analyse du sérum des souris injectées au CpG DNA a montré la présence d'auto-anticorps de type IgG et IgM dans le sérum des souris porteuses de la mutation R594C. L'analyse des reins a montré une augmentation des dépôts d'IgG d'isotype IgG3. L'injection de CpG est connue pour entraîner une commutation isotypique vers les IgG2a et les IgG3 (Chu et al., 2000). Il semble donc que l'injection d'agoniste TLR9 accentue la rupture globale de tolérance observée à l'état basal chez les souris non immunisées et que la présence de la mutation favorise la commutation de classe vers les IgG3. Il est intéressant de noter que la sous-classe IgG3 s'est avérée être impliquée dans le

développement de la glomérulonéphrite lupique dans le modèle murin MRL/lpr (Peng et al., 2002) et l'absence d'expression de cette sous-classe réduit les symptômes dans ce même modèle (Greenspan et al., 2012). Le taux d'anticorps IgG global n'est pas augmenté dans le sérum des souris immunisées, mais il serait intéressant de doser les IgG3 chez les souris immunisées par le CpG, et de rechercher l'isotype des auto-anticorps IgG détectés par la puce à antigènes.

La présence d'auto-anticorps dans le sérum des souris IRE1- α R594C injectées et l'augmentation des dépôts d'anticorps de type IgG3 suggèrent une rupture de tolérance périphérique apparaissant chez les souris IRE1- α R594C. La voie du TLR9 est importante dans la physiopathologie du lupus, son activation entraîne une activation du système immunitaire et une activation de la synthèse d'IFN. Cependant, son rôle dans le développement d'une auto-immunité serait plus complexe et pourrait éventuellement réguler l'apparition de celle-ci (Fillatreau et al., 2021). En revanche, le TLR7 est une voie d'activation très intéressante. La suractivation du TLR7 est associée à la pathologie lupique, des études s'intéressant particulièrement à l'inactivation imparfaite du chromosome X qui pourrait expliquer le sex-ratio du lupus car le gène TLR7 est situé sur ce chromosome (Souyris et al., 2018a). Enfin, l'injection d'un agoniste TLR7 (R848) ou l'application d'imiquimod est un modèle murin d'auto-immunité décrit dans la littérature (Farrugia and Baron, 2017). Il serait intéressant alors de tester une immunisation des souris R594C avec un agoniste TLR7. Il faut cependant noter que la voie du TLR7 a été associée à XBP1 puisque l'activation du TLR7 entraîne la synthèse de XBP1 et la production d'IFN- α dans les cellules humaines (Beisel et al., 2017). L'induction de la synthèse de XBP1 par TLR7 pourrait être modifiée par la présence de la mutation R594C au moins dans le contexte hétérozygote. Cependant, un effet contraire n'est pas à exclure. En effet, la perte de fonction IRE1- α pourrait protéger du développement d'une auto-immunité par l'injection d'un agoniste TLR7 puisque les deux voies sont directement en relation.

IRE1- α pourrait donc jouer un rôle dans la tolérance centrale. En effet, comme l'a décrit un travail d'Eelco van Anken (van Anken et al., 2021), l'expression de BCR anormaux mal-conformés peut entraîner une mort cellulaire programmée suite à un déclenchement d'un stress du RE. La mutation IRE1- α R594C pourrait modifier le seuil d'activation de l'UPR et donc diminuer l'activation de l'apoptose des LB autoréactifs. Dans un modèle murin de surexpression de la synoviline (une protéine essentielle au mécanisme de dégradation des protéines par le protéasome), les cellules autoréactives sont moins sujettes au stress du RE et se développent donc en périphérie, entraînant l'apparition de manifestations articulaires de type arthropathie avec hyperplasie synoviale (Yamasaki

et al., 2005). IRE1- α régule également le miR-17 qui est une cible du RIDD. Or miR-17 cible l'ARN de TXNIP, un activateur de l'inflammasome. D'après ce travail, la perte de fonction de IRE1- α (mutant perte de fonction ribonucléase N906A et kinase I642G) entrainerait une répression de TXNIP et une baisse d'activation de l'inflammasome (Lerner et al., 2012b). La perte de fonction RIDD de notre mutant R594C étant partielle, il serait intéressant de rechercher l'activité IL-1 β dans les cellules immunitaires des souris IRE1- α R594C. Mais il est également intéressant de noter que dans la famille à l'origine de ce travail de thèse, une mutation dans le gène *IRAK4* a été détectée. Or, *IRAK4* est une kinase directement impliquée dans la signalisation de l'IL-1 en aval de son récepteur. Un digénisme n'est pas à exclure dans la famille et une synergie d'action pourrait se produire dans le système immunitaire entre une mutation perturbant la voie de l'IL-1 β et la mutation perturbant la fonction ribonucléase de IRE1- α et donc la régulation de TXNIP.

Pour comprendre le mécanisme de rupture de tolérance observé (augmentation des auto-anticorps IgM et IgG) nous avons croisé la lignée IRE1- α R594C avec la lignée anti-ADN 56R. Dans cette lignée, le processus de tolérance centrale est incomplet. Ainsi, le suivi des populations de LB exprimant le BCR autoréactif est une indication de potentielle rupture de tolérance centrale. Toutefois, nous n'avons pas observé de différence d'expression du BCR autoréactif dans les souris R594C 56R hétérozygotes. L'analyse du modèle homozygote sera complémentaire mais ces résultats négatifs évoquent une rupture de tolérance ayant plutôt lieu en périphérie.

L'hypothèse d'une rupture de tolérance périphérique suggère que la perte de la fonction IRE1- α pourrait être un mécanisme indirect favorisant la survie des LB autoréactifs. En effet, les cellules autoréactives sont moins sujettes au stress métabolique et aux signaux inhibiteurs médiés par le système afin de les réguler (Kolhatkar et al., 2015). Nous avons ainsi mesuré l'expression des marqueurs d'activation sur les LB spléniques et ganglionnaires sans voir de modification. Cependant, l'analyse du répertoire des plasmocytes sécréteurs des anticorps dans notre modèle murin transgénique R594C a montré un biais partiel qui pourrait suggérer des perturbations de sélection des LB autoréactifs. Deux familles de gènes retrouvées augmentées dans les plasmocytes homozygotes (VH01-76 et VH05-04) ont été associées à des clones autoréactifs vis-à-vis des composants nucléaires dans une étude d'hybridomes autoréactifs murins (Detanico et al., 2015). Un autre modèle d'étude des mécanismes de tolérance pourrait être utilisé, tel que le croisement de notre modèle avec un modèle FAS KO (B6^{lpr/lpr}). En effet, l'absence de récepteur de mort cellulaire

Fas entraîne l'apparition de LB autoréactifs du fait d'un défaut de sélection de ces derniers. Le phénotype pourrait être plus sévère que dans le modèle 56R.

Le défaut de sécrétion d'IgM observé après 7 jours de stimulation ainsi que l'apparition à un âge avancé des modifications des populations de cellules immunitaires *in vivo* suggèrent un effet à long terme de la mutation R594C. Une stimulation chronique des cellules immunitaires serait nécessaire pour observer la rupture de tolérance. Un modèle d'infection par *Borrelia burgdorferi* a déjà été utilisé au laboratoire pour déclencher l'apparition d'une auto-immunité (Soulas et al., 2005). Il serait intéressant d'appliquer ce protocole à notre modèle murin transgénique. Nos collaborateurs en Belgique ont également testé l'infection des souris R594C par un adénovirus permettant la surexpression d'IFN- α selon un protocole développé par Sisirak *et al.* (Sisirak et al., 2016). Malheureusement, ce protocole n'a pas permis d'observer de manifestation auto-immune. Cependant, les souris injectées étaient jeunes (âgées de moins de 2 mois) ; ainsi il pourrait être intéressant de développer ce modèle dans les souris plus âgées présentant déjà la rupture partielle de tolérance attestée par l'augmentation de la production d'auto-anticorps.

Il est maintenant établi que les autres cellules immunitaires telles que les neutrophiles, les macrophages et les DC jouent un rôle essentiel dans la physiopathologie du lupus. L'inhibition de la synthèse de XBP1 (à l'aide d'un inhibiteur direct de la fonction ribonucléase de IRE1- α , le 4 μ 8C) dans un modèle murin d'auto-immunité (injection d'agoniste TLR7 R848) a permis de diminuer la quantité d'auto-anticorps (Sule et al., 2021). Il serait intéressant d'observer les fonctions et l'activité des neutrophiles dans notre modèle murin R594C. Les macrophages sont également des cibles intéressantes puisque IRE1- α joue directement un rôle d'activateur de la production d'IL-6, une cytokine proinflammatoire, par ces cellules (Martinon et al., 2010).

Conclusion et perspectives

Ce projet n'a pas permis de répondre définitivement à la question de savoir si la mutation perte de fonction IRE1- α R594C est capable d'entraîner le développement d'une auto-immunité. Nous avons décrit une mutation perte de fonction qui semble impacter faiblement l'homéostasie lymphocytaire à un âge avancé avec une dérégulation des populations de LB et de LT. Cette perturbation lymphocytaire s'accompagne de l'apparition d'auto-anticorps dans le sérum des souris IRE1- α adultes. Cette augmentation de la production d'auto-anticorps est associée à une

modification du répertoire des chaînes lourdes des immunoglobulines. Il n'est pas à exclure la possibilité d'un digénisme dans la famille à l'origine de l'étude et il serait intéressant d'associer notamment la deuxième mutation sélectionnée par le WES située dans le gène IRAK4. Ce gène étant important dans la régulation de l'inflammasome, il pourrait y avoir un effet cumulatif intéressant, activant la rupture de tolérance. De plus, le tableau clinique dans cette famille est très hétérogène. La rupture de tolérance globale observée dans notre modèle, associée au biais du répertoire VDJ, pourrait constituer une étape pré-clinique avant le déclenchement d'une auto-immunité symptomatique et nécessiterait un deuxième facteur qui pourrait être la mutation IRAK4 ou GMPS (cf. 7) ou un terrain génétique ou environnemental particulier à cette famille. La régulation négative de IRE1- α serait donc potentiellement un facilitateur d'une rupture de tolérance ; par conséquent l'utilisation de régulateurs de IRE1 α et de XBP1 pourrait présenter des risques d'effets secondaires dont la production paradoxale d'auto-anticorps.

Les modèles récemment décrits dans la littérature ont montré que l'absence ou la diminution de l'activité de IRE1- α ainsi que la baisse de XBP1 pouvaient être bénéfiques aux symptômes de la maladie lupique (Sule et al., 2021; Xiang et al., 2020; Zhang et al., 2021). Dans ces trois articles, la délétion génétique de XBP1 ou bien chimique via l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de IRE1- α diminue les symptômes auto-immuns (glomérulonéphrite, auto-anticorps) dans des modèles murins induits (pristane, injection d'un agoniste TLR7) ou spontanés (MRL/lpr). Les principales limites de ces trois études sont l'utilisation de modèles KO conditionnels, ce qui peut masquer une diminution de la fonction IRE1- α et de l'épissage dans l'ensemble des cellules de l'organisme. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs chimiques de IRE1- α peut induire des effets secondaires imprévus, tels qu'observés dans notre modèle dans lequel une réduction de l'activité de IRE1- α entraîne une rupture de tolérance globale, ce qui serait contre-productif pour le traitement. Bien que le modèle murin transgénique développé au cours de cette thèse ne présente pas de phénotype clinique du lupus, il semblerait que l'étude du rôle potentiel que peuvent jouer IRE1- α , XBP1 et l'UPR de manière générale dans le développement d'une auto-immunité réserve encore de nombreux points d'interrogations et nécessitera la mise en œuvre de recherches futures pour tenter d'y répondre.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdolmaleki, F., Farahani, N., Gheibi Hayat, S.M., Pirro, M., Bianconi, V., Barreto, G.E., and Sahebkar, A. (2018). The Role of Efferocytosis in Autoimmune Diseases. *Front Immunol* 9, 1645. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01645>.
- Abdullah, A., and Ravanan, P. (2018). The unknown face of IRE1 α – Beyond ER stress. *European Journal of Cell Biology* <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2018.05.002>.
- Ablin, J., Verbovetski, I., Trahtemberg, U., Metzger, S., and Mevorach, D. (2005). Quinidine and procainamide inhibit murine macrophage uptake of apoptotic and necrotic cells: a novel contributing mechanism of drug-induced-lupus. *Apoptosis* 10, 1009–1018. <https://doi.org/10.1007/s10495-005-1189-4>.
- Acosta-Alvear, D., Karagöz, G.E., Fröhlich, F., Li, H., Walther, T.C., and Walter, P. (2018). The unfolded protein response and endoplasmic reticulum protein targeting machineries converge on the stress sensor IRE1. *Elife* 7, e43036. <https://doi.org/10.7554/eLife.43036>.
- Adrianto, I., Wen, F., Templeton, A., Wiley, G., King, J.B., Lessard, C.J., Bates, J.S., Hu, Y., Kelly, J.A., Kaufman, K.M., et al. (2011). Association of a functional variant downstream of TNFAIP3 with systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* 43, 253–258. <https://doi.org/10.1038/ng.766>.
- Alarcón-Segovia, D., Alarcón-Riquelme, M.E., Cardiel, M.H., Caeiro, F., Massardo, L., Villa, A.R., Pons-Estel, B.A., and on behalf of the Grupo Latinoamericano de Estudio del Lupus Eritematoso (GLADEL) (2005). Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort. *Arthritis & Rheumatism* 52, 1138–1147. <https://doi.org/10.1002/art.20999>.
- Al-Maini, M.H., El-Ageb, E.M., Al-Wahaibi, S.S., Al-Farsi, Y., and Richens, E.R. (2003). Demographic, autoimmune, and clinical profiles of patients with systemic lupus erythematosus in Oman. *Rheumatol. Int.* 23, 186–191. <https://doi.org/10.1007/s00296-003-0303-6>.
- Al-Mayouf, S.M., Sunker, A., Abdwani, R., Arawi, S.A., Almurshedi, F., Alhashmi, N., Al Sonbul, A., Sewairi, W., Qari, A., Abdallah, E., et al. (2011). Loss-of-function variant in DNASE1L3 causes a familial form of systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* 43, 1186–1188. <https://doi.org/10.1038/ng.975>.
- Alonso, M.D., Llorca, J., Martinez-Vazquez, F., Miranda-Filloo, J.A., Diaz de Teran, T., Dierssen, T., Vazquez-Rodriguez, T.R., Gomez-Acebo, I., Blanco, R., and Gonzalez-Gay, M.A. (2011). Systemic lupus erythematosus in northwestern Spain: a 20-year epidemiologic study. *Medicine (Baltimore)* 90, 350–358. <https://doi.org/10.1097/MD.0b013e31822edf7f>.
- van Anken, E., Orsi, A., and Sitia, R. (2014). A RIDDLE solved: Why an intact IRE1 α /XBP-1 signaling relay is key for humoral immune responses. *Eur. J. Immunol.* 44, 641–645. <https://doi.org/10.1002/eji.201444461>.
- van Anken, E., Bakunts, A., Hu, C.-C.A., Janssens, S., and Sitia, R. (2021). Molecular Evaluation of Endoplasmic Reticulum Homeostasis Meets Humoral Immunity. *Trends Cell Biol* 31, 529–541. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.02.004>.
- Aplin, B.D., Keech, C.L., Kauwe, A.L. de, Gordon, T.P., Cavill, D., and McCluskey, J. (2003). Tolerance through Indifference: Autoreactive B Cells to the Nuclear Antigen La Show No Evidence of Tolerance

in a Transgenic Model. *The Journal of Immunology* 171, 5890–5900. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.11.5890>.

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. *Annals of the Rheumatic Diseases* 78, 1151–1159. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-214819>.

Arshad, M., Ye, Z., Gu, X., Wong, C.K., Liu, Y., Li, D., Zhou, L., Zhang, Y., Bay, W.P., Yu, V.C., et al. (2013). RNF13, a RING Finger Protein, Mediates Endoplasmic Reticulum Stress-induced Apoptosis through the Inositol-requiring Enzyme (IRE1 α)/c-Jun NH2-terminal Kinase Pathway*. *Journal of Biological Chemistry* 288, 8726–8736. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.368829>.

Ballesteros-Tato, A., and Papillion, A. (2019). Mechanisms of action of low-dose IL-2 restoration therapies in SLE. *Current Opinion in Immunology* 61, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.07.003>.

Balluz, L., Philen, R., Ortega, L., Rosales, C., Brock, J., Barr, D., and Kieszak, S. (2001). Investigation of systemic lupus erythematosus in Nogales, Arizona. *Am. J. Epidemiol.* 154, 1029–1036. .

Barber, M.R.W., Drenkard, C., Falasinnu, T., Hoi, A., Mak, A., Kow, N.Y., Svenungsson, E., Peterson, J., Clarke, A.E., and Ramsey-Goldman, R. (2021). Global epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol* 17, 515–532. <https://doi.org/10.1038/s41584-021-00668-1>.

Barbhaiya, M., and Costenbader, K.H. (2014). Ultraviolet radiation and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 23, 588–595. <https://doi.org/10.1177/0961203314530488>.

Bartoszewski, R., Brewer, J.W., Rab, A., Crossman, D.K., Bartoszevska, S., Kapoor, N., Fuller, C., Collawn, J.F., and Bebok, Z. (2011). The Unfolded Protein Response (UPR)-activated Transcription Factor X-box-binding Protein 1 (XBP1) Induces MicroRNA-346 Expression That Targets the Human Antigen Peptide Transporter 1 (TAP1) mRNA and Governs Immune Regulatory Genes*. *Journal of Biological Chemistry* 286, 41862–41870. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.304956>.

Bashir, S., Bandy, M., Qadri, O., Bashir, A., Hilal, N., Nida-I-Fatima, null, Rader, S., and Fazili, K.M. (2020). The molecular mechanism and functional diversity of UPR signaling sensor IRE1. *Life Sci* 118740. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118740>.

Beese, C.J., Brynjólfssdóttir, S.H., and Frankel, L.B. (2020). Selective Autophagy of the Protein Homeostasis Machinery: Ribophagy, Proteaphagy and ER-Phagy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7. .

Beisel, C., Ziegler, S., Martrus Zapater, G., Chapel, A., Griesbeck, M., Hildebrandt, H., Lohse, A.W., and Altfeld, M. (2017). TLR7-mediated activation of XBP1 correlates with the IFN α production in humans. *Cytokine* 94, 55–58. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.04.006>.

Belot, A., Kasher, P.R., Trotter, E.W., Foray, A.-P., Debaud, A.-L., Rice, G.I., Szykiewicz, M., Zobot, M.-T., Rouvet, I., Bhaskar, S.S., et al. (2013). Protein kinase c δ deficiency causes mendelian systemic lupus

erythematosus with B cell-defective apoptosis and hyperproliferation. *Arthritis Rheum.* *65*, 2161–2171. <https://doi.org/10.1002/art.38008>.

Benagiano, G., Benagiano, M., Bianchi, P., D’Elios, M.M., and Brosens, I. (2019). Contraception in autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* *60*, 111–123. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2019.05.003>.

Bengtsson, A.A., and Rönnblom, L. (2017). Role of interferons in SLE. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* *31*, 415–428. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2017.10.003>.

Benhamron, S., Hadar, R., Iwawaky, T., So, J.-S., Lee, A.-H., and Tirosh, B. (2014). Regulated IRE1-dependent decay participates in curtailing immunoglobulin secretion from plasma cells. *Eur. J. Immunol.* *44*, 867–876. <https://doi.org/10.1002/eji.201343953>.

Bennett, L., Palucka, A.K., Arce, E., Cantrell, V., Borvak, J., Banchereau, J., and Pascual, V. (2003). Interferon and Granulopoiesis Signatures in Systemic Lupus Erythematosus Blood. *Journal of Experimental Medicine* *197*, 711–723. <https://doi.org/10.1084/jem.20021553>.

Bertolotti, A., Wang, X., Novoa, I., Jungreis, R., Schlessinger, K., Cho, J.H., West, A.B., and Ron, D. (2001). Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1beta-deficient mice. *J Clin Invest* *107*, 585–593. <https://doi.org/10.1172/JCI11476>.

Bettigole, S.E., Lis, R., Adoro, S., Lee, A.-H., Spencer, L.A., Weller, P.F., and Glimcher, L.H. (2015). The transcription factor XBP1 is selectively required for eosinophil differentiation. *Nature Immunology* *16*, 829–837. <https://doi.org/10.1038/ni.3225>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.009>.

Bonasia, C.G., Abdulahad, W.H., Rutgers, A., Heeringa, P., and Bos, N.A. (2021). B Cell Activation and Escape of Tolerance Checkpoints: Recent Insights from Studying Autoreactive B Cells. *Cells* *10*, 1190. <https://doi.org/10.3390/cells10051190>.

Borchers, A.T., Keen, C.L., and Gershwin, M.E. (2007). Drug-induced lupus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1108*, 166–182. .

Bouis, D., Kirstetter, P., Arbogast, F., Lamon, D., Delgado, V., Jung, S., Ebel, C., Jacobs, H., Knapp, A.-M., Jeremiah, N., et al. (2019). Severe combined immunodeficiency in stimulator of interferon genes (STING) V154M/wild-type mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* *143*, 712-725.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.04.034>.

Brown, G.J., Cañete, P.F., Wang, H., Medhavy, A., Bones, J., Roco, J.A., He, Y., Qin, Y., Cappello, J., Ellyard, J.I., et al. (2022). TLR7 gain-of-function genetic variation causes human lupus. *Nature* <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04642-z>.

Brozzi, F., Gerlo, S., Grieco, F.A., Nardelli, T.R., Lievens, S., Gysemans, C., Marselli, L., Marchetti, P., Mathieu, C., Tavernier, J., et al. (2014). A Combined “Omics” Approach Identifies N-Myc Interactor as

a Novel Cytokine-induced Regulator of IRE1 α Protein and c-Jun N-terminal Kinase in Pancreatic Beta Cells*. *Journal of Biological Chemistry* 289, 20677–20693. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.568808>.

Brucklacher-Waldert, V., Ferreira, C., Stebegg, M., Fesneau, O., Innocentin, S., Marie, J.C., and Veldhoen, M. (2017). Cellular Stress in the Context of an Inflammatory Environment Supports TGF- β -Independent T Helper-17 Differentiation. *Cell Reports* 19, 2357–2370. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.052>.

Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., and Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415, 92–96. <https://doi.org/10.1038/415092a>.

Cancro, M.P. (2020). Age-Associated B Cells. *Annu Rev Immunol* 38, 315–340. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-092419-031130>.

Carrara, M., Prischi, F., Nowak, P.R., Kopp, M.C., and Ali, M.M. (2015). Noncanonical binding of BiP ATPase domain to Ire1 and Perk is dissociated by unfolded protein CH1 to initiate ER stress signaling. *ELife* 4, e03522. <https://doi.org/10.7554/eLife.03522>.

Cervera, R., Khamashta, M.A., and Hughes, G.R.V. (2009). The Euro-lupus project: epidemiology of systemic lupus erythematosus in Europe. *Lupus* 18, 869–874. <https://doi.org/10.1177/0961203309106831>.

Cervera, R., Doria, A., Amoura, Z., Khamashta, M., Schneider, M., Guillemin, F., Maurel, F., Garofano, A., Roset, M., Perna, A., et al. (2014). Patterns of systemic lupus erythematosus expression in Europe. *Autoimmunity Reviews* 13, 621–629. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.11.007>.

Chi, X., Li, Y., and Qiu, X. (2020). V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation. *Immunology* 160, 233–247. <https://doi.org/10.1111/imm.13176>.

Choi, M.Y., Flood, K., Bernatsky, S., Ramsey-Goldman, R., and Clarke, A.E. (2017). A review on SLE and malignancy. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 31, 373–396. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2017.09.013>.

Chu, R.S., McCool, T., Greenspan, N.S., Schreiber, J.R., and Harding, C.V. (2000). CpG Oligodeoxynucleotides Act as Adjuvants for Pneumococcal Polysaccharide-Protein Conjugate Vaccines and Enhance Antipolysaccharide Immunoglobulin G2a (IgG2a) and IgG3 Antibodies. *Infect Immun* 68, 1450–1456. .

Colangelo, K., Haig, S., Bonner, A., Zelenietz, C., and Pope, J. (2011). Self-reported flaring varies during the menstrual cycle in systemic lupus erythematosus compared with rheumatoid arthritis and fibromyalgia. *Rheumatology (Oxford)* 50, 703–708. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq360>.

Colbert, R.A., Tran, T.M., and Layh-Schmitt, G. (2014). HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis. *Molecular Immunology* 57, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.07.013>.

Cooper, G.S., and Stroehla, B.C. (2003). The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews* 2, 119–125. [https://doi.org/10.1016/S1568-9972\(03\)00006-5](https://doi.org/10.1016/S1568-9972(03)00006-5).

- Cooper, G.S., Bynum, M.L.K., and Somers, E.C. (2009). Recent Insights in the Epidemiology of Autoimmune Diseases: Improved Prevalence Estimates and Understanding of Clustering of Diseases. *Journal of Autoimmunity* 33, 197. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.09.008>.
- Cooper, G.S., Wither, J., Bernatsky, S., Claudio, J.O., Clarke, A., Rioux, J.D., CaNIOS GenES Investigators, and Fortin, P.R. (2010). Occupational and environmental exposures and risk of systemic lupus erythematosus: silica, sunlight, solvents. *Rheumatology (Oxford)* 49, 2172–2180. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq214>.
- Corrigall, V.M., Bodman-Smith, M.D., Fife, M.S., Canas, B., Myers, L.K., Wooley, P.H., Soh, C., Staines, N.A., Pappin, D.J.C., Berlo, S.E., et al. (2001). The Human Endoplasmic Reticulum Molecular Chaperone BiP Is an Autoantigen for Rheumatoid Arthritis and Prevents the Induction of Experimental Arthritis. *The Journal of Immunology* 166, 1492–1498. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.3.1492>.
- Costa-Reis, P., and Sullivan, K.E. (2017). Monogenic lupus: it's all new! *Current Opinion in Immunology* 49, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.10.008>.
- Costenbader, K.H., Feskanich, D., Stampfer, M.J., and Karlson, E.W. (2007). Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. *Arthritis Rheum.* 56, 1251–1262. <https://doi.org/10.1002/art.22510>.
- Cox, J.S., and Walter, P. (1996). A Novel Mechanism for Regulating Activity of a Transcription Factor That Controls the Unfolded Protein Response. *Cell* 87, 391–404. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81360-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81360-4).
- Cox, J.S., Shamu, C.E., and Walter, P. (1993). Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* 73, 1197–1206. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90648-a](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90648-a).
- Crispín, J.C., Liossis, S.-N.C., Kis-Toth, K., Lieberman, L.A., Kyttaris, V.C., Juang, Y.-T., and Tsokos, G.C. (2010). Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends in Molecular Medicine* 16, 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.12.005>.
- Crow, M.K. (2014). Advances in understanding the role of type I interferons in systemic lupus erythematosus. *Current Opinion in Rheumatology* 26, 467–474. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000087>.
- Crow, Y.J., and Manel, N. (2015). Aicardi–Goutières syndrome and the type I interferonopathies. *Nature Reviews Immunology* 15, nri3850. <https://doi.org/10.1038/nri3850>.
- Crow, Y.J., Chase, D.S., Lowenstein Schmidt, J., Szykiewicz, M., Forte, G.M.A., Gornall, H.L., Ojageer, A., Anderson, B., Pizzino, A., Helman, G., et al. (2015). Characterization of human disease phenotypes associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, ADAR, and IFIH1. *Am. J. Med. Genet. A* 167A, 296–312. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36887>.
- Cuda, C.M., Pope, R.M., and Perlman, H. (2016). The inflammatory role of phagocyte apoptotic pathways in rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology* 12, 543–558. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.132>.

- Danza, A., and Ruiz-Irastorza, G. (2013). Infection risk in systemic lupus erythematosus patients: susceptibility factors and preventive strategies. *Lupus* 22, 1286–1294. <https://doi.org/10.1177/0961203313493032>.
- Darling, N.J., and Cook, S.J. (2014). The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843, 2150–2163. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.01.009>.
- Das, A., Heesters, B.A., Bialas, A., O'Flynn, J., Rifkin, I.R., Ochando, J., Mittereder, N., Carlesso, G., Herbst, R., and Carroll, M.C. (2017). Follicular Dendritic Cell Activation by TLR Ligands Promotes Autoreactive B Cell Responses. *Immunity* 46, 106–119. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.12.014>.
- Davis-Porada, J., Kim, M.Y., Guerra, M.M., Laskin, C.A., Petri, M., Lockshin, M.D., Sammaritano, L.R., Branch, D.W., Sawitzke, A., Merrill, J.T., et al. (2020). Low frequency of flares during pregnancy and post-partum in stable lupus patients. *Arthritis Res. Ther.* 22, 52. <https://doi.org/10.1186/s13075-020-2139-9>.
- Deng, Y., and Tsao, B.P. (2014). Advances in lupus genetics and epigenetics. *Curr Opin Rheumatol* 26, 482–492. <https://doi.org/10.1097/BOR.000000000000086>.
- Deng, C., Lu, Q., Zhang, Z., Rao, T., Attwood, J., Yung, R., and Richardson, B. (2003). Hydralazine may induce autoimmunity by inhibiting extracellular signal-regulated kinase pathway signaling. *Arthritis Rheum.* 48, 746–756. <https://doi.org/10.1002/art.10833>.
- Detanico, T., Guo, W., and Wysocki, L.J. (2015). Predominant role for activation-induced cytidine deaminase in generating IgG anti-nucleosomal antibodies of murine SLE. *J Autoimmun* 58, 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.01.006>.
- Dong, H., Adams, N.M., Xu, Y., Cao, J., Allan, D.S.J., Carlyle, J.R., Chen, X., Sun, J.C., and Glimcher, L.H. (2019). The IRE1 endoplasmic reticulum stress sensor activates natural killer cell immunity in part by regulating c-Myc. *Nature Immunology* 20, 865. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0388-z>.
- Durán, S., Apte, M., Alarcón, G.S., and LUMINA Study Group (2007). Poverty, not ethnicity, accounts for the differential mortality rates among lupus patients of various ethnic groups. *J Natl Med Assoc* 99, 1196–1198. .
- Eckard, S.C., Rice, G.I., Fabre, A., Badens, C., Gray, E.E., Hartley, J.L., Crow, Y.J., and Stetson, D.B. (2014). The SKIV2L RNA exosome limits activation of the RIG-I-like receptors. *Nat Immunol* 15, 839–845. <https://doi.org/10.1038/ni.2948>.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.
- Eudy, A.M., Siega-Riz, A.M., Engel, S.M., Franceschini, N., Howard, A.G., Clowse, M.E.B., and Petri, M. (2018). Effect of pregnancy on disease flares in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 77, 855–860. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-212535>.

- Farkas, L., Beiske, K., Lund-Johansen, F., Brandtzaeg, P., and Jahnsen, F.L. (2001). Plasmacytoid Dendritic Cells (Natural Interferon- α/β -Producing Cells) Accumulate in Cutaneous Lupus Erythematosus Lesions. *The American Journal of Pathology* 159, 237–243. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61689-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61689-6).
- Farrugia, M., and Baron, B. (2017). The Role of Toll-Like Receptors in Autoimmune Diseases through Failure of the Self-Recognition Mechanism. *Int J Inflam* 2017, 8391230. <https://doi.org/10.1155/2017/8391230>.
- Fereidan-Esfahani, M., Nayfeh, T., Warrington, A., Howe, C.L., and Rodriguez, M. (2019). IgM Natural Autoantibodies in Physiology and the Treatment of Disease. *Methods Mol Biol* 1904, 53–81. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8958-4_3.
- Fillatreau, S., Manfroi, B., and Dörner, T. (2021). Toll-like receptor signalling in B cells during systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol* 17, 98–108. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-00544-4>.
- Fink, E.E., Moparthy, S., Bagati, A., Bianchi-Smiraglia, A., Lipchick, B.C., Wolff, D.W., Roll, M.V., Wang, J., Liu, S., Bakin, A.V., et al. (2018). XBP1-KLF9 Axis Acts as a Molecular Rheostat to Control the Transition from Adaptive to Cytotoxic Unfolded Protein Response. *Cell Reports* 25, 212-223.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.013>.
- Fors Nieves, C.E., and Izmirly, P.M. (2016). Mortality in Systemic Lupus Erythematosus: an Updated Review. *Curr Rheumatol Rep* 18, 21. <https://doi.org/10.1007/s11926-016-0571-2>.
- Fortuna, G., and Brennan, M.T. (2013). Systemic lupus erythematosus: epidemiology, pathophysiology, manifestations, and management. *Dent. Clin. North Am.* 57, 631–655. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2013.06.003>.
- Fournié, G.J., Lambert, P.H., and Meischer, P.A. (1974). Release of DNA in circulating blood and induction of anti-DNA antibodies after injection of bacterial lipopolysaccharides. *J Exp Med* 140, 1189–1206. <https://doi.org/10.1084/jem.140.5.1189>.
- Freitas, E.C., de Oliveira, M.S., and Monticelo, O.A. (2017). Pristane-induced lupus: considerations on this experimental model. *Clin. Rheumatol.* 36, 2403–2414. <https://doi.org/10.1007/s10067-017-3811-6>.
- Gaedigk, A., Freeman, N., Hartshorne, T., Riffel, A.K., Irwin, D., Bishop, J.R., Stein, M.A., Newcorn, J.H., Jaime, L.K.M., Cherner, M., et al. (2015). SNP genotyping using TaqMan® technology: the CYP2D6*17 assay conundrum. *Sci Rep* 5, 9257. <https://doi.org/10.1038/srep09257>.
- Gao, B., Lee, S.-M., Chen, A., Zhang, J., Zhang, D.D., Kannan, K., Ortmann, R.A., and Fang, D. (2008). Synoviolin promotes IRE1 ubiquitination and degradation in synovial fibroblasts from mice with collagen-induced arthritis. *EMBO Rep* 9, 480–485. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.37>.
- Gass, J.N., Gifford, N.M., and Brewer, J.W. (2002). Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells. *J Biol Chem* 277, 49047–49054. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205011200>.

- Gass, J.N., Jiang, H.-Y., Wek, R.C., and Brewer, J.W. (2008). The Unfolded Protein Response of B-Lymphocytes: PERK-independent Development of Antibody-Secreting Cells. *Mol Immunol* 45, 1035–1043. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.07.029>.
- Gensous, N., Schmitt, N., Richez, C., Ueno, H., and Blanco, P. (2017a). T follicular helper cells, interleukin-21 and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 56, 516–523. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kew297>.
- Gensous, N., Doassans-Comby, L., Lazaro, E., and Duffau, P. (2017b). Lupus érythémateux systémique et contraception : revue systématique de la littérature. *La Revue de Médecine Interne* 38, 358–367. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2016.12.009>.
- Georgakis, S., Gkirtzimanaki, K., Papadaki, G., Gakiopoulou, H., Drakos, E., Eloranta, M.-L., Makridakis, M., Kontostathi, G., Zoidakis, J., Baira, E., et al. (2021). NETs decorated with bioactive IL-33 infiltrate inflamed tissues and induce IFN- α production in patients with SLE. *JCI Insight* 6, e147671. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.147671>.
- Ghosh, R., Wang, L., Wang, E.S., Perera, B.G.K., Igarria, A., Morita, S., Prado, K., Thamsen, M., Caswell, D., Macias, H., et al. (2014). Allosteric inhibition of the IRE1 α RNase preserves cell viability and function during endoplasmic reticulum stress. *Cell* 158, 534–548. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.002>.
- Gies, V., Wagner, A., Seifert, C., Guffroy, A., Fauny, J.-D., Knapp, A.-M., Pasquali, J.-L., Martin, T., Dumortier, H., Korganow, A.-S., et al. (2017a). Identification of autoreactive B cells with labeled nucleosomes. *Scientific Reports* 7, 602. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00664-0>.
- Gies, V., Bouis, D., Martin, M., Pasquali, J.-L., Martin, T., Korganow, A.-S., and Soulas-Sprauel, P. (2017b). Phenotyping of autoreactive B cells with labeled nucleosomes in 56R transgenic mice. *Sci Rep* 7, 13232. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13422-z>.
- Goodnow, C.C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B., and Vinuesa, C.G. (2005). Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 435, 590–597. <https://doi.org/10.1038/nature03724>.
- Gordon, S., and Plüddemann, A. (2018). Macrophage Clearance of Apoptotic Cells: A Critical Assessment. *Front Immunol* 9, 127. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00127>.
- Graham, R.R., Cotsapas, C., Davies, L., Hackett, R., Lessard, C.J., Leon, J.M., Burtt, N.P., Guiducci, C., Parkin, M., Gates, C., et al. (2008). Genetic variants near TNFAIP3 on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* 40, 1059–1061. <https://doi.org/10.1038/ng.200>.
- Gravano, D.M., and Hoyer, K.K. (2013). Promotion and prevention of autoimmune disease by CD8+ T cells. *Journal of Autoimmunity* 45, 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.06.004>.
- Greenspan, N.S., Lu, M.A., Shipley, J.W., Ding, X., Li, Q., Sultana, D., Kollaros, M., Schreiber, J.R., Fu, P., Putterman, C., et al. (2012). IgG3 deficiency extends lifespan and attenuates progression of glomerulonephritis in MRL/lpr mice. *Biology Direct* 7, 3. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-7-3>.

Grennan, D.M., Parfitt, A., Manolios, N., Huang, Q., Hyland, V., Dunckley, H., Doran, T., Gatenby, P., and Badcock, C. (1997). Family and twin studies in systemic lupus erythematosus. *Dis. Markers* *13*, 93–98. .

Grootjans, J., Kaser, A., Kaufman, R.J., and Blumberg, R.S. (2016). The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* *16*, 469–484. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.62>.

Gros, F., Fournel, S., Liégeois, S., Richard, D., and Soulas-Sprauel, P. (2018). *Atlas d'immunologie: De la détection du danger à l'immunothérapie* (Dunod).

Gross, A.J., Hochberg, D., Rand, W.M., and Thorley-Lawson, D.A. (2005). EBV and systemic lupus erythematosus: a new perspective. *J. Immunol.* *174*, 6599–6607. .

Guéry, J.-C. (2019). Why Is Systemic Lupus Erythematosus More Common in Women? *Joint Bone Spine* *86*, 297–299. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2018.12.004>.

Guo, G., Meng, Y., Tan, W., Xia, Y., Cheng, C., Chen, X., and Gu, Z. (2015). Induction of Apoptosis Coupled to Endoplasmic Reticulum Stress through Regulation of CHOP and JNK in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol Res* *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/183738>.

Guttman, O., Le Thomas, A., Marsters, S., Lawrence, D.A., Gutgesell, L., Zuazo-Gatzelu, I., Harnoss, J.M., Haag, S.M., Murthy, A., Strasser, G., et al. (2022). Antigen-derived peptides engage the ER stress sensor IRE1 α to curb dendritic cell cross-presentation. *J Cell Biol* *221*, e202111068. <https://doi.org/10.1083/jcb.202111068>.

Halbleib, K., Pesek, K., Covino, R., Hofbauer, H.F., Wunnicke, D., Hänel, I., Hummer, G., and Ernst, R. (2017). Activation of the Unfolded Protein Response by Lipid Bilayer Stress. *Molecular Cell* *67*, 673-684.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.012>.

Han, D., Lerner, A.G., Vande Walle, L., Upton, J.-P., Xu, W., Hagen, A., Backes, B.J., Oakes, S.A., and Papa, F.R. (2009). IRE1 α kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell* *138*, 562–575. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.017>.

Harding, H.P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., and Ron, D. (2000). Perk Is Essential for Translational Regulation and Cell Survival during the Unfolded Protein Response. *Molecular Cell* *5*, 897–904. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80330-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80330-5).

Harley, J.B., and James, J.A. (2010). Everyone comes from somewhere: systemic lupus erythematosus and Epstein-Barr virus induction of host interferon and humoral anti-Epstein-Barr nuclear antigen 1 immunity. *Arthritis Rheum.* *62*, 1571–1575. <https://doi.org/10.1002/art.27421>.

Harley, J.B., Kelly, J.A., and Kaufman, K.M. (2006). Unraveling the genetics of systemic lupus erythematosus. *Springer Semin. Immunopathol.* *28*, 119–130. <https://doi.org/10.1007/s00281-006-0040-5>.

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. *Nature Medicine* *22*, 991–993. <https://doi.org/10.1038/nm.4148>.

- Hebert, D.N., and Molinari, M. (2007). In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev* 87, 1377–1408. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2006>.
- Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 89–102. <https://doi.org/10.1038/nrm3270>.
- Hetz, C., and Papa, F.R. (2018). The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Molecular Cell* 69, 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.017>.
- Hetz, C., Chevet, E., and Oakes, S.A. (2015). Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat. Cell Biol.* 17, 829–838. <https://doi.org/10.1038/ncb3184>.
- Hetz, C., Zhang, K., and Kaufman, R.J. (2020). Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 421–438. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0250-z>.
- Hilligan, K.L., and Ronchese, F. (2020). Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4+ T helper cell responses. *Cellular & Molecular Immunology* 17, 587–599. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0465-0>.
- Hollien, J., Lin, J.H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., and Weissman, J.S. (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 186, 323–331. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903014>.
- Hu, C.-C.A., Dougan, S.K., McGehee, A.M., Love, J.C., and Ploegh, H.L. (2009). XBP-1 regulates signal transduction, transcription factors and bone marrow colonization in B cells. *EMBO J* 28, 1624–1636. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.117>.
- Hu, F., Yu, X., Wang, H., Zuo, D., Guo, C., Yi, H., Tirosh, B., Subjeck, J.R., Qiu, X., and Wang, X.-Y. (2011). ER stress and its regulator X-box-binding protein-1 enhance polyIC-induced innate immune response in dendritic cells. *Eur J Immunol* 41, 1086–1097. <https://doi.org/10.1002/eji.201040831>.
- Hu, R., Chen, Z.-F., Yan, J., Li, Q.-F., Huang, Y., Xu, H., Zhang, X.-P., and Jiang, H. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress of Neutrophils Is Required for Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Lung Injury. *The Journal of Immunology* 195, 4802–4809. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500073>.
- Humrich, J.Y., von Spee-Mayer, C., Siegert, E., Alexander, T., Hiepe, F., Radbruch, A., Burmester, G.-R., and Riemekasten, G. (2015). Rapid induction of clinical remission by low-dose interleukin-2 in a patient with refractory SLE. *Ann. Rheum. Dis.* 74, 791–792. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206506>.
- Illescas-Montes, R., Corona-Castro, C.C., Melguizo-Rodríguez, L., Ruiz, C., and Costela-Ruiz, V.J. (2019). Infectious processes and systemic lupus erythematosus. *Immunology* 158, 153–160. <https://doi.org/10.1111/imm.13103>.
- Ingvarsson, R.F., Bengtsson, A.A., and Jönsen, A. (2016). Variations in the epidemiology of systemic lupus erythematosus in southern Sweden. *Lupus* 25, 772–780. <https://doi.org/10.1177/0961203316635288>.

- Islam, M.A., Khandker, S.S., Alam, S.S., Kotyla, P., and Hassan, R. (2019). Vitamin D status in patients with systemic lupus erythematosus (SLE): A systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* 18, 102392. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102392>.
- Ito, T., Wang, Y.-H., Duramad, O., Hanabuchi, S., Perng, O.A., Gilliet, M., Qin, F.X.-F., and Liu, Y.-J. (2006). OX40 ligand shuts down IL-10-producing regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 13138–13143. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603107103>.
- Iwakoshi, N.N., Lee, A.-H., Vallabhajosyula, P., Otipoby, K.L., Rajewsky, K., and Glimcher, L.H. (2003). Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nat. Immunol.* 4, 321–329. <https://doi.org/10.1038/ni907>.
- Iwakoshi, N.N., Pypaert, M., and Glimcher, L.H. (2007). The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *J Exp Med* 204, 2267–2275. <https://doi.org/10.1084/jem.20070525>.
- Iwamoto, T., Dorschner, J.M., Selvaraj, S., Mezzano, V., Jensen, M.A., Vsetecka, D., Amin, S., Makol, A., Osborn, T., Moder, K., et al. (2022). High Systemic Type I Interferon Activity Is Associated With Active Class III/IV Lupus Nephritis. *J Rheumatol* 49, 388–397. <https://doi.org/10.3899/jrheum.210391>.
- Iwata, S., and Tanaka, Y. (2016). B-cell subsets, signaling and their roles in secretion of autoantibodies. *Lupus* 25, 850–856. <https://doi.org/10.1177/0961203316643172>.
- Iwawaki, T., Kohno, K., and Miura, M. (2004). Transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress in vivo. *Nat Med* 10, 1014–1014. <https://doi.org/10.1038/nm1004-1014>.
- Izui, S., Zaldivar, N.M., Scher, I., and Lambert, P.H. (1977). Mechanism for induction of anti-DNA antibodies by bacterial lipopolysaccharides in mice. I. Anti-DNA induction by LPS without significant release of DNA in circulating blood. *J Immunol* 119, 2151–2156. .
- Jiang, M., Li, X., Zhang, J., Lu, Y., Shi, Y., Zhu, C., Liu, Y., Qin, B., Luo, Z., Du, Y., et al. (2021). Dual Inhibition of Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidation Stress Manipulates the Polarization of Macrophages under Hypoxia to Sensitize Immunotherapy. *ACS Nano* 15, 14522–14534. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04068>.
- Jiang, S.H., Athanasopoulos, V., Ellyard, J.I., Chuah, A., Cappello, J., Cook, A., Prabhu, S.B., Cardenas, J., Gu, J., Stanley, M., et al. (2019). Functional rare and low frequency variants in BLK and BANK1 contribute to human lupus. *Nat Commun* 10, 2201. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10242-9>.
- Jones, D.R., Hopkinson, N.D., and Powell, R.J. (1992). Autoantibodies in pet dogs owned by patients with systemic lupus erythematosus. *Lancet* 339, 1378–1380. .
- Junjappa, R.P., Patil, P., Bhattarai, K.R., Kim, H.-R., and Chae, H.-J. (2018). IRE1 α Implications in Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Development and Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01289>.
- Kamimura, D., and Bevan, M.J. (2008). Endoplasmic Reticulum Stress Regulator XBP-1 Contributes to Effector CD8 $^{+}$ T Cell Differentiation during Acute Infection. *J Immunol* 181, 5433–5441. .

- Kang, S., Narazaki, M., Metwally, H., and Kishimoto, T. (2020). Historical overview of the interleukin-6 family cytokine. *Journal of Experimental Medicine* 217, e20190347. <https://doi.org/10.1084/jem.20190347>.
- Karagöz, G.E., Acosta-Alvear, D., Nguyen, H.T., Lee, C.P., Chu, F., and Walter, P. (2017). An unfolded protein-induced conformational switch activates mammalian IRE1. *ELife Sciences* 6, e30700. <https://doi.org/10.7554/eLife.30700>.
- Kariuki, S.N., Crow, M.K., and Niewold, T.B. (2008). The PTPN22 C1858T polymorphism is associated with skewing of cytokine profiles toward high interferon- α activity and low tumor necrosis factor α levels in patients with lupus. *Arthritis & Rheumatism* 58, 2818–2823. <https://doi.org/10.1002/art.23728>.
- Katsuyama, T., Tsokos, G.C., and Moulton, V.R. (2018). Aberrant T Cell Signaling and Subsets in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol* 9, 1088. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01088>.
- Kaufman, K.M., Zhao, J., Kelly, J.A., Hughes, T., Adler, A., Sanchez, E., Ojwang, J.O., Langefeld, C.D., Ziegler, J.T., Williams, A.H., et al. (2013). Fine mapping of Xq28: both MECP2 and IRAK1 contribute to risk for systemic lupus erythematosus in multiple ancestral groups. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 437–444. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-201851>.
- Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11, 373–384. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>.
- Keestra-Gounder, A.M., Byndloss, M.X., Seyffert, N., Young, B.M., Chávez-Arroyo, A., Tsai, A.Y., Cevallos, S.A., Winter, M.G., Pham, O.H., Tiffany, C.R., et al. (2016). NOD1 and NOD2 signalling links ER stress with inflammation. *Nature* 532, 394–397. <https://doi.org/10.1038/nature17631>.
- Kemp, K.L., Lin, Z., Zhao, F., Gao, B., Song, J., Zhang, K., and Fang, D. (2013). The serine-threonine kinase inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α) promotes IL-4 production in T helper cells. *J Biol Chem* 288, 33272–33282. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.493171>.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257. .
- Kim, S.J., and Diamond, B. (2015). Modulation of tolerogenic dendritic cells and autoimmunity. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 41, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.04.020>.
- Klein, R.S., Sayre, R.M., Dowdy, J.C., and Werth, V.P. (2009). The risk of ultraviolet radiation exposure from indoor lamps in lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 8, 320–324. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2008.10.003>.
- Ko, K., Franek, B.S., Marion, M., Kaufman, K.M., Langefeld, C.D., Harley, J.B., and Niewold, T.B. (2012). Genetic Ancestry, Serum Interferon- α Activity, and Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 39, 1238–1240. <https://doi.org/10.3899/jrheum.111467>.
- Kolhatkar, N.S., Brahmandam, A., Thouvenel, C.D., Becker-Herman, S., Jacobs, H.M., Schwartz, M.A., Allenspach, E.J., Khim, S., Panigrahi, A.K., Luning Prak, E.T., et al. (2015). Altered BCR and TLR signals

promote enhanced positive selection of autoreactive transitional B cells in Wiskott-Aldrich syndrome. *J Exp Med* 212, 1663–1677. <https://doi.org/10.1084/jem.20150585>.

Kopp, M.C., Nowak, P.R., Larburu, N., Adams, C.J., and Ali, M.M. (2018). In vitro FRET analysis of IRE1 and BiP association and dissociation upon endoplasmic reticulum stress. *Elife* 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.30257>.

Kovats, S. (2015). Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cell Immunol.* 294, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.01.018>.

Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M.J., and Sambrook, J. (1988). The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 332, 462–464. <https://doi.org/10.1038/332462a0>.

Kuhn, A., Wenzel, J., and Weyd, H. (2014). Photosensitivity, apoptosis, and cytokines in the pathogenesis of lupus erythematosus: a critical review. *Clin Rev Allergy Immunol* 47, 148–162. <https://doi.org/10.1007/s12016-013-8403-x>.

Larosa, M., Iaccarino, L., Gatto, M., Punzi, L., and Doria, A. (2016). Advances in the diagnosis and classification of systemic lupus erythematosus. *Expert Rev Clin Immunol* 12, 1309–1320. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2016.1206470>.

Le Thomas, A., Ferri, E., Marsters, S., Harnoss, J.M., Lawrence, D.A., Zuazo-Gaztelu, I., Modrusan, Z., Chan, S., Solon, M., Chalouni, C., et al. (2021). Decoding non-canonical mRNA decay by the endoplasmic-reticulum stress sensor IRE1 α . *Nat Commun* 12, 7310. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27597-7>.

Lee, K.H., Kronbichler, A., Park, D.D.-Y., Park, Y., Moon, H., Kim, H., Choi, J.H., Choi, Y., Shim, S., Lyu, I.S., et al. (2017). Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review. *Autoimmun Rev* 16, 1160–1173. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.09.012>.

Lee, K.P.K., Dey, M., Neculai, D., Cao, C., Dever, T.E., and Sicheri, F. (2008). Structure of the Dual Enzyme Ire1 Reveals the Basis for Catalysis and Regulation in Nonconventional RNA Splicing. *Cell* 132, 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.057>.

Leffler, J., Bengtsson, A.A., and Blom, A.M. (2014). The complement system in systemic lupus erythematosus: an update. *Annals of the Rheumatic Diseases* 73, 1601–1606. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-205287>.

Leffler, J., Ciacma, K., Gullstrand, B., Bengtsson, A.A., Martin, M., and Blom, A.M. (2015). A subset of patients with systemic lupus erythematosus fails to degrade DNA from multiple clinically relevant sources. *Arthritis Research & Therapy* 17, 205. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0726-y>.

Lencer, W.I., DeLuca, H., Grey, M.J., and Cho, J.A. (2015). Innate Immunity at Mucosal Surfaces: the IRE1-RIDD-RIG-I Pathway. *Trends Immunol* 36, 401–409. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.05.006>.

Lerner, A.G., Upton, J.-P., Praveen, P.V.K., Ghosh, R., Nakagawa, Y., Igbaria, A., Shen, S., Nguyen, V., Backes, B.J., Heiman, M., et al. (2012a). IRE1 α Induces Thioredoxin-Interacting Protein to Activate the

NLRP3 Inflammasome and Promote Programmed Cell Death under Irremediable ER Stress. *Cell Metabolism* 16, 250–264. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.07.007>.

Lerner, A.G., Upton, J.-P., Praveen, P.V.K., Ghosh, R., Nakagawa, Y., Igbaria, A., Shen, S., Nguyen, V., Backes, B.J., Heiman, M., et al. (2012b). IRE1 α induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death during endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab* 16, 250–264. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.07.007>.

Lewis, M.J., and Jawad, A.S. (2017). The effect of ethnicity and genetic ancestry on the epidemiology, clinical features and outcome of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 56, i67–i77. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kew399>.

Li, X., Sun, S., Appathurai, S., Sundaram, A., Plumb, R., and Mariappan, M. (2020). A Molecular Mechanism for Turning Off IRE1 α Signaling during Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Rep* 33, 108563. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108563>.

Li, Y., Huang, S., Wang, J., Dai, J., Cai, J., Yan, S., Huang, Z., He, S., Wang, P., Liu, J., et al. (2022). Phosphorylation at Ser724 of the ER stress sensor IRE1 α governs its activation state and limits ER stress-induced hepatosteatosis. *Journal of Biological Chemistry* 101997. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101997>.

Li, Z.-X., Zeng, S., Wu, H.-X., and Zhou, Y. (2019). The risk of systemic lupus erythematosus associated with Epstein-Barr virus infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Exp. Med.* 19, 23–36. <https://doi.org/10.1007/s10238-018-0535-0>.

Lightfoot, Y.L., Blanco, L.P., and Kaplan, M.J. (2017). Metabolic abnormalities and oxidative stress in lupus. *Current Opinion in Rheumatology* 29, 442–449. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000413>.

van der Linden, M.W., Westendorp, R.G., Zidane, M., Meheus, L., and Huizinga, T.W. (2001). Autoantibodies within families of patients with systemic lupus erythematosus are not directed against the same nuclear antigens. *J. Rheumatol.* 28, 284–287. .

Lipsker, D., and Sibilía, J. (2013). *Lupus Erythémateux*.

Lisnevskaja, L., Murphy, G., and Isenberg, D. (2014). Systemic lupus erythematosus. *The Lancet* 384, 1878–1888. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60128-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60128-8).

Liu, J., Wang, Y., Song, L., Zeng, L., Yi, W., Liu, T., Chen, H., Wang, M., Ju, Z., and Cong, Y.-S. (2017). A critical role of DDRGK1 in endoplasmic reticulum homeostasis via regulation of IRE1 α stability. *Nat Commun* 8, 14186. <https://doi.org/10.1038/ncomms14186>.

Liu, Q., Körner, H., Wu, H., and Wei, W. (2019). Endoplasmic reticulum stress in autoimmune diseases. *Immunobiology* 151881. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.11.016>.

Lo, M.S. (2018). Insights Gained From the Study of Pediatric Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol* 9, 1278. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01278>.

- Ma, K., Du, W., Wang, X., Yuan, S., Cai, X., Liu, D., Li, J., and Lu, L. (2019). Multiple Functions of B Cells in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20236021>.
- Ma, Y., Shimizu, Y., Mann, M.J., Jin, Y., and Hendershot, L.M. (2010). Plasma cell differentiation initiates a limited ER stress response by specifically suppressing the PERK-dependent branch of the unfolded protein response. *Cell Stress and Chaperones* 15, 281–293. <https://doi.org/10.1007/s12192-009-0142-9>.
- Macedo, A.C.L., and Isaac, L. (2016). Systemic Lupus Erythematosus and Deficiencies of Early Components of the Complement Classical Pathway. *Front Immunol* 7, 55. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00055>.
- 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. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00035>.
- Malynn, B.A., and Ma, A. (2019). A20: A multifunctional tool for regulating immunity and preventing disease. *Cell. Immunol.* 340, 103914. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.04.002>.
- Manjarrez-Orduño, N., Marasco, E., Chung, S.A., Katz, M.S., Kiridly, J.F., Simpfendorfer, K.R., Freudenberg, J., Ballard, D.H., Nashi, E., Hopkins, T.J., et al. (2012). CSK regulatory polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus and influences B-cell signaling and activation. *Nat Genet* 44, 1227–1230. <https://doi.org/10.1038/ng.2439>.
- Maria, N.I., and Davidson, A. (2018). Emerging areas for therapeutic discovery in SLE. *Current Opinion in Immunology* 55, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.09.004>.
- Marré, M.L., and Piganelli, J.D. (2017). Environmental Factors Contribute to β Cell Endoplasmic Reticulum Stress and Neo-Antigen Formation in Type 1 Diabetes. *Front. Endocrinol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00262>.
- Martinon, F., Chen, X., Lee, A.-H., and Glimcher, L.H. (2010). TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat. Immunol.* 11, 411–418. <https://doi.org/10.1038/ni.1857>.
- Mathian, A., Arnaud, L., and Amoura, Z. (2014). Physiopathologie du lupus systémique : le point en 2014. *La Revue de Médecine Interne* 35, 503–511. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2013.10.334>.
- Maurel, M., Chevet, E., Tavernier, J., and Gerlo, S. (2014). Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends in Biochemical Sciences* 39, 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.008>.
- Mizui, M., and Tsokos, G.C. (2018). Targeting Regulatory T Cells to Treat Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00786>.
- Mok, C.C., To, C.H., Ho, L.Y., and Yu, K.L. (2008). Incidence and mortality of systemic lupus erythematosus in a southern Chinese population, 2000-2006. *J. Rheumatol.* 35, 1978–1982. .

- Moore, K., and Hollien, J. (2015). Ire1-mediated decay in mammalian cells relies on mRNA sequence, structure, and translational status. *Mol Biol Cell* 26, 2873–2884. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-02-0074>.
- Mori, K. (2009). Signalling Pathways in the Unfolded Protein Response: Development from Yeast to Mammals. *The Journal of Biochemistry* 146, 743–750. <https://doi.org/10.1093/jb/mvp166>.
- Mori, K., Ma, W., Gething, M.J., and Sambrook, J. (1993). A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell* 74, 743–756. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90521-q](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90521-q).
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.05.006>.
- Muskardin, T.L.W., and Niewold, T.B. (2018). Type I interferon in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 14, 214–228. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2018.31>.
- Mustelin, T., Lood, C., and Giltiay, N.V. (2019a). Sources of Pathogenic Nucleic Acids in Systemic Lupus Erythematosus. *Front. Immunol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01028>.
- Mustelin, T., Bottini, N., and Stanford, S.M. (2019b). The contribution of PTPN22 to rheumatological disease. *Arthritis Rheumatol* 71, 486–495. <https://doi.org/10.1002/art.40790>.
- Nagata, S., and Tanaka, M. (2017). Programmed cell death and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 333–340. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.153>.
- Navid, F., and Colbert, R.A. (2017). Causes and consequences of endoplasmic reticulum stress in rheumatic disease. *Nature Reviews Rheumatology* 13, 25–40. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.192>.
- Nemazee, D. (2017). Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol* 17, 281–294. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.19>.
- Nguyên, D.T., Kebache, S., Fazel, A., Wong, H.N., Jenna, S., Emadali, A., Lee, E.-H., Bergeron, J.J.M., Kaufman, R.J., Larose, L., et al. (2004). Nck-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase-1 and regulation of cell survival during endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 15, 4248–4260. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-11-0851>.
- Nikawa, J., and Yamashita, S. (1992). IRE1 encodes a putative protein kinase containing a membrane-spanning domain and is required for inositol phototrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 6, 1441–1446. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb00864.x>.
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., and Ichijo, H. (2002). ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* 16, 1345–1355. <https://doi.org/10.1101/gad.992302>.

Nossent, J.C. (1992). Systemic lupus erythematosus on the Caribbean island of Curaçao: an epidemiological investigation. *Ann. Rheum. Dis.* *51*, 1197–1201. .

Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., et al. (2006). Autophagy Is Activated for Cell Survival after Endoplasmic Reticulum Stress. *Molecular and Cellular Biology* *26*, 9220–9231. <https://doi.org/10.1128/MCB.01453-06>.

Ohl, K., and Tenbrock, K. (2015). Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *European Journal of Immunology* *45*, 344–355. <https://doi.org/10.1002/eji.201344280>.

Oikawa, D., Kimata, Y., Kohno, K., and Iwawaki, T. (2009). Activation of mammalian IRE1alpha upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins. *Exp Cell Res* *315*, 2496–2504. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.06.009>.

Omarjee, O., Picard, C., Frachette, C., Moreews, M., Rieux-Laucat, F., Soulas-Sprauel, P., Viel, S., Lega, J.-C., Bader-Meunier, B., Walzer, T., et al. (2019). Monogenic lupus: Dissecting heterogeneity. *Autoimmun Rev* *18*, 102361. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102361>.

Ortíz-Fernández, L., Martín, J., and Alarcón-Riquelme, M.E. (2022). A Summary on the Genetics of Systemic Lupus Erythematosus, Rheumatoid Arthritis, Systemic Sclerosis, and Sjögren’s Syndrome. *Clin Rev Allergy Immunol* <https://doi.org/10.1007/s12016-022-08951-z>.

Osiecka-Iwan, A., Hyc, A., Radomska-Lesniewska, D.M., Rymarczyk, A., and Skopinski, P. (2018). Antigenic and immunogenic properties of chondrocytes. Implications for chondrocyte therapeutic transplantation and pathogenesis of inflammatory and degenerative joint diseases. *Cent Eur J Immunol* *43*, 209–219. <https://doi.org/10.5114/ceji.2018.77392>.

Osorio, F., Lambrecht, B.N., and Janssens, S. (2018). Antigen presentation unfolded: identifying convergence points between the UPR and antigen presentation pathways. *Current Opinion in Immunology* *52*, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.04.020>.

Palucka, A.K., Blanck, J.-P., Bennett, L., Pascual, V., and Banchereau, J. (2005). Cross-regulation of TNF and IFN-alpha in autoimmune diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 3372–3377. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408506102>.

Parisis, D., Bernier, C., Chasset, F., and Arnaud, L. (2019). Impact of tobacco smoking upon disease risk, activity and therapeutic response in systemic lupus erythematosus: A systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* *18*, 102393. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102393>.

Park, S.-M., Kang, T.-I., and So, J.-S. (2021). Roles of XBP1s in Transcriptional Regulation of Target Genes. *Biomedicines* *9*, 791. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070791>.

Parks, C.G., Walitt, B.T., Pettinger, M., Chen, J.-C., de Roos, A.J., Hunt, J., Sarto, G., and Howard, B.V. (2011). Insecticide use and risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in the Women’s Health Initiative Observational Study. *Arthritis Care Res (Hoboken)* *63*, 184–194. <https://doi.org/10.1002/acr.20335>.

- Peng, S.L., Szabo, S.J., and Glimcher, L.H. (2002). T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 5545–5550. <https://doi.org/10.1073/pnas.082114899>.
- Perl, A. (2016). Activation of mTOR (mechanistic target of rapamycin) in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* *12*, 169–182. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.172>.
- Perry, D., Sang, A., Yin, Y., Zheng, Y.-Y., and Morel, L. (2011a). Murine Models of Systemic Lupus Erythematosus.
- Perry, D., Sang, A., Yin, Y., Zheng, Y.-Y., and Morel, L. (2011b). Murine Models of Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* *2011*, e271694. <https://doi.org/10.1155/2011/271694>.
- Pescarmona, R., Belot, A., Villard, M., Besson, L., Lopez, J., Mosnier, I., Mathieu, A.-L., Lombard, C., Garnier, L., Frachette, C., et al. (2019). Comparison of RT-qPCR and Nanostring in the measurement of blood interferon response for the diagnosis of type I interferonopathies. *Cytokine* *113*, 446–452. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.10.023>.
- Pestka, S., Krause, C.D., and Walter, M.R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews* *202*, 8–32. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x>.
- Peters, A.L., Stunz, L.L., Meyerholz, D.K., Mohan, C., and Bishop, G.A. (2010). Latent membrane protein 1, the EBV-encoded oncogenic mimic of CD40, accelerates autoimmunity in B6.Sle1 mice. *J. Immunol.* *185*, 4053–4062. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904065>.
- 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. <https://doi.org/10.1002/art.34473>.
- Picard, C., and Belot, A. (2018). Les interféronopathies de type I. Mise au point et revue de la littérature. *La Revue de Médecine Interne* *39*, 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2016.08.016>.
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.1124978>.
- Poole, B.D., Gross, T., Maier, S., Harley, J.B., and James, J.A. (2008). Lupus-like autoantibody development in rabbits and mice after immunization with EBNA-1 fragments. *J Autoimmun* *31*, 362–371. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2008.08.007>.
- Pramanik, J., Chen, X., Kar, G., Henriksson, J., Gomes, T., Park, J.-E., Natarajan, K., Meyer, K.B., Miao, Z., McKenzie, A.N.J., et al. (2018). Genome-wide analyses reveal the IRE1a-XBP1 pathway promotes T helper cell differentiation by resolving secretory stress and accelerating proliferation. *Genome Medicine* *10*, 76. <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0589-3>.

- Pretel, M., Marquès, L., and España, A. (2014). Drug-induced lupus erythematosus. *Actas Dermosifiliogr* 105, 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2012.09.007>.
- Qi, L., Tsai, B., and Arvan, P. (2017). New insights into the physiological role of ERAD. *Trends Cell Biol* 27, 430–440. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.12.002>.
- Radanović, T., and Ernst, R. (2021). The Unfolded Protein Response as a Guardian of the Secretory Pathway. *Cells* 10, 2965. <https://doi.org/10.3390/cells10112965>.
- Ramirez-Ortiz, Z.G., Pendergraft Iii, W.F., Prasad, A., Byrne, M.H., Iram, T., Blanchette, C.J., Luster, A.D., Hacohen, N., Houry, J.E., and Means, T.K. (2013). The scavenger receptor SCARF1 mediates the clearance of apoptotic cells and prevents autoimmunity. *Nature Immunology* 14, 917–926. <https://doi.org/10.1038/ni.2670>.
- Rees, F., Doherty, M., Grainge, M.J., Lanyon, P., and Zhang, W. (2017). The worldwide incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: a systematic review of epidemiological studies. *Rheumatology (Oxford)* 56, 1945–1961. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex260>.
- Reimold, A.M., Iwakoshi, N.N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravalles, E.M., Friend, D., Grusby, M.J., Alt, F., and Glimcher, L.H. (2001). Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 412, 300–307. <https://doi.org/10.1038/35085509>.
- Richard, M.L., and Gilkeson, G. (2018). Mouse models of lupus: what they tell us and what they don't. *Lupus Sci Med* 5, e000199. <https://doi.org/10.1136/lupus-2016-000199>.
- Riedhammer, C., and Weissert, R. (2015). Antigen Presentation, Autoantigens, and Immune Regulation in Multiple Sclerosis and Other Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology* 6. .
- Rigante, D., and Esposito, S. (2015). Infections and Systemic Lupus Erythematosus: Binding or Sparring Partners? *International Journal of Molecular Sciences* 16, 17331–17343. <https://doi.org/10.3390/ijms160817331>.
- Rigante, D., Mazzoni, M.B., and Esposito, S. (2014). The cryptic interplay between systemic lupus erythematosus and infections. *Autoimmun Rev* 13, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.09.004>.
- Rose, T., and Dörner, T. (2017). Drivers of the immunopathogenesis in systemic lupus erythematosus. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 31, 321–333. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2017.09.007>.
- Rother, N., and van der Vlag, J. (2015). Disturbed T Cell Signaling and Altered Th17 and Regulatory T Cell Subsets in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Front. Immunol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00610>.
- Rottman, J.B., and Willis, C.R. (2010). Mouse Models of Systemic Lupus Erythematosus Reveal a Complex Pathogenesis. *Vet Pathol* 47, 664–676. <https://doi.org/10.1177/0300985810370005>.
- Saeed, M. (2017). Lupus pathobiology based on genomics. *Immunogenetics* 69, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00251-016-0961-7>.

- Sang, A., Zheng, Y.-Y., Yin, Y., Dozmorov, I., Li, H., Hsu, H.-C., Mountz, J.D., and Morel, L. (2014). Dysregulated Cytokine Production by Dendritic Cells Modulates B Cell Responses in the NZM2410 Mouse Model of Lupus. *PLOS ONE* 9, e102151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102151>.
- Scheu, S., Stetson, D.B., Reinhardt, R.L., Leber, J.H., Mohrs, M., and Locksley, R.M. (2006). Activation of the integrated stress response during T helper cell differentiation. *Nat Immunol* 7, 644–651. <https://doi.org/10.1038/ni1338>.
- Schickel, J.-N., Pasquali, J.-L., Soley, A., Knapp, A.-M., Decossas, M., Kern, A., Fauny, J.-D., Marcellin, L., Korganow, A.-S., Martin, T., et al. (2012). Carabin deficiency in B cells increases BCR-TLR9 costimulation-induced autoimmunity. *EMBO Mol Med* 4, 1261–1275. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201595>.
- Schneider, L., Dos Santos, A.S.P., Santos, M., da Silva Chakr, R.M., and Monticciolo, O.A. (2014). Vitamin D and systemic lupus erythematosus: state of the art. *Clin. Rheumatol.* 33, 1033–1038. <https://doi.org/10.1007/s10067-014-2530-5>.
- Schubert, U., Antón, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W., and Bennink, J.R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770–774. <https://doi.org/10.1038/35008096>.
- Sekiguchi, D.R., Yunk, L., Gary, D., Charan, D., Srivastava, B., Allman, D., Weigert, M.G., and Prak, E.T.L. (2006). Development and Selection of Edited B Cells in B6.56R Mice. *The Journal of Immunology* 176, 6879–6887. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.11.6879>.
- Senejani, A.G., Liu, Y., Kidane, D., Maher, S.E., Zeiss, C.J., Park, H.-J., Kashgarian, M., McNiff, J.M., Zelterman, D., Bothwell, A.L.M., et al. (2014). Mutation of POLB causes lupus in mice. *Cell Rep* 6, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.017>.
- Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.-H., Qian, S.-B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., et al. (2004). XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* 21, 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.06.010>.
- Shao, W.-H., and Cohen, P.L. (2011). Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 13, 202. <https://doi.org/10.1186/ar3206>.
- Sheng, Y.-J., Gao, J.-P., Li, J., Han, J.-W., Xu, Q., Hu, W.-L., Pan, T.-M., Cheng, Y.-L., Yu, Z.-Y., Ni, C., et al. (2011). Follow-up study identifies two novel susceptibility loci PRKCB and 8p11.21 for systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 50, 682–688. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq313>.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., and Stall, A.M. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68, 855–867. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90029-c](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90029-c).
- Shiu, R.P., Pouyssegur, J., and Pastan, I. (1977). Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 3840–3844. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.9.3840>.

- Shoulders, M.D., Ryno, L.M., Genereux, J.C., Moresco, J.J., Tu, P.G., Wu, C., Yates, J.R., Su, A.I., Kelly, J.W., and Wiseman, R.L. (2013). Stress-Independent Activation of XBP1s and/or ATF6 Reveals Three Functionally Diverse ER Proteostasis Environments. *Cell Reports* 3, 1279–1292. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.03.024>.
- Sim, T.M., Ong, S.J., Mak, A., and Tay, S.H. (2022). Type I Interferons in Systemic Lupus Erythematosus: A Journey from Bench to Bedside. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 2505. <https://doi.org/10.3390/ijms23052505>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.034>.
- Siwecka, N., Rozpędek-Kamińska, W., Wawrzynkiewicz, A., Pytel, D., Diehl, J.A., and Majsterek, I. (2021). The Structure, Activation and Signaling of IRE1 and Its Role in Determining Cell Fate. *Biomedicines* 9, 156. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020156>.
- So, J.-S. (2018). Roles of Endoplasmic Reticulum Stress in Immune Responses. *Mol Cells* 41, 705–716. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.0241>.
- Song, M., Sandoval, T.A., Chae, C.-S., Chopra, S., Tan, C., Rutkowski, M.R., Raundhal, M., Chaurio, R.A., Payne, K.K., Konrad, C., et al. (2018). IRE1 α -XBP1 controls T cell function in ovarian cancer by regulating mitochondrial activity. *Nature* 562, 423–428. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0597-x>.
- Soulas, P., Woods, A., Jaulhac, B., Knapp, A.-M., Pasquali, J.-L., Martin, T., and Korganow, A.-S. (2005). Autoantigen, innate immunity, and T cells cooperate to break B cell tolerance during bacterial infection. *J Clin Invest* 115, 2257–2267. <https://doi.org/10.1172/JCI24646>.
- Souyris, M., Cenac, C., Azar, P., Daviaud, D., Canivet, A., Grunenwald, S., Pienkowski, C., Chaumeil, J., Mejía, J.E., and Guéry, J.-C. (2018a). TLR7 escapes X chromosome inactivation in immune cells. *Science Immunology* 3, eaap8855. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aap8855>.
- Souyris, M., Mejía, J.E., Chaumeil, J., and Guéry, J.-C. (2018b). Female predisposition to TLR7-driven autoimmunity: gene dosage and the escape from X chromosome inactivation. *Semin Immunopathol* <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0712-y>.
- Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K., and Brewer, J.W. (2004). XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 167, 35–41. <https://doi.org/10.1083/jcb.200406136>.
- Suárez-Fueyo, A., Bradley, S.J., and Tsokos, G.C. (2016). T cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Current Opinion in Immunology* 43, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.09.001>.
- 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603912103>.

- Sule, G., Abuaita, B.H., Steffes, P.A., Fernandes, A.T., Estes, S.K., Dobry, C., Pandian, D., Gudjonsson, J.E., Kahlenberg, J.M., O’Riordan, M.X., et al. (2021). Endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 α propels neutrophil hyperactivity in lupus. *J Clin Invest* 131. <https://doi.org/10.1172/JCI137866>.
- Sundaram, A., Appathurai, S., Plumb, R., and Mariappan, M. (2018). Dynamic changes in complexes of IRE1 α , PERK, and ATF6 α during endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* 29, 1376–1388. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-10-0594>.
- Suurmond, J., Calise, J., Malkiel, S., and Diamond, B. (2016). DNA-reactive B cells in lupus. *Current Opinion in Immunology* 43, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.07.002>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.12.027>.
- Tam, A.B., Koong, A.C., and Niwa, M. (2014). Ire1 has distinct catalytic mechanisms for XBP1/HAC1 splicing and RIDD. *Cell Rep* 9, 850–858. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.016>.
- Tang, C.-H.A., Ranatunga, S., Kriss, C.L., Cubitt, C.L., Tao, J., Pinilla-Ibarz, J.A., Del Valle, J.R., and Hu, C.-C.A. (2014). Inhibition of ER stress-associated IRE-1/XBP-1 pathway reduces leukemic cell survival. *J Clin Invest* 124, 2585–2598. <https://doi.org/10.1172/JCI73448>.
- Tang, C.-H.A., Chang, S., Paton, A.W., Paton, J.C., Gabrilovich, D.I., Ploegh, H.L., Del Valle, J.R., and Hu, C.-C.A. (2018). Phosphorylation of IRE1 at S729 regulates RIDD in B cells and antibody production after immunization. *J. Cell Biol.* <https://doi.org/10.1083/jcb.201709137>.
- Taubenheim, N., Tarlinton, D.M., Crawford, S., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., and Nutt, S.L. (2012). High rate of antibody secretion is not integral to plasma cell differentiation as revealed by XBP-1 deficiency. *J. Immunol.* 189, 3328–3338. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201042>.
- Tavernier, S.J., Osorio, F., Vandersarren, L., Vettters, J., Vanlangenakker, N., Van Isterdael, G., Vergote, K., De Rycke, R., Parthoens, E., van de Laar, L., et al. (2017). Regulated IRE1-dependent mRNA decay sets the threshold for dendritic cell survival. *Nat Cell Biol* 19, 698–710. <https://doi.org/10.1038/ncb3518>.
- Tenbrock, K., and Rauen, T. (2022). T cell dysregulation in SLE. *Clin Immunol* 239, 109031. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2022.109031>.
- Tenbrock, K., Juang, Y.-T., Kyttaris, V.C., and Tsokos, G.C. (2007). Altered signal transduction in SLE T cells. *Rheumatology* 46, 1525–1530. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kem154>.
- Thanou, A., and Merrill, J.T. (2013). Top 10 things to know about lupus activity measures. *Curr Rheumatol Rep* 15, 334. <https://doi.org/10.1007/s11926-013-0334-2>.
- Thanou, A., James, J.A., Arriens, C., Aberle, T., Chakravarty, E., Rawdon, J., Stavarakis, S., Merrill, J.T., and Askanase, A. (2019). Scoring systemic lupus erythematosus (SLE) disease activity with simple, rapid outcome measures. *Lupus Sci Med* 6, e000365. <https://doi.org/10.1136/lupus-2019-000365>.

Theofilopoulos, A.N., Kono, D.H., and Baccala, R. (2017). The multiple pathways to autoimmunity. *Nat Immunol* 18, 716–724. <https://doi.org/10.1038/ni.3731>.

Tirasophon, W., Welihinda, A.A., and Kaufman, R.J. (1998). A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev* 12, 1812–1824. <https://doi.org/10.1101/gad.12.12.1812>.

Todd, D.J., McHeyzer-Williams, L.J., Kowal, C., Lee, A.-H., Volpe, B.T., Diamond, B., McHeyzer-Williams, M.G., and Glimcher, L.H. (2009). XBP1 governs late events in plasma cell differentiation and is not required for antigen-specific memory B cell development. *J. Exp. Med.* 206, 2151–2159. <https://doi.org/10.1084/jem.20090738>.

Toong, C., Adelstein, S., and Phan, T.G. (2011). Clearing the complexity: immune complexes and their treatment in lupus nephritis. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 4, 17–28. <https://doi.org/10.2147/IJNRD.S10233>.

Tsokos, G.C., Lo, M.S., Reis, P.C., and Sullivan, K.E. (2016). New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol* 12, 716–730. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.186>.

Tufanli, O., Telkoparan Akillilar, P., Acosta-Alvear, D., Kocaturk, B., Onat, U.I., Hamid, S.M., Çimen, I., Walter, P., Weber, C., and Erbay, E. (2017). Targeting IRE1 with small molecules counteracts progression of atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, E1395–E1404. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621188114>.

Tusseau, M., Lovšin, E., Samaille, C., Pescarmona, R., Mathieu, A.-L., Maggio, M.-C., Selmanović, V., Debeljak, M., Dachy, A., Novljan, G., et al. (2022). DNASE1L3 deficiency, new phenotypes, and evidence for a transient type I IFN signaling. *J Clin Immunol* <https://doi.org/10.1007/s10875-022-01287-5>.

Ulf-Møller, C.J., Simonsen, J., Kyvik, K.O., Jacobsen, S., and Frisch, M. (2017). Family history of systemic lupus erythematosus and risk of autoimmune disease: Nationwide Cohort Study in Denmark 1977-2013. *Rheumatology (Oxford)* 56, 957–964. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex005>.

Upton, J.-P., Wang, L., Han, D., Wang, E.S., Huskey, N.E., Lim, L., Truitt, M., McManus, M.T., Ruggero, D., Goga, A., et al. (2012). IRE1 α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. *Science* 338, 818–822. <https://doi.org/10.1126/science.1226191>.

Uramoto, K.M., Michet, C.J., Thumboo, J., Sunku, J., O’Fallon, W.M., and Gabriel, S.E. (1999). Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. *Arthritis Rheum.* 42, 46–50. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199901\)42:1<46::AID-ANR6>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199901)42:1<46::AID-ANR6>3.0.CO;2-2).

Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. *Science* 287, 664–666. <https://doi.org/10.1126/science.287.5453.664>.

Urowitz, M.B., Gladman, D.D., Tom, B.D.M., Ibañez, D., and Farewell, V.T. (2008). Changing patterns in mortality and disease outcomes for patients with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 35, 2152–2158. .

Urra, H., Pihán, P., and Hetz, C. (2020). The UPProsome - decoding novel biological outputs of IRE1 α function. *J Cell Sci* 133, jcs218107. <https://doi.org/10.1242/jcs.218107>.

Vasudevan, A., and Krishnamurthy, A.N. (2010). Changing worldwide epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 36, 1–13, vii. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2009.12.005>.

Vaughn, S.E., Foley, C., Lu, X., Patel, Z.H., Zoller, E.E., Magnusen, A.F., Williams, A.H., Ziegler, J.T., Comeau, M.E., Marion, M.C., et al. (2015). Lupus risk variants in the PXX locus alter B-cell receptor internalization. *Frontiers in Genetics* 5. .

Vembar, S.S., and Brodsky, J.L. (2008). One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 944–957. <https://doi.org/10.1038/nrm2546>.

Villamin, C.A.C., and Navarra, S.V. (2008). Clinical manifestations and clinical syndromes of Filipino patients with systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol* 18, 161–164. <https://doi.org/10.1007/s10165-008-0029-0>.

Wahadat, M.J., Schonenberg-Meinema, D., van Helden-Meeuwsen, C.G., van Tilburg, S.J., Groot, N., Schatorjé, E.J.H., Hoppenreijts, E.P.A.H., Hissink Muller, P.C.E., Brinkman, D.M.C., Dvorak, D., et al. (2022). Gene signature fingerprints stratify SLE patients in groups with similar biological disease profiles: a multicenter longitudinal study. *Rheumatology (Oxford)* keac083. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keac083>.

Walsh, E.R., Pisitkun, P., Voynova, E., Deane, J.A., Scott, B.L., Caspi, R.R., and Bolland, S. (2012). Dual signaling by innate and adaptive immune receptors is required for TLR7-induced B-cell-mediated autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 16276–16281. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209372109>.

Wang, M., and Kaufman, R.J. (2016). Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature* 529, 326–335. <https://doi.org/10.1038/nature17041>.

Wang, J., Cheng, Q., Wang, X., Zu, B., Xu, J., Xu, Y., Zuo, X., Shen, Y., Wang, J., and Shen, Y. (2014a). Deficiency of IRE1 and PERK signal pathways in systemic lupus erythematosus. *Am. J. Med. Sci.* 348, 465–473. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0000000000000328>.

Wang, J.-M., Qiu, Y., Yang, Z., Kim, H., Qian, Q., Sun, Q., Zhang, C., Yin, L., Fang, D., Back, S.H., et al. (2018a). IRE1 α prevents hepatic steatosis by processing and promoting the degradation of select microRNAs. *Sci. Signal.* 11, eaao4617. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aao4617>.

Wang, L., Zhao, P., Ma, L., Shan, Y., Jiang, Z., Wang, J., and Jiang, Y. (2014b). Increased Interleukin 21 and Follicular Helper T-like Cells and Reduced Interleukin 10+ B cells in Patients with New-onset Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 41, 1781–1792. <https://doi.org/10.3899/jrheum.131025>.

Wang, M., Ishikawa, T., Lai, Y., Nallapothula, D., and Singh, R.R. (2022). Diverse Roles of NETosis in the Pathogenesis of Lupus. *Front Immunol* 13, 895216. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.895216>.

- Wang, P., Li, J., Tao, J., and Sha, B. (2018b). The luminal domain of the ER stress sensor protein PERK binds misfolded proteins and thereby triggers PERK oligomerization. *J Biol Chem* 293, 4110–4121. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001294>.
- Wang, X.-Z., Harding, H.P., Zhang, Y., Jolicoeur, E.M., Kuroda, M., and Ron, D. (1998). Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *The EMBO Journal* 17, 5708–5717. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5708>.
- Woehlbier, U., and Hetz, C. (2011). Modulating stress responses by the UPRosome: A matter of life and death. *Trends in Biochemical Sciences* 36, 329–337. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.001>.
- Worbs, T., Hammerschmidt, S.I., and Förster, R. (2017). Dendritic cell migration in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 17, 30–48. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.116>.
- Wu, H., Fu, S., Zhao, M., Lu, L., and Lu, Q. (2016). Dysregulation of Cell Death and Its Epigenetic Mechanisms in Systemic Lupus Erythematosus. *Molecules* 22. <https://doi.org/10.3390/molecules22010030>.
- Wu, P., Tian, T., Zhao, J., Song, Q., Wu, X., Guo, Y., Yu, Y., Tan, S., and Xia, H. (2021). IRE1 α -JNK pathway-mediated autophagy promotes cell survival in response to endoplasmic reticulum stress during the initial phase of hepatic steatosis. *Life Sciences* 264, 118668. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118668>.
- Xiang, L., Liu, A., and Xu, G. (2020). Expression of XBP1s in B lymphocytes is critical for pristane-induced lupus nephritis in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 318, F1258–F1270. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00472.2019>.
- Yamasaki, S., Yagishita, N., Tsuchimochi, K., Nishioka, K., and Nakajima, T. (2005). Rheumatoid arthritis as a hyper-endoplasmic reticulum-associated degradation disease. *Arthritis Research & Therapy* 7, 181. <https://doi.org/10.1186/ar1808>.
- Yanagitani, K., Imagawa, Y., Iwawaki, T., Hosoda, A., Saito, M., Kimata, Y., and Kohno, K. (2009). Cotranslational Targeting of XBP1 Protein to the Membrane Promotes Cytoplasmic Splicing of Its Own mRNA. *Molecular Cell* 34, 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.02.033>.
- Yang, F., He, Y., Zhai, Z., and Sun, E. (2019). Programmed Cell Death Pathways in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol Res* 2019, 3638562. <https://doi.org/10.1155/2019/3638562>.
- Yarkoni, Y., Getahun, A., and Cambier, J.C. (2010). Molecular underpinning of B-cell anergy. *Immunol Rev* 237, 249–263. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00936.x>.
- Yelin, E., Trupin, L., and Yazdany, J. (2017a). A Prospective Study of the Impact of Current Poverty, History of Poverty, and Exiting Poverty on Accumulation of Disease Damage in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 69, 1612–1622. <https://doi.org/10.1002/art.40134>.
- Yelin, E., Yazdany, J., and Trupin, L. (2017b). The Relationship between Poverty and Mortality in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Care Res (Hoboken)* <https://doi.org/10.1002/acr.23428>.

- Yokoyama, K., Su Ih, I. -hsin, Tezuka, T., Yasuda, T., Mikoshiba, K., Tarakhovsky, A., and Yamamoto, T. (2002). BANK regulates BCR-induced calcium mobilization by promoting tyrosine phosphorylation of IP(3) receptor. *EMBO J.* 21, 83–92. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.1.83>.
- Yoo, S.-A., You, S., Yoon, H.-J., Kim, D.-H., Kim, H.-S., Lee, K., Ahn, J.H., Hwang, D., Lee, A.S., Kim, K.-J., et al. (2012). A novel pathogenic role of the ER chaperone GRP78/BiP in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 209, 871–886. <https://doi.org/10.1084/jem.20111783>.
- Yoon, S.-B., Park, Y.-H., Choi, S.-A., Yang, H.-J., Jeong, P.-S., Cha, J.-J., Lee, S., Lee, S.H., Lee, J.-H., Sim, B.-W., et al. (2019). Real-time PCR quantification of spliced X-box binding protein 1 (XBP1) using a universal primer method. *PLOS ONE* 14, e0219978. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219978>.
- Yoshimi, R., Ishigatsubo, Y., and Ozato, K. (2012). Autoantigen TRIM21/Ro52 as a Possible Target for Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Int J Rheumatol* 2012, 718237. <https://doi.org/10.1155/2012/718237>.
- Youness, A., Miquel, C.-H., and Guéry, J.-C. (2021). Escape from X Chromosome Inactivation and the Female Predominance in Autoimmune Diseases. *Int J Mol Sci* 22, 1114. <https://doi.org/10.3390/ijms22031114>.
- Yu, J., Li, T., Liu, Y., Wang, X., Zhang, J., Wang, X., Shi, G., Lou, J., Wang, L., Wang, C.-C., et al. (2020). Phosphorylation switches protein disulfide isomerase activity to maintain proteostasis and attenuate ER stress. *EMBO J* 39, e103841. <https://doi.org/10.15252/emboj.2019103841>.
- Zhang, K., Wong, H.N., Song, B., Miller, C.N., Scheuner, D., and Kaufman, R.J. (2005). The unfolded protein response sensor IRE1 α is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis. *J Clin Invest* 115, 268–281. <https://doi.org/10.1172/JCI21848>.
- Zhang, Y., Gui, M., Wang, Y., Mani, N., Chaudhuri, S., Gao, B., Li, H., Kanwar, Y.S., Lewis, S.A., Dumas, S.N., et al. (2021). Inositol-Requiring Enzyme 1 α -Mediated Synthesis of Monounsaturated Fatty Acids as a Driver of B Cell Differentiation and Lupus-like Autoimmune Disease. *Arthritis Rheumatol* <https://doi.org/10.1002/art.41883>.
- Zhao, M., Wang, Z., Yung, S., and Lu, Q. (2015). Epigenetic dynamics in immunity and autoimmunity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 67, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.05.022>.
- Zhu, H., Luo, H., Yan, M., Zuo, X., and Li, Q.-Z. (2015). Autoantigen Microarray for High-throughput Autoantibody Profiling in Systemic Lupus Erythematosus. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 13, 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.09.001>.
- Zhu, Q., Rui, K., Wang, S., and Tian, J. (2021). Advances of Regulatory B Cells in Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology* 12. .

Rôle de la mutation IRE1- α R594C dans l'homéostasie lymphocytaire et le développement d'une auto-immunité

Résumé

Le lupus érythémateux systémique est une maladie auto-immune sévère caractérisée par une importante étiologie génétique. Une analyse par séquençage d'exome d'un patient atteint de lupus et de membres de sa famille atteints d'auto-immunité a permis d'identifier une mutation hétérozygote (R594C) du gène *ERN1* qui pourrait être liée à la pathologie. La protéine IRE1- α , codée par le gène *ERN1*, est impliquée dans le mécanisme de l'UPR (unfolded protein response) permettant la réponse à un stress cellulaire à la suite d'une accumulation de protéines mal repliées. L'UPR restaure les fonctions normales de la cellule et peut activer les voies de l'apoptose si ces mécanismes sont insuffisants. Le rôle de l'UPR dans le développement du lupus est aujourd'hui inconnu. L'objectif de ce projet était de comprendre, grâce à l'étude d'un nouveau modèle murin porteur de la mutation R594C, les conséquences de cette mutation sur la physiologie des cellules immunitaires et le développement d'une auto-immunité. Nous avons observé que cette mutation conduit à une perte de fonction de la voie d'IRE1- α , et à une perte de tolérance sans manifestations cliniques. Ce projet a ainsi permis de décrire un nouveau rôle potentiel de IRE1- α dans la régulation de la tolérance lymphocytaire.

Mots-clés : lupus, IRE1- α , auto-immunité, tolérance, lymphocytes B, auto-anticorps

Résumé en anglais

Systemic lupus erythematosus is a severe auto-immune disease characterized by an important genetic etiology. An exome sequencing analysis of a lupus patient and family members with autoimmunity identified a heterozygous mutation (R594C) in the *ERN1* gene, which may be linked to the disease. The IRE1- α protein, encoded by the *ERN1* gene, is involved in the UPR (unfolded protein response) mechanism allowing the response to a cellular stress following an accumulation of misfolded proteins. UPR restores normal cell functions and can activate apoptosis pathways if these mechanisms are insufficient. The role of the UPR in the development of lupus is currently unknown. The objective of this project was to understand, through the study of a new mouse model carrying the R594C mutation, the consequences of this mutation on the physiology of immune cells and the development of autoimmunity. We observed that this mutation leads to a loss of function of the IRE1- α pathway, and to a general tolerance breakdown without clinical manifestations. This project thus described a potential new role of IRE1- α in the disruption of lymphocyte tolerance mechanisms.

Keywords: lupus, IRE1- α , autoimmunity, tolerance, B cells, autoantibodies