Université catholique de Louvain
Faculté de Médecine
Institut de Recherche Expérimentale et Clinique (IREC)
Unité de Rhumatologie (RUMA)

Rôle de PKR dans la physiopathologie du lupus

Aurélie De Groof

Juin 2018

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en
Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Promoteur : Pr Bernard Lauwerys
Co-promoteur : Pr Frédéric Houssiau

Membres du jury :
- Pr Luc Bertrand
- Pr Thomas Michiels
- Pr Laurent Knoops
- Pr Valérie Badot
- Pr Jacques-Eric Gottenberg
- Pr René Westhovens

Remerciements

Je profite de cette section pour remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de ma thèse.

Tout d'abord je remercie mon promoteur, le professeur Bernard Lauwerys, pour m'avoir permis de faire ma thèse dans son laboratoire et m'avoir accordé sa confiance en m'attribuant ce sujet. Merci pour ton suivi et pour tes bonnes idées (et parfois moins bonnes, mais on ne le savait pas avant de les tester). Merci pour « tes yeux de la foi » et du coup, pour ton enthousiasme de tous les instants. Grâce à toi, je n'ai jamais baissé les bras malgré toutes les difficultés rencontrées. J'y ai toujours cru car tu y as toujours cru. Finalement, je sors grandie de ce chemin sinueux qui m'aura tellement appris. Merci !

Je remercie ensuite les professeurs Frédéric Houssiau, Thomas Michiels, Laurent Knoops et Alexandre Persu pour leur accompagnement et leur soutien tout au long de ma thèse ainsi que leurs précieux conseils.

Merci également au professeur Luc Bertrand pour la reprise en dernière minute du titre de Président de mon jury et à ses très bonnes remarques apportées lors ma défense privée.

Merci à mes trois membres du jury extérieurs, le professeur Valérie Badot, le professeur Jacques-Eric Gottenberg et le professeur René Westhovens, pour leurs encouragements, leur gentillesse et leurs remarques pertinentes pour l'amélioration du manuscrit. Cette défense fut un moment très agréable passé en votre compagnie, merci.

Je tiens également à remercier le professeur Christine Galant pour toutes les analyses immunohistologiques réalisées malgré son planning très chargé.

Ce petit paragraphe pour toi, Julie. Tu auras été là dès le début et j'aurais aimé jusqu'à la fin. Mais je suis si heureuse que tu viennes me voir pour ma défense publique ! Nos discussions m'ont beaucoup appris et tu as toujours été là pour me soutenir et me pousser vers le haut. Je garde de très bons souvenirs de ces congrès passés ensemble et de ces moments en dehors du labo. Nous avons une amitié sincère. J'espère vraiment qu'elle perdurera malgré la distance.

Un énorme merci à Anne-Lise, Joëlle et Siam pour leurs coups de main indispensables tout au long de ce projet.

Merci à Gaëlle pour sa relecture du manuscrit et ses bons conseils pour l'améliorer.

Bonne route aux prochains doctorants, Pauline, Clément et Sylvie. Que vos thèses vous passionnent autant que la mienne m'a passionnée.

Merci à tous ceux des labos voisins qui m'ont apporté leur aide (et ils sont nombreux)! Nous avons de la chance d'être entourés d'équipes compétentes et toujours prêtes à partager leur savoir.

Merci aux « filles » du plateau (Alexandra, Tatiana, Laurie, Kenza, et les autres) pour les repas de midi en votre compagnie. Des vrais moments de détente et de rigolade.

Merci à Marie-Christine pour l'accès à certains articles de rhumatologie et pour son rôle dans la logistique de ma défense privée et publique. Merci aussi à Marie pour sa précieuse aide et ses contacts pour l'envoi de colis de dernière minute.

Un grand, grand merci à tous les membres de ma famille. Vous êtes tellement importants à mes yeux. Nos « réunions » sont des moments de déconnexions et de bonheurs à vos côtés.

A toi Vincent, qui m'a soutenue quand ça n'allait pas et qui a écouté « patiemment » tous mes problèmes de labo sans en comprendre un mot. J'ai appris beaucoup sur le cinéma grâce à toi. Tu m'as ouvert les yeux sur un art que je ne connaissais pas du tout, et tu me pousses à m'intéresser à des sujets qui habituellement ne me préoccupent pas. Je suis fière de ton parcours. J'espère que tu le seras aussi du mien. Alors oui, sur le papier je serai docteur, mais tu l'as compris maintenant, je serai toujours incapable de te soigner ! Désolée, petit chat.

Enfin, je dédie cette thèse à mon papa qui, j'en suis certaine, aurait suivi avec beaucoup d'intérêt ce travail.

Résumé

Le lupus érythémateux disséminé est une maladie complexe qui se caractérise par la production d'auto-anticorps dirigés contre le matériel nucléaire. Une des manifestations grave est la néphrite lupique.

Les traitements de base consistent en des immunosuppresseurs mais ceux-ci causent souvent des effets secondaires ou ne sont pas totalement efficaces. Dès lors le développement de molécules ciblées constituerait un progrès dans le traitement du lupus. Dans ce but, il est nécessaire de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie.

Les cellules du sang de patients atteints de lupus présentent une signature interféron, et une des premières observations que nous avons faite est que parmi les gènes interféron-induits surexprimés se trouvait PKR, une protéine activée par des acides nucléiques induisant elle-même la production d'interféron et de gènes interféron-induits. Nous avons par la suite mis en évidence l'activation spontanée de PKR de par sa forme phosphorylée dans les cellules du sang de patients atteints de lupus.

Une première expérience d'étude du rôle de PKR dans la physiopathologie du lupus a été réalisée avec des souris lupiques injectées avec de la 2-aminopurine, un inhibiteur pharmacologique de PKR, et montre une diminution de l'atteinte rénale et du taux d'anticorps anti-ADN double brin dans leur sérum. Un résultat encourageant mais pouvant être le résultat d'effets off-target induits par la 2-aminopurine. Dès lors, dans le but d'éliminer ces biais, nous avons généré des souris lupiques PKR-inactivées avec la technologie CRISPR/Cas9. Les analyses de la physiopathologie de la maladie de ces souris ont montré un effet de PKR sur la différenciation des lymphocytes B dans la mesure où les souris PKR-inactivées présentent une diminution de la présence de plasmocytes dans le sang et les ganglions, ainsi qu'une diminution de la production d'immunoglobulines totales résultant en une diminution de l'atteinte rénale. Dans la mesure où nous montrons également que PKR est une cible de la 6-mercaptopurine, le métabolite actif de l'azathioprine, un traitement standard du lupus, nos résultats sont compatibles avec un rôle clé de PKR dans la physiopathologie de la maladie.

Liste des abréviations

2AP = 2-aminopurine
6MP = 6-mercaptopurine
ADAR = Adenosine Deaminase acting on RNA
ADNc = ADN complémentaire
ALPS = Syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité
ARNdb = ARN double brin
ARNm = ARN messager
ARNsb = ARN simple brin
BAFF = B cell activating factor
BCR = Récepteur des lymphocytes B
CAR = Chimeric antigen receptor
CARD = Caspase recruiting domain
CD = Cellule dendritique
CD = Cluster de différenciation
CG = Centre germinatif
CMH = Complexe majeur d'histocompatibilité
DN = Double négatif
DRBD = dsRNA-binding domain (domaines de liaison à l'ARNdb)
eIF2 = Eukaryotic Initiation Factor 2
ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay
FADD = Fas-Associated protein with Death Domain
FBS = Fœtal bovine serum
FcR = Récepteur Fc gamma
GCN2 = General control non-derepressible kinase 2
GWAS = Genome-Wide Association Studies
HEK = Human embryonic kidney
HMGB1 = High-mobility group box 1
HRI = Heme-regulated inhibitor kinase
ICOS = Inducible T-cell COStimulator
IFIH1 = Interferon Induced With Helicase C Domain 1
IFN = Interféron
IFNAR = Récepteur aux IFN de type 1
IL = Interleukine
IP = intrapéritonéale
IRF = Interferon regulatory factor
ISGF3 = Interferon-stimulated gene factor 3
ISN-RPS = International Society of Nephrology - Renal Pathology Society
ISRE = Interferon-stimulated response element
JNK = Jun N-terminal kinase
KLH = Keyhole limpet haemocyanin

LED = Lupus érythémateux disséminé
LPS = Lipopolysaccharide
MAPK = Mitogen-activated protein kinases
MAVS = Mitochondrial antiviral signaling
MDA5 = Melanoma Differentiation-Associated protein 5
MEF = Murine embryonic fibroblast
MRL = Murphy Roths Large
NET = Neutrophil extracellular trap
NFκB = Nuclear factor kappa B
NK = Natural killer
NL = Néphrite lupique
NLR = NOD-like receptor
NPSLE = Lupus neuropsychiatrique
NZB = New Zealand black
NZW = New Zealand white
OMS = Organisation mondiale de la santé
PACT = Protein activator of PKR
PAM = Protospacer adjacent motif
PBMC = Cellules mononuclées du sang périphérique
PERK = PKR-like endoplasmic reticulum kinase
PKR = Protéine kinase ARN double brin dépendante
RAX = PKR-associated protein X
RIG-I = Retinoic acid-inducible gene I
RNP = Ribonucléoprotéine
SAMHD1 = SAM And HD Domain Containing Deoxynucleoside Triphosphate Triphosphohydrolase 1
SAPL = Syndrome antiphospholipide
SNP = Single-nucleotide polymorphism
STAT = Signal transducer and activator of transcription
TLR = Récepteur de type Toll
TCR = Récepteur des lymphocytes T
TNFα = Tumor necrosis factor α
TRAP = Tartrase-resistant acid phosphatase
Treg = T régulateur
TREX = Three Prime Repair Exonuclease
TYK = Non-receptor tyrosine-protein kinase
WT = Wild type

Avant-propos

Cet ouvrage présente le travail de mon sujet de thèse « Rôle de PKR dans la physiopathologie du lupus » pour lequel j'ai consacré la majorité de mon temps.

Parallèlement à ce travail, j'ai eu l'occasion de travailler sur d'autres projets qui ont contribué à ma formation doctorale :

- étude de la différenciation des lymphocytes B chez les patients lupique. Nous montrons que les lymphocytes B naïfs se différencient en lymphocytes B matures après stimulation par l'IFNα en passant par la phosphorylation de STAT3. Par la suite, nous avons testé un inhibiteur de STAT3, en cours d'étude clinique dans d'autres maladies autoimmunes, afin d'évaluer son efficacité sur la différenciation des lymphocytes B et pouvoir peut-être l'utiliser dans le cadre de la maladie lupique.

- étude de l'expression des gènes induit par le TNFα dans la synoviale de patients atteints d'arthrite rhumatoïde. Nous montrons que l'expression de ces gènes corrèle avec l'activité de la maladie et qu'elle prédit l'absence de réponse au traitement quel que soit le médicament prescrit [1].

- participation au projet européen PreciseSADS dans un groupe d'étude de la physiopathologie du lupus des différents modèles lupiques murins. Ce projet a pour but de définir une nouvelle classification moléculaire des maladies autoimmunes systémiques afin de trouver de nouveaux biomarqueurs cliniques. A ce jour, ce projet m'a permis de publier une revue en collaboration avec le professeur Renaudineau de l'UBO à Brest, sur les différences observées au niveau des populations lymphocytaires entre les modèles lupiques MRL/lpr et B6.*Sle1*/*Sle2*/*Sle3* [2]. Le projet est toujours en cours d'étude et débouchera sur d'autres publications.

Table des matières

INTRODUCTION **15**

1. Lupus érythémateux disséminé **17**
1.1. Généralités **17**
1.2. Epidémiologie **18**
1.3. Physiopathologie **18**
1.3.1. Les facteurs immunologiques 19
1.3.1.1. Apoptose / NETose 20
1.3.1.2. Les complexes immuns 22
1.3.1.3. Les cellules dendritiques 23
1.3.1.3.1. Les cellules dendritiques myéloïdes 25
1.3.1.3.2. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes 26
1.3.1.4. Les lymphocytes T 26
1.3.1.4.1. Les lymphocytes T CD4 26
1.3.1.4.1.1. Les lymphocytes T helper folliculaire (Thf) 27
1.3.1.4.1.2. Les lymphocytes T helper 1 et 2 (Th1 et Th2) 28
1.3.1.4.1.3. Les lymphocytes T helper 17 (Th17) et T régulateurs (Treg) 28
1.3.1.4.2. Les lymphocytes T CD8 29
1.3.1.4.3. Les lymphocytes T double négatif (T DN) 31
1.3.1.5. Les lymphocytes B 31
1.3.1.6. Cytokines 34
1.3.1.6.1. L'IFNα 35
1.3.1.6.2. L'interleukine 6 (IL6) 37
1.3.1.6.3. BAFF 38
1.3.1.6.4. L'interleukine 17 (IL17) 39
1.3.1.6.5. Le TNFα 39
1.3.2. Facteurs génétiques (polygénique / monogénique) 40
1.3.2.1. Gènes déficients/mutés 41
1.3.2.2. Gènes de prédisposition 42
1.3.3. Facteurs environnementaux 42
1.3.4. Remarque conclusive concernant la physiopathologie du lupus 43
1.4. Modèles murins **44**
1.4.1. Modèles classiques 44
1.4.1.1. NZB/W 44
1.4.1.2. MRL/*lpr* 46
1.4.1.3. BXSB 46
1.4.2. Phénotypes cellulaires 47

2. PKR **48**
2.1. Généralités **48**
2.2. Structure **49**
2.2.1. Humaine 49

2.2.2. Murine ... 49
2.3. Activation ... 50
2.4. Rôle physiologique ... 52
2.4.1. Rôle dans la défense anti-virale ... 52
2.4.2. Rôle dans l'immunité innée ... 54
2.4.3. Rôle dans l'induction de l'apoptose ... 56
2.5. Autres senseurs nucléiques ... 56
2.5.1. MDA5 et RIG-I ... 56
2.5.2. ADAR1 ... 57
2.6. Intérêt en rhumatologie ... 61
2.7. Modèles souris ... 61

OBJECTIF ... 63

RÉSULTATS ... 67

Matériel et méthodes ... **69**

Résultats ... **81**
Surexpression de PKR dans des PBMC de patients lupiques ... 81
Phosphorylation spontanée de PKR dans des PBMC de patients lupiques ... 82
Effets de l'inhibition de PKR dans des PBMC lupiques ... 82
Effets de la 6-mercaptopurine sur la fonction de PKR ... 84
L'injection de 2-aminopurine dans des souris lupiques (NZB x NZW)F1 induit une diminution de l'atteinte rénale ... 85
Génération de souris lupiques PKR-inactivées avec la méthode speed-congenic ... 87
Génération de souris lupiques PKR-inactivées avec la méthode CRISPR/Cas9 ... 88
Vérification des off-targets ... 89
Confirmation du phénotype inactivé des souris CRISPR PKR -/- ... 90
Effets de l'inactivation de PKR au niveau du profil cellulaire des souris lupiques ... 91
Effets de l'inactivation de PKR sur les ganglions cervicaux des souris lupiques ... 93
Effets de l'inactivation de PKR sur la production des immunoglobulines des souris lupiques ... 95
Effets de l'inactivation de PKR sur l'atteinte rénale des souris lupiques ... 95

DISCUSSION ... 97

1. Éléments indiquant un rôle de PKR dans la maladie lupique humaine ... 99

2. Etude de l'effet de la délétion de PKR dans la physiopathologie du lupus du modèle murin ... 100

3. Mécanisme d'action potentiel de PKR dans la physiopathologie du lupus 103

4. Modèles murins de LED et signature interféron 104

5. Conclusion et perspectives 105

ANNEXES 107

Article 1 : Dysregulated lymphoid cell populations in mouse models of systemic lupus erythematosus 110

Article 2 : STAT3 Phosphorylation Mediates the Stimulatory Effects of Interferon Alpha on B Cell Differentiation and Activation in SLE 128

Article 3 : Higher expression of TNFα-induced genes in the synovium of patients with early rheumatoid arthritis with disease activity, and predicts absence of response to first line therapy 152

BIBLIOGRAPHIE 165

INTRODUCTION

Introduction

1. Lupus érythémateux disséminé

1.1. Généralités

Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie chronique auto-immune qui induit différentes manifestations cliniques. Cette maladie peut affecter la peau, les articulations, les poumons et dans sa forme la plus grave, elle peut affecter les cellules du sang, le système nerveux central et le rein. D'un point de vue biologique, le LED se caractérise par une perte de la tolérance à la chromatine et par la production d'auto-anticorps dirigés contre le matériel nucléaire. Selon la spécificité de ces auto-anticorps, certaines manifestations cliniques peuvent survenir plus fréquemment (Tableau 1) [3].

Anticorps	Manifestations cliniques
Anti-ADN double brin (ADNdb)	NL, NPSLE
Anti-SM	NL
Anti-histone	NPSLE
Anti-Ro/Anti-SSA	Lupus néonatal, bloc cardiaque congénital, dermatite
Anti-SSB/La	Lupus néonatal
Anti-RNP	NL
Anti-C1q	NL
Antiphospholipides, anti-cardiolipine	SAPL, thrombose, NPSLE, NL
Anti-α-énolase	NL
Anti-catalase	Peroxydation lipidique améliorée, activité élevée de la maladie
Anti-cathepsine G	NL
Anti-protéinase 3	Sérite, parodontite
Anti-lactoferrine	NL, manifestations cutanées, et sérite
Anti-myéloperoxidase	NL

RNP, ribonucléoprotéine ; SAPL, syndrome antiphospholipide; NL, néphrite lupique; NPSLE, lupus neuropsychiatrique

Tableau 1. Auto-anticorps produits dans le LED [4]. Les auto-anticorps produits durant la maladie lupique sont dirigés contre le matériel nucléaire et peuvent être, selon leurs spécificités, associés à des atteintes cliniques.

Le mot « lupus » signifie « loup » en latin. Ce terme est apparu au Moyen-âge et a été donné à cette maladie rhumatismale de par son atteinte cutanée en forme de papillon sur les joues et le nez des patients et ressemblant à une morsure de loup.

La maladie se caractérise par des périodes de poussées et de rémissions de durées imprévisibles.

Les traitements de base du lupus consistent en des corticoïdes et d'autres immunosuppresseurs. Cependant, ces traitements peuvent induire des effets secondaires indésirables, mais grâce à la recherche médicale, beaucoup d'acteurs clés de la physiopathologie du lupus ont été découverts et des traitements ciblant ces acteurs sont en cours d'études cliniques comme par exemple le belimumab (anti-BAFF (B cell activating factor)), le baricitinib (anti-JAK1 et 2) et l'anifrolumab (anti-récepteur à l'interféron-α). La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques est toujours en cours mais nécessite une meilleure connaissance de la physiopathologie de la maladie.

1.2. Epidémiologie

En Belgique, l'incidence du LED est de 1 à 10 nouveaux cas pour 100 000 habitants par an et sa prévalence à environ 1 cas pour 2000 habitants. La maladie peut apparaître à n'importe quel âge mais elle se manifeste le plus souvent entre 15 et 45 ans et touche les femmes dans 9 cas sur 10. Elle touche également plus souvent les populations non caucasienne (africains, asiatiques, latino-américains) et de manière plus sévère avec un taux de mortalité plus élevé.

1.3. Physiopathologie

Le développement du lupus comprend plusieurs étapes : perte de la tolérance aux autoantigènes nucléaires, amplification de la réponse auto-immunitaire et

atteinte des organes cibles. Les facteurs impliqués sont génétiques, environnementaux et immunologiques. La compréhension du mécanisme d'interaction de ces 3 facteurs est primordiale pour pouvoir développer des thérapies efficaces.

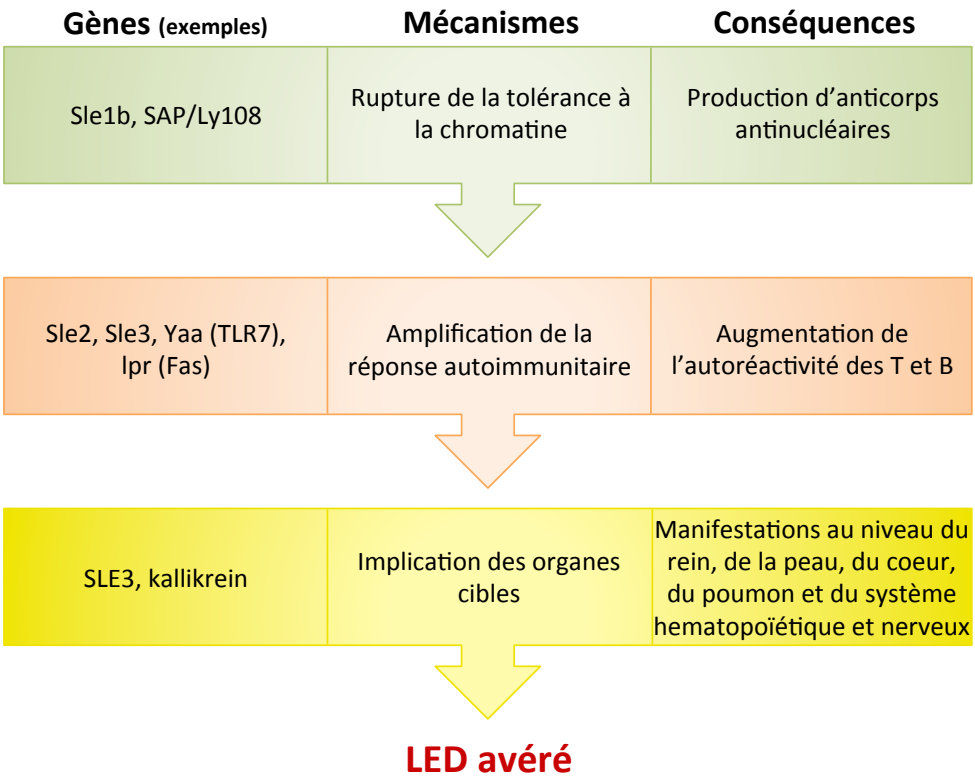


Figure 1. Le développement du lupus est un processus comprenant plusieurs étapes (exemple de gènes identifiés chez la souris) (adapté de [2]).

1.3.1. Les facteurs immunologiques

La réponse immunitaire qui se met en place suite à la présence d'un pathogène, peut être dérégulée à plusieurs niveaux dans la maladie lupique.

1.3.1.1. Apoptose / NETose

Il existe plusieurs processus bien distincts de mort cellulaire, parmi lesquels l'apoptose et la NETose, jouant chacun un rôle important dans la physiopathologie du lupus via le relargage de matériel nucléaire.

L'apoptose

L'apoptose est un mécanisme naturel de mise à mort d'une cellule, suite par exemple à une infection virale, à une blessure mécanique ou bien à la vieillesse. Le corps utilise ce mécanisme pour maintenir l'homéostasie sans induire d'inflammation. En condition physiologique, les cellules en apoptose sont rapidement éliminées par les macrophages. Dans le cadre du lupus, il a été montré qu'il y avait un défaut de clairance des cellules apoptotiques par les macrophages [5], induisant une accumulation de débris nucléaire dans l'environnement. Ce matériel apoptotique non éliminé devient une cible immunogène qui peut être soit directement phagocyté par les cellules dendritiques, soit se complexer à leurs anticorps et devenir des complexes immuns, menant à des conséquences pathogéniques.

La NETose

Les neutrophiles sont les leucocytes du sang les plus abondants et ils sont la première ligne de défense du système immunitaire contre une infection lors d'une blessure.

La NETose est un mécanisme de suicide naturel des neutrophiles qui, en mourant, relarguent un filet composé de chromatine, d'histones qui ont un effet bactéricide, et de granules antimicrobiennes (NET : neutrophil extracellular trap) emprisonnant les pathogènes tels que les bactéries, les virus, les champignons et les parasites, pour les détruire. La NETose peut également être stimulées par des cytokines proinflammatoires tels que l'interféron α (IFNα) et le TNFα. Contrairement à l'apoptose, la NETose induit de l'inflammation due aux cytokines proinflammatoires sécrétées par les cellules stimulées par les NETs [6, 7].

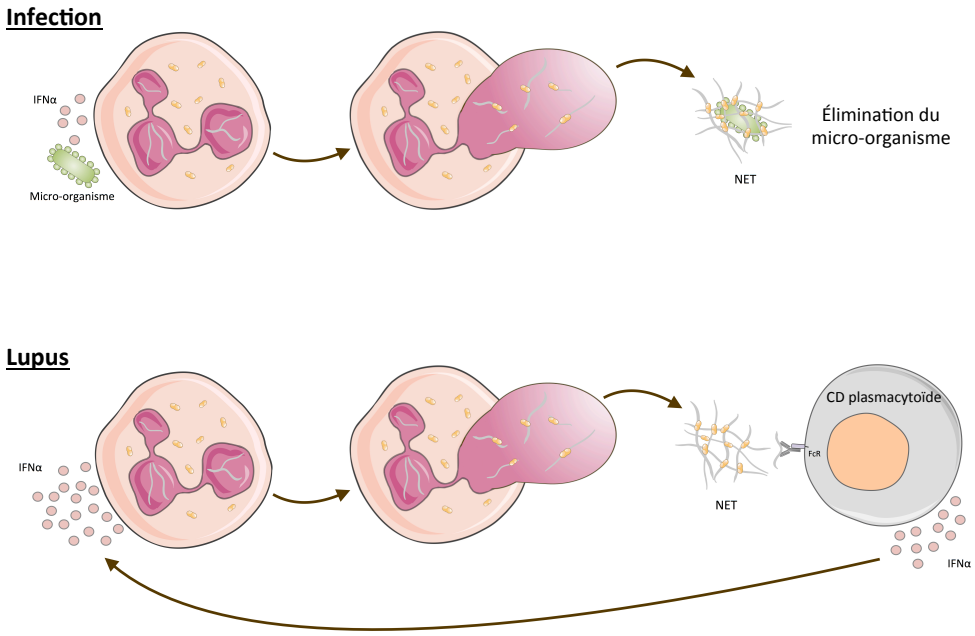


Figure 2. Induction de la NETose lors d'une infection ou dans le cas du lupus. En cas d'infection par un micro-organisme, les neutrophiles rentrent en NETose afin d'éliminer ce micro-organisme grâce à l'activité bactéricide des NETs. Dans le cadre du lupus, dû à l'abondance d'IFNα dans l'environnement, les neutrophiles rentrent spontanément en NETose, et les NETs rejetés dans l'environnement, n'étant pas dégradés à cause du défaut de clairance des macrophages que l'on retrouve chez la plupart des patients lupiques, se retrouvent phagocytés par les cellules dendritiques plasmacytoïdes qui vont induire la production d'IFNα.

La plupart des NETs des patients lupiques ont un défaut de dégradation par les macrophages. De plus, l'IFNα étant une cytokine fortement exprimée dans la maladie lupique, les NETs se retrouvent en abondance dans l'environnement, se faisant dès lors phagocyter par les cellules dendritiques (CD) dans lesquelles ils stimulent les récepteurs de type Toll (TLRs) qui induisent la sécrétion d'IFNα, formant alors un cercle vicieux (IFNα→NETose→IFNα) (Figure 2). Les NETs non dégradés se retrouvent également dans le rein où ils induisent l'activation du complément en se liant à C1q, provoquant une amplification de l'inflammation tissulaire [8, 9].

1.3.1.2. Les complexes immuns

Les auto-anticorps produits durant la maladie lupique, se lient à leurs antigènes et forment les complexes immuns. Ceux-ci sont le bras effecteur de la maladie lupique : comprendre le lupus c'est comprendre comment sont produits les auto-anticorps. Les antigènes peuvent être soit circulants, soit présents dans un tissu cible. C'est le cas par exemple des anticorps anti-nucléosome qui circulent jusque dans la membrane basale glomérulaire du rein où ils se lient à leur antigène et induisent des complexes immuns directement à cet endroit, mais ce concept est toujours débattu. Alternativement, les anticorps anti-nucléosomes pourraient reconnaître des cibles antigéniques croisées tels que des héparans sulfate présents dans la membrane basale glomérulaire [10, 11]. Les complexes immuns circulants peuvent également se retrouver dans le rein dans le but d'être éliminés, mais dû à leur grande taille ils se retrouvent piégés dans la membrane glomérulaire (Figure 3). Au final, les dépôts de complexes immuns activent le complément, provoquant, dans le rein, une inflammation glomérulaire et le recrutement de cellules inflammatoires (macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques, lymphocytes) conduisant à une glomérulonéphrite lupique, une complication sévère du LED. Les dépôts de complexes immuns peuvent également avoir lieu dans d'autres organes comme le derme provoquant un rash cutané, une autre manifestation clinique de la maladie.

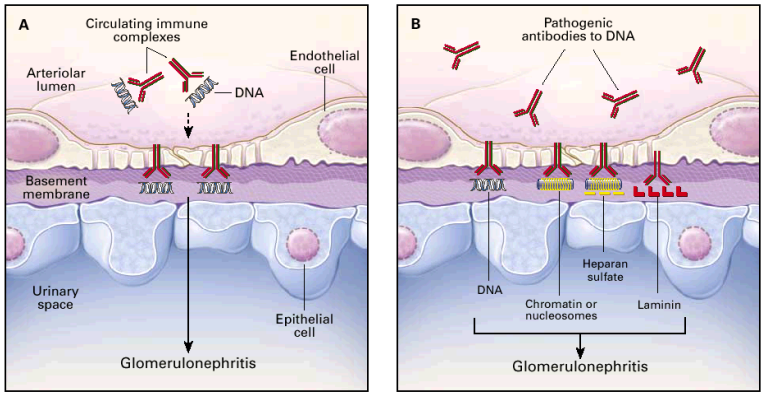


Figure 3. Mécanismes par lesquels les anticorps anti-ADN causent des dommages tissulaires (figure reprise de [12]). Les anticorps anti-ADN peuvent se retrouver dans la membrane basale glomérulaire soit sous forme de complexes immuns, qui de par leurs tailles restent coincés dans la membrane basale glomérulaire (partie A), soit car ils reconnaissent des composants de la membrane basale glomérulaire structurellement proches de l'ADN (partie B). La présence de ces anticorps dans le membrane basale glomérulaire induit l'activation du complément provoquant une inflammation et conduisant finalement à une glomérulonéphrite lupique.

1.3.1.3. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes qui contribuent, dans leur forme immature, à la maintenance de la tolérance [13]. Lors d'une infection, les cellules dendritiques s'activent et jouent un rôle important dans l'activation des lymphocytes T CD4 et CD8.

Dans le cas du lupus, les cellules dendritiques phagocytent le matériel nucléaire environnant ou internalisent les complexes auto-immuns via leur récepteur Fc gamma pour les présenter ensuite aux TLRs présents dans leurs endosomes. Les TLRs stimulés par les antigènes nucléaires, induisent la production d'IFNα, conduisant à l'activation et la maturation de la cellule dendritique. Par ailleurs, Blanco et al. ont montré que l'IFNα, qui est surexprimée chez les patients lupiques, induit la différenciation des monocytes en cellules dendritiques spontanément actives et matures [14],

engendrant une surexpression à leur surface des molécules de costimulation des lymphocytes T et des CMH-II (complexe majeur d'histocompatibilité de type II). Dès lors, dû à la pression activatrice constante exercée par les cellules dendritiques sur les lymphocytes T auto-réactifs, ceux-ci s'activent et se multiplient, provoquant la rupture de la tolérance. Les cellules dendritiques sont donc des cellules clés dans l'induction et la progression du lupus.

Les cellules dendritiques peuvent être divisées en deux sous-populations : les cellules dendritiques myéloïdes et les cellules dendritiques plasmacytoïdes, ayant chacune leurs propres caractéristiques.

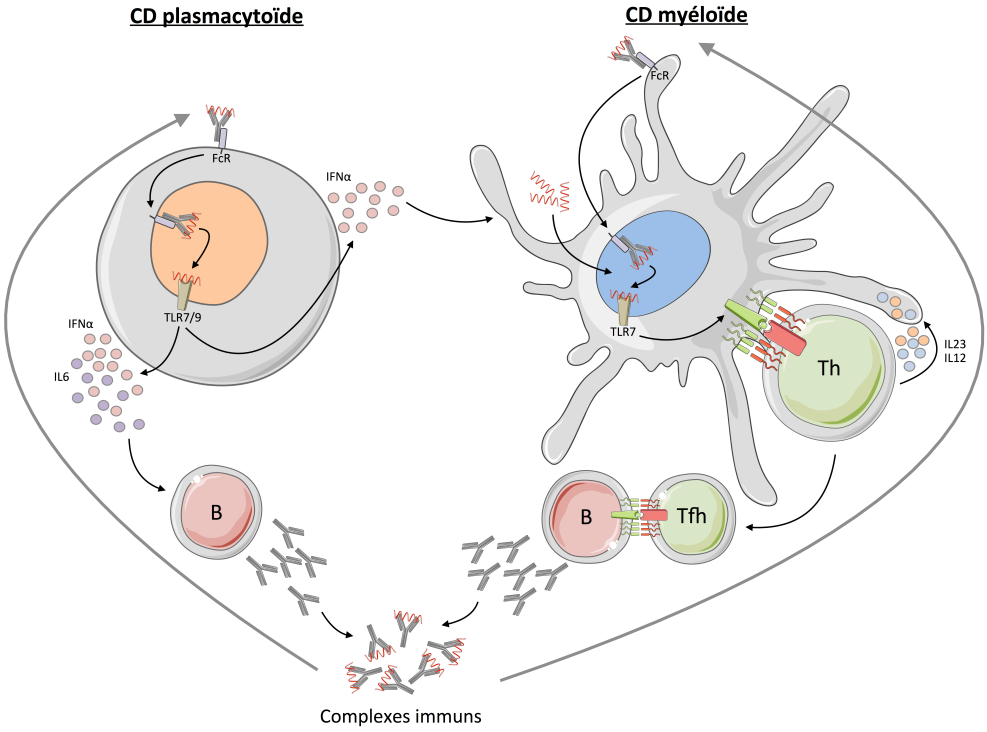


Figure 4. Rôle des cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes dans la physiopathologie du lupus (adapté de [15]). Les cellules dendritiques plasmacytoïdes endocytent les complexes immuns via leur récepteur Fc, les présentent aux senseurs nucléiques comme TLR7 et TLR9 qui induisent la production de cytokines telles que l'IFNα et l'IL6. Les cellules dendritiques myéloïdes peuvent quant à elles endocyter directement le matériel nucléaire présent dans l'environnement ou également sous forme de complexes immuns. Après activation, ces cellules induisent la stimulation des lymphocytes T et B autoréactifs (voir plus loin).

1.3.1.3.1. Les cellules dendritiques myéloïdes

Les cellules dendritiques myéloïdes se caractérisent par l'expression de CD11c et CD11b. Ces cellules peuvent endocyter directement le matériel apoptotique présent dans l'environnement contrairement aux cellules dendritiques plasmacytoïdes qui ne peuvent l'endocyter que via les complexes immuns [16]. Une fois activée, les cellules dendritiques myéloïdes stimulent les lymphocytes T auto-réactifs via une grande expression de molécules de co-stimulation et de CMH-II à leur surface. Par la suite, les lymphocytes T activés stimulent les lymphocytes B auto-réactifs, producteurs des auto-anticorps.

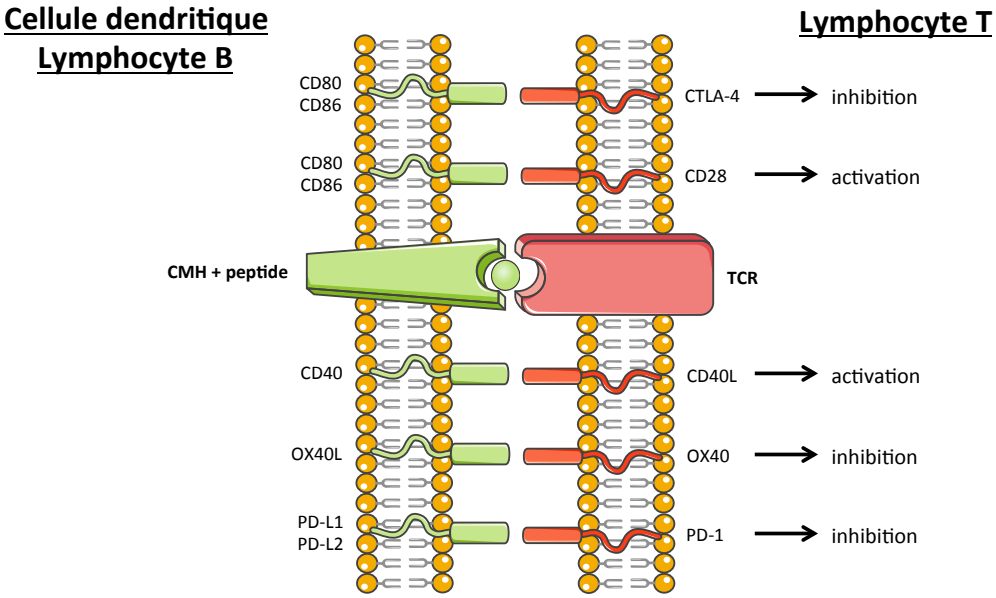


Figure 5. Molécules de co-stimulation des cellules dendritiques, des lymphocytes B et des lymphocytes T (adapté de [17]). Selon les molécules de co-stimulation présentées à la surface des cellules dendritiques ou des lymphocytes B, ceux-ci peuvent activer ou inhiber le lymphocyte T récepteur.

1.3.1.3.2. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes se caractérisent par l'absence d'expression de CD11c et CD11b. Ces cellules sont les plus grandes productrices d'IFNα, via la stimulation de TLR7 et TLR9 par les acides nucléiques endocytés sous forme de complexes immuns, et jouent dès lors un rôle clé dans la physiopathologie du lupus. L'IFNα sécrété induit la maturation des autres cellules dendritiques de l'environnement ainsi que l'activation directe des lymphocytes B auto-réactifs et la production des auto-anticorps par ceux-ci.

1.3.1.4. Les lymphocytes T

Les lymphocytes T se caractérisent par l'expression d'un TCR (T-cell receptor) à leur surface, capable de reconnaître un antigène présenté par un CMH à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène. On distingue plusieurs types de lymphocytes T selon les CD (cluster de différenciation) exprimés à leur surface : CD4 / CD8 ou DN (double négatif)

Les lymphocytes T jouent un rôle clé dans la physiopathologie du lupus, notamment de par leur capacité à stimuler les lymphocytes B auto-réactifs qui vont produire les auto-anticorps.

1.3.1.4.1. Les lymphocytes T CD4

Les lymphocytes T CD4 se caractérisent par leur reconnaissance des CMH de type II présents sur les cellules présentatrices d'antigène (monocytes, macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B).

Les lymphocytes T CD4 naïfs peuvent se différencier en plusieurs effecteurs T helper (Th) selon l'environnement en cytokines dans lesquels ils se trouvent et selon le signal perçu par leur TCR [18].

1.3.1.4.1.1. Les lymphocytes T helper folliculaire (Thf)

Les lymphocytes Thf jouent un rôle crucial dans l'activation des lymphocytes B auto-réactifs, et la formation des centres germinatifs (CG) dans les tissus lymphoïdes secondaires.

Les lymphocytes Thf se différencient à partir des lymphocytes T CD4 naïfs dans les tissus lymphoïdes secondaires suite à une interaction avec une cellule présentatrice d'antigène. Après plusieurs étapes, les lymphocytes Thf matures migrent dans les CG où ils interagissent avec les lymphocytes B spécifique d'un antigène. Ces lymphocytes B activés entrent alors en stade de maturation où ils subissent une commutation isotypique et une hypermutation somatique résultant en la synthèse de « long-lived » plasmocytes, producteurs d'anticorps de hautes affinités, et de lymphocytes B mémoires [19, 20]. Les lymphocytes Thf se caractérisent par une forte sécrétion d'IL21 qui régule la prolifération et la commutation de classe des lymphocytes B [21].

La majorité des auto-anticorps IgG des patients lupiques ont subi une hypermutation somatique, suggérant l'implication des lymphocytes Thf dans l'activation des lymphocytes B auto-réactifs dans les CG [22]. Il a également été montré que des lymphocytes Thf extra-folliculaire circulaient en grande quantité dans le sang périphérique de patients lupiques et que cette quantité mesurée corrélait avec l'activité de la maladie [23]. De plus, il a été montré que des Thf se situaient directement au niveau du rein dans la néphrite lupique, de par la formation de CG ectopiques dans les tissus enflammés [20].

Un grand nombre de molécules impliquées dans la génération et la régulation des Thf sont également dérégulées dans la maladie lupique, comme CD40L, ICOS et OX40 qui se retrouvent surexprimés sur les lymphocytes T CD4 des

patients lupiques [21]. Tout ceci fait des lymphocytes Thf une nouvelle cible thérapeutique dans le lupus [15].

1.3.1.4.1.2. Les lymphocytes T helper 1 et 2 (Th1 et Th2)

Les lymphocytes Th1 et Th2 diffèrent de par leur production en cytokines et leur rôle dans l'immunité. Les lymphocytes Th1 induisent principalement une réponse immunitaire cellulaire comme la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes cytotoxiques via la sécrétion d'IL2. Quant aux lymphocytes Th2, ils induisent davantage la production d'anticorps via, par exemple, la différenciation des lymphocytes B en lymphoblastes par l'intermédiaire, entre autre, de l'IL4 [24]. Selon les connaissances actuelles de la maladie lupique, il ne semble pas y avoir d'impact de la présence ou non de Th1 ou Th2 au niveau de la physiopathologie et des manifestations de la maladie.

1.3.1.4.1.3. Les lymphocytes T helper 17 (Th17) et T régulateurs (Treg)

Les lymphocytes Th17 se différencient à partir des lymphocytes T CD4 naïf et sont les principaux producteurs de l'IL17, une cytokine pro-inflammatoire pathogénique dans les maladies auto-immunes. Il a été montré que les patients lupiques ont un nombre de cellules Th17 ainsi qu'un taux d'IL17 élevés [25]. De plus, ces lymphocytes Th17 se retrouvent infiltrés dans les reins des patients atteints de néphrite lupique [26].

Les lymphocytes Treg ont un rôle opposé aux Th17 car ils sont immunosuppresseurs et préservent de l'auto-immunité. Ainsi, une balance équilibrée Treg/Th17 permet le maintien de l'homéostasie immunitaire. Cependant on constate que chez les patients atteints de néphrite lupique, l'augmentation des lymphocytes Th17 s'accompagne d'une diminution des

lymphocytes Treg, dérégulant la balance Th17/Treg et contribuant à l'inflammation tissulaire [27, 28].

Les lymphocytes Treg se différencient eux aussi à partir des lymphocytes T CD4 naïfs, via, entre autres, leur stimulation par l'IL2. Dès lors, des études cliniques sont actuellement en cours où des faibles doses d'IL2 sont données à des patients lupiques. Les résultats préliminaires de ces études montrent une augmentation du nombre des Treg chez ces patients ainsi qu'une diminution des Th17 et des Thf, avec une amélioration significative de l'activité de la maladie [29-31].

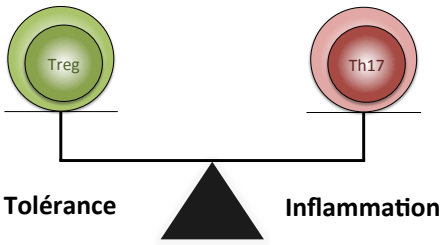


Figure 6. Balance Treg / Th17. Selon la prédominance de différenciation d'une des 2 populations (Treg ou Th17), l'homéostasie est rompue et la balance penche plus vers la tolérance (Treg) ou l'inflammation (Th17).

1.3.1.4.2. Les lymphocytes T CD8

Les lymphocytes T CD8, dits cytotoxiques, ont pour rôle de détruire les cellules présentant l'antigène qu'ils reconnaissent (cellules infectées par un virus, cellules cancéreuses, ou cellules du soi dans les maladies auto-immunes comme le diabète ou encore la maladie de Goodpasture) [32, 33].

Dans le sang des patients lupiques, il y a une augmentation du nombre et de l'activation des lymphocytes T CD8 en corrélation avec l'activité de la maladie [34]. De plus, on retrouve ces lymphocytes infiltrant les reins dans la néphrite lupique [35]. Il a également été montré que les CD8 avec un enrichissement

des gènes exprimés par les lymphocytes T mémoires (CD27, CD44, …), ainsi que ceux de la voie de l'IL7 récepteur (dont la stimulation permet l'amplification des T CD8) et ceux de la voie de signalisation du TCR, sont prédictifs d'un mauvais pronostic au long terme (maladie récurrente) [36].

Blanco et al. ont montré, par une expérience *in vitro*, que les cellules dendritiques dérivées de monocytes stimulés par de l'IFNα, provenant de sérum de patients lupiques actifs, induisent la différenciation des lymphocytes T CD8 naïfs en T CD8 cytotoxiques identique au phénotype observé *in vivo* (expression intracellulaire de granzyme B). Ils montrent ensuite que ces lymphocytes cytotoxiques sont capables d'induire la synthèse d'auto-anticorps par destruction de leurs cellules cibles [34]. En effet, le matériel nucléaire relargué pendant cette mort cellulaire, se retrouve fragmenté par la granzyme B, conduisant à la création de nouveaux antigènes non-tolérogènes [37].

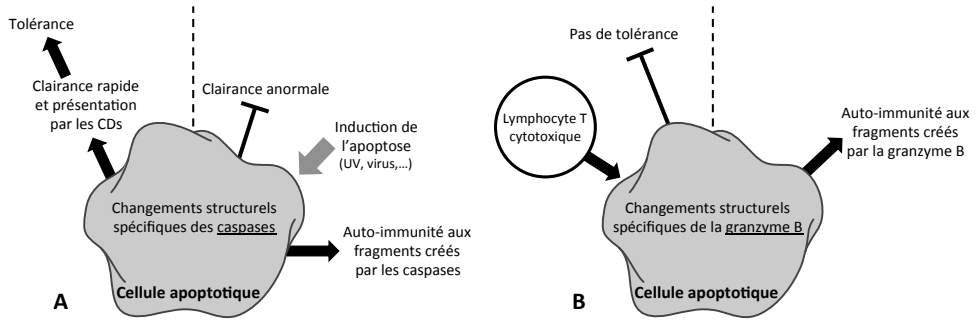


Figure 7. Modèle de sélection des antigènes durant la mort cellulaire (adapté de [37])
A, mort homéostatique. La forme prédominante de la molécule tolérogène durant le développement et l'homéostasie est la forme induite par les caspases. La tolérance aux fragments clivés par les caspases résulte d'une clairance normale. **B**, mort pro-immune. Certaines circonstances pro-immunes induisent une activité préférentielle de la voie granzyme B, générant de nouveaux fragments d'auto-antigènes non préalablement tolérés par l'hôte.

1.3.1.4.3. Les lymphocytes T double négatif (T DN)

Les lymphocytes T DN se caractérisent par l'absence d'expression à leur surface des clusters de différenciation 4 et 8. En condition normale, les lymphocytes T DN ont un rôle immunosuppresseur. Cependant, dans le lupus, il y a une augmentation des lymphocytes T DN sanguins [38]. Une étude montre que ces lymphocytes infiltrent les reins des patients lupiques, induisent la production d'auto-anticorps par les lymphocytes B, et produisent de l'IL17, une cytokine pro-inflammatoire qui recrute les neutrophiles dans les tissus conduisant aux lésions rénales [39]. L'origine de ces lymphocytes n'est pas encore claire mais il semblerait que chez les patients lupiques, ces lymphocytes dériveraient des lymphocytes T CD8 qui, après stimulation chronique de leur TCR par un auto-antigène dans les tissus enflammés, réduiraient l'expression de leur récepteur CD8 [40, 41].

1.3.1.5. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont les cellules productrices des auto-anticorps pathogènes dans la maladie lupique. Ils se caractérisent le plus communément par l'expression de CD19 à leur surface.

Le développement des lymphocytes B commence dans la moelle osseuse où ils subissent diverses étapes de maturation et de sélection avant de rejoindre les tissus lymphoïdes secondaires pour y rencontrer leur antigène.

La tolérance des lymphocytes B aux auto-antigènes passe par plusieurs points de contrôle durant leur développement et leur maturation, dans la moelle osseuse et en périphérie. Une rupture de la tolérance centrale et périphérique a été démontrée dans le cadre du lupus [42]. Pour commencer, une proportion importante des lymphocytes B immatures sortant de la moëlle osseuse est auto-réactive chez les patients lupique et montre donc un défaut au niveau de

la tolérance centrale. D'ailleurs, des gènes de susceptibilité à la tolérance centrale des lymphocytes B, ont été trouvé dans les locus *Sle1* et *Sle2* des souris lupiques NZM2410 [43, 44], et chez l'humain avec le gène *PTPN22* [45]. Il a également été montré que les patients lupiques avaient un défaut au niveau de la délétion des lymphocytes B transitionnels auto-réactifs, dû à l'excès de la cytokine BAFF dans l'environnement, empêchant l'apoptose de ces cellules (voir 1.3.1.6.3.). Ensuite, concernant la tolérance périphérique qui s'effectue à 3 stades de développement du lymphocyte B : les B naïfs, les B des centres germinatifs et les B mémoires, il a été montré qu'un important point de contrôle prévenant la différenciation des lymphocytes B autoréactifs naïfs en cellules mémoires, est défectueux chez les patients lupiques [46, 47].

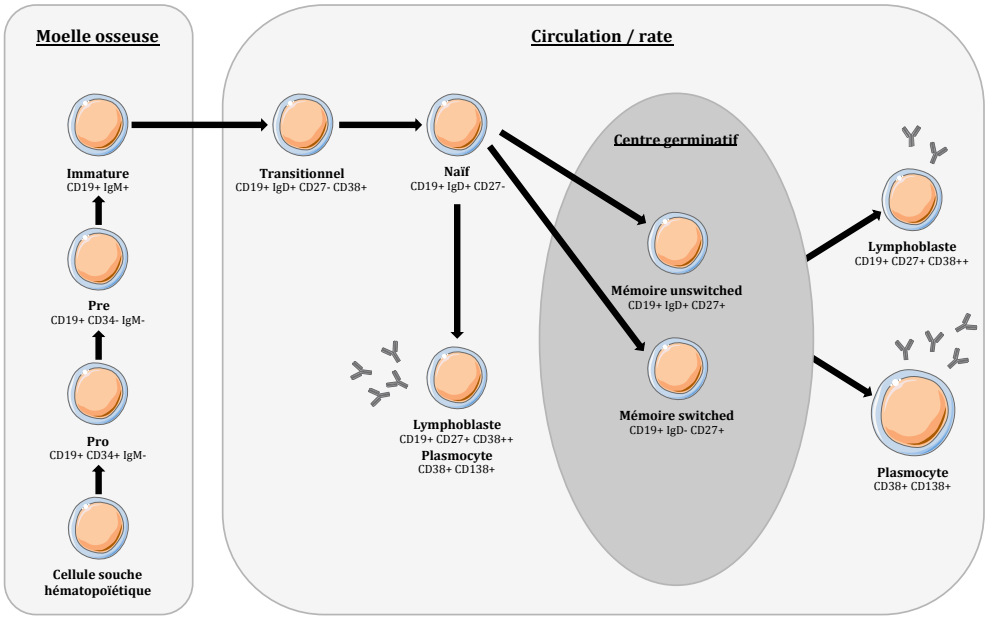


Figure 8. Développement des lymphocytes B (adapté de [48]). Le développement des lymphocytes B débute dans la moelle osseuse, puis ceux-ci intègrent la circulation sous forme de lymphocytes B transitionnels. Ils restent naïfs tant qu'ils ne rencontrent pas leur antigène qui peut avoir lieu dans les CG, donnant lieu à la différenciation soit en mémoire unswitched (réponse indépendante des lymphocytes T en zone marginale du CG : anticorps de faible affinité) soit en mémoire switched (réponse dépendante des lymphocytes T en zone folliculaire du CG : anticorps de haute affinité) puis en lymphoblastes et plasmocytes (long-lived). La rencontre avec l'antigène peut aussi avoir lieu en-dehors des CG, donnant lieu à une différenciation en lymphoblastes et plasmocytes (short-lived).

Concernant l'activation du lymphocyte B, lorsque celui-ci rencontre son antigène dans les CG, il subit une hypermutation somatique ainsi qu'une commutation de classe, rendant les anticorps produit par ce lymphocyte B activé plus spécifique et de haute affinité. Les lymphocytes B activés dans les CG par leur antigène puis par les Thf, peuvent engendrer des « long-lived » plasmocytes ou des lymphocytes B mémoires. L'activation des lymphocytes B peut également avoir lieu en-dehors des CG, soit une activation extra-folliculaire, ce qui donnera lieu à des « short-lived » plasmocytes. Une fois activés, les lymphocytes B sécrètent des cytokines comme l'IL6, l'IL10 et le TGFβ, qui vont induire une amplification de la réponse immunitaire [19, 20, 49].

Chez les patients lupiques, les lymphocytes B sont hyper-activés [50], de par l'abondance des auto-antigènes présents dans l'environnement (matériel apoptotique qui stimule le BCR et les TLRs 7 et 9), mais également par la costimulation avec les lymphocytes T et les cellules dendritiques activés. De plus, il a été montré que les lymphocytes B lupiques avaient un seuil d'activation plus bas que les non lupiques [51]. Les lymphocytes B étant également des cellules présentatrices d'antigènes (endocytose des complexes immuns), leur abondance par rapport aux cellules dendritiques en fait des cellules cibles pour les traitements.

De nombreuses cytokines surexprimées dans le LED (voir 1.3.1.6.) jouent potentiellement un rôle dans l'activation et la différenciation des lymphocytes B caractéristiques de la maladie: BAFF, IL6, IL21, IL10 mais aussi IFNα. Au cours de mon travail de thèse, j'ai pu montrer que de toutes ces cytokines, l'IFNα est celle qui reproduit au mieux le phénotype caractéristique des lymphocytes B lupiques, quand elle est ajoutée à des cultures de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) contrôles en même temps qu'un anticorps anti-IgM : diminution des lymphocytes B naïfs et augmentation des lymphocytes B mémoires switched, des doubles négatifs et des lymphoblastes, ainsi que surexpression du marqueur d'activation CD95 (Fas) à la surface de ces sous-populations de lymphocytes B. Qui plus est, l'IFNα, contrairement à l'IL6, l'IL10, l'IL21 ou BAFF, joue un effet direct sur la différenciation des lymphocytes B naïfs stimulés par un anti-IgM et un anti-CD40 et y stimule l'expression de CD95 et CD38. Nous avons par ailleurs montré que, dans les lymphocytes B lupiques, STAT3, plutôt que STAT1, participe à la transduction

des signaux induits par l'IFNα, une observation avec de potentielles retombées thérapeutiques, au vu du développement actuel d'agents inhibiteurs de STAT3 dans le domaine de l'oncologie [52]. De ces résultats émerge donc le rôle de l'IFNα sur le phénotype d'activation et de différenciation des lymphocytes B lupiques, en accord avec notre compréhension actuelle du rôle central de cette cytokine dans la pathogénie de la maladie.

De multiples études sont en cours pour évaluer l'efficacité de cibler les lymphocytes B dans le lupus. Plusieurs stratégies existent comme des anticorps ciblant les marqueurs de surface (CD20) ou bien des molécules ciblant la croissance et la survie des lymphocytes B (BAFF). Le rituximab, un anticorps anti-CD20 chimérique dont la partie Fab est d'origine murine, permet la déplétion des lymphocytes B mais ne permet pas l'élimination des plasmocytes et des lymphoblastes qui perdent le marqueur membranaire CD20. Ce médicament est efficace dans certaines situations cliniques au cours du lupus, comme la néphrite lupique, mais il n'a pas pu montrer une efficacité significative contre un placebo lors des études cliniques. L'ocrelizumab, un anticorps humanisé (90 à 95%) reconnaissant un autre site de la protéine CD20 a été testé, et montre également un effet positif dans certaines situations cliniques, mais les études ont dû être arrêtées plus tôt car ce médicament induisait une augmentation des infections sévères. Les anti-CD20 sont finalement indiqués dans les traitements de dernier recourt de la néphrite lupique. Outre les anti-CD20, des études ciblant CD22, une protéine transmembranaire nécessaire à l'activation du lymphocyte B après interaction avec le BCR stimulé, ont été menées et malgré des premiers résultats encourageant lors des phase I et II, la phase III de l'étude n'a pas montré d'efficacité du médicament et son développement a été arrêté [53, 54].

1.3.1.6. Cytokines

Plusieurs cytokines sont impliquées dans l'activité de la maladie ainsi que dans l'atteinte des organes. Elles sont donc également des facteurs clés de la

physiopathologie du lupus et par conséquence la cible de nombreuses thérapies.

1.3.1.6.1. L'IFNα

L'IFNα est LA cytokine clé de la maladie lupique. En 1982, elle a été premièrement découverte comme étant surexprimée dans le sérum des patients lupiques comparés à des contrôles [55]. Ensuite, en 2003, grâce à l'évolution des technologies, les scientifiques ont pu étudier le profil d'expression des transcrits des cellules du sang des patients, par l'utilisation de microarrays. Les résultats de ces études montrent que les gènes interféron-induits sont surexprimés chez 2/3 des patients lupiques, un phénomène que les scientifiques appelleront la « signature interféron » [56, 57].

L'IFNα se subdivise en 13 sous-types et est produite par plusieurs cellules mais les principales cellules productrices sont les cellules dendritiques plasmacytoïdes (100 à 200 fois plus que les autres cellules) [58]. L'IFNα induit la différenciation des monocytes en cellules dendritiques, comme vu au chapitre « cellules dendritiques » [14], mais également la transcription de centaines de gènes qui activeront finalement les cellules dendritiques et les lymphocytes T et B [59]. Cette cytokine influence donc l'activation et la fonction de nombreux acteurs immunitaires, témoignant des effets étendus de cette cytokine dans la physiopathologie du lupus. D'ailleurs, de nombreux gènes de susceptibilité au lupus se retrouvent dans la voie des IFN de type I. En effet, plusieurs polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP, single-nucleotide polymorphism) ont été mis en évidence dans des gènes impliqués dans la voie des TLRs et des IFN de type I : IRF5, un facteur de transcription de la voie TLR-MyD88 ; TYK2, une protéine liée au récepteur à l'IFN de type I (IFNAR1) induisant l'activation de la voie JAK/STAT ; TLR7 et TLR9, respectivement des récepteurs des ARN simple brin et des ADN CpG non-méthylés. Les variants alléliques induit par ces SNPs sont impliqués dans la maladie lupique lorsqu'ils sont accumulés, menant à une surexpression d'IFNα [60, 61]. Cette surproduction d'IFNα conduit à une surexpression des molécules CMH-II à la surface des cellules présentatrices d'antigène, activant

alors les lymphocytes T autoréactifs qui à leur tour vont activer les lymphocytes B producteurs d'auto-anticorps (Figure 9).

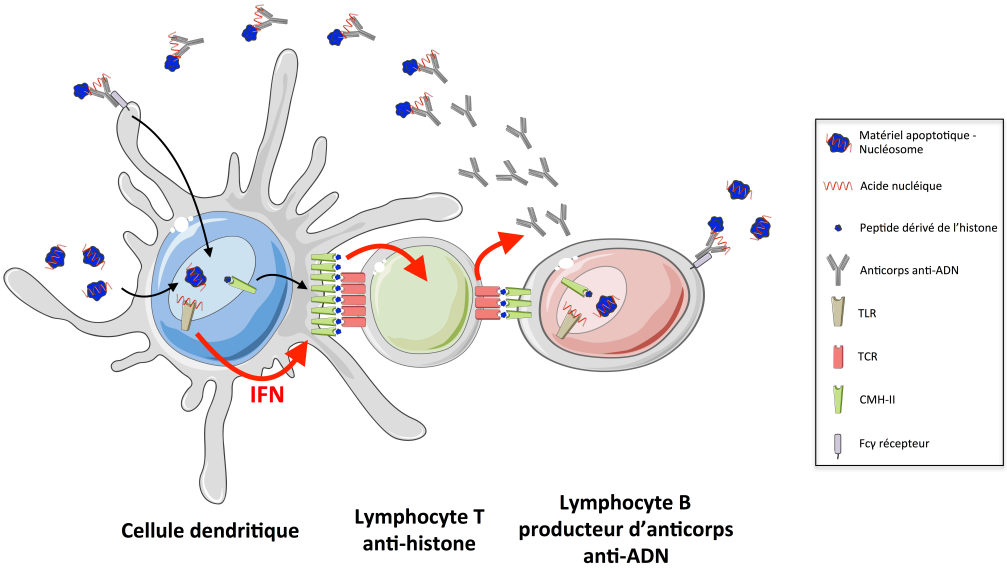


Figure 9. Schéma montrant les effets de la surproduction de l'IFNα sur l'activation des lymphocytes T et B menant à la production d'auto-anticorps (adapté de [62]). Le matériel apoptotique n'étant pas dégradé par les macrophages chez la plupart des patients lupiques, se retrouve endocyté par les cellules dendritiques myéloïdes qui décomposent ce matériel pour ensuite présenter un peptide dérivé de l'histone sur leur CMH-II. Parallèlement, les acides nucléiques stimulent leurs senseurs comme les TLRs, et dû à la présence de gènes de susceptibilité chez les patients lupiques, les cellules dendritiques induisent une forte production d'IFN de type I, conduisant à une maturation de ces cellules et la présentation de plusieurs CMH-II à leur surface. Les lymphocytes T anti-histone de faible affinité que l'on retrouve dans toute la population, se retrouvent dès lors fortement stimulés par les cellules dendritiques, conduisant à une rupture de la tolérance. Ces lymphocytes T stimulent à leur tour des lymphocytes B producteurs d'anticorps anti-ADN présentant également des peptides dérivés de l'histone, de par leur fonction de cellules phagocytaires, et aboutissant à la production d'auto-anticorps de haute affinité et pathogéniques.

L'IFNα jouant un rôle important dans la physiopathologie du lupus, beaucoup de traitements visant différents niveaux de la voie de signalisation de l'IFNα

sont en cours de développement. Il y a par exemple des études sur des molécules visant à inhiber les TLRs, les cellules dendritiques plasmacytoïdes, les récepteurs à l'IFNα (anifrolumab actuellement en phase III de développement dans le lupus) et l'IFNα lui-même [63]. Concernant un traitement ciblant directement l'IFNα, il y a l'IFNα kinoïd, une molécule composée d'un transporteur particulièrement immunogène (KLH) sur lequel sont fixées des molécules d'IFNα2b et qui induit une réponse polyclonale dirigée contre les 13 variants de l'IFNα, contrairement aux autres stratégies d'inhibition de l'IFNα ciblant souvent un seul variant. Au laboratoire, nous avons collaboré avec la société créatrice du vaccin, pour étudier les réponses de ce vaccin chez les patients lupiques, et les résultats de cette étude montre que le vaccin induit une réponse anti-IFNα polyclonale qui diminue la signature interféron des patients [64]. Le vaccin est maintenant en phase IIb de développement.

1.3.1.6.2. L'interleukine 6 (IL6)

L'IL6 est une cytokine sécrétée principalement par les monocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales durant l'inflammation et qui a des activités biologiques multiples.

Dans le lupus, l'IL6 joue un rôle dans la dérégulation des B en induisant la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs des auto-anticorps. Il a été montré que les patients lupiques ont un taux d'IL6 sanguin élevé qui corrèle avec la sévérité de la maladie et le taux d'anticorps anti-ADNdb [65].

La surexpression d'IL6 induit également une dérégulation de la balance Treg/Th17 au niveau de la différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs avec une diminution des Tregs et une augmentation des Th17. Ces conditions accentuent l'auto-immunité et les lésions tissulaires [66]. On retrouve d'ailleurs l'IL6 dans les reins et les urines de patients atteints de glomérulonéphrite lupique ainsi que dans la peau des patients atteints de lupus cutané [67-69].

Pour contrer les effets néfastes de l'IL6 dans le lupus, il existe un anticorps monoclonal antagoniste du récepteur à l'IL6, le tocilizumab, qui est en cours d'étude et qui induit une diminution de l'activation des lymphocytes B et T, une diminution des auto-anticorps, et une diminution de l'activité de la maladie chez les patients traités [70]

1.3.1.6.3. BAFF

La cytokine BAFF est fortement exprimée à la surface des monocytes, macrophages, cellules dendritiques et neutrophiles activés. Les cytokines pro-inflammatoires telles que IL2, IFNγ et TNFα induisent la sécrétion de BAFF via un clivage de la protéine membranaire, libérant la forme soluble de BAFF dans la circulation. Lorsque BAFF interagit avec son récepteur qui se trouve sur les lymphocytes B transitionnels et matures, celle-ci induit leur survie. Dans le lupus, cette cytokine est surexprimée, jouant dès lors un rôle pathogénique via la survie des lymphocytes B auto-réactifs [71, 72].

Plusieurs traitements ciblant BAFF existent aujourd'hui et sont à des stades de développement différents. Le plus connu et le premier à avoir été testé est le Belimumab, un anticorps monoclonal humain qui se lie à la forme soluble de BAFF, l'empêchant d'interagir avec son récepteur. Ce médicament est efficace chez les patients lupiques avec des auto-anticorps, mais n'a pas été testé chez les patients lupiques avec une atteinte rénale. Une autre molécule, le Tabalumab, un anticorps monoclonal humain qui se lie à la forme soluble et membranaire de BAFF, vient de terminer son étude en phase III mais n'a pas montré de différences significatives au niveau de son efficacité contre un placebo. Une troisième molécule ciblant BAFF, le Blisibimod, liant également la forme soluble et membranaire de BAFF, montre des résultats significatifs en phase II contre un placebo, et cette molécule est actuellement entrée en phase III de développement [53, 54].

1.3.1.6.4. L'interleukine 17 (IL17)

L'IL17 est une cytokine pro-inflammatoire sécrétée principalement par les lymphocytes Th17 mais également par les lymphocytes T DN. Cette cytokine induit le recrutement des neutrophiles et monocytes et l'infiltration des lymphocytes T dans les tissus enflammés où elle est sécrétée. L'IL21, l'IL23 et l'IL6 sont des cytokines clés dans la différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs en Th17 et par conséquence dans la sécrétion de l'IL17, et comme le milieu cytokinique des patients lupiques est riche en IL21 et IL6, la différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs tend vers une surexpression des lymphocytes Th17 [73].

Il existe 3 inhibiteurs de l'IL17 actuellement en phase III de développement et qui semblent prometteurs dans le traitement du psoriasis mais qui n'ont jamais été testés dans le cadre du lupus [74].

1.3.1.6.5. Le TNFα

Le TNFα est une protéine transmembranaire, exprimée à la surface des macrophages et des lymphocytes T activés, mais également par les cellules endothéliales, les fibroblastes et les lymphocytes B. Cette cytokine est clivée par une enzyme qui induit alors la libération de la forme soluble du TNFα. Le TNFα soluble ou membranaire, interagit avec ses récepteurs et induit soit l'apoptose cellulaire, soit la transcription de gènes et la production de protéines impliquées dans la survie, la différenciation ou la prolifération cellulaire ou enfin à l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire [75]. Le TNFα, ayant des fonctions pléiotropiques, est à la fois une cytokine pro-inflammatoire et une cytokine immunorégulatrice. D'ailleurs, lors d'une réponse auto-immune, le TNFα induit la prolifération des lymphocytes B et la maturation des cellules dendritiques ainsi que la diminution de la réactivité des lymphocytes T et l'expression de molécules anti-apoptotiques [76].

Dans le lupus, le niveau de cette cytokine est augmenté et corrèle avec l'activité de la maladie [77]. De plus, il a été montré que dans la néphrite lupique, les cellules épithéliales des glomérules, surtout celles où il y a un dépôt de complexes immuns, expriment du TNFα [78]. Ce TNFα, induit par les complexes immuns, provoque l'inflammation et la destruction des tissus [76].

Il existe 5 molécules ciblant le TNFα : l'infliximab, l'adalimumab, le certolizumab, le golimumab et l'étanercept. Certains de ces médicaments ont été testés dans d'autres maladies auto-immunes (la polyarthrite rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante et la maladie inflammatoire de l'intestin) et induisent des bénéfices majeurs pour la majorité des patients, mais dans certains cas, ces médicaments causent des syndromes « anti-TNF induced lupus » (ATIL) avec une augmentation des auto-anticorps (nucléaires, ADNdb, …) mais dont les manifestations cliniques sont minimes [79]. Les anti-TNFα ne sont pas prescrits pour les patients lupiques, malgré une nette amélioration de la néphrite lupique, car ceux-ci induisent une augmentation de l'IFNα et des auto-anticorps ainsi qu'un risque accru d'infection bactérienne létale [80].

1.3.2. Facteurs génétiques (polygénique / monogénique)

Les facteurs génétiques sont importants dans la physiopathologie du lupus. Des études montrent que chez les jumeaux hétérozygotes, la concordance est d'environ 5%, et chez les monozygotes (« vrais » jumeaux avec le même patrimoine génétique), la concordance est de 50% [81]. Le lupus est dans la plupart des cas une maladie qui se manifeste suite à la prédisposition qu'induisent plusieurs gènes de susceptibilité, même s'il existe des rares cas où le lupus se manifeste suite à une seule mutation génique.

1.3.2.1. Gènes déficients/mutés

Les cas exceptionnels où la maladie lupique se manifeste suite à une mutation monogénique, apparaissent dès la petite enfance. C'est le cas des déficiences de l'un des composants de la cascade du complément comme C1q, C2 et C4, qui induisent un lupus par une diminution de la clairance du matériel apoptotique et des complexes immuns, conduisant à l'accumulation d'auto-antigènes. Le déficit en C1q induit un lupus sévère avec une glomérulonéphrite sévère et une atteinte de la peau. Les déficits en C2 et C4, beaucoup plus rares, induisent un lupus modéré avec une atteinte de la peau et des articulations. Ensuite, il existe des mutations dans la voie Fas/FasL, correspondant aux souris lupiques MRL/*lpr*, associées au syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité (ALPS), mais dont seulement un cas recensé a développé un lupus.

Les mutations monogéniques conduisant à la surexpression d'IFNα sont appelées interféronopathies de type I et induisent des manifestations lupiques. On retrouve deux pathologies héréditaires d'interféronopathies de type I. La première, le syndrome d'Aicardi-Goutières, où l'IFNα se retrouve augmenté dans le liquide céphalo-rachidien, se manifeste par une encéphalopathie inflammatoire précoce parfois associée à des manifestations auto-immunes. Les mutations conduisant à cette pathologie sont homozygotes ou hétérozygotes composites et touchent des gènes codant pour des protéines impliquées dans le catabolisme intracytoplasmique des acides nucléiques (exonucléase (TREX1), ribonucléases (RNASEH2A, 2B et 2 C), adénosine déaminase (ADAR1)) ou une protéine qui se lie aux acides nucléiques et qui n'a pas d'activité de nucléase (SAMHD1). La deuxième pathologie, la spondylenchondrodysplasie est due à une mutation de l'enzyme TRAP (Tartrase-resistant acid phosphatase) et induit un retard statural lié à une dysplasie osseuse, parfois associée à une atteinte neurologique et à des manifestations auto-immunes [82-84]. Mais il existe encore de multiples autres mutations induisant des interféronopathies de type I qui pourraient être corrélées à la pathogénie de maladies, comme STING qui provoque un syndrome vasculaire et pulmonaire ou IFIH1 (MDA5) qui induit la dysplasie Singleton-Merten [85].

1.3.2.2. Gènes de prédisposition

Le lupus se caractérise principalement par une accumulation de variants polymorphiques dans le génome d'un individu. L'évolution des technologies a rendu possible, il y a quelques années, des études de type *Genome-Wide Association Studies* (GWAS), qui ont permis d'associer certains polymorphismes au développement de maladies lupiques. Dernièrement, grâce au partage des données de milliers de patients à travers le monde, Maria Teruela et Marta E. Alarcón-Riquelme ont confirmé l'existence de 60 gènes de susceptibilité dans le lupus, partagés, pour la plupart, par tous les continents et les différentes ethnicités [60]. Ces gènes de susceptibilité concernent plusieurs processus de régulation de la réponse immunitaire (voie NFκB, voie des TLRs et des IFN de type I, l'apoptose, fonction des lymphocytes B et T,…) et jouent donc un rôle à chaque étape du développement de la maladie.

Avant les études GWAS, des gènes de susceptibilité avaient été identifiés par des études cas-témoins de gènes candidats, dont le locus HLA découvert dans les années septante, les récepteurs Fcγ et deux gènes de la voie des IFN de type I, IRF5 et TYK2 [49].

1.3.3. Facteurs environnementaux

Outre les facteurs génétiques pour expliquer la survenue d'un lupus, les facteurs environnementaux semblent jouer un rôle. Cependant, il faut qu'il y ait une prédisposition génétique du système immunitaire à s'activer pour que la maladie apparaisse. Parmi les facteurs environnementaux reconnus comme jouant un rôle dans l'apparition de la maladie, il y a l'exposition aux ultra-violets (UV), les infections virales telles que le virus d'Epstein-Barr (EBV) ainsi que certains médicaments.

En ce qui concerne l'exposition aux UV, ceux-ci provoquent l'apoptose des kératinocytes dont le matériel nucléaire devient des auto-antigènes, dû au défaut de clairance par les macrophages. En ce qui concerne l'infection à EBV, ce virus partage une séquence épitopique commune avec les auto-antigènes SSA/Ro (Anti-Sjögren's-syndrome-related antigen A) et pourrait provoquer dès lors une réaction auto-immunitaire, mais ce concept est controversé. Pour ce qui est des médicaments provoquant un lupus, dans le traitement d'autres maladies auto-immunes, il a été montré que des anti-TNFα pouvaient provoquer des lupus induits (voir chapitre « TNFα »). Deux autres médicaments, l'hydralazine et le procaïnamide, inhibent quant à eux la méthylation de l'ADN, entraînant une augmentation de l'expression de plusieurs gènes des lymphocytes T et conduisant alors à un lupus induit [49].

1.3.4. Remarque conclusive concernant la physiopathologie du lupus

Au vu des éléments développés dans les paragraphes précédents, il apparaît que la maladie lupique est caractérisée par l'intrication de multiples anomalies immunologiques, qui peuvent se retrouver séparément ou de manière simultanée chez le même patient. Il est d'ailleurs notable que des patients avec un même phénotype clinique ne répondent pas nécessairement de la même manière aux traitements, ce qui est probablement le résultat de cette hétérogénéité immunologique propre à la maladie. Cela a été montré par exemple avec une étude récente testant l'abatacept (CTLA4-Ig, une molécule de fusion se liant à CD80 et CD86, inhibant dès lors la voie de costimulation nécessaire à l'activation des lymphocytes T) chez des patients avec un lupus actif (manifestations de polyarthrite rhumatoïde active, de lésions cutanées ou de sérosite). L'analyse transcriptomique du sang total de ces patients, prélevé avant traitement, a montré que ceux-ci pouvaient être différenciés en 4 groupes distincts selon leur phénotype immunologique (prédominance d'un type cellulaire : C1 = neutrophiles seuls, C2 = lymphocytes T cytotoxiques, monocytes, lymphocytes B mémoires IgG et lymphocytes T activés, C3 = plasmocytes, cellules dendritiques activées, cellules NK (natural killer) activées et neutrophiles, C4 = cellules dendritiques activées et lymphocytes T

cytotoxiques). Parmi eux, les groupes C3 et C1 ont montré des effets bénéfiques du traitement avec l'abatacept comparés à leur groupe placebo [86]. Ceci met en avant la nécessité de modifier la taxonomie clinique actuelle (« lupus ») vers une nouvelle taxonomie moléculaire plus adaptée à la prise de décision thérapeutique, ce que le projet européen PreciseSADS essaye actuellement de réaliser.

1.4. Modèles murins

Il existe plusieurs modèles murins lupiques permettant l'étude de la physiopathologie du lupus, l'identification de locus de susceptibilité ou le développement de nouveaux traitements et qui sont utilisées en test préclinique. Chaque modèle diffère par son mécanisme de déclenchement et de progression du lupus, se rapprochant parfois plus ou moins de la maladie humaine. Chaque modèle est donc utilisé selon la recherche envisagée.

1.4.1. Modèles classiques

Les modèles murins de lupus spontané les plus classiques sont les NZB/W, les MRL/*lpr* et les BXSB. Il existe également un modèle de lupus induit par l'injection de Pristane dans des souris BALB/c, et il existe aussi des modèles de lupus accéléré où on injecte de l'IFNα dans des souris lupiques, par exemple, NZB/W [87].

1.4.1.1. NZB/W

Les souris lupiques NZB/W, aussi appelées (NZBxNZW)F1, est le modèle lupique murin le plus ancien. Ces souris proviennent du croisement de New

Zealand Black avec New Zealand White, entraînant un lupus spontané. Les souris NZB et NZW ont toutes deux une faible auto-immunité alors que la génération F1 développe une maladie lupique sévère touchant principalement les femelles et se caractérisant par une splénomégalie, une lymphadénopathie et une production d'auto-anticorps nucléaires conduisant à une glomérulonéphrite lupique via le dépôt de complexes immuns dans les reins. Cette génération F1 a par la suite été croisée avec des NZW suivi par des intercrosses, générant plusieurs lignées dont les NZM2410 qui développent une glomérulonéphrite lupique sévère chez les mâles et les femelles. Des études d'identification et de classification de loci de susceptibilité chez cette lignée NZM2410 ont été réalisées par Morel et al. en 1994 et ont permis l'identification de 3 locus de susceptibilité : *Sle1*, *Sle2* et *Sle3*, en corrélation avec le développement d'une glomérulonéphrite [88]. Il a également été mis en évidence l'existence d'un locus de suppression de la maladie, Sles1, lié au CMH-II [89]. Afin d'étudier la fonction de chacun de ces loci, des souris congéniques ont été créées puis étudiées. Le locus *Sle1* induit une rupture de la tolérance aux antigènes nucléaires conduisant à une expansion des lymphocytes B et T autoréactifs et à la production d'auto-anticorps anti-nucléaires. Ce locus se compose de 4 sous locus (a, b, c et d) dont *Sle1b* a été le plus étudié et dans lequel le gène *Ly108*, encodant une molécule de surface induisant des signaux activateurs ou inhibiteurs après interaction entre 2 cellules immunitaires, a été identifié comme un gène candidat dont certains variants sont associés à une forte production d'anticorps antinucléaires [90]. Le locus *Sle2* induit une hyperactivité des lymphocytes B et se compose également de 3 sous locus (a, b et c) dont *Sle2c* dans lequel le gène *Cdkn2c* a été identifié pour son rôle dans l'expansion des lymphocytes B auto-réactifs [91]. Enfin, le locus *Sle3* induit une dérégulation des lymphocytes T CD4 via l'hyperstimulation des APC. Aucun des locus seuls, dans un background C57Bl/6, n'induit de maladie lupique. Par contre, lorsque les 3 locus se retrouvent ensemble dans un background C57Bl/6, il s'agit des souris tricongéniques B6.*Sle1*/*Sle2*/*Sle3*, celles-ci manifestent une maladie lupique sévère et hautement pénétrante [2, 87, 92-94]. Les travaux sur les souris congéniques ont mis en évidence que la susceptibilité au développement du lupus des souris est polygénique, impliquant des interactions épistatiques entre de multiples gènes de susceptibilité, agrégés dans ces régions chromosomiques.

Les souris lupiques que nous possédons au laboratoire et qui ont été utilisées dans le cadre de cette thèse, sont les B6.*Sle1*/*Sle2*/*Sle3*. Comme dit précédemment, elles possèdent 3 locus de susceptibilité et ne possèdent pas le locus suppresseur Sles1.

1.4.1.2. MRL/*lpr*

Les souris lupiques MRL/*lpr* se caractérisent par une lymphoprolifération (*lpr*) dû à une mutation dans le gène *Fas*, une protéine de surface induisant l'apoptose. Ces souris développent un phénotype lupique par l'accumulation de cellules immunitaires dans les organes lymphoïdes secondaires. Les manifestations cliniques qui en résultent sont une lymphadénopathie, une splénomégalie et un niveau élevé d'auto-anticorps nucléaires conduisant à une glomérulonéphrite lupique via le dépôt de complexes immuns dans les reins. La mutation du gène *Fas* peut également avoir lieu chez l'humain et provoquer une maladie lymphoprolifération (syndrome Canale-Smith), mais engendre très rarement de l'auto-immunité. De même, la même mutation *Fas* mais dans un autre background génétique, comme C57Bl/6, ne conduit pas à une glomérulonéphrite [95-100]. Le fond génétique MRL joue donc un rôle important dans l'apparition de la maladie et des études d'identification de locus de susceptibilité sont en cours [2, 87, 93].

1.4.1.3. BXSB

Les souris BXSB développent une maladie lupique rapide et sévère touchant principalement les mâles contrairement à la maladie humaine qui touche dans 90% des cas les femmes. Le biais masculin de ces souris est dû à la présence d'un élément susceptible dans le chromosome Y, le locus *Yaa* (y-linked autoimmune accelerating), provoqué par une translocation d'une partie du chromosome X sur le chromosome Y. Cette translocation induit la duplication de plusieurs gènes dont *TLR7*, qui est un récepteur d'ARN simple brin localisé

dans les lymphocytes B et les cellules présentatrices d'antigènes. Cette surexpression de TLR7 engendre une lymphadénopathie, un niveau d'auto-anticorps nucléaires modérément élevé, une monocytose (expansion des monocytes circulants) et une glomérulonéphrite induite par les complexes immuns [2, 87, 93].

Comme pour les souris MRL/*lpr*, l'introduction du gène *Yaa* dans un background de souris classique ne provoque pas de maladie lupique. Des locus de susceptibilité ont été identifiés dans le background BXSB et plusieurs se superposent à ceux découverts chez NZB/W [101, 102].

1.4.2. Phénotypes cellulaires

Comme pour l'humain, on retrouve des dérégulations au niveau de la proportion des cellules immunitaires chez les B6.*Sle1*/*Sle2*/*Sle3* comparés à leurs contrôles C57Bl/6 comme je l'ai démontré dans la revue [2]. On retrouve par exemple chez ces souris lupiques une augmentation des plasmocytes sanguins ainsi qu'une augmentation de l'activation des lymphocytes T CD4 et CD8 (Tableau 2). Cependant, bien que ces souris soient le modèle qui se rapproche le plus de la maladie lupique humaine, il subsiste des différences qui peuvent compromettre certaines études. La plus grande différence se situe au niveau de la signature interféron, qui est présente chez les patients lupiques, et qui n'est que très peu, voire pas du tout exprimée chez les souris lupiques MRL/*lpr* et BXSB. Concernant les B6.*Sle1*/*Sle2*/*Sle3*, il semblerait qu'elles expriment une signature interféron, mais celle-ci semble restreinte à des populations cellulaires spécifiques comme les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse [103], un point important à prendre en compte dans ce travail.

Tableau 2. Populations cellulaires de la rate et du sang des souris lupiques B6.*Sle1*/*Sle2*/*Sle3* comparées à leur contrôle C57Bl/6

	Populations cellulaires	B6.*Sle1*/*Sle2*/*Sle3* vs C57Bl/6
Sang	Lymphocytes T CD4	Normal
	Lymphocytes T CD4 activés	Augmenté
	Lymphocytes T CD8	Normal
	Lymphocytes T CD8 activés	Augmenté
	Lymphocytes B	Normal
	Lymphocytes B activés	Normal
	Lymphoblastes	Diminué
	Plasmocytes	Augmenté
	Cellules dendritiques plasmacytoïdes	Augmenté
Rate	Lymphocytes T CD4	Normal
	Lymphocytes T CD8	Diminué
	Lymphocytes T reg	Normal
	Lymphocytes B	Normal
	Lymphocytes B folliculaire	Diminué
	Lymphocytes B de la zone marginale	Normal
	Plasmocytes	Augmenté
	Cellules dendritiques plasmacytoïdes	Normal
	Cellules dendritiques myéloïdes	Normal

2. PKR

2.1. Généralités

La protéine kinase ARN double brin dépendante, appelée PKR ou PRKR ou encore EIF2AK2, est une sérine/thréonine kinase ubiquitaire qui interagit avec les ARN double brin (ARNdb) viraux et endogènes. Cette interaction induit la dimérisation de PKR qui s'autophosphoryle, rendant la protéine active et capable de phosphoryler son substrat, eIF2α. Cette phosphorylation induit l'arrêt de la traduction des protéines, conférant à PKR un rôle dans la défense anti-virale, mais induit également l'apoptose, l'expression d'IFN de type I et de gènes IFN-induits. PKR joue dès lors un rôle crucial dans l'immunité innée [104].

2.2. Structure

La protéine PKR se compose de 2 domaines de liaison à l'ARN, DRBD1 et DRBD2, d'un domaine central et d'un domaine catalytique. Cette partie catalytique peut être divisée en 2 parties, la partie N contenant des sites pour l'autophosphorylation de PKR essentiels pour sa dimérisation, et la partie C contenant des sites de reconnaissance du substrat eIF2α.

2.2.1. Humaine

La protéine PKR humaine est composée de 551 acides aminés organisés en 17 exons.

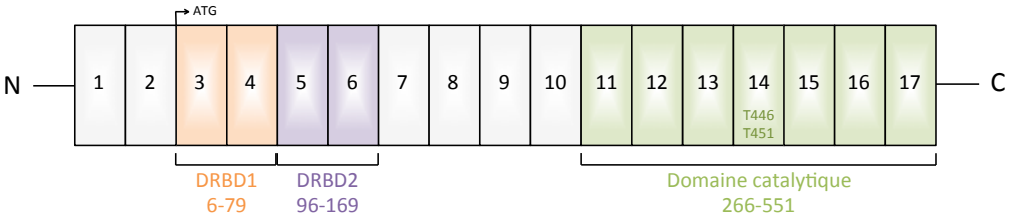


Figure 10. Représentation schématique de la protéine PKR humaine

2.2.2. Murine

La protéine PKR murine est composée de 515 acides aminés organisés en 16 exons. Elle est structurellement très proche de la protéine humaine et peut d'ailleurs physiquement interagir avec elle et induire un dimère capable de s'autophosphoryler [105].

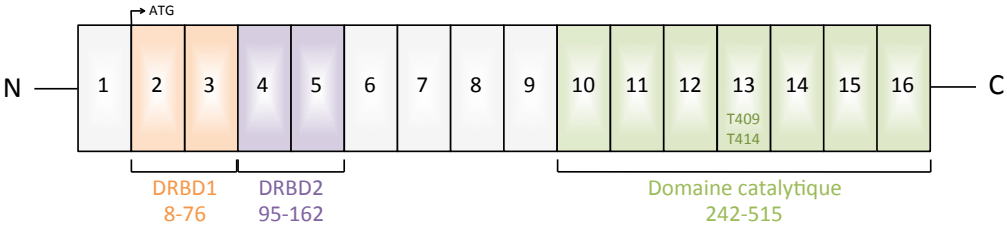


Figure 11. Représentation schématique de la protéine PKR souris

2.3. Activation

La protéine PKR est exprimée à l'état latent sous forme de monomère en absence d'ARNdb. Pratiquement, la partie DRBD se replie sur la partie catalytique, rendant la boucle d'activation de PKR indisponible à la phosphorylation et donc à l'activation. Par contre, lorsque de l'ARNdb se lie aux DRBDs, la conformation de la protéine se relaxe, permettant alors sa dimérisation via l'interaction des parties N des parties catalytiques. Le rapprochement des boucles d'activation induit une transautophosphorylation des thréonines 446 et 451, conduisant à l'activation de la protéine (Figure 12). Ces 2 thréonines sont indispensables à l'activation de PKR. En effet, une étude montre que lorsque l'on mute la thréonine 446 en alanine, la fonction de PKR est significativement diminuée, et lorsque l'on mute la thréonine 451 en alanine, PKR devient totalement inactive [106].

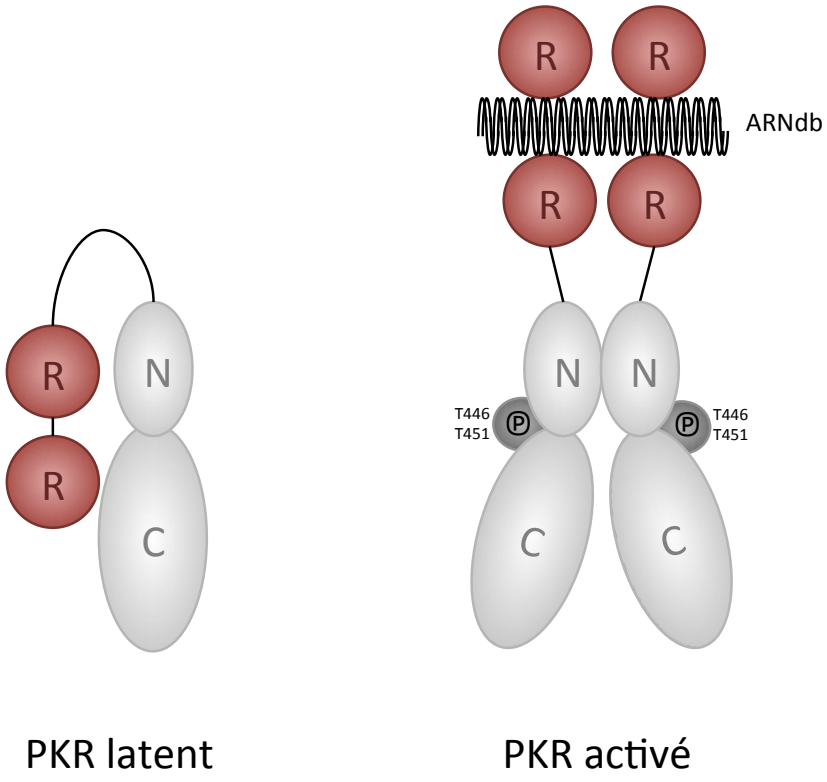


Figure 12. Schéma de l'activation de PKR par de l'ARNdb

L'origine de l'ARNdb est typiquement virale, cependant, il existe des conformations que l'ARNsb peut prendre pour mimer de l'ARNdb et pouvoir activer PKR [107-110]. Par exemple, l'IFNγ utilise PKR pour contrôler son rendement de production en formant un pseudonoeud dans la partie 5'UTR de son ARNm pour activer PKR qui va ensuite inhiber sa traduction [111, 112]. De même, la partie 3'UTR de l'ARNm de TNFα prend une conformation en tige boucle pour activer PKR et réguler son expression [113].

Il existe également des cas particuliers où PKR peut être activé indépendamment de l'ARNdb. En effet, les protéines PACT chez l'humain et RAX chez la souris possèdent 3 DRBDs dont les 2 premiers se lient aux 2 DRBDs de PKR et le 3ème DRBD induit l'activation de PKR et la phosphorylation de eIF2α en réponse à un stress tels qu'une infection virale, la présence de

cytokines inflammatoires, ou encore un traitement de chimiothérapie [114-118] . De même qu'une étude réalisée *in vitro* montre que PKR peut être spontanément phosphorylée en incubant la protéine à forte concentration ce qui induit la dimérisation puis la phosphorylation des thréonines 446 et 451 et donc l'activation de PKR [119].

A noter que la phosphorylation d'eIF2α peut se faire indépendamment de PKR. En effet, les protéines HRI (heme-regulated inhibitor kinase) activée par une diminution en hème de l'hémoglobine (carence en fer) et par le stress oxydatif, GCN2 (general control non-derepressible kinase 2) activée par une carence en acide aminés par privation en nutriments, ou encore PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase) activée par les protéines malformées et le stress du réticulum endoplasmique, peuvent toutes trois phosphoryler eIF2α [120, 121].

2.4. Rôle physiologique

PKR inhibe la traduction des protéines par phosphorylation de eIF2α mais elle régule également l'action de plusieurs facteurs de transcription lui conférant des rôles dans la défense antivirale, l'immunité innée et l'apoptose.

2.4.1. Rôle dans la défense anti-virale

PKR est un des nombreux gènes IFN-induits dont l'expression est augmentée lorsque de l'IFNα/β se lie à son récepteur IFNAR, induisant l'activation de la voie de signalisation STAT1 et STAT2 qui se lient ensuite à IRF9 pour former le complexe ISGF3 qui migre dans le noyau puis se lie au site ISRE, conduisant à la transcription des gènes IFN-induits. L'expression de PKR est donc augmentée lors d'une infection virale dûe aux IFN sécrétés après stimulation des TLRs et des senseurs nucléiques par le virus (Figure 13). Une fois que PKR est activée par les ARNdb du virus, dont la taille minimum est de 30pb (paire

de base), PKR phosphoryle son substrat eIF2α qui inhibe la synthèse des protéines cellulaires et virales, et induit l'apoptose et la sécrétion d'IFN de type I et de gènes IFN-induits [122-124].

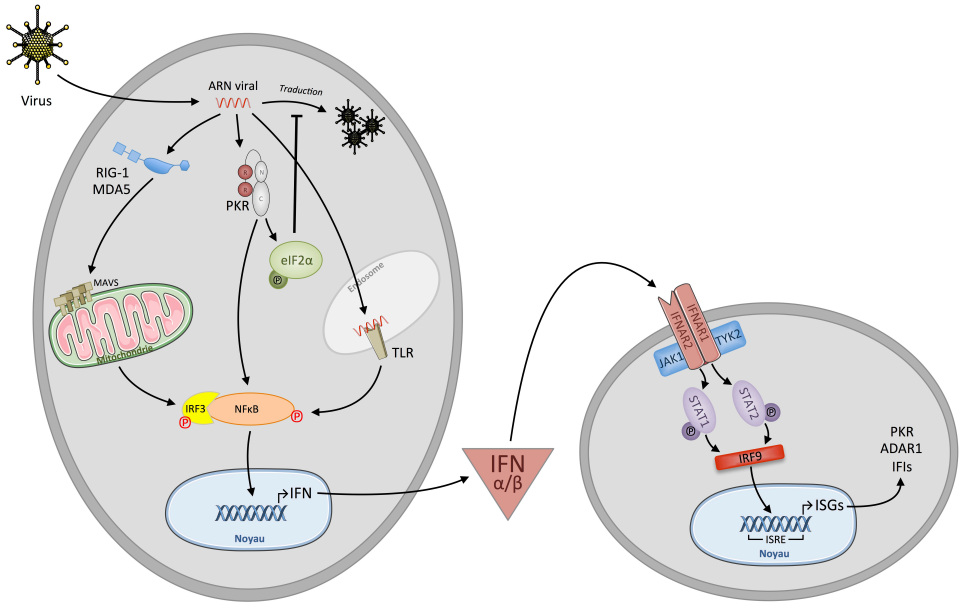


Figure 13. Voies de la défense anti-virale (adapté de [125]). Les ARN viraux qui pénètrent dans une cellule, peuvent stimuler plusieurs senseurs d'acides nucléiques comme RIG-I, MDA5, PKR ou encore les TLRs 3, 7 et 9, aboutissant à l'activation de NfκB puis la production d'IFN de type I. PKR induit également la phosphorylation d'eIF2α, qui va empêcher la traduction des protéines du virus et donc sa propagation. Les IFN de type I sécrétés dans l'environnement vont se fixer sur leur récepteur IFNAR sur des cellules voisines, ce qui va induire la phosphorylation de STAT1 et STAT2 qui vont se lier à IRF9 pour ensuite aller se fixer sur le site ISRE, conduisant à la production de gènes IFN-induits tels que PKR et ADAR1.

2.4.2. Rôle dans l'immunité innée

PKR contrôle l'activation d'eIF2α, et régule également la transcription de différentes voies comme NF-κB, p53, MAPK et l'inflammasome afin de maintenir l'homéostasie.

NF-κB

PKR active le facteur de transcription NF-κB qui est, en condition physiologique, négativement régulé par son interaction avec IκB, l'empêchant d'accéder au noyau pour activer la transcription de gènes. La voie NF-κB est activée par les cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL1), les produits viraux et bactériens (ARNdb, LPS) et le stress oxydatif, qui phosphorylent IκB entrainant son ubiquitination puis sa dégradation par le protéasome, libérant ainsi NF-κB qui peut alors migrer vers le noyau. PKR active cette voie par la phosphorylation de IKK qui va ensuite phosphoryler IκB. A noter que NF-κB induit la production d'IFN de type I et de cytokines pro-inflammatoires [104, 126, 127].

p53

PKR phosphoryle p53, un gène suppresseur de tumeurs intervenant dans la régulation de la croissance cellulaire notamment tumorale, en se fixant à son domaine C-terminal en l'absence d'ARNdb, et conduisant à une augmentation de l'activité de fixation à l'ADN et à l'activation transcriptionnelle de p53. PKR a donc une fonction onco-suppressive via l'activation de p53 [128, 129]. D'ailleurs, dans des souris PKR-inactivées traitées avec des irradiations-γ ou de la doxorubicine (chimiothérapie), il n'y a pas d'activation de p53 [130].

MAPK : p38 et JNK

Suite à un stress cellulaire (irradiation aux UV, infection bactérienne, virale, …), la voie de signalisation MAPK est activée afin de produire des cytokines pro-inflammatoires ou induire l'apoptose dans le but de rétablir l'homéostasie. Il a été montré que l'activité catalytique de PKR était indispensable à l'activation de p38 et JNK de la voie MAPK, conférant à PKR un autre rôle important dans l'immunité innée [104].

Production des immunoglobulines

Le rôle de PKR dans l'activation transcriptionnelle des immunoglobulines a d'abord été montré en 1995 [131] puis confirmé en 2011 où les auteurs montrent également que cette activation transcriptionnelle des immunoglobulines se fait via la molécule de costimulation CD40, se trouvant à la surface des lymphocytes B, et dont PKR ferait partie de la voie de signalisation aboutissant à la production d'IgG [132].

Inflammasome

L'inflammasome est un complexe multiprotéique dont l'assemblage conduit à l'activation de la caspase 1, qui va à son tour libérer des cytokines pro-apoptotique telles que IL1β, IL18 et HMGB1. L'assemblage de l'inflammasome dépend des NLRs dont NLRP1 et NLRP3, qui ont montré qu'ils interagissaient avec PKR, préalablement autophosphorylé par un pathogène. PKR joue donc un rôle dans l'activation et l'assemblage des composants de l'inflammasome. De plus, il a été récemment montré que NLRP3 était positivement régulé par NF-κB, une voie que PKR régule également positivement après liaison à un pathogène [133-135] .

L'inflammasome joue un rôle important dans l'immunité innée en permettant l'élimination des pathogènes, mais une activation anormale de l'inflammasome pourrait conduire à de l'inflammation et l'apparition de maladies auto-immunes comme le diabète de type I et le vitiligo (SNPs dans le gène NLRP1), un concept en pleine étude [136].

2.4.3. Rôle dans l'induction de l'apoptose

Le rôle de PKR dans l'induction de l'apoptose a été premièrement découvert lors de sa surexpression dans des cellules HeLa, conduisant à leur mort [137]. Par la suite, il a été montré que PKR induisait l'apoptose en réponse à différents stimuli tels que l'infection virale, le TNFα ou le LPS [138]. Le mécanisme d'induction de l'apoptose par PKR comprend, de manière indirecte, la phosphorylation d'eIF2α et l'activation de la voie NF-κB qui induisent l'expression de gènes apoptotiques tels que Fas, Bax et p53, et de manière directe, PKR active FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) conduisant à l'activation de la caspase 8 [139].

2.5. Autres senseurs nucléiques

Outre PKR et les TLRs, d'autres senseurs nucléiques jouent un rôle dans la reconnaissance des ARNdb et la production d'IFN de type I et de cytokines pro-inflammatoires.

2.5.1. MDA5 et RIG-I

C'est le cas par exemple des deux hélicases intracellulaires, RIG-I et MDA5, exprimées par toutes les cellules et ayant chacune leur spécificité. RIG-I reconnaît préférentiellement les ARNdb courts (<300pb) alors que MDA5 reconnaît des ARNdb de plus grandes tailles (>1000pb). Ces deux hélicases possèdent un domaine CARD (caspase recruiting domain) à leur extrémité N-terminale, qui, en absence d'ARNdb, se retrouve emprisonné par la conformation inactive de la protéine, mais qui, en présence d'ARNdb, se retrouve libéré et peut alors recruter et activer son substrat, MAVS (mitochondrial antiviral signaling). Cette interaction mène à l'activation de la voie NF-κB et de IRF3 et/ou IRF7, conduisant à la production d'IFN de type I,

de gènes IFN-induits ainsi que des cytokines pro-inflammatoires (Figure 14) [140].

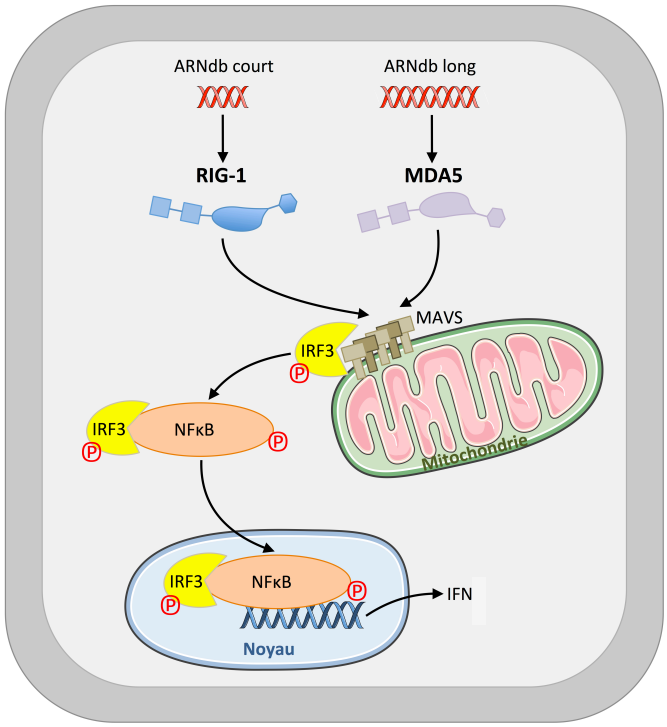


Figure 14. Voie de signalisation de RIG-1 et MDA5 (adapté de [140]).

2.5.2. ADAR1

L'ARNdb peut également servir de substrat aux ADARs (adenosine deaminases acting on RNA), un groupe de protéines qui catalyse la déamination des adénosines (A) en inosine (I) dans l'ARNdb, le rendant instable. Les ADARs se subdivisent en 3 sous-types, ADAR1, ADAR2 et ADAR3 mais seul ADAR1 est significativement exprimé de manière basale dans les cellules. ADAR1 peut être traduit sous 2 isoformes appelées p110 et p150 (Figure 15). La forme p110 d'ADAR1 est constitutivement exprimée par les cellules alors que la forme p150 est induite par les interférons. ADAR1 agit

comme un suppresseur de l'immunité innée et de la voie des IFNs. Le mécanisme par lequel ADAR1 module l'expression des gènes IFN-induits et l'activation des protéines IFN-dépendantes n'est pas encore élucidé [141, 142].

La modification de A (adénosine) en I (iosine) se produit principalement dans les rétro-transposons non-codant du génome qui forment des ARNdb, les empêchant alors d'être reconnu par les autres senseurs nucléiques comme MDA5 [143]. La déamination de A-en-I a également un impact sur l'épissage alternatif des exons flanquants comme c'est le cas pour STAT3 dont l'isoforme β dépend de la présence d'ADAR1 [144].

PKR et ADAR1 partagent la même conformation de leurs domaines de liaison de l'ARNdb (DRBDs) (Figure 15), et comme PKR, ADAR1 est une protéine IFN-induit. Selon les virus qu'il rencontre, ADAR1 peut avoir un effet proviral ou antiviral, mais en général, ADAR1 joue un rôle proviral et anti-apoptotique. En effet, ADAR1 améliore le maintien et la réplication des virus soit via leur déamination (par exemple l'EBV (virus Epstein-Barr) qui produit un miRNA BART6, qui une fois déaminé, conduit au maintien de la latence du virus) soit via l'inhibition de PKR (par exemple la rougeole et le VIH) avec qui il interagit physiquement [145, 146].

La délétion d'ADAR1 dans des souris est embryonnairement létale, contrairement à PKR [125]. Chez l'homme, des mutations dans ADAR1 (comme Adar1E861A) conduit au syndrome Aicardi-Goutières, une interféronopathie de type I [147].

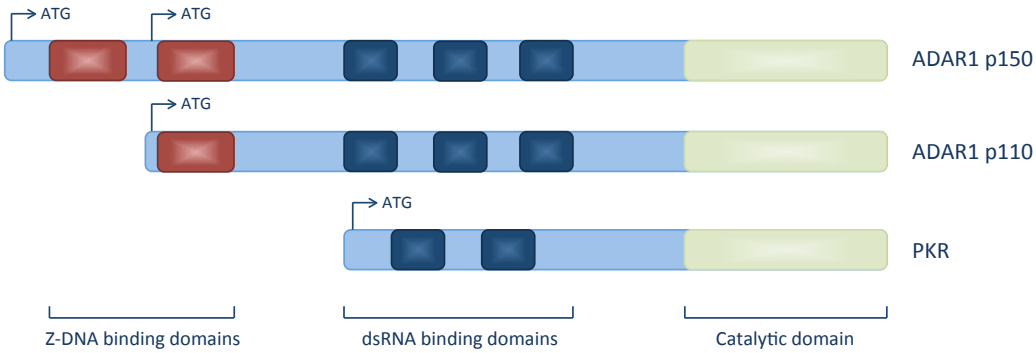


Figure 15. Représentation schématique de ADAR1 et PKR (adapté de [145]). ADAR1 p150 possède 2 domaines de liaison à l'ADN-Z et 3 domaines de liaison à l'ARNdb, tandis qu'ADAR1 p110 ne possède qu'un seul domaine de liaison à l'ADN-Z. PKR possède quant à lui 2 domaines de liaison à l'ARNdb et un domaine catalytique.

La balance entre PKR et ADAR1 fluctue selon la présence initiale d'ADAR1 et a donc un impact important sur la réponse immunitaire innée (Figure 16) [125].

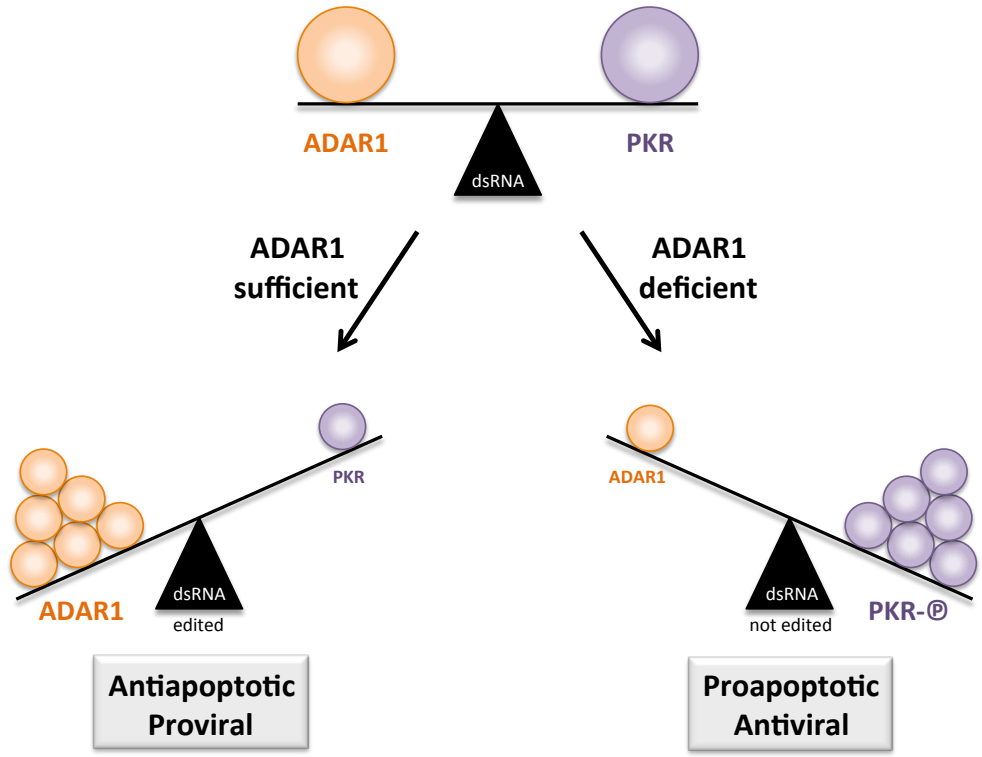


Figure 16. Balance ADAR1 / PKR (adapté de [125]). Selon l'abondance ou le déficit en ADAR1 d'une cellule, la réponse contre un virus peut être soit provirale et anti-apoptotique (abondance en ADAR1) soit antivirale et pro-apoptotique (déficit en ADAR1 et donc abondance en PKR).

Dans le cadre du lupus, une équipe a montré qu'ADAR1 était surexprimé dans les lymphocytes T des patients lupiques et que cela pouvait être en lien avec les mutations de transcrits plus abondants chez les patients lupiques comparé à des contrôles [148].

2.6. Intérêt en rhumatologie

Le rôle de PKR a été étudié dans les maladies rhumatismales suivantes:

Dans la **polyarthrite rhumatoïde**, la protéine PKR est surexprimée et elle jouerait un rôle dans l'inflammation par la sécrétion de HMGB1 (high–mobility group box 1), une cytokine pro-inflammatoire [149].

Dans la **maladie de Sjögren**, il a été montré que la protéine PKR est essentielle pour la production de BAFF, une cytokine jouant un rôle important dans l'activation des B auto-immuns par les cellules épithéliales des glandes salivaires après stimulation par des IFN de type I ou après une infection virale [150].

Dans la **maladie lupique**, Grolleau et al. ont montré que la surexpression de PKR dans les lymphocytes T activés corrélait négativement avec la quantité de protéines synthétisées [151]. De plus, une étude transcriptomique réalisée en 2016, montre que PKR fait partie des transcrits surexprimés dans le sang des patients lupiques avec des anticorps anti-ADNdb [152].

Pour conclure, une méta-analyse réalisée récemment à partir de données publiques d'études d'expression de gènes, montre que PKR fait partie de la signature partagée par les 3 maladies rhumatismales citées ci-dessus [153]. La protéine PKR semble donc être un acteur important des maladies auto-immunes inflammatoires.

2.7. Modèles souris

Il existe 2 principaux modèles de souris PKR-inactivées qui ont été étudiés et dont la mutation du gène se fait à des endroits différents. Un premier modèle créé en 1995 par Weissmann, possède une délétion, via l'introduction d'une cassette néomycine, de l'exon 2 et 3 correspondant au domaine de liaison de

l'ARNdb DSRB1 [154]. Un deuxième modèle créé en 1999 par Bell, possède une délétion, également via l'introduction d'une cassette néomycine, de l'exon 13 correspondant au domaine catalytique de PKR avec les 2 thréonines (T409 et T414 chez la souris) importantes à l'activation de PKR [155].

Ces 2 modèles de souris PKR-inactivées se développent normalement, sont fertiles et ne développent pas de tumeurs spontanées.

Concernant les souris PKR-inactivées avec la délétion dans DSRB1, elles ont une réponse antivirale diminuée suite au traitement à l'IFNγ ou au poly I:C mais induisent une réponse IFN de type I normale suite l'infection par un virus ou au traitement par le poly I:C. Par contre, des MEFs (Fibroblastes embryonnaires de souris) dérivées de ces souris PKR-inactivées, traités au poly I:C ont une production d'IFNα/β et une activation de la voie NF-κB diminuées. [154]

Pour ce qui est des souris PKR-inactivées avec la délétion dans le domaine catalytique, elles ont une réponse antivirale normale suite à l'infection avec des virus (grippe, vaccine) [155], mais des MEFs dérivées de ces souris et traitées avec de l'IFNα recombinant ont une réponse antivirale diminuée contre le virus VSV (virus de la stomatite vésiculaire) comparée au PKR-WT (wild type) [156].

OBJECTIF

Objectif

Le lupus érythémateux disséminé est une maladie complexe dont l'étiologie précise reste inconnue. Aujourd'hui, aucun traitement ne guérit les patients atteints de lupus. Les traitements de base se composent essentiellement d'immunosuppresseurs mais ils se révèlent toxiques à long terme. Dès lors, des nouveaux traitements ciblant de manière spécifique les acteurs majeurs de la maladie tels que les lymphocytes B, les cellules dendritiques plasmacytoïdes et les interférons de type I pourraient constituer un important progrès dans la prise en charge de la maladie.

Une des principales caractéristiques de la maladie est l'expression d'une signature interféron induisant une dérégulation du système immunitaire et de l'inflammation. Parmi les gènes interféron induits surexprimés chez les patients lupiques se trouve PKR, une protéine qui induit elle-même la production de gènes interféron induits une fois activée. Cette protéine fait partie de la famille des senseurs d'acides nucléiques (comme les TLRs, RIG-1 et MDA5) que l'on retrouve fortement présents dans l'environnement des patients lupique, dus, entre autres, au défaut de clairance du matériel apoptotique par les macrophages.

L'objectif de ce travail est de comprendre si la protéine PKR, par son rôle de senseur d'acides nucléiques, pourrait être impliquée dans la génération ou la perpétuation de la signature interféron dans le LED, jouant par ce biais un rôle physiopathologique dans la maladie.

RÉSULTATS

Matériel et méthodes

Etude d'expression génique

Etude de la signature interféron : Des PBMC provenant de 9 contrôles et 7 patients lupiques actifs (score de SLEDAI médian de 16 avec un range de 7 à 27) ont été récoltés par cytaphérèse puis congelés à -80°C dans 10% de DMSO. Les PBMC ont été décongelés en présence de 10 µg/ml de DNase I (Roche) puis resuspendus dans du tampon Hanks supplémenté d'EDTA pour une concentration finale d'1 mM et de 1% de FBS, puis marqués avec un anti-CD4 FITC, un anti-CD20 APC et un anti-CD11c PE (tous de BD-Pharmingen). Les populations CD4 et CD20 positives ont été triées par cytométrie de flux (FacsVantage, BD-Pharmingen) avec une pureté >98% pour les lymphocytes T CD4 et >97% pour les lymphocytes B. L'ARN a ensuite été extrait de ces populations avec le kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel).

Etude de l'effet de la 2-aminopurine (2AP) : des PBMC provenant de 3 patients lupiques ont été mis en culture avec et sans 2AP (Sigma) à une concentration finale de 10 mM pendant une nuit, puis l'ARN en a été extrait avec le kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel).

La qualité de l'ARN de ces 2 expériences indépendantes a été mesurée par électrophorèse capillaire avec une Pico Chip 6000 à l'aide d'un Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent). La synthèse d'ARN complémentaire (ARNc) biotinylé a été réalisé en suivant la procédure standard d'Affymetrix (One Cycle Target Labeling kit, Affymetrix). Du fait d'une quantité minimale d'1µg d'ARN pour la synthèse d'ARNc, tous les CD20 et CD4 purifés n'ont pas pu être utilisés. Ensuite, 10µg des ARNc ont été hybridés sur des puces GeneChip Human genome U133 Plus 2.0 (coatées avec 1 300 000 oligonucléotides pour 47 000 transcripts correspondants à 39 000 gènes, Affymetrix) pendant une nuit à 45°C puis lavées et enfin scannées à l'aide du Genechip Scanner 3000. Les données ont été normalisées sur GCOS puis analysées sur GeneSpring avec des tests t de student, et enfin les analyses de pathways ont été réalisées avec le programme DAVID (http://david.abcc.ncifcrf.gov).

Etude de l'activation de PKR

Des PBMC de 5 patients lupiques actifs et 5 contrôles ont été récoltés par cytaphérèse puis congelés à -80°C dans 10% de DMSO. Par la suite, les PBMC ont été décongelés puis directement resuspendus dans un tampon de lyse pour western blot (voir plus loin).

PCR quantitative en temps réel

L'ADNc a été synthétisé à partir de 500ng d'ARN de PBMC, en utilisant des oligo(dT) (Eurogentec), un inhibiteur de RNAse (40U, Fermentas) et une reverse transcriptase (200U, Fermentas). La PCR quantitative a été réalisé sur le Light Cycler 480 (Roche) en utilisant un mix SYBR Green (BioRad #1708880). Pour chaque échantillon, 20ng d'ADNc a été chargé en triplicats avec le mix SYBR Green 1x et 0,4 µM de chaque primer (Tableau 3). L'expression relative de chaque gène a été obtenue par l'utilisation du programme du Light Cycler 480 qui prend en compte l'efficience de la courbe standard du gène. Le gène de référence utilisé est la βactine.

Gène	Primer forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')
β-actine	TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA	CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG
Ig Kappa Constant	GACAGCAAGGACAGCACCTAC	GGGCACTTCTCCCTCTAACAC
IFI27	ACCTCATCAGCAGTGACCAGT	ACATCATCTTGGCTGCTATGG
IFI44L	GTGGATGATTGCAGTGAGGTT	AATATCCTTCATGGGGTCCAG

Tableau 3. Oligonucléotides pour PCR quantitative

Infection par virus

Des cellules HEK-293 ont été mise en plaque la veille dans du milieu DMEM + 10% FBS puis infectées avec un virus induisant l'activation de PKR (FB09 du laboratoire de Thomas Michiels) à 10 PFU/cellules dans du milieu DMEM sans sérum pendant 1 heure à 37°C 5% CO2. Ensuite les cellules ont été traitées en ajoutant dans les puits avec ou sans le virus, la 2AP ou la 6 MP (Sigma) à une concentration finale de 10 mM pendant 6h30 puis traitées une deuxième fois

de la même manière pendant 2h30. Enfin, les cellules ont été récupérées et resuspendues dans du tampon de lyse western blot (voir plus loin).

Souris

Les expériences utilisant des souris ont reçu l'accord du « Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale de l'Université catholique de Louvain » (référence #2014/UCL/MD/019) et ont été effectuées conformément aux règlements nationaux sur les soins des animaux. Cette étude est conforme au « Guide for the Care and Use of Laboratory Animals » (National Academies Press, 2011).

B6.*Sle1*/*Sle2*/*Sle3*

Les souris lupiques B6.*Sle1*/*Sle2*/*Sle3* sont un don du Dr Wakeland à Dallas aux Etats-Unis.

(NZB/W) F1

Les souris lupiques (NZB/W) F1 ont été achetées chez Jackson Laboratory.

Injection de 2AP

Dans cette expérience, 3 groupes de 6 souris (NZB/W) F1 de 5 mois d'âge ont été étudiés. Un groupe a reçu des injections intra-péritonéales (IP) de 7,5 mg de 2AP tous les 2 jours, un second groupe a reçu des injections IP de PBS (même volume que le groupe injecté avec la 2AP) tous les 2 jours, et un troisième groupe n'a pas reçu d'injection. Avant les premières injections, du sérum a été prélevé sur chaque souris puis après 40 jours, les souris ont été sacrifiées et le sérum et les reins ont été prélevés (1 rein congelé et 1 rein en formol).

Analyse protéomique

Les reins congelés de 3 souris injectées à la 2AP et de 3 contrôles (injection PBS) ont été envoyés au CING (Chypre) pour les analyses protéomiques en spectrométrie de masse. Brièvement, les reins ont été coupés au cryostat à du 10 µm, les sections de reins ont été solubilisées dans un tampon de lyse, incubées sur glace pendant 30 minutes puis soniquées et précipitées à l'acétone. Les culots de protéines ont été dissous dans un tampon 8M urea / 50 mM NH_4HCO_3 puis quantifiés par test BCA. Ensuite, 100µg de protéines issues des tissus ont été réduits avec du DTT, alkylés par de l'iodoacétamide puis digérés avec de la trypsine pendant une nuit à 37°C. Les peptides produits ont été dessalés avec des colonnes C18 SPE (extraction en phase solide) puis centrifugés sous vide jusqu'à lyophilisation. Par la suite, les peptides sont dissous dans un tampon acétonitrile 1% / acide formique 0,1%, séparés sur une colonne nanoAcquity UPLC CSH C18 (250mm x 75µm, 1.7µm) en utilisant le système Waters nanoAcquity UPLC, puis analysés sur un appareil Waters Synapt G2Si HDMS utilisant l'approche $UDMS^E$.

Les données brutes ont été traitées avec le programme Progenesis QI proteomic (v3.0). Les protéines identifiées possèdent les caractéristiques suivantes : 1% de taux de fausses découvertes, score de confiance ≥ 5, longueur de séquence peptidique ≥ 6 et coups ≥ 2.

Génération de souris lupiques PKR-inactivées avec la méthode CRISPR/Cas9

Design et synthèse du système CRISPR/Cas9

2 parties du gène PKR ont été ciblées avec le système CRISPR/Cas9, l'exon 2 pour éliminer totalement la protéine, et l'exon 13 pour éliminer la partie catalytique de PKR importante à son activation. La séquence cible de l'exon 2 a été designée avec le programme : http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html, et la séquence cible de l'exon 13 a été designée manuellement en cherchant une séquence PAM (NGG) précédée d'une guanine 20 bases avant. Les oligonucléotides des single guide (sg)RNA (Tableau 4) ont été construit en ajoutant en 3' et en 5' les parties communes du plasmide

pX330 (Addgene, #42230) après coupure avec l'enzyme de restriction BbsI. Pour la construction du plasmide avec les sgRNA, nous avons suivi le papier [157]. Pratiquement, les oligonucléotides forward et reverse sont phosphorylés (T4 PNK, Thermo, #EK0031) et appariés pour ensuite être introduits (T4 DNA ligase, Thermo, #EL0016) dans le plasmide pX330 préalablement digéré avec l'enzyme BbsI (NEB, #R3539). Celui-ci est ensuite transformé dans des bactéries (Invitrogen, #K4800), amplifié puis purifié (Macherey-Nagel, #740550 puis Qiagen, #28104) pour être microinjecté dans les zygotes.

Position	**Primer forward (5' - 3')**	**Primer reverse (5' - 3')**
Exon 2	CACCGTATAAAGAACTTAGTACTT	AAACAAGTACTAAGTTCTTTATAC
Exon 13	CACCGATGAAAGACACATTAAGAT	AAACATCTTAATGTGTCTTTCATC

Tableau 4. Oligonucléotides des sg(RNA) de PKR

Production et injection des zygotes

80 femelles B6.*Sle1*/*Sle2*/*Sle3* ont été injectées avec des hormones de superovulation (Folligon et Chorulon) puis mises aux mâles pour la nuit. Les bouchons vaginaux ont été vérifiés le lendemain matin et les femelles positives ont été euthanasiées pour prélever les oviductes qui ont été mis dans du milieu M2. La suite a été réalisée en collaboration avec le pôle de transgénèse de l'UCL qui a extrait les zygotes des oviductes, les a microinjectés avec les 2 plasmides CRISPR puis les a transférés dans des femelles pseudogestantes.

Génotypage et séquençage des souriceaux

Un petit morceau de queue a été prélevé sur chaque souris et l'ADN génomique en a été extrait en suivant le protocole du kit utilisé (NucleoSpin Tissue, Macherey-Nagel, #740952). Une PCR a ensuite été réalisée autour des sites cibles (Tableau 5) puis le produit de PCR a été envoyé au séquençage (Tableau 6) (Genewiz, UK).

Position	**Primer forward (5' - 3')**	**Primer reverse (5' - 3')**
Exon 2	GGGGAACAGACTGGAACATC	CTGGATCATGGTCCTCCATC
Exon 13	GCGCGTTTTCATTCTTCACT	CCCACACATCTCCCTCATTT

Tableau 5. Oligonucléotides pour les PCR autour des sg(RNA)

Position	**Primer séquençage (5'- 3')**
Exon 2	CCCTGTCTCCTGTTCTCCTG
Exon 13	GCAGGCAGGTCTCTGAGTTC

Tableau 6. Oligonucléotides pour le séquençage sur le produit de PCR

Élevage des souris CRISPR

La souris CRISPR PKR hétérozygote, un mâle, a été croisée avec des femelles B6.*Sle1*/*Sle2*/*Sle3* afin d'amplifier les hétérozygotes. Ensuite, les hétérozygotes ont été intercrossés pour obtenir les -/- et +/+. Nous ne créons pas de lignée -/- ou +/+ afin de pouvoir comparer les souris d'une même portée et qu'elles aient le même background génétique.

Isolation des MEFs

Une souris femelle CRISPR PKR +/- a été accouplée à un mâle CRISPR PKR +/-, puis a été sacrifiée après 14 jours de gestation. Les embryons ont été placés dans du PBS stérile puis séparés de leur poche amniotique en condition stérile. Pour chaque embryon, la tête a été gardée pour le génotypage, puis les organes rouges ont été éliminés et le tissu restant a été découpé en petits morceaux à l'aide d'un scalpel dans 5ml de trypsine-EDTA, incubés 13 minutes à 37°C puis centrifugés 8 minutes à 270g. Le culot a été resuspendu dans 10ml de milieu DMEM+10%FCS puis mis en boîte de culture T25.

Stimulation par le poly I:C

Les cellules MEFs ont été mises en plaque 24 puits la veille à 50% de confluence, puis transfectées avec un mix contenant 3µl de réactif de transfection (Lipofectamine 2000, Invitrogen, #11668-027) et 2,5µg de poly I:C (Invivogen, #tlrl-pic), dilués dans de l'Opti-MEM (Gibco). Les cellules ont été récupérées après 4 heures d'incubation.

Western blot

Les cellules sont lavées au PBS froid puis lysées avec du tampon RIPA (ThermoFisher, #89900) additionné d'inhibiteur de phosphatase et de protéase (ThermoFisher, #78440). Les lysats sont ensuite soniqués puis centrifugés à 11000g. Les surnageants sont incubés 10 minutes à 90°C avec du « Protein Loading Buffer » 1x (LifeTechnologies, #39000) puis sont mis à migrer sur un gel de polyacrylamide Tris-Glycine 10% (Pierce). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose que l'on sature avec du PBS additionné de 5% de lait écrémé en poudre. Les anticorps primaire utilisés sont : phospho-eIF2α (Cell Signaling, #9721), eIF2α (Cell Signaling, #9722), phospho-PKR (Abcam, #ab81303), PKR (Abcam, #ab184257) et β-actin (Sigma, #A1978) dilués à 1/1000, dans du PBS-5% BSA puis incubés pendant une nuit à 4°C. Les protéines cibles sont révélées avec un anticorps secondaire anti-rabbit HRP (Cell Signaling, #7074) à une dilution de 1/1000 sauf pour l'actine que l'on révèle avec un anti-mouse HRP (Santa Cruz, #sc-2302) à une dilution de 1/2000, suivi pour tous d'un agent luminescent (Pico ou Femto de Pierce). La luminescence des protéines est ensuite détectée avec la G:BOX Chemi system (Syngene, UK) et quantifiée avec le programme GenoSoft (VWR).

Prélèvement des organes et purification cellulaire

Les souris CRISPR de 5 mois ont été anesthésiées avec un mélange Kétamine/Xylazine, puis le sang a été collecté par ponction cardiaque et mis en présence de 20µl d'EDTA 0,5M puis placé sur glace en attendant les cellules de la rate et des fémurs. Les ganglions cervicaux et les glandes salivaires ont été prélevés et fixés dans du formol. Les 2 reins de chaque souris ont été prélevés, coupés en deux et ½ rein a été fixé avec du formol, 2 ½ reins ont été congelés séparément dans de l'azote liquide, et enfin le dernier ½ rein a été incubé dans du RNA later (Invitrogen) pour une nuit à 4°C puis conservé à -80°C. Les rates ont été prélevées, pesées puis un morceau transversal a été coupé et congelé dans de l'azote liquide. Les restes de rate ont été écrasés dans du PBS puis passés sur un filtre 70µ et placés sur glace. Les fémurs ont

été prélevés, nettoyés de tout tissu résiduel puis coupés aux extrémités et placés dans un Eppendorf 0,5ml troué avec une aiguille 21G, placé lui-même dans un Eppendorf 1,5ml puis centrifugés quelques secondes à 5000g. Les cellules de la moelle osseuse ont ensuite été resuspendues dans du PBS puis passées sur un filtre 70µ avant d'être placées sur glace.

Les tubes de sang, de rate et de moelle osseuse ont été centrifugés à 500g pendant 5 minutes à 4°C. Les plasmas ont été récupérés et conservés à -80°C. Les buffy coat et les culots de rate et de moelle osseuse ont été resuspendus dans un tampon de lyse des globules rouges (home made) et incubés pendant 5 minutes à température ambiante. La lyse a ensuite été coupée par l'ajout de PBS puis les tubes ont été centrifugés à 500g pendant 5 minutes à 4°C. Les cellules ont été resuspendues dans du PBS/EDTA 2mM BSA 0,5% puis comptées pour la partie cytométrie de flux.

Pour les souris CRISPR de 7 mois, le même protocole de prélèvement a été réalisé pour récupérer le plasma, les ganglions avec les glandes salivaires et les reins. Il n'y a pas eu de purification cellulaire pour ces souris.

Cytométrie de flux

La totalité des cellules du sang, 4.10^6 cellules de la rate et 2.10^6 cellules de la moelle osseuse ont été incubées avec un marqueur de viabilité (Zombie Violet vital dye (ZV), eBiosciences, #65-0863-14) pendant 20 minutes à 4°C, puis lavées, centrifugées et resuspendues dans du PBE (PBS-EDTA 1mM + 0,5% BSA). Les récepteurs Fc sont bloqués avec un anti-CD16/32 Fc Block (Biolegend, #101319) pendant 10 minutes à 4°C puis les cellules sont marquées avec les mix d'anticorps (Tableau 7) pendant 20 minutes à 4°C, lavées, centrifugées et resuspendues dans du PBE pour l'acquisition au cytomètre de flux (Canto II, Becton Dickinson). Les résultats sont analysés avec le programme FlowJo X 10.0.7r2.

	ANTICORPS		
channel	**Blood panel 1**	**Blood panel 2**	**Bone marrow**
FITC	CD5-FITC (BD-Pharmingen, #553020)	-	CD43-FITC (eBioscience, #11-0431-81)
PE	CD138-PE (BD-Pharmingen, #561070)	CD115-PE (BD-Pharmingen, #565249)	CD138-PE (BD-Pharmingen, #561070)
PC5.5	CD19-PC5.5 (BD-Pharmingen, #561113)	CD11b-PC5.5 (BD-Pharmingen, #561114)	-
PC7	CD69-PC7 (BD-Pharmingen, #561930)	SiglecH-PC7 (eBioscience, #25-0333-80)	CD24-PC7 (eBioscience, #25-0242-80)
APC	CD49b-APC (BD-Pharmingen, #560628)	CD11c-APC (BD-Pharmingen, #561119)	IgM-eF660 (eBioscience, #50-5790)
APC-Cy7	CD8a-APC-Cy7 (BD-Pharmingen, #561967)	Gr1-APC-Cy7 (BD-Pharmingen, #557661)	IgD-eF780 (eBioscience, #47-5993-80)
PB	-	CD5-eF450 (eBioscience, #48-0051-80)	CD5-eF450 (eBioscience, #48-0051-80)
PB	-	CD19-eF450 (eBioscience, #48-0193-80)	-
PB	-	CD49b-BV421 (BD-Pharmingen, #563063)	CD49b-BV421 (BD-Pharmingen, #563063)
KO	CD4-V500 (BD-Pharmingen, #560783)	B220-V500 (BD-Pharmingen, #561227)	B220-V500 (BD-Pharmingen, #561227)

	ANTICORPS		
channel	**Spleen panel 1**	**Spleen panel 2**	**Spleen panel 3**
FITC	CD5-FITC (BD-Pharmingen, #553020)	CD5-FITC (BD-Pharmingen, #553020)	CD8a-FITC (BD-Pharmingen, #553030)
PE	CD23-PE (eBioscience, #12-0232-81)	CD25-PE (BD-Pharmingen, #561065)	CD115-PE (BD-Pharmingen, #565249)
PC5.5	CD21-PC5.5 (BioLegend, #123415)	CD62L-PC5.5 (BioLegend, #104431)	CD11b-PC5.5 (BD-Pharmingen, #561114)
PC7	CD93-PC7 (eBioscience, #25-5892-81)	CD44-PC7 (BioLegend, #103029)	SiglecH-PC7 (eBioscience, #25-0333-80)
APC	IgM-eF660 (eBioscience, #50-5790)	CD49b-APC (BD-Pharmingen, #560628)	CD11c-APC (BD-Pharmingen, #561119)
APC-Cy7	IgD-eF780 (eBioscience, #47-5993-80)	CD8a-APC-Cy7 (BD-Pharmingen, #561967)	Gr1-APC-Cy7 (BD-Pharmingen, #557661)
PB	-	-	CD5-eF450 (eBioscience, #48-0051-80)
PB	-	-	CD19-eF450 (eBioscience, #48-0193-80)
PB	-	-	CD49b-BV421 (BD-Pharmingen, #563063)
KO	B220-V500 (BD-Pharmingen, #561227)	CD4-V500 (BD-Pharmingen, #560783)	CD138-BV510 (BD-Pharmingen, #563192)

Tableau 7. Panels des anticorps de cytométrie de flux

Immunohistochimie

Analyse de l'atteinte rénale

La coloration hématoxyline éosine (HE) a été réalisé sur les reins fixés avec le formol puis enrobés dans de la paraffine et coupés à du 5 µm.

Le marquage en immunofluorescence du dépôt des immunoglobulines dans les reins des souris a été réalisé sur les ½ reins congelés dans l'azote liquide puis incorporé dans un composé OCT. Les lames de reins congelés ont été saturées avec du PBS-BSA 4% et marquées pendant 30 minutes avec un anticorps anti-IgG2b Alexa 488 (Life Technologie, A-21141) dilué 200 fois. Les lames ont ensuite été rincées 3 fois dans du PBS 1x puis montées et scannées avec le scanner de lames MIRAX équipé pour la fluorescence (Zeiss, Allemagne).

Les reins ont été analysés et scorés selon Weening [158] par un anatomopathologiste en aveugle. Brièvement, la présence ou non de certains éléments histologiques sont analysés comme la prolifération cellulaire, les croissants fibreux ou cellulaires, les dépôts hyalins, la fibrose ou l'inflammation interstitielle, l'atrophie tubulaire et les dépôts

d'immunoglobulines. Une classe ISN-RPS (International Society of Nephrology - Renal Pathology Society) de la néphrite lupique est finalement attribuée à chaque rein.

Analyse des ganglions

Les ganglions ont été fixés avec du formol puis enrobés dans de la paraffine et coupés à du 5 µm. Les lames ont été déparaffinées puis démasquées dans du tampon EDTA Borate (CD138) ou citrate (CD3, BCl2, Ig Lambda et Ig Kappa). L'inhibition des peroxydases endogènes a été réalisée avec le réactif de Dako puis l'inhibition des réactions aspécifiques a été faite avec un mélange de BSA (5%), lait (2%) dans du tampon Dako. Le marquage CD138 (Sino Biological 50641-RP02-50) a été réalisé à une dilution de 2µg/ml pendant une heure à 37°C. Les marquages CD3 (Abcam ab5690) à une dilution 1/100, BCl2 (Abcam ab182858) à une dilution 1/1000, Ig Lambda (Novus NBP1-72792) à une dilution 1/3000, et Ig Kappa (Abcam ab190484) à une dilution 1/1000, ont été réalisés pendant une nuit à 4°C. Pour finir, la révélation des marquages a été réalisée avec le système Em-Vision de Dako.

Les sections ont été digitalisées à un grossissement 40x avec le scanner de lames SCN400 (Leica, Wetzlar, Allemagne).

Pour la quantification du marquage CD138, les tissus de ganglions ont été délimités manuellement en excluant les plis, les bulles et autres artéfacts (2 échantillons ont été exclus de l'analyse car les tissus étaient entièrement contaminés par des globules rouges). Puis le marquage a été quantifié en utilisant le programme Tissue IA (Leica Biosystems, Dublin, Irlande).

Pour la semi-quantification de Ig Lambda, 2 observateurs indépendants ont évalué le marquage selon une échelle de 0 à 3 où 0 = pas de marquage, 1 = marquage léger, 2 = marquage modéré, 3 = marquage fort.

ELISA

Dosage des immunoglobulines totales

Un anticorps anti-Mouse kappa light chain (Abcam, ab99614) a été coaté dans une plaque 96 puits à fond plat (Greiner bio-one 655061) à une dilution 1/200

dans du tampon bicarbonate, puis placé à 4°C pour la nuit. Le lendemain, la plaque a été lavée 4 fois dans un tampon de lavage (PBS 0,1% Tween20), saturée avec 10% de lait pendant 2 heures à 37°C, lavée 4 fois, incubée avec les sérums dilués ($2{,}5.10^{6}$x) et la courbe standard pendant 2 heures à 37°C, lavée 4 fois, incubée avec l'anticorps secondaire (Rat Anti-Mouse Kappa Light Chain Cl. LO-MK-1 HRP mAb, Cell Sciences, CMSR011P-500) dilué 1/1000 pendant 2 heures à 37°C, lavée 4 fois et enfin révélée au TMB puis H_2SO_4 et lue au spectrophotomètre à 450nm.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec GraphPad Prism (GraphPad Software Inc. Version 5.0f). Les résultats représentent la moyenne ± l'écart-type, et les valeurs de P inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives.

Résultats

Surexpression de PKR dans des PBMC de patients lupiques

Des microarrays réalisées au laboratoire sur des lymphocytes B de patients atteints de lupus et de contrôles sains, montrent que 196 (sur 51.142) probe sets sont significativement surexprimés dans les lymphocytes B lupiques. Les analyses de pathways indiquent un enrichissement significatif de gènes interféron-induits, mais également de gènes impliqués dans la division cellulaire parmi ces transcrits. Pas moins de 146 sur les 196 gènes surexprimés sont induits par l'IFNα2b dans une expérience réalisée sur du sang total de contrôles sains. Parmi les gènes interférons-induits surexprimés chez les patients lupiques, se trouve la protéine PKR (Figure 17).

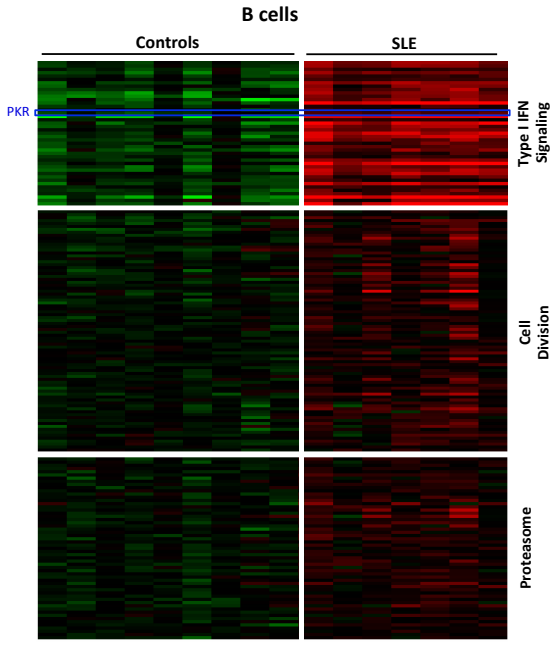


Figure 17. Pathways et transcrits significativement surexprimés dans les lypmhocytes B de patients lupiques.

Les analyses de pathways (http://david.abcc.ncifcrf.gov) des 196 transcrits significativement surexprimés dans les lymphocytes B lupiques (test t de student non pairé), montrent un enrichissement des gènes de la voie des IFN (43 probe sets), des gènes de la division cellulaire (82 probe sets) et des gènes du protéasome (57 probe sets). Les valeurs d'expression génique sont normalisées en base log 2 et centrées sur la moyenne d'expression du transcript (= -3 ; = +3)

Phosphorylation spontanée de PKR dans des PBMC de patients lupiques

Par la suite, nous avons voulu étudier l'état d'activation de PKR dans les PBMC des patients lupiques. Pour cela, nous avons prélevé du sang frais chez des patients lupiques et des contrôles dont nous avons extrait les PBMC, puis nous avons réalisé un western blot pour détecter la forme phosphorylée de PKR, soit sa forme active. Les résultats montrent que PKR est spontanément phosphorylée dans les PBMC des patients lupiques (Figure 18).

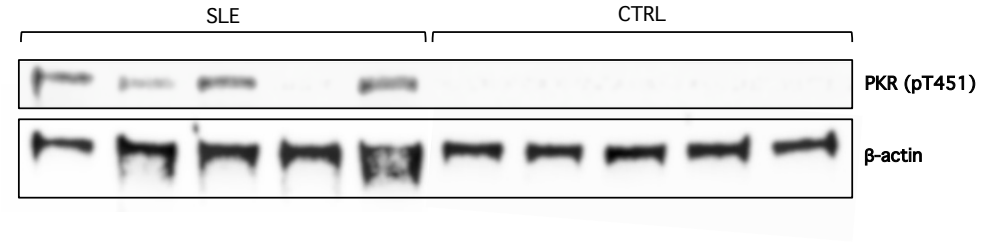


Figure 18. Phosphorylation spontanée de PKR dans des PBMC de patients lupiques

Western blot de la phosphorylation de PKR dans des PBMC frais de patients lupiques (SLE) et contrôles (CTRL).

Effets de l'inhibition de PKR dans des PBMC lupiques

Afin d'évaluer le rôle potentiel de PKR dans la signature interféron, nous avons traité, pendant une nuit, des PBMC provenant de patients lupiques avec de la 2-aminopurine (2AP), un inhibiteur pharmacologique de PKR. Les résultats des microarrays réalisées à partir de ces PBMC traités montrent une diminution de l'expression de gènes interféron-induits après traitement à la 2AP, de même qu'une diminution de gènes de chémokines et d'immunoglobulines (Figure 19 A). Ces résultats ont ensuite été confirmés par PCR quantitative pour 3 gènes : Ig, IFI27 et IFI44L (Figure 19 B).

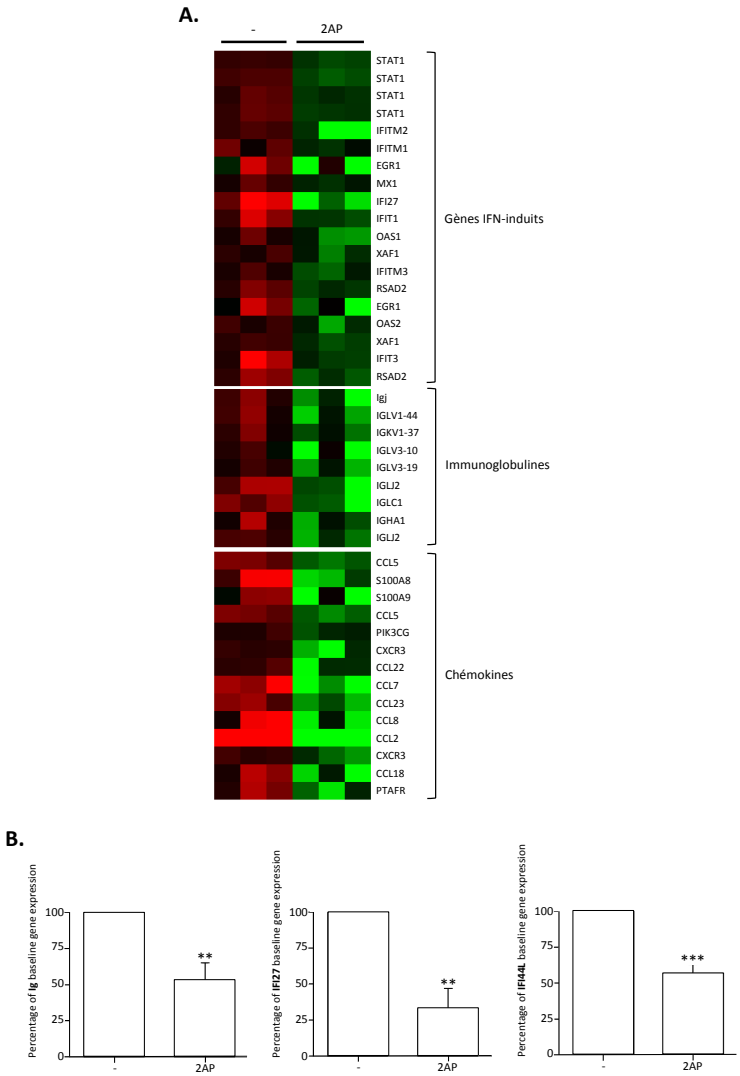


Figure 19. La 2AP induit une diminution de l'expression des gènes interféron-induits et des gènes de chémokines et d'immunoglobulines

A. Les analyses de pathways (http://david.abcc.ncifcrf.gov) des 1534 transcrits significativement diminués par la 2AP (test t de student non pairé), montrent un enrichissement des gènes IFN-induits (19 probe sets), des gènes des immunoglobulines (9 probe sets) et des gènes des chémokines (14 probe sets). Les valeurs d'expression génique sont normalisées en base log 2 et centrées sur la moyenne d'expression du transcript (= -3 ; = +3) **B.** Expression quantitative des gènes IG, IFI27 et IFI44L sur les même ARN que ceux utilisés en A. **p<0,005 et ***p<0,0001 en utilisant un test t de Student

Effets de la 6-mercaptopurine sur la fonction de PKR

La 6-mercaptopurine (6MP) est un analogue de purine moléculairement très proche de la 2AP (Figure 20 A), et est le métabolite actif de l'azathioprine, un médicament immunosuppresseur donné aux patients lupiques et dont le mécanisme d'action n'est pas totalement connu. Sachant que la 2AP est un inhibiteur de PKR, nous avons voulu étudier l'effet de la 6MP sur la fonction de PKR. Pour cela, nous avons infecté des cellules avec un virus activateur de PKR puis nous avons traité les cellules avec les 2 analogues de purine séparément, et avons analysé la phosphorylation de PKR et de son substrat eIF2α par western blot. Il ressort de notre étude que la 6MP, comme la 2AP, empêche la phosphorylation de PKR et de son substrat eIF2α après infection par un virus induisant l'activation de PKR (Figure 20 B et C). La 6MP est donc, comme la 2AP, un inhibiteur de PKR.

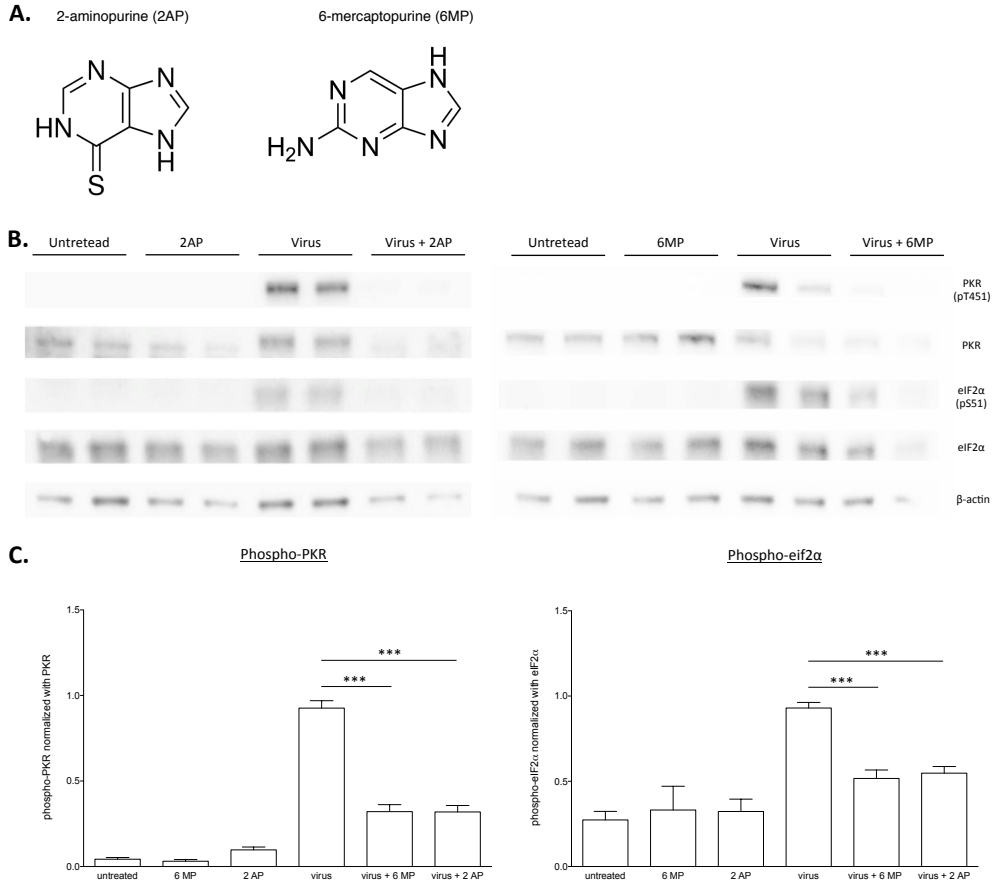
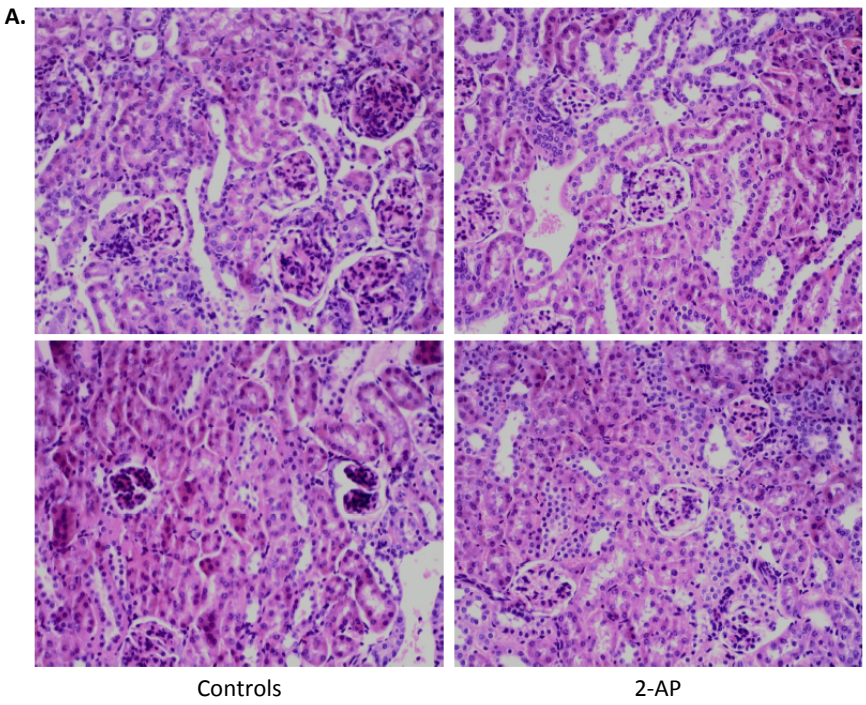


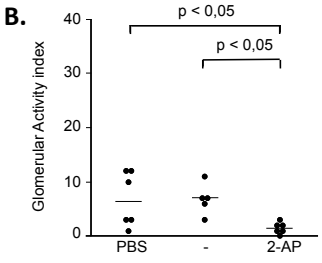
Figure 20. Le traitement de cellules infectées par un virus avec la 2 AP ou la 6MP, induit l'inhibition de PKR

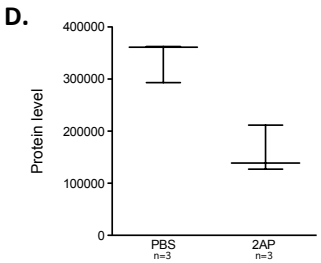
A. Structure moléculaire de la 2AP et de la 6MP **B.** Western blot de la forme phosphorylée de PKR et d'eIF2α, de la forme non phosphorylée de PKR et d'eIF2α et de l'actine dans des cellules HEK293 infectées ou non par un virus et traitées ou non par la 2AP ou la 6MP **C.** Quantification des signaux de PKR phosphorylé sur PKR et eIF2α phosphorylé sur eIF2α (n=4) en normalisant pour chaque expérience la plus haute valeur des 2 ratios de la condition « virus » à 1. ***p<0,0001 en utilisant un test t de Student non apparié.

L'injection de 2-aminopurine dans des souris lupiques (NZB x NZW)F1 induit une diminution de l'atteinte rénale

Par la suite, nous avons voulu étudier l'effet de la 2AP sur la physiopathologie du lupus dans le modèle murin. Pour cela, nous avons travaillé avec 3 groupes de 6 souris lupiques (NZB x NZW)F1 de 5 mois où un groupe recevait une injection intrapéritonéale (IP) tous les 2 jours de 7,5mg de 2AP, un autre groupe recevait le même type d'injection à la même fréquence mais de PBS et un dernier groupe ne recevait pas d'injection. Après 40 jours, les souris ont été sacrifiées et les reins ont été analysés en histologie par un anatomopathologiste en aveugle. Il ressort de cette expérience que les souris traitées avec la 2AP ont un score d'activité et une infiltration glomérulaire inférieure aux souris contrôles (Figure 21 A et B). De plus, du sérum a été prélevé avant les injections et au moment de l'euthanasie et les analyses réalisées sur ces sérums montrent que les taux d'anticorps anti-ADNdb et d'urée sont significativement moins augmentés après 40 jours de traitement chez les souris injectées avec la 2AP que chez les contrôles (Figure 21 C). De même qu'une analyse protéomique réalisée sur les reins des souris injectées à la 2AP montre une diminution de la présence d'immunoglobulines, comparée aux souris injectées avec du PBS (Figure 21 D).


A.
Controls
2-AP


B.
p < 0,05
p < 0,05
Glomerular Activity index
40
30
20
10
0
PBS
-
2-AP


D.
Protein level
400000
300000
200000
100000
0
PBS
n=3
2AP
n=3

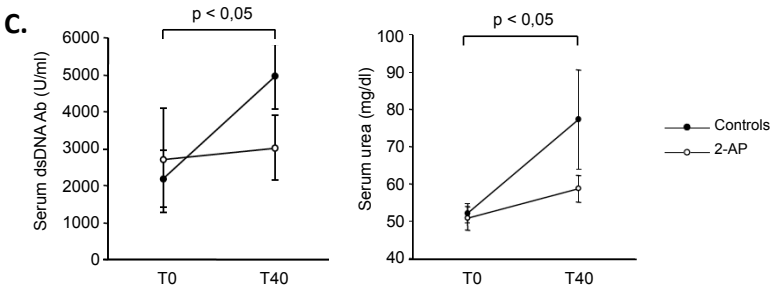

C.
p < 0,05
Serum dsDNA Ab (U/ml)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
T0
T40
p < 0,05
Serum urea (mg/dl)
100
90
80
70
60
50
40
T0
T40
Controls
2-AP

Figure 21. Le phénotype lupique est diminué après le traitement à la 2AP des souris

A. Représentation photographique de la différence d'infiltration glomérulaire entre les reins des souris traités à la 2AP et les contrôles (coloration HE, grossissement 20x) **B.** Score glomérulaire donné à chaque rein de souris selon Weening, $p<0,05$ en utilisant un test t de Student non pairé **C.** Evolution du taux d'anticorps anti-ADNdb et du taux d'urée dans le sérum des souris contrôles (PBS et non injectées) et traitées à la 2AP au temps 0 et après 40 jours, $p<0,05$ en utilisant un test t de Student pairé **D.** Analyse protéomique sur 3 reins traités à la 2AP et au PBS pour les immunoglobulines (1 composant).

Génération de souris lupiques PKR-inactivées avec la méthode speed-congenic

Les résultats de l'expérience avec l'injection de 2AP dans des souris lupiques étant très prometteurs mais pouvant être induit par des effets off-target de la 2AP, c'est à dire des effets inattendus de cette molécule sur une autre cible que PKR et induisant les différences observées, nous avons décidé de générer des souris lupiques PKR-inactivées dans le but d'étudier le rôle précis de PKR dans la physiopathologie du lupus.

Au début de ce travail, nous avons suivi la méthode dite « speed-congenic » pour la génération de ces souris lupiques PKR-inactivées. Pour cela, nous avons croisé des souris PKR -/- (délétion de l'exon 13 [155]) avec des souris lupiques B6.*Sle1*/*Sle2*/*Sle3* qui sont des souris B6 tricongéniques dont le phénotype lupique est dû à la présence, à l'état homozygote, de 3 régions chromosomiques de susceptibilité (*Sle1*/*Sle2*/*Sle3*) et l'absence d'un locus suppresseur (Sles1). Ensuite, nous avons réalisé des back-cross successifs de cette première génération de souris (PKR +/-) avec les souris lupiques. Nous avons génotypé les souris à chaque génération pour ne garder que les souris PKR +/- les plus homozygotes pour les locus de susceptibilité à la maladie lupique. Une fois que nous avons obtenu les souris hétérozygotes pour PKR et homozygotes pour les 4 locus associés au lupus, nous les avons intercrossées pour obtenir les souris lupiques PKR -/-, +/+ et +/- (Figure 22).

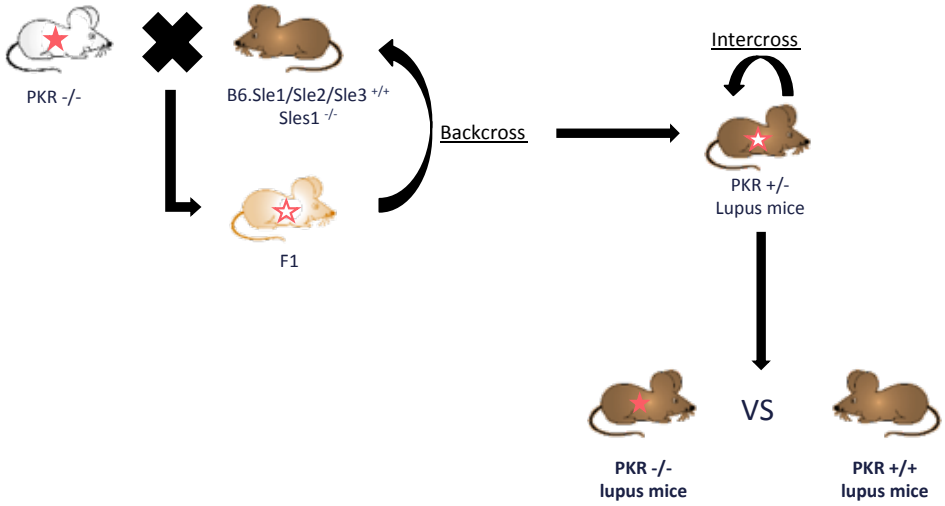


Figure 22. Génération de souris lupiques PKR-inactivées avec la méthode « speed-congenic »

Sur ces souris, nous avons prélevé le sérum et l'urine tous les 2 mois de vie et nous avons étudié la mortalité. Mais les résultats qui sont ressortis de cette étude ont mis en évidence un problème au niveau des back-crosses car la maladie lupique n'apparaissait plus chez les souris lupiques PKR +/+. Nous avons alors découvert la présence d'une recombinaison hot-spot dans le locus *Sle1*, le plus important au développement du lupus.

Génération de souris lupiques PKR-inactivées avec la méthode CRISPR/Cas9

En raison des difficultés rencontrées avec la méthode « speed-congenic », nous nous sommes dirigés vers la méthode CRISPR/Cas9 afin de ne pas modifier le background génétique des souris lupiques B6.*Sle1*/*Sle2*/*Sle3*. Pour cela, nous avons microinjecté des zygotes de souris lupiques B6.*Sle1*/*Sle2*/*Sle3* avec un plasmide codant pour l'endonucléase Cas9 et un ARN guide ciblant la partie catalytique de PKR.

Un total de 162 blastocystes a été transféré dans 9 femelles pseudo gestantes dont 2 ont poursuivi la grossesse à terme, donnant naissance à 5 souriceaux. Le génotypage et séquençage de l'exon 13 de PKR à partir de l'ADN génomique extrait d'un morceau de queue de ces 5 souris, montrent qu'une souris possède une mutation à l'état hétérozygote dans le gène PKR conduisant à un codon stop prématuré (Figure 23).

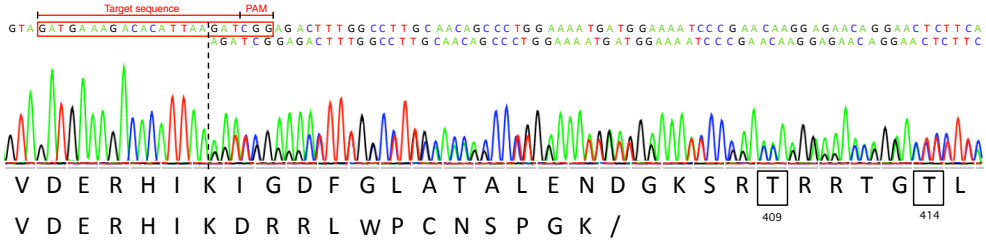


Figure 23. Obtention d'une souris hétérozygote pour PKR dont le brin muté conduit à un codon stop prématuré.

Résultat du séquençage de l'exon 13 du gène PKR avec, tout en haut, la séquence originale en acide nucléique du gène PKR et la partie ciblée par l'endonucléase Cas9, puis juste en-dessous, la séquence correspondant au deuxième brin du gène PKR où on remarque l'addition d'une base d'adénine par l'apparition d'un deuxième pic à partir des pointillés. En-dessous du chromatogramme se trouve la séquence protéique originale de PKR avec les deux thréonines indispensables à son activation (409 et 414), et en-dessous, la séquence protéique correspondant au brin muté de PKR avec l'apparition d'un codon stop prématuré conduisant à la perte des deux thréonines.

Vérification des off-targets

Nous avons tenté un séquençage du génome total de notre souris CRISPR hétérozygote sur une plateforme locale (UCL), cependant, les résultats n'étant pas probants, nous nous sommes tourné vers une analyse informatique des off-targets. Pour cela, nous avons introduit notre séquence cible dans un programme de prédiction d'off-targets, http://crispr.mit.edu/, qui nous a identifié 399 sites dont 18 dans des gènes mais avec une probabilité de reconnaissance très faible. Nous ne devrions donc pas rencontrer de problème d'off-targets dans nos souris.

Confirmation du phénotype inactivé des souris CRISPR PKR -/-

Afin de confirmer l'absence d'activité de PKR chez les souris -/-, nous avons généré des cellules MEFs PKR -/- et +/+ que nous avons mis en présence ou non de poly I:C, puis nous avons analysé la phosphorylation du substrat de PKR, eIF2α. Nous n'étudions pas directement la phosphorylation de PKR chez la souris car les anticorps détectant cette phosphorylation ne sont pas efficaces pour cette espèce.

Les résultats du western blot et sa quantification montre que l'absence des deux thréonines chez les PKR -/- conduit à une incapacité de PKR à activer son substrat eIF2α en réponse au poly I:C (Figure 24).

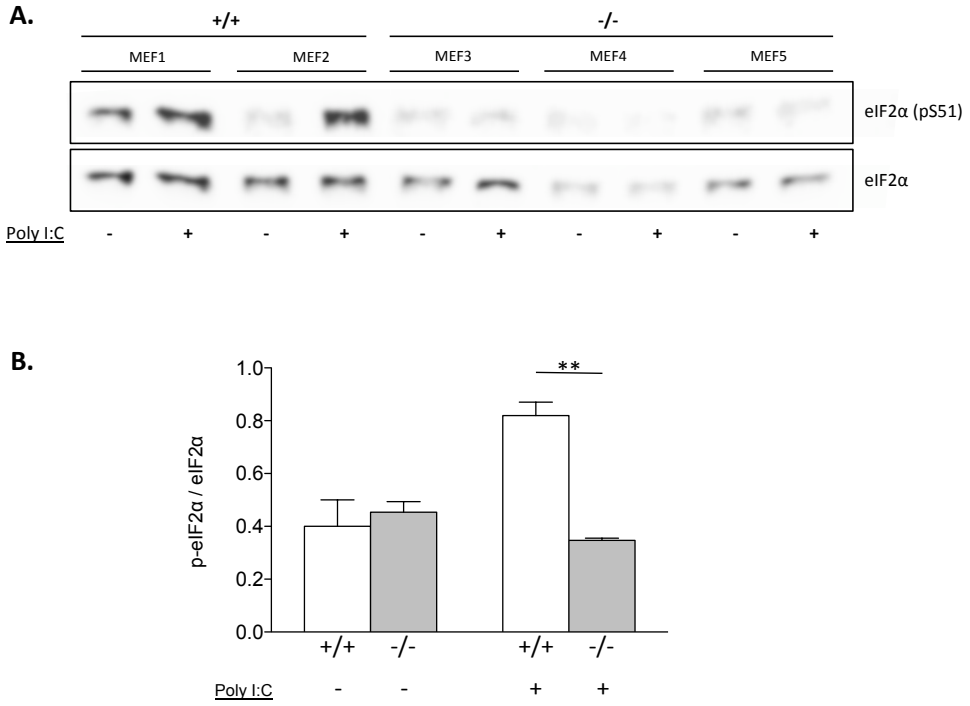


Figure 24. Confirmation du phénotype inactivé des souris lupiques PKR -/-

A. Western-blot de la phosphorylation d'eIF2α dans des MEFs traitées au poly I:C (n=2) **B.** Quantification des signaux d'eIF2α phosphorylé sur eIF2α provenant du Western-blot A. Les résultats représentent les moyennes avec écart-type du rapport phospho-eIF2α/eIF2α. **p<0,005 en utilisant un test t de Student non apparié.

Effets de l'inactivation de PKR au niveau du profil cellulaire des souris lupiques

Ayant validé notre modèle PKR -/- vs +/+, nous avons étudié les profils cellulaires par cytométrie de flux de ces souris à 5 mois de vie, moment où la maladie commence à s'installer. Nous l'avons comparé aux profils cellulaires de souris lupiques B6.*Sle1*/*Sle2*/*Sle3* (=SLE) vs contrôles (C57Bl/6 = B6) étudiés au même âge, et il ressort que pour plusieurs populations cellulaires, la différence -/- vs +/+ mime celle observée entre B6 et SLE (Figure 25). On note, chez les souris -/- et B6 comparées respectivement aux +/+ et SLE, une augmentation des lymphoblastes ($CD19^+/CD138^+$) et une diminution des plasmocytes ($CD19^-/CD138^+$) ainsi qu'une diminution des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans le sang, et une diminution du ratio CD4 : CD8 dans la rate. On n'observe pas de différences significatives cohérentes pour les autres populations étudiées (Tableau 8).

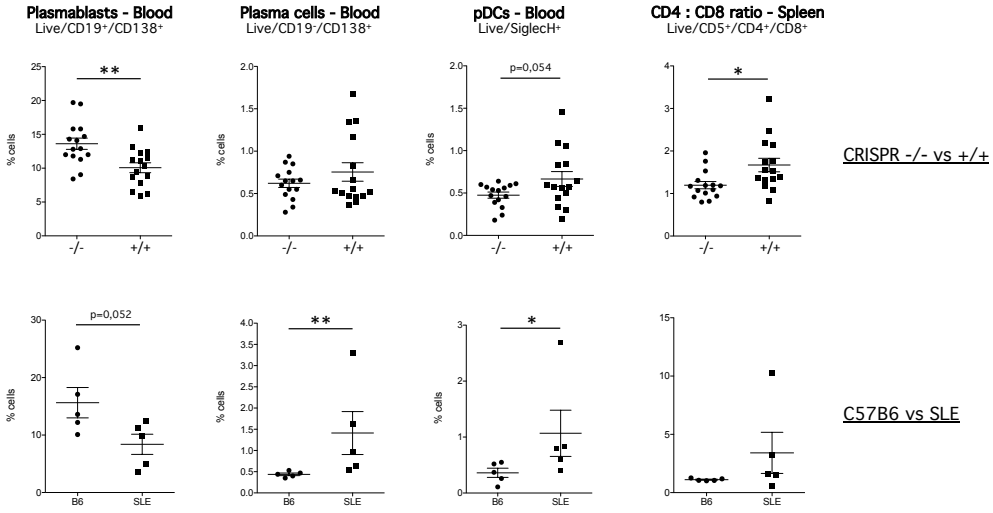


Figure 25. Le phénotype -/- à 5 mois permet de rétablir le profil observé pour certaines populations cellulaires entre les souris contrôles C57B6 et les souris lupiques B6.*Sle1*/*Sle2*/*Sle3* au même âge

Les résultats représentent les moyennes avec écart-type du pourcentage des lymphoblastes, des plasmocytes et des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans le sang et du ratio CD4 : CD8 dans la rate des souris. CRISPR -/- vs +/+ = 15 souris par groupe, C57B6 vs SLE = 5 souris par groupe. *p<0,05, **p<0,005 en utilisant un test t de Student non apparié.

					% population mean		p-value	
					-/-	+/+		
Blood panel 1	Live (ZV⁻)	T cells (CD5⁺)		Total	14,07	15,56	0,4842	
				Activated (CD69⁺)	1,498	1,634	0,4869	
				CD4⁺	28,38	33,99	0,0322	*
				CD4 activated (CD69⁺)	1,387	0,955	0,2118	
				CD8⁺	65,87	60,50	0,0389	*
				CD8 activated (CD69⁺)	1,074	1,420	0,0349	*
		B cells (CD19⁺)		Total	58,52	56,71	0,4715	
				Activated (CD69⁺)	3,173	3,161	0,9454	
		Plasmablasts (CD19⁺, CD138⁺)			13,61	10,07	0,0035	**
		Plasma cells (CD19⁻, CD138⁺)			0,621	0,755	0,2741	
Blood panel 2	Live + Lin (ZV⁻, CD5⁻, CD19⁻, CD49b⁻)	Granulocytes (CD11b⁺, SSC-A^{hight})		Total	61,60	64,29	0,5899	
				Neutrophils (Gr1⁺)	93,67	89,55	0,0782	
		Not granulocytes (SSC-A^{low})		Monocytes (CD11b⁺, CD115⁺)	60,11	55,91	0,5094	
		Eosinophils (CD11b$^{+/-}$, SiglecH⁺)			0,50	0,59	0,2451	
		pDCs (CD11c⁺, SiglecH⁺)		Total	0,475	0,665	0,0536	
				B220⁺	30,67	24,23	0,1717	
Spleen panel 1	Live (ZV⁻)	B cells (B220⁺)		Total	48,75	42,69	0,0184	*
				MZ B (CD93⁻, CD21⁺, CD23⁻)	12,94	13,32	0,8633	
				FO B (CD93⁻, CD21$^{+/-}$, CD23⁺)	64,05	59,65	0,1104	
				T1 B (CD93⁺, IgM⁺, CD23⁻)	43,19	37,73	0,1009	
				T2 B (CD93⁺, IgM⁺, CD23⁺)	37,59	34,41	0,2275	
				T3 B (CD93⁺, IgM⁻, CD23⁺)	3,047	4,247	0,0148	*
				B1a (CD93⁻, IgM⁺, IgD⁻, CD21⁻, CD23⁻, CD5⁺)	9,491	9,779	0,8695	
Spleen panel 2	Live (ZV⁻)	T cells (CD5⁺)	CD4⁺	Total	14,27	16,56	0,0822	
				T helper (CD25⁻) Total	83,55	83,04	0,6769	
				T helper (CD25⁻) Effector (CD44⁻, CD62L⁻)	10,48	10,28	0,8627	
				T helper (CD25⁻) Memory (CD44⁺, CD62L⁻)	44,91	44,78	0,9753	
				T helper (CD25⁻) Naïve (CD44⁻, CD62L⁺)	33,73	32,63	0,8453	
				T reg (CD25⁺)	16,06	16,60	0,6479	
			CD8⁺		12,30	11,05	0,3553	
Spleen panel 3	Live + Lin (ZV⁻, CD5⁻, CD19⁻, CD49b⁻)	cDCs (SiglecH⁻, CD11c⁺)	Total		13,49	14,73	0,3067	
			cDC1 (CD8a⁺, CD11b⁻)		26,28	24,67	0,4239	
			cDC2 (CD8a⁻, CD11b⁺)		62,47	63,27	0,7047	
		pDCs (SiglecH⁺, CD11c⁻)			2,145	2,245	0,8329	
		Plasma cells (CD138⁺)			20,29	16,60	0,2179	
		Monocytes (CD115⁺, CD11b⁺)			12,50	14,03	0,4989	
		Granulocytes (CD11b⁺, SSC-A^{hight})	Total		13,29	14,24	0,6393	
			Eosinophils (SSC-A^{hight}, Gr1⁻)		21,73	21,91	0,9634	
			Neutrophils (Gr1⁺)		63,24	57,73	0,1725	

Bone Marrow	Live + Lin (ZV^-, $CD5^-$, $CD49b^-$)	Plasma cells ($B220^{+/-}$, $CD138^+$)			8,882	7,654	0,2747	
		B cell lineage ($B220^+$)	Total		15,91	13,34	0,1166	
			PreProB ($CD43^+$, $CD24^+$)		18,39	18,66	0,8918	
			Developing B ($CD43^-$, $CD24^+$)	Total	20,60	24,06	0,3583	
				Transitional B (IgM^+, IgD^-)	1,671	1,542	0,7353	
				Immature B ($IgM^{+/-}$, IgD^-)	0,241	0,362	0,3694	
				ProB PreB (IgM^-, IgD^-)	1,303	3,391	0,0283	*
				Early mature B (IgM^+, IgD^+)	96,09	93,69	0,074	
				Late mature B (IgM^-, IgD^+)	0,705	1,025	0,0602	

Tableau 8. Pourcentage de toutes les populations analysées par cytométrie de flux pour les souris lupiques PKR -/- et +/+

Les populations cellulaires du sang, de la rate et de la moelle osseuse ont été analysées en utilisant 6 panels de cytométrie de flux. Les résultats représentent la moyenne du pourcentage de chaque population cellulaire sur la population dont elles proviennent selon la stratégie de gating (population en amont dans le tableau), pour les souris lupiques PKR -/- (n=15) et +/+ (n=15) et la p-value obtenue en comparant ces 2 groupes. *p<0,05, **p<0,005 en utilisant un test t de Student non apparié.

Effets de l'inactivation de PKR sur les ganglions cervicaux des souris lupiques

Le volume des ganglions cervicaux est souvent augmenté pendant la maladie lupique, mais cette adénopathie est généralement bénigne. L'analyse histologique des ganglions cervicaux des souris lupiques PKR -/- et +/+ ne montre pas de différence significative au niveau de l'hyperplasie folliculaire en coloration HE, et confirme qu'il ne s'agit pas d'un lymphome par l'analyse des marquages CD3, BCl2, Ig Kappa et Ig Lambda. Cependant, les ganglions des souris lupiques PKR +/+ ont une infiltration significativement plus importante de plasmocytes (marquage CD138) avec une plus grande présence d'Ig Lambda que chez les -/- (Figure 26). Ce résultat corrèle avec l'observation faite dans le sang des souris, à savoir plus de plasmocytes chez les +/+ comparés aux -/-.

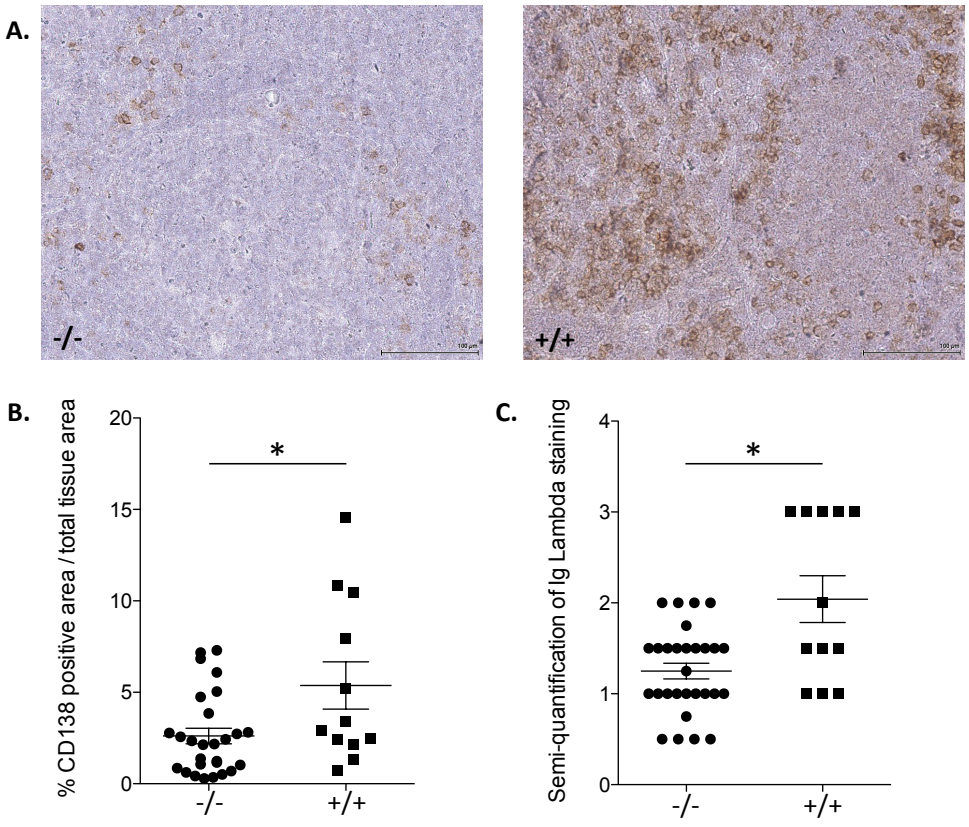


Figure 26. Le phénotype -/- induit une plus faible présence de plasmocytes dans les ganglions cervicaux à 7 mois

A. Représentation photographique de la différence du marquage CD138 (marquage HRP-DAB, grossissement 20x, barre = 100 µm) **B.** Quantification du marquage CD138 des ganglions cervicaux des souris lupiques PKR -/- (n=27) et +/+ (n=12) reportée à la taille du tissu total **C.** Quantification semi-quantitative du marquage de l'immunoglobuline Lambda par 2 observateurs indépendants (corrélation de 0,84) des ganglions cervicaux des souris lupiques PKR -/- (n=27) et +/+ (n=12). *p<0,05 en utilisant un test t de Student non paramétrique.

Effets de l'inactivation de PKR sur la production des immunoglobulines des souris lupiques

Pour déterminer si la diminution des plasmocytes observée dans le sang et les ganglions à un impact sur la production des anticorps, nous avons dosé le taux d'immunoglobulines (Ig) totales du sérum des souris à 7 mois d'âge. Les résultats montrent une diminution significative des Ig totales du sérum chez les souris lupiques PKR -/- comparés aux +/+ (Figure 27).

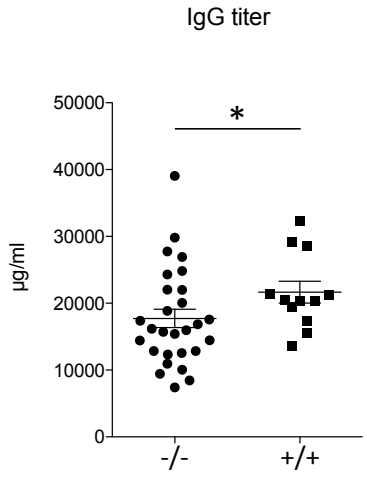


Figure 27. Le phénotype -/- induit une diminution des immunoglobulines totales du sérum à 7 mois

Le dosage des immunoglobulines totales du sérum a été réalisé avec un ELISA sandwich. Les résultats représentent la moyenne avec écart-type des PKR -/- (n=28) et +/+ (n=12). *p<0,05 en utilisant un test t de Student non paramétrique.

Effets de l'inactivation de PKR sur l'atteinte rénale des souris lupiques

La néphrite lupique étant une des complications grave de la maladie lupique, nous avons comparé l'atteinte rénale de nos souris -/- et +/+. Il ressort de cette analyse qu'à 7 mois, lorsque la maladie rénale est installée, l'atteinte glomérulaire (classe ISN-RPS) et l'infiltration tubulaire par des lymphocytes sont significativement plus importantes chez les souris +/+ comparée aux -/- (Figure 28).

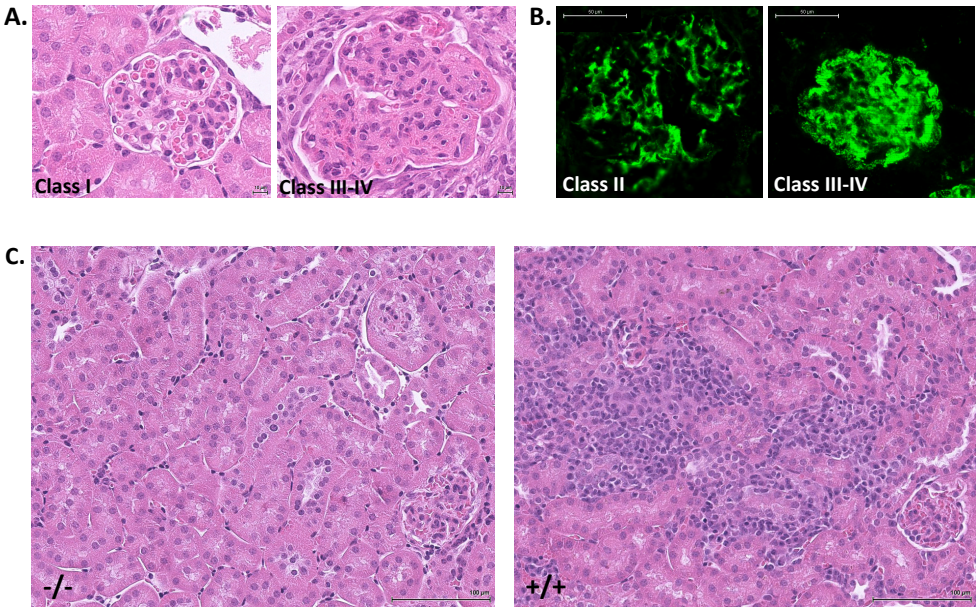


Figure 28. Le phénotype -/- induit une diminution de l'atteinte glomérulaire et de l'infiltration tubulaire rénale à 7 mois

A. Coloration HE d'un glomérule normal (classe 0) et d'un glomérule malade avec la présence de dépôts hyalins (classe III ou IV) (grossissement 40x, barre = 10µm) **B.** Immunofluorescence d'IgG2b d'un glomérule montrant des dépôts mésangiaux (classe II) et sous-endothéliaux (classe III ou IV) (Alexa fluor 488, grossissement 20x, barre = 50µm) **C.** Représentation photographique de la diminution de l'infiltration tubulaire rénale (coloration HE, grossissement 20x, barre = 100µm) **D.** Pourcentage de souris dans chaque classe ISN-RPS, PKR -/- (n=29), PKR +/+ (n=12) **E.** Score histologique de l'infiltration tubulaire rénale des souris lupiques PKR -/- (n=29) et +/+ (n=12). 0 = normal, 1 = moyen, 2 = modéré, 3 = sévère. *p<0,05 en utilisant un test Chi-carré

DISCUSSION

Discussion et perspectives

1. Éléments indiquant un rôle de PKR dans la maladie lupique humaine

Nous avons montré au laboratoire que PKR fait partie des gènes interféron-induits surexprimés dans les PBMC de patients lupiques, un résultat qui a été également démontré dans plusieurs études d'expression génique [152, 153]. Par la suite, nous avons montré que PKR se retrouve spontanément phosphorylé dans des PBMC de patients lupiques, correspondant à sa forme active. Grolleau et al. ont constaté cette surexpression de PKR dans des lymphocytes T activés de patients lupiques conduisant à la phosphorylation de son substrat eIF2α et aboutissant à une diminution de 5 à 20 fois de la synthèse des protéines dans ces cellules comparés à des contrôles, et à une augmentation de l'apoptose par la surexpression du ligand de Fas à leur surface [151]. Sachant qu'en plus d'inhiber la synthèse des protéines et d'induire l'apoptose, PKR induit l'expression de gènes interféron-induits, cette surexpression et auto-phosphorylation de PKR que l'on retrouve chez les patients lupiques pourrait jouer un rôle dans le maintien de la signature interféron.

Pour appuyer cette hypothèse, nous avons ensuite étudié l'effet de l'inhibition de PKR dans des PBMC de patients lupiques en les traitant avec de la 2AP, un inhibiteur pharmacologique de PKR, et avons montré une diminution de l'expression de gènes interféron-induits et de la production d'immunoglobulines suite au traitement. Un résultat intéressant dans le cadre de la maladie lupique qui se caractérise par la production d'auto-anticorps et où 2/3 des patients expriment une signature interféron. Nous avons également montré que la 6MP, comme la 2AP dont elle est moléculairement très proche, induit une inhibition de la protéine PKR et de son substrat eIF2α, et une diminution de l'expression de gènes interféron-induits. Ce résultat est particulièrement intéressant dans le cadre de la thérapie de la maladie lupique car la 6MP est le métabolite actif de l'azathioprine, un médicament immunosuppresseur donné aux patients lupiques, qui diminue l'activité de la maladie. PKR pourrait donc jouer un rôle dans les bénéfices observés suite à ce traitement. Cependant, ce médicament ne peut pas être donné sur le long

terme car il augmenterait le risque de développer un lymphome non hodgkinien, même si les résultats des études à ce sujet sont conflictuels [159]. Dès lors, si le rôle de PKR dans la physiopathologie du lupus se confirme, les perspectives futures du projet seraient de tester de nouvelles molécules inhibant PKR avec des effets moins toxiques que la 2AP et la 6MP.

2. Etude de l'effet de la délétion de PKR dans la physiopathologie du lupus du modèle murin

Au commencement de notre projet, nous avons étudié l'effet de l'inhibition de PKR sur la physiopathologie du lupus en injectant de la 2AP dans des souris lupiques (NZB × NZW)F1. Nous avons observé une diminution de l'atteinte rénale ainsi qu'une diminution du taux d'anticorps anti-ADNdb dans le sérum des souris traitées à la 2AP comparés aux souris contrôles. Ces résultats prometteurs sont à prendre avec précautions, dû aux possibles effets off-target de la 2AP. Dès lors, pour pouvoir contrôler les effets aspécifiques des molécules inhibitrices de PKR, nous avons décidé de générer des souris lupiques PKR-inactivées.

Nous nous sommes dirigés vers le modèle lupique B6.*Sle1*/*Sle2*/*Sle3* car ces caractéristiques en font le modèle le plus proche de la maladie humaine (atteinte rénale conduisant à une insuffisance rénale et à la mort de la souris, production d'anticorps anti-ADNdb, …). D'autant plus que des kinase assays réalisés sur des splénocytes de ces souris par E.K. Wakeland et C. Mohan à Dallas (données non publiées) ont montré que PKR se trouve spontanément phosphorylée dans ces cellules, une autre caractéristique renforçant notre décision d'utiliser ce modèle.

Pour créer les souris lupiques PKR-inactivées, nous avons tout d'abord utilisé la méthode dite « speed-congenic ». Pour cela, nous avons croisé des souris PKR -/- avec des souris lupiques B6.*Sle1*/*Sle2*/*Sle3* qui se caractérisent par la présence, à l'état homozygote, de 3 régions chromosomiques de susceptibilité (*Sle1*/*Sle2*/*Sle3*) et l'absence d'un locus suppresseur (Sles1) dans un background C57Bl/6. Ensuite, nous avons réalisé des back-cross successifs de cette première génération de souris (PKR +/-) avec les souris lupiques. Nous avons génotypé les souris à chaque génération pour ne garder que les souris

PKR +/- les plus homozygotes pour les locus de susceptibilité à la maladie lupique. Une fois que nous avons obtenu les souris hétérozygotes pour PKR et homozygotes pour les 4 locus associés au lupus, nous les avons intercrossées pour obtenir les souris lupiques PKR -/-, +/+ et +/-. Sur ces souris, nous avons prélevé le sérum et l'urine tous les 2 mois de vie et nous avons étudié la mortalité. Mais les résultats qui sont ressortis de cette étude ont mis en évidence un problème au niveau des back-crosses car la maladie lupique n'apparaissait plus chez les souris lupiques PKR +/+. Nous nous sommes rendu compte de la présence d'une recombinaison hot-spot dans le locus *Sle1*, résultant en une transmission partielle de ce locus, le plus important au développement du lupus. Suite à cette constatation, nous nous sommes dirigés vers la méthode CRISPR/Cas9 pour générer nos souris lupiques PKR-inactivées. Grâce à cette méthode, nous avons obtenu une souris avec une mutation conduisant à la délétion de la partie catalytique de PKR la rendant inactive. A noter que la méthode CRISPR/Cas9 peut également induire des mutations off-target, un problème que nous avons initialement adressé en tentant un séquençage du génome de nos souris sur une plateforme locale (UCL). Faute, cependant, de résultats de séquençage probants, nous avons utilisé un software de prédiction des off-target, n'indiquant pas de risque élevé dans notre cas.

Les analyses du phénotype de nos souris lupiques PKR -/- vs +/+ ont montré plusieurs résultats intéressants de l'effet de la délétion de PKR sur la physiopathologie de la maladie. D'un point de vue pratique, nous avons travaillé avec des souris de 5 mois pour l'étude du pourcentage des populations du sang, de la rate et de la moelle osseuse car c'est à cet âge qu'on observe les premiers changements entre les souris lupiques B6.*Sle1*/*Sle2*/*Sle3* et leurs contrôles C57Bl/6 [2], et nous voulions étudier si la délétion de PKR permettait un retardement voire même une perte de certains de ces changements. Par contre, pour pouvoir étudier l'infiltration des ganglions et des reins ainsi que l'atteinte glomérulaire, nous avons travaillé avec des souris de 7 mois afin que la maladie soit installée et qu'elle ait atteint ces organes.

L'ensemble de nos résultats indique que la délétion de PKR résulte en une diminution de la différenciation et l'activation des lymphocytes B dans les souris B6.*Sle1*/*Sle2*/*Sle3*, conduisant à une amélioration de la maladie rénale.

Tout d'abord, concernant l'étude des pourcentages des populations du sang, nos résultats ont montré que, à 5 mois, les souris lupiques PKR -/- possédaient moins de plasmocytes et plus de lymphoblastes dans leur sang que les souris lupiques PKR +/+. Cette différence corrèle avec celle observée entre souris lupiques B6.*Sle1*/*Sle2*/*Sle3* et contrôles C57Bl/6, montrant un retour vers la normalité de ces populations de lymphocytes B chez les souris lupiques PKR -/-. Les plasmocytes correspondent à la dernière étape de maturation des lymphocytes B après celle des lymphoblastes, et sécrètent jusqu'à 80% des anticorps totaux du sérum, faisant d'eux des acteurs importants de l'auto-immunité [160]. Il est récemment apparu que certains plasmocytes, appelés long-lived plasma cells, survivent pendant des années dans des niches situées dans la moelle osseuse ou dans les organes enflammés tels que le rein [161]. Cette catégorie de lymphocytes B n'est pas éliminée par les thérapies anti-B comme le Rituximab (anti-CD20) car ces cellules perdent leur marquage CD20 en se différenciant, ni d'ailleurs par les autres immunosuppresseurs comme le cyclophosphamide. Il n'existe pas non plus de molécule ciblant CD19 utilisée dans le traitement de la maladie mais une étude clinique en phase 1 est actuellement en cours pour tester une thérapie anti-CD19-CAR (chimeric antigen receptor)-T qui consiste à injecter des lymphocytes T cytotoxiques exprimant un récepteur dirigés contre CD19 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03030976). Ce nouveau type de traitement semble engageant, cependant des thérapies prometteuses en pré-clinique peuvent conduire à un échec en phase clinique, comme dernièrement avec l'Epratuzumab (anti-CD22). Il est donc important d'étudier d'autres voies pouvant mener à une diminution de la production des immunoglobulines, et dans cette optique, l'inhibition de PKR pourrait constituer une piste pertinente.

Ensuite, au niveau de l'infiltration des ganglions cervicaux à 7 mois, notre étude a montré une différence allant dans le même sens que celle observée dans le sang. En effet, il y a une plus faible infiltration des tissus ganglionnaires chez les souris lupiques PKR -/- par des cellules CD138 positives que chez les +/+, avec une plus faible présence d'immunoglobulines Kappa et Lambda.

Enfin, concernant l'étude des reins, l'organe le plus gravement touché par la maladie lupique, nos résultats ont également mis en évidence une plus faible atteinte rénale à 7 mois, avec l'analyse des dépôts d'immunoglobulines dans

les glomérules, chez les souris lupiques PKR -/- comparée aux +/+. Nous avons également observé une diminution de l'infiltration tubulaire chez les -/- comparé aux +/+. Un résultat intéressant car l'infiltration tubulaire a longtemps été ignorée par rapport à l'atteinte glomérulaire, mais des études récentes, dont une réalisée au laboratoire, montrent que l'atteinte tubulaire est plus prédictive d'une chute vers l'insuffisance rénale que l'atteinte glomérulaire [162].

3. Mécanisme d'action potentiel de PKR dans la physiopathologie du lupus

Dans un des travaux réalisés au cours de cette thèse, nous avons montré que l'IFNα induit la différenciation des lymphocytes B naïfs en mémoires et lymphoblastes, via la phosphorylation de STAT3. En effet, la différenciation des lymphocytes B est perturbée chez les patients lupiques comparés à des contrôles, conduisant à une augmentation de lymphocytes B stimulés et activés, et aboutissant à la production d'immunoglobulines de haute affinité [163, 164]. Cette perturbation, lors de la différenciation des lymphocytes B, est provoquée par plusieurs mécanismes incluant les facteurs génétiques, ainsi que le dysfonctionnement des checkpoints de la tolérance périphérique et centrale. Les cytokines comme BAFF, IL6, IL10 et IL21 jouent également un rôle en augmentant la stimulation directe ou indirecte des lymphocytes B. Dans notre travail, nous avons montré que l'IFNα joue un rôle majeur et direct sur la différenciation et l'activation des lymphocytes B dans le LED. La transduction du signal de l'IFNα implique habituellement STAT1 et STAT2, en association avec IRF9, mais l'effet pro-apoptotique et anti-prolifératif de STAT1 est peu compatible avec les profils transcriptomiques que nous avons observés dans les lymphocytes B lupiques, plutôt caractérisés par l'expression de gènes anti-apoptotiques et impliqués dans la division cellulaire. C'est ainsi que nous avons également démontré que, plutôt que STAT1, STAT3 est impliquée dans la transduction du signal de l'IFNα dans les lymphocytes B lupiques.

Nos résultats obtenus sur PKR, tant chez l'homme que chez la souris, rentrent dans le même contexte et indiquent que PKR est également impliqué dans la médiation ou l'amplification des effets de l'IFNα sur la différenciation des

lymphocytes B lupiques. PKR est impliqué dans la différenciation terminale des lymphocytes B et la production d'immunoglobulines, et ceci pourrait être lié au rôle sur la production systémique d'IFNα, ou à un effet direct de PKR, gène induit par l'IFNα dans les lymphocytes B, sur leur différenciation. Dans le but d'étudier ce dernier point, nous isolerons prochainement des lymphocytes B naïfs de souris lupiques PKR -/- et +/+ que nous mettrons en culture avec de l'IFNα, et étudierons leur différenciation par cytométrie de flux.

4. Modèles murins de LED et signature interféron

Ces résultats prometteurs mettent cependant en avant les limites de notre modèle murin dans l'étude de la délétion de PKR sur la physiopathologie du lupus. En effet, en utilisant le modèle lupique murin B6.*Sle1*/*Sle2*/*Sle3*, nous nous sommes retrouvés face à une très grande hétérogénéité entre les souris, exprimant la maladie à des moments différents et avec des intensités différentes. De plus, nous avons constaté que ces souris n'exprimaient pas de signature interféron, ni dans les PBMC, ni dans les splénocytes (Figure 28), ce qui pourrait avoir des répercussions dans nos résultats, dans la mesure où il nous est difficile de nous prononcer sur l'effet de la délétion de PKR sur la signature interféron … en l'absence de signature interféron

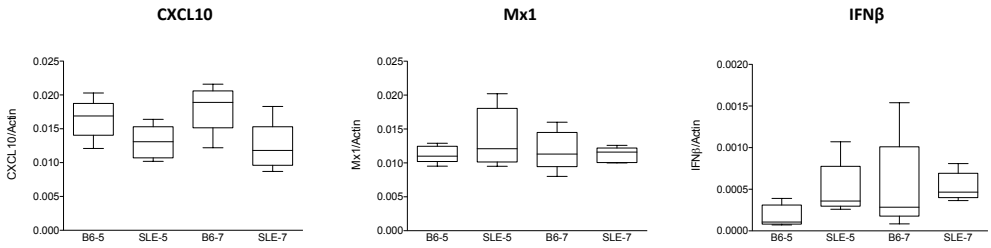


Figure 28. Expression de gènes IFN-induits dans les splénocytes de souris lupiques et contrôles

PCR quantitative en temps réel des gènes CXCL10, Mx1 et IFNβ dans des splénocytes de souris lupiques (SLE) et contrôles (B6) à 5 mois et 7 mois d'âge (5 souris par groupe). Les résultats sont normalisés avec la βactine et représentent la moyenne avec écart-type.

5. Conclusion et perspectives

Avec ce projet, nous pouvons conclure que PKR joue un rôle dans la différenciation des B et sa délétion conduit à une réduction systémique des plasmocytes et de la production d'auto-anticorps, aboutissant à un meilleur pronostic pour l'atteinte rénale.

Dans un futur proche, afin de pouvoir étudier le rôle de PKR sur la signature interféron et dans le mécanisme de différenciation des lymphocytes B, nous avons l'intention d'injecter les souris lupiques avec un adénovirus contenant le gène de l'IFNα, qui accélère la maladie de manière homogène entre les souris. En effet, des injections de cet adénovirus dans des souris lupiques (NZB × NZW)F1 induisent une forte expression d'IFNα dans leur sérum ainsi qu'une augmentation du taux d'anticorps anti-ADNdb et du taux d'IgG totaux, de même qu'une glomérulonéphrite puissante conduisant à la mort de la souris endéans les 100 jours post-injection [165]. Ces mêmes injections faites dans des souris BALB/c n'induisent pas de rupture à la tolérance aux auto-antigènes, mettant en évidence la nécessité d'avoir des prédispositions génétiques pour induire des phénomènes auto-immuns. Les caractéristiques induites par l'injection d'IFNα dans le modèle lupique nous permettrons d'appréhender les effets de PKR sur la signature interféron.

ANNEXES

Annexes lupus érythémateux disséminé

Article 1 : Dysregulated lymphoid cell populations in mouse models of systemic lupus erythematosus

Article 2 : STAT3 Phosphorylation Mediates the Stimulatory Effects of Interferon Alpha on B Cell Differentiation and Activation in SLE

Annexes polyarthrite rhumatoïde

Article 3 : Higher expression of TNFα-induced genes in the synovium of patients with early rheumatoid arthritis with disease activity, and predicts absence of response to first line therapy

Article 1

Dysregulated lymphoid cell populations in mouse models of systemic lupus erythematosus

De Groof et al. Clinical Reviews in Allergy & Immunology (2017)

Clinic Rev Allerg Immunol (2017) 53:181–197
DOI 10.1007/s12016-017-8605-8

Dysregulated Lymphoid Cell Populations in Mouse Models of Systemic Lupus Erythematosus

Aurélie De Groof[1] · Patrice Hémon[2] · Olivier Mignen[2] · Jacques-Olivier Pers[2] · Edward K. Wakeland[3] · Yves Renaudineau[2,4] · Bernard R. Lauwerys[1,5]

Published online: 13 May 2017
© Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract Biases in the distribution and phenotype of T, B, and antigen-presenting cell populations are strongly connected to mechanisms of disease development in mouse models of systemic lupus erythematosus (SLE). Here, we describe longitudinal changes in lymphoid and antigen-presenting cell subsets in bone marrow, blood and spleen from two lupus-prone strains (MRL/*lpr* and B6.*Sle1.Sle2.Sle3* tri-congenic mice), and how they integrate in our present understanding of the pathogenesis of the disease. In particular, we focus on (autoreactive) T cell activation patterns in lupus-prone mice. Break of T cell tolerance to chromatin constituents (histone peptides) is key to the development of the disease and is related to T cell intrinsic defects, contributed by genetic susceptibility factors and by extrinsic amplificatory mechanisms, in particular over-stimulation by antigen-presenting cells. We also describe shifts in B cell sub-populations, going from skewed immature B cell populations as an indication of disturbed central and peripheral tolerance checkpoints, to enriched long-lived plasma cells, which are key to persistent autoantibody production in the disease. B cell activation mechanisms in SLE are both T cell-dependent (break of tolerance and production of specific autoantibodies) and -independent (polyclonal B cell activation, production of autoantibodies by long-lived plasma cells). By providing a comprehensive evaluation of B and T cell surface markers in two major mouse models of SLE and a description of their changes before and after disease onset, this review illustrates how the study of lymphoid cell phenotype delivers key information regarding pathogenic pathways and supplies tools to assess the beneficial effects of novel therapeutic interventions.

Keywords Systemic lupus erythematosus · Autoimmunity · Mouse models · T cell · B cell · Flow cytometry

✉ Bernard R. Lauwerys
Bernard.Lauwerys@uclouvain.be

[1] Pôle de Pathologies Rhumatismales Systémiques et Inflammatoires, Institut de Recherche Expérimentale et Clinique, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium

[2] INSERM U1227, UFR Médecine, Brest, France

[3] Department of Immunology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA

[4] Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie, CHRU Brest, Brest, France

[5] Department of Rheumatology, Cliniques Universitaires Saint-Luc, Brussels, Belgium

Introduction

Mouse models of systemic lupus erythematosus (SLE) are widely used in order to test pathogenic hypotheses or acquire pre-clinical data on specific drugs. While these models share common phenotypes in terms of autoantibody profiles leading to end-organ involvement (e.g., nephritis), mechanisms of disease differ from strain to strain, and, most notably, from the human situation. Acquiring thorough knowledge of the main pathogenic features of each mouse model is therefore an important step in order to instruct adequate experimental interventions and help with their interpretation.

In the present review, we intend to describe key characteristics of common lupus-prone strains of mice (e.g., BWF1 and derived strains, MRL/*lpr*, and BXSB), in terms of pathogenic mechanisms leading to the development of autoimmunity, and also in terms of aberrant distribution and functions of lymphoid and myeloid cell populations.

Genetic Susceptibility to SLE in Mouse Models of the Disease

By definition, genetic factors play a determinant role in the development of SLE in inbred models of the disease. In these models, and also in humans, it is generally accepted that genetic susceptibility impacts the development of autoimmunity at different stages of a multi-step process, i.e., impaired clearance of immune complexes and apoptotic cells leading to a loss of tolerance to autoantigens (e.g., anti-chromatin autoantibodies), amplification of the T and B cell autoimmune response, and finally susceptibility to end-organ involvement (Fig. 1).

Genetic requirements to reach the first level (loss of tolerance to autoantigens) are frequently met in mice and humans, as illustrated by the detection of anti-nuclear antibodies in up to 5% of healthy individuals under normal conditions, or at a higher rate after disruption of immune homeostatic mechanisms (by a viral infection in humans, or a genetic knock-out or transgenic modification in mice). Even when a strong accelerator is present (e.g., *lpr* mutation leading to MRL/lpr mice or *Yaa*-containing Y chromosome in BXSB animals), genetic susceptibility to SLE is polygenic. Susceptibility is related to the additive or synergistic effects of frequent gene variants that, taken individually, only display a modest effect on the mechanisms leading to the development of autoimmunity, but have the ability to push the immune system beyond a (theoretical) autoimmunity threshold, when combined in the same genome [1, 2]. Interestingly, susceptibility variants that push the immune system toward more (auto)immunity might have been subjected to positive evolutionary pressure, due to their favorable effect on immune responses to infectious triggers [3]. This potentially explains why so many mouse strains

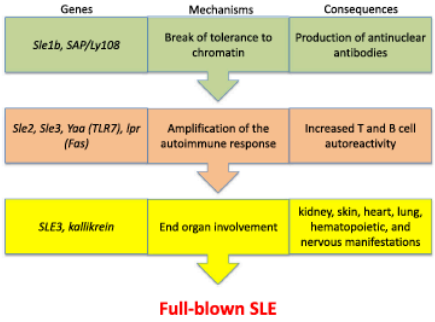


Fig. 1 The development of SLE is a multi-step process. Genetic susceptibility to SLE is related to the additive or synergistic effects of allelic variants of numerous genes involved in the regulation of the immune system. This non-exhaustive list (restricted to mouse susceptibility genes) illustrates how these variants impact the development of the disease in a multistep process

(e.g., 129, MRL, NZB, and NZW) readily develop autoimmune features (production of autoantibodies) in various experimental conditions.

Conversely, the same autoimmune phenotype may be due to different combinations of genetic variants in different mouse species and in humans, and it is therefore not a surprise that genetic association studies in murine models of SLE led to the identification of very different susceptibility loci according to the strain explored. That genetic susceptibility to SLE is complex is well illustrated in human genetic association studies, in which high prevalence of susceptibility alleles in controls, and the possibility of developing the disease based on alternative sets of genetic variants (a definite probability when the patients belong to different ethnic backgrounds), result in overall low genetic effects (odd ratios between 1.1 and 1.5, except for HLA alleles that can have odd ratios >2) for individual candidate genes, even for those having important mechanistic roles. In humans, variations in epigenetic and environmental factors are additional layers of complexity in our understanding of the development of the disease [4–7].

Thus, genetic association studies performed in SLE-prone mice resulted in the identification of numerous susceptibility loci, containing one or sometimes several susceptibility genes. The telomeric end of chromosome 1, one of the non-MHC loci displaying the strongest association with the development of the disease across different strains of mice (and also in humans), is such a cluster of numerous candidate genes. Using NZM2410 lupus-prone mice, a homozygous strain derived from the prototypical $(NZB \times NZW)_{F1}$ (or BWF1) model, Morel et al. identified, in addition to the *H-2* locus, *Sle1* on the telomeric end of chromosome 1, and also *Sle2* on chromosome 4 and *Sle3* on chromosome 7, three chromosomal regions that are strongly associated with the development of the disease [8]. It is important to note that C57Bl/6 mice congenic for each of these loci do not develop SLE [9], but display patterns of immune cell activation that will be further described in the next paragraphs. By contrast, transfer of the three loci in the C57Bl/6 genome is sufficient to induce full-blown SLE, with a very high penetrance of immune complex-mediated nephritis [10].

Amplification of the autoimmune response is the step in which loss of tolerance to chromatin translates into pathogenic events, e.g., due to the maturation of the autoantibody response, and the production of high-affinity autoantibodies. In humans, type I interferons (IFN) play such amplificatory roles on autoreactive T and B cell activation, and several strategies are being developed in order to block these cytokines in SLE patients [11–14]. By contrast, a strong IFN bias is not spontaneously observed in most common mouse models of SLE. Clinical disease is exacerbated in SLE-prone mice overexpressing IFNα after injection of a recombinant adenoviral vector [15–17], and this experimental strategy was used in order to obtain pre-clinical data on IFN blockade in SLE animals.

The lymphoproliferation (*lpr*) trait of MRL/*lpr* mice is due to a *Fas* mutation, resulting in the accumulation of immune cells in secondary lymphoid organs, including autoantibody producing B cells. In humans, the *Fas* mutation also results in a lymphoproliferative disease (Canale-Smith syndrome), but very few of these patients display autoimmune features. Similarly, C57Bl/6 mice carrying the *Fas* mutation only develop minor autoimmune manifestations [18]. This observation emphasizes that *lpr* is an amplifier, rather than the cause of autoimmunity in MRL/*lpr* mice, and led to the identification of multiple susceptibility loci, associated with the development of the disease in MRL/*lpr* strain [18–24].

In BXSB mice, SLE symptoms are more prevalent in males, a very unique situation for a disease with such a strong female bias, due to the presence of the chromosome Y-associated accelerator (*yaa*). A few years ago, it appeared that *yaa* was related to the translocation on the Y chromosome of a fragment of chromosome X, resulting in a duplication of 16 genes, including the *Toll-like receptor 7* (*Tlr7*) gene in the genome of male animals [25, 26]. In BXSB mice, *Tlr7* duplication in male is strongly associated with the development of the disease, and the contribution of *TLR7* is further substantiated by in vivo experiments indicating that overexpression or downregulation of *TLR7* gene expression in lupus-prone animals worsens or improves disease manifestations, respectively (see below).

In SLE, end-organ involvement is dependent on the autoantibody profile, e.g., anti-double stranded (ds)DNA antibodies are associated with renal involvement [27–29]. However, some data indicate that genetic factors are also involved. Thus, injection of rabbit anti-glomerular basement membrane nephrotoxic serum leads to more severe renal disease and pathological changes in NZW compared to other control strains (C57Bl/6, BALB/c), despite similar glomerular deposits of the pathogenic antibodies [30], an observation that points to the presence of inborn mechanisms of end-organ reactivity to autoimmune aggressions. Similarly, the *Sle3* variant of the gene encoding kallikrein on chromosome 7 is characterized by a decreased renal expression of kallikrein in response to anti-GBM antibody challenge in B6.*Sle3* mice (C57Bl/6 mice congenic for *Sle3*), and exogenous administration of kallikrein using an adenoviral vector has a protective effect on disease progression in these animals [31].

T Cell Phenotype in SLE Mouse Models

That the production of anti-dsDNA antibodies is CD4 T cell driven was one of the most important discoveries of the early nineties in the field of SLE. Thus, Mohan et al. isolated CD4 T cell clones from $(SWR \times NZB)_{F1}$ (or SNF1) lupus-prone mice, based on their ability to provide help in the production of anti-dsDNA antibodies by syngeneic B cells, and found that these CD4 T cells were specifically stimulated by nucleosomes. The authors further demonstrated that purified splenic CD4 T cells from not only SNF1, but also BWF1 mice proliferated in response to purified nucleosomes or histones presented by syngeneic splenic antigen-presenting cells (APC) from 1-month-old (disease-free) animals. Finally, immunization of young SWF1 mice with nucleosomes significantly accelerated the development of nephritis [32]. Thus, in these mice, anti-dsDNA antibody-producing B cells capture nucleosomes, process them, and present histone peptides to histone-specific T cells, which in turn provide bystander help in the production of anti-dsDNA antibodies. Similar reactivity against histones or non-histone chromosomal proteins was reported in human CD4 T cells isolated based on their ability to stimulate the production of anti-dsDNA antibodies [33].

Not surprisingly, chronic administration of inhibitory anti-CD4 monoclonal antibodies to BWF1 mice efficiently prevents or treats nephritis, through decreased production of IgG anti-dsDNA autoantibodies [34–37]. Similar effects of in vivo CD4 T cell inhibition were observed in the production of (both IgM and IgG) anti-dsDNA antibodies in MRL/*lpr* mice, although treated mice finally do develop nephritis in this model [38–40]. IFNα-induced acceleration of disease in 3-month-old BWF1 mice is also significantly prevented by the injection of a depleting anti-CD4 monoclonal antibody that, in particular, impacts production of IgG anti-dsDNA autoantibodies and renal disease [15].

Phenotype and function of CD4 T cells were extensively studied in C57Bl/6 animals carrying congenic NZM2410-derived SLE susceptibility fragments. Thus, B6.*Sle1* mice have elevated IgG anti-chromatin autoantibodies but do not develop renal disease. Spleens and lymph nodes from B6.*Sle1* mice have higher percentages of activated (CD69-positive) CD4 T cells. In addition, purified B6.*Sle1* spleen and lymph node T cells proliferate and produce IFNγ in response to purified histones (H2A, H2B, H3, and H4) [41]. T cell activation in these mice is still present in B6.*Sle1*.μMT mice with no circulating B cells, suggesting an intrinsic effect of *Sle1* on T cells [42]. However, in B6 radiation chimera receiving mixed bone marrows from C57Bl/6 and B6.*Sle1* mice, increased expression of CD69 is also found in CD4 T cells of C57Bl/6 origin, thereby indicating that T cell activation is at least partly secondary to loss of tolerance in the B cell compartment of B6.*Sle1* mice [43]. *Sle1* is a cluster of 4 sub-loci (*Sle1a* to *d*) among which *Sle1b* recapitulates many of the features typical of *Sle1*, due to the presence of an activating polymorphic variant of *SLAM family member 6* (*SAP/Ly108*), a cell surface receptor expressed on NK, T, and B cells [44]. In addition to increased percentages of splenic activated $CD4^+CD69^+$ cells compared to C57Bl/6 controls, B6.*Sle1b* female mice have larger proportions of splenic $CD4^+CD44^{high}CD62L^{high}$ effector memory and $CD4^+CD44^{high}CD62L^{low}$ short-lived effector T helper cells.

Percentages of $CD4^+CXCR5^{high}PD\text{-}1^{high}$ T follicular helper cells are also higher in B6.*Sle1b* compared to C57Bl/6 control mice, in parallel with increased numbers of germinal centers observed in their spleens [45]. T follicular helper cells are key in the selection and affinity maturation of autoantibody-producing B cells in germinal centers. Numbers of circulating $CD4^+CXCR5^+$ $ICOS^+$ or $PD\text{-}1^+$ T follicular helper cells are significantly increased in SLE patients compared to controls [46, 47].

B6.*Sle3* congenic mice also have larger numbers of $CD4^+CD69^+$ activated T cells in the spleen, in particular when they are aging, and an increased CD4/CD8 ratio in spleen and lymph nodes. In vitro expansion of CD4 T cells upon anti-CD3 stimulation is significantly higher in B6.*Sle3* compared to control C57Bl/6 mice, due to increased proliferation and reduced activation-induced cell death [48]. This phenotype is not due to an intrinsic T cell defect, but results from the *Sle3*-dependent activation of antigen-presenting cells (see below).

Activated T cells are not only found in secondary lymphoid organs in SLE-prone mice, but also in the kidney. This is also reflected in high-throughput transcriptomic studies performed on the kidneys of nephritic BWF1 animals, in which T cell and plasma cell gene expression signatures are predominant [49, 50]. Fairhurst et al. studied the profile of infiltrating inflammatory cells in the kidneys of B6.*Sle1.yaa* (C57Bl/6 mice congenic for both *Sle1* and *yaa*) nephritic mice and found a predominant population of CD4 T cells and $Gr1^{high}$ monocytes. CD4 T cells were activated, as demonstrated by increased expression of ICOS and PD-1. $GR1^{high}$ monocytes also had an activated phenotype, overexpressing CD69 and CXCR4, and this was also the case for infiltrating B cells. TLR7 played a role in this renal phenotype, and *TLR7* deletion on the X chromosome, resulting in a 2-fold decrease in the TLR7 copy number in B6.*Sle1.yaa.TLR7*-mice, prevented the development of nephritis and kidney infiltration by inflammatory cells, despite the persistence of high titers of IgG antinuclear antibodies [26]. Conversely, transgenic overexpression (4- to 8-fold) of TLR7 in a non-autoimmune background leads to the development of an SLE-like disorder, characterized by the production of anti-RNA autoantibodies, expansion of $CD11c^+$ $MHCII^-$ myeloid cells, and immune complex-mediated nephritis [51]. Interestingly, moderate (two-fold, i.e., similar to the level of over-expression observed in *yaa* mice) overexpression of TLR7 in a C57Bl/6 background does not lead to any symptoms, but when combined with *Sle1* in B6.*Sle1.Tg7* animals, increased TLR7 expression led to severe nephritis similar to the B6.*Sle1.yaa* strain [52].

By contrast to the overwhelming evidence demonstrating the role of CD4 T effector cells in SLE-prone mice and patients, characterization of T regulatory (Treg) cell number and function did not deliver concordant results across the studies, probably in view of the methodological difficulties related to the identification and functional analyses of these cells. Percentages of $CD4^+CD25^+CD69L^{high}$ or $CD4^+Foxp3^+$ Treg cells are decreased in spleens and lymph nodes of BWF1 mice, at least in pre-diseased animals, but this is not the case in older mice [53, 54] or in the MRL/lpr lupus-prone strain, in which Treg cells are rather increased [55, 56]. Using B6.*Sle1a* congenic mice, the group of Laurence Morel found that decreased Treg cell numbers and function in this strain were not intrinsic to Treg cells themselves, but were instead related to increased IL6 production by bone marrow dendritic cells [57, 58]. In any case, Treg cell modulation in lupus-prone mice, either by injection of purified Treg cells, or by administration of low-dose IL2, resulted in significant improvements in disease activity [53, 59, 60]. Interestingly, preliminary studies in patients with SLE also indicated that low-dose IL2 administration resulted in increased circulating Treg cells, which augurs well for potential clinical benefits of this therapeutic strategy [61].

Natural killer T (NKT) cells are cells from the lymphoid lineage with innate, but also adaptive functions due to the expression of T cell receptors. While type II NKT cells display a diverse TCR repertoire, type I or invariant NKT (iNKT) cells express an invariant TCRα chain that recognizes CD1d molecules. Again, inconsistent results were reported on the role and functions of these cells in mouse models of SLE. Thus, numbers of iNKT cells in blood and spleen of 7-, 14-, and 24-week-old BWF1 mice are similar compared to age-matched Balb/c animals. Yet, cytokine production, either directly by iNKT themselves or by transactivated T and B cells, is lower in BWF1 compared to Balb/c animals in response to α-GalCer, a typical iNKT cell ligand, and this effect is more pronounced in younger animals [62]. Functional defects in iNKT cell functions might be relevant in the pathogenesis of SLE, in view of their contact- and CD1d-dependent inhibitory effects on autoantibody-producing B cells (by contrast to their rather Th2 cytokine-dependent stimulatory effects on non-autoantibody producing B cells that express less CD1d) [63, 64]. Nevertheless, injections of α-GalCer to lupus-prone mice generated contradictory results according to the injection schedule and age of the recipients: disease worsening in older mice receiving repeated injections, versus protective effect in younger animals after short-term treatment [65, 66].

Finally, this chapter on T cells would not be complete without addressing the dual role of CD8 T cells in the pathogenesis of SLE. In BWF1 mice, CD8 T cells expand less compared to CD4 T cells, resulting in decreased CD8 T cell percentages and increased CD4/CD8 ratios in secondary lymphoid organs [67]. While in vivo CD4 T cell inhibition prevented disease progression in BWF1 mice, injection of anti-CD8 antibodies resulted in increased disease severity, due to the blockade of a CD8 T cell sub-population with suppressive properties [68]. CD8 T suppressor cells are $CD44^+CD122^+Ly49^+$ CD8 T cells that inhibit the expansion of CD4 T follicular helper cells and the production of autoantibodies through recognition of Qa-

1 at the surface of T follicular helper cells. Qa-1 deficient mice develop a lupus-like disorder characterized by the presence of dysregulated T helper follicular cells, autoantibody production, and nephritis [69]. Conversely, suppressor function of $CD44^+CD122^+Ly49^+$ CD8 T cells is significantly impaired in B6.*yaa* lupus-prone mice, underscoring the role of suppressor CD8 T cells in regulating autoimmune mechanisms at the systemic level [70]. By contrast to these immunosuppressive effects at the systemic level, CD8 T cells locally amplify renal inflammatory mechanisms in mouse models of immune glomerular injury [71] and are also involved in periglomerular and tubular cell damage, e.g., after rupture of the Bowman's capsule and cross-presentation of cryptic glomerular antigens by resident interstitial antigen-presenting cells [72]. In humans with lupus nephritis, increased CD8 T cell numbers in kidney biopsies are associated with poorer response to therapy, an observation in line with a pathogenic role for CD8 T cells in the target organ [73].

In order to illustrate alterations in T cell phenotype in SLE-prone mice, both of our groups used flow cytometry panels in order to compare MRL/*lpr* versus C57Bl/6 (in Brest) and B6.*Sle1.Sle2.Sle3* versus C57Bl/6 (in Brussels) mice before and after disease onset (disease manifestations are apparent at age 5 months in B6.*Sle1.Sle2.Sle3* mice and at age 12 weeks in MRL/*lpr* animals). Although the flow cytometry data are presented in the same figures, they were not generated using the same antibody panels, as indicated in the figure legends and summarized in Tables 1, 2, and 3. In B6.*Sle1.Sle2.Sle3* mice, results were expressed as percentages of positive cells compared to a reference population, while absolute numbers were used in MRL/*lpr* experiments. Despite these differences in our methodological approaches, the data displayed in the figures are representative of the changes observed in these mice, as discussed in the above paragraphs. Thus, our results confirmed the presence of activated (i.e., CD69-positive) CD4 and CD8 T cells in the blood of B6.*Sle1.Sle2.Sle3* compared to C57Bl/6 mice, from disease onset (5 months) to later stages of the disease. In B6.*Sle1.Sle2.Sle3* mice, percentages of blood CD4 and CD8 T cells were not different compared to C57Bl/6 controls. Percentages of CD8 T cells were lower in the spleens of B6.*Sle1.Sle2.Sle3* compared to C57Bl/6 mice. In MRL/*lpr* mice, sheer numbers of conventional CD4 and CD8 T cells were more elevated in peripheral blood, spleen, as well as in thymus and lymph nodes compared to C57Bl/6 animals (Figs. 2 and 3, and data not shown).

B Cell Phenotype in SLE Mouse Models

SLE is not only characterized by the production of specific CD4 T cell-driven anti-chromatin autoantibodies, but also by a polyclonal B cell activation and hypergammaglobulinemia [74–77]. In SLE patients, circulating B cells have an activated phenotype (overexpression of CD95, HLA class II, and co-stimulatory molecules) and display a skewed differentiation pattern characterized by a decrease in naïve and unswitched memory B cells, and an increase in switched memory, double-negative B cells, and in plasmablasts [78, 79]. B cell development occurs in the bone marrow, where two thirds of autoreactive B cells are eliminated. B cells leave the bone marrow as transitional B cells, and this stage of development is also an important autoreactivity checkpoint, with reported alterations in SLE patients. In particular, proportions of $CD24^{high}CD38^{high}$ transitional B cells are higher in SLE compared to control individuals [80]. Last but not least, qualitative and quantitative modifications of the $CD5^+$ B1 cell subsets are also reported in SLE patients [81, 82].

Table 1 Peripheral blood T cells, B cells, and dendritic cells (DC) in lupus-prone mice

Subset	Phenotype	B6.*Sle1, Sle2, Sle3* vs C57Bl/6	Mrl/lpr vs C57Bl/6
CD4 T cell	$CD4^+$	normal	expanded
Activated	$CD4^+CD69^+$	expanded	NT
Treg	$CD4^+CD25^+CD127^{low}$	NT	normal
CD8 T cell	$CD8^+$	normal	expanded
Activated	$CD8^+CD69^+$	expanded	NT
B cells	$CD19^+$ or $B220^+$/CD138-	normal	normal
Immature/T1	$B220^{int}$ CD21-CD23-IgM^+	NT	expanded
Mature	$B220^{high}IgM^+$	NT	normal
Activated	$CD19^+CD69^+$	normal	NT
Plasmablasts	$CD19^+CD138^+$	reduced	NT
Plasma cells	$CD19\text{-}CD138^+$	expanded	NT
	$B220^+CD138^+$	NT	highly expanded
DC	$CD11c^+CD11b^+$	NT	reduced
pDC	$CD11c^+SiglecH^+$	expanded	NT

NT not tested

Table 2 Spleen T cells, NK cells, B cells, and dendritic cells (DC) in lupus-prone mice

Subset	Phenotype	B6.*Sle1, Sle2, Sle3* vs C57Bl/6	Mrl/lpr vs C57Bl/6
CD4 T cell	$CD4^+$	normal	expanded
Treg	$CD4^+CD5^+CD25+$	normal	NT
Treg	$CD4^+CD5^+CD25^+CD127^{low}$	NT	expanded
CD8 T cell	$CD8^+$	reduced	expanded
NK cells	CD49b CD5-	normal	NT
	$NK1.1^+$	NT	reduced
B cells	$CD19^+$ or B220+	normal	normal
T1	$CD19^+B220^+CD93^+CD23$-IgM+	normal	NT
	$B220^+CD21$-CD23-IgM+	NT	normal
T2	$CD19^+B220^+CD93^+CD23^+$IgM+	normal	NT
	$B220^+CD21^+CD23^+$IgM+	NT	reduced
T3	$CD19^+B220^+CD93^+CD23^+$IgM-	reduced	NT
Mantle zone	$B220^+CD93$-$CD21^+CD23$-	normal	NT
	$B220^+CD21^+$CD23-IgM+	NT	expanded
Follicular	$B220^+CD93$-$CD21^{int}CD23$+	reduced	NT
	$B220^+CD21^{int}CD23^+IgM^{low}$	NT	reduced
B1a	$B220^+CD93$-IgM^+IgD-CD21-CD23-$CD5^+$	expanded	NT
Plasma cells	$B220^+$CD138+	expanded	highly expanded
DC	$CD11c^+CD11b$+	NT	expanded
pDC	$CD11c^+$SiglecH+	normal	NT
cDC	$CD11c^+$SiglecH-	normal	NT

NT not tested

In mouse models of SLE, increase in the percentage of ($CD19^+IgM^+CD43^+CD5^+$) B1a cells is one of the most common features of the disease [83–85]. Enrichment in B1a cells is under genetic control and is a major characteristic of B6.*Sle2* congenic mice. *Sle2* is a cluster of 3 susceptibility loci, one of which is characterized by a decreased expression of the protein encoded by the *Cdkn2c* gene: cyclin-dependent kinase inhibitor p18, found to be a regulator of the B1a cell

Table 3 Bone marrow B cells in lupus-prone mice

Subset	Phenotype	B6.*Sle1, Sle2, Sle3* vs C57Bl/6	Mrl/lpr vs C57Bl/6
B cell lineage	$B220^+$	normal	reduced
Pre/Pro B	$B220^+CD24^{int}$CD43+	normal	NT
	$B220^+CD43^{high}$	NT	normal
Developing B	$B220^+CD24^{high}$CD43-	reduced	NT
Pro B/Pre B	$B220^+CD24^{high}$CD43-IgD-IgM-	expanded	normal
Pro B	$B220^+CD43^{int}$	NT	reduced
Pre B	$B220^+$CD43-	NT	reduced
Immature	$B220^+CD24^{high}$CD43-IgM^{int}IgD-	expanded	NT
	$B220^+IgM^+$IgD-	NT	normal
Transitional	$B220^+CD24^{high}$CD43-IgM^+IgD-	expanded	NT
	$B220^+IgM^+IgD^{int}$	NT	normal
Mature	$B220^+IgM^+IgD^{high}$	NT	reduced
Early mature	$B220^+CD24^{high}$CD43-IgM^+IgD+	reduced	NT
Late mature	$B220^+CD24^{high}$CD43-IgM-IgD+	expanded	NT
Plasma cells	CD138+	normal	expanded

NT not tested

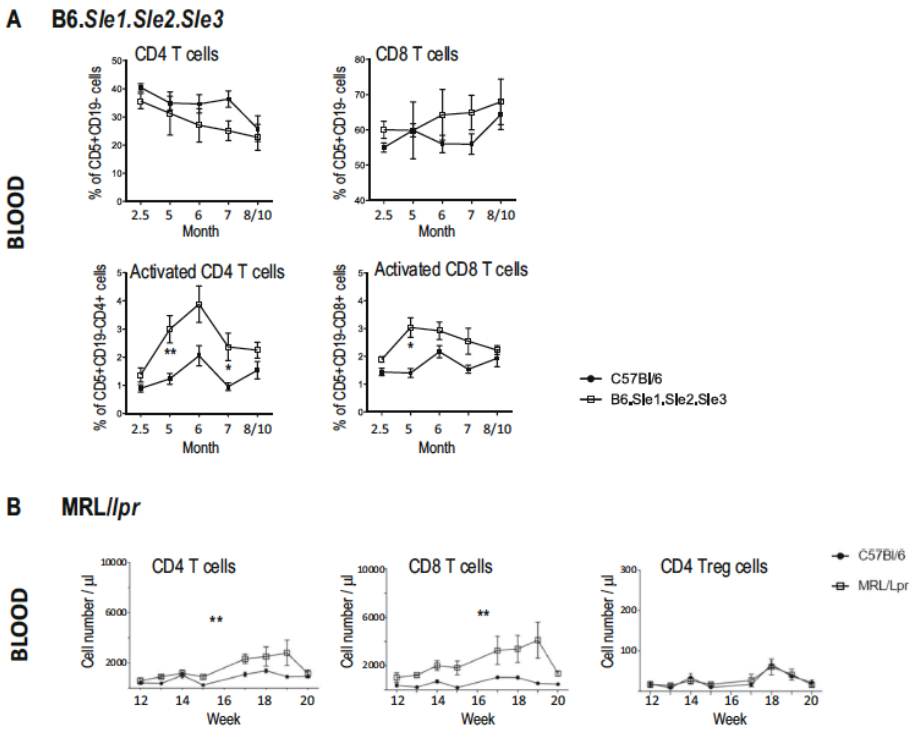


Fig. 2 Blood CD4 and CD8 T cells in lupus-prone mice. **a** Blood samples from B6.*Sle1.Sle2.Sle3* and C57Bl6 mice were harvested at the indicated time points and stained with a viability dye and the following antibodies: CD5, CD4, CD8a, and CD69. Cell activation was defined based on CD69 expression. Percentages are calculated in reference to the population indicated on the *Y* axis. 8/10: 8-month-old B6.*Sle1.Sle2.Sle3* were compared to 10-month-old C57Bl/6 mice, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ using Mann-Whitney tests. **b** Blood samples from MRL/*lpr* and C57Bl/6 mice were harvested at the indicated time points and stained with the following antibodies: B220, CD5, CD8, CD4, CD127, and CD25. Treg cells were defined as $CD25^+$ $CD4^+CD127^{low}$ cells $**p < 0.01$ using Mann-Whitney tests

pool [86, 87]. B1a cells are self-renewing, natural IgM antibody-producing cells, and their contribution to disease pathogenesis is not fully understood [88]. Natural antibodies may display a low affinity to autoantigens, thereby potentially giving rise to high affinity autoantibodies in specific conditions (e.g., in the presence of an autoimmune accelerator). However, autoantibody production is not restricted to $CD5^+$ B cells in BWF1 mice, as evidenced by in vitro or in vivo reconstitution experiments with either $CD5^-$ or $CD5^+$ B cells [89]. Other than antibody-producing cells, B1a cells also play a role as antigen-presenting cells, due to their expression of co-stimulatory molecules (B7.1, B7.2, CD24, LFA-1, ICAM-1) [83], and are also known to produce IL-10, a cytokine strongly overexpressed in SLE patients, and in mouse models of the disease [81, 90–92].

In mice, immature B cells that escaped bone marrow checkpoints migrate to the spleen as transitional (T1) B cells. The T1 cell stage is an important tolerance checkpoint, and many autoreactive B cells are eliminated at this stage. In particular, T1 B cells with a strong affinity for self-antigens undergo apoptosis, and this mechanism is impaired in NZB [93] and in TLR7 transgenic mice [94]. Similarly, T1 B cells from B6.*Sle1b* animals transgenic for a lysozyme B cell receptor are efficiently eliminated after strong B cell receptor (BCR) stimulation with the antigen, but they resist apoptosis when weak antigen stimulation is applied, by opposition to T1 B cells from BCR transgenic controls not carrying the *Sle1b* susceptibility interval, thereby emphasizing the role of *Sle1b* on B cell tolerance [95]. T1 transitional B cells further differentiate into T2 cells, next into mature follicular B cells, or, in some

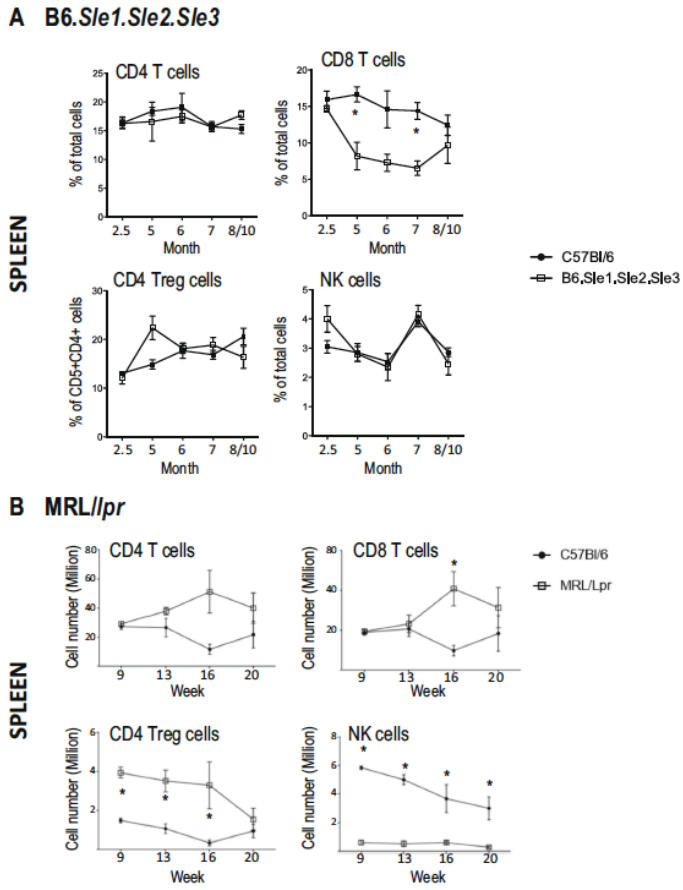


Fig. 3 Spleen T and NK cells in lupus-prone mice. **a** Spleens from B6.*Sle1.Sle2.Sle3* and C57Bl6 mice were harvested at the indicated time points and stained with a viability dye and the following antibodies: CD5, CD4, CD8a, CD25, and CD49b. Treg cells were defined as $CD25^+CD5^+CD4^+$ cells. NK cells were defined as $CD49b^+CD5^-$ cells. Percentages are calculated in reference to the population indicated on the *Y* axis. 8/10: 8-month-old B6.*Sle1.Sle2.Sle3* were compared to 10-month-old C57Bl/6 mice, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ using Mann-Whitney tests. **b** Spleens from MRL/*lpr* and C57Bl/6 mice were harvested at the indicated time points and stained with the following antibodies: B220, CD5, CD8, CD4, CD127, CD25, and NK1.1. Treg cells were defined as $CD25^+CD5^+CD4^+CD127^{low}$ cells. NK cells were defined as NK1.1 cells, $*p < 0.05$ using Mann-Whitney tests

circumstances, into marginal zone B cells. Marginal zone B cells are involved in T cell-independent mechanisms of antibody production and display higher sensitivity to TLR9 stimulation, while mature follicular B cells will differentiate into mature naïve B cells that further recirculate to secondary lymphoid organs and are involved in T cell-dependent responses. Peripheral tolerance checkpoints can be disrupted in numerous situations, as is the case in BAFF-transgenic mice that are characterized by increased transitional and MZ B cells and develop a lupus-like autoantibody-mediated syndrome [96]. However, increase in overall numbers of transitional and marginal zone B cells is not a typical feature found in BWF1 mice themselves. These mice rather display a decrease in mature follicular cells, as a sign of disrupted B cell development and tolerance checkpoints. They also display a decrease in transitional T3 cells, a sub-population of anergic B cells with a still unclear ontology [97].

Sustained autoantibody production in patients or mice receiving strong immunosuppressive agents (such as corticosteroids and cyclophosphamide) led to the identification of the

role of depletion-resistant long-lived plasma cells in the pathogenesis of the disease. Using BrdU in the drinking water of BWF1 mice in order to track dividing cells in their spleen, Hoyer et al. demonstrated that the spleen of BWF1 mice contained anti-DNA antibody producing CD138-positive plasma cells, which did not divide for at least 12 weeks (the time of BrdU feeding). An estimated 40% of autoantibody-producing $CD138^+$ cells were such long-lived plasma cells in the spleen. These cells express low MHC II, by opposition to short-lived plasma cells, and are resistant to in vivo cyclophosphamide therapy [98]. Not only the spleen, but also bone marrow and kidneys of BWF1 mice host long-lived plasma cells [99]. Transfer of BWF1 CD138-positive cells into *Rag1* −/− mice results in the establishment of autoantibody-producing long-lived plasma cells in spleen and bone marrow of recipient mice and the development of nephritis, thereby demonstrating the ability of these cells to cause disease manifestations, independent of any additional stimulus [100].

By contrast to conventional immunosuppressive or cytotoxic drugs, bortezomib, a proteasome inhibitor, targets both short-lived and long-lived plasma cells, by activation of the terminal unfolded protein response. Thus, bortezomib administration induces a drastic decrease in total and anti-dsDNA antibody-producing $CD138^{high}CD25^-$ intracellular κ light $chain^+$ plasma cells in spleen and bone marrow of BWF1 mice, resulting in decreased serum dsDNA antibody titers and prevention of glomerulonephritis [101]. Optimal therapy was achieved by not only depleting long-lived plasma cells with bortezomib, but also the pool of precursors from which they are generated, using cyclophosphamide or anti-CD20 [102, 103].

Rituximab, a depleting anti-CD20 antibody, does not target plasma cells that are CD20 negative. The drug is commonly used in the treatment of refractory lupus nephritis, but also other autoimmune disorders [104–109]. Mahévas et al. reported the presence of autoantibody secreting cells in the spleen of patients with idiopathic thrombocytopenic purpura, resistant to rituximab therapy. Intriguingly, transcriptomic profiling of plasma cells in the spleen from rituximab-treated patients was different compared to non-treated patients or healthy donors and characterized by the expression of molecular signatures associated with a long-lived phenotype (overexpression of anti-apoptotic genes and negative regulator of the cell cycle and downregulation of genes involved in positive regulation of cell cycle). Increased production of BAFF in the supernatants of spleen cell cultures from rituximab-treated patients is suspected to explain the generation of long-lived plasma cells in rituximab-treated patients [110, 111].

Alterations in B cell phenotype in B6.Sle123 and MRL/lpr mice are illustrated in Figs. 4, 5, and 6. In our experiments, terminally differentiated plasma cells were more numerous in blood and spleens of both B6.*Sle1.Sle2.Sle3* and MRL/*lpr* mice compared to controls. MRL/*lpr* mice also had increased numbers of plasma cells in peripheral blood, and even in the spleen as well as in thymus and lymph nodes (Figs. 4 and 5, and data not shown). In MRL/*lpr* mice, numbers of T1 B cells were significantly increased in the peripheral blood, in line with similar observations in other strains of lupus-prone mice and in humans. In the spleens of both lupus-prone strains, we observed decreased follicular B cells compared to C57Bl/6 mice, as discussed earlier. Percentages of T3 transitional B cells were also significantly decreased while B1a cells were significantly increased in B6.*Sle1.Sle2.Sle3* spleens (Figs. 4 and 5). In the bone marrow (Fig. 6), we found differences in developing B cell populations between the two lupus-prone strains, potentially indicative of dysregulated tolerance checkpoints. In particular, we observed decreased overall developing B cells in both lupus-prone strains compared to control mice, although differences in developing B cell subpopulations were not entirely overlapping between B6.*Sle1.Sle2.Sle3* and MRL/*lpr* animals.

Role of Antigen-Presenting Cells in Mouse Models of SLE

The role of myeloid cells in autoimmune disorders is extensively reviewed in another contribution of this series of reviews [112]. In the next paragraphs, we focus on reports highlighting the links between antigen-presenting cell dysfunctions and T or B cell activation in SLE. In humans, impaired clearance of apoptotic material by SLE macrophages in lymph nodes is an important step in the pathogenesis of the disease, resulting in the availability of nuclear autoantigens for presentation by professional antigen-presenting cells such as dendritic cells [113]. Among them, $CD11b^-CD11c^-CD123^+$ plasmacytoid dendritic cells (pDC) produce high levels of IFNα in response to stimulation and are therefore under particular scrutiny in SLE research. Thus, heterozygous deletion of *Tcf4*, a gene encoding E2-2, a transcription factor involved in the development of pDC, led to a significant improvement of disease manifestations in TLR7 transgenic mice, i.e., a decrease in $CD11c^+$ $MHCII^-$ myeloid cells, and decreased renal deposition of immunoglobulins and nephritis. Similarly, decreased T cell activation and production of autoantibodies and significant improvement of immune complex-mediated nephritis were observed in *Tcf4*+/− B6.*Sle1.Sle3* compared to wild-type B6.*Sle1.Sle3* lupus-prone animals [114].

However, in vitro depletion experiments using human cells indicated that pDC are not the sole IFNα producers in SLE patients [115], underscoring the potential role of $CD11b^+CD11c^+$ myeloid DC in the pathogenic process. By breeding B6.*Sle1.Tg7* mice that conditionally overexpress TLR7 with a CD11c-Cre reporter strain, Celhar et al. normalized TLR7 expression in CD11b-positive conventional DC (cDC) and pDC, resulting in decreased production of anti-

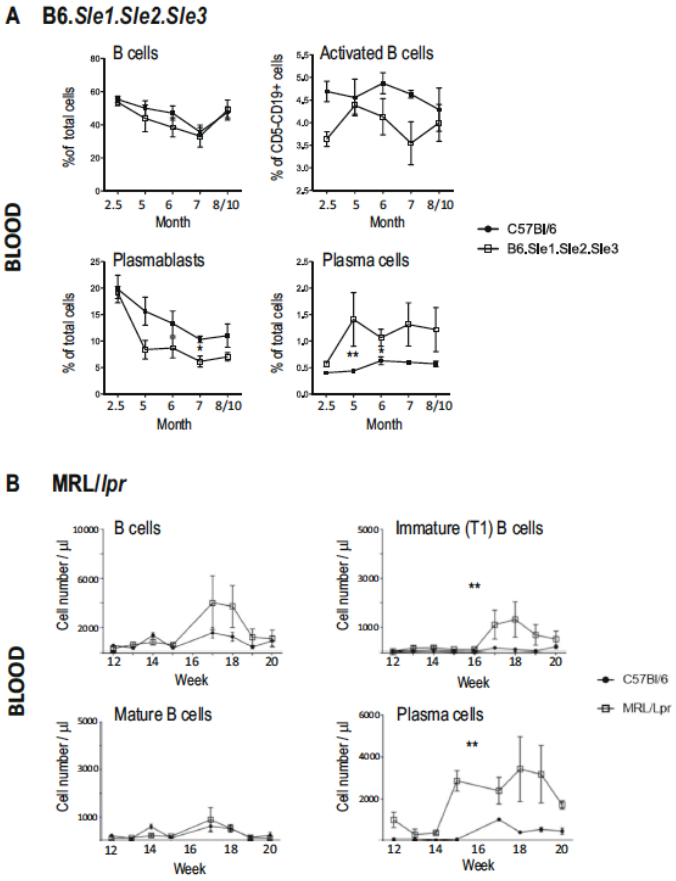


Fig. 4 Blood B cells in lupus-prone mice. **a** Blood samples from B6.*Sle1.Sle2.Sle3* and C57Bl6 mice were harvested at the indicated time points, and stained with a viability dye and the following antibodies: CD5, CD69, CD19, and CD138. Cell activation was defined based on CD69 expression. Plasmablasts were identified as $CD19^{+}CD138^{+}$ cells, and plasma cells as $CD19^{-}CD138^{+}$ cells. Percentages are calculated in reference to the population indicated on the *Y* axis. 8/10: 8-month-old B6.*Sle1.Sle2.Sle3* were compared to 10-month-old C57Bl/6 mice, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ using Mann-Whitney tests. **b** Blood samples from MRL/*lpr* and C57Bl/6 mice were harvested at the indicated time points and stained with the following antibodies: B220, CD23, CD21/35, IgM, and CD138. Plasma cells were identified as $CD138^{+}$ cells, $**p < 0.01$ using Mann-Whitney tests

dsDNA and anti-snRNP autoantibodies, inhibition of immunoglobulin deposition in the kidney and prevention of nephritis. In addition, TLR7 inhibition in dendritic cells from B6.*Sle1.Tg7* mice resulted in normalization of TLR7-induced changes in cell populations in the spleen, i.e., reduction in numbers of expanded CD11b-positive myeloid cells, decreased expression of activation markers on CD4 and CD8 T cells, decrease in the percentage of $CD62L^{low}CD44^{high}$ effector memory cells. Numbers of pDC were not increased in B6.*Sle1.Tg7* mice compared to B6.*Sle1* controls and were not affected by the decrease in TLR7 expression in B6.*Sle1.Tg7.CD1c-Cre* animals [116].

As discussed previously, B6.*Sle3* congenic mice are characterized by the presence of spontaneously activated and hyperproliferative T cells [48]. In B6.*Sle3* animals transgenic for an OVA-specific T cell receptor (TCR), Zhu et al. confirmed increased T cell responses to antigenic stimulation and decreased activation-induced cell death compared to B6

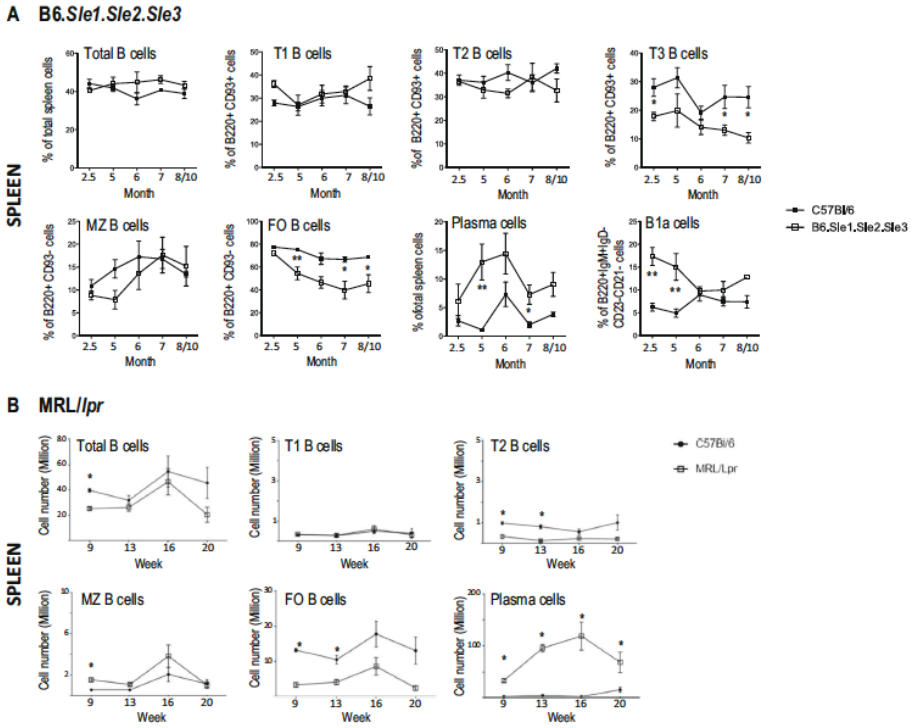


Fig. 5 Spleen B cell subsets in lupus-prone mice. **a** Spleens from B6.*Sle1.Sle2.Sle3* and C57Bl6 mice were harvested at the indicated time points and stained with a viability dye and the following antibodies: CD5, B220, IgD, IgM, CD23, CD21, CD93, and CD138. T1, T2, and T3 B cells were defined based on CD23 and IgM expression in B220^{+}CD93^{+} cells. Follicular (FO) and mantle-zone (MZ) B cells were defined based on CD23 and CD21 expression in B220^{+}CD93^{-} cells. B1a cells were identified based on CD5 expression in B220^{+}CD93-IgM + IgD-CD23-CD21- cells. Plasma cells were identified as CD138+ cells. Percentages are calculated in reference to the population indicated on the *Y* axis. 8/10: 8-month-old B6.*Sle1.Sle2.Sle3* were compared to 10-month-old C57Bl/6 mice, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ using Mann-Whitney tests. **b** Spleens from MRL/*lpr* and C57Bl/6 mice were harvested at the indicated time points and stained with the following antibodies: B220, CD23, CD21/35, IgM, and CD138. Plasma cells were identified as CD138+ cells, $*p < 0.05$ using Mann-Whitney tests

OVA TCR transgenic controls not carrying the *Sle3* congenic interval. However, this T cell phenotype was not intrinsic to T cells, as demonstrated by adoptive transfer of B6.*Sle3* TCR transgenic T cells in C57Bl/6 mice, resulting in the loss of their activated phenotype. Looking at phenotype and function of antigen-presenting cells, the authors found increased numbers of macrophages and lymphoid dendritic cells in the spleen of B6.*Sle3* mice, and, more importantly, increased activation status of all myeloid cell types studied, i.e., increased expression of the co-stimulatory molecules CD40 and CD80, and cell adhesion molecules (VCAM-1/CD106) on macrophages, neutrophils, lymphoid, and myeloid dendritic cells, increased expression of Fcγ Receptor on neutrophils, lymphoid, and myeloid dendritic cells, increased expression of CD86 in myeloid dendritic cells, resulting in increased activation of antigen-specific T cells [117].

Macrophages and dendritic cells also infiltrate nephritic kidneys of SLE-prone mice. Comparing the transcriptomic profiles of nephritic BWF1, NZW × BXSB, and NZM2410 mice to their pre-nephritic counterparts, Bethunaickan et al. found increased expression of macrophage activation-associated transcripts (CD68, activating Fcγ receptors,

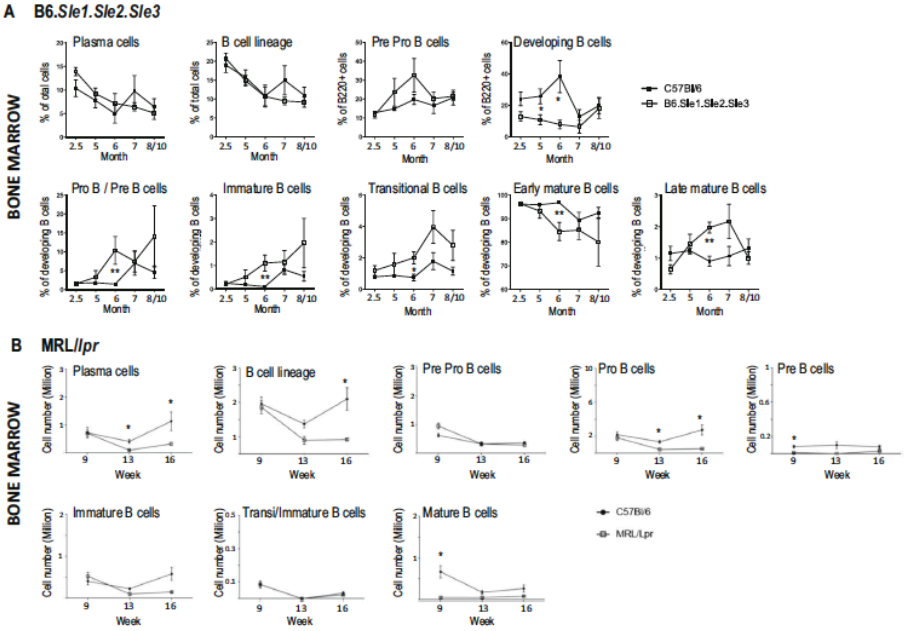


Fig. 6 Bone marrow B cell precursors in lupus-prone mice. **a** Bone marrow was obtained from B6.*Sle1.Sle2.Sle3* and C57Bl6 mice at the indicated time points and stained with a viability dye and the following antibodies: B220, CD24, CD43, IgM, IgD, and CD138. Plasma cells were defined as CD138+ cells. B cell lineage was defined as B220+ cells. PrePro B cells were identified as $B220^{+}CD24^{intermediate}CD43+$ cells. Developing B cells were defined as $B220^{+}CD24^{high}CD43-$ cells. Pro B/Pre B, immature, transitional, early, and late mature B cells were defined based on IgM and IgD expression in $B220^{+}CD24^{high}CD43^{-}$ cells. Percentages are calculated in reference to the population indicated on the *Y* axis. 8/10: 8-month-old B6.*Sle1.Sle2.Sle3* were compared to 10-month-old C57Bl/6 mice, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ using Mann-Whitney tests. **b** Bone marrow from MRL/*lpr* and C57Bl/6 mice was obtained at the indicated time points and stained with the following antibodies: B220, CD43, IgM, IgD, and CD138. Plasma cells were defined as $CD138^{+}$ cells. PrePro B cells were identified as $B220^{+}CD43^{high}$ cells. Pro B cells were identified as $B220^{+}CD43^{+}$ cells. Pre B cells were identified as $B220^{+}CD43^{-}$ cells. Immature, transitional, and mature B cells were defined based on IgM and IgD expression in B220+, $*p < 0.05$ using Mann-Whitney tests

FPR2, C type lectins, cathepsins, HLA-DM) in the nephritic kidneys of all three strains of mice. In the two models with proliferative nephritis (BWF1, NZW × BXSB), they also found overexpression of other macrophage or dendritic cell-associated transcripts (CD11c, IKBKE, FCGR3A, CXCL13) [50]. Purification of macrophages and dendritic cells infiltrating BWF1 kidneys showed the presence of different populations with heterogeneous functional characteristics. The most enriched population was made of $CD11b^{high}CD11c^{high}F4/80^{low}$ dendritic cells able to induce the proliferation of allogeneic CD4 T cells. $CD11b^{high}F4/80^{high}CD11c^{low/intermediate}$ macrophages were also strongly enriched in BWF1 kidneys. These cells also induced proliferation of allogeneic CD4 T cells, had a high phagocytic activity, and had increased expression of TLR3, TLR5, TLR9, ITGAM, CCL7, and CX3CR1 compared to the other cell subtypes. There was also a slight increase in $CD11c^{high}CD11b^{low/intermediate}F4/80^{low}CD103^{+}$ dendritic cells with high CD4 T cell proliferation abilities, by contrast to $CD11b^{high}CD11c^{low}F4/80^{low}$ macrophages that had little effects on the activation of CD4 T cells [118].

In our flow cytometry data (Fig. 7), numbers of dendritic cells (DC) in the spleen, lymph nodes, and thymus of MRL/*lpr* mice were higher as compared to C57Bl/6 animals. We did not find differences in percentages of cDC or pDC in the spleens of B6.*Sle1.Sle2.Sle3*, but percentages of pDC in the blood were higher in B6.*Sle1.Sle2.Sle3* compared to C57Bl/6 mice.

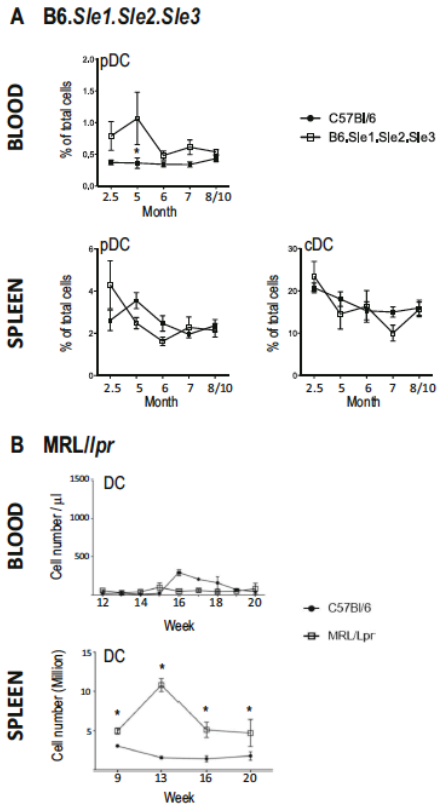


Fig. 7 Blood and spleen dendritic cells in lupus-prone mice. **a** Blood samples and spleens from B6.*Sle1.Sle2.Sle3* and C57Bl6 mice were harvested at the indicated time points and stained with a viability dye and the following antibodies: CD11b, CD11c, SiglecH, Gr1, CD115, B220, and CD8a. pDC were defined as $CD11c^{+}SiglecH^{+}$ cells. In the spleen, cDC were defined as $CD11c^{+}SiglecH^{-}$ cells. 8/10: 8-month-old B6.*Sle1.Sle2.Sle3* were compared to 10-month-old C57Bl/6 mice, $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ using Mann-Whitney tests. **b** Blood samples and spleens from MRL/*lpr* and C57Bl/6 mice were harvested at the indicated time points and stained with the following antibodies: CD11b and CD11c. DC were defined as $CD11c^{+}CD11b^{+}$ cells, in blood and in spleen, $^{*}p < 0.05$, using Mann-Whitney tests

Concluding Remarks

Phenotypic changes in lymphoid and myeloid cell populations in mouse models of SLE are strongly associated with intrinsic pathogenic events characteristic of the disease and are frequently used in order to assess the effects of therapeutic interventions or genetic modifications.

Recently, the development of multi-panel staining strategies contributed to a better identification of lymphoid cell subsets in the bone marrow and in the periphery. In particular, skewed distribution of immature B cell populations in mice and in humans with SLE is indicative of defective central and peripheral tolerance checkpoints, an essential step in the development of autoimmunity. Similarly, activation of myeloid cell subsets appears to be a necessary step for the activation of autoreactive T cells in the disease.

The recent identification of long-lived plasma cells in kidneys and bone marrow of lupus-prone mice nicely illustrates how the local–inflammatory–environment shapes the representation and function of innate and adaptive immune effectors, and our present 'systemic' approach to our understanding of the mechanisms of disease needs to be adjusted, in order to consider the important role of these 'organ-specific' modifications.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding This work was supported by a grant from the Fonds National de la Recherche Scientifique. A. De Groof is supported by the "Chaire UCB/UCL sur les rhumatismes inflammatoires et systémiques". B. Lauwerys is supported in part by the Fonds National de la Recherche Scientifique (Communauté française de Belgique), and P. Hemon by a SATT Ouest Valorisation grant.

Ethical Approval All animal experiments reported in this manuscript were approved by the ethical committee of the Université catholique de Louvain (Secteur des Sciences de la Santé), and by the ethical committee of the Université de Bretagne Occidentale (Brest).

References

1. Wandstrat A, Wakeland E (2001) The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. Nat Immunol 2(9):802–809. doi:10.1038/ni0901-802
2. Lauwerys BR, Wakeland EK (2005) Genetics of lupus nephritis. Lupus 14(1):2–12
3. Limaye N, Belobrajdic KA, Wandstrat AE, Bonhomme F, Edwards SV, Wakeland EK (2008) Prevalence and evolutionary origins of autoimmune susceptibility alleles in natural mouse populations. Genes Immun 9(1):61–68. doi:10.1038/sj.gene.6364446
4. Konsta OD, Le Dantec C, Charras A, Brooks WH, Arleevskaya MI, Bordron A, Renaudineau Y (2015) An in silico approach reveals associations between genetic and epigenetic factors within regulatory elements in B cells from primary Sjogren's syndrome patients. Front Immunol 6:437. doi:10.3389/fimmu.2015.00437
5. Konsta OD, Le Dantec C, Brooks WH, Renaudineau Y (2015) Genetics and Epigenetics of Autoimmune Diseases. eLS:1–9. doi:10.1002/9780470015902.a0023593

6. Renaudineau Y, Ballestar E (2016) Epigenetics: DNA methylation signatures in Sjogren syndrome. Nat Rev Rheumatol 12(10):565–566. doi:10.1038/nrrheum.2016.144
7. Charras A, Konsta OD, Le Dantec C, Bagacean C, Kapsogeorgou EK, Tzioufas AG, Pers JO, Bordron A, Renaudineau Y (2017) Cell-specific epigenome-wide DNA methylation profile in long-term cultured minor salivary gland epithelial cells from patients with Sjogren's syndrome. Ann Rheum Dis 76(3):625–628. doi:10.1136/annrheumdis-2016-210167
8. Morel L, Rudofsky UH, Longmate JA, Schiffenbauer J, Wakeland EK (1994) Polygenic control of susceptibility to murine systemic lupus erythematosus. Immunity 1(3):219–229
9. Morel L, Yu Y, Blenman KR, Caldwell RA, Wakeland EK (1996) Production of congenic mouse strains carrying genomic intervals containing SLE-susceptibility genes derived from the SLE-prone NZM2410 strain. Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society 7(5):335–339
10. Morel L, Croker BP, Blenman KR, Mohan C, Huang G, Gilkeson G, Wakeland EK (2000) Genetic reconstitution of systemic lupus erythematosus immunopathology with polycongenic murine strains. Proc Natl Acad Sci U S A 97(12):6670–6675
11. Khamashta M, Merrill JT, Werth VP, Furie R, Kalunian K, Illei GG, Drappa J, Wang L, Greth W, investigators CDs (2016) Sifalimumab, an anti-interferon-alpha monoclonal antibody, in moderate to severe systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. Ann Rheum Dis 75(11):1909–1916. doi:10.1136/annrheumdis-2015-208562
12. Peng L, Oganesyan V, Wu H, Dall'Acqua WF, Damschroder MM (2015) Molecular basis for antagonistic activity of anifrolumab, an anti-interferon-alpha receptor 1 antibody. MAbs 7(2):428–439. doi:10.1080/19420862.2015.1007810
13. Lauwerys BR, Hachulla E, Spertini F, Lazaro E, Jorgensen C, Mariette X, Haelterman E, Grouard-Vogel G, Fanget B, Dhellin O, Vandepapeliere P, Houssiau FA (2013) Down-regulation of interferon signature in systemic lupus erythematosus patients by active immunization with interferon alpha-kinoid. Arthritis & Rheumatism 65(2):447–456. doi:10.1002/art.37785
14. Ducreux J, Houssiau FA, Vandepapeliere P, Jorgensen C, Lazaro E, Spertini F, Colaone F, Roucairol C, Laborie M, Croughs T, Grouard-Vogel G, Lauwerys BR (2016) Interferon alpha kinoid induces neutralizing anti-interferon alpha antibodies that decrease the expression of interferon-induced and B cell activation associated transcripts: analysis of extended follow-up data from the interferon alpha kinoid phase I/II study. Rheumatology (Oxford) 55(10):1901–1905. doi:10.1093/rheumatology/kew262
15. Liu Z, Bethunaickan R, Huang W, Lodhi U, Solano I, Madaio MP, Davidson A (2011) Interferon-alpha accelerates murine systemic lupus erythematosus in a T cell-dependent manner. Arthritis & Rheumatism 63(1):219–229. doi:10.1002/art.30087
16. Mathian A, Weinberg A, Gallegos M, Banchereau J, Koutouzov S (2005) IFN-alpha induces early lethal lupus in preautoimmune (New Zealand black x New Zealand White) F1 but not in BALB/c mice. J Immunol 174(5):2499–2506
17. Fairhurst AM, Mathian A, Connolly JE, Wang A, Gray HF, George TA, Boudreaux CD, Zhou XJ, Li QZ, Koutouzov S, Banchereau J, Wakeland EK (2008) Systemic IFN-alpha drives kidney nephritis in B6.Sle123 mice. Eur J Immunol 38(7):1948–1960. doi:10.1002/eji.200837925
18. Vidal S, Kono DH, Theofilopoulos AN (1998) Loci predisposing to autoimmunity in MRL-Fas lpr and C57BL/6-Faslpr mice. J Clin Invest 101(3):696–702. doi:10.1172/JCI1817
19. Ichii O, Konno A, Sasaki N, Endoh D, Hashimoto Y, Kon Y (2008) Autoimmune glomerulonephritis induced in congenic mouse strain carrying telomeric region of chromosome 1 derived from MRL/MpJ. Histol Histopathol 23(4):411–422
20. Santiago-Raber ML, Haraldsson MK, Theofilopoulos AN, Kono DH (2007) Characterization of reciprocal Lmb1-4 interval MRL-Faslpr and C57BL/6-Faslpr congenic mice reveals significant effects from Lmb3. J Immunol 178(12):8195–8202
21. Kong PL, Morel L, Croker BP, Craft J (2004) The centromeric region of chromosome 7 from MRL mice (Lmb3) is an epistatic modifier of Fas for autoimmune disease expression. J Immunol 172(5):2785–2794
22. Yamada A, Miyazaki T, Lu LM, Ono M, Ito MR, Terada M, Mori S, Hata K, Nozaki Y, Nakatsuru S, Nakamura Y, Onji M, Nose M (2003) Genetic basis of tissue specificity of vasculitis in MRL/lpr mice. Arthritis & Rheumatism 48(5):1445–1451. doi:10.1002/art.10952
23. Kamogawa J, Terada M, Mizuki S, Nishihara M, Yamamoto H, Mori S, Abe Y, Morimoto K, Nakatsuru S, Nakamura Y, Nose M (2002) Arthritis in MRL/lpr mice is under the control of multiple gene loci with an allelic combination derived from the original inbred strains. Arthritis & Rheumatism 46(4):1067–1074
24. Nishihara M, Terada M, Kamogawa J, Ohashi Y, Mori S, Nakatsuru S, Nakamura Y, Nose M (1999) Genetic basis of autoimmune sialadenitis in MRL/lpr lupus-prone mice: additive and hierarchical properties of polygenic inheritance. Arthritis & Rheumatism 42(12):2616–2623. doi:10.1002/1529-0131(199912)42:12<2616::AID-ANR16>3.0.CO;2-O
25. Subramanian S, Tus K, Li QZ, Wang A, Tian XH, Zhou J, Liang C, Bartov G, McDaniel LD, Zhou XJ, Schultz RA, Wakeland EK (2006) A Tlr7 translocation accelerates systemic autoimmunity in murine lupus. Proc Natl Acad Sci U S A 103(26):9970–9975. doi:10.1073/pnas.0603912103
26. Fairhurst AM, Hwang SH, Wang A, Tian XH, Boudreaux C, Zhou XJ, Casco J, Li QZ, Connolly JE, Wakeland EK (2008) Yaa autoimmune phenotypes are conferred by overexpression of TLR7. Eur J Immunol 38(7):1971–1978. doi:10.1002/eji.200838138
27. Hanrotel-Saliou C, Segalen I, Le Meur Y, Youinou P, Renaudineau Y (2011) Glomerular antibodies in lupus nephritis. Clinical reviews in allergy & immunology 40(3):151–158. doi:10.1007/s12016-010-8204-4
28. Seret G, Canas F, Pougnet-Di Costanzo L, Hanrotel-Saliou C, Jousse-Joulin S, Le Meur Y, Saraux A, Valeri A, Putterman C, Youinou P, Rojas-Villarraga A, Anaya JM, Renaudineau Y (2015) Anti-alpha-actinin antibodies are part of the anti-cell membrane antibody spectrum that characterize patients with lupus nephritis. J Autoimmun 61:54–61. doi:10.1016/j.jaut.2015.05.009
29. Renaudineau Y, Croquefer S, Jousse S, Renaudineau E, Devauchelle V, Gueguen P, Hanrotel C, Gilburd B, Saraux A, Shoenfeld Y, Putterman C, Youinou P (2006) Association of alpha-actinin-binding anti-double-stranded DNA antibodies with lupus nephritis. Arthritis & Rheumatism 54(8):2523–2532. doi:10.1002/art.22015
30. Xie C, Zhou XJ, Liu X, Mohan C (2003) Enhanced susceptibility to end-organ disease in the lupus-facilitating NZW mouse strain. Arthritis & Rheumatism 48(4):1080–1092. doi:10.1002/art.10887
31. Li QZ, Zhou J, Yang R, Yan M, Ye Q, Liu K, Liu S, Shao X, Li L, Zhou XJ, Wakeland EK, Mohan C (2009) The lupus-susceptibility gene kallikrein downmodulates antibody-mediated glomerulonephritis. Genes Immun 10(5):503–508. doi:10.1038/gene.2009.7
32. Mohan C, Adams S, Stanik V, Datta SK (1993) Nucleosome: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus. J Exp Med 177(5):1367–1381
33. Lu L, Kaliyaperumal A, Boumpas DT, Datta SK (1999) Major peptide autoepitopes for nucleosome-specific T cells of human lupus. J Clin Invest 104(3):345–355. doi:10.1172/JCI6801
34. Wofsy D, Seaman WE (1985) Successful treatment of autoimmunity in NZB/NZW F1 mice with monoclonal antibody to L3T4. J Exp Med 161(2):378–391

35. Wofsy D, Seaman WE (1987) Reversal of advanced murine lupus in NZB/NZW F1 mice by treatment with monoclonal antibody to L3T4. J Immunol 138(10):3247–3253
36. Carteron NL, Wofsy D, Schimenti C, Ermak TH (1990) F(ab')2 anti-CD4 and intact anti-CD4 monoclonal antibodies inhibit the accumulation of CD4+ T cells, CD8+ T cells, and B cells in the kidneys of lupus-prone NZB/NZW mice. Clin Immunol Immunopathol 56(3):373–383
37. Connolly K, Roubinian JR, Wofsy D (1992) Development of murine lupus in CD4-depleted NZB/NZW mice. Sustained inhibition of residual CD4+ T cells is required to suppress autoimmunity. J Immunol 149(9):3083–3088
38. Santoro TJ, Portanova JP, Kotzin BL (1988) The contribution of L3T4+ T cells to lymphoproliferation and autoantibody production in MRL-lpr/lpr mice. J Exp Med 167(5):1713–1718
39. Merino R, Iwamoto M, Fossati L, Izui S (1993) Polyclonal B cell activation arises from different mechanisms in lupus-prone (NZB x NZW)F1 and MRL/MpJ-lpr/lpr mice. J Immunol 151(11): 6509–6516
40. Chesnutt MS, Finck BK, Killeen N, Connolly MK, Goodman H, Wofsy D (1998) Enhanced lymphoproliferation and diminished autoimmunity in CD4-deficient MRL/lpr mice. Clin Immunol Immunopathol 87(1):23–32
41. Mohan C, Alas E, Morel L, Yang P, Wakeland EK (1998) Genetic dissection of SLE pathogenesis. Sle1 on murine chromosome 1 leads to a selective loss of tolerance to H2A/H2B/DNA subnucleosomes. J Clin Invest 101(6):1362–1372
42. Sobel ES, Satoh M, Chen Y, Wakeland EK, Morel L (2002) The major murine systemic lupus erythematosus susceptibility locus Sle1 results in abnormal functions of both B and T cells. J Immunol 169(5):2694–2700
43. Sobel ES, Mohan C, Morel L, Schiffenbauer J, Wakeland EK (1999) Genetic dissection of SLE pathogenesis: adoptive transfer of Sle1 mediates the loss of tolerance by bone marrow-derived B cells. J Immunol 162(4):2415–2421
44. Wandstrat AE, Nguyen C, Limaye N, Chan AY, Subramanian S, Tian XH, Yim YS, Pertsemlidis A, Garner HR Jr, Morel L, Wakeland EK (2004) Association of extensive polymorphisms in the SLAM/CD2 gene cluster with murine lupus. Immunity 21(6):769–780. doi:10.1016/j.immuni.2004.10.009
45. Wong EB, Khan TN, Mohan C, Rahman ZS (2012) The lupus-prone NZM2410/NZW strain-derived Sle1b sublocus alters the germinal center checkpoint in female mice in a B cell-intrinsic manner. J Immunol 189(12):5667–5681. doi:10.4049/jimmunol.1201661
46. Simpson N, Gatenby PA, Wilson A, Malik S, Fulcher DA, Tangye SG, Manku H, Vyse TJ, Roncador G, Huttley GA, Goodnow CC, Vinuesa CG, Cook MC (2010) Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. Arthritis & Rheumatism 62(1):234–244. doi:10.1002/art.25032
47. Jacquemin C, Schmitt N, Contin-Bordes C, Liu Y, Narayanan P, Seneschal J, Maurouard T, Dougall D, Davizon ES, Dumortier H, Douchet I, Raffray L, Richez C, Lazaro E, Duffau P, Truchetet ME, Khoryati L, Mercie P, Couzi L, Merville P, Schaeverbeke T, Viallard JF, Pellegrin JL, Moreau JF, Muller S, Zurawski S, Coffman RL, Pascual V, Ueno H, Blanco P (2015) OX40 ligand contributes to human lupus pathogenesis by promoting T follicular helper response. Immunity 42(6):1159–1170. doi:10.1016/j.immuni.2015.05.012
48. Mohan C, Yu Y, Morel L, Yang P, Wakeland EK (1999) Genetic dissection of Sle pathogenesis: Sle3 on murine chromosome 7 impacts T cell activation, differentiation, and cell death. J Immunol 162(11):6492–6502
49. Bethunaickan R, Berthier CC, Zhang W, Eksi R, Li HD, Guan Y, Kretzler M, Davidson A (2014) Identification of stage-specific genes associated with lupus nephritis and response to remission induction in (NZB x NZW)F1 and NZM2410 mice. Arthritis & Rheumatology 66(8):2246–2258. doi:10.1002/art.38679
50. Bethunaickan R, Berthier CC, Zhang W, Kretzler M, Davidson A (2013) Comparative transcriptional profiling of 3 murine models of SLE nephritis reveals both unique and shared regulatory networks. PLoS One 8(10):e77489. doi:10.1371/journal.pone.0077489
51. Deane JA, Pisitkun P, Barrett RS, Feigenbaum L, Town T, Ward JM, Flavell RA, Bolland S (2007) Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation. Immunity 27(5):801–810. doi:10.1016/j.immuni.2007.09.009
52. Hwang SH, Lee H, Yamamoto M, Jones LA, Dayalan J, Hopkins R, Zhou XJ, Yarovinsky F, Connolly JE, Curotto de Lafaille MA, Wakeland EK, Fairhurst AM (2012) B cell TLR7 expression drives anti-RNA autoantibody production and exacerbates disease in systemic lupus erythematosus-prone mice. J Immunol 189(12): 5786–5796. doi:10.4049/jimmunol.1202195
53. Scalapino KJ, Tang Q, Bluestone JA, Bonyhadi ML, Daikh DI (2006) Suppression of disease in New Zealand black/New Zealand White lupus-prone mice by adoptive transfer of ex vivo expanded regulatory T cells. J Immunol 177(3):1451–1459
54. Humrich JY, Morbach H, Undeutsch R, Enghard P, Rosenberger S, Weigert O, Kloke L, Heimann J, Gaber T, Brandenburg S, Scheffold A, Huehn J, Radbruch A, Burmester GR, Riemekasten G (2010) Homeostatic imbalance of regulatory and effector T cells due to IL-2 deprivation amplifies murine lupus. Proc Natl Acad Sci U S A 107(1):204–209. doi:10.1073/pnas.0903158107
55. Yang CH, Tian L, Ling GS, Trendell-Smith NJ, Ma L, Lo CK, Stott DI, Liew FY, Huang FP (2008) Immunological mechanisms and clinical implications of regulatory T cell deficiency in a systemic autoimmune disorder: roles of IL-2 versus IL-15. Eur J Immunol 38(6):1664–1676. doi:10.1002/eji.200838190
56. Divekar AA, Dubey S, Gangalum PR, Singh RR (2011) Dicer insufficiency and microRNA-155 overexpression in lupus regulatory T cells: an apparent paradox in the setting of an inflammatory milieu. J Immunol 186(2):924–930. doi:10.4049/jimmunol.1002218
57. Cuda CM, Wan S, Sobel ES, Croker BP, Morel L (2007) Murine lupus susceptibility locus Sle1a controls regulatory T cell number and function through multiple mechanisms. J Immunol 179(11): 7439–7447
58. Wan S, Xia C, Morel L (2007) IL-6 produced by dendritic cells from lupus-prone mice inhibits CD4+CD25+ T cell regulatory functions. J Immunol 178(1):271–279
59. Weigert O, von Spee C, Undeutsch R, Kloke L, Humrich JY, Riemekasten G (2013) CD4+Foxp3+ regulatory T cells prolong drug-induced disease remission in (NZBxNZW) F1 lupus mice. Arthritis research & therapy 15(1):R35. doi:10.1186/ar4188
60. Yan JJ, Lee JG, Jang JY, Koo TY, Ahn C, Yang J (2017) IL-2/anti-IL-2 complexes ameliorate lupus nephritis by expansion of CD4+ CD25+Foxp3+ regulatory T cells. Kidney Int 91(3):603–615. doi:10.1016/j.kint.2016.09.022
61. von Spee-Mayer C, Siegert E, Abdirama D, Rose A, Klaus A, Alexander T, Enghard P, Sawitzki B, Hiepe F, Radbruch A, Burmester GR, Riemekasten G, Humrich JY (2016) Low-dose interleukin-2 selectively corrects regulatory T cell defects in patients with systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis 75(7): 1407–1415. doi:10.1136/annrheumdis-2015-207776
62. Yang JQ, Kim PJ, Halder RC, Singh RR (2013) Intrinsic hyporesponsiveness of invariant natural killer T cells precedes the onset of lupus. Clin Exp Immunol 173(1):18–27. doi:10.1111/cei.12079
63. Yang JQ, Wen X, Kim PJ, Singh RR (2011) Invariant NKT cells inhibit autoreactive B cells in a contact- and CD1d-dependent

manner. J Immunol 186(3):1512–1520. doi:10.4049/jimmunol.1002373
64. Wermeling F, Lind SM, Jordo ED, Cardell SL, Karlsson MC (2010) Invariant NKT cells limit activation of autoreactive CD1d-positive B cells. J Exp Med 207(5):943–952. doi:10.1084/jem.20091314
65. Zeng D, Liu Y, Sidobre S, Kronenberg M, Strober S (2003) Activation of natural killer T cells in NZB/W mice induces Th1-type immune responses exacerbating lupus. J Clin Invest 112(8):1211–1222. doi:10.1172/JCI17165
66. Yang JQ, Kim PJ, Singh RR (2012) Brief treatment with iNKT cell ligand alpha-galactosylceramide confers a long-term protection against lupus. J Clin Immunol 32(1):106–113. doi:10.1007/s10875-011-9590-y
67. Karpouzas GA, La Cava A, Ebling FM, Singh RR, Hahn BH (2004) Differences between CD8+ T cells in lupus-prone (NZB x NZW) F1 mice and healthy (BALB/c x NZW) F1 mice may influence autoimmunity in the lupus model. Eur J Immunol 34(9):2489–2499. doi:10.1002/eji.200424978
68. Ruiz PJ, Zinger H, Mozes E (1996) Effect of injection of anti-CD4 and anti-CD8 monoclonal antibodies on the development of experimental systemic lupus erythematosus in mice. Cell Immunol 167(1):30–37. doi:10.1006/cimm.1996.0004
69. Kim HJ, Verbinnen B, Tang X, Lu L, Cantor H (2010) Inhibition of follicular T-helper cells by CD8(+) regulatory T cells is essential for self tolerance. Nature 467(7313):328–332. doi:10.1038/nature09370
70. Kim HJ, Wang X, Radfar S, Sproule TJ, Roopenian DC, Cantor H (2011) CD8+ T regulatory cells express the Ly49 class I MHC receptor and are defective in autoimmune prone B6-Yaa mice. Proc Natl Acad Sci U S A 108(5):2010–2015. doi:10.1073/pnas.1018974108
71. Tsumiyama K, Hashiramoto A, Takimoto M, Tsuji-Kawahara S, Miyazawa M, Shiozawa S (2013) IFN-gamma-producing effector CD8 T lymphocytes cause immune glomerular injury by recognizing antigen presented as immune complex on target tissue. J Immunol 191(1):91–96. doi:10.4049/jimmunol.1203217
72. Heymann F, Meyer-Schwesinger C, Hamilton-Williams EE, Hammerich L, Panzer U, Kaden S, Quaggin SE, Floege J, Grone HJ, Kurts C (2009) Kidney dendritic cell activation is required for progression of renal disease in a mouse model of glomerular injury. J Clin Invest 119(5):1286–1297. doi:10.1172/JCI38399
73. Couzi L, Merville P, Deminiere C, Moreau JF, Combe C, Pellegrin JL, Viallard JF, Blanco P (2007) Predominance of CD8+ T lymphocytes among periglomerular infiltrating cells and link to the prognosis of class III and class IV lupus nephritis. Arthritis & Rheumatism 56(7):2362–2370. doi:10.1002/art.22654
74. Taher TE, Muhammad HA, Bariller E, Flores-Borja F, Renaudineau Y, Isenberg DA, Mageed RA (2013) B-lymphocyte signalling abnormalities and lupus immunopathology. Int Rev Immunol 32(4):428–444. doi:10.3109/08830185.2013.788648
75. Taher TE, Muhammad HA, Rahim A, Flores-Borja F, Renaudineau Y, Isenberg DA, Mageed RA (2013) Aberrant B-lymphocyte responses in lupus: inherent or induced and potential therapeutic targets. Eur J Clin Investig 43(8):866–880. doi:10.1111/eci.12111
76. Youinou P, Taher TE, Pers JO, Mageed RA, Renaudineau Y (2009) B lymphocyte cytokines and rheumatic autoimmune disease. Arthritis & Rheumatism 60(7):1873–1880. doi:10.1002/art.24665
77. Renaudineau Y, Pers JO, Bendaoud B, Jamin C, Youinou P (2004) Dysfunctional B cells in systemic lupus erythematosus. Autoimmun Rev 3(7–8):516–523. doi:10.1016/j.autrev.2004.07.035
78. Jacobi AM, Reiter K, Mackay M, Aranow C, Hiepe F, Radbruch A, Hansen A, Burmester GR, Diamond B, Lipsky PE, Dorner T (2008) Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95. Arthritis & Rheumatism 58(6):1762–1773. doi:10.1002/art.23498
79. Simonin L, Pasquier E, Leroyer C, Cornec D, Lemerle J, Bendaoud B, Hillion S, Pers J-O, Couturaud F, Renaudineau Y (2016) Lymphocyte disturbances in primary antiphospholipid syndrome and application to venous thromboembolism follow-up. Clinical reviews in allergy & immunology:1–14. doi:10.1007/s12016-016-8568-1
80. Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE (2005) Identification and characterization of circulating human transitional B cells. Blood 105(11):4390–4398. doi:10.1182/blood-2004-11-4284
81. Garaud S, Le Dantec C, de Mendoza AR, Mageed RA, Youinou P, Renaudineau Y (2009) IL-10 production by B cells expressing CD5 with the alternative exon 1B. Ann N Y Acad Sci 1173:280–285. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04616.x
82. Youinou P, Renaudineau Y (2011) CD5 expression in B cells from patients with systemic lupus erythematosus. Crit Rev Immunol 31(1):31–42
83. Mohan C, Morel L, Yang P, Wakeland EK (1998) Accumulation of splenic B1a cells with potent antigen-presenting capability in NZM2410 lupus-prone mice. Arthritis & Rheumatism 41(9):1652–1662. doi:10.1002/1529-0131(199809)41:9<1652::AID-ART17>3.0.CO;2-W
84. Xu Z, Morel L (2015) Contribution of B-1a cells to systemic lupus erythematosus in the NZM2410 mouse model. Ann N Y Acad Sci 1362:215–223. doi:10.1111/nyas.12607
85. Holodick NE, Zeumer L, Rothstein TL, Morel L (2016) Expansion of B-1a cells with germline heavy chain sequence in lupus mice. Front Immunol 7:108. doi:10.3389/fimmu.2016.00108
86. Xu Z, Butfiloski EJ, Sobel ES, Morel L (2004) Mechanisms of peritoneal B-1a cells accumulation induced by murine lupus susceptibility locus Sle2. J Immunol 173(10):6050–6058
87. Xu Z, Duan B, Croker BP, Wakeland EK, Morel L (2005) Genetic dissection of the murine lupus susceptibility locus Sle2: contributions to increased peritoneal B-1a cells and lupus nephritis map to different loci. J Immunol 175(2):936–943
88. Renaudineau Y, Bariller E, Pers JO (2014) B1- and CD5-positive B cells. In: eLS. John Wiley & Sons, ltd. doi:10.1002/9780470015902.a0024242
89. Ye YL, Chuang YH, Chiang BL (1996) In vitro and in vivo functional analysis of CD5+ and CD5- B cells of autoimmune NZB x NZW F1 mice. Clin Exp Immunol 106(2):253–258
90. Mageed RA, Garaud S, Taher TE, Parikh K, Pers JO, Jamin C, Renaudineau Y, Youinou P (2012) CD5 expression promotes multiple intracellular signaling pathways in B lymphocyte. Autoimmun Rev. doi:10.1016/j.autrev.2012.02.007
91. Garaud S, Taher TE, Debant M, Burgos M, Melayah S, Berthou C, Parikh K, Pers JO, Luque-Paz D, Chiocchia G, Peppelenbosch M, Isenberg DA, Youinou P, Mignen O, Renaudineau Y, Mageed RA (2016) CD5 expression promotes IL-10 production through activation of the MAPK/Erk pathway and upregulation of TRPC1 channels in B lymphocytes. Cellular & molecular immunology. doi:10.1038/cmi.2016.42
92. Garaud S, Morva A, Lemoine S, Hillion S, Bordron A, Pers JO, Berthou C, Mageed RA, Renaudineau Y, Youinou P (2011) CD5 promotes IL-10 production in chronic lymphocytic leukemia B cells through STAT3 and NFAT2 activation. J Immunol 186(8):4835–4844. doi:10.4049/jimmunol.1003050
93. Roy V, Chang NH, Cai Y, Bonventi G, Wither J (2005) Aberrant IgM signaling promotes survival of transitional T1 B cells and

Article 2

STAT3 Phosphorylation Mediates the Stimulatory Effects of Interferon Alpha on B Cell Differentiation and Activation in SLE

De Groof et al. (2018) (en soumission)

Annexes – Article 2

STAT3 phosphorylation mediates the stimulatory effects of interferon alpha on B cell differentiation and activation in SLE.

Aurélie De Groof[1], Julie Ducreux[1], Floor Aleva[2], Alina Ferster[3], André van der Ven[2], Frank van de Veerdonk[2], Frédéric A. Houssiau[1], Bernard R. Lauwerys[1]

[1]Pôle de pathologies rhumatismales inflammatoires et systémiques, Institut de Recherche Expérimentale et Cliniques, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium; [2]Department of General Internal Medicine, Radboud University, Nijmegen, The Netherlands; [3]Service d'Onco-Hématologie, Hôpital Reine Fabiola, Brussels, Belgium

This work was supported by an unrestricted grant from UCB (Chaire UCL/UCB sur les rhumatismes systémiques et inflammatoires), and by research grants from the Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS – Communauté française de Belgique) and the Fonds de la Recherche Scientifique en Rhumatologie (Belgian Society of Rheumatology).

ABSTRACT

Objective: In our previous work, we reported a link between interferon alpha (IFNα) inhibition and decreased expression of B cell activation genes in ex vivo whole blood samples from IFN kinoid-treated SLE patients. Here, we investigated the effects of IFNα stimulation on B cell activation and differentiation.

Methods: PBMC and purified total (CD20+) or naïve (CD19+ CD20+ IgD+ CD27-) B cells were obtained from healthy controls and SLE patients. The effects of interferon alpha on B cell differentiation were studied by flow cytometry. The role of STAT3 on B cell responses to IFNα was studied using pharmacological inhibitors and PBMC from STAT3-deficient individuals.

Results: Incubation of normal PBMC with IFNα induces a B cell differentiation pattern as observed spontaneously in SLE PBMC: decreased naïve, decreased unswitched memory, increased switched memory cells and increased plasmablasts. IFNα displays direct stimulatory effects on purified naïve B cells from healthy individuals, as evidenced by a significant induction of cell surface CD38 and CD95 in the presence of the cytokine. In purified B cells, IFNα also induces STAT3 phosphorylation. IFNα-induced naïve B cell differentiation in total PBMC is significantly inhibited in the presence of STAT3 inhibitors, or in PBMC from STAT3-deficient patients.

Spontaneous levels of STAT3, but not STAT1, phosphorylation are significantly higher in total B cells from SLE patients compared to controls. Pharmacological STAT3 inhibition in SLE PBMC inhibits their spontaneous over-production of immunoglobulins.

Conclusions: IFNα displays direct stimulatory effects on B cell differentiation and activation in SLE. STAT3 phosphorylation mediates the effects of IFNα stimulation in naïve B cells, an observation that opens new therapeutic perspectives in SLE.

INTRODUCTION

Type I IFN, in particular IFNα, play an important role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). In mouse models of the disease, IFNα overexpression led to increased production of autoantibodies, early onset of nephritis and accelerated mortality (1,2). In humans with SLE, a strong IFN signature was found in PBMC from two thirds of patients (3, 4). IFNα blockade using anifrolumab, an anti-IFNAR antibody, induced significant clinical improvements in a recent phase IIb study including SLE patients with moderate to severe disease activity (5). Of note, the IFNα family of cytokines encompasses 13 different subtypes that all signal through the type I IFN receptor (IFNAR). Although all subtypes share a significant amount of homology, they are not blocked with a similar efficacy by monoclonal antibodies directed against IFNα2b (that were initially tested in clinical trials). Hence, drug development is presently focused on inhibitors targeting all IFNα family members (anti-IFNAR antibody, IFNα kinoid) (6, 7).

The mechanisms of action of IFNα in the pathogenesis of the disease are pleiotropic, due to the widespread distribution of IFNAR on multiple cell types. Blanco et al. showed that IFNα in lupus sera induced the differentiation of monocytes in myeloid-derived dendritic cells, able to stimulate autoreactive CD4 T cells (8). Authors from the same group also demonstrated that IFNα produced by plasmacytoid dendritic cells displayed direct effects on B cells and induced the differentiation of a CD40-stimulated CD19-positive bulk cell population into immunoglobulin-secreting CD38high plasma cells (9). Recently, we performed global transcriptomic studies in the blood of patients treated with IFNα kinoid, a drug that induces a polyclonal anti-IFNα antibody production in SLE patients. Other than a decrease in the expression of IFNα-induced genes, the strongest transcriptomic signal we obtained from these IFNα kinoid-treated patients was an inhibition of the expression of B cell activation associated transcripts (10), and these results prompted us to readdress the links between IFNα and B cell differentiation in SLE at the light of recent advances in the field.

B cell differentiation in SLE PBMC is strongly skewed compared to controls. Thus, proportions of antigen-naïve (i.e. naïve and unswitched memory) B cells are decreased in SLE PBMC while switched, antigen-stimulated B cell populations (switched memory, double negative B cells and plasmablasts) are significantly increased compared to controls. In addition, SLE B cell sub-populations spontaneously express cell surface activation markers, such as CD95 (Fas) (11). These changes in B cell phenotype in SLE are associated with a T cell-dependent and T cell-independent overproduction of (auto)antibodies. B cell activation in SLE results from several mechanisms, including genetic factors, dysfunctional central and peripheral tolerance checkpoints, increased stimulation by cellular and soluble factors, in particular cytokines such as BAFF, IL6, IL10 or IL21 that directly or indirectly induce B cell activation and differentiation (12-16). Here, we wondered whether IFNα also plays a role in the generation of this B cell phenotype, and which mechanisms are involved.

MATERIALS AND METHODS

SLE and STAT3 +/- patients

All SLE patients recruited in this study met the 1982 ACR revised classification criteria for the diagnosis of SLE (17), and had blood samples harvested during outpatient visits at the Lupus Clinic of the Cliniques Universitaires Saint-Luc in Brussels. STAT3 +/- individuals all had an ad hoc clinical phenotype (Job's syndrome) and genotyped heterozygous mutations in their STAT3 gene. Their blood samples were harvested at the outpatient clinics of the Department of Internal Medicine, Rabdoud University, Nijmegen (n=3), Department of Pediatric Hematology, Hôpital des Enfants Reine Fabiola, Brussels (n=1) and Department of Pediatric Hematology, Cliniques Universitaires Saint-Luc, Brussels (n=1). The study was approved by the Ethical Committees of Université catholique de Louvain, Radboud University and Hôpital des Enfants and written informed consent was obtained from all patients.

Flow cytometry characterization of SLE and control individuals

Whole blood samples from 24 consecutive SLE patients and 10 sex- and age-matched healthy individuals were harvested in heparinated tubes. Red blood cell lysis buffer (Biolegend) was added at a 20:1 ratio during 15 minutes at room temperature. Cells were washed and resuspended in sodium phosphate (1 mM, pH = 7.4) buffer containing 137 nM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM $MgSO_4$, 0.3 mM $MgCl_2$, 5 mM Glucose, 4 mM $NaHCO_3$, 1 mM EDTA (HCF) and 3% FBS (Flow Cytometry buffer). Cells were stained with the following antibodies BV510-labeled CD19, FITC-labeled CD20, APC-labeled CD38, PE-Cy7-labeled CD5, BV421-labeled IgD, APC-Cy7-labeled CD27 and PerCP-Cy5.5-labeld CD95 (all from BioLegend), next washed in HCF buffer with 0.5% FBS, fixed and permeabilized using FC004 flow cytometry fixation buffer (R&D Systems) and FC005, and stained with PE-labeled anti-survivin. Stained cells were analyzed on a FACSCanto II flow cytometer (Beckton-Dickinson).

High throughput transcriptomic studies on SLE and control B cells

PBMC from 7 SLE and 9 control patients were resuspended in flow cytometry buffer and stained with FITC-labeled anti-CD4, APC-labeled anti-CD20 and PE-labeled CD11c monoclonal antibodies (Beckton-Dickinson). The CD4 and CD20 positive cell populations were sorted by flow cytometry. The purity of the sorted cells was typically >98% for the CD4 T cell population and >97% for the B cell population. Total RNA was extracted from both cell subsets using the Nucleospin® RNA II extraction kit (Macherey-Nagel GmbH & Co, Düren, Germany), including DNase treatment of the samples. RNA quality was assessed by capillary electrophoresis using RNA 6000 Pico LabChips on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc, Palo Alto, CA, USA). Labeling of RNA (cRNA synthesis) was performed according to a standard Affymetrix® procedure (One-Cycle Target Labeling kit, Affymetrix UK Ltd, High Wycombe, United Kingdom). GeneChip® Human genome U133 Plus 2.0 Arrays were hybridized overnight at 45°c in monoplicates. The slides were then washed and stained using the EukGE-WS2v5 Fluidics protocol on the Genechip® Fluidics Station (Affymetrix) before being scanned on a Genechip® Scanner 3000. Data were retrieved on GCOS software for the initial normalization and analysis steps. The signals given by the poly-A RNA controls, hybridization controls and housekeeping/control genes were indicative of the good quality of the amplification and hybridization procedures. Further statistical analyses were performed using the Genespring® software (Agilent Technologies Inc).

Cell culture and cytokine stimulation experiments

Frozen PBMC from healthy donors or from STAT3 +/- individuals were thawed and plated at 3.106 cells/well in RPMI supplemented with 1% antibiotics-antimycotics (Invitrogen), L-arginine (0.55 mM), L-asparagine (0.24 mM), L-glutamine (1.5 mM) and 10% FBS in 24-well plates. In some experiments, cells were pre-incubated for one hour with STA21 (Sapphire North America), a STAT3 inhibitor at a 30 µM concentration. Cells were next stimulated in duplicate or triplicate culture conditions with anti-IgM (20 µg/mL, Jackson ImmunoResearch), and the following cytokines: IL21 (200 ng/mL, eBioscience), IFNα2b (5.000 U/mL, PBL Assay Science), IL6 (25

ng/mL, eBioscience), IL10 (25 ng/mL, eBioscience), BAFF (100 ng/mL, R&D Systems). These experiments were repeated 3 to 5 times, as indicated in the figure legends. After 3 days, cells were analyzed by flow cytometry, as described above.

For the experiments on purified naïve B cells, PBMC were isolated by Ficoll gradient centrifugation from fresh blood samples obtained in 3 healthy donors. Naïve B cells were purified using negative selection magnetic beads (Miltenyi Biotec). Cells were plated in duplicates in IMDM medium, supplemented with 1% antibiotics-antimycotics (Invitrogen), L-arginine (0.55 mM), L-asparagine (0.24 mM), L-glutamine (1.5 mM) and 10% FBS at 100,000 cells/well in 96-well plates in the presence of anti-IgM (20 µg/mL), anti-CD40 (10 µg/mL, BioLegend), and the following cytokines: IL21 (200 ng/mL), IFNα2b (5.000 U/mL), IL6 (25 ng/mL), IL10 (25 ng/mL), BAFF (100 ng/mL). After 3 days, cells were evaluated by flow cytometry.

Western blot experiments on total B cells.

Total B cells were isolated from fresh PBMC obtained in 9 SLE patients and 4 controls using CD19 positive selection magnetic beads (Milteniy Biotec), then resuspended in RIPA lysis buffer (ThermoFisher) supplemented with phosphatase and protease inhibitor (ThermoFisher). In other experiments, total B cells were isolated from fresh PBMC obtained from 3 control individuals using CD19 positive selection magnetic beads, next resuspended in IMDM buffer, supplemented with 1% antibiotics-antimycotics (Invitrogen), L-arginine (0.55 mM), L-asparagine (0.24 mM), L-glutamine (1.5 mM) and 10% FBS and incubated for 15 minutes in the absence or the presence of following stimuli : anti-IgM (20 µg/mL), IFNα2b (500 U/mL), IFNα2b + anti-IgM, IFNβ (500 U/mL, PBL Assay Science). Cells were washed and resuspended in RIPA buffer. Lysates were subjected to sonication, spun at 13,000 g to remove debris, next denaturated in loading buffer (Life Technologies) at 90°C for 10 minutes. Supernatants were resolved on 10% Tris-Glycine gels (BioRad) and nitrocellulose membranes (Invitrogen), and immunoblotted with the following primary antibodies: anti-phospho-STAT3 (Cell Signaling), anti-phospho-STAT1 (Cell Signaling), βactin (Sigma) and the following secondary antibodies: HRP-anti-rabbit IgG (Cell Signaling) for anti-phospho-STAT3 and

phospho-STAT1 and HRP-anti-mouse IgG (Santa Cruz) for βactin. Membranes were stripped using Restore Plus Western Blot Stripping Buffer (Pierce), next stained with anti-STAT3 (Cell Signaling) and anti-STAT1 (Cell Signaling) antibodies, followed by HRP-anti-ra bbit IgG.

ELISA and Bioplex measurements

Serum IFNα concentrations were measured using the VeriKine Human Interferon Alpha Multi-Subtype Serum ELISA kit (PBL Assay Science). Serum IL6, IL10 and IL21 concentrations were measured using reagents from the Bioplex ProHuman Th17 cytokine panel (BioRad) and serum BAFF concentrations using reagents from the Bioplex ProHuman Inflammation panel (BioRad). Serum total IgG concentrations were measured using a homemade ELISA, using anti-human IgG (Sigma) as a coating and anti-human IgG HRP (SouthernBiotech) as a detecting antibody.

Statistical analyses

Analyses of the SLE and control B cell transcriptomic profiles were performed on GeneSpring®, using Student's t tests with Benjamini-Hochberg comparisons for multiple comparisons. All other statistical tests were performed on Prism, using parametric or non-parametric tests in function of the distribution of the data, as indicated in the figure legends.

RESULTS

In our first experiment, we studied the distribution and activation pattern of B cell subsets in SLE (n=24) versus control (n=10) PBMC. As expected, SLE PBMC were characterized by a significant decrease in percentages of naïve and unswitched memory B cells and a significant increase in percentages of switched memory, double negative B cells and plasmablasts compared to controls (Figure 1A). Percentages (Figure 1B) and mean fluorescence intensities (data not shown) of CD95 (Fas)-positive cells were significantly higher in SLE B cell subpopulations compared to controls (except in plasmablasts, in which almost the entire control and SLE cell subpopulation were CD95 positive). Percentages and mean fluorescence intensities of CD95-positive naïve (Spearman r = -0.62; p = 0.0012 and Spearman r = -0.52; p = 0.0094), unswitched memory (Spearman r = -0.47; p = 0.0215 and Spearman r = -0.44; p = 0.0334) and double negative (Spearman r = -0.48; p = 0.0166 and Spearman r = -0.48; p = 0.0176) B cells correlated negatively with serum C3, thereby confirming that CD95 expression on SLE B cells is a marker of disease activity. Mean fluorescence intensities of survivin, an anti-apoptotic marker, were significantly higher in all SLE B cell subsets compared to controls (data not shown).

At the time of PBMC sampling, serum levels of IFNα, but also of classical B cell activating cytokines such as BAFF, IL10 and IL6, were significantly higher in SLE compared to control sera (IL21 was not detected in most sera) (Figure 1C). Serum IFNα, but not BAFF, IL10 or IL6, correlated significantly with proportions of CD95 (Spearman r = 0.67; p = 0.0043), and intracellular survivin (Spearman r = 0.57; p = 0.0212) positive naïve B cells.

In another experiment, we carried out transcriptomic studies on purified CD20-positive B cells from SLE patients (n=7), compared to controls (n=9). 196 (out of 51,452) probe sets were significantly overexpressed in SLE B cells (after correction for multiple comparisons). Pathway analyses indicated that these transcripts were enriched in type I interferon signaling, but also in

additional pathways, in particular cell division (Figure 2A). Further data mining, using a microarray dataset generated from IFNα-stimulated PBMC, showed that 146 of the 196 transcripts overexpressed in SLE B cells were significantly induced by IFNα, underscoring the magnitude of the IFN signature in these cells (data not shown).

IFNα signal transduction typically involves STAT1 and STAT2, although evidence also indicates a role for other members of the STAT family. Because of the proliferative and anti-apoptotic transcriptional pathways found in SLE B cells, we decided to focus on STAT3, which is typically associated with these pathways. Western Blot experiments, performed on purified control and SLE B cells indicated that STAT3 (Figure 2B), but not STAT1 (Supplementary Figure 1A), was spontaneously phosphorylated in SLE B cells. Intriguingly, addition of STAT3 inhibitors to SLE PBMC cultures induced a significant decrease in spontaneous immunoglobulin production in culture supernatants (Figure 2C).

In view of these observations, suggesting a STAT3-mediated role of IFNα on SLE B cells, we wondered whether addition of IFNα, compared to IL10, IL6, IL21 or BAFF, to anti-IgM-stimulated healthy PBMC could induce a B cell differentiation and activation pattern similar to that found spontaneously in SLE PBMC. As shown in Figure 3, IFNα significantly skewed the distribution of B cell subsets toward a lupus-like phenotype, and significantly induced CD95 expression in all B cell subsets (except in plasmablasts in which baseline expression was already maximal).

We next performed experiments on purified anti-IgM and anti-CD40-stimulated naïve B cells from healthy individuals, in order to evaluate whether IFNα displayed direct effects on these cells. We found that IFNα induced the expression of CD38 and CD95 on purified naïve B cells, but this was not the case for IL10, IL6, IL21 and BAFF (Figure 4A). In addition, we found that IFNα not only induced the phosphorylation of STAT1 (Supplementary Figure 1B), but also STAT3 (Figure 4B), in control purified naïve B cells.

We next wondered whether the effects of IFNα on B cells were partly mediated by STAT3, and incubated healthy PBMC with IFNα, in the presence of STA21, a pharmacological STAT3 inhibitor. As shown in Figure 4C, STA21 significantly reversed the effects of IFNα on naïve B cell differentiation. To overcome potential biases generated by off-target effects of STA21, we also studied the effects of IFNα on B cell differentiation in PBMC from STAT3 +/- individuals with Job syndrome. Compared to controls, STAT3-deficient individuals have a pattern of B cell differentiation opposite as what is observed in SLE patients; i.e. significantly increased naïve and decreased switched memory B cells (Figure 4D). Using IL21 as a positive, and IFNγ as a negative control, we found that the effects of IFNα on naïve B cell differentiation were, at least partly, inhibited in STAT3 +/- PBMC (Figure 4E).

DISCUSSION

We found that IFNα induces a SLE-like pattern of B cell activation and differentiation in healthy PBMC: decreased percentages of naïve and unswitched memory B cells and increased percentages of switched memory, double negative B cells and plasmablasts, in addition to increased expression of CD95. These effects are inhibited by STAT3 inhibitors or in STAT3 +/- PBMC. IFNα displays direct stimulatory effects and induces STAT3 phosphorylation in purified control naïve B cells. That IFNα plays a role in SLE B cell differentiation and activation is suggested by the presence of a typical IFN signature in purified SLE B cells. STAT3 is spontaneously phosphorylated in SLE B cells, and incubation of SLE PBMC with STAT3 inhibitors results in decreased production of immunoglobulins. Taken together, our data support the hypothesis that IFNα displays direct stimulatory effects on SLE B cells, and that these effects are, at least partly, mediated by STAT3 activation.

IFNα displays major amplificatory roles in the stimulation of autoimmune effectors in SLE. Evidence indicates that the cytokine impacts antigen-presenting cell functions (expression of MHC and co-stimulatory molecules), not only in humans, but also in mouse models of the disease. IV injection of an IFNα adenovirus strongly accelerates disease manifestations (ie. anti-dsDNA antibody titers, glomerulonephritis, proteinuria and death) in BWF1 mice. These effects are inhibited by the administration of an anti-CD4 depleting antibody, but are also BAFF-dependent, thereby emphasizing the dependence on antigen-presenting and CD4 T cells of autoantibody production in this model (18, 19). Of note, IFNα still displays stimulatory effects on B cells in the absence of CD4 T cells, as illustrated by the presence of increased mantle-zone B cells in the spleen, increased TLR7 expression in B cells and increased serum polyclonal immunoglobulins (IgG2 and IgG3) levels after administration of an anti-CD4 depleting antibody to IFNα adenovirus-treated BWF1 mice (18).

Antigen presenting and CD4 T cell-independent effects of IFNα on B cell stimulation were also reported in experimental models evaluating antibody

responses to T cell-dependent or independent antigens. Although, mantle-zone and B1 B cells are major players in T cell-independent antigen-specific responses, follicular B cells also have the ability of producing T cell-independent antigen-specific antibodies, and IFNα plays a stimulatory role in this process (20). More strikingly, IFNα increases germinal center formation and production of antigen-specific IgM and IgG after injection of a T cell-dependent antigen (chicken gamma globulins), and these effects are significantly decreased in mice with a targeted IFNAR deletion in CD19+ cells (21). Of note, IFNα relaxes the selection of B cells that enter germinal centers, thereby facilitating the stimulation of autoreactive B cells (22). In addition, IFNα down-regulates expression of Bcl6 in germinal center B cells, which facilitates their differentiation into plasmablasts (23).

Our data are in line with these observations, and support a major role for IFNα in indirect, but also direct stimulatory effects on B cell differentiation and activation in SLE. Together with IFNα, all cytokines tested (BAFF, IL6, IL10, IL21) have the ability to induce B cell differentiation when added to anti-IgM stimulated PBMC from healthy individuals. Yet, only IFNα induced CD95 expression in B cells in anti-IgM-stimulated PBMC, and CD95 and CD38 expression in anti-IgM- and anti-CD40-stimulated naïve B cells. These observations indicate that, if any of the other cytokines could mediate the effects of IFNα on B cell differentiation in PBMC, IFNα plays a unique role in the priming of naïve B cells, leading to their activation and differentiation.

Type 1 interferons usually induce an anti-proliferative and pro-apoptotic response in target cells in opposition to the proliferative and anti-apoptotic signature observed in SLE B cells, a paradox that could be explained by the role of STAT3 in mediating type 1 interferon signaling in B cells. JAK/STAT activation is the major signal transduction pathway activated after ligation of IFNα and other type 1 interferons to IFNAR. Ligand binding to IFNAR induces the activation of Jak1 and Tyk2, which induce the phosphorylation of STAT1 and STAT2. ISGF3, a complex made of activated STAT1/STAT2 heterodimers in association with IRF9, next migrates to the nucleus and binds to interferon-responsive elements in the promoter region of interferon-induced genes. In

mouse CD3 T cells and macrophages, absence of STAT1 is associated with an inhibition of the induction of MHC class I or class II expression, respectively, and abrogation of the expression of other interferon-induced transcripts in response to IFNα (24). By contrast, using primary human cells, van Boxel-Dezaire et al. found that exposure to IFNβ resulted in differential activation of STAT1, STAT3 and STAT5 according to the cell subset. While STAT3 and STAT5 were activated in monocytes, CD8, CD4 T cells and B cells in response to IFNβ, STAT1 phosphorylation was observed in monocytes and CD8 T cells, but only in very few (< 10%) CD4 T and B cells, an observation that was paralleled by a decreased apoptosis of these cells following incubation with IFNβ (25, 26). Other than STAT3 and STAT5, STAT2 and STAT6 were also found to be induced in cultured B cell lines in response to type 1 interferons in other studies (27, 28). More recently, constitutive activation of STAT1 and STAT3 was observed in CD3 positive T cells from patients with an interferonopathy due to DNASE2 mutations (29). Taken together, these observations indicate that signal transduction following IFNAR ligation is not restricted to STAT1 and STAT2, but also involves other STAT molecules, including STAT3.

STAT1 and STAT3 display opposite effects in many cell types. While STAT1 activation induces apoptosis, STAT3 activation is mostly associated with cell proliferation and survival. Of note, STAT1 and STAT3 transcriptional activities are strongly controlled by histone deacetylase (HDAC) 1 and 2, which are necessary for ISGF3- but repress STAT3-dependent gene expression, even in the presence of STAT3 phosphorylation and nuclear translocation (30). In B cells from healthy individuals, we observed that IFNα induced both STAT1 and STAT3 activation. That STAT3 is transcriptionally active in IFNα-stimulated B cells appeared clearly from the inhibition of the stimulatory effects of the cytokine on naïve B cell activation and differentiation in the presence of STAT3 inhibitors or in STAT3-deficient individuals. In SLE B cells, constitutive STAT3 activation was observed compared to controls. By contrast, no bias in STAT1 activation was observed in SLE B cells; all control and SLE B cells displayed baseline levels of STAT1 activation, which could be due to alternative STAT1 activation pathways in a proportion of cells (e.g. BCR engagement results in the delayed activation of STAT1) (31). From a

transcriptomic point of view, SLE B cells display a gene expression pattern pointing at STAT3, rather than STAT1 transcriptional activity, and this is also illustrated by the over-expression of intracellular survivin, a typical STAT3-dependant anti-apoptotic gene. Finally, inhibition of the spontaneous over-production of immunoglobulins by addition of a STAT3 inhibitor to cultured SLE PBMC is further indicative of the central role of the molecule in SLE B cell activation and differentiation.

FIGURES

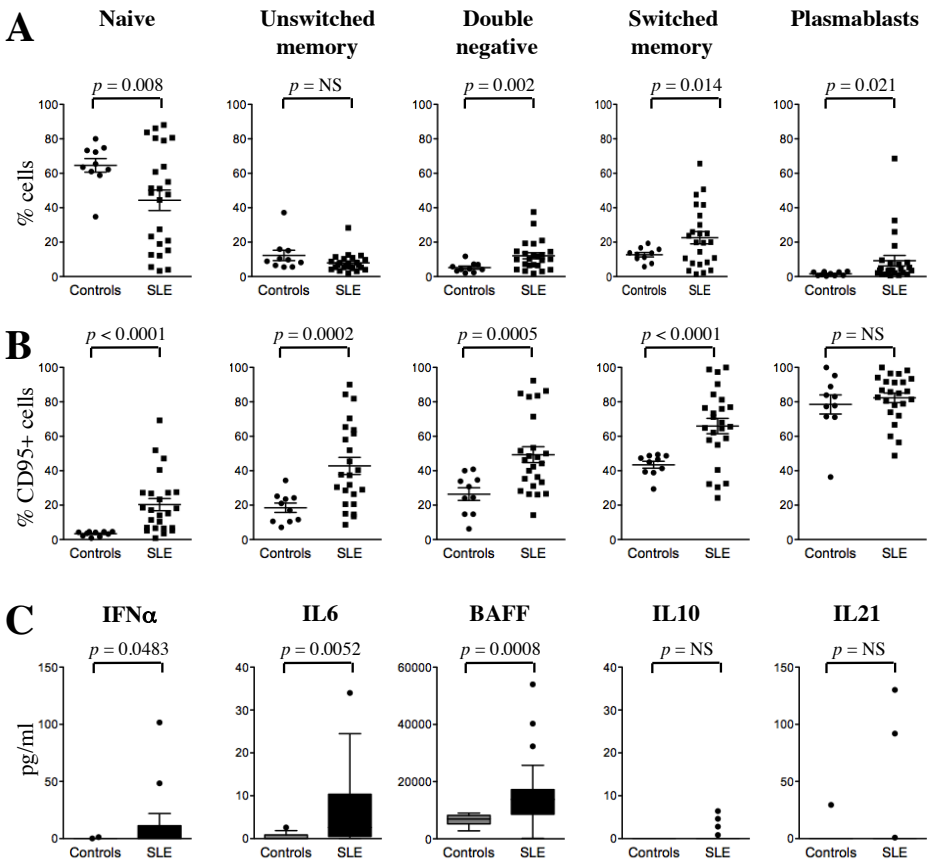


Figure 1.

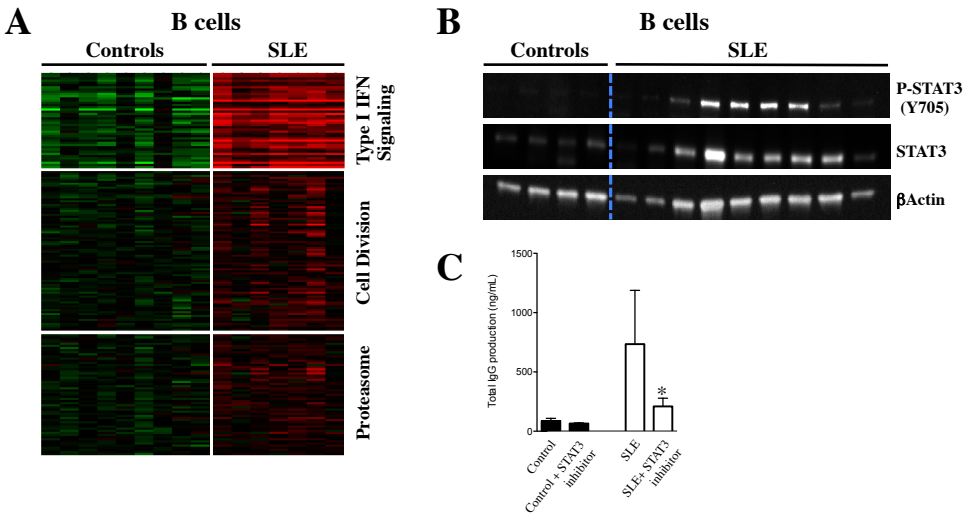


Figure 2.

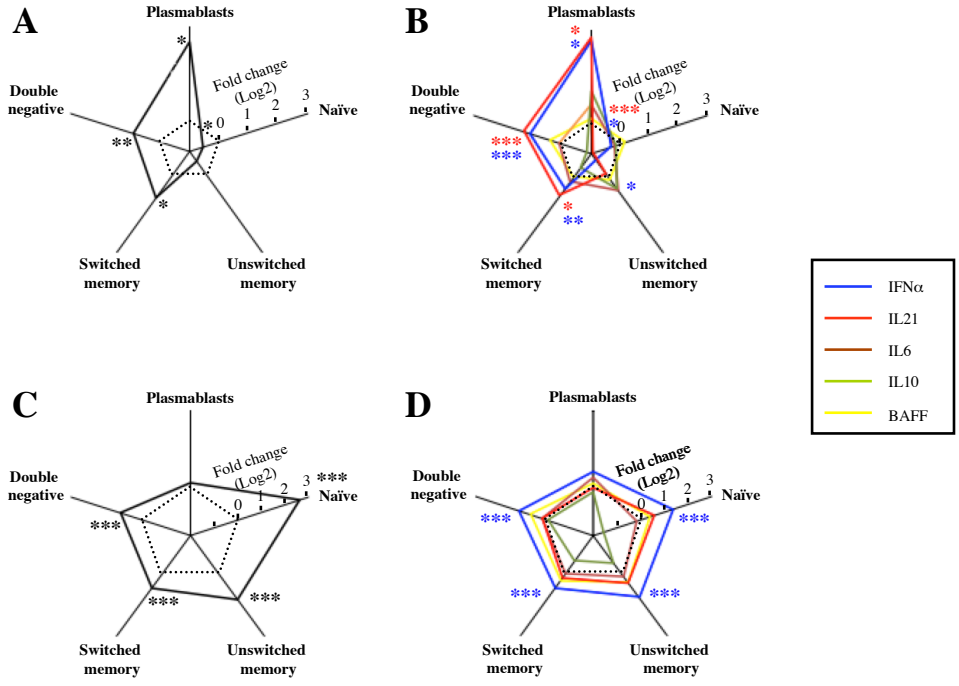


Figure 3.

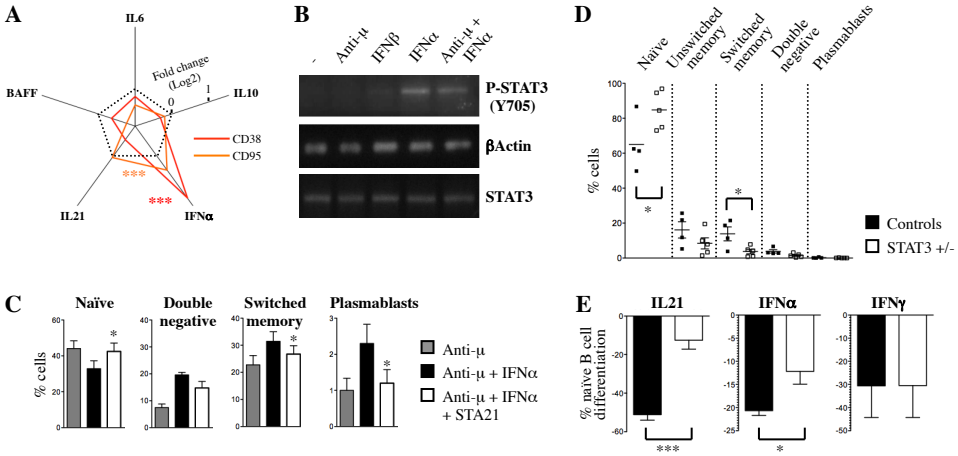
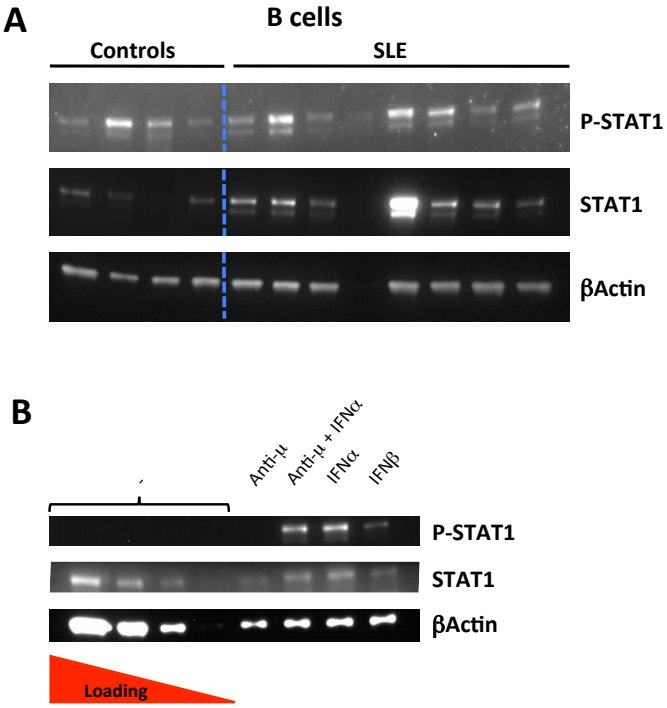


Figure 4.



Supplementary Figure 1.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: B cell differentiation and activation pattern in SLE PBMC. A. Proportions of naïve, unswitched memory, double negative, switched memory B cells and plasmablasts as a % of total CD19+ cells in SLE (n=24) and control (n=10) PBMC. B. Proportions of CD95-positive cells in gated SLE and control B cell sub-populations. C. IFNα, IL6, BAFF, IL10 and IL21 serum levels at the time of SLE and control B cell phenotyping. p values were calculated using Mann-Whitney tests.

Figure 2: SLE B cells spontaneously over-express interferon-induced genes. A. High-density transcriptomic analyses indicate the presence of an interferon signature in SLE CD19-positive B cells. B. STAT3 and pSTAT3 Western Blots in SLE versus control CD19-positive cells. C. Effects of STAT3 inhibition immunoglobulin production by SLE PBMC.

Figure 3: Effects of cytokines on B cell differentiation and activation. A. Fold changes in average proportions of the indicated B cell sub-populations in SLE (n=24, plain line) compared to control (dotted line set to 1, n=10) CD19+ B cells. B. Changes in average (n = 5 experiments) proportions of the indicated B cell sub-populations in response to a 3-day incubation with anti-IgM and cytokines compared to anti-IgM-stimulated cells (dotted line, set to 1). C. Fold changes in average proportions of CD95-positive cells in the indicated SLE (n=24, plain line) compared to control (dotted line set to 1, n=10) B cell sub-populations. D. Changes in average (n = 5 experiments) proportions of CD95-positive cells in the indicated B cell sub-populations in response to a 3-day incubation with anti-IgM and cytokines compared to anti-IgM-stimulated cells (dotted line, set to 1). p values were calculated using Mann-Whitney tests. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$.

Figure 4: Role of STAT3 in naïve B cell responses to IFNα. A. Average (n = 3 experiments) fold changes in CD38 and CD95 in anti-IgM- and anti-CD40-stimulated naïve B cells in response to a 3-day incubation with the indicated cytokines compared to controls (dotted line, set to 1). B. STAT3 and pSTAT3 Western Blots in total B cells in response to the indicated stimuli (the figure is representative of 3 different experiments). C. Effects of STA21, a STAT3 inhibitor, on average (n = 3 different experiments) proportions of the indicated B cell sub-populations in response to IgM and IFNα stimulation. D. Proportions of baseline B cell sub-populations in PBMC from STAT3 +/- versus control individuals. E. Effects of a 3-day incubation with IL21, IFNα and IFNγ on naïve B cell differentiation in IgM-stimulated PBMC from controls (n = 4) versus STAT3 +/- (n = 5) individuals. Results are expressed in % decrease in naïve B cells compared to IgM-stimulated cells. p values were calculated using Mann-Whitney tests. * $p < 0.05$; *** $p < 0.0005$.

Supplementary Figure 1: Absence of increased STAT1 phosphorylation in SLE B cells. A. pSTAT1 and STAT1 Western Blots in purified CD19-positive B cells from SLE patients and controls. B. STAT1 and pSTAT1 Western Blots in total B cells in response to the indicated stimuli (the figure is representative of 3 different experiments).

REFERENCES

1. Mathian A, Weinberg A, Gallegos M, Banchereau J, Koutouzov S. IFN-alpha induces early lethal lupus in preautoimmune (New Zealand Black x New Zealand White) F1 but not in BALB/c mice. J Immunol 2005, 174:2499-506.

2. Fairhurst AM, Mathian A, Connolly JE, Wang A, Gray HF, George TA, et al. Systemic IFN-alpha drives kidney nephritis in B6.Sle123 mice. Eur J Immunol 2008, 38:1948-60.

3. Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. J Exp Med 2003, 197:711-23.

4. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. Proc Natl Acad Sci U S A 2003, 100:2610-5.

5. Furie R, Khamashta M, Merrill JT, Werth VP, Kalunian K, Brohawn P, et al. Anifrolumab, an anti-interferon-alpha receptor monoclonal antibody, in moderate-to-severe systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheumatol 2017, 69:376-86.

6. Lauwerys BR, Hachulla E, Spertini F, Lazaro E, Jorgensen C, Mariette X, et al. Down-regulation of interferon signature in systemic lupus erythematosus patients by active immunization with interferon alpha-kinoid. Arthritis Rheum 2013, 65:447-56.

7. Lauwerys BR, Ducreux J, Houssiau FA. Type I interferon blockade in systemic lupus erythematosus: where do we stand? Rheumatology (Oxford) 2014, 53:1369-76.

8. Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. Science 2001, 294:1540-3.

9. Jego G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. Immunity 2003, 19:225-34.

10. Ducreux J, Houssiau FA, Vandepapeliere P, Jorgensen C, Lazaro E, Spertini F, et al. Interferon alpha kinoid induces neutralizing anti-interferon alpha antibodies that decrease the expression of interferon-induced and B cell activation associated transcripts: analysis of extended follow-up data from the interferon alpha kinoid phase I/II study. Rheumatology (Oxford) 2016, 55:1901-5.

11. Jacobi AM, Reiter K, Mackay M, Aranow C, Hiepe F, Radbruch A, et al. Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95. Arthritis Rheum 2008, 58:1762-73.

12. Suurmond J, Calise J, Malkiel S, Diamond B. DNA-reactive B cells in lupus. Curr Opin Immunol 2016, 43:1-7.

13. Jacobi AM, Zhang J, Mackay M, Aranow C, Diamond B. Phenotypic characterization of autoreactive B cells--checkpoints of B cell tolerance in patients with systemic lupus erythematosus. PLoS One 2009, 4:e5776.

14. Meffre E, Wardemann H. B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. Curr Opin Immunol 2008, 20:632-8.

15. De Groof A, Hemon P, Mignen O, Pers JO, Wakeland EK, Renaudineau Y, et al. Dysregulated lymphoid cell populations in mouse models of systemic lupus erythematosus. Clin Rev Allergy Immunol 2017, 53:181-97.

16. Ettinger R, Sims GP, Fairhurst AM, Robbins R, da Silva YS, Spolski R, et al. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. J Immunol 2005, 175:7867-79.

17. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982, 25:1271-7.

18. Liu Z, Bethunaickan R, Huang W, Lodhi U, Solano I, Madaio MP, et al. Interferon-alpha accelerates murine systemic lupus erythematosus in a T cell-dependent manner. Arthritis Rheum 2011, 63:219-29.

19. Jacob N, Guo S, Mathian A, Koss MN, Gindea S, Putterman C, et al. B Cell and BAFF dependence of IFN-alpha-exaggerated disease in systemic lupus erythematosus-prone NZM 2328 mice. J Immunol 2011, 186:4984-93.

20. Swanson CL, Wilson TJ, Strauch P, Colonna M, Pelanda R, Torres RM. Type I IFN enhances follicular B cell contribution to the T cell-independent antibody response. J Exp Med 2010; 207:1485-500.

21. Le Bon A, Thompson C, Kamphuis E, Durand V, Rossmann C, Kalinke U, Tough DF. Cutting edge: enhancement of antibody responses through direct stimulation of B and T cells by type I IFN. J Immunol 2006; 176: 2074-8.

22. Moisini I, Huang W, Bethunaickan R, Sahu R, Ricketts PG, Akerman M, et al. The Yaa locus and IFN-α fine-tune germinal center B cell selection in murine systemic lupus erythematosus. J Immunol 2012; 189:4305-12.

23. Salamon D, Adori M, He M, Bönelt P, Severinson E, Kis LL, et al. Type I interferons directly down-regulate BCL-6 in primary and transformed germinal center B cells: dirrential regulation in B cell lines derived from endemic or sporadic Burkitt's lymphoma. Cytokine 2012; 57: 360-71.

24. Meraz MA, White JM, Sheehan KCF, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, et al. Targeted disruption of the STAT1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. Cell 1996; 84:431-42.

25. van Boxel-Dezaire AH, Rani MR, Stark GR. Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. Immunity 2006; 25:361-72.

26. van Boxel-Dezaire AH, Zula JA, Xu Y, Ransohoff RM, Jacobberger JW, Stark GR. Major differences in the responses of primary human leukocyte subsets to IFN-β. J Immunol 2010; 185:5888-99.

27. Gupta S, Jiang M, Pernis AB. IFN-α activates Stat6 and leads to the formation of Stat2: Stat6 complexes in B cells. J Immunol 1999; 163:3834-41.

28. Jaster R, Tschirch E, Bittorf T, Brock J. Role of STAT5 in interferon-α signal transduction in Ba/F3 cells. Cell Signal 1999; 11:331-5.

29. Rodero MP, Tesser A, Bartok E, Rice GI, Della Mina E, Depp M, et al. Type I interferon-mediated autoinflammation due to DNase II deficiency. Nat Commun 2017; 8:2176.

30. Icardi L, Lievens S, Mori R, Piessevaux J, De Cauwer L, De Bosscher K, et al. Opposed regulation of type I IFN-induced STAT3 and ISGF3 transcriptional activities by histone deacetylases (HDACS) 1 and 2. FASEB J 2012; 26:240-9.

31. Karras JG, Huo L, Wang Z, Frank DA, Zimmet JM, Rothstein TL. Delayed tyrosine phosphorylation and nuclear expression of STAT1 following antigen receptor stimulation of B lymphocytes. J Immunol 1996; 157:2299-309.

Article 3

Higher expression of TNFα-induced genes in the synovium of patients with early rheumatoid arthritis with disease activity, and predicts absence of response to first line therapy

De Groof et al. Arthritis Research & Therapy (2016)

De Groof *et al. Arthritis Research & Therapy* (2016) 18:19
DOI 10.1186/s13075-016-0919-z

Arthritis Research & Therapy

RESEARCH ARTICLE Open Access

Higher expression of TNFα-induced genes in the synovium of patients with early rheumatoid arthritis correlates with disease activity, and predicts absence of response to first line therapy

Aurélie De Groof[1], Julie Ducreux[1], Frances Humby[2], Adrien Nzeusseu Toukap[1,3], Valérie Badot[4], Costantino Pitzalis[2], Frédéric A. Houssiau[1,3], Patrick Durez[1,3] and Bernard R. Lauwerys[1,3*]

Abstract

Background: IL6-related T cell activation and TNFα-dependent cell proliferation are major targets of therapy in the RA synovium. We investigated whether expression of these pathways in RA synovial biopsies is associated with disease activity and response to therapy.

Method: Correlation and gene set enrichment studies were performed using gene expression profiles from RA synovial biopsies. Immunostaining experiments of GADD45B and PDE4D were performed on independent additional sets of early untreated RA samples, obtained in two different centers by needle-arthroscopy or US-guided biopsies.

Results: In 65 RA synovial biopsies, transcripts correlating with disease activity were strongly enriched in TNFα-induced genes. Out of the individual variables used in disease-activity scores, tender joint count, swollen joint count and physician's global assessment, but not CRP or patient's global assessment displayed a similar correlation with the expression of TNFα-dependent genes. In addition, TNFα-induced genes were also significantly enriched in transcripts over-expressed in synovial biopsy samples obtained from poor-responders to methotrexate or tocilizumab, prior to initiation of therapy.
GADD45B (induced by TNFα in monocytes) and PDE4D (induced by TNFα in FLS) immunostaining was significantly higher in overall poor-responders to therapy in 46 independent baseline samples obtained from early untreated RA patients prior to initiation of therapy. GADD45B (but not PDE4D) immunostaining was significantly higher in the sub-group of patients with poor-response to methotrexate therapy, and this was confirmed in another population of methotrexate-treated patients.

Conclusion: Higher expression of TNFα-induced transcripts in early RA synovitis is associated with higher disease activity, and predicts poor response to first-line therapy. That over-expression of TNFα-induced genes predicts poor-response to therapy regardless of the drug administered, indicates that this molecular signature is associated with disease severity, rather than with specific pathways of escape to therapy.

Keywords: Rheumatoid arthritis, Early rheumatoid arthritis, Synovitis, TNF-alpha

* Correspondence: Bernard.Lauwerys@uclouvain.be
[1]Pôle de Pathologies Rhumatismales Inflammatoires et Systémiques, Institut de Recherche Expérimentale et Clinique, Université catholique de Louvain, Avenue Hippocrate 10, B2.5390, 1200 Brussels, Belgium
[3]Department of Rheumatology, Cliniques Universitaires Saint-Luc, Brussels, Belgium
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2016 De Groof et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Access to synovial material from patients with rheumatoid arthritis (RA) provides unique opportunities to investigate local molecular and cellular mechanisms of inflammation, and their links with clinical outcomes. Thus, histological and gene expression studies on RA synovial biopsies recently showed the presence of distinct, although partly overlapping, phenotypes: myeloid, lymphoid, low inflammatory and fibroid, based on most prevalent cell type, and related gene expression patterns. Concentrations of serum markers associated with these phenotypes were found to be informative about response to therapy in a biomarker study performed in patients included in the ADACTA trial. Thus, a high baseline serum sICAM1/CXCL13 ratio, reflecting a myeloid phenotype, predicted a higher probability of response to TNF blockade (American College of Rheumatology 50 % response (ACR50) 42 % versus 13 %), while a high CXCL13/sICAM1 ratio (lymphoid phenotype) was rather associated with better response rates to tocilizumab therapy (ACR50 69 % versus 20 %) [1, 2].

Using high-density and customized low-density gene expression platforms, we also found heterogeneous expression of T cell (lymphoid)-associated transcripts in RA synovial tissue. In a group of 32 biopsies obtained in treated and untreated patients, we observed that expression of these transcripts displayed a significant, albeit moderate ($0.40 < r < 0.55$) correlation with disease activity (disease activity score in 28 joints-C reactive protein (DAS28-CRP)) [3, 4]. In other studies, we evaluated the effects of therapies on global gene expression patterns in prospective synovial biopsy samples obtained prior to and 3 months after initiation of therapy with methotrexate, tocilizumab, rituximab or adalimumab. We showed that methotrexate, tocilizumab and rituximab display very similar molecular effects in RA synovitis, characterized by a decrease in T cell activation genes [5, 6]. By contrast, TNF blockade resulted in a decrease in the expression of transcripts involved in cell proliferation and inflammation. Interestingly, higher baseline expression of TNFα-induced transcripts in RA synovial tissue was associated with decreased responses to TNF blockade in methotrexate-resistant patients [7, 8]. These observations probably indicate that, in some cases, tissue impregnation in TNFα is too high to be blocked using standard TNF blockade regimens.

Overall, these observations indicate that expression of TNFα- or T cell-associated transcripts displays a large level of plasticity in RA synovitis, related to disease activity, and effects of therapy. We therefore undertook the present study, on existing sets of gene expression data generated in our laboratory, in order to investigate the impact of disease activity on synovial molecular pathways, and assess whether variations in synovial gene expression profiles are also informative about disease outcomes.

Methods

Gene expression data sets

Transcriptomic data (GeneChip Human Genome U133 Plus2.0.CEL files, Affymetrix) from 65 samples obtained by needle-arthroscopic knee synovial biopsy were used in the present analyses. These samples were obtained in untreated RA patients (<1 year disease duration for the majority of them), prior to and 3 months after initiation of tocilizumab ($n = 13$ and 12 samples, respectively) or methotrexate ($n = 2 \times 8$ samples) therapy [GEO:GSE45867] (National Center for Biotechnology Information; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo), and in RA patients resistant to TNF blockade, prior to and 3 months after administration of rituximab ($n = 2 \times 12$ samples, GSE24742) therapy [5, 6]. All patients met the ACR/European League Against Rheumatism (EULAR) 2010 RA classification criteria, and the ACR 1987 revised classification for RA. Patients' characteristics are displayed in Table 1.

Student's *t* tests, correlation and pathway analyses

Selected .CEL files were uploaded on GeneSpring software (Agilent Technologies), and fluorescence intensity data were normalized using robust multi-array analysis. Normalized, log2-transformed gene expression data were exported on Excel (Microsoft) in order to calculate Pearson *r* correlation coefficients with disease activity score in 28 joints using the C-reactive protein level (DAS28-CRP), simplified disease activity index (SDAI), clinical disease activity index (CDAI) or each individual component of these scores. Student's *t* test (without correction for multiple comparisons) was performed on baseline gene expression data from good versus poor responders to therapy, using GeneSpring. A cutoff value of 1.5 was further used to discriminate genes overexpressed in poor versus good responders to therapy. Pathway analyses were performed with lists of probe sets displaying a Pearson *r* correlation coefficient >0.5 with DAS28-CRP, using the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID), an application that interrogates functional annotation databases (Gene Ontology, KEGG, Biocarta and InterPro), and finds overrepresented biologic themes within a group of genes (http://david.abcc.ncifcrf.gov) [9].

Gene set enrichment analyses

Lists of selected probe sets were uploaded on GeneSpring, and their eigenvalues were calculated in several experiments. Eigenvalues are the percentages of variation in gene expression data that are explained by the principal component of the experiment (whatever the amplitude of the

Table 1 Patients' characteristics (high-density transcriptomic studies)

Patients with early rheumatoid arthritis ($n = 21$)	
Baseline biopsies (number)	21
Follow-up (3 months) biopsies (number)	20
Age at baseline (mean ± SD, years)	51.4 ± 12.8
Gender (female/male, number)	16/5
Anti-citrullinated peptide antibodies status (% positive)	66.7 %
Rheumatoid factor status (% positive)	71.4 %
Disease duration (mean ± SD, years)	0.5 ± 1.1
Disease activity score in 28 joints-CRP in methotrexate group ($n = 9$)	
Baseline	4.51 ± 1.49
After 3 months	3.84 ± 1.61
After 6 months	3.10 ± 1.54
Good, moderate, poor responders (number at 3 months)	2, 3, 4
Good, moderate, poor responders (number at 6 months)	5, 2, 2
Disease activity score in 28 joints-CRP in tocilizumab group ($n = 12$)	
Baseline	4.50 ± 1.10
After 3 months	2.35 ± 0.95
After 6 months	2.17 ± 1.14
Good, moderate, poor responders (number at 3 months)	7, 4, 1
Good, moderate, poor responders (number at 6 months)	9, 0, 3
Rheumatoid arthritis patients refractory to TNF blockade	
Baseline biopsies, number	12
Follow-up (3 months) biopsies, number	12
Age at baseline (mean ± SD, years)	54.6 ± 16.1
Gender (female/male, number)	9/3
Anti-citrullinated peptide antibodies status (% positive)	50 %
Rheumatoid factor status (% positive)	41.7 %
Patients receiving concomitant methotrexate therapy	100 %
Disease activity score in 28 joints-CRP at baseline	5.80 ± 1.32
Disease activity score in 28 joints-CRP 3 months after administration of rituximab treatment	4.48 ± 1.28

Disease activity score in 28 joints-CRP disease activity score in 28 joints using the C-reactive protein level

variation). The influence of IL6 was assessed using synovial biopsy samples prior to and after administration of tocilizumab, an anti-IL6R antibody, using GSE45867 data. The effects of TNFα were analyzed using online available gene expression data (GSE38351) obtained from monocytes ($n = 3$) cultured for 1.5 hours in the presence or the absence of TNFα [10], and gene expression data produced in our laboratory on synovial fibroblast-like synoviocytes (FLS) cultured overnight in the presence or the absence of TNFα (10 ng/ml). For this experiment, FLS were purified from synovial biopsies from one patient with osteoarthritis, and two patients with RA, as previously described [8]. After overnight incubation, cells were detached and total RNA was extracted using the Nucleospin RNA II extraction kit (Macherey-Nagel), including DNase treatment of the samples. Complementary RNA (cRNA) was synthetized, biotin-labeled and fragmented according to a standard Affymetrix procedure (Genechip 3′ IVT Express kit, Affymetrix), and GeneChip Human Genome U133 Plus2.0 arrays were hybridized overnight with 10 µg cRNA. The slides were washed and stained using a EukGE-WS2v5 fluidics protocol on a GeneChip fluidics Station 450, before being scanned on a GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix). The .CEL files corresponding to this experiment are available [GEO:GSE15615 and GSE73764].

Immunohistochemistry experiments

GADD45B and PDE4D immunolabeling experiments were performed using paraffin-embedded synovial sections obtained in two different cohorts of patients with early RA. Knee synovial biopsies were obtained by needle arthroscopy in a first population of 46 patients with early (disease duration <1 year) ACR/EULAR 2010 classification criteria-positive RA. These patients were untreated at the time of the biopsy (except for use of non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)). Next, 17 of them received oral methotrexate (15–20 mg/week), while the other patients received biological original disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs), alone or in combination with oral methotrexate (see Additional file 1).

Ultrasound (US)-guided biopsies were obtained in 35 additional patients with early (disease duration <1 year) untreated ACR/EULAR 2010 classification criteria-positive RA, prior to initiation of methotrexate therapy (see Additional file 2). Response to therapy was determined in both cohorts using EULAR response criteria, based on DAS28-CRP evaluations at baseline, and 6 months after initiation of therapy.

Knee synovial biopsies were also obtained by needle arthroscopy from the knee of untreated patients with psoriatic arthritis ($n = 9$), and osteoarthritis ($n = 12$). After removal of paraffin, sections were incubated in a sodium citrate buffer (ImmunoDNA Retriever with citrate, BioSB) and heated in a bain-marie for 60 minutes at 98 °C to retrieve the antigenic sites. Endogenous peroxidase was inactivated with Peroxydase Blocking Reagent (Dako), and nonspecific binding was blocked by 15-minute incubation with 1 × Envision buffer (Dako) containing 1 % normal human IgG, 5 % bovine serum albumin and 2 % milk. Sections were then incubated overnight at 4 °C with primary antibody. The following antibodies were used: GADD45B (rabbit polyclonal, 1/100 dilution, Sigma) and PDE4D (rabbit polyclonal, 1/2,000 dilution, Sigma). After three washes in 1 × Envision buffer, specifically bound antibodies were labeled with anti-rabbit

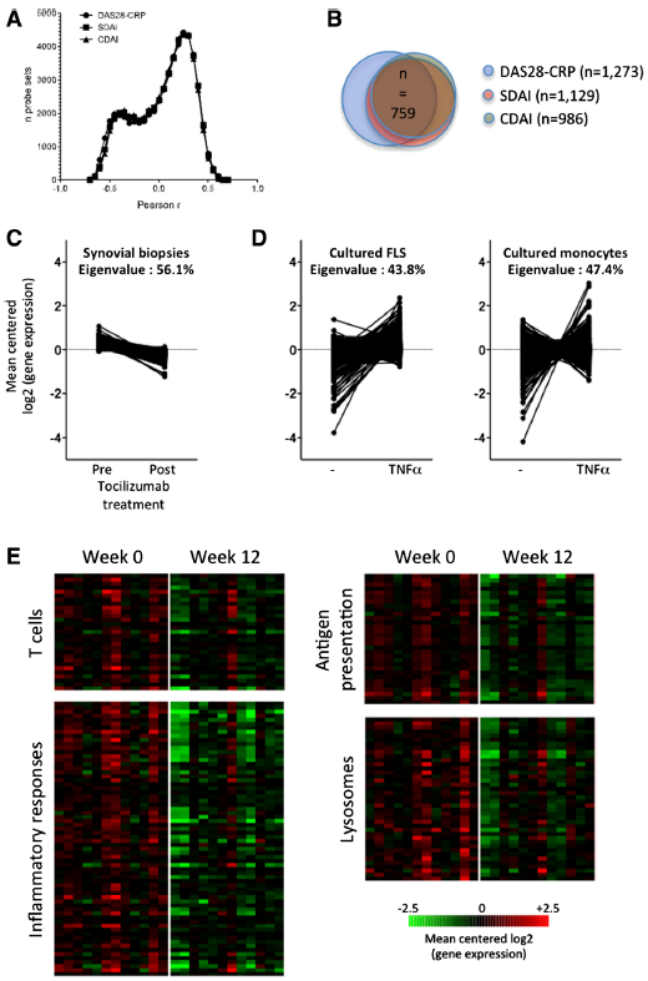


Fig. 1 Correlations between clinical disease activity indices and the expression of 51,452 probe sets in 65 synovial biopsy samples from untreated and treated patients with rheumatoid arthritis (RA). **a** Distribution of Pearson *r* correlation coefficients between disease activity score in 28 joints assessed by C-reactive protein level (*DAS28*-CRP)/simplified disease activity index (*SDAI*)/clinical disease activity index (*CDAI*) and synovial gene expression levels. **b** Overlap between probe sets displaying a Pearson *r* correlation coefficient >0.5 with DAS28-CRP, SDAI and CDAI. **c**, **d** Gene set enrichment analyses and eigenvalues calculations using probe sets displaying a Pearson *r* correlation coefficient >0.5 with DAS28-CRP indicate that the majority of them are downregulated by tocilizumab in synovial tissue in RA (**c**), and a large proportion are induced by TNFα in cultured fibroblast-like synoviocytes (*FLS*) or monocytes (**d**). **e** Pathway analyses (http://david.abcc.ncifcrf.gov) indicate that transcripts displaying a Pearson *r* correlation coefficient >0.5 with DAS28-CRP are significantly enriched in genes associated with T cell activation, inflammatory responses, antigen presentation and lysosomes. Probe sets belonging to these pathways are downregulated by tocilizumab in RA synovial tissue

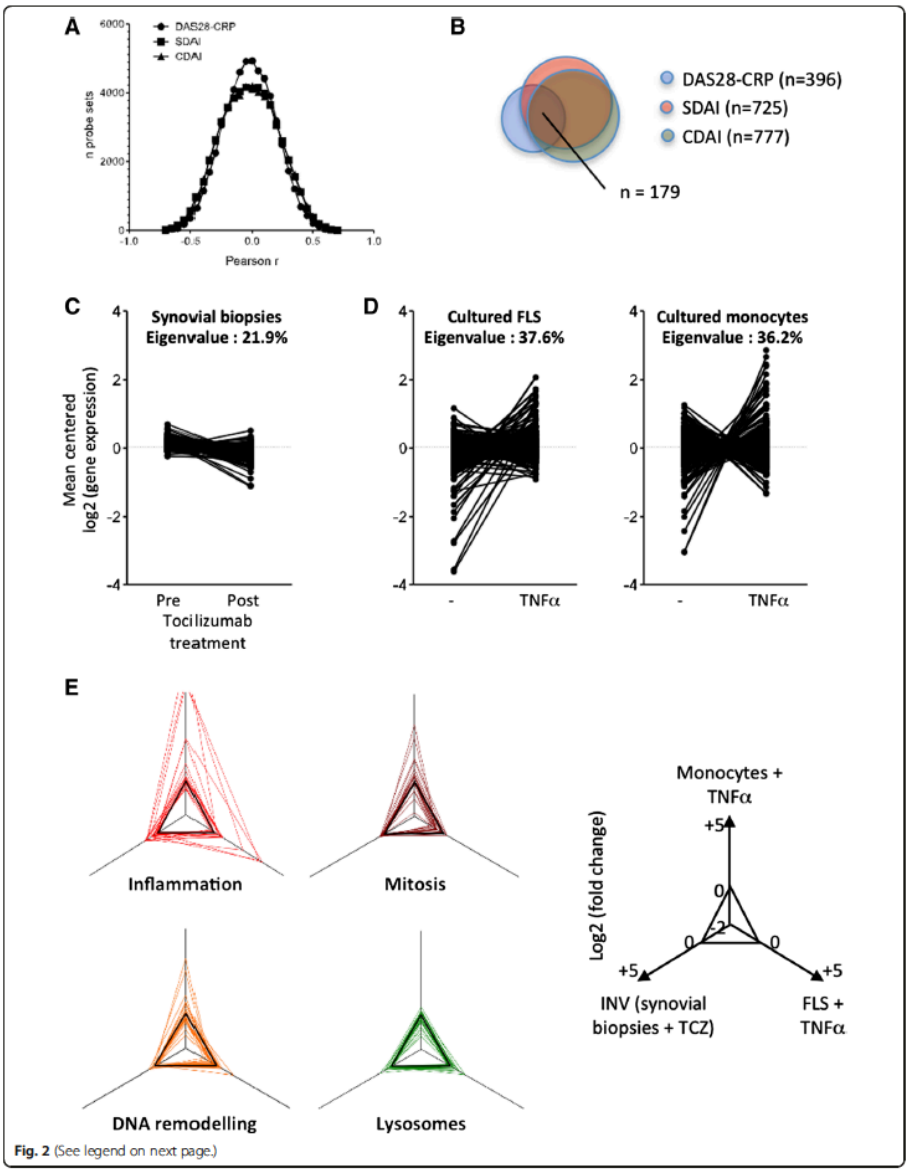


Fig. 2 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)
Fig. 2 Correlations between clinical disease activity indices and the expression of 51,452 probe sets in 21 synovial biopsy samples from untreated patients with early rheumatoid arthritis (RA). **a** Distribution of Pearson *r* correlation coefficients between disease activity score in 28 joints assessed by C-reactive protein level (*DAS28*-CRP)/simplified disease activity index (*SDAI*)/clinical disease activity index (*CDAI*) and synovial gene expression levels. **b** Overlap between probe sets displaying a Pearson *r* correlation coefficient >0.5 with DAS28-CRP, SDAI and CDAI. **c**, **d** Gene set enrichment analyses and eigenvalues calculations using probe sets displaying a Pearson *r* correlation coefficient >0.5 with DAS28-CRP indicate that a subset of these transcripts is downregulated by tocilizumab in synovial tissue in RA (**c**), and a large proportion is induced by TNFα in cultured fibroblast-like synoviocytes (*FLS*) or monocytes (**d**). **e** Pathway analyses (http://david.abcc.ncifcrf.gov) indicate that transcripts displaying a Pearson *r* correlation coefficient >0.5 with DAS28-CRP are significantly enriched in genes associated with inflammation, mitosis, DNA remodeling and lysosomes. The radar plots indicate how the transcripts belonging to these pathways are influenced by tocilizumab in synovial biopsies, and by TNFα in cultured monocytes and FLS. *INV* inverse (a negative effect of tocilizumab appears as positive and suggests a positive effect of IL6)

Envision-HRP labeled polymer for 1 hour at room temperature, and peroxidase activity was revealed by 10-minute incubation with diaminobenzidine (Dako). As a final step, sections were washed in tap water and lightly counterstained with hematoxylin.

Slides were scanned on a Mirax station (Zeiss) and quantitative analysis of the immunostained sections was performed using Frida software [11], in accordance with the digital image analysis process [12]. Six digitized pictures (magnification × 400) were obtained for each slide by one operator who was blinded to the identity of the specimens. Each picture included a lining and sublining region when possible. When the distribution of the staining was heterogeneous, the pictures were taken in order to be representative of the whole slide. The surface staining (S) and the surface of the nuclei (N) were determined for each image, and the area of staining then was normalized by calculating the ratio of S to N, and averaging it for each slide. When the quality of the tissue was insufficient to obtain enough material for quantification, the sample was discarded. For GADD45B, this was the case in 6 out of 46 knee and 9 out of 35 US-guided biopsies. For PDE4D, this was the case in 3 out of 46 knee and 7 out of 35 US-guided biopsies. Between-group differences were assessed using the Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests.

The study was approved by the Ethical Committee of the Université catholique de Louvain, and informed consent was obtained from all patients.

Results

In order to identify molecular pathways that drive disease activity in RA synovitis, we calculated the correlation coefficients of clinical disease activity scores (DAS28-CRP, CDAI, SDAI) with the expression levels of 51,452 individual probe sets in 65 synovial biopsies from 33 different RA patients (collected prospectively before and after administration of several therapies; see Table 1). Around 1,000 transcripts displayed a correlation coefficient (Pearson *r*) ≥0.5 with disease activity scores (Fig. 1a). All three disease activity indices generated strongly overlapping results (Fig. 1b). Gene set enrichment analyses indicated that almost all these transcripts are downregulated by tocilizumab (anti-IL6R antibody) in the synovium in early RA, which indicates that they are, directly or indirectly, IL6-dependent (Fig. 1c). A large proportion of these transcripts is also TNFα-dependent, as they are induced by the addition of TNFα in peripheral blood monocyte and/or FLS cell cultures (Fig. 1d). Additional pathway analyses indicated that these transcripts are significantly enriched in T cell activation, antigen presentation, inflammation and lysosome genes, many of which are known tocilizumab targets in the synovium in RA (Fig. 1e).

Samples used in this first study were obtained from untreated patients, but also from the same patients 3 months after initiation of methotrexate, tocilizumab or rituximab therapy. In order to avoid biases associated with the use of treated samples, we repeated our analyses, this time only in samples ($n = 21$) obtained from untreated patients. Again, all three clinical indices of disease activity generated strongly overlapping results (Fig. 2a and b). When looking at transcripts correlating with individual components of the disease activity scores (tender joint count, swollen joint count, patient's global assessment, physician's global assessment, CRP), we found that transcripts correlating with tender joint count, physician's global assessment and swollen joint count displayed the strongest overlap with the global scores (see Additional file 3). Gene set enrichment analyses were performed using the transcripts displaying $r \geq 0.5$ with DAS28-CRP. The changes in eigenvalues (i.e., the percentage of variation in gene expression explained by the principal component of the experiment), and the changes in the amplitude of the effects compared to the initial analyses showed that these transcripts are much less IL6-dependent, but still comparably TNFα-dependent (Fig. 2c and d). Pathway analyses indicated a significant enrichment in the following functional terms: inflammation, mitosis, DNA remodeling and lysosomes. Transcripts belonging to some of these pathways (mitosis, DNA remodeling) are strongly TNFα-dependent, while transcripts belonging to the inflammation pathway are both TNFα-dependent and IL6-dependent (Fig. 2e).

Next, we wondered whether over-expression of TNFα-induced genes in baseline synovial tissue was also

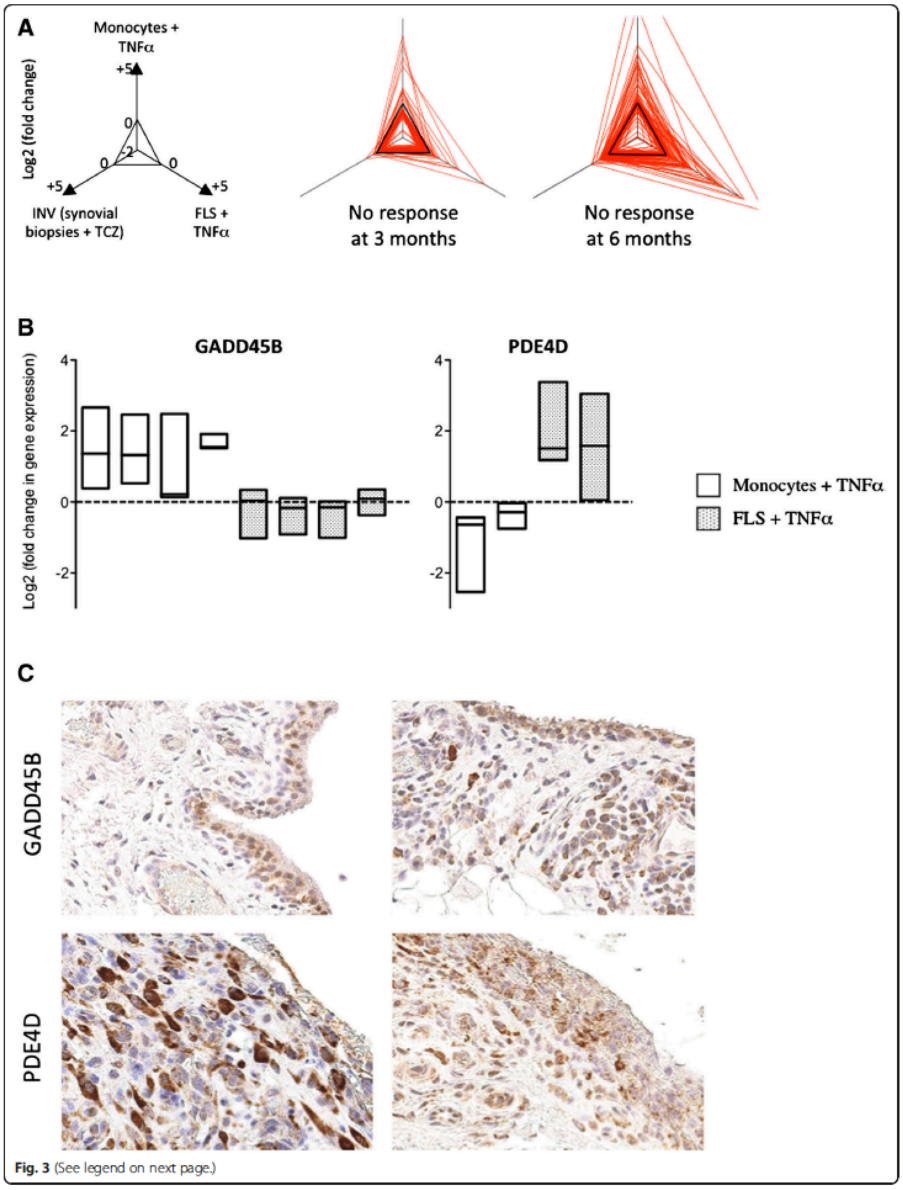


Fig. 3 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)
Fig. 3 Higher synovial expression of TNFα-induced transcripts is associated with overall absence of response to therapy in early rheumatoid arthritis (RA). **a** Baseline synovial gene expression profiles were compared in poor versus good responders to either tocilizumab or methotrexate therapy at 3 months (4 non-responders versus 9 good responders), and at 6 months (4 non-responders versus 15 good responders). The radar plots indicate how transcripts over-expressed in poor responders (p <0.05, >1.5-fold change in gene expression) are influenced by tocilizumab in synovial biopsies, and by TNFα in cultured monocytes and fibroblast-like synoviocytes (*FLS*). *INV* inverse (a negative effect of tocilizumab appears as positive and suggests a positive effect of IL6). **b** Fold changes in the expression of GADD45B and PDE4D encoding probe sets obtained from HGU133 Plus2.0 transcriptomic data generated in TNFα-stimulated versus non-stimulated monocytes (n = 3) and FLS (n = 3). *Box plots* represent minimum, maximum and median log2 (fold changes) compared to non-stimulated cells. **c** Typical GADD45B and PDE4D immunostaining pictures (original magnification × 400) obtained in early RA synovial biopsies, illustrative of marked inter-individual variations in protein expression

associated with overall disease evolution. Six months after the biopsy, 4 out of 21 patients were non-responders and 15 were good responders to either methotrexate or tocilizumab therapy. As shown in Fig. 3a, transcripts over-expressed in the synovium of non-responders (see Additional file 4) were significantly enriched in TNFα-induced genes. In order to confirm this observation, we performed immunohistochemistry experiments in two independent cohorts of synovial biopsies, using two TNFα-dependent markers: PDE4D, which is preferentially induced in TNFα-stimulated fibroblasts, and GADD45B, preferentially induced in TNFα-stimulated monocytes (Fig. 3b). We found that both molecules are strongly over-expressed in RA compared to osteoarthritis or psoriatic arthritis synovial biopsies (Fig. 4a). In addition, both GADD45B and PDE4D are significantly over-expressed in baseline synovial tissue of patients with early RA, who will not respond to methotrexate or original biological DMARDs given as first line monotherapy or combination therapy. Out of the 46 RA synovial biopsy samples used in these immunostaining experiments, 17 were taken prior to initiation of methotrexate monotherapy. In this subgroup of samples, baseline over-expression of GADD45B (but not PDE4D) was significantly associated with poor response to therapy. Similarly, baseline over-expression of GADD45B (but not PDE4D) was associated with poor response to methotrexate therapy in an independent set of US-guided synovial biopsies obtained in patients with early RA prior to initiation of therapy.

Discussion

We studied correlations between clinical indices of disease activity and global gene expression levels in RA synovitis. We found that synovial transcripts correlating with DAS28-CRP are significantly enriched in TNFα-induced genes in early RA. In addition, high synovial expression of TNFα-induced transcripts is associated with poor response to therapy in early disease. Immunohistochemistry experiments on two independent cohorts of patients confirmed that baseline over-expression of GADD45B, a molecule induced by TNFα in monocytes in vitro, is associated with poor response to therapy in early RA.

Identification of molecular pathways driving disease activity in RA synovitis is an important step toward a better understanding of the complex pathogenesis of the disease. Hence, a careful approach to the data is warranted, in particular when the analytical process is based on correlative studies. In this perspective, our data illustrate nicely how methodological choices can influence the shape of such correlative results. Thus, our initial analyses, performed on 65 samples obtained before and after initiation of methotrexate, tocilizumab or rituximab therapy, point at a predominant role of IL6-derived mechanisms in driving disease activity in RA, as almost all the genes correlating (r ≥0.5) with DAS28-CRP are downregulated by tocilizumab therapy in RA biopsy samples. Yet, we recently demonstrated that all three drugs display very similar molecular effects in RA synovitis, characterized by a downregulation of T cell activation-associated genes, and a large panel of chemokine and cytokine transcripts [6]. Thus, not only tocilizumab, but also rituximab and methotrexate decrease the expression of IL6-dependent transcripts in RA synovitis. Because these three drugs also downregulate disease activity, inclusion of post-treatment samples in our initial analyses increased the odds of finding an association between IL6-dependent transcripts and disease activity, and this is what we observed.

We therefore repeated our analyses, excluding samples from treated patients. In synovial biopsies from patients with early (untreated) RA, transcripts correlating with DAS28-CRP (r ≥0.5) are significantly enriched in TNFα-dependent genes. Some of these genes are also induced by IL6, but to a lesser extent. The fact that disease activity score-associated transcripts are more enriched in TNFα-induced genes in early RA does not mean that TNFα plays a greater role in disease pathogenesis at this stage of the disease. Instead, it means that the variables with the highest weights in the disease activity scores in patients with active RA (e.g., number of tender and swollen joints) are more susceptible to direct influence of TNFα-dependent mechanisms. This could be due to the fact that TNFα-related mechanisms drive disease extension, resulting in higher numbers of affected joints. Alternatively, over-expression of TNFα-induced genes

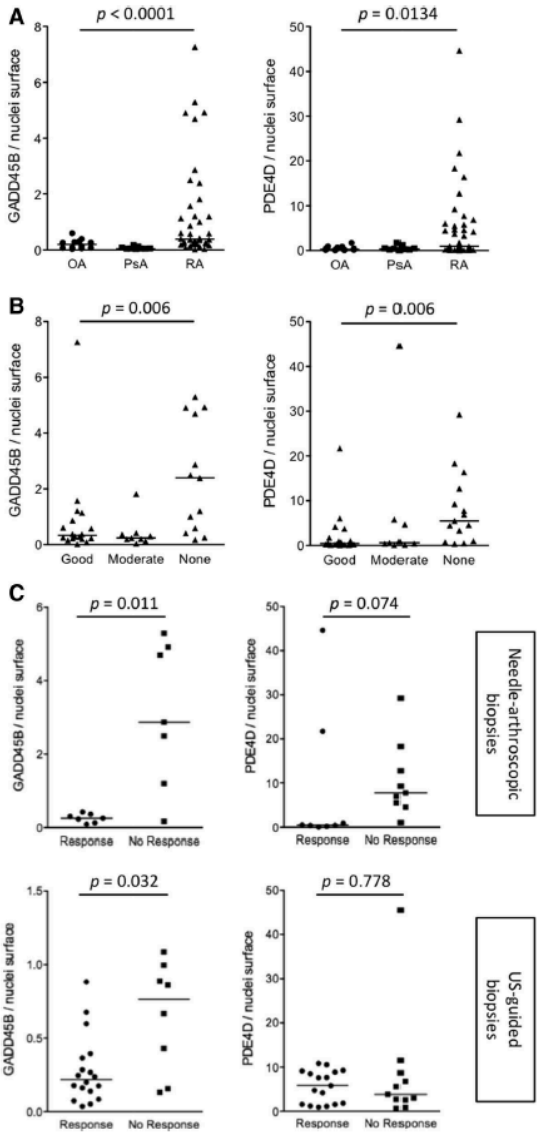


Fig. 4 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)
Fig. 4 Quantification of GADD45B and PDE4D immunostaining in baseline synovial biopsies from patients with early rheumatoid arthritis (RA), osteoarthritis and psoriatic arthritis. **a** Needle-arthroscopic synovial biopsies from untreated patients with early RA ($n = 46$), psoriatic arthritis ($n = 9$) and osteoarthritis ($n = 12$) were stained with polyclonal antibodies directed at GADD45B and PDE4D. Data are represented as the ratio of GADD45B or PDE4D surface staining to staining of the nuclei. *Horizontal bars* represent the median values. *P* values were calculated using Kruskal–Wallis test. **b** GADD45B and PDE4D immunostaining in needle-arthroscopic synovial biopsies obtained in patients with early RA prior to initiation of therapy. Patients are distributed as good, moderate and poor responders to therapy according to European League Against Rheumatism (EULAR) response criteria at 6 months. *P* values were calculated using Kruskal–Wallis test. **c** GADD45B and PDE4D immunostaining in needle-arthroscopic (sub-group of population displayed in **a** and **b**) and ultrasound-guided biopsies obtained in patients with early RA prior to initiation of methotrexate therapy. Patients are distributed as responders or non-responders according to EULAR response criteria at 6 months. *P* values were calculated using Mann–Whitney test

could make affected joints more susceptible to detection by the clinician. In this perspective, performing similar analyses with ultrasound rather than clinical scores would be of interest, in order to evaluate whether expression of TNFα-dependent transcripts in synovial biopsies correlate with higher gray-scale and power Doppler signals, hence a higher probability of being detected clinically.

One striking observation is that all three disease activity indices - DAS28-CRP, SDAI and CDAI - generated highly concordant results in the correlation analyses with synovial gene expression data. This is not a surprise considering that these three indices are calculated based on an overlapping set of variables (tender joint count, swollen joint count, CRP, patient's global assessment, physician's global assessment). Comparing the results of the correlation analyses using the global indices, versus each of their individual components, it appears that the highest overlap with the global indices is found for the tender joint count (the variable with the highest weight in all the scores). The lowest overlap is found for patient's global assessment, and CRP. Interestingly, there was also a large overlap found between the three clinical indices and physician's global assessment, although this variable is not included in the DAS calculation, and has little weight in the SDAI and CDAI. Although one should not underestimate the risk of circularity in the reasoning, association of independent clinical indices of disease activity with synovial molecular signatures known to be involved in the pathogenesis of RA, provides strong extra-clinical support to the view that these scores adequately and equally capture information that is truly representative of the disease.

From a clinical point of view, assessment of disease activity using synovial transcriptomic data is not the most valuable information one expects from synovial biopsies, considering how readily disease activity is evaluated at the bedside by a trained clinician. Instead, evaluation of variables associated with less favorable disease outcomes, and a decreased probability of response to therapy, is more helpful, not only in daily clinical practice, but also in the context of patient stratification strategies in clinical trials. In our previous work we demonstrated that baseline over-expression of TNFα-induced genes in the synovium from patients with DMARD-resistant RA was associated with poor response to TNF blockade [7, 8]. Our present gene expression and immunohistochemistry results obtained from different cohorts of patients indicate that baseline synovial over-expression of TNFα-induced genes is also associated with poor response to therapy, in particular methotrexate, in early RA. The fact that greater synovial expression of TNFα-dependent molecules is associated with poor therapeutic outcomes regardless of the drug received by the patient, probably indicates that this molecular signature is associated with overall disease severity, rather than with activation of specific pathways of escape to therapies. Translating this hypothesis in clinical terms would lead to the speculation that patients with high synovial expression of TNFα-induced genes do not necessarily need alternative therapies, but stronger therapies, a statement that obviously needs to be verified in further studies (also bearing in mind that estimation of not only drug efficacy, but also toxicity, needs to be incorporated into personalized treatment algorithms).

In our immunohistochemistry confirmation studies, we selected GADD45B and PDE4D, because of their in vitro specific pattern of induction in monocytes versus FLS, respectively. Both molecules were already subject to scrutiny in the context of RA. Thus, GADD45B is mainly expressed in synovial CD68 positive macrophages in RA, in response to pro-inflammatory cytokines, such as TNFα [13, 14]. PDE4 isoforms regulate intracellular cAMP concentrations, and knowledge about their involvement in arthritis mainly originates from clinical studies on apremilast, a specific PDE4 inhibitor. Apremilast is registered for the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis [15]; however, the drug does not have superior efficacy compared to placebo in methotrexate-resistant RA patients [16]. In our results, baseline over-expression of both GADD45B and PDE4D is associated with overall poor response to therapy in a group of untreated patients with early RA. When we restricted the analyses to methotrexate therapy, the association remained significant for baseline GADD45B over-expression in two independent cohorts of patients with early RA.

Conclusions

At the present time, stratification of RA patients in clinical trials is based on parameters (autoantibodies, radiographic evidence of erosions, acute phase reactants) that are associated with disease severity, yet are poorly discriminant on an individual basis. Our data provide a strong rationale for including synovial markers of disease severity in the stratification panels of clinical trials, in view of their ability to identify patients with a low overall probability of response to therapy. The development of minimally invasive techniques (needle arthroscopy and US-guided biopsy) potentially gives access to synovial material from any joint in ambulatory patients [17]. In addition, a large international effort is ongoing to standardize pre-analytical and analytical procedures for synovial biopsy sampling [18]. In this context, our results open perspectives in terms of a new molecular classification of patients with rheumatoid arthritis, resulting in a more precise evaluation of disease outcomes and the need for more aggressive therapies.

Additional files

Additional file 1: Patients' characteristics (immunohistochemistry studies on needle arthroscopic biopsies). Characteristics of the patients with early rheumatoid arthritis (RA) included in the immunohistochemistry studies on needle arthroscopic biopsies. (DOCX 56 kb)

Additional file 2: Patients' characteristics (immunohistochemistry studies on ultrasound (US)-guided biopsies). Characteristics of the patients with early rheumatoid arthritis (RA) included in the immunohistochemistry studies on US-guided biopsies. (DOCX 47 kb)

Additional file 3: Numbers of probe sets displaying a positive correlation with global disease activity indices and each of their individual variables. Overlap between probe sets displaying a Pearson *r* correlation coefficient >0.5 between tender joint count, swollen joint count, patient's global assessment, physician's global assessment, C-reactive protein (CRP) and global disease activity scores. (XLSX 37 kb)

Additional file 4: Genes over-expressed in poor responders to therapy at baseline. Lists of probe sets differentially expressed at baseline in synovial biopsies from patients with early rheumatoid arthritis (RA) in good versus poor responders to first line therapy at 3 and 6 months. (XLSX 293 kb)

Abbreviations

ACR50: American College of Rheumatology 50 % response; ACR/EULAR: American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism; ADACTA: Adalimumab Actemra trial; CDAI: clinical disease activity index; CRP: C-reactive protein; CXCL13: chemokine (C-X-C motif) ligand 13; DAS28-CRP: disease activity score in 28 joints using C-reactive protein level; DMARD: disease-modifying anti-rheumatic drug; DNA: Deoxyribonucleic acid; FLS: fibroblast-like synovial cells; GADD45B: growth arrest and DNA-damage-inducible, beta; GEO: Gene Expression Omnibus; HRP: horseradish peroxidase; IL6: interleukin 6; IL6R: interleukin 6 receptor; NSAID: non steroidal anti-inflammatory drug; PDE4D: phosphodiesterase 4D, cAMP-specific; RA: rheumatoid arthritis; RNA: Ribonucleic acid; SDAI: simplified disease activity index; sICAM1: soluble intercellular adhesion molecule 1; TNFα: tumor necrosis factor alpha; US: ultrasound.

Competing interests

Bernard Lauwerys holds shares of DNALytics, a Belgian SME involved in the development of diagnostic tests for patients with arthritis. DNALytics did not have any influence on the design or the interpretation of the results displayed in this manuscript. None of the other authors have any conflict of interest to disclose.

Authors' contributions

ADG carried out most of the experiments, performed the statistical analyses, and drafted the manuscript. JD contributed to the statistical analyses (microarray data) and drafting of the manuscript. FH collected part of the biopsy samples, contributed to the statistical analyses (immunohistochemistry experiments) and drafting of the manuscript. ANT collected part of the biopsy samples and contributed to the drafting and revision of the manuscript. VB carried out cell culture experiments, and contributed to the revision of the manuscript. CP participated in the coordination of the study, and contributed to the revision of the manuscript. FAH and PD participated in the coordination of the study, and helped in drafting and revising the manuscript. BL designed the study, participated in its coordination, contributed to the analyses of the results, and helped drafting and revising the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was funded by grants from Cap48 (charity supported by the Radio Télévision belge francophone) and the Fonds National de la Recherche Scientifique (Communauté française de Belgique). Aurélie De Groof's fellowship is supported by the Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture (Communauté française de Belgique). Julie Ducreux's salary is supported in part by the "Chaire UCB/UCL sur les rhumatismes systémiques et inflammatoires). Bernard Lauwerys' salary is supported in part by the Fonds National de la Recherche Scientifique (Communauté française de Belgique). The authors are grateful to Anne-Lise Maudoux for outstanding technical assistance.

Author details

[1]Pôle de Pathologies Rhumatismales Inflammatoires et Systémiques, Institut de Recherche Expérimentale et Clinique, Université catholique de Louvain, Avenue Hippocrate 10, B2.5390, 1200 Brussels, Belgium. [2]Centre for Experimental Medicine and Rheumatology, John Vane Science Centre, William Harvey Research Institute, St. Bartholomew's and Royal London School of Medicine London, London, UK. [3]Department of Rheumatology, Cliniques Universitaires Saint-Luc, Brussels, Belgium. [4]Service de Rhumatologie, Hôpital Erasme, Brussels, Belgium.

Received: 27 October 2015 Accepted: 4 January 2016
Published online: 20 January 2016

References

1. Pitzalis C, Kelly S, Humby F. New learnings on the pathophysiology of RA from synovial biopsies. Curr Opin Rheumatol. 2013;25:334–44.
2. Dennis Jr G, Holweg CT, Kummerfeld SK, Choy DF, Setiadi AF, Hackney JA, et al. Synovial phenotypes in rheumatoid arthritis correlate with response to biologic therapeutics. Arthritis Res Ther. 2014;16:R90.
3. Nzeusseu Toukap A, Galant C, Theate I, Maudoux AL, Lories RJ, Houssiau FA, et al. Identification of distinct gene expression profiles in the synovium of patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 2007;56:1579–88.
4. Lauwerys BR, Hernández-Lobato D, Gramme P, Ducreux J, Dessy A, Focant I, et al. Heterogeneity of synovial molecular patterns in patients with arthritis. PLoS One. 2015;10:e0122104.
5. Gutierrez-Roelens I, Galant C, Theate I, Lories RJ, Durez P, Nzeusseu-Toukap A, et al. Rituximab treatment induces the expression of genes involved in healing processes in the rheumatoid arthritis synovium. Arthritis Rheum. 2011;63:1246–54.
6. Ducreux J, Durez P, Galant C, Nzeusseu Toukap A, Van den Eynde B, Houssiau FA, et al. Global molecular effects of tocilizumab therapy in rheumatoid arthritis synovium. Arthritis Rheumatol. 2014;66:15–23.
7. Badot V, Galant C, Nzeusseu Toukap A, Theate I, Maudoux AL, Van den Eynde BJ, et al. Gene expression profiling in the synovium identifies a predictive signature of absence of response to adalimumab therapy in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther. 2009;11:R57.
8. Badot V, Durez P, Van den Eynde BJ, Nzeusseu-Toukap A, Houssiau FA, Lauwerys BR. Rheumatoid arthritis synovial fibroblasts produce a soluble form of the interleukin-7 receptor in response to pro-inflammatory cytokines. J Cell Mol Med. 2011;15:2335–42.
9. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc. 2009;4:44–57.

10. Smiljanovic B, Grün JR, Biesen R, Schulte-Wrede U, Baumgrass R, Stuhlmüller B, et al. The multifaceted balance of TNF-α and type I/II interferon responses in SLE and RA: how monocytes manage the impact of cytokines. J Mol Med (Berl). 2012;90:1295–309.
11. Cornish T, Morgan J, Gurel B, De Marzo AM. FrIDA: An open source framework for image dataset analysis. Arch Pathol Lab Med. 2008;132:856.
12. Haringman JJ, Vinkenoog M, Gerlag DM, Smeets TJ, Zwinderman AH, Tak PP. Reliability of computerized image analysis for the evaluation of serial synovial biopsies in randomized controlled trials in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther. 2005;7:R862–7.
13. Du F, Wang L, Zhang Y, Jiang W, Sheng H, Cao Q, et al. Role of GADD45 beta in the regulation of synovial fluid T cell apoptosis in rheumatoid arthritis. Clin Immunol. 2008;128:238–47.
14. Svensson CI, Inoue T, Hammaker D, Fukushima A, Papa S, Franzoso G, et al. Gadd45beta deficiency in rheumatoid arthritis: enhanced synovitis through JNK signaling. Arthritis Rheum. 2009;60:3229–40.
15. Kavanaugh A, Mease PJ, Gomez-Reino JJ, Adebajo AO, Wollenhaupt J, Gladman DD, et al. Treatment of psoriatic arthritis in a phase 3 randomised, placebo-controlled trial with apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor. Ann Rheum Dis. 2014;73:1020–6.
16. Genovese MC, Jarosova K, Cieślak D, Alper J, Kivitz A, Hough DR, et al. Apremilast in Patients With Active Rheumatoid Arthritis: A Phase II, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel-Group Study. Arthritis Rheumatol. 2015;67:1703–10.
17. Kelly S, Humby F, Filer A, Ng N, Di Cicco M, Hands RE, et al. Ultrasound-guided synovial biopsy: a safe, well-tolerated and reliable technique for obtaining high-quality synovial tissue from both large and small joints in early arthritis patients. Ann Rheum Dis. 2015;74:611–7.
18. Humby F, Kelly S, Bugatti S, Manzo A, Filer A, Mahto A, et al. Evaluation of Minimally Invasive, Ultrasound-guided Synovial Biopsy Techniques by the OMERACT Filter-determining Validation Requirements. J Rheumatol. 2016; 43(1):208–13.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

BIBLIOGRAPHIE

1. De Groof, A., et al., *Higher expression of TNFalpha-induced genes in the synovium of patients with early rheumatoid arthritis correlates with disease activity, and predicts absence of response to first line therapy.* Arthritis Res Ther, 2016. **18**: p. 19.
2. De Groof, A., et al., *Dysregulated Lymphoid Cell Populations in Mouse Models of Systemic Lupus Erythematosus.* Clin Rev Allergy Immunol, 2017.
3. Lauwerys, B.R. and E.K. Wakeland, *Genetics of lupus nephritis.* Lupus, 2005. **14**(1): p. 2-12.
4. Mahajan, A., M. Herrmann, and L.E. Munoz, *Clearance Deficiency and Cell Death Pathways: A Model for the Pathogenesis of SLE.* Front Immunol, 2016. **7**: p. 35.
5. Munoz, L.E., et al., *Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus.* Lupus, 2008. **17**(5): p. 371-5.
6. Delgado-Rizo, V., et al., *Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview.* Front Immunol, 2017. **8**: p. 81.
7. Sabbione, F., et al., *Neutrophil Extracellular Traps Stimulate Proinflammatory Responses in Human Airway Epithelial Cells.* J Innate Immun, 2017. **9**(4): p. 387-402.
8. Leffler, J., et al., *Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease.* J Immunol, 2012. **188**(7): p. 3522-31.
9. Yu, Y. and K. Su, *Neutrophil Extracellular Traps and Systemic Lupus Erythematosus.* J Clin Cell Immunol, 2013. **4**.
10. Mjelle, J.E., et al., *Nephritogenic antibodies bind in glomeruli through interaction with exposed chromatin fragments and not with renal cross-reactive antigens.* Autoimmunity, 2011. **44**(5): p. 373-83.
11. Krishnan, M.R., C. Wang, and T.N. Marion, *Anti-DNA autoantibodies initiate experimental lupus nephritis by binding directly to the glomerular basement membrane in mice.* Kidney Int, 2012. **82**(2): p. 184-92.
12. Hahn, B.H., *Antibodies to DNA.* N Engl J Med, 1998. **338**(19): p. 1359-68.
13. Audiger, C., et al., *The Importance of Dendritic Cells in Maintaining Immune Tolerance.* J Immunol, 2017. **198**(6): p. 2223-2231.

14. Blanco, P., et al., *Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus.* Science, 2001. **294**(5546): p. 1540-3.
15. Blanco, P., H. Ueno, and N. Schmitt, *T follicular helper (Tfh) cells in lupus: Activation and involvement in SLE pathogenesis.* Eur J Immunol, 2016. **46**(2): p. 281-90.
16. Dalgaard, J., et al., *Differential capability for phagocytosis of apoptotic and necrotic leukemia cells by human peripheral blood dendritic cell subsets.* J Leukoc Biol, 2005. **77**(5): p. 689-98.
17. Hubo, M., et al., *Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells.* Front Immunol, 2013. **4**: p. 82.
18. Yamane, H. and W.E. Paul, *Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets.* Immunol Rev, 2013. **252**(1): p. 12-23.
19. Crotty, S., *T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease.* Immunity, 2014. **41**(4): p. 529-42.
20. Ueno, H., J. Banchereau, and C.G. Vinuesa, *Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice.* Nat Immunol, 2015. **16**(2): p. 142-52.
21. Sawaf, M., H. Dumortier, and F. Monneaux, *Follicular Helper T Cells in Systemic Lupus Erythematosus: Why Should They Be Considered as Interesting Therapeutic Targets?* J Immunol Res, 2016. **2016**: p. 5767106.
22. Tipton, C.M., et al., *Diversity, cellular origin and autoreactivity of antibody-secreting cell population expansions in acute systemic lupus erythematosus.* Nat Immunol, 2015. **16**(7): p. 755-65.
23. Choi, J.Y., et al., *Circulating follicular helper-like T cells in systemic lupus erythematosus: association with disease activity.* Arthritis Rheumatol, 2015. **67**(4): p. 988-99.
24. Romagnani, S., *T-cell subsets (Th1 versus Th2).* Ann Allergy Asthma Immunol, 2000. **85**(1): p. 9-18; quiz 18, 21.
25. Wong, C.K., et al., *Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity.* Clin Immunol, 2008. **127**(3): p. 385-93.
26. Apostolidis, S.A., J.C. Crispin, and G.C. Tsokos, *IL-17-producing T cells in lupus nephritis.* Lupus, 2011. **20**(2): p. 120-4.

27. Xing, Q., et al., *Elevated Th17 cells are accompanied by FoxP3+ Treg cells decrease in patients with lupus nephritis.* Rheumatol Int, 2012. **32**(4): p. 949-58.
28. Rother, N. and J. van der Vlag, *Disturbed T Cell Signaling and Altered Th17 and Regulatory T Cell Subsets in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus.* Front Immunol, 2015. **6**: p. 610.
29. Humrich, J.Y., et al., *Rapid induction of clinical remission by low-dose interleukin-2 in a patient with refractory SLE.* Ann Rheum Dis, 2015. **74**(4): p. 791-2.
30. von Spee-Mayer, C., et al., *Low-dose interleukin-2 selectively corrects regulatory T cell defects in patients with systemic lupus erythematosus.* Ann Rheum Dis, 2016. **75**(7): p. 1407-15.
31. He, J., et al., *Low-dose interleukin-2 treatment selectively modulates CD4(+) T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus.* Nat Med, 2016. **22**(9): p. 991-3.
32. Pinkse, G.G., et al., *Autoreactive CD8 T cells associated with beta cell destruction in type 1 diabetes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(51): p. 18425-30.
33. Merkel, F., et al., *Autoreactive T-cells in Goodpasture's syndrome recognize the N-terminal NC1 domain on alpha 3 type IV collagen.* Kidney Int, 1996. **49**(4): p. 1127-33.
34. Blanco, P., et al., *Increase in activated CD8+ T lymphocytes expressing perforin and granzyme B correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum, 2005. **52**(1): p. 201-11.
35. Couzi, L., et al., *Predominance of CD8+ T lymphocytes among periglomerular infiltrating cells and link to the prognosis of class III and class IV lupus nephritis.* Arthritis Rheum, 2007. **56**(7): p. 2362-70.
36. McKinney, E.F., et al., *A CD8+ T cell transcription signature predicts prognosis in autoimmune disease.* Nat Med, 2010. **16**(5): p. 586-91, 1p following 591.
37. Ian R. Mackay, N.R.R., *The Autoimmune Diseases* Vol. fourth edition. 2006.
38. Dean, G.S., et al., *Characterization of CD3+ CD4- CD8- (double negative) T cells in patients with systemic lupus erythematosus: production of IL-4.* Lupus, 2002. **11**(8): p. 501-7.

39. Crispin, J.C., et al., *Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys.* J Immunol, 2008. **181**(12): p. 8761-6.
40. Hedrich, C.M., et al., *cAMP responsive element modulator (CREM) alpha mediates chromatin remodeling of CD8 during the generation of CD3+ CD4- CD8- T cells.* J Biol Chem, 2014. **289**(4): p. 2361-70.
41. Rodriguez-Rodriguez, N., et al., *Programmed cell death 1 and Helios distinguish TCR-alphabeta+ double-negative (CD4-CD8-) T cells that derive from self-reactive CD8 T cells.* J Immunol, 2015. **194**(9): p. 4207-14.
42. Yurasov, S., et al., *Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus.* J Exp Med, 2005. **201**(5): p. 703-11.
43. Kumar, K.R., et al., *Regulation of B cell tolerance by the lupus susceptibility gene Ly108.* Science, 2006. **312**(5780): p. 1665-9.
44. Liu, Y., et al., *Lupus susceptibility genes may breach tolerance to DNA by impairing receptor editing of nuclear antigen-reactive B cells.* J Immunol, 2007. **179**(2): p. 1340-52.
45. Menard, L., et al., *The PTPN22 allele encoding an R620W variant interferes with the removal of developing autoreactive B cells in humans.* J Clin Invest, 2011. **121**(9): p. 3635-44.
46. Kirthi Raman Kumar, C.M., *B-cell tolerance checkpoint violations in systemic lupus erythematosus.* Future Rheumatol., 2007. **2**(4): p. 415-422.
47. Tobon, G.J., J.H. Izquierdo, and C.A. Canas, *B lymphocytes: development, tolerance, and their role in autoimmunity-focus on systemic lupus erythematosus.* Autoimmune Dis, 2013. **2013**: p. 827254.
48. Claes, N., et al., *B Cells Are Multifunctional Players in Multiple Sclerosis Pathogenesis: Insights from Therapeutic Interventions.* Front Immunol, 2015. **6**: p. 642.
49. Mathian, A., L. Arnaud, and Z. Amoura, *[Physiopathology of systemic lupus erythematosus: a 2014 update].* Rev Med Interne, 2014. **35**(8): p. 503-11.
50. Shlomchik, M.J., J.E. Craft, and M.J. Mamula, *From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease.* Nat Rev Immunol, 2001. **1**(2): p. 147-53.

51. Mackay, M., et al., *Selective dysregulation of the FcgammaIIB receptor on memory B cells in SLE.* J Exp Med, 2006. **203**(9): p. 2157-64.
52. Wong, A.L.A., et al., *Do STAT3 inhibitors have potential in the future for cancer therapy?* Expert Opin Investig Drugs, 2017. **26**(8): p. 883-887.
53. Narain, S. and R. Furie, *Update on clinical trials in systemic lupus erythematosus.* Curr Opin Rheumatol, 2016. **28**(5): p. 477-87.
54. Kyttaris, V.C., *Novel Treatments in Lupus.* Curr Rheumatol Rep, 2017. **19**(3): p. 10.
55. Preble, O.T., et al., *Systemic lupus erythematosus: presence in human serum of an unusual acid-labile leukocyte interferon.* Science, 1982. **216**(4544): p. 429-31.
56. Baechler, E.C., et al., *Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2610-5.
57. Bennett, L., et al., *Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood.* J Exp Med, 2003. **197**(6): p. 711-23.
58. Fitzgerald-Bocarsly, P., J. Dai, and S. Singh, *Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history.* Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(1): p. 3-19.
59. de Veer, M.J., et al., *Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays.* J Leukoc Biol, 2001. **69**(6): p. 912-20.
60. Teruel, M. and M.E. Alarcon-Riquelme, *The genetic basis of systemic lupus erythematosus: What are the risk factors and what have we learned.* J Autoimmun, 2016. **74**: p. 161-175.
61. Gutierrez-Roelens, I. and B.R. Lauwerys, *Genetic susceptibility to autoimmune disorders: clues from gene association and gene expression studies.* Curr Mol Med, 2008. **8**(6): p. 551-61.
62. Lauwerys, B.R., J. Ducreux, and F.A. Houssiau, *Type I interferon blockade in systemic lupus erythematosus: where do we stand?* Rheumatology (Oxford), 2014. **53**(8): p. 1369-76.
63. Oon, S., N.J. Wilson, and I. Wicks, *Targeted therapeutics in SLE: emerging strategies to modulate the interferon pathway.* Clin Transl Immunology, 2016. **5**(5): p. e79.
64. Ducreux, J., et al., *Interferon alpha kinoid induces neutralizing anti-interferon alpha antibodies that decrease the expression of*

interferon-induced and B cell activation associated transcripts: analysis of extended follow-up data from the interferon alpha kinoid phase I/II study. Rheumatology (Oxford), 2016. **55**(10): p. 1901-5.

65. Linker-Israeli, M., et al., *Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis.* J Immunol, 1991. **147**(1): p. 117-23.
66. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells.* Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
67. Herrera-Esparza, R., et al., *Renal expression of IL-6 and TNFalpha genes in lupus nephritis.* Lupus, 1998. **7**(3): p. 154-8.
68. Iwano, M., et al., *Urinary levels of IL-6 in patients with active lupus nephritis.* Clin Nephrol, 1993. **40**(1): p. 16-21.
69. Nurnberg, W., et al., *Interleukin-6 expression in the skin of patients with lupus erythematosus.* Exp Dermatol, 1995. **4**(1): p. 52-7.
70. Illei, G.G., et al., *Tocilizumab in systemic lupus erythematosus: data on safety, preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells from an open-label phase I dosage-escalation study.* Arthritis Rheum, 2010. **62**(2): p. 542-52.
71. Cheema, G.S., et al., *Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases.* Arthritis Rheum, 2001. **44**(6): p. 1313-9.
72. Cancro, M.P., D.P. D'Cruz, and M.A. Khamashta, *The role of B lymphocyte stimulator (BLyS) in systemic lupus erythematosus.* J Clin Invest, 2009. **119**(5): p. 1066-73.
73. Yap, D.Y. and K.N. Lai, *The role of cytokines in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus - from bench to bedside.* Nephrology (Carlton), 2013. **18**(4): p. 243-55.
74. Wasilewska, A., et al., *Interleukin-17 inhibitors. A new era in treatment of psoriasis and other skin diseases.* Postepy Dermatol Alergol, 2016. **33**(4): p. 247-52.
75. Horiuchi, T., et al., *Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents.* Rheumatology (Oxford), 2010. **49**(7): p. 1215-28.
76. Zhu, L.J., X. Yang, and X.Q. Yu, *Anti-TNF-alpha therapies in systemic lupus erythematosus.* J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 465898.

77. Studnicka-Benke, A., et al., *Tumour necrosis factor alpha and its soluble receptors parallel clinical disease and autoimmune activity in systemic lupus erythematosus.* Br J Rheumatol, 1996. **35**(11): p. 1067-74.
78. Neale, T.J., et al., *Tumor necrosis factor-alpha is expressed by glomerular visceral epithelial cells in human membranous nephropathy.* Am J Pathol, 1995. **146**(6): p. 1444-54.
79. Mudduluru, B.M., et al., *TNF-alpha antagonist induced lupus on three different agents.* Postgrad Med, 2017. **129**(2): p. 304-306.
80. Aringer, M. and J.S. Smolen, *Therapeutic blockade of TNF in patients with SLE-promising or crazy?* Autoimmun Rev, 2012. **11**(5): p. 321-5.
81. Moser, K.L., et al., *Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus.* Genes Immun, 2009. **10**(5): p. 373-9.
82. Ramos, P.S., et al., *Genetic factors predisposing to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis.* Semin Nephrol, 2010. **30**(2): p. 164-76.
83. Belot, A. and R. Cimaz, *Monogenic forms of systemic lupus erythematosus: new insights into SLE pathogenesis.* Pediatr Rheumatol Online J, 2012. **10**(1): p. 21.
84. Crow, Y.J. and N. Manel, *Aicardi-Goutieres syndrome and the type I interferonopathies.* Nat Rev Immunol, 2015. **15**(7): p. 429-40.
85. Rodero, M.P. and Y.J. Crow, *Type I interferon-mediated monogenic autoinflammation: The type I interferonopathies, a conceptual overview.* J Exp Med, 2016. **213**(12): p. 2527-2538.
86. Bandyopadhyay, S., et al., *Identification of biomarkers of response to abatacept in patients with SLE using deconvolution of whole blood transcriptomic data from a phase IIb clinical trial.* Lupus Sci Med, 2017. **4**(1): p. e000206.
87. Perry, D., et al., *Murine models of systemic lupus erythematosus.* J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 271694.
88. Morel, L., et al., *Polygenic control of susceptibility to murine systemic lupus erythematosus.* Immunity, 1994. **1**(3): p. 219-29.
89. Morel, L., et al., *Epistatic modifiers of autoimmunity in a murine model of lupus nephritis.* Immunity, 1999. **11**(2): p. 131-9.
90. Howie, D., et al., *Cutting edge: the SLAM family receptor Ly108 controls T cell and neutrophil functions.* J Immunol, 2005. **174**(10): p. 5931-5.

91. Potula, H.H., et al., *Cyclin-dependent kinase inhibitor Cdkn2c deficiency promotes B1a cell expansion and autoimmunity in a mouse model of lupus.* J Immunol, 2012. **189**(6): p. 2931-40.
92. Morel, L., et al., *Genetic reconstitution of systemic lupus erythematosus immunopathology with polycongenic murine strains.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6670-5.
93. Celhar, T. and A.M. Fairhurst, *Modelling clinical systemic lupus erythematosus: similarities, differences and success stories.* Rheumatology (Oxford), 2017. **56**(suppl_1): p. i88-i99.
94. Zhu, J., et al., *T cell hyperactivity in lupus as a consequence of hyperstimulatory antigen-presenting cells.* J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1869-78.
95. Vidal, S., D.H. Kono, and A.N. Theofilopoulos, *Loci predisposing to autoimmunity in MRL-Fas lpr and C57BL/6-Faslpr mice.* J Clin Invest, 1998. **101**(3): p. 696-702.
96. Ichii, O., et al., *Autoimmune glomerulonephritis induced in congenic mouse strain carrying telomeric region of chromosome 1 derived from MRL/MpJ.* Histol Histopathol, 2008. **23**(4): p. 411-22.
97. Santiago-Raber, M.L., et al., *Characterization of reciprocal Lmb1-4 interval MRL-Faslpr and C57BL/6-Faslpr congenic mice reveals significant effects from Lmb3.* J Immunol, 2007. **178**(12): p. 8195-202.
98. Kong, P.L., et al., *The centromeric region of chromosome 7 from MRL mice (Lmb3) is an epistatic modifier of Fas for autoimmune disease expression.* J Immunol, 2004. **172**(5): p. 2785-94.
99. Yamada, A., et al., *Genetic basis of tissue specificity of vasculitis in MRL/lpr mice.* Arthritis Rheum, 2003. **48**(5): p. 1445-51.
100. Kamogawa, J., et al., *Arthritis in MRL/lpr mice is under the control of multiple gene loci with an allelic combination derived from the original inbred strains.* Arthritis Rheum, 2002. **46**(4): p. 1067-74.
101. Hogarth, M.B., et al., *Multiple lupus susceptibility loci map to chromosome 1 in BXSB mice.* J Immunol, 1998. **161**(6): p. 2753-61.
102. Haywood, M.E., et al., *Identification of intervals on chromosomes 1, 3, and 13 linked to the development of lupus in BXSB mice.* Arthritis Rheum, 2000. **43**(2): p. 349-55.

103. Sriram, U., et al., *Myeloid dendritic cells from B6.NZM Sle1/Sle2/Sle3 lupus-prone mice express an IFN signature that precedes disease onset.* J Immunol, 2012. **189**(1): p. 80-91.
104. Garcia, M.A., et al., *Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action.* Microbiol Mol Biol Rev, 2006. **70**(4): p. 1032-60.
105. Rende-Fournier, R., et al., *Interaction of the human protein kinase PKR with the mouse PKR homolog occurs via the N-terminal region of PKR and does not inactivate autophosphorylation activity of mouse PKR.* Virology, 1997. **238**(2): p. 410-23.
106. Romano, P.R., et al., *Autophosphorylation in the activation loop is required for full kinase activity in vivo of human and yeast eukaryotic initiation factor 2alpha kinases PKR and GCN2.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(4): p. 2282-97.
107. Nussbaum, J.M., S. Gunnery, and M.B. Mathews, *The 3'-untranslated regions of cytoskeletal muscle mRNAs inhibit translation by activating the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR.* Nucleic Acids Res, 2002. **30**(5): p. 1205-12.
108. Davis, S. and J.C. Watson, *In vitro activation of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by RNA from the 3' untranslated regions of human alpha-tropomyosin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(1): p. 508-13.
109. Youssef, O.A., et al., *Potential role for snoRNAs in PKR activation during metabolic stress.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(16): p. 5023-8.
110. Mayo, C.B., et al., *Activation of PKR by short stem-loop RNAs containing single-stranded arms.* RNA, 2016. **22**(7): p. 1065-75.
111. Ben-Asouli, Y., et al., *Human interferon-gamma mRNA autoregulates its translation through a pseudoknot that activates the interferon-inducible protein kinase PKR.* Cell, 2002. **108**(2): p. 221-32.
112. Cohen-Chalamish, S., et al., *Dynamic refolding of IFN-gamma mRNA enables it to function as PKR activator and translation template.* Nat Chem Biol, 2009. **5**(12): p. 896-903.
113. Osman, F., et al., *A cis-acting element in the 3'-untranslated region of human TNF-alpha mRNA renders splicing dependent on the activation of protein kinase PKR.* Genes Dev, 1999. **13**(24): p. 3280-93.

114. Patel, R.C. and G.C. Sen, *PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR.* EMBO J, 1998. **17**(15): p. 4379-90.
115. Ito, T., M. Yang, and W.S. May, *RAX, a cellular activator for double-stranded RNA-dependent protein kinase during stress signaling.* J Biol Chem, 1999. **274**(22): p. 15427-32.
116. Peters, G.A., et al., *Modular structure of PACT: distinct domains for binding and activating PKR.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(6): p. 1908-20.
117. Huang, X., B. Hutchins, and R.C. Patel, *The C-terminal, third conserved motif of the protein activator PACT plays an essential role in the activation of double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR).* Biochem J, 2002. **366**(Pt 1): p. 175-86.
118. Bennett, R.L., et al., *RAX, the PKR activator, sensitizes cells to inflammatory cytokines, serum withdrawal, chemotherapy, and viral infection.* Blood, 2006. **108**(3): p. 821-9.
119. Lemaire, P.A., J. Lary, and J.L. Cole, *Mechanism of PKR activation: dimerization and kinase activation in the absence of double-stranded RNA.* J Mol Biol, 2005. **345**(1): p. 81-90.
120. Samuel, C.E., *The eIF-2 alpha protein kinases, regulators of translation in eukaryotes from yeasts to humans.* J Biol Chem, 1993. **268**(11): p. 7603-6.
121. Wek, R.C., H.Y. Jiang, and T.G. Anthony, *Coping with stress: eIF2 kinases and translational control.* Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 1): p. 7-11.
122. Manche, L., et al., *Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI.* Mol Cell Biol, 1992. **12**(11): p. 5238-48.
123. Lemaire, P.A., et al., *Mechanism of PKR Activation by dsRNA.* J Mol Biol, 2008. **381**(2): p. 351-60.
124. Husain, B., I. Mukerji, and J.L. Cole, *Analysis of high-affinity binding of protein kinase R to double-stranded RNA.* Biochemistry, 2012. **51**(44): p. 8764-70.
125. Pfaller, C.K., et al., *Protein kinase PKR and RNA adenosine deaminase ADAR1: new roles for old players as modulators of the interferon response.* Curr Opin Immunol, 2011. **23**(5): p. 573-82.
126. Gil, J., J. Alcami, and M. Esteban, *Activation of NF-kappa B by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR involves the I kappa B kinase complex.* Oncogene, 2000. **19**(11): p. 1369-78.

127. Garcia, M.A., E.F. Meurs, and M. Esteban, *The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control.* Biochimie, 2007. **89**(6-7): p. 799-811.
128. May, V.L.e.P., *Activation and post-translational modifications ofp53 following DNA damage.* Med Sci (Paris), 2002. **18**(5): p. 577–584.
129. Cuddihy, A.R., et al., *The double-stranded RNA activated protein kinase PKR physically associates with the tumor suppressor p53 protein and phosphorylates human p53 on serine 392 in vitro.* Oncogene, 1999. **18**(17): p. 2690-702.
130. Cuddihy, A.R., et al., *Double-stranded-RNA-activated protein kinase PKR enhances transcriptional activation by tumor suppressor p53.* Mol Cell Biol, 1999. **19**(4): p. 2475-84.
131. Koromilas, A.E., et al., *The interferon-inducible protein kinase PKR modulates the transcriptional activation of immunoglobulin kappa gene.* J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25426-34.
132. Thakur, S.A., et al., *Protein kinase R is a novel mediator of CD40 signaling and plays a critical role in modulating immunoglobulin expression during respiratory syncytial virus infection.* Clin Vaccine Immunol, 2011. **18**(12): p. 2060-6.
133. Lu, B., et al., *Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release.* Nature, 2012. **488**(7413): p. 670-4.
134. Kang, R. and D. Tang, *PKR-dependent inflammatory signals.* Sci Signal, 2012. **5**(247): p. pe47.
135. Yoshida, K., et al., *PKR induces the expression of NLRP3 by regulating the NF-kappaB pathway in Porphyromonas gingivalis-infected osteoblasts.* Exp Cell Res, 2017. **354**(1): p. 57-64.
136. Lamkanfi, M., L. Vande Walle, and T.D. Kanneganti, *Deregulated inflammasome signaling in disease.* Immunol Rev, 2011. **243**(1): p. 163-73.
137. Lee, S.B. and M. Esteban, *The interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase induces apoptosis.* Virology, 1994. **199**(2): p. 491-6.
138. Gil, J. and M. Esteban, *Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action.* Apoptosis, 2000. **5**(2): p. 107-14.
139. Gil, J. and M. Esteban, *The interferon-induced protein kinase (PKR), triggers apoptosis through FADD-mediated activation of*

caspase 8 in a manner independent of Fas and TNF-alpha receptors. Oncogene, 2000. **19**(32): p. 3665-74.
140. Reikine, S., J.B. Nguyen, and Y. Modis, *Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5.* Front Immunol, 2014. **5**: p. 342.
141. Samuel, C.E., *ADARs: viruses and innate immunity.* Curr Top Microbiol Immunol, 2012. **353**: p. 163-95.
142. George, C.X., et al., *Editing of Cellular Self-RNAs by Adenosine Deaminase ADAR1 Suppresses Innate Immune Stress Responses.* J Biol Chem, 2016. **291**(12): p. 6158-68.
143. Liddicoat, B.J., et al., *RNA editing by ADAR1 prevents MDA5 sensing of endogenous dsRNA as nonself.* Science, 2015. **349**(6252): p. 1115-20.
144. Goldberg Lior, A.-A.M., Paret Gideon, and Nevo-Caspi Yael, *Alternative Splicing of STAT3 Is Affected by RNA Editing* DNA and Cell Biology, 2017. **36**(5): p. 367-376.
145. Gelinas, J.F., et al., *Enhancement of replication of RNA viruses by ADAR1 via RNA editing and inhibition of RNA-activated protein kinase.* J Virol, 2011. **85**(17): p. 8460-6.
146. Iizasa, H., et al., *Editing of Epstein-Barr virus-encoded BART6 microRNAs controls their dicer targeting and consequently affects viral latency.* J Biol Chem, 2010. **285**(43): p. 33358-70.
147. Rice, G.I., et al., *Mutations in ADAR1 cause Aicardi-Goutieres syndrome associated with a type I interferon signature.* Nat Genet, 2012. **44**(11): p. 1243-8.
148. Laxminarayana, D., I.U. Khan, and G. Kammer, *Transcript mutations of the alpha regulatory subunit of protein kinase A and up-regulation of the RNA-editing gene transcript in lupus T lymphocytes.* Lancet, 2002. **360**(9336): p. 842-9.
149. Wang, W.J., S.J. Yin, and R.Q. Rong, *PKR and HMGB1 expression and function in rheumatoid arthritis.* Genet Mol Res, 2015. **14**(4): p. 17864-70.
150. Ittah, M., et al., *B-cell-activating factor expressions in salivary epithelial cells after dsRNA virus infection depends on RNA-activated protein kinase activation.* Eur J Immunol, 2009. **39**(5): p. 1271-9.
151. Grolleau, A., et al., *Impaired translational response and increased protein kinase PKR expression in T cells from lupus patients.* J Clin Invest, 2000. **106**(12): p. 1561-8.

152. Rai, R., et al., *RNA-seq Analysis Reveals Unique Transcriptome Signatures in Systemic Lupus Erythematosus Patients with Distinct Autoantibody Specificities.* PLoS One, 2016. **11**(11): p. e0166312.
153. Toro-Dominguez, D., P. Carmona-Saez, and M.E. Alarcon-Riquelme, *Shared signatures between rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome uncovered through gene expression meta-analysis.* Arthritis Res Ther, 2014. **16**(6): p. 489.
154. Yang, Y.L., et al., *Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase.* EMBO J, 1995. **14**(24): p. 6095-106.
155. Abraham, N., et al., *Characterization of transgenic mice with targeted disruption of the catalytic domain of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR.* J Biol Chem, 1999. **274**(9): p. 5953-62.
156. Samuel, C.E., *Antiviral actions of interferons.* Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(4): p. 778-809, table of contents.
157. Ran, F.A., et al., *Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system.* Nat Protoc, 2013. **8**(11): p. 2281-2308.
158. Weening, J.J., et al., *The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited.* J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(2): p. 241-50.
159. Boddu, P., et al., *SLE and Non-Hodgkin's Lymphoma: A Case Series and Review of the Literature.* Case Rep Rheumatol, 2017. **2017**: p. 1658473.
160. Espeli, M., et al., *Local renal autoantibody production in lupus nephritis.* J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(2): p. 296-305.
161. Liu, Z., Y. Zou, and A. Davidson, *Plasma cells in systemic lupus erythematosus: the long and short of it all.* Eur J Immunol, 2011. **41**(3): p. 588-91.
162. Chang, A., et al., *In situ B cell-mediated immune responses and tubulointerstitial inflammation in human lupus nephritis.* J Immunol, 2011. **186**(3): p. 1849-60.
163. Dorner, T., C. Giesecke, and P.E. Lipsky, *Mechanisms of B cell autoimmunity in SLE.* Arthritis Res Ther, 2011. **13**(5): p. 243.
164. Nashi, E., Y. Wang, and B. Diamond, *The role of B cells in lupus pathogenesis.* Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(4): p. 543-50.

165. Mathian, A., et al., *IFN-alpha induces early lethal lupus in preautoimmune (New Zealand Black x New Zealand White) F1 but not in BALB/c mice.* J Immunol, 2005. **174**(5): p. 2499-506.