

THESE de l'Université des Antilles

Discipline : Biologie et Santé

Spécialité : Immunologie

Réalisée au service de virologie du CHU de Martinique

Equipe d'Accueil 4537 Université des Antilles

Sous la responsabilité du Pr DUEYMES Maryvonne
et du Dr DOS SANTOS Georges

**Polymorphismes des récepteurs des Fc des
Immunoglobulines G et maladies autoimmunes en
Martinique**

-

**Impact du FcγRIIb sur la régulation du
Lymphocyte B**

Soutenue publiquement le 29 novembre 2016 par

Fatima-Ezzahra RADOUANI

Devant le jury suivant

LEMOINE François	PU/PH Université de Paris VI	Rapporteur
JAMIN Christophe	MCU/PH Université de Bretagne occidentale	Rapporteur
CESAIRE Raymond	PU/PH Université des Antilles	Président du jury
DOS SANTOS Georges	Docteur ès Science	Invité
DUEYMES Maryvonne	PU/PH Université des Antilles	Directrice

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury, et tout particulièrement le Pr François LEMOINE pour avoir accepté de faire partie de mon jury, vous avez tant donné pour la Martinique et vous continuez à le faire.

Je remercie aussi le Dr Christophe JAMIN, tout votre savoir relaté par Maryvonne m'impressionne, Merci d'avoir fait le déplacement spécifiquement pour cette occasion.

Je tiens à remercier le Pr Raymond CESAIRE, de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et son équipe d'accueil. Je vous remercie grandement d'avoir toujours cru en moi et de votre soutien en toute discrétion, je vous en remercie.

Je remercie grandement le Dr Christophe DELIGNY pour son implication dans ce projet et dans le recrutement des patients. Merci pour votre disponibilité et votre sympathie.

J'exprime ma reconnaissance à ma directrice de thèse, le Pr Maryvonne DUEYMES de m'avoir soutenu dans la réalisation de ce projet. En plus de ton savoir, tu as toujours su trouver les mots justes pour m'encourager quand rien n'allait. Merci pour ta sympathie, ta disponibilité et tes petits macarons qui nous manquent tant depuis ton départ en Guyane.

J'adresse ma reconnaissance à mon directeur de thèse, le Dr Georges DOS SANTOS, de m'avoir aidé tout le long de cette thèse, et de m'avoir transmis un peu de ton savoir en biologie moléculaire. Merci pour ce que tu as fait pour moi tant sur le plan professionnel que personnel, on ne sait plus si mon fils s'appelle Amjad ou Hellio.

Je remercie aussi le Dr Katlyne POLOMAT et le Dr Florence MOINET pour leur participation au recrutement des patients et des témoins.

Un grand merci au Pr Philippe Cabre qui a aussi participé au recrutement des patients et qui a mis à notre disposition sa collection Carnomad.

Je remercie également le Dr Fabienne DANTIN pour son aide précieuse en cytométrie. Merci pour ta disponibilité, tes longues explications et ta gentillesse. Je remercie aussi Sylviane qui m'a toujours trouvé un moment pour passer mes tubes.

Je remercie les techniciennes du laboratoire HLA, Patricia, Clairette, Colette et Annie de m'avoir toujours soutenue et d'avoir mis à ma disposition toute une paillasse en plus du matériel pour pouvoir travailler. Merci aussi pour les bons moments passés en votre compagnie.

Je n'oublie pas les techniciennes de Biologie Moléculaire, merci pour votre sympathie et pour votre aide.

L'équipe du CERBIM, merci de m'avoir permis de travailler dans vos locaux et d'utiliser votre matériel.

Je remercie également le Dr Agnés LEZIN pour son conseil et son soutien. Merci aussi pour les petits bonbons et les biscuits.

Je remercie mes amies Laure et Hélène, vous m'avez soutenue et vous avez su être une épaule sur lequel je suis venu pleurer à chaque fois que rien n'allait, Merci pour votre participation intellectuelle à ce travail. Laure merci pour tes petits mots en arabe qui m'ont permis de garder un lien avec mes origines. Hélène merci pour ton humour et ta joie de vivre, le cyclone Matthew m'a permis de t'arracher haut la main la première place du podium de la black cat attitude.

Gilda et Régine, mes habilleuses personnelles, merci pour vos encouragements, c'est un plaisir de vous connaître et de travailler avec vous. Merci de m'avoir aidé à choisir ma robe et de m'avoir accompagné dans l'organisation de la soutenance.

Je remercie l'équipe de la DRCI, en particulier Mme CRASPAG, Mme MARNY-VROUST et M. CONTARET qui ont géré la partie réglementaire et financière de ce projet. Merci aussi aux infirmières Valérie et Catherine.

Un grand merci aux patients sans qui ce projet n'aurait jamais vu le jour, ainsi qu'aux volontaires qui se reconnaîtront. Merci de n'avoir jamais dit non face à l'aiguille, même après plusieurs sollicitations, je vous suis grandement reconnaissante.

Je remercie aussi l'association lupus-Antilles Guyane qui m'ont donné un vrai coup de pouce pour l'initiation de ce projet.

Merci à Jimmy pour sa gentillesse et tout son temps passé à faire les bons de commande relatifs à ce projet.

Puis Merci à tous ceux et celles qui travaillent aux laboratoires de virologie et d'immunologie : les biologistes, les ingénieurs, les techniciennes, les secrétaires, je vous remercie un à un. Je suis vraiment ravie d'avoir fait autant de rencontres très enrichissantes.

Fadila, merci pour ton soutien et ton aide. Plus besoin de google translate pour les corrections.

Enfin, le dernier mot est pour ma famille : merci à mamie, tu as été un moteur qui me pousse vers l'avant même depuis le Maroc. Merci à ma maman, à mon frère pour leurs soutiens permanents et un grand merci à ma belle mère d'avoir gardé mon fils. Richard, merci pour ton soutien et ton amour.

Résumé : Les récepteurs du Fc des Immunoglobulines G (FcγR) sont impliqués dans de nombreuses réactions immunitaires. Deux groupes de faible affinité existent : les FcγRIIa/b/c et les FcγRIIIa/b, FcγRIIb étant le seul inhibiteur. Plusieurs polymorphismes, modifiant l'affinité au ligand et la réponse du récepteur, sont favorisés par une pression de sélection infectieuse et associés aux Maladies Auto-Immunes (MAI). Nous avons étudié l'association des polymorphismes FcγRIIa-R131H, FcγRIIb-I232T, FcγRIIIa-F158V, FcγRIIIb-Na1/Na2 aux Lupus érythémateux systémique (LES), la neuromyéélite optique (NMO) et la sclérose en plaque (SEP) en Martinique. Nos résultats montrent une forte fréquence des allèles T232, V158 et des génotypes 232TT et 158VV dans la population générale, une augmentation de la fréquence de l'homozygote Na1, des allèles Na1 et 158F dans le LES, une augmentation du génotype 131RR ainsi que des allèles 131R et 158V dans le LES avec atteinte rénale, une augmentation du génotype 131RR et une diminution du NA2/NA2 dans la SEP ainsi qu'une augmentation de l'allèle 232T dans les NMO. L'étude de l'influence du FcγRIIb-I232T sur l'activation du récepteur à l'antigène des lymphocytes B (BCR) chez des lupiques et des témoins sains porteurs des formes IT, TT ou II montre que la régulation du BCR est effective même en présence de la forme TT. Ces résultats démontrent pour la première fois que la population martiniquaise possède un terrain génétique particulier qui faciliterait l'apparition de MAI avec pronostic plus sévère.

Mot clés : Autoimmunité, FcγRs, Lymphocyte B, Lupus, neuromyéélite optique.

Abstract: Receptors of Fc of Immunoglobulin G (FcγR) are involved in many immune responses. Two low affinity groups exist: FcγRIIa/b/c, and FcγRIIIa/b, FcγRIIb is the only inhibitor. Several polymorphisms, altering the affinity ligand and receptor response, are selected by an infectious pressure and associated with autoimmune diseases (AID). We studied the association of polymorphisms FcγRIIa-R131H, FcγRIIb-I232T, FcγRIIIa-F158V, FcγRIIIb-Na1/Na2 to systemic lupus erythematosus (SLE), neuromyelitis optica (NMO) and multiple sclerosis (MS) in Martinique. Our results show a high frequency of alleles T232, V158 and 232TT and 158VV genotypes in Martinican, an increase in the frequency of the homozygous Na1, Na1 and 158F alleles in SLE, an increase of 131RR genotype, the 131R and 158V alleles in SLE with kidney disease, an increase of 131RR genotype and a decrease of NA2 / NA2 in MS but an increase in the 232T allele in NMO. Study of the influence of FcγRIIb-I232T on the activation of the B cells receptor (BCR) in lupus and healthy controls exhibiting IT, TT or II forms, shows that the regulation of BCR is effective even in the presence TT form. These results show for the first time Martinican population has a particular genetic background which would facilitate the appearance of MAI particularly serious

Key Words: Autoimmunity, FcγRs, B cell, Lupus, Neuromyelitis optica.

SOMMAIRE

TABLE DES FIGURES	12
TABLE DES TABLEAUX	15
LISTE DES ABREVIATIONS	17
INTRODUCTION	21
I Pathologies auto-immunes	23
1 Le lupus érythémateux systémique (LES)	23
1.1 Epidémiologie	23
1.2 La clinique	26
1.3 Physiopathologie du lupus	30
1.4 Les facteurs génétiques du LES	36
1.5 Facteurs épigénétiques	42
1.6 Facteurs environnementaux:	43
2 Neuro-myélite optique	45
2.1 Clinique	45
2.2 Epidémiologie	46
2.3 Diagnostic de la NMO	47
2.4 Immunopathologie de la NMO	49
II Le lymphocyte B	52
1 Ontogenèse des Lymphocytes B	52
2 Le développement périphérique des LB	53
2.1 Les LB transitionnels	53
2.2 Les LB folliculaires	54
2.3 Les LB de la zone Marginale	56
2.4 Les LB1	57
3 Fonctions du LB	58
3.1 La Sécrétion d'Ac	58

3.2	Présentation d'Ag	58
3.3	Production des cytokines et polarisation de la réponse immunitaire	58
3.4	Les LB régulateurs (LBreg)	59
4	Les voies de signalisation du BCR	59
4.1	Corécepteurs activateurs et inhibiteurs	63
5	Rôle du LB dans le lupus érythémateux	65
III	Les récepteurs pour le Fragment Fc des Ig	67
1	Les récepteurs pour les Ig autres que les IgG	68
1.1	Les récepteurs pour le Fc des IgM	68
1.2	Les récepteurs pour le Fc des IgA	68
1.3	Les récepteurs pour le Fc des IgE	69
1.4	Le récepteur néonatal (FcRn)	69
2	Les récepteurs pour le Fc des IgG ou Fc γ R	70
2.1	Localisations génétiques et expression cellulaire	72
2.2	Affinité pour les IgG :	76
3	Fonctions des différents récepteurs Fc γ Rs	78
3.1	Fonctions activatrices	79
3.2	Fonctions inhibitrices	81
4	Les polymorphismes des récepteurs Fc γ Rs	84
4.1	Le gène FCGR2A	84
4.2	Le gène FCGR3A	85
4.3	Le gène FCGR3B	85
4.4	Le gène FCGR2B	86
IV	CD72	87
1	Localisation génétique et expression protéique	87
2	Régulation du Lymphocyte B par le CD72	88
2.1	Régulation de la prolifération et de la différenciation du LB	88

2.2	Régulation de la survie	88
2.3	CD72 et tolérance	88
3	CD72 et BCR	88
	OBJECTIFS	89
	RESULTATS	92
I	Etude de la variabilité dans le locus FCGR chez les afro-caribéens(Martinique)	93
1	Introduction	93
2	Patients et méthodes	94
2.1	Groupes d'étude	94
2.2	Extraction de l'ADN	94
2.3	Amplification du promoteur du Gene FCGR2B par « LongRange » PCR	94
2.4	Amplification des gènes FCGR2A, FCGR2B, FCGR3A, et FCGR3B	95
2.5	Séquençage	96
2.6	Analyses statistiques	98
3	Résultats	98
3.1	Le gène FCGR2A	98
3.2	Le gène FCGR2B	100
3.3	Le gène FCGR3A	103
3.4	Le gène FCGR3B	105
4	Discussion	106
II	FCGR et Lupus	109
1	Introduction	109
2	Patients et méthodes	110
2.1	Groupes d'étude	110
2.2	Amplification	110
2.3	Analyse de microsatellite	110
2.4	Analyses statistiques	110

3	Résultats	112
3.1	Patients et témoins	112
3.2	Polymorphisme du promoteur du FCGR2B	112
3.3	FCGR et association au lupus	113
3.4	FCGR2A est associé aux atteintes rénales dans le LES	115
3.5	Le déséquilibre de liaison	117
3.6	Association de l'haplotype FcγRIIa-131R FcγRIIIa-158V à l'atteinte rénale	118
3.7	CD72	119
3.8	L'haplotype 2 ne joue pas de rôle protecteur contre l'effet de 232T	120
4	Discussion	122
III	Maladie auto-immunes démyélinisantes et FCGR	126
1	Introduction	126
2	Patients et méthodes	127
2.1	Groupes d'étude	127
2.2	Amplification, séquençage et microsatellite	127
2.3	Détection d'anticorps anti Aquaporine-4	127
3	Résultats	129
3.1	Patients et témoins	129
3.2	FcγRIIb-232T est associé au NMO mais n'est pas associé à la SEP	129
3.3	Déséquilibre de liaison	132
3.4	Haplotypes de CD72	135
4	Discussion	137
IV	Etudes de l'expression des co-récepteurs du BCR dans les différentes sous populations de lymphocytes B chez les patients LES et de l'impact du polymorphisme I232T sur ces populations B	139
1	Introduction	139
2	Patients et méthodes	140

2.1	Isolement des lymphocytes B du sang périphérique	140
2.2	Stimulation des LB	140
2.3	Cytométrie en flux	141
2.4	Western-blot	142
2.5	Analyses statistiques	142
3	Résultats	143
3.1	Anomalie dans la distribution des sous-populations des LB	143
3.2	Expression du FcγRIIb	146
3.3	Expression du CD72	147
3.4	Influence du polymorphisme I232T sur l'expression du FcγRIIb.	149
3.5	CD19	150
3.6	Stimulation des LB et FcγRIIb	151
4	Discussion	156
4.1	Répartition des sous-populations du LB	157
4.2	FcγRIIb	158
4.3	CD72	159
4.4	Stimulation	159
	DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION	161
	BIBLIOGRAPHIE	166
	ANNEXES	189
	Article 1: Polymorphisms at the FCGR locus in the population of black ancestry in Martinique, a Windward Island of the Caribbean	190
	Article 2: Association of FCGR with lupus in Martinican	208
	Article 3: Human FcγR in Martinican with Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica	231

TABLE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Incidence du LES : ratios pour 100 000 habitants (Arnaud et al. 2014).....</i>	<i>25</i>
<i>Figure 2 : Prévalence du LES en France : ratios pour 100 000 habitants (Arnaud et al. 2014).....</i>	<i>25</i>
<i>Figure 3:Rôle du complexe immunitaire dans l'initiation des lésions tissulaires dans le LES (Mathian et al. 2014).....</i>	<i>31</i>
<i>Figure 4 : Modèle de pathogenèse de LES (Mahajan et al. 2016).</i>	<i>33</i>
<i>Figure 5 :Rôle central des cellules dendritiques dans la physiopathologie du LES (Contin-Bordes et al. 2009). ...</i>	<i>35</i>
<i>Figure 6 : Mutations impliquées dans la défaillance du système immunitaire dans le LES (Guerra et al. 2012). .</i>	<i>41</i>
<i>Figure 7 : Physiopathologie du lupus systémique (Mathian et al. 2014).</i>	<i>44</i>
<i>Figure 8 : Mécanismes immunopathologiques de la NMO (Jasiak-Zatonska, 2016).....</i>	<i>51</i>
<i>Figure 9 : l'ontogenèse du LB (Guerrier 2012).....</i>	<i>53</i>
<i>Figure 10 : Centre germinatif et les LB folliculaires.</i>	<i>56</i>
<i>Figure 11 : Formation des signalosomes du BCR (Harwood & Batista 2008).....</i>	<i>60</i>
<i>Figure 12 : Activation des Kinases (Pinilla-Ibarz et al. 2013).....</i>	<i>61</i>
<i>Figure 13 : voies de signalisation distales du BCR (Slupsky 2014).....</i>	<i>62</i>
<i>Figure 14 : La complexité de la signalisation du BCR (Cell Signaling Technology).</i>	<i>62</i>
<i>Figure 15 : Co-récepteurs activateurs et inhibiteurs du BCR (Xu et al. 2005).....</i>	<i>64</i>
<i>Figure 16 : les protéines et voies de signalisation dont la régulation est altérée dans le lupus (Taher et al. 2013).</i>	<i>66</i>
<i>Figure 17 : les récepteurs Fc d'après (Kaetzel 2014) modifié.</i>	<i>67</i>
<i>Figure 18 : FcR d'après (Li & Kimberly 2014).....</i>	<i>69</i>
<i>Figure 19 : Recrutement de TRIM 21 après reconnaissance par les Ac et leur internalisation (McEwan et al. 2011).</i>	<i>70</i>
<i>Figure 20: FcR de type I et de type II (Nimmerjahn et al. 2015).</i>	<i>71</i>
<i>Figure 21 : Fcγ Récepteurs (Hogarth & Pietersz 2012).</i>	<i>72</i>
<i>Figure 22 : Localisation des FCGR : le locus FCGR est à 1q21-24 (Brown et al. 2007).....</i>	<i>73</i>
<i>Figure 23 : Expression cellulaire des FcγRs (Gillis et al. 2014), modifié.</i>	<i>76</i>
<i>Figure 24 : Interaction et affinité entre les IgG et les FcγRs (Lejeune et al. 2010).</i>	<i>77</i>
<i>Figure 25: Fonction des FcγRs (Guilliams et al. 2014) modifié.</i>	<i>78</i>
<i>Figure 26 : Mécanismes d'action activés par l'intermédiaire des FcγRs (Lejeune et al. 2010).....</i>	<i>80</i>
<i>Figure 27 : Voies de signalisation induites par les récepteurs FCγR activateurs et inhibiteurs (Nimmerjahn & Ravetch 2008).</i>	<i>84</i>
<i>Figure 28: schéma de la protéine CD72 d'après (Wu & Bondada 2002).</i>	<i>87</i>
<i>Figure 29 : gène du CD72 d'après (Hitomi et al. 2004).....</i>	<i>87</i>
<i>Figure 30 : gènes FCGR et localisation des polymorphismes étudiés </i>	<i>96</i>
<i>Figure 31 : Déséquilibre de liaison entre les différents gènes. Représentation schématique des D' entre les gènes.</i>	<i>117</i>
<i>Figure 32 : Déséquilibre de liaison exprimé en D' entre les gènes FCGR2A, FCGR2B et FCGR3B.</i>	<i>134</i>
<i>Figure 33 : Analyse de la population LB CD19+ du sang périphérique.</i>	<i>143</i>
<i>Figure 34 : Distribution des différentes sous-populations lymphocytaires B.</i>	<i>144</i>

<i>Figure 35 : Distribution des LB transitionnels.....</i>	<i>145</i>
<i>Figure 36 : Intensité moyenne de fluorescence(IMF) du CD32.....</i>	<i>147</i>
<i>Figure 37 : Intensité moyenne de fluorescence de CD72.....</i>	<i>148</i>
<i>Figure 38 : Intensité moyenne de fluorescente de CD32 dans les différents sous-groupes de 232II, 232IT et 232TT.....</i>	<i>149</i>
<i>Figure 39 : Comparaison de l'intensité moyenne de fluorescence de CD19.....</i>	<i>150</i>
<i>Figure 40 : Phosphorylation de SHIP et de Erk à l'état basal.....</i>	<i>151</i>
<i>Figure 41 : Phosphorylation de SHIP à l'état basal chez les patients et les témoins II, IT et TT.....</i>	<i>152</i>
<i>Figure 42 : Phosphorylation de Erk et de SHIP avant et après stimulation par des F(ab)'2 anti Ig des lymphocytes B.....</i>	<i>153</i>
<i>Figure 43 : Phosphorylation de Erk et de SHIP avant et après stimulation par IgG anti-IgT des lymphocytes B.....</i>	<i>154</i>
<i>Figure 44 : Immunoprécipitation de p-SHIP avec le FcγRIIb chez des témoins II, IT et TT.....</i>	<i>155</i>

TABLE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Critères de l'ACR du Lupus Erythémateux Disséminé</i>	26
<i>Tableau 2 : Critères SLICC 2012</i>	27
<i>Tableau 3 : évolution des marqueurs membranaires dans les différentes sous population de LB Fo</i>	55
<i>Tableau 4 : Phénotypes des LB chez l'homme, B immatures, transitionnels, mature et LB ZM</i>	57
<i>Tableau 5 : Amorces utilisées pour la biologie moléculaire</i>	97
<i>Tableau 6 : Fréquence génotypique, allélique et porteur d'allèle pour le FcyRIIa-R131H</i>	99
<i>Tableau 7 : Fréquence génotypique, allélique et porteur d'allèle pour le FcyRIIb-I232T</i>	101
<i>Tableau 8 : Fréquence génotypique, allélique et porteur d'allèle du polymorphisme -343G/C du promoteur de FCGR2B</i>	102
<i>Tableau 9 : Fréquence génotypique, allélique et porteur d'allèle du FcyRIIIa-F158V</i>	104
<i>Tableau 10 : Fréquence génotypique, allélique et porteur d'allèle du FcyRIIIb-Na1/Na2</i>	105
<i>Tableau 11 : Comparaison entre les patients LES et les Témoins</i>	112
<i>Tableau 12 : Distribution du génotype (-343G/C) du promoteur du FCGR2B</i>	112
<i>Tableau 13 : Distribution des polymorphismes des FcyRs dans la population lupique martiniquaise et témoins</i>	114
<i>Tableau 14 : Génotype et fréquence allélique des FcyRs chez les témoins et les patients avec ou sans atteinte rénale</i>	116
<i>Tableau 15 : Haplotypes des différents FcyR chez les témoins, les patients LES et les avec ou sans atteinte rénale</i>	118
<i>Tableau 16 : Distribution des haplotype Hap1 et Hap2 du CD72 chez les témoins, les patients atteints de lupus systémique (LES), ainsi que patients avec et sans atteinte rénale</i>	119
<i>Tableau 17 : Distribution des haplotypes Hap1/Hap2 du CD72 dans les différents groupes génotypiques FCGR2B, chez les témoins, les patients LES et patients LES</i>	121
<i>Tableau 18 : Comparaison des pourcentages des hommes et des femmes dans les groupes SEP, NMO et témoins</i>	129
<i>Tableau 19 : Distribution du FcyRIIa-H131R chez des patients atteints de sclérose en plaque, et des neuromyéélite optique</i>	130
<i>Tableau 20 : Distribution du FcyRIIb-I131T chez des patients atteints de sclérose en plaque, et des patients atteints de neuromyéélite optique</i>	131
<i>Tableau 21 : Distribution du FcyRIIIb-Na1/Na2 chez des patients atteints de sclérose en plaque, et des neuromyéélite optique</i>	132
<i>Tableau 22 : Equilibre de Hardy weiberg des gènes FCGR2A, 2B et 3B chez les patients SEP et NMO et les témoins</i>	133
<i>Tableau 23 : distribution des haplotypes Hap1 et Hap2 chez les patients SEP, NMO et témoins</i>	135
<i>Tableau 24 : Distribution des haplotypes Hap1/Hap2 du CD72 dans les différents groupes génotypiques FCGR2B, chez les témoins, les patients SEP, NMO et les Témoins</i>	136
<i>Tableau 25 : Anticorps utilisés en cytométrie de flux</i>	141

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acides Aminés
Ac : Anticorps
ACR : American College of Rheumatology
ADCC : cytotoxicité à médiation cellulaire dépendant des Ac
ADN : Acide Désoxyribonucléique
Ag : Antigènes
AP-1 : Activator protein 1
AQP4 : Aquaporine 4
ARN : Acide Ribonucléique
Baff : B cell-Activation Factor of the tumor necrosis factor Family
BANK : B cell scaffold protein with ankyrin repeats
BCR : B Cell Receptor
Be : Lymphocyte B effecteur
BHE : Barrière Hémato-Encéphalique
Blk : B Lymphocyte Kinase
BLNK : B cell linker
Bm : Lymphocyte B mature
Btk : B lymphoid Tyrosine Kinase
CBA : Cell Based Assay
CD : cellules dendritiques
CD40L : CD40ligand
CG : Centre Germinatif
CI : Complexes Immuns
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CpG : Cytosine-phosphate-Guanine
DAG : Diacyl Glycerol
DR : Antigen D Related
EAAT2 : transporteur d'acide aminé excitateur
EBV : Epstein-Barr virus
ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent assay
Erk extracellular signal-regulated kinase
Fc : Fragment Cristallisable
FcRL : FcR like
FcRs : récepteurs pour la portion Fc des Immunoglobulines
FcγR : récepteurs pour le fragment Fc des IgG
FIPA : Fluorescence ImmunoPrecipitation Assay
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfert
G-CSF : Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GFAP : protéine acide fibrillaire gliale
GWAS : Genome-Wide Association Studies
HLA : Human Leukocyte Antigen
IFN interféron
Ig : immunoglobuline
IL- Interleukine
IP : Inositol triphosphate
IRF : Interferon Regulatory Factor, : Interferon-Regulatory Factor
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITGAM : Integrin alpha M
ITIM : Immunoreceptor Tyrosine Inhibition Motif

JNK : Jun N terminal Kinase
kDa : Kilo-Dalton
LB : lymphocytes B
LB Fo : Lymphocyte B folliculaire
LB ZM : Lymphocyte B de la zone marginale
LBreg : Lymphocyte B régulateur
LBT1 : Lymphocyte B Transitionnel de type 1
LBT2 : Lymphocyte B transitionnel de type 2
LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
LES : Lupus Erythémateux Disséminé
LPS : lipopolysaccharide
LT : lymphocytes T
Lyn : Lck/Yes-related novel protein tyrosine kinase
MAI : Maladies Auto-Immunes
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases
miRNA : microARN
MOG : Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein
NET : Neutrophil Extracellular Trap
NFAT : Nuclear Factor of Activated T cells
NFkB : Nuclear Factor kB
NK : natural killer
NMO : Neuro-Myélite Optique, : Neuromyérite Optique
NMOSD : NMO Spectrum Disorder
NORB : Neuropathie Optique Rétro-Bulbaire
NZB/W : New Zealand Black/White
ODN : oligodésoxy nucléotide
OLS : Organes Lymphoïdes Secondaires
PD-1 : Programmed cell Death 1
PI3K : PhosphoInositol-3 Kinase
PIR-B : Paired Immunoglobulin like Receptor-B
PKC : Protéines Kinase C
PLC : phospholipase C
PTPN22 : Protein phosphatase non receptor type 22
RE : Reticulum endoplasmique
RIPA : Radio-ImmunoPrecipitation Assay
RNP : ribonucleoprotein particle, particule ribonucléoprotéique
SEP Sclérose En Plaques
SHIP : protéine inositol-phosphatase à domaine SH2
SHP-1 : SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase
SLICC : Systemic Lupus International Collaborating Clinics
Sm : Smith
SNC : Système Nerveux Central
SNP : Système Nerveux Périphérique
Src : sarcoma
STAT-4 : Signal of Transducers and Activator of Transcription 4
Syk : Spleen tyrosine Kinase
TCR : T Cell Receptor
TGF : Transforming Growth Factor
Th : T helper
TLR : récepteurs TOLL like

TNF : Tumor Necrosis Factor
TNFSF4 : TNF SuperFamily 4
TRIM21 : Tripartite Motif containing protein 21
TYK2 : Tyrosine Kinase 2
UV : ultra violets
XBP-1 : X box binding protein1

INTRODUCTION

L'incidence et la prévalence des maladies auto-immunes (MAI) sont plus élevées dans les populations d'origine africaine et asiatique comparées aux européennes. Le lupus érythémateux disséminé (LES) qui en est le prototype et les maladies démyélinisantes du système nerveux central comme la neuromyéélite optique (NMO) sont un problème de santé publique en Martinique où la population est à 70% d'ascendance africaine.

Un dénominateur commun entre ces MAI est l'hyperactivation des lymphocytes B (LB) et la production de nombreux auto-Ac.

L'objectif de notre étude a été d'étudier le lien entre ces MAI et des polymorphismes intervenant sur les gènes des récepteurs pour la portion Fc des Immunoglobulines (FcRs), en particulier le récepteur Fc γ RIIb connu pour son rôle inhibiteur sur les LB et les cellules myéloïdes.

Dans un premier temps, nous présenterons brièvement le LES et la NMO ainsi que les hypothèses concernant leurs mécanismes physiopathologiques.

Dans un deuxième temps nous aborderons le développement normal du LB, ses différentes sous-populations ainsi que le contrôle du seuil d'activation de son récepteur à l'Ag (BCR) par les co-récepteurs activateurs et inhibiteurs.

Dans une troisième partie nous détaillerons la famille des récepteurs FcRs et en particulier les récepteurs pour les IgG (Fc γ Rs).

Enfin nous terminerons cette introduction par une description de la molécule CD72 qui fait partie des récepteurs inhibiteurs du BCR et dont nous avons étudié les interactions avec le récepteur Fc γ RIIb chez les patients LES martiniquais.

I Pathologies auto-immunes

1 Le lupus érythémateux systémique (LES)

Le lupus érythémateux systémique est une maladie auto-immune systémique dont l'aspect clinique est très polymorphe et dont l'origine multigénique laisse la place à des facteurs environnementaux susceptibles de provoquer des poussées évolutives. Les anomalies immunologiques se traduisent par la présence de nombreux auto-Anticorps (auto-Ac) qui constituent une aide précieuse au diagnostic et contribuent, pour certains, au développement de lésions tissulaires par le dépôt de complexes immuns (CI) circulants, provoquant ainsi leur destruction (Sternner *et al.* 2014; Choi *et al.* 2015).

L'évolution de cette pathologie est capricieuse, variable d'un sujet à l'autre, se faisant généralement par poussées entrecoupées de phases de rémission. Son pronostic est dépendant des organes touchés, notamment le rein et le système nerveux central.

1.1 Epidémiologie

La prévalence et l'incidence du LES varient selon l'âge, le sexe, l'origine géographique et ethnique avec un développement précoce et une sévérité augmentée dans les populations d'origines africaines ou asiatiques (Lau *et al.* 2006).

A partir des données du recensement national britannique de 1991, Hopkinson a trouvé une prévalence moyenne du LES de $24,7/10^5$ habitants. En fonction de l'origine ethnique, la prévalence était de $207/10^5$ habitants chez les afro-caribéens, de $48,8/10^5$ chez les asiatiques et enfin de $20,3/10^5$ chez les caucasiens (Hopkinson *et al.* 1993; Johnson *et al.* 1995; Borchers *et al.* 2010).

Parmi les manifestations cliniques les plus sévères figure l'atteinte rénale qui engage le pronostic vital du patient. Le risque du développement d'une néphrite est évalué à 75 % chez les patients lupiques d'origine africaine, c'est à dire 3 à 5 fois plus fréquente dans cette population par rapport aux Caucasiens (Lau *et al.* 2006; Gómez-Puerta *et al.* 2015).

En France, une étude sur l'année 2010 à partir d'une cohorte de 27369 cas de LES, retrouve, toutes régions confondues, une prévalence de 47 cas pour 10^5 et une incidence de 3,32 cas / 10^5 . La prévalence est plus élevée chez les femmes ($79/10^5$) que chez les hommes ($11,8/10^5$). Le pic de la prévalence est observé chez les femmes âgées de 40 à 49 ans ($138,8/10^5$) contre $22,3/10^5$ chez les hommes âgés de 60 à 69 ans. L'âge moyen est de $48,4 \pm 15,9$ chez les femmes contre $51 \pm 16,5$ ans chez les hommes.

Enfin le sex-ratio Femme/Homme est de 13 pour la tranche d'âge allant de 20 à 29 ans et diminue pour atteindre 3 dans la tranche d'âge allant de 70 à 79 ans (Arnaud *et al.* 2014).

En individualisant les régions, les incidences et prévalences les plus fortes sont retrouvées dans les territoires ultra marins avec une prévalence de 126,7/10⁵ habitants pour la Martinique, de 93,9/10⁵ pour la Guadeloupe, de 86,2/10⁵ en Guyane et de 60,1 pour la Réunion (Figure 2). Les incidences pour 10⁵ habitants sont respectivement de 8,03, 7,09, 11,2 et 5,5 (Figure 1).

La population martiniquaise a deux grandes origines ethniques : une africaine (golfe de Guinée par le biais de l'esclavage) et une caucasienne. Les analyses génétiques des différents groupes de Human Leukocyte Antigen (HLA) ont permis d'identifier une origine africaine à 70% et caucasienne à 30% (Bera *et al.* 2001). Une étude de la population martiniquaise atteinte de LES entre 1990 et 1999 trouve un sex ratio de 12,6/1, une incidence annuelle moyenne de 4,7 cas dans la population générale alors qu'elle est de 8,5 cas chez les femmes et de 0,7 cas chez les hommes lorsque l'on sépare les deux groupes. Dans cette population 47% de patients LES développent une atteinte rénale dont 14% aboutissant en épuration extra-rénale (Deligny *et al.* 2002). Les atteintes neurologiques surviennent chez 17 à 48% des patients selon les études (Wilson *et al.* 1979; Deligny *et al.* 2002). Enfin le profil immunologique se caractérise par une plus grande fréquence des Ac anti Smith (anti-Sm) (37%), anti particule ribonucléoprotéique (anti-RNP) (58,7%) et anti-SSA (47,5%) contre respectivement 10, 13 et 25% chez les caucasiens.

La sévérité et les co-morbidités sont différentes entre les pays industrialisés et les pays en voie de développement. La prévalence et la gravité du LES chez les patients d'origine africaine et asiatique sont plus importantes pour les populations vivant dans des pays industrialisés. Ce gradient de prévalence reste encore une énigme qui ne peut être expliquée uniquement par un accès au diagnostic et aux soins plus faible dans les pays en voie de développement (Bae *et al.* 1998). Dans les pays industrialisés plusieurs facteurs de risque (sur lesquels nous reviendrons au chapitre I.6 comme la pollution, seraient impliqués dans cette augmentation.

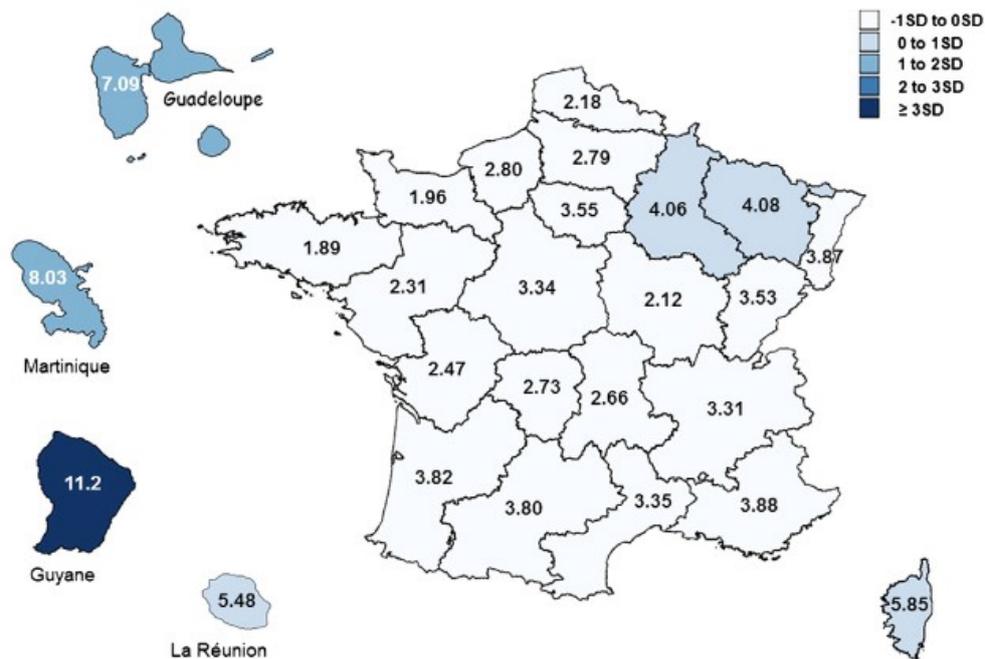


Figure 1 : Incidence du LES : ratios pour 100 000 habitants (Arnaud *et al.* 2014)

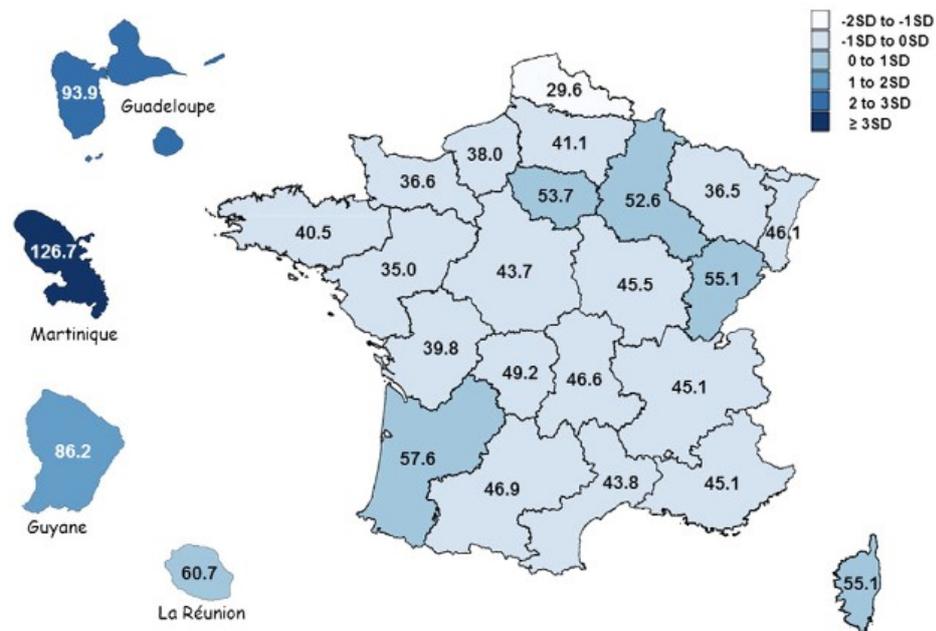


Figure 2 : Prévalence du LES en France : ratios pour 100 000 habitants (Arnaud *et al.* 2014)

1.2 La clinique

Les manifestations inaugurales du LES sont variables d'un patient à un autre et les formes pauci-symptomatiques sont nombreuses. L'argument diagnostique biologique reste donc d'une grande importance. Le LES débute souvent par des signes généraux (fièvre et asthénie) et des symptômes cutanés/articulaires. Les atteintes multi-viscérales constituent toutefois les formes les plus caractéristiques.

1.2.1 Critères diagnostiques

Le diagnostic repose sur un ensemble de critères qui constituent autant de situations cliniques et/ou biologiques qui doivent conduire à rechercher la maladie.

Deux séries de critères ont été validées. Ces critères ont le mérite de cerner les éléments utiles pour définir la pathologie au plan clinique et biologique mais ils sont parfois pris par défaut de sensibilité, notamment en début de maladie.

- Les critères de l'*American College of Rheumatology* (ACR), dont la dernière révision date de 1997, et pour lesquels le patient doit avoir au minimum 4 critères (Yu *et al.* 2014) (Tableau 1).

Tableau 1 : Critères de l'ACR du Lupus Erythémateux Disséminé

1. Erythème facial en aile de papillon	
2. lupus discoïde	
3. photosensibilité	
4. Ulcération buccale ou nasopharyngée	
5. Arthrite non déformante, atteinte d'une ou plusieurs articulations périphériques avec douleurs à la mobilisation, sensibilité, épanchement ou gonflement des parties molles sans déformation	
6. Pleurésie ou péricardite (séríte)	
7. Atteinte rénale : protéinurie persistante >0,5g/24 heures ou cylindres urinaires	
8. Atteinte neurologique : psychose ou convulsion (en l'absence de cause médicamenteuse et/ou métabolique)	
9. Atteinte hématologique	-Leucopénie <4000 à deux reprises. -Thrombopénie < 100000 (en absence de drogue cytopéniante). -Lymphopénie < 1500 (à deux reprises). -Anémie hémolytique
10. Anomalie Immunologiques	-présence d'anti-ADN à un taux significatif -présence d'anti-Sm -Présence d'Ac antiphospholipides : soit sérologie syphilitique dissociée positive à 2 déterminations à 6 mois d'écart, soit anticoagulant circulant de type lupique ou titre anormal d'Ac anti-cardiolipine et immunoglobuline G (IgG) et/ou IgM.
11. taux anormal d'Ac anti-noyaux identifié par immunofluorescence ou une autre technique, persistant et en l'absence de médicaments inducteurs.	

- Les critères SLICC (*Systemic Lupus International Collaborating Clinics*) en 2012 (Petri *et al.* 2012). Pour ceux-ci, le diagnostic requiert également quatre critères, incluant au moins un critère clinique et un critère biologique ou une glomérulonéphrite lupique prouvée par biopsie avec des Ac anti-nucléaires ou des Ac anti Acide Désoxyribonucléique (anti-ADN) natif (Tableau2).

Tableau 2 : Critères SLICC 2012.

	Critères de classification du LES	Détails
Critères cliniques	Lupus cutané aigu ou subaigu	Rash malaire Lupus bulleux Nécrolyse épidermique toxique Rash maculo-papuleux Rash dans le cadre d'une photosensibilité Lésions psoriasiforme Lésion annulaire polycyclique
	Lupus cutané chronique	Rash discoïde Lésion verruqueuse Panniculite lupique Lupus tumidus Lupus engelure Lésion type lichen plan
	Lésion muqueuse orale ou nasale	Palais, bouche, langue ou nez
	Alopécie non-cicatricielle	Lésion diffuse avec des cheveux cassés visibles
	Synovites \geq 2 articulations Ou douleur \geq 2 articulations+ dérouillage matinal	
	Sérite	Pleurésie > Péricardite \geq 1 jour
	Atteinte rénale	Protéinurie >0,5g/24h Ou hématurie
	Atteinte neurologique	Epilepsie, Psychose, mononévrite, myélite, neuropathie périphérique, état confusionnel aigu
	Atteinte hémolytique	
	Leucopénie	Leucocytes <4000/mm ³ Ou lymphocytes <1000/mm ³
Thrombopénie	<100000 /mm ³	
Critère Immunologique	Auto-Ac ou anomalie de certaines fractions du complément	Ac anti-noyaux > norme du laboratoire Ac anti-ADN double brin > norme du laboratoire anti-Sm Ac anti-phospholipides Complément abaissé Test de coombs direct positif

1.2.2 Manifestations cutanées

Elles inaugurent l'affection une fois sur quatre mais elles peuvent manquer tout au long de l'évolution. Elles peuvent être classées en trois types de lésions : Lupus cutané aigu, lupus sub-aigu et lupus chronique. En fonction de ce classement, leur association avec les atteintes viscérales sont variables de 90% pour les formes aiguës à 20% pour les formes chroniques (Meyer 2005; Grönhagen & Nyberg 2014; Kuhn & Landmann 2014).

1.2.2.1 Lupus cutané aigu

Associées dans 90% des cas à une atteinte systémique (Okon & Werth 2013), les lésions concernent surtout les zones photo-exposées avec un érythème malaire (versperilio ou « loup ») (Nico *et al.* 2014).

1.2.2.2 Lupus cutané chronique

Cette forme est dominée par les lésions du lupus discoïde, plaques érythémateuses circonscrites, isolées ou multiples, avec un aspect papulo-squameux (Okon & Werth 2013). Ces lésions siègent au niveau du visage, des oreilles et du cuir chevelu laissant souvent une alopecie définitive (Nico *et al.* 2014).

1.2.2.3 Lupus cutané subaigu

Cette forme sert de lien entre les deux précédentes et peut prendre deux aspects : un aspect papulo-squameux psoriasiforme et un aspect annulaire polycyclique (Meyer 2005). Une photosensibilité cutanée est retrouvée chez 10 à 50% des malades, en particulier chez les caucasiens.

1.2.3 Manifestations rhumatologiques

Elles inaugurent la maladie une fois sur deux et sont présentes à un moment quelconque de l'évolution huit à neuf fois sur dix. Les arthralgies sont présentes une fois sur quatre, résistantes aux anti-inflammatoires et s'accompagnent de myalgies (Meyer 2005).

Les arthrites sont habituellement bilatérales, symétriques, non destructives et non déformantes. Elles sont présentes chez 80% des patients au moment du diagnostic.

1.2.4 Manifestations rénales

Dominées par les atteintes glomérulaires, elles constituent la deuxième cause de mortalité du LES. Leur fréquence varie selon les études entre 40 et 60%. La généralisation des biopsies montre que leur fréquence anatomique atteint 70% des cas (Seshan & Jennette 2009). La néphropathie peut être révélatrice de la maladie et survient dans la majorité des cas au cours des cinq premières années.

Les lésions sont réparties en six classes (Zubair & Frieri 2013) :

- Classe I : rein optiquement normal sans dépôt mésangial.
- Classe II : glomérulonéphrite mésangiale pure se traduisant par une protéinurie avec ou sans hématurie microscopique.
- Classe III : glomérulonéphrite segmentaire et focale, proliférative qui touche moins de 50% des glomérules sans insuffisance rénale.
- Classe IV : glomérulonéphrite proliférative diffuse touchant plus de 50 % des glomérules avec protéinurie, syndrome néphrotique et parfois insuffisance rénale. En immunofluorescence il existe des dépôts diffus d'Ig ainsi que des fractions du complément.
- Classe V : glomérulonéphrite extra membraneuse.
- Classe VI : glomérulonéphrite avec une sclérose avancée touchant plus de 90 % des glomérules.

A ce classement se rajoutent des index d'activité et de chronicité.

1.2.5 Autres manifestations

1.2.5.1 Manifestations cardiaques et vasculaires

La péricardite représente l'atteinte cardiaque la plus fréquente dans le LES (D'Cruz *et al.* 2007). Elle est également récidivante. Le LES peut se compliquer de vascularites dont la gravité dépend des organes cibles.

Des thromboses veineuses sont retrouvées dans 8 à 20% des cas. Elles peuvent intéresser différents territoires (membres, veines caves) (Frerix *et al.* 2014).

1.2.5.2 Manifestations respiratoires

La pleurésie avec ou sans épanchement est l'atteinte pulmonaire la plus observée dans le LES, suivie des formes inflammatoires ou des fibroses interstitielles diffuses (Mittoo & Fell 2014).

1.2.5.3 Manifestations neurologiques et psychiatriques

Elles constituent la troisième cause de mortalité du lupus après les complications infectieuses et l'atteinte rénale. Leur fréquence globale est de 30 à 40%. Les atteintes du système nerveux central (SNC) sont plus fréquentes que l'atteinte du système nerveux périphérique (SNP) (Gotkine & Vaknin-Dembinsky 2012).

Les tableaux cliniques sont d'expression et de gravité très variables. Sur le plan neurologique peuvent être observés des céphalées, des crises comitiales, des méningites, des accidents ischémiques ou une myélite (Vadacca *et al.* 2006). Il est souvent difficile d'affirmer la nature organique de manifestations telles que les céphalées, l'état dépressif ou la psychose. Les mécanismes de ces lésions restent encore discutés.

1.3 Physiopathologie du lupus

La physiopathologie du lupus reste encore imparfaitement connue. La survenue d'un LES dépend d'un contexte génétique et d'un environnement particulier. Elle fait intervenir une rupture de tolérance avec des dérèglements des systèmes immunitaires inné et adaptatif. Les interactions entre auto-antigènes (auto-Ag), cellules présentatrices d'Ag (principalement les cellules dendritiques), LB et lymphocytes T (LT) aboutissent à la production d'auto-Ac et à l'activation des LT délétères pour l'organisme. A ce titre, les Ac anti-nucléaires sont détectables plusieurs années avant l'apparition des premiers symptômes cliniques.

1.3.1 Les Ac anti-nucléaires, dénominateur commun

Leur présence est quasi constante chez les patients atteints de LES. Ils sont dirigés contre la chromatine et ses constituants : Ac anti-ADN natif, anti-ARN, anti-histone et nucléosome. Les nucléosomes sont produits lors de l'apoptose des cellules par la dégradation de la chromatine (Bell *et al.* 1990; Dieker *et al.* 2002; Jiang *et al.* 2003).

Le titre de certains auto-Ac est corrélé à l'activité de la maladie en particulier les Ac anti-ADN double brin. Il peut exister chez des personnes en bonne santé des Ac anti-ADN qui sont des auto-Ac naturels, d'isotype IgM et de faible affinité.

Les auto-Ac caractéristiques et spécifiques du LES ont une haute affinité pour l'ADN natif. D'isotype IgG avec des mutations somatiques, ils sont le signe indirect d'une activation des LB par un mécanisme T dépendant au sein du centre germinatif.

1.3.2 Les lésions tissulaires

Certains auto-Ac peuvent causer directement par fixation sur la cible antigénique le dysfonctionnement voire la destruction de la cible moléculaire ou cellulaire. C'est le cas des Ac dirigés contre les leucocytes, plaquettes ou globules rouges dans les cytopénies hématologiques. Mais, dans la majorité des cas, ce sont les CI qui sont à l'origine de la plupart des lésions tissulaires. Quand ils sont présents dans les tissus, ils activent la voie classique du complément et initient la réaction inflammatoire par le recrutement in situ des macrophages, polynucléaires, cellules dendritiques et lymphocytes (Figure 3).

Ces mécanismes sont particulièrement importants dans l'atteinte rénale lupique qui se caractérise par le dépôt glomérulaire d'Ig, soit par la fixation d'Ac anti-ADN ou anti-nucléosome sur de l'ADN glomérulaire, soit par réaction croisée avec d'autres Ag glomérulaires comme l'actinine. Les CI peuvent également se former dans la circulation et se déposer secondairement dans le glomérule grâce à leurs propriétés physico-chimiques (Rahman & Isenberg 2008). L'accumulation des CI peut être également favorisée par un défaut de clairance du système du complément.

Plusieurs autres mécanismes participent à l'inflammation tissulaire comme l'infiltration des LT CD8 cytotoxiques. L'accumulation de débris nucléaires issus de l'apoptose et de la nécrose cellulaire induit l'activation directe des lymphocytes et des cellules de l'immunité innée ainsi que la sécrétion de cytokines inflammatoires comme les interférons (IFN)- α , IFN- γ , le tumor necrosis factor alpha (TNF)- α et l'interleukine (IL)-17.

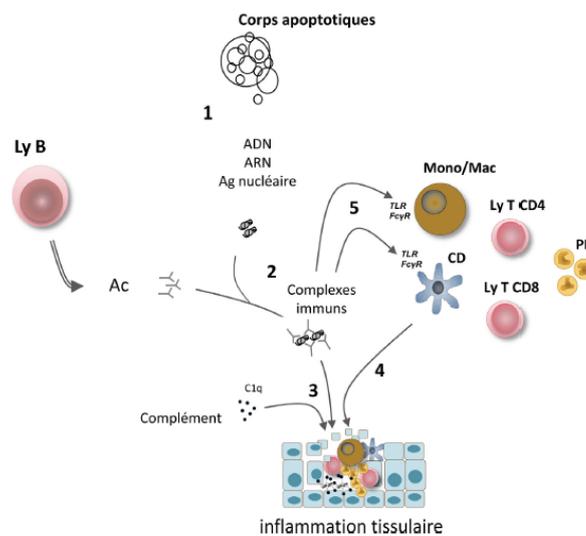


Figure 3: Rôle du complexe immunitaire dans l'initiation des lésions tissulaires dans le LES (Mathian *et al.* 2014).

1) Apoptose anormale, 2) Formation des complexes immuns, 3) Activation du complément, 4) Recrutement de cellules immunitaires, 5) Activation des cellules du système immunitaire inné par les CI.

1.3.3 Apoptose et LES

L'apoptose est un processus crucial, qui doit être mené à terme sans faille pour préserver l'intégrité du système.

Une apoptose anormale ou excessive ou une clairance déficiente des corps apoptotiques par les macrophages conduisent à l'entrée dans un processus de nécrose inflammatoire, qui conduit d'une part à l'activation de récepteurs TOLL like (TLR) et de récepteurs pour le fragment Fc des IgG (FcγRs) suivie de la production de cytokines pro-inflammatoires et d'autre part, à l'augmentation de la présentation d'auto-Ag apoptotiques par les cellules dendritiques et à l'activation des LB et LT auto-réactifs (Nagata 2010; Uderhardt *et al.* 2012; Janko *et al.* 2013) (Figure 4).

La réaction auto-immune contre les corps apoptotiques est favorisée par un environnement inflammatoire (débris cellulaires et microbiens) et la survenue lors de l'apoptose de modifications des auto-Ag avec la création de néo-épitopes ou l'exposition d'épitopes cryptiques.

Une autre source d'auto-Ag est constituée par les polynucléaires : au cours du lupus, ceux-ci sont présents en excès dans la circulation en particulier lors des poussées. Ces cellules peuvent induire des lésions tissulaires, notamment endothéliales et peuvent être une source d'IFN α suite à leur mort cellulaire, appelée NETose : le polynucléaire subit un processus de désintégration de sa membrane nucléaire et de sa chromatine. Ce processus aboutit à la formation de longs filaments de chromatine contenant de l'ADN couplé au contenu des granules qui prennent la forme de filets, les NET (Neutrophil Extracellular Trap). Ces NET couplés aux anti-ADN vont activer les cellules dendritiques et les LB (Lande *et al.* 2011; Mahajan *et al.* 2016) (Figure 4).

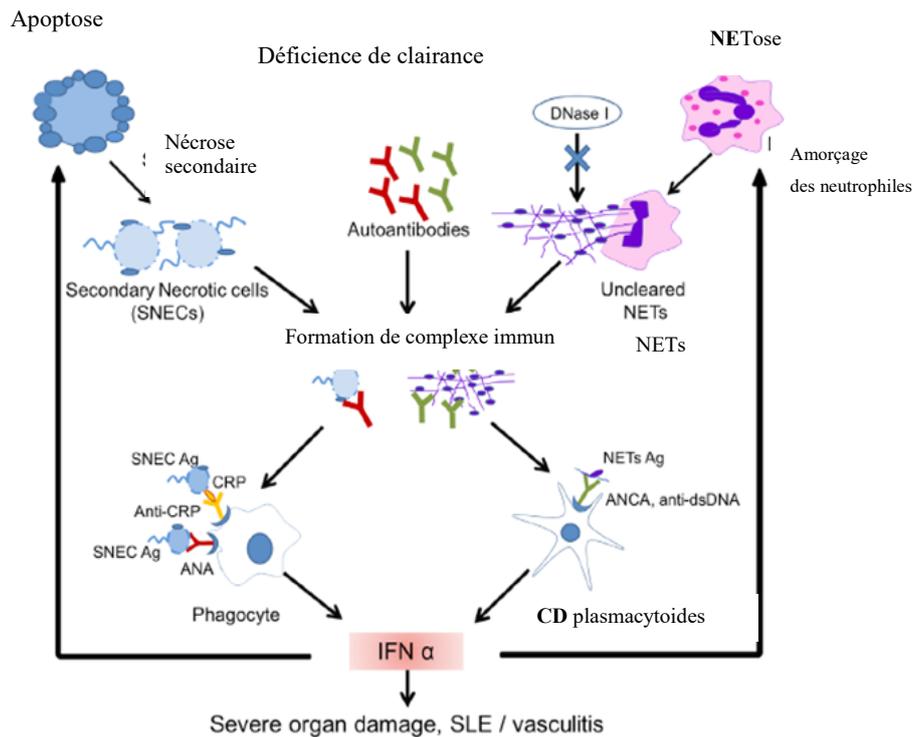


Figure 4 : Modèle de pathogenèse de LES (Mahajan et al. 2016).

Le défaut de clairance des corps apoptotiques et des NETs conduit à une accumulation des cellules nécrotiques secondaires, la formation des CI, la phagocytose de ces CI par les CD et les macrophages ce qui provoque une libération des cytokines pro inflammatoires comme $IFN\alpha$, augmente la mort cellulaire et les lésions tissulaires rencontrées dans le LES.

1.3.4 L'implication de l'immunité innée

L'immunité innée occupe une place centrale dans la physiopathologie du LES par l'intervention de cellules clés comme les cellules dendritiques (CD). Dans le LES, le réseau de ces cellules est activé pour capturer de grandes quantités de matériel nucléaire et activer secondairement les cellules de l'immunité adaptative (Blanco *et al.* 2008). Ainsi deux partenaires sont importants, d'une part l'auto-Ag dont le réservoir principal est constitué par les corps apoptotiques et les NETs, d'autre part les cellules dendritiques (CD) (Banchereau *et al.* 2004).

Les CD sont des cellules présentatrices d'Ag qui sous leur forme immature contrôlent la tolérance périphérique et sous leur forme activée, mature, déclenchent l'activation des LT. Elles sont réparties quantitativement en deux sous-populations : une mineure, les plasmacytoïdes et une majeure, les myéloïdes. Les CD plasmacytoïdes, principales productrices d'IFN de type I, seraient la source principale d' $IFN\alpha$ dans le lupus (Figure 5).

Cette cytokine va activer les CD myéloïdes qui vont alors capter des auto-Ag nucléaires et migrer au niveau des organes lymphoïdes secondaires (OLS) pour induire une réponse auto-immune. Le rôle central de l'IFN α a été démontré dans plusieurs études avec une augmentation de l'expression des gènes régulés par cette cytokine chez 70 à 80% des malades lupiques (Baechler *et al.* 2003; Bennett *et al.* 2003). Les CD captent des Ag grâce à de nombreux récepteurs. Parmi eux, deux grandes familles : les récepteurs TLRs et les FcRs que nous verrons plus particulièrement dans le chapitre IV.

Les TLRs forment une famille d'une dizaine de récepteurs membranaires invariants, exprimés à la surface ou dans des vésicules intra-cytoplasmiques de la plupart des cellules nucléées. Ils reconnaissent des motifs moléculaires conservés présents chez de nombreux pathogènes. Ces motifs sont d'origine et de nature très diverses. Il s'agit de protéines, de sucres ou d'acides nucléiques. Par exemple, le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries gram négatif est reconnu par le TLR4, les acides nucléiques viraux à Acide Ribonucléique (ARN) double brin par le TLR3, les ADN riches en séquences cytosine-phosphate-Guanine (CpG) hypométhylées (retrouvées chez les bactéries ou les cellules apoptotiques) par le TLR9 et enfin les ARN viraux simple brin par le TLR7 et TLR8. La reconnaissance du composant microbien par un TLR active différents facteurs de transcription dont le Nuclear Factor kB (NFkB) et certains facteurs régulateurs de l'interféron ou Interferon-Regulatory Factor (IRF), ce qui induit la sécrétion de multiples cytokines inflammatoires ainsi que l'activation des CD et des lymphocytes. Plusieurs stimuli des CD ont été identifiés dans le lupus comme la co-activation du Fc γ RIIa et de TLR7 ou de TLR9 par des complexes immuns contenant de l'ADN ou de l'ARN ou comme l'activation de TLR9 par un Epstein-Barr virus (EBV) (Quan *et al.* 2010).

De cette façon, les TLRs déclenchent l'immunité innée et orientent l'immunité adaptative. Ces TLR jouent un rôle important dans la physiopathologie du lupus. Dans des modèles murins, l'injection de LPS ou de CpG oligodésoxy nucléotide (ODN) à des souris prédisposées génétiquement au lupus induit une accélération de la maladie. Sur des souris normales, cette stimulation induit un syndrome proche du lupus avec une atteinte rénale (Izui *et al.* 1977; Hasegawa & Hayashi 2003). Ces résultats peuvent en partie expliquer les liens épidémiologiques existant entre les infections et les poussées du LES.

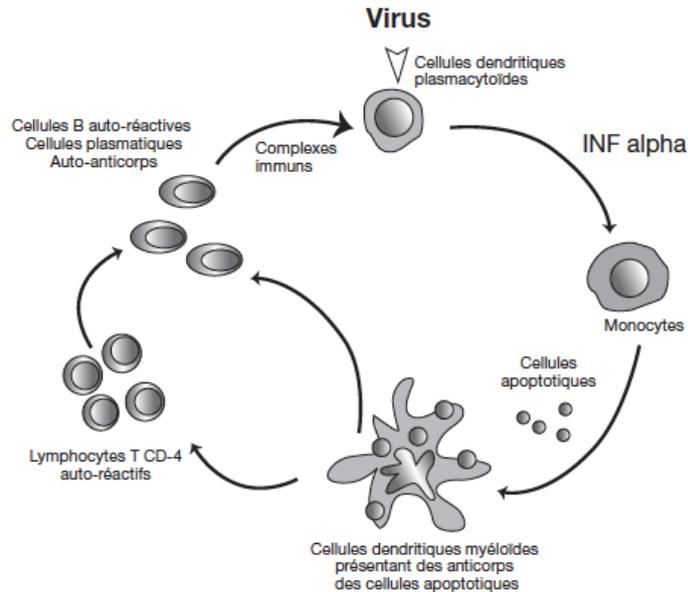


Figure 5 :Rôle central des cellules dendritiques dans la physiopathologie du LES (Contin-Bordes *et al.* 2009).

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes activées par un EBV par exemple sont capables de sécréter de $IFN\alpha$, L' $IFN\alpha$ d'une part, induit la différenciation des monocytes circulants en CD myéloïdes capables de phagocyter le matériel nucléaire et de le présenter aux LT CD4+et d'autre part, permet la différenciation de LB en plasmocytes et la production d'auto-Ac.

1.3.5 L'Immunité adaptative

1.3.5.1 Le rôle des Lymphocytes B

Le LES se caractérise par une stimulation polyclonale des LB conduisant à la production d'auto-Ac dirigés contre des composants nucléaires, notamment l'ADN et/ou des protéines associées. En plus de leur capacité à sécréter des Ac, les LB participent à l'entretien de la maladie par l'activation des LT auto-réactifs et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou immuno-suppressives comme l'IL-10. Normalement les B auto-réactifs sont éliminés au niveau de plusieurs points de contrôle tout au long de leur maturation et différenciation.

In vivo, les souris et les patients lupiques ont une hyper-activation des centres germinatifs et une augmentation du nombre de LB précurseurs et de cellules sécrétrices d'Ac (plasmoblastes et plasmocytes). Les causes de cette hyper-activation sont multiples. L'excès d'auto-Ag initie l'activation des LB mais, pour que celle-ci soit optimale, des stimuli supplémentaires doivent y être associés. Ces facteurs sont apportés par les cellules dendritiques, les LT CD4, les cytokines qui contrôlent et amplifient l'activation des LB : la cytokine B cell-activation factor of the tumor necrosis factor family (Baff), IL-4, IL-10, IL-6, IL-17, $IFN\alpha$.

Comme nous l'avons vu dans le précédent chapitre, les TLRs déclenchent la réaction immunitaire innée et orientent la réponse adaptative. Dans les modèles murins, l'engagement simultané du récepteur à l'Ag du LB ou B Cell Receptor (BCR) et du TLR9 ou TLR7 par des complexes immuns anti-ADN ou anti-ARN active les LB auto-réactifs sans l'aide des LT (Viglianti *et al.* 2003).

L'activation des LB dans le lupus est facilitée par un seuil d'activation plus bas qui serait expliqué par une diminution d'expression des récepteurs inhibiteurs du BCR. Cette diminution est corrélée à l'hyper-activation des LB (Liopsis *et al.* 2001).

Il existe chez les patients lupiques un nombre important de LB naïfs auto-réactifs ayant échappé aux mécanismes de tolérance centrale et périphérique.

1.3.5.2 Les lymphocytes T

Ils participent à l'initiation et au maintien de l'inflammation dans le LES. Les LT CD4 et LT CD8 ont un phénotype activé et infiltrent les tissus. Ils sont résistants à l'apoptose et à l'anergie avec une surexpression de cyclo-oxygénase 2 (Shlomchik *et al.* 2001).

Il existe une hyper-activation du récepteur à l'Ag ou T Cell Receptor (TCR) et des voies de signalisation avec une augmentation des facteurs de transcription : la protéine activatrice ou Activator Protein 1 (AP-1) et le Nuclear Factor of Activated T cells (NFAT). Les LT CD8 ont une augmentation de l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et des molécules de cytotoxicité. Ces cellules cytotoxiques induisent des lésions cellulaires et augmentent la production des corps apoptotiques. Les LT CD4 exercent un rôle pathogène par le biais de la sécrétion de cytokines comme l'IFN γ et IL-17. Il a été montré que l'IL-17 agissait en synergie avec la cytokine Baff pour induire l'activation, la prolifération et la survie des LB et leur différenciation en cellules productrices d'Ac (Doreau *et al.* 2009).

1.4 Les facteurs génétiques du LES

Les facteurs génétiques sont importants dans la physiopathologie du LES. Les études familiales montrent que la concordance de 5% entre jumeaux hétérozygotes passent à 25-30% pour les jumeaux homozygotes (Deapen *et al.* 1992). Dix pour cent des patients atteints d'un LES ont au moins un membre de leur famille atteint d'une forme de la maladie lupique (Alarcón-Segovia *et al.* 2005).

Les modèles murins ont confirmé le rôle important de la génétique car la suppression ou la surexpression d'un gène codant pour une molécule impliquée dans l'élimination des corps apoptotiques, la cascade du complément ou la survie lymphocytaire, peuvent induire un lupus (Tenbrock *et al.* 2007).

1.4.1 Mutations mono-géniques

Il existe chez l'homme quelques mutations mono-géniques associées au développement d'un LES. C'est le cas des déficits en l'un des composants précoces de la cascade du complément comme le C1q, le C2 et le C4. Le déficit en C1q est responsable d'un déficit dans la clairance des CI. Le déficit en C4 est associé à une altération de la déplétion en LB auto-réactifs. Une équipe japonaise a rapporté plusieurs cas pédiatriques porteurs de mutations dans le gène de la DNase1 (Yasutomo *et al.* 2001).

Plus récemment des pathologies héréditaires à début pédiatrique ont été rapportées, elles seraient associées à une surexpression d'IFN α :

La première, le syndrome d'Alcardi-Goutières se manifeste par une encéphalopathie inflammatoire précoce associée à une fièvre, des manifestations auto-immunes de type cytopénie ou syndrome des anti-phospholipides. L'augmentation du taux d'IFN α dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) est évocatrice de cette maladie. Les mutations touchent des gènes codant pour des protéines impliquées dans le catabolisme des acides nucléiques.

La seconde, la spondyloenchondrodysplasie se manifeste par un retard statural, des atteintes neurologiques, des manifestations de type lupique. Le gène responsable de la maladie code pour une phosphatase résistante à l'acide tartrate (TRAP). Ces lupus secondaires à des anomalies mono-géniques sont exceptionnels.

1.4.2 Mutations multigéniques

Les anomalies génétiques identifiées dans le LES sont plutôt d'ordre polygénique. Les études d'association cas-témoins et surtout à partir de 2008, les études de type Genome-Wide Association Studies (GWAS) sur le génome entier ont permis de découvrir plusieurs loci de prédisposition au LES (Graham *et al.* 2009; Moser *et al.* 2009; Cui *et al.* 2013 ; Deng & Tsao 2014). Les loci et les gènes étudiés ne rendent compte pour l'instant que d'environ 15% des facteurs héréditaires à l'origine du LES (Manolio *et al.* 2009). Les gènes connus codent pour des protéines qui ont un rôle dans le fonctionnement du système immunitaire. Ils peuvent être regroupés arbitrairement en fonction de leur action sur la réponse immunitaire (Figure 6).

1.4.2.1 Action sur la phagocytose des corps apoptotiques

Les patients lupiques ont une clairance des corps apoptotiques déficiente ce qui induit une transition en nécrose cellulaire et inflammation. Plusieurs polymorphismes ont été mis en évidence sur plusieurs gènes :

1.4.2.1.1 Le gène de l'intergrin alpha M (ITGAM)

Le gène ITGAM code pour une intégrine, le CD11b, qui joue un rôle dans la phagocytose et l'adhésion des leucocytes. Les études GWAS ont retrouvé des variants dans les populations européennes et afro-américaines fortement associés au LES (Han *et al.* 2009). Ces polymorphismes induisent un changement de conformation de cette intégrine impliquant une perte de liaison avec ses ligands comme les produits de dégradation du complément.

1.4.2.1.2 Les récepteurs FcγR

Ces récepteurs seront développés plus précisément dans le chapitre VI. Plusieurs polymorphismes ont été mis en évidence sur les gènes FCGR2A, FCGR2B, FCGR3A et FCGR3B et seraient associés au LES (Karassa *et al.* 2003; Brown *et al.* 2007). Ils sont en particulier impliqués dans la clairance des CI et dans la régulation des LB.

1.4.2.2 Activation du Lymphocyte T

Le LT joue un important rôle dans la réponse immunitaire. C'est donc sans aucune surprise que plusieurs gènes impliqués dans son fonctionnement ont été associés au lupus. Parmi ces gènes :

1.4.2.2.1 Le gène de la protéine phosphatase non récepteur type 22 (PTPN22)

Le polymorphisme R620W du gène PTPN22 est associé à plusieurs maladies auto-immunes dont le LES dans les populations européennes, hispaniques et afro-américaines (Ramirez *et al.* 2012). Le polymorphisme R620 est plus efficace que le W620 dans la régulation négative de la voie de signalisation du TCR. Ce polymorphisme W620 entraîne une survie des LT auto-réactifs ainsi qu'une diminution de la population des LT régulateurs (Vang *et al.* 2005).

1.4.2.2.2 Le gène de la TNF SuperFamily 4 (TNFSF4)

Ce gène code pour la protéine TNFSF4 (OX40L) appartenant à la superfamille des TNF et exprimée à la surface des cellules présentatrices de l'Ag. En se liant à l'OX40 (CD123), le TNFSF4 joue un rôle dans l'activation des LT CD4 et CD8.

Un polymorphisme a été retrouvé associé à une augmentation de son expression, augmentant les co-stimulations entre les cellules présentatrices d'Ag et les LT, la survie des LT et inhibant la production d'IL-10 des LT régulateurs (Zheng *et al.* 2013).

1.4.2.2.3 Le gène du facteur Signal of transducers and activator of transcription 4 (STAT-4)

La molécule STAT-4 est un facteur de transcription des LT CD4, elle joue un rôle clé dans les voies de signalisation des interleukines IL-12, IL-17, IL-23 et INF γ ainsi que dans l'orientation de réponse immunitaire T helper (Th)-1 et Th-17. L'association de polymorphismes du gène de STAT-4 avec le LES, impliquant une augmentation de l'expression de STAT-4, est retrouvée dans différentes populations, asiatiques, hispaniques et afro-américaines (Harley *et al.* 2008).

1.4.2.3 Action sur l'activation du Lymphocyte B

1.4.2.3.1 Le gène de l'IL-10 :

Cytokine pivot, l'IL-10 est sécrétée par différentes cellules et possède des fonctions inhibitrices sur les réponses immunitaires. Elle favorise également la survie et la prolifération des LB (Pestka *et al.* 2004).

Un polymorphisme du gène de l'IL-10 est identifié comme étant un facteur de risque du LES chez les européens avec une augmentation de l'expression de l'IL-10 et la phosphorylation du facteur de transcription Elk-1 (Sakurai *et al.* 2013).

1.4.2.3.2 Les gènes BANK, Blk, Lyn

Ces gènes codent pour des tyrosines kinases : B lymphocyte kinase (Blk) et la Lck/Yes-related novel protein tyrosine kinase (Lyn) et une protéine adaptatrice B cell scaffold protein with ankyrin repeats (BANK) impliquées dans la transmission du signal d'activation du BCR des LB que nous développons au chapitre III. L'activation de BANK, en agissant sur la mobilisation du Calcium intracellulaire, régule le seuil d'activation du BCR. Deux polymorphismes sur le gène BANK ont été associés au risque de lupus dans les populations européennes aboutissant à une hyper-activation des LB (Harley *et al.* 2008; Kozyrev *et al.* 2008; Gateva *et al.* 2009; Han *et al.* 2009).

Les polymorphismes retrouvés sur Lyn et Blk induisent, au contraire de ceux sur BANK, des diminutions d'expression des tyrosines kinases. Par exemple, la kinase Lyn étant responsable de l'inhibition du signal du BCR via le corécepteur CD22, la diminution de son expression entraîne une hyper-activation du LB. Ces polymorphismes sont surtout retrouvés dans les populations européennes.

1.4.2.4 Action sur la présentation de l'Antigène

Depuis 1970, l'implication de la région 6p21.3 codant pour les molécules du système du CMH dans l'apparition des maladies auto-immunes et notamment le LES n'est plus à démontrer (Harley *et al.* 2008; Costa-Reis & Sullivan 2013). Les études génétiques de cette région ont mis en évidence l'association des gènes codants pour le CMH de classe II et pour le complément avec le LES. Le HLA- Antigen D Related (DR)B1 est retrouvé associé au LES dans plusieurs populations d'origine ethnique différentes (Chung *et al.* 2011; Lee *et al.* 2014). Plus particulièrement, le HLA-DRB1*1501 et le DRB1*0301 présentent une forte association chez les africains, asiatiques, européens et américains (Niu *et al.* 2015). Par contre d'autres phénotype HLA-DR seraient des facteurs de protection, comme par exemple les HLA-DR4, DR11 et DR14 (Niu *et al.* 2015).

Récemment, l'implication du HLA-DR2 et surtout du HLA-DR3 a été décrite dans l'apparition et dans la progression des atteintes rénales (Taylor *et al.* 2011).

1.4.2.5 Action sur les récepteurs TLRs et les voies des IFNs

Plus de la moitié des patients lupiques ont un dérèglement dans l'expression des gènes impliqués dans la voie des IFNs. Les interférons de type I sont impliqués dans la défense antivirale, dans la régulation de la réponse immunitaire de type Th-1, dans l'activation des LT et dans la survie des LB. Ces actions induisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires contribuant à la chronicité de l'inflammation et aux lésions tissulaires. Les voies d'activation des TLRs aboutissent à la production des IFNs, en particulier l'IFN α dont la forte expression est associée au LES (Baechler *et al.* 2003).

Des variants dans les gènes codants pour les TLRs, pour les molécules de régulation de leur transcription ainsi que pour les facteurs de transcription de la voie des TLRs ont été associés au LES (Bronson *et al.* 2012).

1.4.2.5.1 Les facteurs de régulation des IFNs : IRF-5, IRF-7, IRF-8

Facteurs de régulation de l'interféron ou interferon regulatory factor (IRF), les IRF-5, IRF-7 et IRF-8 sont des facteurs de transcription résultants de l'activation des TLRs et qui induisent l'expression des gènes des IFN-I ou d'autres cytokines.

Des polymorphismes sur les gènes codant pour IRF-5, 7 et 8 sont associés au LES et à d'autres maladies auto-immunes (Nordang *et al.* 2012). Ces variants entraînent l'augmentation d'expression et de production d'IFN-I (Costa-Reis & Sullivan 2013).

Récemment un variant de l'IRF-5 a été associé à une augmentation de la production d'Ac anti-Sm et anti-ADN natif (Kawasaki *et al.* 2012).

1.4.2.5.2 La Tyrosine kinase 2 (TYK2)

La tyrosine kinase 2 (TYK2) est impliquée dans la réponse immunitaire pro-inflammatoire et dans la phosphorylation des récepteurs des IFNs. Des études ont montré une association entre des variants de TYK2 et une augmentation de l'expression des gènes des IFNs (Järvinen *et al.* 2010; Cunninghame Graham *et al.* 2011). Une méta-analyse a trouvé une association entre deux polymorphismes de TYK2 et des maladies inflammatoires et auto-immunes (Tao *et al.* 2011).

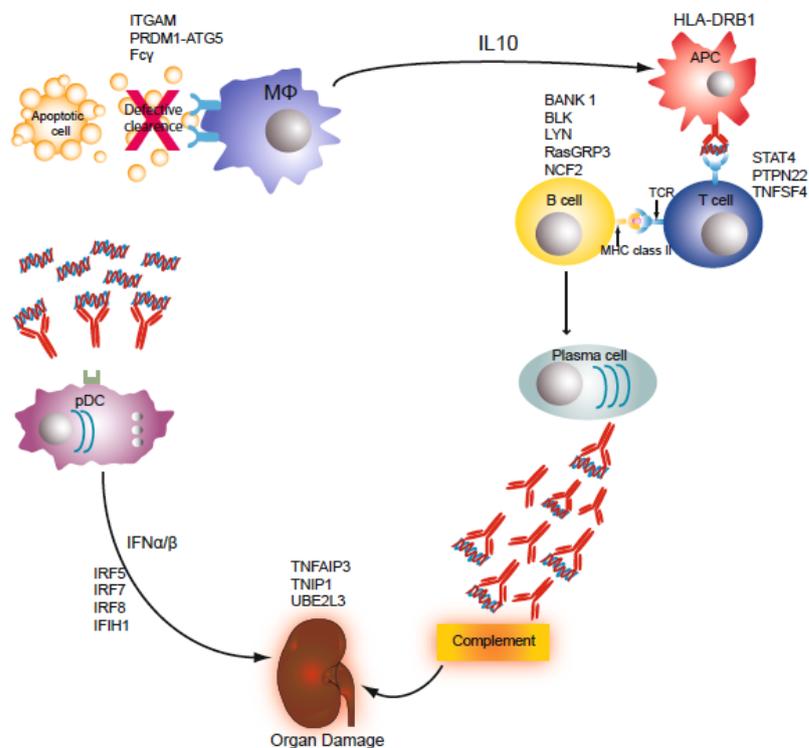


Figure 6 : Mutations impliquées dans la défaillance du système immunitaire dans le LES (Guerra *et al.* 2012).

1.5 Facteurs épigénétiques

Les changements épigénétiques modulent de façon très importante la transcription d'un gène. La transcription des gènes peut être affectée soit par méthylation de l'ADN soit par la modification des histones ou par des micro-ARN.

1.5.1 Hypo-méthylation de l'ADN

L'hypo-méthylation de l'ADN se retrouve sur des séquences de nucléotides CpG et induit une inhibition de l'expression du gène. Le rôle de l'hypo-méthylation de l'ADN dans le lupus a été démontré par plusieurs études, en particulier sur l'action de drogues déméthylantes induisant la prolifération de LT auto-réactifs et de maladies lupiques chez la souris. De même, une hypo-méthylation de l'ADN des LT CD4 a été retrouvée chez des patients lupiques (Costa-Reis & Sullivan 2013).

Des études pan-génomiques sur la méthylation de l'ADN ont montré une hypo-méthylation sévère des gènes de régulation des IFN-I dans les LT CD4+, les LB et les monocytes de patients lupiques (Coit *et al.* 2013)

1.5.2 Les modifications des histones

La modification des histones peut s'effectuer par méthylation, acétylation, phosphorylation ou citrullination. Ces changements affectent la structure de la chromatine et par conséquent la réplication de l'ADN ainsi que sa transcription.

L'hyper-acétylation des protéines histones H3 et H4 est associée à une activation de la transcription provoquant une expression aberrante des gènes des IFN-I.

Cette hyper-acétylation est observée dans les monocytes des patients lupiques (Zhang *et al.* 2010 ; Ballestar 2011).

1.5.3 Les microARN (miRNA)

Ces molécules non codantes ont un rôle clé dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. Leur rôle principal est de bloquer la traduction des ARN messagers auxquels ils vont se fixer. Plus de 2500 miRNA ont été découverts chez l'homme, ciblant plus de 50% du génome. Un seul gène peut être régulé par plusieurs miRNA.

Les miRNA jouent un rôle majeur dans les processus de développement et de différenciation. Des altérations dans leur niveau d'expression ont été décrites dans de nombreuses pathologies comme le LES (Shen *et al.* 2012) : une diminution de la miRNA-146a dont le rôle est d'inhiber l'expression de IFN-I en ciblant l'ARN messager de STAT-4 et d'IRF-5 est observée chez les patients lupiques, conduisant à une hyperproduction d' IFN-I (Tang *et al.* 2009).

Les miRNA sont également impliqués dans l'augmentation de la réponse inflammatoire en augmentant l'expression des cytokines et dans les mécanismes d'hypométhylation de l'ADN en inhibant l'ADN méthyltransférase 1 (Pan *et al.* 2010).

1.6 Facteurs environnementaux:

Plusieurs facteurs externes favorisent le développement du LES : les rayons ultra-violets, certains pathogènes comme le virus EBV, certains médicaments, la silice, le tabac, les pesticides. Ces facteurs environnementaux associés à d'autres événements aléatoires n'enclencheraient une réaction lupique que si le système immunitaire y est génétiquement prédisposé. Les mécanismes par lesquels ces facteurs induisent ou accélèrent une réponse auto-immune ne sont que partiellement connus. Par exemple les ultra violets (UV) favorisent l'apoptose des kératinocytes et la production en excès de corps apoptotiques. L'Ag NA du virus EBV aurait des épitopes communs avec les auto-Ag : SSA et Sm.

L'hydralazine et la procaïnamide inhibent la méthylation de l'ADN et induirait une augmentation de l'expression de plusieurs gènes des LT.

La silice et les infections microbiennes joueraient le rôle d'activateur polyclonal du système immunitaire (Parks *et al.* 2002).

Les mécanismes par lesquels les œstrogènes seraient impliqués dans la réponse auto-immune sont multiples. Par le biais de la stimulation de leur récepteur alpha, ils ont un rôle activateur sur le système immunitaire par une action sur les LB et les LT (Cohen-Solal *et al.* 2008; Feng *et al.* 2010).

Les pesticides de type organochlorés comme le chloredécone auraient une action œstrogène like et pourraient être un facteur de risque supplémentaire dans les pays de la Caraïbe où ce pesticide a été utilisé pendant des années et continue à polluer le sol.

2 Neuro-myélite optique

La neuro-myélite optique aigüe de Devic (NMO) est une maladie inflammatoire sévère multifocale démyélinisante du SNC qui touche presque exclusivement les nerfs optiques et la moelle épinière. Elle se caractérise par des poussées de myélite transverse et de neuropathie optique rétrobulbaire (NORB) (Bernard-Valnet & Marignier 2015).

L'histoire de la NMO a commencé avec Albutt qui constate un pronostic sévère chez des patients ayant une myélite transverse et une névrite optique. Vingt ans plus tard, en 1894, le terme neuro-myélite optique apparaît avec Eugene Devic. Pendant très longtemps la NMO a été considérée comme une forme particulière de la sclérose en plaques (SEP). Cependant depuis une quinzaine d'années, des travaux ont mis en avant des différences sur le plan clinique, épidémiologique, immunologique et anatomopathologique entre la SEP et la NMO.

La distinction entre SEP et NMO est cruciale car leur pronostic et leur traitement sont différents.

C'est la mise en évidence d'un auto-Ac, appelé initialement Ig-NMO, spécifique de la NMO et dirigé contre l'aquaporine 4 anti-(AQP4) qui a permis de montrer qu'il s'agissait bien d'une maladie auto-immune autonome à médiation essentiellement humorale (Lennon *et al.* 2004; Lennon *et al.* 2005). Cet Ac a été proposé comme outil diagnostique et pronostique de la NMO et des « syndromes dits à haut risque » de NMO et a permis d'élargir le spectre clinique de la maladie.

La découverte du rôle pathogène de cet auto-Ac a permis de mieux comprendre la physiopathologie de la NMO qui doit maintenant être considérée comme une astrocytopathie auto-immune. Néanmoins, la définition de cette maladie est en constante évolution car malgré l'amélioration des tests de détection des anti-AQP4, 25% de patients NMO sont séronégatifs ce qui soulève la question de la place de ces patients dans le nouveau spectre de la maladie (Bernard-Valnet *et al.* 2015).

2.1 Clinique

La NMO est caractérisée par des attaques sévères des nerfs optiques associées à une myélite. Initialement considérée comme maladie monophasique, elle se caractérise comme pour la SEP par des poussées évolutives. Les rechutes concernent près de 80% des cas (Collongues *et al.* 2010). Ces poussées ont deux particularités :

- Leur caractère bifocal, marqué par une atteinte quasi-exclusive du nerf optique et de la moelle épinière avec une symptomatologie de type NORB unie ou bilatérale et de névrite transverse aigüe.

- Leur sévérité, avec des cécités complètes (exceptionnelles dans la SEP) ou des tableaux médullaires aigus pouvant engager le pronostic fonctionnel et vital.

Autre particularité évolutive de la NMO par rapport à la SEP, il n'existe pas de phénomène de progression dans l'intervalle des poussées. Cet intervalle peut être très variable, parfois de plusieurs années.

L'élément paraclinique le plus caractéristique de la NMO est l'imagerie par résonance magnétique (IRM) médullaire qui met en évidence la présence d'une lésion étendue longitudinalement sur un minimum de trois segments vertébraux. Ce type d'atteinte est exceptionnel au cours de la SEP où les lésions médullaires sont fréquentes mais partielles et étendues au maximum sur deux métamères.

L'étude du Liquide céphalorachidien diffère également entre la SEP et la NMO. A la phase aigüe d'une poussée de NMO, une pléiocytose lymphocytaire (>50 éléments/mm³) associée à des polynucléaires neutrophiles (>5 éléments/mm³) est classiquement décrite. De plus la présence de bandes oligoclonales est moins fréquente qu'au cours de la SEP et peut disparaître au cours du temps.

Des taux élevés de protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), qui est une classe de filaments intermédiaires du cytosquelette des astrocytes, sont retrouvés dans le LCR lors des poussées de NMO. Ces taux reflètent la présence de lésions astrocytaires, ce qui n'est pas le cas dans la SEP.

2.2 Epidémiologie

C'est une maladie rare dont la prévalence est de 1-2/10⁵ habitants (Bizzoco *et al.* 2009) et qui représente 1 à 2% des pathologies inflammatoires démyélinisantes du SNC. Il existe des zones à plus forte prévalence comme les Antilles françaises avec une prévalence de 4,2/10⁵ (Cabre *et al.* 2009) ou l'Asie et le Japon. L'âge moyen de début est aux alentours de 40 ans avec néanmoins des formes pédiatriques ou à début très tardif après 80 ans. La NMO est caractérisée par une prédominance féminine très nette (sex-ratio>5/1), soit environ le double du ratio observé dans la SEP mais ce ratio descend à 1 pour les formes séronégatives (Wingerchuk *et al.* 2007; Mealy *et al.* 2012).

2.3 Diagnostic de la NMO

2.3.1 Définition selon les critères de Wingerchuk

Selon les critères diagnostiques de Wingerchuk proposés en 1999 puis révisés en 2006, le diagnostic de NMO doit être évoqué face à un patient ayant deux critères cliniques principaux, une myélite transverse et une névrite optique, associés à au moins deux des trois critères paracliniques suivants : IRM cérébrale non évocatrice de SEP, IRM médullaire avec lésions sur trois segments et / ou sérologie positive pour les NMO-IgG/ anti-AQP4 (Wingerchuk *et al.* 1999; Wingerchuk *et al.* 2006).

En 2007, le terme de NMOSD (NMO spectrum disorder) a été introduit permettant d'inclure les formes débutantes avec atteinte limitée du nerf optique mais présence d'anti-AQP4 (Wingerchuk *et al.* 2007).

En 2014, de nouveaux critères ont été introduits par un panel d'experts internationaux permettant d'inclure des patients séronégatifs mais avec des critères cliniques et IRM plus complexes (de Sèze *et al.* 2016).

2.3.2 Anticorps anti-aquaporine 4

En 2004, l'équipe de la Mayo Clinic a mis en évidence un marqueur sérique appelé NMO-IgG ayant une sensibilité de 62% et une spécificité de 90% pour la NMO (Lennon *et al.* 2004).

Cet Ac a pour cible le canal hydrique le plus abondant du SNC, l'aquaporine 4 (AQP4) qui se situe principalement dans les reins et le SNC (Amiry-Moghaddam & Ottersen 2003). Dans le SNC, l'AQP4 n'est exprimée que par les astrocytes. Elle est surtout présente au niveau des vaisseaux sanguins, dans les pieds astrocytaires qui forment avec les cellules endothéliales la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cet Ac serait un marqueur pronostic permettant de prédire une conversion des épisodes isolés de myélite transverse ou de névrite optique vers une NMO. Chez les patients NMO, le taux d'Ac anti-AQP4 semble corrélé à l'activité de la maladie.

La technique classique et historique de détection des Ac spécifiques de la NMO (NMO-Ig) repose sur l'immuno-histochimie sur coupe de tronc cérébral et de cervelet (Lennon *et al.* 2004). Cette technique a plusieurs avantages, elle est reproductible, peu coûteuse et détecte plusieurs types d'auto-Ac. Cependant elle est peu sensible (38 à 75%) et peut avoir de faux positifs.

L'Ac anti-AQP4 reconnaît un Ag conformationnel résultant de la structure tridimensionnelle de l'AQP4 en réseau. De nombreuses techniques ont été développées, basées sur l'utilisation de la protéine recombinante AQP4 : Immunocytochimie, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Immunoprécipitation en IF ou fluorescence immunoprecipitation assay (FIPA), radioimmunoprecipitation assay (RIPA) et western blot. Toutes ces techniques ont leurs avantages et leurs limites, la principale limite étant la dénaturation des épitopes conformationnels. Actuellement, il n'existe toujours pas de technique de référence et les tests les plus sensibles et spécifiques sont basés sur l'immunocytochimie : cell based assay (CBA) utilisant la protéine recombinante AQP4, principalement son isoforme M23 exprimée par des cellules transfectées (Sellner *et al.* 2010; Marignier *et al.* 2013).

Certains auteurs proposent la combinaison de deux tests : d'une part, l'immunohistochimie pour le « screening » des sérums qui ne se limite pas à la recherche des anti-AQP4 et d'autre part un test sensible semi-quantitatif de recherche des anti-AQP4.

2.3.3 Autres biomarqueurs

D'autres biomarqueurs ont été mis en évidence ces dernières années, permettant de mieux définir le groupe des patients NMO séronégatifs en anti-AQP4.

2.3.3.1 Anticorps anti-Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG)

Ils ont été mis en évidence dans le sérum de patients NMO par un test CBA. Ces Ac sont retrouvés uniquement dans le sérum de patients NMO et NMOSD séronégatifs pour les anti-AQP4 (Kitley *et al.* 2012). Pour l'instant, la pathogénicité de ces Ac n'a pas été démontrée. Ces Ac agiraient par un mécanisme physiopathologique différent de celui des anti-AQP4 et affecteraient directement les oligodendrocytes (Saadoun *et al.* 2010; Jasiak-Zatonska *et al.* 2016).

2.3.3.2 Anticorps anti-aquaporine 1

Certains patients auraient des Ac dirigés contre une autre aquaporine, l'aquaporine 1 exprimée également par les astrocytes.

Cette molécule est localisée de façon spécifique dans les plexus choroïdes permettant la sécrétion du liquide céphalorachidien. Ces auto-Ac seraient soit isolés soit associés aux anti AQP4 (Tzartos *et al.* 2013; Tüzün *et al.* 2014). Une autre étude retrouve ces auto-Ac en majorité chez des patients NMO mais également chez certains patients ayant une SEP (Long *et al.* 2014).

2.3.3.3 La protéine acide fibrillaire gliale

Plusieurs équipes ont montré que le taux de la protéine GFAP, marqueur astrocytaire spécifique, est très augmenté dans le LCR des patients NMO en poussée en comparaison avec d'autres pathologies du SNC (Storoni *et al.* 2011; Melamed *et al.* 2015). Cette libération de GFAP serait le reflet de la destruction astrocytaire.

2.4 Immunopathologie de la NMO

La compréhension des mécanismes immunopathologiques de la NMO ne bénéficie pas de modèles animaux comme l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale qui se rapproche de la SEP. L'immunopathologie de la NMO est différente de celle de la SEP qui serait principalement médiée par les lymphocytes T avec une réactivité accrue de ceux-ci vis à vis d'antigènes myéliniques ainsi qu'une infiltration intra parenchymateuse de cellules immunitaires. La NMO serait plutôt une pathologie à composante lymphocytaire B, en effet plusieurs études ont démontré le rôle pathogène des anticorps anti-AQP4 mais le facteur déclenchant de la synthèse de ces Ac est encore inconnu.

2.4.1 Rôle Clé des Ac anti-AQP4

Les anti-AQP4 ne sont pas juste le reflet d'une auto-immunité non spécifique mais sont directement impliqués dans la physiopathologie de la NMO. De nombreuses équipes ont montré un effet directement pathogène de l'Ac anti-AQP4. Plusieurs mécanismes ont été proposés :

2.4.1.1 Par activation de la voie du complément

Les lésions de NMO sont caractérisées par des dépôts péri-vasculaires de complément dans les zones exprimant fortement l'AQP4. Cette activation de la voie classique du complément a été mise en évidence *in vitro* sur des cultures d'astrocytes et dans un modèle de BHE. Les IgG anti-AQP4 activent le complément et provoquent une atteinte de la membrane plasmique par dépôt du complexe d'attaque membranaire aboutissant à la lyse cellulaire (Hinson *et al.* 2008).

2.4.1.2 Par cytotoxicité à médiation cellulaire dépendant des Ac (ADCC)

La fixation des Ac sur leur cible va être capable d'entraîner une activation et une dégranulation des cellules natural killer (NK), des polynucléaires neutrophiles et des polynucléaires éosinophiles. Cette activation se fait grâce aux récepteurs FcRs présents à la surface des cellules immunes. La déplétion de l'une de ces trois populations cellulaires réduit de façon significative l'effet délétère des anti-AQP4 in vivo et in vitro.

2.4.1.3 Par la modulation de l'expression membranaire de l'AQP4

Certaines lésions de NMO sont caractérisées par la perte d'expression de l'AQP4 alors que les astrocytes sont toujours présents. Il a été démontré in vitro, sur des cellules non neuronales et sur des cultures d'astrocytes, que le contact avec du sérum contenant des anti AQP4 induisait une perte d'expression membranaire d'AQP4 (Hinson *et al.* 2008). Cet effet serait précoce et réversible. Cette perte d'expression est associée à la perte d'un transporteur du glutamate : la protéine excitatory amino acid transporter (EAAT2)/GLT1, provoquant une dysrégulation du transport du glutamate astrocytaire.

2.4.2 *Synthèse des différents mécanismes impliqués*

Il est probable que tous ces mécanismes se succèdent dans le temps et peuvent s'associer ou se potentialiser dans l'action délétère des Ac anti-AQP4.

Tout d'abord, l'anti-AQP4 ne provoquerait qu'une endocytose de l'AQP4 à l'origine d'une perte d'expression membranaire et donc d'une dysrégulation fonctionnelle de l'astrocyte, notamment au niveau du métabolisme de l'eau. Cette perturbation osmotique pourrait être à l'origine de symptômes cliniques liés à une rupture de la perméabilité de la BHE. Ces phénomènes seraient initialement réversibles puis, dans un second temps, le dysfonctionnement astrocytaire prolongé serait à l'origine d'une perturbation de l'homéostasie du glutamate et de phénomènes de cytotoxicité au niveau des oligodendrocytes et des neurones. Enfin ces différents mécanismes pourraient être influencés par l'isoforme de l'AQP4, la forme M23 étant capable de former des structures denses en réseau qui favoriseraient l'activation du complément alors que la forme M1 serait plus susceptible d'être internalisée (Hinson *et al.* 2012).

L'activation du complément favoriserait la libération de molécules chimio-attractives pour un grand nombre de cellules immunes comme les cellules NK, les granulocytes et les macrophages, ce qui aboutirait à une nécrose astrocytaire par mise en jeu de l'ADCC et une phagocytose de la myéline ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages (Hendriks *et al.* 2005).

Bien que les auto-Ac aient un rôle majeur dans la NMO, les LT auto-réactifs anti-AQP4 ont également un rôle actif :

- Des LT spécifiques anti-AQP4 peuvent être induits chez la souris, ils ont des propriétés encéphalitogènes et peuvent coopérer avec les Ac anti-AQP4 pour détruire les astrocytes.
- Des LT spécifiques anti-AQP4 ont également été identifiés chez l'homme, lorsqu'ils sont stimulés par des peptides AQP4, ils prolifèrent et sécrètent de l'IL-17 (Varrin-Doyer *et al.* 2012). Une augmentation de ces LTh-17 a également été retrouvée chez des patients NMO en poussée (Wang *et al.* 2011).
- Les LT spécifiques AQP4 ou MOG initient des phénomènes inflammatoires avec accumulation de polynucléaires éosinophiles, neutrophiles et de lymphocytes (Figure 8).

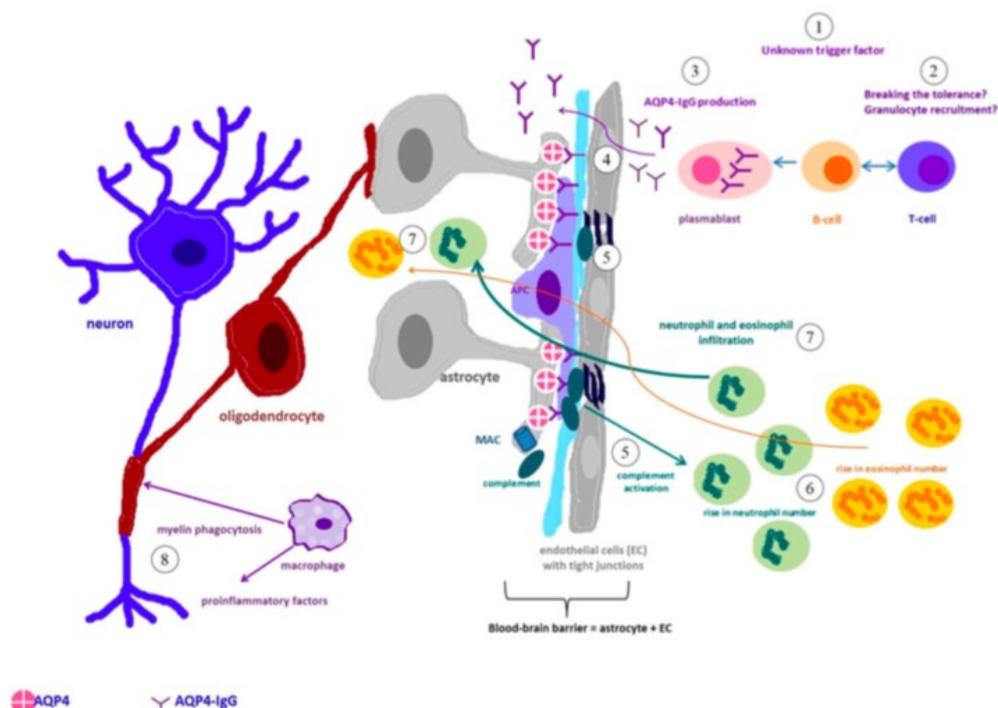


Figure 8 : Mécanismes immunopathologiques de la NMO (Jasiak-Zatonska, 2016).

1) Immunisation (origine inconnue), 2) Rupture de tolérance des LT, 3) Production des anti AQP4, 4) Transcytose des anti AQP4, 5) Activation du Complément, 6 et 7) infiltration des polynucléaires, 8) démyélinisation secondaire par phagocytose.

II Le lymphocyte B

Classiquement, les LB sont présentés comme des cellules mononuclées, présentes dans le sang et les tissus lymphoïdes, qui participent aux réponses immunitaires adaptatives en sécrétant des Ac suite à la rencontre avec leur Ag et à l'interaction avec les LT CD4+ auxiliaires. Les apports récents des recherches ont permis de réévaluer l'importance et les fonctions du LB en général comme dans la présentation des Ag ou l'orientation de la réponse immunitaire, tout particulièrement au cours des réactions immunitaires auto-immunes.

1 Ontogenèse des Lymphocytes B

In utéro, la lymphopoïèse B débute dans le foie fœtal. Après la naissance, elle prend place dans la moelle osseuse où, à partir d'une cellule souche lymphoïde, plusieurs stades se distinguent (lymphocyte pro-B, lymphocyte pré-B, LB immature) durant lesquels seront progressivement réarrangés les segments de gènes codant pour la partie variable de l'Ig (Nescakova & Bystricky 2011).

Ces réarrangements génétiques permettent d'obtenir des Ig dirigées contre une très grande variété d'Ag. Une fois ces réarrangements terminés (au stade de LB immature), l'Ig pourra être exprimée au niveau membranaire et constituera avec d'autres protéines associées, le BCR.

C'est au stade du LB immature que s'opère la première étape de contrôle de la tolérance au soi des LB. On estime que la moitié des BCR nouvellement formés sont auto-réactifs. Ainsi un des rôles majeurs du BCR à ce stade est d'éliminer ces cellules à risque. Il s'agit de la sélection négative qui peut se réaliser suivant trois procédés :

- La délétion clonale : les LB possédant un BCR auto-réactif de forte affinité sont éliminés par apoptose (Nossal 1987; Guerrier 2012).
- La révision du BCR : elle consiste en un réarrangement secondaire des segments de gènes codant pour la région variable de l'Ig afin d'en modifier la spécificité (von Boehmer & Melchers 2010).
- L'inactivation : La faible affinité du BCR pour l'auto-Ag est insuffisante pour induire un signal de délétion par apoptose et maintient les cellules dans un état non activable appelé anergie (Agliari *et al.* 2015).

2 Le développement périphérique des LB

2.1 Les LB transitionnels

Les LB immatures ou transitionnels quittent la moelle osseuse et se dirigent dans la rate pour continuer leur différenciation en LB folliculaire (LB Fo) ou en LB de la zone marginale (LB ZM) (Pieper *et al.* 2013) (Figure 9).

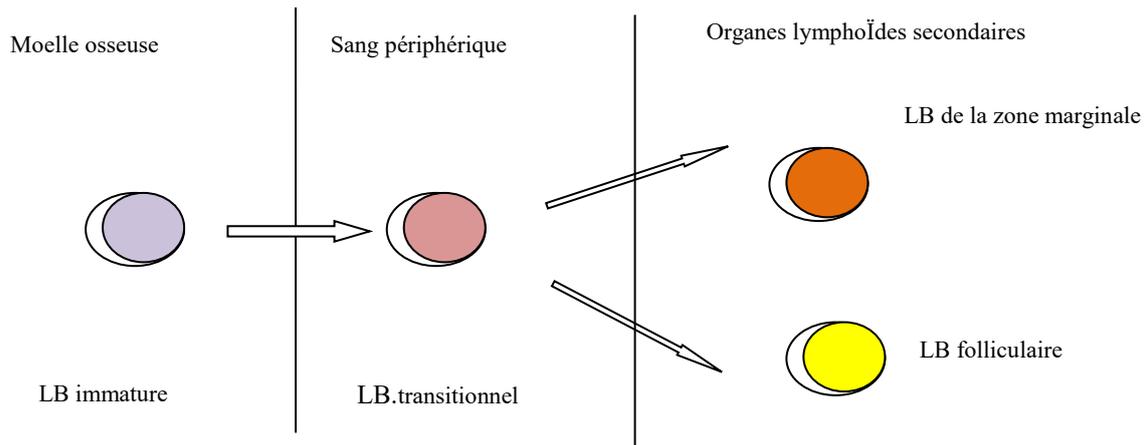


Figure 9 : l'ontogenèse du LB (Guerrier 2012).

Le LB immature quitte la MO pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires ou il donnera naissance au LB mature de la zone marginale et au LB folliculaire après le passage par le stade transitionnel dans le sang périphérique.

Chez l'homme on distingue deux sous-populations lymphocytaires transitionnelles : Les LB transitionnels de type 1 (LBT1) et les LB transitionnels de type 2 (LBT2) (Kaminski *et al.* 2012).

Le passage de LBT1 à LBT2 est un processus continu par lequel des marqueurs de surface disparaissent et apparaissent. Les LBT1 sont plus proches des LB immatures avec l'expression du CD24 et de l'IgM et les LBT2 se rapprochent des LB des centres germinatifs des (OLS) par l'apparition du CD21, CD23 et de l'IgD (Sims *et al.* 2005; Suryani *et al.* 2010). Ils peuvent être distingués phénotypiquement par les molécules ci-dessous :

- LBT1 : CD24⁺⁺⁺, CD38⁺⁺⁺, CD10⁺, CD21^{faible}, CD23^{faible}, IgM^{fort}, IgD^{faible}, CD44^{faible}, BR3⁺, CD5⁺.
- LBT2 : CD24⁺⁺, CD38⁺⁺, CD10^{faible}, CD21^{fort}, CD23^{fort}, IgM^{fort}, IgD^{fort}, CD44^{fort}, BR3^{fort}.

Les LB transitionnels, après avoir migré hors de la moelle osseuse, rejoignent les OLS et principalement la rate où ils subissent une deuxième étape de contrôle de la tolérance au soi. La fréquence des LB auto-immuns passent de 40% chez les LB transitionnels à 20% chez les LB matures naïfs.

Cette maturation est très dépendante de l'intensité du signal transmis par le BCR. Une perturbation des différents composants de la signalisation du BCR induit des blocages à différents stades du développement des cellules transitionnelles.

Les LBT2 vont ensuite se différencier soit en cellules folliculaires soit en cellules de la zone marginale. Les éléments qui influencent le choix entre la voie vers les LB Fo ou les LB ZM sont encore incomplètement identifiés. Un des facteurs serait la force du signal perçu par le BCR, plus le signal est fort, plus la population des LB Fo augmente au détriment des LB ZM (Cariappa *et al.* 2001). Aussi, des facteurs de transcription sont indispensables pour la différenciation dans l'une ou l'autre voie. Notch2 favorise la différenciation vers le LB ZM et le B-cell lymphoma 6 (Bcl6) celui de la voie du LB Fo (Saito *et al.* 2003).

Il existe d'autres facteurs favorisant la différenciation vers la voie des LB ZM, comme la cytokine BAFF du moins chez la souris (Batten *et al.* 2000; Paus *et al.* 2006).

2.2 Les LB folliculaires

Les LB Fo correspondent à la principale population des LB périphériques. Ils représentent 80 à 90% des LB spléniques. Les LB Fo naïfs re-circulent en permanence par le sang et la lymphe, dans les différents OLS à la rencontre de l'Ag et sont responsables des réactions immunitaires T dépendantes (Figure 10).

Les LB Fo peuvent être subdivisés en plusieurs sous populations grâce à leurs marqueurs membranaires dont l'expression évolue durant la différenciation lymphocytaire (Bohnhorst *et al.* 2001) (Tableau 3) :

- Les LB Fo naïfs appelés aussi LB matures1 (Bm1) présentent le phénotype suivant : IgD+, CD38-. Suite à la rencontre avec l'Ag dans la zone riche en LT de l'OLS, ils se différencient en LBm2.

- Les LBm2 : IgD+, CD38+ donnent naissance soit à des plasmocytes (IgD+, CD38+++), de courte durée de vie et sécrétant des IgM, soit à des LBm2'.

- Les LBm2' : (IgD+, CD38++) sont les cellules fondatrices du centre germinatif (CG) ou follicule secondaire. Au sein de cette structure, caractéristique des réponses T dépendantes, les centroblastes se trouvent autour des cellules dendritiques folliculaires.

- Les centroblastes ou LBm3 (IgD-, CD38++, CD77+) sont situés dans la zone sombre du CG, ils perdent l'expression de l'IgD et subissent une intense prolifération ainsi que des mutations somatiques sur les portions des gènes codant pour la partie variable du BCR qui modifient l'affinité du BCR. Ils deviennent des centrocytes.

- Les centrocytes ou LBm4 (IgD-, CD38++, CD77-), ayant une forte affinité pour l'Ag ont été sélectionnés grâce aux cellules dendritiques folliculaires présentatrices d'Ag. Ce processus est appelé la maturation d'affinité. Un autre phénomène se déroule à ce stade : la commutation de classe ou d'isotype. L'Ig, exprimée par les centrocytes, change d'isotype. Enfin, les centrocytes au niveau de la zone claire du CG se différencient soit en plasmocytes à longue durée de vie, soit en LB mémoires précoces puis en LB mémoires.

- Les plasmocytes (IgD-, CD38+++) à longue durée de vie correspondent au stade ultime de différenciation des LB. Ils sont spécialisés dans la sécrétion des Ac. Ils migrent dans la moelle osseuse où ils peuvent rester pendant plusieurs années (O'Connor *et al.* 2004).

- Les LB mémoires précoces et mémoires LBm5 (IgD-, CD38-) acquièrent l'expression du marqueur CD27. Ils expriment des Ig de forte affinité, re-circulent dans l'organisme et se différencient rapidement en plasmocytes quand ils rencontrent leur Ag.

Toutes ces réactions au sein du CG sont dépendantes des LT et plus particulièrement de l'interaction entre le CD40ligand (CD40L) du LT et le CD40 du LB.

Tableau 3 : évolution des marqueurs membranaires dans les différentes sous population de LB Fo .

	Bm1	Bm2	Bm3	Bm4	Bm5
CD19	+	+	+	+	+
IgM	+	+	+	+	+/(switch)
IgD	+	+	-	-	+/(switch)
CD38	-	+	++	++	-
CD27	-	-	-	-	+
CD77	-	-	+	-	-

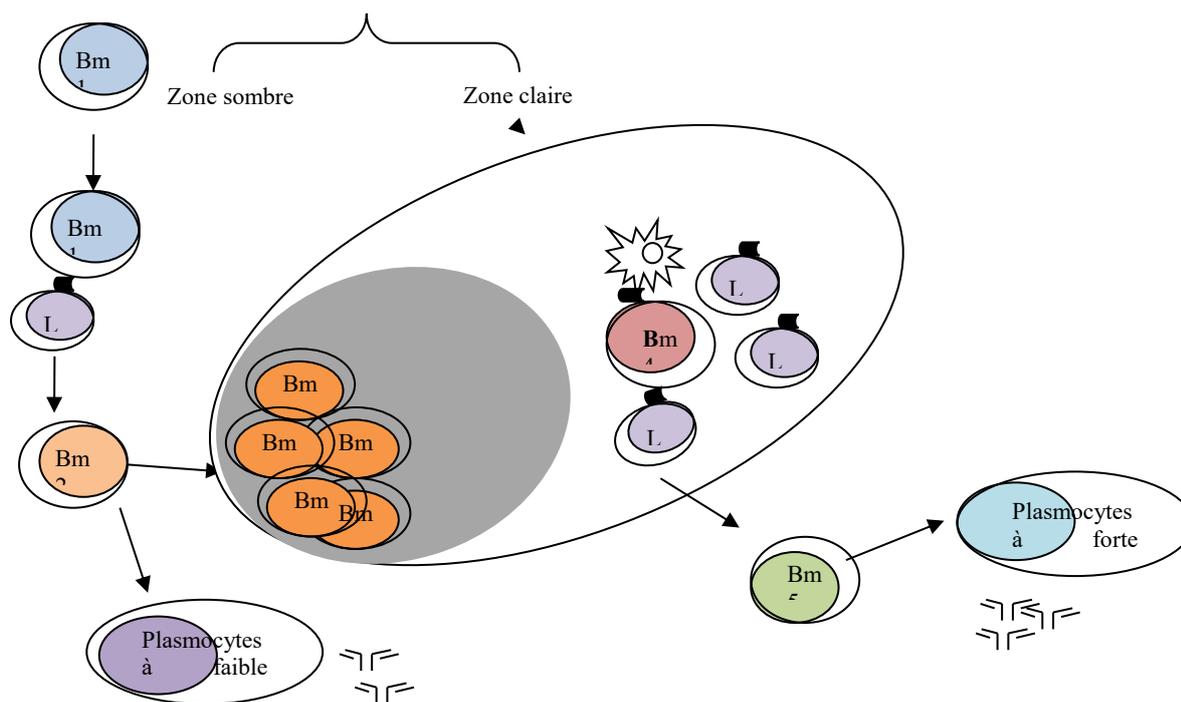


Figure 10 : Centre germinatif et les LB folliculaires.

Les LB Fo jouent un rôle majeur dans les réactions immunitaires par la production massive d'Ac mono-spécifiques de haute affinité. Cependant, la mise en place de cette réaction T-dépendante est longue. La sécrétion d'Ac ne devient significative qu'après une à deux semaines. D'autres populations de LB ont une sécrétion d'Ac plus rapide : les LB ZM et les LB1.

2.3 Les LB de la zone Marginale

La zone marginale de la rate sépare la pulpe rouge de la blanche. Elle renferme trois types cellulaires : des LB, des macrophages et des cellules stromales. Les LB ZM représentent environ 10% des LB spléniques. Le flux sanguin entre dans la rate par le sinus marginal puis traverse la ZM pour ressortir par le sinus veineux avant de rejoindre la circulation. Ainsi, les LB ZM sont spécialisés dans la réponse aux agents pathogènes provenant de la circulation sanguine (Mebius & Kraal 2005).

Ces LB ZM possèdent des critères phénotypiques particuliers (Tableau 4) :

Chez l'homme, ils sont : $CD21^{fort}$, $CD23^{faible}$, IgM^{fort} , IgD^{faible} , $CD27+$ et $CD1c^{fort}$. La caractéristique de leur phénotype a permis de les mettre en évidence dans le sang périphérique et de démontrer que ces cellules étaient capables de re-circuler (Weller *et al.* 2005).

Les LB ZM ont un répertoire antigénique restreint et sont capables d’avoir une sécrétion rapide et T-indépendante d’Ac poly-spécifiques de faible affinité (Zhang 2013). Ces Ac sont principalement dirigés contre des Ag polysaccharidiques. Comme ils sont poly-spécifiques, ils sont également souvent auto-réactifs et sécrètent des Ac dits naturels (Moore *et al.* 2001). Ces caractéristiques en font l’une des premières lignes de défense vis à vis des agents pathogènes circulants dans le sang (Lopes-Carvalho & Kearney 2004; Allman & Pillai 2008).

2.4 Les LB1

Les LB1 sont caractérisés par l’expression du marqueur CD5 et sont localisés dans les cavités pleurales et péritonéales (Rothstein *et al.* 2013). Ils sont responsables de la sécrétion d’Ac poly-réactifs, peu affins, souvent auto-réactifs et principalement de type IgM. Cette production est T-indépendante. Ces LB1 se rapprochent des LB ZM dans la défense contre les agents infectieux pulmonaires ou digestifs (Viau & Zouali 2005; Browning 2006). Phénotypiquement, les LB1 sont caractérisés par l’expression du CD27 et CD43. Ils sont divisés en LB1a exprimant le CD5 et LB1b ne l’exprimant pas (Alugupalli *et al.* 2003; Griffin *et al.* 2011).

Les lymphocytes B1 correspondent à une lignée bien distincte des lymphocytes B2 ou LB conventionnels qui regroupent les LB Fo et les LB ZM. En effet, ils possèdent des progéniteurs propres. Par ailleurs, ils sont difficiles à identifier chez l’homme puisque leur marqueur caractéristique CD5 est également exprimé sur les LBT, LB activés et les pré-B (Sims *et al.* 2005; Rothstein *et al.* 2013).

Tableau 4 : Phénotypes des LB chez l’homme, B immatures, transitionnels, mature et LB ZM.

	LB immatures	LBT1	LBT2	LB mature	LB ZM
CD19	+	+	+	+	+
IgM	++	++	++	+	+++
IgD	-	-	+	+	+
CD21	-	-	++	+	++
CD23	-	-	+	-	+
CD24	+++	+++	+++	+	-
CD38	+++	+++	+++	-	-
CD5	+	+	-	-	+
CD27	-	-	-	-	+
CD1c	-	-	-	-	+++

3 Fonctions du LB

3.1 La Sécrétion d'Ac

Les LB sont responsables de la production des Immunoglobulines (Ig) du même isotype que leur Ig de surface, à savoir les IgM, IgG, IgA et IgE. L'étude de la physiopathologie des maladies auto-immunes a permis de mieux comprendre ces pathologies mais également de mieux appréhender le fonctionnement normal du système immunitaire.

Au cours du LES, la pathogénicité des LB a été historiquement attribuée à la production d'auto-Ac et à la formation de CI qui initient la cascade inflammatoire. Cependant, il a été démontré que ces LB étaient également indispensables à l'hyper-activation des LT observée au cours du LES (Chan *et al.* 1999).

Les LB ont été longtemps considérés exclusivement comme étant une usine de production d'Ac, néanmoins ce point de vue a été reconsidéré et le LB s'est vu attribuer d'autres fonctions importantes (Youinou 2007).

3.2 Présentation d'Ag

Bien que nécessaire à l'activation du lymphocyte B, la signalisation du BCR n'est pas suffisante à elle seule pour induire la prolifération et la différenciation des LB. La réponse du LB envers la grande majorité des Ag requiert l'interaction avec les LT spécifiques de l'Ag.

Les LB sont capables d'internaliser leur Ag via le BCR, de l'apprêter et de présenter les peptides antigéniques aux LT (Schultz *et al.* 1990).

Cette présentation antigénique effectuée par les LB active le LT de façon précoce avant la mise en jeu des cellules dendritiques (Yan *et al.* 2006)

Par cette fonction, les LB pourraient être impliqués dans l'initiation des réponses immunes et notamment auto-immunes (Youinou 2007; Zotos & Tarlinton 2012). Les LB ZM, avec une densité plus importante de molécules de CMH II que les LB Fo, sont plus efficaces dans le rôle de cellules présentatrices d'Ag et peuvent par conséquent être impliqués dans la réponse auto-immune en tant que cellules présentatrices d'Ag (Youinou 2007).

3.3 Production des cytokines et polarisation de la réponse immunitaire

Historiquement, la polarisation des lymphocytes a d'abord été décrite chez les LT auxiliaires en fonction de leur sécrétion de cytokines.

Les LB, eux aussi, peuvent être sous divisés en deux populations : les LBreg qui secrètent de IL-10 et le transforming growth factor (TGF- β) et les LB effecteurs (Be), eux-même divisés en lymphocytes Be1 produisant IFN γ , IL-12 et TNF α et IL-2 et en lymphocytes Be2 qui produisent de l' IL-4, IL-10 et IL-6 (Lund 2008). Cette différenciation entre Be1 et Be2 est sous le contrôle de LT auxiliaires ou « helpers »Th-1 et Th-2 respectivement.

Les Lymphocytes Be1 et Be2 participent à leur tour à la polarisation de la réponse immunitaire et orientent les LTh0 vers Th-1 qui induit une réponse cellulaire ou Th-2 qui induit plutôt une réponse humorale. Ainsi se met en place un renouvellement cyclique concourant à l'équilibre de la balance Th-1 et Th-2 (Harris *et al.* 2000).

3.4 Les LB régulateurs (LBreg)

Beaucoup d'études ont été réalisées sur les LT régulateurs et leur rôle immunosuppresseur de la réaction immunitaire mais depuis quelques années, le rôle de régulation de certains LB a été également mis en évidence.

Ces LBreg secrètent de l'IL-10 et le TGF- β dans plusieurs modèles expérimentaux comme l'encéphalomyélite expérimentale de la souris ou dans des modèles de colite ou d'arthrites (Mauri *et al.* 2003).

A ce jour, nous n'avons pas de données permettant de classer les LBreg comme une sous-population de LB à part entière. Néanmoins, phénotypiquement, les LBreg se rapprochent des LB transitionnels CD19⁺ CD24^{fort}, CD27⁻, CD38^{fort}, CD1d^{fort} ou CD19^{fort}, CD24^{for}, IgD⁺, CD38^{fort}, CD5⁺ (Blair *et al.* 2010; Lemoine *et al.* 2011), ou de la population de LB mémoires CD19⁺, CD27⁺, IgM⁺ et CD19⁺, CD27⁺, IgD⁺ (Bouaziz *et al.* 2010; Khoder *et al.* 2014).

4 Les voies de signalisation du BCR

L'importance cruciale du BCR dans la survie et la différenciation du LB a été démontrée dans le chapitre précédent. Ce rôle repose sur plusieurs événements cellulaires allant de l'expression à la surface jusqu'à son internalisation et la présentation de l'Ag. Le BCR, récepteur à l'Ag du LB, est un complexe membranaire composé d'une Ig de surface associé à un hétéromère de Ig α et Ig β (CD79 a et b) lié par un pont disulfure, l'Ig α et Ig β sont protéines transmembranaires portant un motif Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (ITAM) à leur partie intracellulaire.

L'information concernant la rencontre du BCR avec l'Ag est envoyée aux protéines cytoplasmiques grâce à l'hétérodimère Ig α /Ig β qui active la signalisation intracellulaire.

Des études de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) démontrent qu'en l'absence d'Ag, les molécules de BCR paraissent dispersées dans la membrane plasmique. Suite à l'engagement de l'Ag, les LB remodelent leur cytosquelette en réunissant les molécules de BCR sous forme de clusters. Il se forme sous les molécules de BCR et dans le cytoplasme un complexe de signalisation composé de plusieurs acteurs comme la Spleen tyrosine kinase (Syk), Lyn, la phospholipase C (PLC)- γ 2, la B cell linker (BLNK). Ce complexe est appelé « signalosome » (Figure 11) (Harwood & Batista 2008).

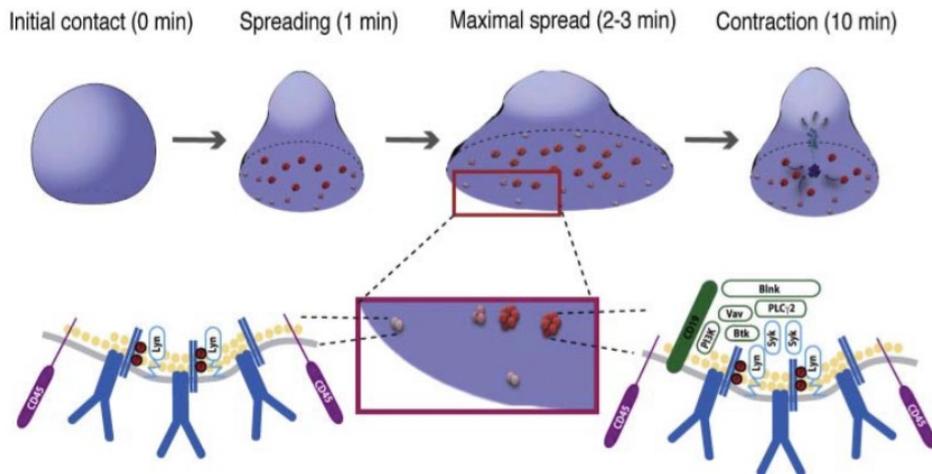


Figure 11 : Formation des signalosomes du BCR (Harwood & Batista 2008).

Cette agrégation des BCR induit la phosphorylation des tyrosines des motifs ITAM de Ig α /Ig β par une Tyrosine kinase de la famille de sarcoma (Src) en particulier Lyn, Fyn et Btk (B lymphoïd tyrosine kinase), les trois kinases les plus abondantes dans le LB (Figure12). Il est probable que le rapprochement de plusieurs Lyn induise leur auto-activation. La phosphorylation des motifs ITAM crée un site de liaison qui recrute la Tyrosine kinase Syk par son domaine SH2. L'activation de Syk déclenche une cascade d'autophosphorylation qui a pour rôle de recruter des protéines adaptatrices comme BLNK, Btk et PLC γ 2. Une fois recruté, le BLNK devient un substrat de Syk qui le phosphoryle et crée un site de liaison pour Btk qui recrute et active la PLC γ 2. Celle-ci hydrolyse les phospholipides de la membrane plasmique et génère de l'inositol triphosphaye (IP3) et du diacyl glycérol (DAG). L'IP3 se lie à ses récepteurs au niveau du réticulum et induit également la fuite du calcium du Reticulum endoplasmique (RE). Cette déplétion calcique des stocks intra-cellulaires est couplée à un flux calcique provenant de l'extérieur de la membrane plasmique (Figure 12).

L'élévation du niveau de calcium active la calcineurine qui facilite la translocation nucléaire du facteur NFATc. De plus, un des effets de l'activation de la PLC γ 2 est l'activation de la protéine Ras qui active la voie des protéines Mitogen-activated protein kinases (MAPK) et en particulier la protéine extracellulaire signal-regulated kinase (Erk)-1/2. L'activation de Syk et de PLC γ 2 a des conséquences sur la voie NF κ B à travers l'activation des protéines kinase C (PKC) qui activent ainsi NF κ B (Figure 13).

En résumé, la signalisation enclenchée par l'engagement du BCR met en jeu une multitude de molécules et de voies de signalisation allant de la membrane plasmique jusqu'aux facteurs de transcription. Ces voies de signalisation sont souvent interconnectées et exercent entre elles des réactions de rétro-contrôle (Figure 14). Ces voies de signalisation, en activant les facteurs de transcription activent la prolifération du LB et la sécrétion d'Ac (Taher *et al.* 2013).

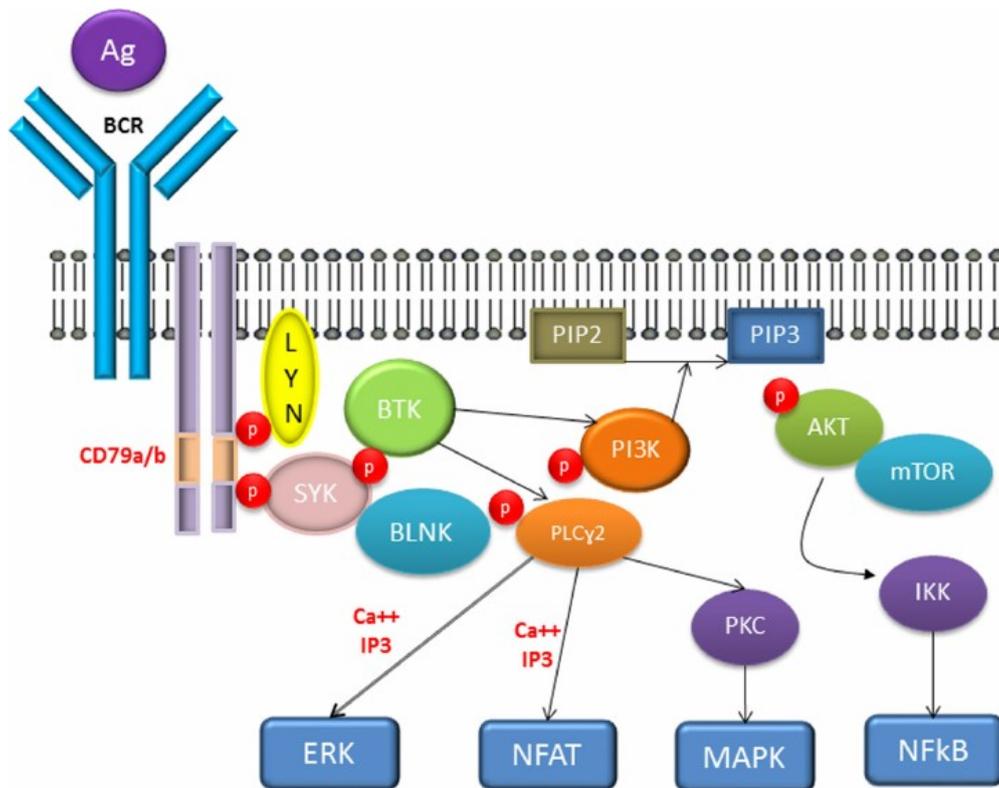


Figure 12 : Activation des Kinases (Pinilla-Ibarz *et al.* 2013).

L'engagement du BCR induit sa phosphorylation et la phosphorylation d'autres protéines kinases, ce qui va initier le recrutement des protéines adaptatrices comme BLNK aboutissant à l'activation de la voie des MAPK et NF κ B.

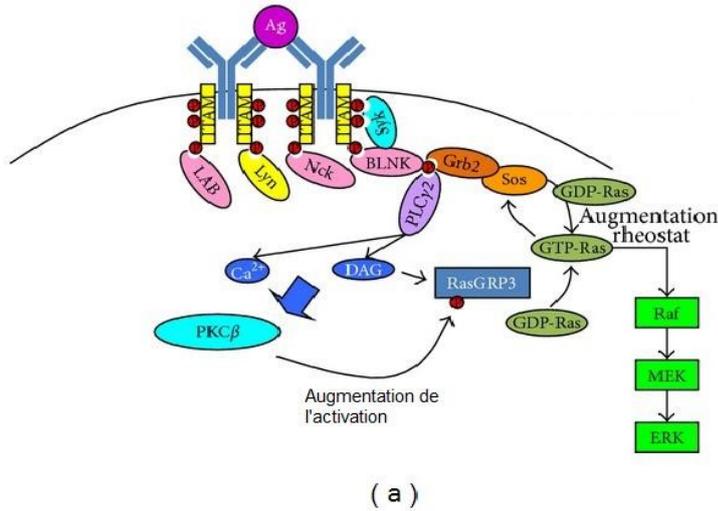


Figure 13 : voies de signalisation distales du BCR (Slupsky 2014).

L'activation de la voie de PKC induit une phosphorylation du GDP-Ras en GTP-Ras qui, exerce un rétrocontrôle positif en activant la voie de Grb-Sos, cette augmentation intracellulaire de GTP-Ras induit l'activation de la voie de MAP kinase.

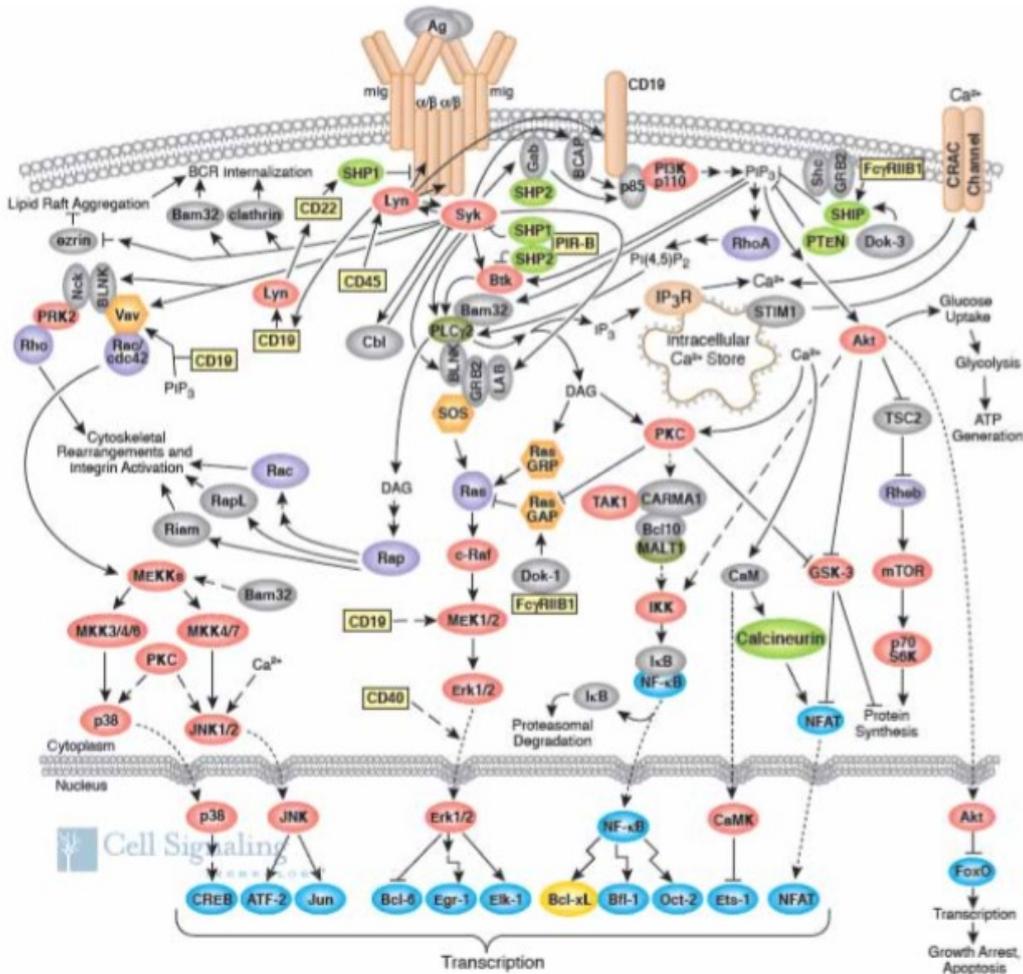


Figure 14 : La complexité de la signalisation du BCR (Cell Signaling Technology).

Les protéines kinases (en rouge), les protéines phosphatases (en vert), les protéines adaptatrices (en gris), les GTPases (en violet), les facteurs de transcription (bleu), les co-récepteurs membranaires (rectangles jaunes).

4.1 Corécepteurs activateurs et inhibiteurs

A côté des protéines cytoplasmiques, des protéines de signalisation transmembranaires participent au contrôle du signal BCR (Figure 15). En effet, les récepteurs qui entourent le BCR possèdent, soit des motifs ITAM qui recrutent des protéines kinases pesant en faveur de l'augmentation du signal BCR, soit des motifs Immunoreceptor tyrosine Inhibition Motif (ITIM) qui recrutent des phosphatases comme la protéine phosphatase ou SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase (SHP-1) et la protéine inositol-phosphatase à domaine SH2 (SHIP) agissant en faveur d'une inhibition du signal.

4.1.1 Co-récepteurs activateurs

Le plus important est le **co-récepteur CD19**, une glycoprotéine exprimée depuis le stade pré-B jusqu'au stade de plasmocyte. Le CD19 est présent à proximité du BCR parmi un complexe comprenant les co-récepteurs CD21 et CD81.

La protéine CD21 est le récepteur d'un produit de clivage du complément C3d. Lorsque le complexe CD19/CD21 est engagé avec le BCR par un Ag couplé au C3d, le seuil d'activation du BCR est réduit de 10^4 fois (Fearon 2000). Le CD19 est rapidement phosphorylé et régule le signal BCR en amplifiant l'activation des tyrosines kinases Lyn. La molécule CD81 permet de stabiliser le CD19 et de l'emmener dans les radeaux lipidiques en optimisant ainsi l'activation du signal BCR (Cherukuri *et al.* 2004)

Le rôle de la **phosphatase membranaire CD45** est quant à lui contradictoire en fonction du stade de maturation du LB. Cette phosphatase contribue à la régulation positive du signal du BCR dans les lymphocytes matures en activant les phosphoinositol-3 kinase (PI3K), Erk1/2 et NFkB et en agissant sur les phosphorylations inhibitrices des Src kinases, contrairement aux cellules immatures où elle exerce un effet inhibiteur sur les protéines kinases et en particulier Lyn (Katagiri *et al.* 1999; Huntington *et al.* 2006).

4.1.2 Les Co-récepteurs inhibiteurs

Une réponse immunitaire exagérée des LB et la sécrétion d'auto-Ac sont observées dans des cas de mutations et de perte de fonction de certains gènes qui codent pour des molécules impliquées dans la régulation négative du BCR. A ce jour, il a été recensé plus de récepteurs inhibiteurs que d'activateurs. Les récepteurs inhibiteurs les plus importants sont : le récepteur FcγRIIb1, le CD22, le CD5, le CD72, le PIR-B (paired immunoglobulin like receptor-B) et le PD-1(Programmed cell Death 1) (Figure 15) (Xu *et al.* 2005).

La boucle de régulation négative la plus connue est celle qui agit directement sur le couple ITAM/Syk. Cette boucle met en jeu la tyrosine phosphatase SHP-1 qui se lie aux motifs ITIM des co-récepteurs du BCR : le **CD22**, le **CD72** ou **PIR-B** (Cornall *et al.* 1998). De façon surprenante, il a été montré que Lyn exerce un effet de rétro-contrôle négatif sur le signal du BCR à travers ces récepteurs inhibiteurs. La dualité fonctionnelle de Lyn a été illustrée par les phénotypes de souris déficientes en Lyn qui présentent un développement normal des cellules B dans la moelle mais une diminution en cellules matures B périphériques. De plus, ces cellules B périphériques seraient auto-réactives et échapperaient à la sélection négative médullaire (Chan *et al.* 1997).

Lyn phosphoryle les motifs ITIMs du **FcγRIIb** qui recrute SHIP-1, ce qui induit le blocage de la voie PI3K/Akt. Lyn phosphoryle aussi le motif ITIM de CD22 qui recrute SHP-1 qui à son tour déphosphoryle Syk en induisant une extinction du signal du BCR.

PIR-B exerce aussi son effet inhibiteur sur la voie PLCγ2 via le recrutement de SHP-1 (Maeda *et al.* 1999). Les mécanismes d'inhibition de **CD72** seront développés dans le chapitre V.

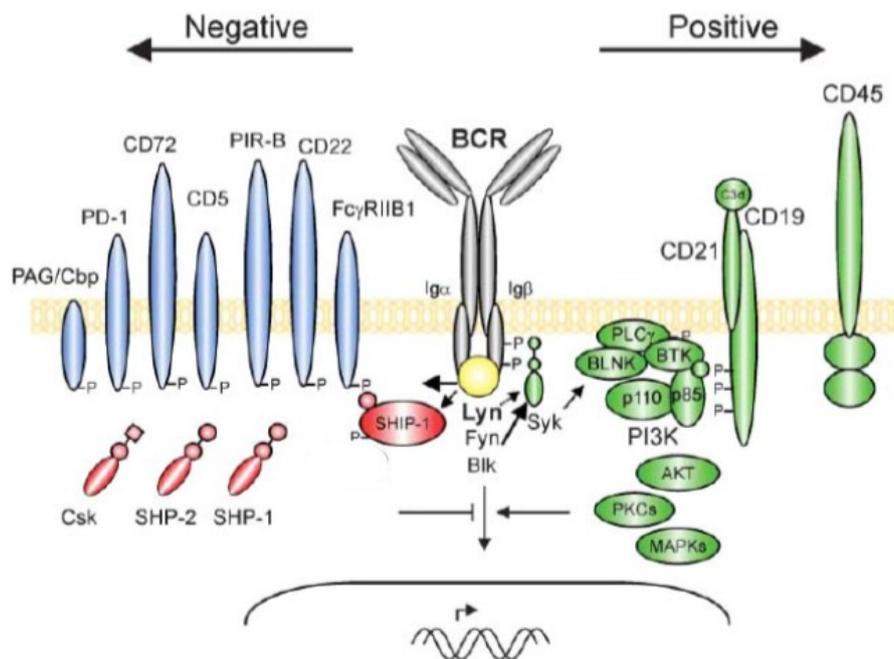


Figure 15 : Co-récepteurs activateurs et inhibiteurs du BCR (Xu *et al.* 2005).

En vert les corécepteurs activateurs, en bleu les corécepteurs inhibiteurs, en rouge les phosphatases recrutées par les corécepteurs inhibiteurs.

5 Rôle du LB dans le lupus érythémateux

Historiquement au cours des MAI, la pathogénicité des LB était attribuée à la production d'auto-Ac et à la formation des CI qui initiaient la cascade inflammatoire. Depuis quelques années, des études ont montré que les LB étaient indispensables à l'hyperactivité des LT et avaient le pouvoir de polariser la réponse immunitaire (Tobon *et al.* 2013). Le LB peut être impliqué dans le développement de la maladie auto-immune par au moins deux mécanismes, la production d'auto-Ac et la présentation de l'Ag.

En premier lieu, les LB dits « innés » comme les LB1 (B CD5+) et les LB ZM sont des lymphocytes qui sécrètent des Ac polyspécifiques fréquemment auto-réactifs.

Nous avons vu précédemment (dans le chapitre fonction des LB) que ces sous-populations de LB, grâce à leur position intermédiaire entre l'immunité innée et adaptative, étaient les plus efficaces dans la présentation des auto-Ag aux LT et l'enclenchement des processus pathologiques auto-immuns (Strzelecka *et al.* 1997; Sato *et al.* 2004).

Dans les modèles murins spontanément lupiques comme les New Zealand Black/White (NZB/W) ou les souris BAFF transgéniques, il existe une augmentation du compartiment de la zone marginale corrélée à l'augmentation des Ac Anti-ADN natif (Wither *et al.* 2000; Zeng *et al.* 2000; Enzler *et al.* 2006; Zheng *et al.* 2014).

Par ailleurs les modèles de souris transgéniques ou déficientes pour les molécules qui régulent la signalisation du BCR ont mis en évidence le rôle que peut jouer cette signalisation du LB dans les MAI. Des polymorphismes dans les gènes codant pour le FcγRIIb, le PD-1, CD22, CD19 et Lyn ont été trouvés chez des patients atteints de MAI (Grimaldi *et al.* 2005). La signalisation du BCR des patients LES présentent un flux calcique et un taux de phosphorylation des protéines cytosoliques exagérés, une diminution du signal inhibiteur de FcγRIIb, une diminution de l'expression de Lyn et une augmentation du facteur de stimulation et de survie des LB, la cytokine BAFF (Pugh-Bernard & Cambier 2006). La figure 16 résume la majorité des voies et protéines impliquées dans l'altération de la régulation du signal du BCR liée à l'apparition du lupus du lupus.

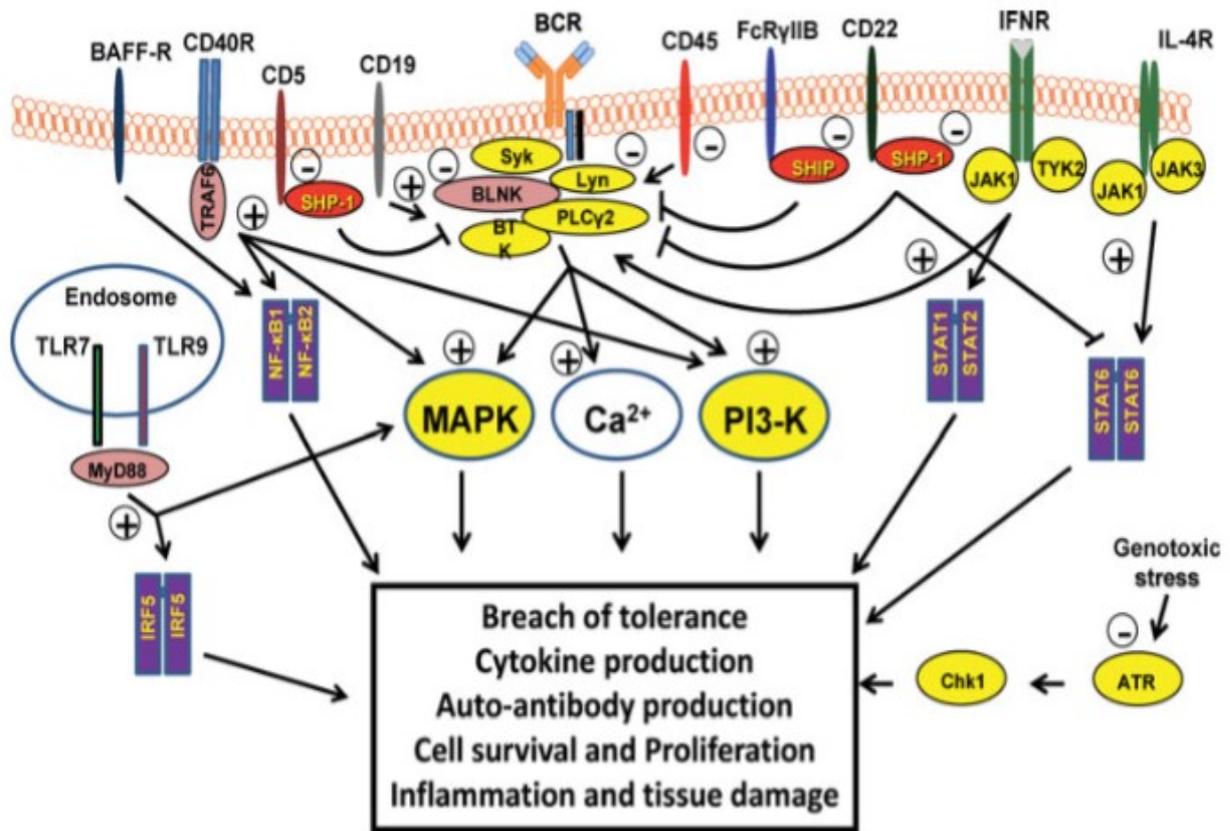


Figure 16 : les protéines et voies de signalisation dont la régulation est altérée dans le lupus (Taher *et al.* 2013).

En jaune les protéines kinases, en rouge les phosphatases, en violet les facteurs de transcriptions, en rose les protéines adaptatrices. Les flèches indiquent un signal positif, les flèches avec bout en T indiquent un signal inhibiteur. Le + indique une augmentation de l'expression de la protéine, le - une diminution de l'expression de la protéine dans le cadre du lupus.

III Les récepteurs pour le Fragment Fc des Ig

Les récepteurs pour le fragment cristallisable (Fc) des Ig sont des glycoprotéines présentes à la surface des cellules immunitaires facilitant leur interaction avec les cellules effectrices du système immunitaire. Ils appartiennent en majorité à la superfamille des immunoglobulines et certains à la famille des lectines (Brown *et al.* 2007; Li *et al.* 2009).

Alors que les fragments Fab des Ig sont impliqués dans la spécificité de la réponse humorale, la partie Fc, par son interaction avec les différents récepteurs à la surface des cellules va induire de nombreux événements comme la clairance de pathogènes ou de toxines, la dégradation des cellules cancéreuses et infectées ainsi que la modulation de l'immunité innée ou adaptative. Les récepteurs sont classés selon la spécificité isotypique de leur ligand. Ainsi les récepteurs sont nommés Fc γ R, Fc α R, Fc μ R et Fc ϵ R respectivement pour les récepteurs des IgG, IgA, IgM, et IgE (Figure 17) (Ivan & Colovai 2006). Ils peuvent être membranaires ou solubles et jouent un rôle dans la régulation des différentes réponses immunitaires cellulaires et humorales comme la phagocytose, la dégranulation, l'ADCC, la régulation transcriptionnelle des cytokines et chemokines, l'activation des LB et la clairance de CI.

Dans ce paragraphe, nous développerons surtout les récepteurs pour le Fc des IgG (Fc γ Rs) qui font l'objet d'une partie de notre travail.

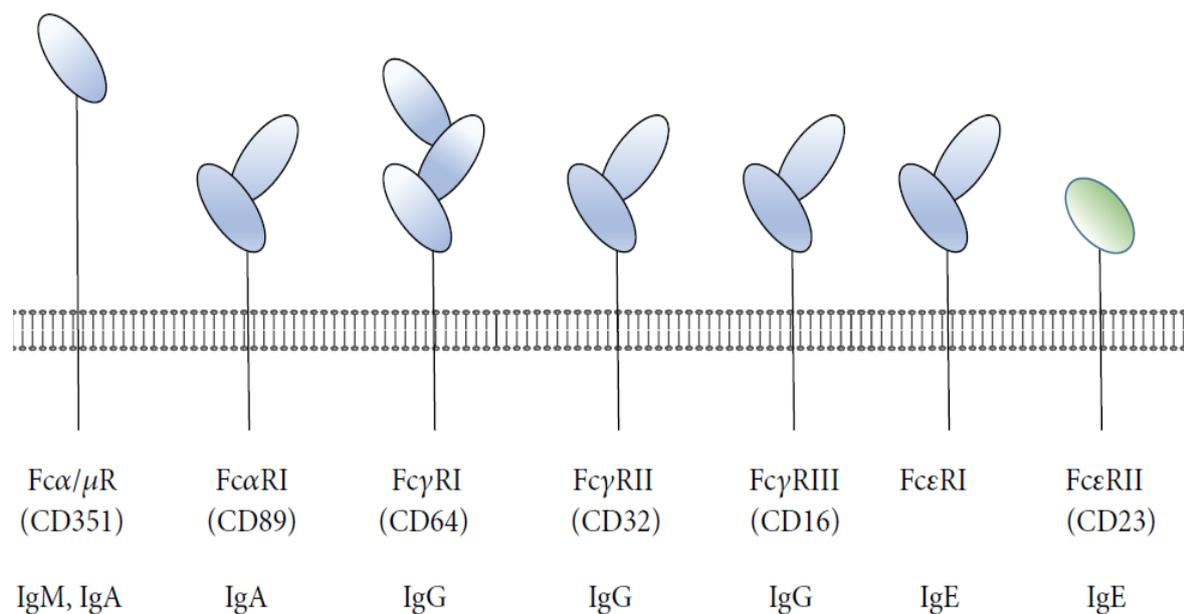


Figure 17 : les récepteurs Fc d'après (Kaetzel 2014) modifié.

1 Les récepteurs pour les Ig autres que les IgG

1.1 Les récepteurs pour le Fc des IgM

On en distingue plusieurs :

- **Le récepteur polymérique**, exprimé à la surface baso-latérale des cellules épithéliales des muqueuses, participe au transfert dans la lumière des Ig polymériques IgM et IgA.
- **Le récepteur Fc μ R**, découvert en 2007. Il est exprimé sur les LB ZM des organes lymphoïdes secondaires, sur les cellules dendritiques ainsi qu'au niveau des cellules épithéliales des tubules rénaux mais pas des glomérules. C'est une protéine membranaire de 70kDa appartenant à la super famille des Ig et se fixant au niveau des parties constantes C α 2-C α 3 pour les IgA et C μ 3-C μ 4 pour les IgM. Les fonctions de ce récepteur ne sont pas encore bien définies en dehors de son rôle dans l'endocytose des CI à IgM par les cellules dendritiques folliculaires (Honda *et al.* 2015).
- **Le récepteur Fc μ R**, est une protéine membranaire de 60 kilodalton (kDa) distincte du Fc μ R, codée par le gène situé sur le chromosome 1q32.2. Il est exprimé sur les LB et les LT, doté d'un domaine extracellulaire fortement affin pour les IgM et d'un grand motif intracellulaire sans motifs ITIM ni ITAM (Klimovich 2011; Kubagawa *et al.* 2015). Son rôle probable dans la régulation des réponses immunitaires reste encore à préciser.

1.2 Les récepteurs pour le Fc des IgA

La famille des récepteurs pour le Fc des IgA comprend plusieurs récepteurs dont le récepteur pour **les Ig polymériques** précédemment cité et impliqué dans le transport épithélial trans-cellulaire des IgA et IgM, le récepteur spécifique myéloïde **Fc α RI** (CD89), le **récepteur Fc α R**, l'**asialoglycoprotéine récepteur** et le **récepteur de la transferrine** impliqués dans le catabolisme et le dépôt tissulaire des IgA.

Le **Fc α RI** est un récepteur de faible affinité, constitué d'une chaîne alpha et de sous unités γ porteuses de motifs ITAM intracellulaires (Figure 18) et exprimé sur les neutrophiles, les éosinophiles, les monocytes, cellules dendritiques et les cellules de Kupffer. L'activation des cellules par sa liaison favorise la phagocytose, l'ADCC, la dégranulation cellulaire et le catabolisme des IgA (Monteiro & Van De Winkel 2003).

1.3 Les récepteurs pour le Fc des IgE

Ce sont des récepteurs clés dans les mécanismes des phénomènes allergiques. Il existe deux récepteurs : le **FcεRI** de forte affinité et le **FcεRII** (CD23) de faible affinité.

Le FcεRI est un complexe multimérique constitué d'une chaîne alpha pour lier les IgE et d'une chaîne beta et gamma pour la transduction du signal (Figure 18).

Ce récepteur est exprimé majoritairement sur les mastocytes, les basophiles, les polynucléaires éosinophiles et neutrophiles, les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les plaquettes et les cellules de Langerhans. C'est le pontage des récepteurs par les IgE et les allergènes qui initie la cascade d'activation des cellules par l'intervention des motifs ITAM (Nadler *et al.* 2000).

Le FcεRII ou CD23 est un récepteur de faible affinité jouant un rôle important dans la régulation de la sécrétion des IgE. Il est exprimé sur les LB et peut être clivé de la surface cellulaire et retrouvé sous forme soluble dans le sérum.

1.4 Le récepteur néonatal (FcRn)

C'est un récepteur qui a une structure similaire au CMH de classe I (Figure 18). Il est co-exprimé avec la β2 microglobuline. Sa première fonction décrite a été le transport passif des Ig de la mère vers le fœtus pendant la grossesse. Puis, il a été impliqué dans plusieurs processus immunologiques. Il est responsable de la transcytose, du recyclage des Ig ainsi que de la durée de leur demi-vie dans le sérum. Chez l'adulte il joue un rôle de protéine chaperonne protégeant les IgG du catabolisme et assurant leur transfert vers les cellules cibles. De ce fait, il joue un rôle important dans la bio-destruction et la demi vie des agents thérapeutiques (Wang *et al.* 2014).

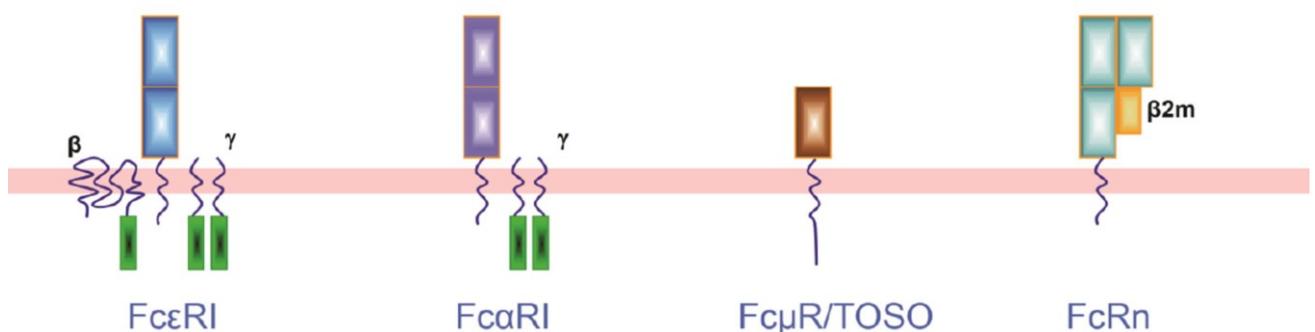


Figure 18 : FcR d'après (Li & Kimberly 2014).

2 Les récepteurs pour le Fc des IgG ou FcγR

Les FcγRs sont les récepteurs les plus importants de la famille des FcRs de part l'abondance des IgG qui représentent 75% des Ig sériques.

Ce sont des récepteurs très variés qui ont été classés en fonction de leur structure, de leur affinité vis à vis des différentes sous classes d'IgG, de leur type de liaison ainsi que de leur fonction (activatrice ou inhibitrice) sur les cellules à la surface desquelles ils sont fixés.

En dehors de la plupart des récepteurs qui sont membranaires, un récepteur est intracellulaire : la protéine Tripartite motif containing protein 21 (TRIM21) ou encore Ro52, récepteur intracellulaire pour les IgG et plus particulièrement pour les sous classes IgG1 et IgG2 (Figure 19). Elle se lie à ces dernières après leur internalisation (Guilliams *et al.* 2014). C'est un trimère qui se lie au niveau du site de la protéine A sur la partie Fc des IgG. C'est une ubiquitine ligase qui est retrouvée dans plusieurs organes et tissus mais elle est surexprimée dans les cellules du sang périphérique des patients atteints de maladie auto-immunes et dans les lésions cutanées des patients atteints de LES (Ghillani *et al.* 2011). Quand des virus recouverts d'Ig sont internalisés dans les cellules infectées, la protéine TRIM21 est rapidement recrutée pour neutraliser ces virus avant leur réplication et initier leur dégradation dans le protéasome (Foss *et al.* 2015).

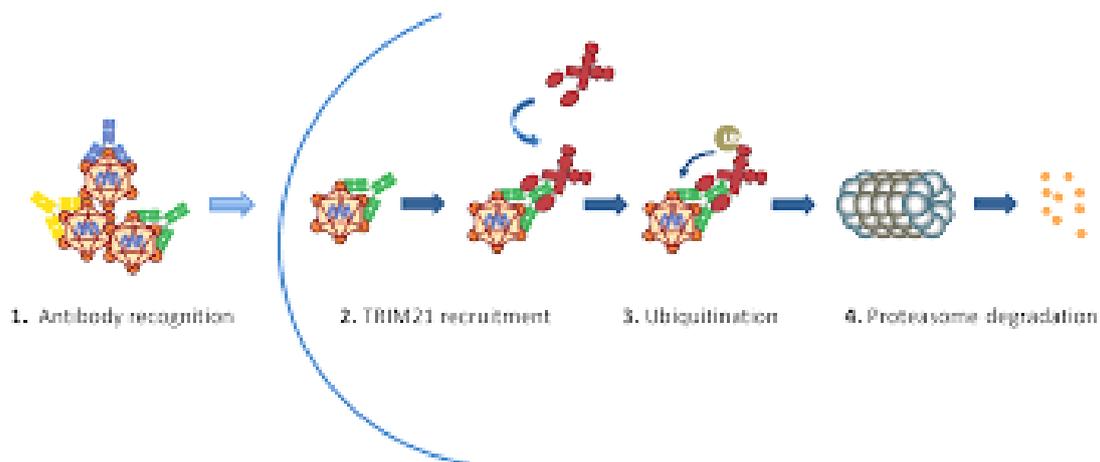


Figure 19 : Recrutement de TRIM 21 après reconnaissance par les Ac et leur internalisation (McEwan *et al.* 2011).

Après sa reconnaissance par les Ac les virus sont internalisés, la protéine TRIM21 est recrutée pour neutraliser et le diriger vers le protéasome où il sera dégradé.

En dehors de ce récepteur intracellulaire, deux groupes de récepteurs classiques pour les IgG ont été décrits (Figure 20).

- **Les récepteurs de type I** qui appartiennent à la super famille des Ig, ils sont représentés par les récepteurs classiques FcγR comprenant les récepteurs activateurs FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIIIa, FcγRIIIb et le récepteur inhibiteur FcγRIIb. Chacun de ces récepteurs se lie au Fc près de sa région charnière avec un ratio stoechiométrique de 1/1 (récepteur/IgG).

- **Les récepteurs de type II** appartiennent à la famille des récepteurs de type C lectine et réunissent le CD209 (DC-SIGN) et le CD22. Ils se lient aux variants d'IgG anti-inflammatoires riches en acide sialique. Ces récepteurs se fixent entre les domaines CH2-CH3 du Fc dans un rapport de 2/1 (Pincetic *et al.* 2014).

A côté de ces récepteurs classiques, il existe une famille de récepteurs non classiques et récemment découverte il y a une dizaine d'années, **les FcR like (FcRL)**. Ces récepteurs appartiennent à la super famille des Ig. Ils sont surtout exprimés sur les LB et auraient des fonctions plutôt répressives bien qu'ils possèdent souvent les deux motifs ITAM et ITIM. Il existe 8 gènes différents codant pour les FcRL1 à 6, FcRLA et FcRLB. Leurs ligands ne sont pas encore tous déterminés (IgG et IgA agrégées) de même pour leur distribution et leurs fonctions exactes sur la régulation des LB (Li *et al.* 2014; Capone *et al.* 2016). Nous ne développerons dans cette introduction que la famille des récepteurs classiques de type I : les FcγRs qui font l'objet de notre étude.

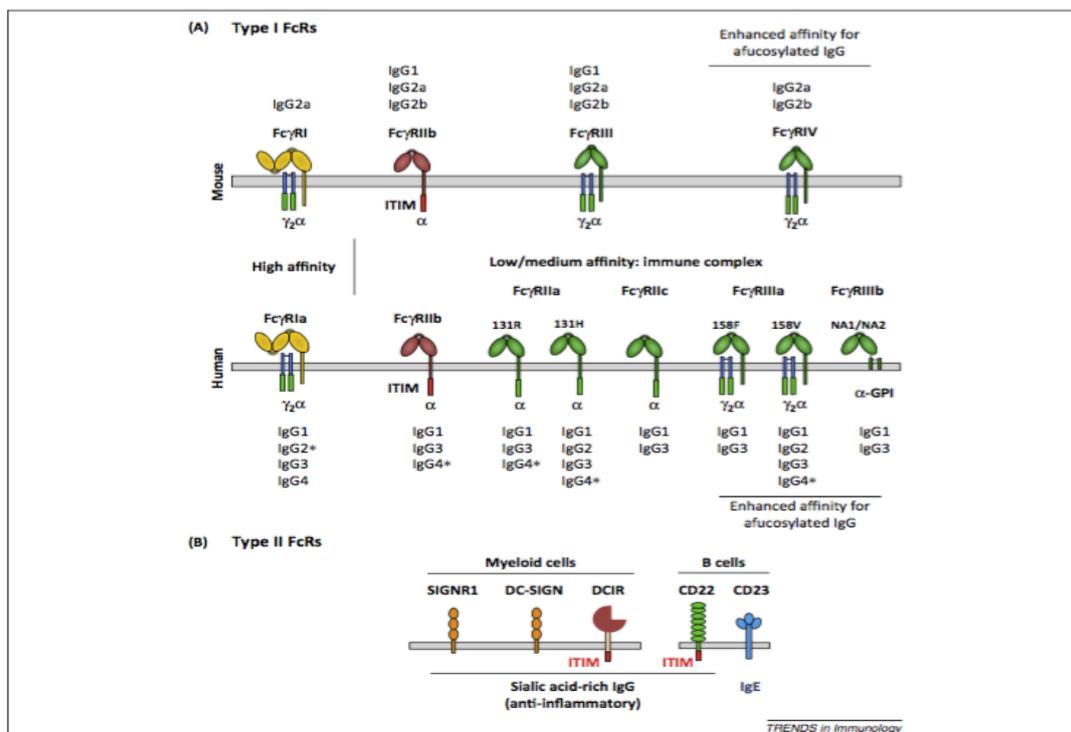


Figure 20: FcR de type I et de type II (Nimmerjahn *et al.* 2015).

Ce sont donc des glycoprotéines dont la portion extracellulaire est constituée d'une chaîne α contenant deux à trois domaines d'immunoglobulines, d'un domaine transmembranaire indispensable au déplacement du récepteur et à son rapprochement des autres récepteurs membranaires au sein des radeaux lipidiques de la membrane cellulaire et d'une partie intracellulaire portée par la chaîne α ou une chaîne γ associée responsable de la transduction du signal de l'activation des différentes voies de signalisation. Cette dernière partie contient un motif ITAM ou ITIM qui détermine l'activité du récepteur (Li *et al.* 2009) (Figure 21).

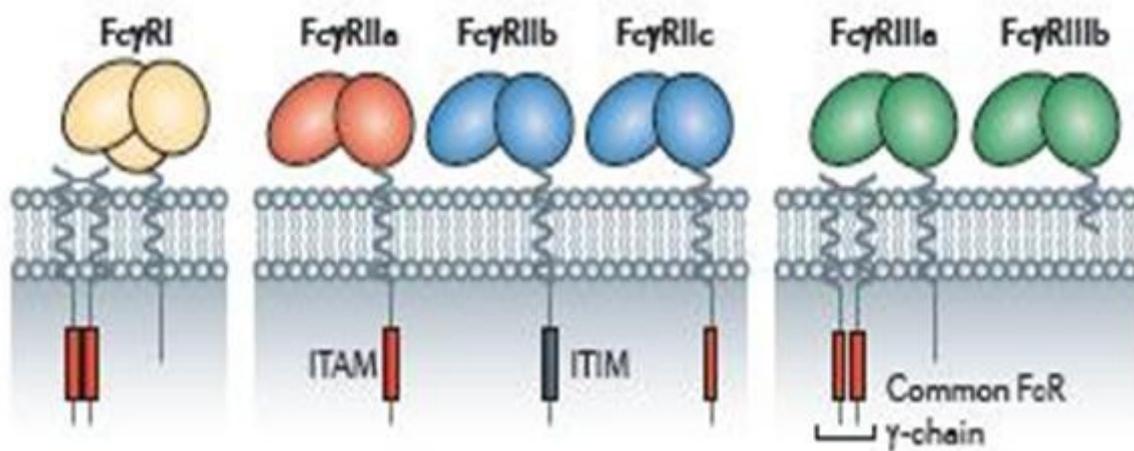


Figure 21 : Fc γ Récepteurs (Hogarth & Pietersz 2012).
Fc γ récepteurs à haute affinité Fc γ RI, et Fc γ récepteurs à faible affinité (Fc γ RII et III).

2.1 Localisations génétiques et expression cellulaire

Les 3 familles de Fc γ R sont codées par 8 gènes distincts tous localisés sur le chromosome 1 :

- Les gènes FCGR1A, FCGR1B et FCGR1C qui codent pour des récepteurs de haute affinité appelés Fc γ RI (CD64).
- Les FCGR2A, FCGR2B, FCGR2C codant pour les récepteurs de faible affinité appelés Fc γ RII (CD32).
- Les FCGR3A et FCGR3B codent pour les Fc γ RIII (CD16) (Figure 22).

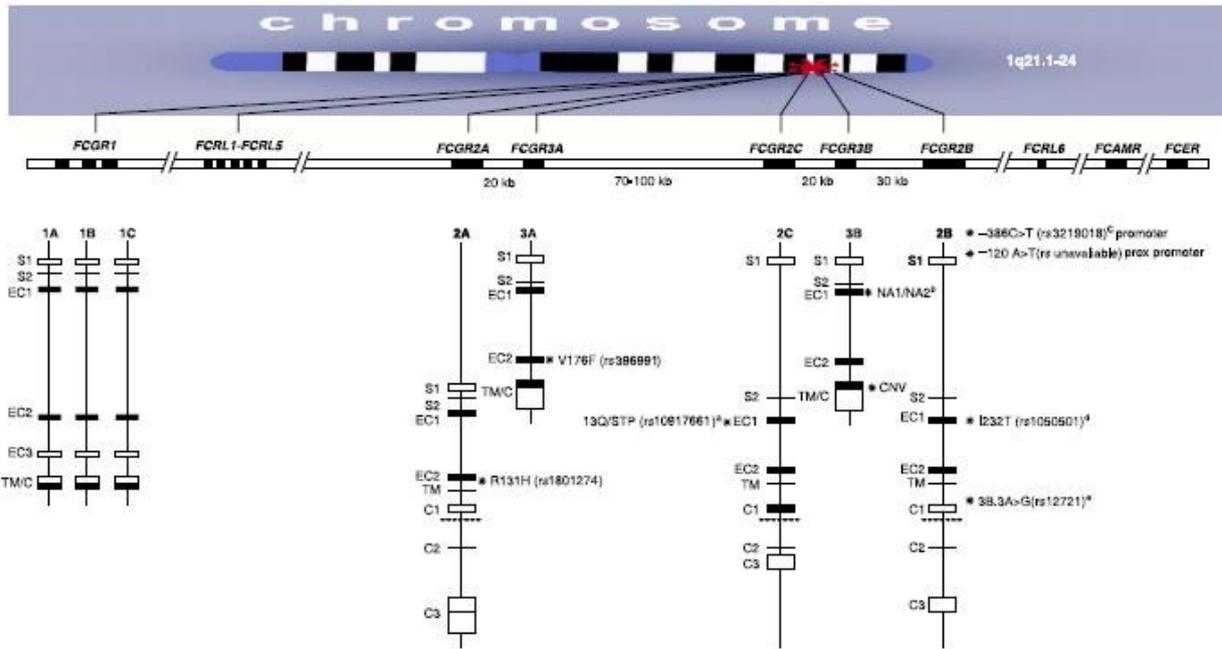


Figure 22 : Localisation des FCGR : le locus FCGR est à 1q21-24 (Brown et al. 2007).

Représentation schématique des séquences pour : S : peptide signal, EC : domaine Extra-Cellulaire, TM : Transmembranaire, C : cytoplasmique.

2.1.1 Les FcγRI

Les trois gènes 1A, 1B et 1C sont localisés de part et d'autre du centromère du chromosome 1, FCGR1B dans la région 1p12 et FCGR1A/1C localisés dans la région 1q21. Ils sont constitués de 6 exons : deux codant pour le peptide signal (S1 et S2), trois pour la partie extracellulaire (EC1, EC2 et EC3) et un pour la partie transmembranaire et cytoplasmique (TM/C).

Les FCGR1B et FCGR1C présentant un codon stop dans l'exon EC2, seul le FCGR1A semble coder le récepteur intégral (Ernst *et al.* 1992).

Le FcγRI est une glycoprotéine membranaire de 72 kDa, constituée d'une chaîne α extra cellulaire qui possède trois domaines, d'une région transmembranaire comprenant un résidu chargé et d'une courte région intra-cytoplasmique. Le résidu chargé permet au récepteur de s'associer à des dimères d'une chaîne transductrice FcR-γ. Cette chaîne possède une très courte région extracellulaire, une région transmembranaire et une région intra-cytoplasmique comportant un motif de transduction ITAM impliqué dans l'activation cellulaire après l'agrégation des récepteurs par des CI.

Le FcγRI est le seul récepteur possédant une haute affinité, capable de se lier de façon très forte aux IgG monomériques $K_a=10^9 \text{ M}^{-1}$. Il est exprimé sur les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles activés. Son expression est augmentée par l'IFN-γ ou le granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) (Li & Kimberly 2014).

2.1.2 Les FcγRII

Cette famille de récepteurs est composée des FcγRIIa, FcγRIIb et FcγRIIc codés par trois gènes FCGR2A, FCGR2B et FCGR2C.

Les gènes FCGR2A et FCGR2B sont orientés dans le même sens transcriptionnel alors que le FCGR2C est inversement orienté. Chaque gène est constitué de 8 exons : deux codant pour le peptide signal (S1 et S2), deux codant pour la partie extracellulaire (EC1 et EC2), un pour la partie transmembranaire (TM) et trois pour la partie cytoplasmique (C1, C2 et C3).

Le gène FCGR2C est né d'un croisement non équilibré entre le FCGR2A et FCGR2B. Le produit résultant est une protéine ayant une partie extracellulaire hautement homologue à celle du FcγRIIb et une partie cytoplasmique plus proche de celle du FcγRIIa (Figure 21) (Su *et al.* 2002; Li *et al.* 2009).

Le FCGR2A code pour deux transcrits de 1,8 et 2,5 kb résultant de deux sites de polyadénylation distants de 1kb.

Le gène FCGR2B code pour trois transcrits grâce un épissage alternatif : les FcγRIIb1, FcγRIIb2 et FcγRIIb3. L'isoforme b1 a une séquence de 19 acides aminés (AA) supplémentaires dans la partie cytoplasmique, l'isoforme b2 ne possède pas de séquence codée par l'exon S2 et l'isoforme b3, très proche du b1, possède une délétion de 21 nucléotides au niveau du peptide signal (Brooks *et al.* 1989).

Ces récepteurs sont des glycoprotéines membranaires de 40 kDa de faible affinité pour les IgG monomériques $K_a= 10^6 \text{ M}^{-1}$ mais capables de se lier à des IgG agrégées ou des CI.

Il existe deux récepteurs activateurs, le FcγRIIa et le FcγRIIc possédant une partie extracellulaire de 2 domaines et un motif ITAM porté directement sur la partie intracellulaire.

Le FcγRIIa est exprimé sur la lignée myéloïde et absent sur les LB alors que le FcγRIIc est exprimé uniquement sur les lymphocytes NK à condition que son premier domaine extracellulaire possède une glutamine à la position 13 (Figure 23) (Gamberale *et al.* 2005).

En ce qui concerne le Fc γ RIIb : l'isoforme Fc γ RIIb1 est exprimée sur les LB et constitue **le seul récepteur Fc γ R sur ces lymphocytes** et l'isoforme b2 est co-exprimée avec le Fc γ RIIa sur les cellules myéloïdes (Figure 23) (Nimmerjahn & Ravetch 2006).

2.1.3 Les Fc γ RIII :

Les gènes FCGR3A et FCGR3B codent pour deux protéines activatrices Fc γ RIIIa et Fc γ RIIIb. Le gène FCGR3A est situé entre les gènes FCGR2A et FCGR2B et le gène FCGR3B est situé entre les gènes FCGR2B et FCGR2C. Ils sont constitués de 5 exons, deux pour le peptide signal, deux pour le domaine extracellulaire (EC1 et EC2) et un pour le domaine transmembranaire et cytoplasmique (Su *et al.* 2002).

Les récepteurs Fc γ RIII sont des protéines de 50 à 80 kDa selon leur niveau de glycosylation. Considérés comme des récepteurs de faible affinité malgré leur affinité intermédiaire pour les IgG monomériques, ils se lient aussi de façon très efficace aux IgG agrégées et aux CI.

La stabilité d'expression du récepteur Fc γ RIIIa ainsi que la transduction de son signal requièrent, comme pour le Fc γ RI l'association de la chaîne α à un homo-dimère de chaîne γ quand ce récepteur est exprimé sur les monocytes et macrophages ou de la chaîne ζ quand il est exprimé sur les cellules dendritiques, LT et les NK (Tanigaki *et al.* 2015) (Figure 23). Ces chaînes ont un rôle très important dans la traduction du signal grâce à leur motif ITAM.

Le Fc γ RIIIb est un récepteur atypique du fait qu'il s'agit d'une protéine glypiée, c'est à dire reliée au feuillet externe de la membrane par une liaison glycosylphosphatidylinositol (GPI) qui la localise principalement dans les radeaux lipidiques. Sa structure ne lui confère aucune capacité intrinsèque de transduction de signal mais il peut coopérer avec d'autres récepteurs comme le Fc γ RIIa amenant à proximité de ces derniers des éléments de signalisation associés aux radeaux lipidiques. Ce récepteur est exprimé à la surface des polynucléaires neutrophiles et des basophiles.

Cette hétérogénéité de tous les Fc γ Rs est accentuée par la présence de variants d'épissage permettant la synthèse de formes solubles ou de récepteurs différant par la longueur de leur portion intra cytoplasmique.

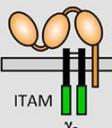
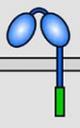
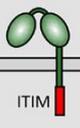
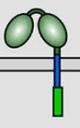
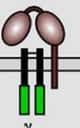
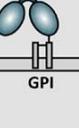
Human IgG receptors						
Name	Fc γ RI	Fc γ RIIA	Fc γ RIIB	Fc γ RIIC ^h	Fc γ RIIIA	Fc γ RIIIB
CD	CD64	CD32A	CD32B	CD32C	CD16A	CD16B
						
B cell	-	-	+	-	-	-
T cell	-	-	-	-	-	-
NK cell	-	-	- ^d	+ ^h	+	-
Mono/Macro	+	+	+/-	+ ^h	+	-
Neutrophil	(+)	+	+/-	+ ^h	-	+
Dendritic Cell ^h	+	+	+	-	-	-
Basophil	-	+	+	-	-	+/-
Mast cell	(+)	+	-	-	-	-
Eosinophil	-	+	-	-	-	-
Platelet	-	+	-	-	-	-
Endothelium	-	-	-	-	-	-

Figure 23 : Expression cellulaire des Fc γ Rs (Gillis *et al.* 2014), modifié.

(-) : indique que le récepteur n'est pas exprimé, (+) indique que le récepteur est exprimé à la surface de la cellule. (+/-) indique une expression faible du récepteur.

2.2 Affinité pour les IgG :

La cristallographie a permis de déterminer la structure des domaines extracellulaires de plusieurs Fc γ Rs et de comprendre précisément comment s'effectue l'interaction entre ces récepteurs et la portion Fc des IgG. L'étude du cocrystal Fc γ RIIIb-IgG1 a montré que la portion Fc se fixait au domaine extracellulaire proximal ainsi qu'à la région de connexion entre les deux domaines (Figure 24A). Un récepteur ne pouvant fixer qu'une seule IgG, l'activation cellulaire ne peut avoir lieu que lorsque les récepteurs sont engagés par des ligands multivalents. Comme mentionné précédemment, seul le Fc γ RI, grâce à un domaine extracellulaire supplémentaire, peut lier les IgG monovalentes avec une forte affinité, ce qui explique qu'il soit en permanence saturé. Les autres Fc γ Rs présentent une affinité moindre pour les IgG monomériques mais fixent avec avidité les IgG engagées dans des CI.

Cette faible affinité est très importante car en prévenant la liaison des IgG monomériques qui sont en circulation permanente, elle évite ainsi une potentielle réponse non spécifique pro-inflammatoire (Tanigaki *et al.* 2015). Il a été montré également que certains polymorphismes des récepteurs FcR sur lesquels nous reviendrons au chapitre (IV.4) influençaient leur fixation aux IgG.

Les IgG sont des glycoprotéines constituées de deux chaînes peptidiques lourdes et de deux chaînes légères symétriques. La portion terminale des deux chaînes lourdes forme le fragment Fc. Ce fragment possède des chaînes de glucides en bi-antenne entre les domaines CH2 et CH3. Le degré de glycosylation de ces antennes a fait l'objet de nombreuses études, il varie selon les pathologies et le degré de sévérité de certaines maladies auto-immunes. Ces chaînes de glucides stabilisent la structure de l'IgG en influençant profondément leur liaison aux récepteurs FcγR et par conséquent, modulent leur rôle effecteur (Kaneko *et al.* 2006).

Par exemple, les IgG aglycosylées ne se lient pas aux FcγRs (Pincetic *et al.* 2014) et ont une affinité 40 fois plus faible vis-à-vis du FcγRI (Lu *et al.* 2015).

Il a été démontré également que le degré de sialylation de ces chaînes de glucides induisait une conformation différente du Fc qui influençait sa liaison avec les récepteurs FcRs (Tomana *et al.* 1988; Borrok *et al.* 2012). Les glucides terminaux présents dans cette bi-antenne modulent la fonction de l'IgG qui, avec du fucose ou de l'acide sialique, aura un effet plutôt anti inflammatoire, à l'inverse du galactose (Maverakis *et al.* 2015).

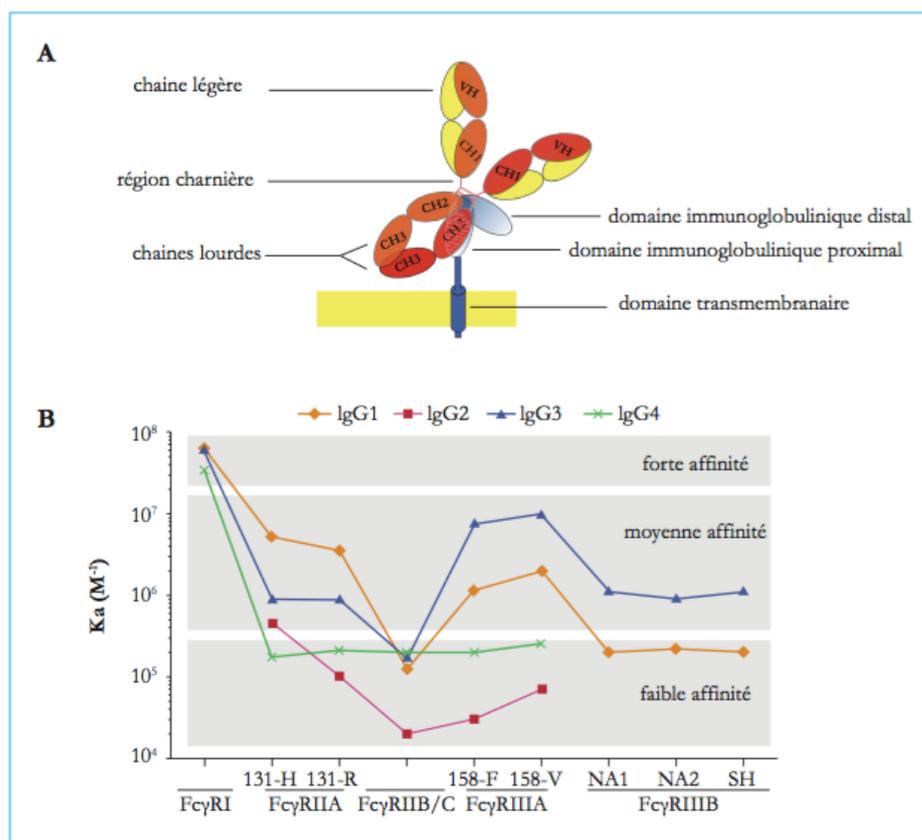


Figure 24 : Interaction et affinité entre les IgG et les FcγRs (Lejeune *et al.* 2010).

A) Interaction entre les deux domaines CH2 de l'IgG et le domaine immunoglobulinique proximal et la région charnière du FcγR ; B) d'après les données publiées par Brunhs P, 2009 représentation des affinités des FcγRs en fonction des différentes sous classes des IgG.

3 Fonctions des différents récepteurs FcγRs

La fonction de chaque FcγR est déterminée par le motif porté dans sa partie cytoplasmique ITAM ou ITIM. Ainsi, deux groupes activateur et inhibiteur sont identifiés (Figure 25).

La réponse cellulaire dépend du récepteur mis en jeu, du type cellulaire et du niveau d'expression du récepteur.

Chaque récepteur présente un profil d'expression particulier tandis que chaque type cellulaire exprime le plus souvent plusieurs classes de FcγRs.

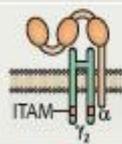
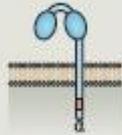
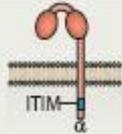
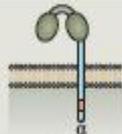
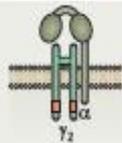
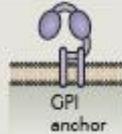
Structure	Name	CD	Gene	Alleles*	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	Major function
	FcγRI	CD64	FCGR1A	-	6x10 ⁷	No binding	6x10 ⁷	3x10 ⁷	Activation
	FcγRIIA	CD32A	FCGR2A	His131 Arg131	5x10 ⁶ 3x10 ⁶	4x10 ⁵ 1x10 ⁵	9x10 ⁵ 9x10 ⁵	2x10 ⁵ 2x10 ⁵	Activation
	FcγRIIB	CD32B	FCGR2B	Ile232 Thr232	1x10 ⁵ 1x10 ⁵	2x10 ⁴ 2x10 ⁴	2x10 ⁵ 2x10 ⁵	2x10 ⁵ 2x10 ⁵	Inhibition
	FcγRIIC	CD32C	FCGR2C	Gln13 Stop13	1x10 ⁵	2x10 ⁴	2x10 ⁵	2x10 ⁵	Activation
	FcγRIIIA	CD16A	FCGR3A	Val158 Phe158	2x10 ⁵ 1x10 ⁵	7x10 ⁴ 3x10 ⁴	10x10 ⁴ 8x10 ⁴	2x10 ⁵ 2x10 ⁵	Activation
	FcγRIIIB [†]	CD16B	FCGR3B	NA1, NA2 or SH	2x10 ⁵	No binding	1x10 ⁶	No binding	Decoy; activation?

Figure 25: Fonction des FcγRs (Guilliams *et al.* 2014) modifié.

Les récepteurs activateurs contiennent un motif cytoplasmique Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif (ITAM) composé d'une séquence d'une tyrosine suivie de deux AA puis d'une leucine ou une isoleucine. Il peut y avoir plusieurs motifs ITAM à la suite, séparés par 6 ou 8 AA (Cambier 1995). Ce motif initie les voies de signalisation activatrices par la phosphorylation de la tyrosine.

Le FcγRIIb est le seul récepteur pour les IgG qui soit inhibiteur. Il est porteur d'un motif inhibiteur ITIM constitué d'une séquence de 6 acides aminés dont le premier peut être une isoleucine, une valine, une leucine ou une sérine, d'une tyrosine à la troisième position et d'une leucine ou une valine à la dernière position (I/V/L/SxYxxL/V) (Ravetch 1997). Ce motif ITIM met en jeu les voies de signalisation inhibitrices. En condition physiologique et après engagement d'une faible quantité de complexes immuns, la balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs garde la cellule inactive (Ravetch & Bolland 2001; van de Winkel 2010). Par ailleurs, certaines cytokines peuvent modifier cette balance en modifiant le rapport entre récepteurs activateurs et inhibiteurs conduisant alors à l'activation de la cellule (Hartnell *et al.* 1992).

3.1 Fonctions activatrices

Le déclenchement d'une réponse cellulaire via les FcRs va être conditionné par leur agrégation qui induira leur migration au sein de radeaux lipidiques. Cette étape est indispensable pour la transduction des signaux, quasiment identique pour les différents récepteurs activateurs.

En fonction du type cellulaire et de son équipement en récepteur FcγR, on distingue quatre grands types de fonctions cellulaires pouvant découler de ces voies d'activation (Figure 26) :

- La première est la **phagocytose** exercée par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles :

Cette phagocytose aboutit à une internalisation favorisant la dégradation des agents pathogènes ou des débris cellulaires opsonisés par les IgG (Guilliams *et al.* 2014).

Les FcγRs jouent également un rôle important dans la clairance des CI en particulier le FcγRIIIa qui semble avoir un rôle important dans la capture des CI (Li *et al.* 2009).

L'activation des macrophages par les CI est déterminée par une balance entre les FcγRs activateurs et les FcγR inhibiteurs. Une modulation de la polarisation des macrophages en M1 spécialisés dans la dégradation des pathogènes ou en M2 spécialisés dans la réparation tissulaire, est induite en fonction de l'activation simultanée ou non des Toll like récepteurs avec les FcRs (Sutterwala *et al.* 1997).

- La **présentation antigénique** constitue une deuxième voie de réponse enclenchée par les FcγRs et permet d'induire une réponse immunitaire adaptative. Les cellules dendritiques vont pouvoir internaliser les particules antigéniques via leur FcγR activateurs, les dégrader et les présenter sous forme de peptides apprêtés dans les molécules de CMH II induisant l'activation des LTCD4 (Fanger *et al.* 1996). La capture par les FcγRs activateurs semble également favoriser la présentation de ces peptides exogènes via les molécules CMH I par cross-présentation permettant l'initiation de réponses TCD8 cytotoxiques (Regnault *et al.* 1999).
- Le troisième type de réponse déclenchée par l'activation des FcγRs activateurs est l'**ADCC**. Les cellules NK et les monocytes/macrophages en sont les principaux acteurs.
- Le quatrième mécanisme est la sécrétion de facteurs solubles comme les cytokines ou substances vaso-actives. Suite à l'activation par les FcγRs, ce mécanisme va jouer des rôles variés comme la modulation de la réponse immunitaire par l'IL-10 ou l'IFNγ.

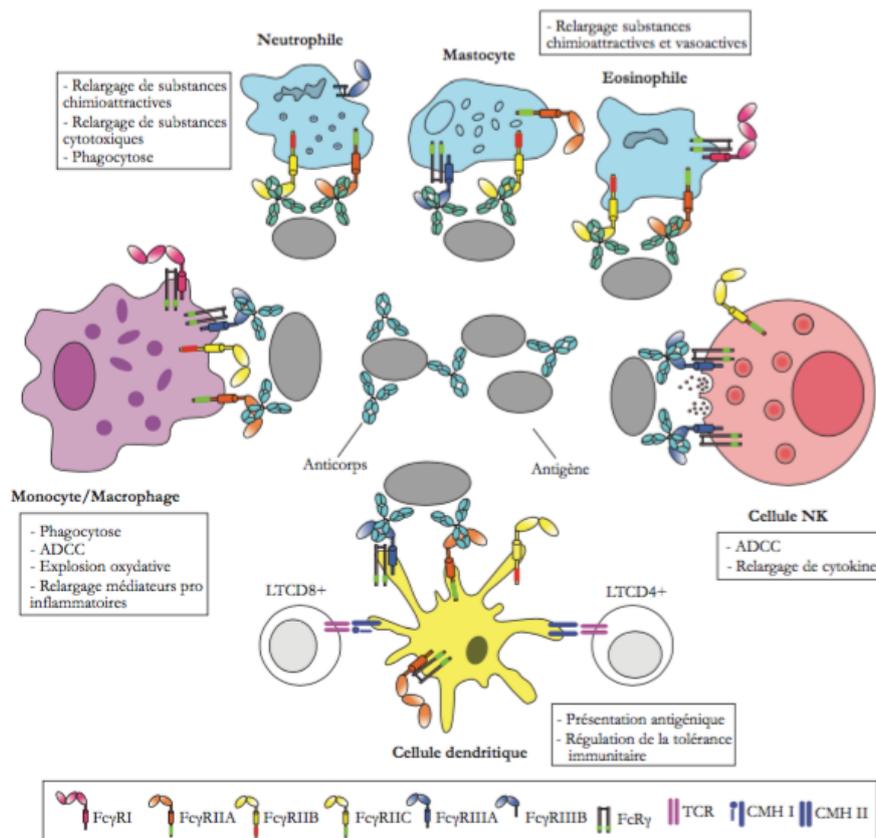


Figure 26 : Mécanismes d'action activés par l'intermédiaire des FcγRs (Lejeune *et al.* 2010).

En fonction du type cellulaire, quatre grands types de fonctions peuvent être enclenchés : la cytotoxicité, la phagocytose, la présentation antigénique et la sécrétion de facteurs solubles.

La réponse commence par la phosphorylation des tyrosines des motifs ITAM ainsi que le recrutement de protéines kinases de la famille Src (Lck, lyn, Hck) et Syk (Syk, ZAP70). Ces kinases activées vont catalyser la phosphorylation et l'activation d'un certain nombre de substrats comme la PLC γ , la PI3K ou encore les protéines de la famille des MAP-kinases comme Erk (Figure 27a) (Sánchez-Mejorada & Rosales 1998; Jovanovic *et al.* 2009; Xu *et al.* 2014). Ces différents substrats dépendent du type de cellule, de la fonction cellulaire concernée et également du type de récepteur engagé (Strzelecka *et al.* 1997). Par exemple, le Fc γ RIIIa active Lck dans les cellules NK alors que le Fc γ RIIa ou le Fc γ RIIIa active Lyn et Hck dans les monocytes et les mastocytes (Ravetch & Bolland 2001). La transduction du signal, s'opérant par le motif ITAM des récepteurs Fc γ RIIa serait à l'origine d'une activité cellulaire différente de celle observée via le motif ITAM des dimères de chaîne γ des récepteurs Fc γ RIIIa.

3.2 Fonctions inhibitrices

La présence du motif ITIM dans la partie cytoplasmique du Fc γ RIIb lui permet d'inhiber les voies de signalisation activatrices des autres récepteurs à motif ITAM, que ce soit un autre récepteur Fc γ R ou un récepteur comme le BCR précédemment décrit chapitre (III.4) (Daëron *et al.* 1995). Ces fonctions inhibitrices permettent le maintien de l'homéostasie.

3.2.1 Régulation du LB ITIM dépendante

Nous avons décrit précédemment que le Fc γ RIIb faisait partie des corécepteurs inhibiteurs du BCR à la surface des LB chapitre (III.4.1).

C'est l'isoforme Fc γ RIIb1 présente dans les LB et joue un rôle dans le maintien de la tolérance en périphérie, l'isoforme b2 étant présente dans les cellules myéloïdes (Nimmerjahn & Ravetch 2007). Le co-engagement du Fc γ RIIb avec le BCR par des CI active une voie de signalisation négative qui s'oppose à la signalisation positive BCR dépendante avec blocage du flux calcique (Ravetch & Lanier 2000) (Figure 27b).

L'étude des voies de signalisation de Fc γ RIIb a été débutée chez la souris mais les mêmes voies de régulation existent chez l'homme ou sur des lignées humaines (Van Den Herik-Oudijk *et al.* 1994; Koncz *et al.* 1999).

Le co-engagement du BCR et Fc γ RIIb amorce une cascade de signalisation négative par phosphorylation du résidu tyrosine du motif ITIM par la kinase Lyn.

Cette modification induit le recrutement de tyrosine phosphatases comme SHP-1 et de façon préférentielle SHIP1 qui va hydrolyser le PIP3 en PIP2, induire la dissociation des protéines PLC γ et Btk, réguler négativement le flux calcique et bloquer ainsi la signalisation positive du BCR chapitre (III.4) (Ono *et al.* 1996; Liu *et al.* 1999; Ravetch & Bolland 2001; Cady *et al.* 2008).

En plus de cette régulation négative du flux calcique, le Fc γ RIIb peut aussi inhiber la prolifération des LB par l'inhibition de la voie de signalisation de Ras, soit par phosphorylation et recrutement de la protéine Dok sur SHIP-1-P, soit en recrutant la molécule Grb sur SHIP-p (Tridandapani *et al.* 1997; Tanguay *et al.* 1999).

La molécule SHIP1 a un rôle central dans cette voie de signalisation comme le démontrent les modèles murins déficients en SHIP et présentant une augmentation anormale du pool des LB avec une dérégulation de la production d'Ac (Liu *et al.* 1999).

Contrairement à l'isoforme b2 capable d'endocyter l'Ag sur les cellules myéloïdes, l'isoforme b1 régule de façon négative la présentation de l'Ag en inhibant l'endocytose par le BCR (Minskoff *et al.* 1998).

Le récepteur Fc γ RIIb a également un rôle dans le maintien de la tolérance en périphérie en inhibant l'activation des B auto-réactifs dans le centre germinatif. Seuls les LB ayant un BCR de forte affinité pour les Ag des CI auront un signal d'activation suffisamment fort pour contrer le signal inhibiteur du Fc γ RIIb. Il existe également une augmentation de la densité des Fc γ RIIb à la surface des cellules du centre germinatif (Pritchard *et al.* 2000).

3.2.2 Régulation du LB ITIM indépendante

Le pontage de deux récepteurs inhibiteurs Fc γ RIIb entraîne la mort par apoptose de la cellule et ce, sans la phosphorylation du motif ITIM ni le recrutement de la phosphatase SHIP (figure 27C) (Pierson *et al.* 2014).

L'apoptose induite par Fc γ RIIb active la voie de signalisation de Jun N terminal Kinase (JNK) et le recrutement de Btk qui passe d'une localisation membranaire à une localisation nucléaire. Au cours de cette apoptose, une activation des caspases ainsi que la dépolarisation de la membrane mitochondriale avec libération du cytochrome c ont été démontrées (Tzeng *et al.* 2005).

Les plasmocytes à longue durée de vie migrent dans la moelle osseuse et sont responsables d'une grande partie de la production d'IgG sériques.

Dans les modèles murins de SLE, ces plasmocytes ont une augmentation de leur nombre et de leur durée de vie ainsi qu'une diminution d'expression du Fc γ RIIb à leur surface. Des souris non lupiques mais déficitaires en Fc γ RIIb développent également une augmentation de ces plasmocytes ainsi qu'une résistance de ces cellules à l'apoptose (Xiang *et al.* 2007). Enfin in vitro, le co-engagement des Fc γ RIIb sans engagement des BCR provoque l'apoptose des plasmocytes. Il est possible qu'une expression réduite des Fc γ RIIb sur les plasmocytes prévienne l'apoptose médiée par les CI et induise une accumulation de ces cellules dans la moelle, initiant ainsi les lésions inflammatoires du SLE.

3.2.3 *Fc γ RIIb et les autres cellules effectrices du système immunitaire*

- Sur les cellules dendritiques :

Le Fc γ RIIb est présent sur les CD myéloïdes et plasmacytoïdes. Les souris déficientes en Fc γ RIIb présentent une activation des réponses lymphocytaires T et une activation des cellules dendritiques. La maturation des CD myéloïdes est accompagnée d'une diminution d'expression du Fc γ RIIb et d'une baisse de leur seuil d'activation par les CI (Yada *et al.* 2003).

A la surface des cellules dendritiques, comme les récepteurs Fc γ Rs activateurs, le Fc γ RIIb internalise les CI, mais au lieu de conduire à la dégradation des Ag comme les Fc γ Rs activateurs, il va favoriser leur rétention, préserver ces Ag et induire leur présentation aux LB (Amigorena & Bonnerot 1999; Guilliams *et al.* 2014).

Au niveau des centres germinatifs, à la surface des cellules dendritiques folliculaires, le Fc γ RIIb est un des récepteurs capables de retenir les complexes immuns et, par conséquent, capables de présenter les Ag aux LB du centre germinatif. En effet, le Fc γ RIIb des CD folliculaires permet ainsi une activation rapide des BCR, la prolifération des LB et la formation du CG (El Shikh *et al.* 2006).

- Sur les macrophages :

L'activation des macrophages par les CI est déterminée par la balance entre les récepteurs Fc γ Rs activateurs et Fc γ RIIb inhibiteurs. La taille de l'Ag, sa concentration et la valence des IgG du CI sont également des facteurs influents. Les macrophages de souris déficientes en Fc γ RIIb ont un seuil d'activation bas, une augmentation de leur capacité à éliminer les pathogènes mais également une sensibilité augmentée aux pathologies à CI circulants (Yuasa *et al.* 1999; Clatworthy & Smith 2004).

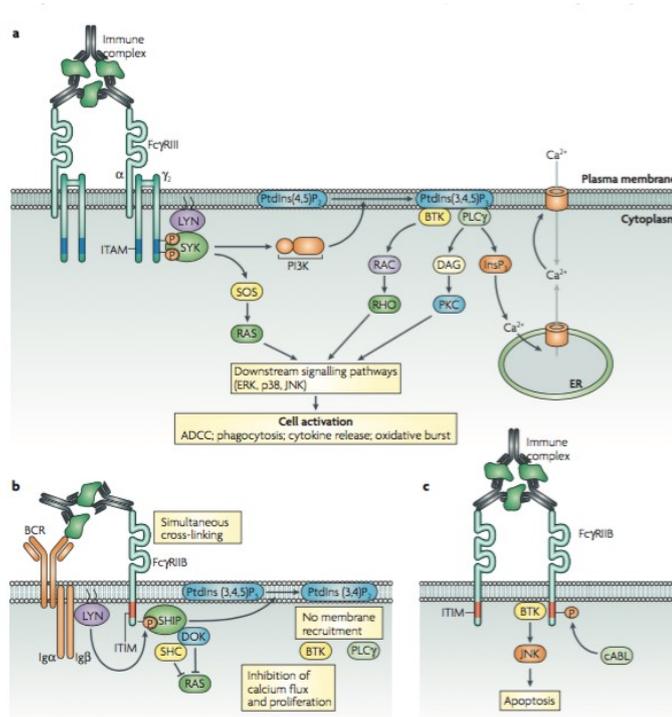


Figure 27 : Voies de signalisation induites par les récepteurs FcγR activateurs et inhibiteurs (Nimmerjahn & Ravetch 2008).

a) Voie de signalisation induite par le coengagement de deux récepteurs activateurs FcγRIIIa. b) Voie de signalisation induite par le coengagement du récepteur inhibiteur FcγRIIb et le récepteur à l'Ag BCR à la surface du LB. c) Voie de signalisation induite par le coengagement de deux récepteurs inhibiteurs ITIM indépendante.

4 Les polymorphismes des récepteurs FcγRs

Le séquençage des gènes FCGR a permis de mettre en évidence de nombreux variants génétiques qui peuvent avoir des conséquences fonctionnelles sur les récepteurs. Ainsi, certains variants ont été associés ou identifiés comme étant des facteurs de risque dans l'apparition de certaines maladies auto-immunes. Ces variants peuvent être dus soit à un polymorphisme d'une seule base nucléotidique, SNP (Single nucleotide polymorphism), soit à une variation du nombre de copies CNV (Copy number variation). Ils peuvent changer les fonctions du récepteur et, influencer sur son expression quantitative, son affinité ou sa capacité de transmission du signal.

4.1 Le gène FCGR2A

- **Le polymorphisme R131** : La substitution d'une Guanine (G) par une Adénine (A) dans l'exon 4 du gène de FCGR2A (rs 1801274) se traduit par une différence d'un seul acide aminé histidine ou arginine à la position 131 (H131 ou R131) dans le deuxième domaine immunoglobulinique extracellulaire du récepteur.

La différence physico-chimique de ces deux acides aminés induit une différence d'affinité du récepteur. Le FcγRIIa-H131 est capable de lier les IgG2 de façon efficiente alors que le FcγRIIa-R131 ne les lie pas (Duits *et al.* 1995; Salmon *et al.* 1996). Le R131 serait un facteur de susceptibilité au LES et d'atteinte rénale lupique chez les caucasiens, américains et coréens (Haseley *et al.* 1997; Yun *et al.* 2001; Kobayashi *et al.* 2007; International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus Genetics (SLEGEN) *et al.* 2008; Vigato-Ferreira *et al.* 2014).

- Des études GWAS ont retrouvé en plus du R131 d'autres polymorphismes situés dans les régions des introns et associés à des maladies auto-immunes : arthrite (Raychaudhuri *et al.* 2009), colite ulcéreuse (Asano *et al.* 2009), syndrome de Sjögren (Lessard *et al.* 2013).

4.2 Le gène FCGR3A

Le FCGR3A présente un polymorphisme (rs 396991) avec un changement de nucléotide Thymine en Guanine à la position 559, ce qui donne une substitution d'une phénylalanine (F) par une valine (V) à la position 158 du deuxième domaine extracellulaire. Comme précédemment, le FcγRIIIa-158V est beaucoup plus affiné pour les IgG1, IgG3 et IgG4 que le FcγRIIIa-158F (Koene *et al.* 1997; Wu *et al.* 1997).

Le FcγRIIIa-158F est décrit comme étant un facteur de susceptibilité au LES dans différents groupes ethniques, caucasiens et afro-américains (Jönsen *et al.* 2007; Dong *et al.* 2014; Karassa *et al.* 2002; Kyogoku *et al.* 2002).

4.3 Le gène FCGR3B

Le FcγRIIIb est surtout exprimé sur les neutrophiles : six SNP (G141C, C147T, A227G, C266A, G277A et G349A) dans le gène FCGR3B sont responsables des trois allotypes du FcγRIIIb, Na1, Na2 et SH (Ory *et al.* 1989).

Les variants Na1 et Na2 sont les produits de 5 SNP non synonymes dans le premier domaine extracellulaire du Na1 (R36, L38, N65, A78, D82, V106) et du Na2 (S36, L38, S65, A78, N82, L106). Le variant SH est due à un SNP synonyme avec une substitution d'une alanine par un acide aspartique en position 78 (Bux *et al.* 1997).

Le changement de l'acide aminé à la position 65 provoque la perte du site de glycosylation sur l'allotype Na2 qui réduit de façon considérable son affinité pour les IgG1 et les IgG3. (Ravetch & Perussia 1989).

Les FcγRIIIb Na1 ont une affinité plus forte et permettent une meilleure phagocytose des particules opsonisées par des IgG1 et IgG3 que l'allotype Na2. (Salmon *et al.* 1990). Le FcγRIIIb ne peut transmettre le signal d'activation en intracellulaire car il ne possède ni domaine membranaire ni cytoplasmique. La transduction du signal du FcγRIIIb se fait par interaction avec la β-intégrine, interaction qui est fortement perturbée par la perte de glycosylation (Li *et al.* 2009).

L'allèle Na2 a été décrit comme facteur de susceptibilité au LES chez les Asiatiques (Chu *et al.* 2004; Siriboonrit *et al.* 2003; Hatta *et al.* 1999).

4.4 Le gène FCGR2B

- **Le polymorphisme 386C** : dans la région promotrice du gène FCGR2B existe deux haplotypes. Le moins fréquent le -386C-120A qui induit une augmentation de la capacité de liaison des facteurs de transcription GATA-4 et Yin-Yang1, avec une augmentation de l'activité promotrice, et une augmentation de l'expression du récepteur des haplotypes (Blank *et al.* 2005; Smith & Clatworthy 2010; Gillis *et al.* 2014).

Cet haplotype mineur -386C n'a été associé au LES que dans la population caucasienne (Su *et al.* 2004; Blank *et al.* 2005).

- **Le polymorphisme I232T** : ce polymorphisme a été identifié dans l'exon 8 consistant en une transition d'une thymidine en cytosine T695C qui code pour une substitution d'une isoleucine par une thréonine I232T dans la région transmembranaire du récepteur (Kyogoku *et al.* 2002) . Ce SNP induit une inefficacité du récepteur FcγRIIb-232T à se lier aux radeaux lipidiques et, par conséquent, une diminution de son activité inhibitrice (Kono *et al.* 2005; Floto *et al.* 2005).

Cette altération du fonctionnement de ce récepteur constitue un facteur de résistance contre les formes les plus graves du paludisme (Clatworthy *et al.* 2007; Waisberg *et al.* 2011; Willcocks *et al.* 2010). Ce facteur de résistance a donc soumis les populations des régions impaludées à une pression de sélection pour ce polymorphisme, ce qui explique sa fréquence plus importante dans les populations d'Asie du sud et d'Afrique (Willcocks *et al.* 2010).

IV CD72

Le CD72 est une glycoprotéine transmembranaire de type II de 45 KDa, à l'origine décrite dans le modèle murin en tant que Lyb-2. Il est exprimé sous la forme d'un homodimère lié par un pont disulfure, dont la partie C-terminal contient un domaine C-lectine suivie d'un domaine en super hélice α . Son domaine intracellulaire est porteur à la partie proximal N-terminal d'un motif ITIM1 qui lie SHP-1 et d'une séquence ITIM like dit ITIM2 qui lie Grb-2 (Figure 28) (Cambier 1997).

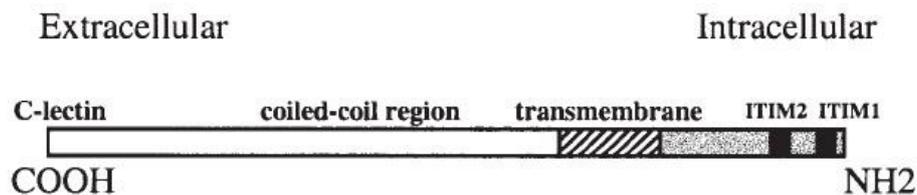


Figure 28: schéma de la protéine CD72 d'après (Wu & Bondada 2002).

1 Localisation génétique et expression protéique

Le gène de CD72 est localisé dans la région 13.3 du bras court du chromosome 9, 9 p13.3. Il est inversement orienté par rapport aux autres gènes de la région et sa région promotrice ne possède pas de boîte TATA. Ce gène est constitué de 9 exons (Figure 29) : l'exon 1 code pour le peptide signal, les exons 2, 3 et 4 codent pour la partie extracellulaire, le domaine en super hélice est codé par l'exon 5, la partie TM est codée par l'exon 6, et les exons 7, 8 et 9 codent pour la partie intracellulaire incluant les motifs ITIM1 et ITIM2. Il existe au moins 3 formes appelées CD72^a, CD72^b et CD72^c qui se différencient essentiellement par la partie extracellulaire. Le CD72 est exprimé sous la forme CD72^b sur les LT, les NK, les macrophages, les cellules dendritiques, les mastocytes ainsi que sur le LB (Kataoka *et al.* 2015).

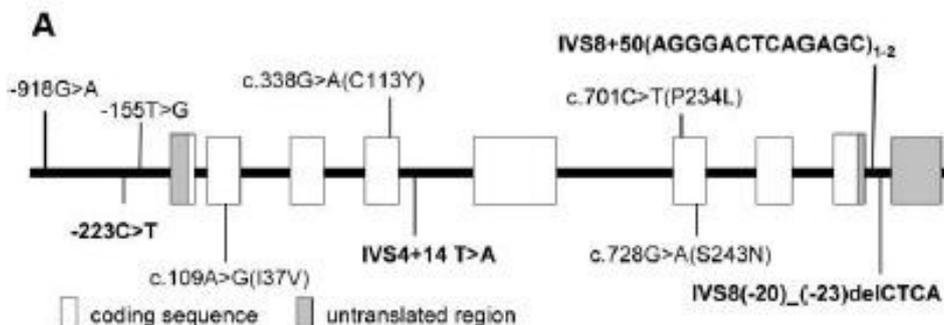


Figure 29 : gène du CD72 d'après (Hitomi *et al.* 2004).

2 Régulation du Lymphocyte B par le CD72

2.1 Régulation de la prolifération et de la différenciation du LB

Le CD72 a un rôle de régulateur négatif. Son expression normale inhibe la différenciation des LB en plasmocyte (Pan *et al.* 1999; Parnes & Pan 2000). Cette inhibition passerait par la régulation négative des facteurs de transcription impliqués dans l'activation de la transcription de la protéine X box binding protein1 (XBP-1). Cette protéine est indispensable pour le passage au stade plasmocytaire (Yamazaki *et al.* 2005). La stimulation du CD72 peut initier à elle seule la prolifération du LB ou faciliter cette différenciation quand elle est induite par un Ag ou par le CD40 (Subbarao & Mosier 1983; Subbarao *et al.* 1988; Kumanogoh *et al.* 2000).

2.2 Régulation de la survie

Le CD72 serait impliqué dans la régulation de la survie des LB. En effet, la stimulation *in vitro* du CD72 permet aux LB immatures avec un BCR hyper réactif et aux LB matures hautement affins pour l'Ag d'échapper à l'apoptose. Le pré-engagement du CD72 peut constituer un mécanisme d'échappement de cellules apoptotiques aux signaux d'inhibition délivrés par la stimulation du BCR, ce qui suggère que le CD72 donne un signal positif qui tend à diminuer les signaux d'apoptose (Pan *et al.* 1999; Baba *et al.* 2005). Par ailleurs, une autre étude a montré une augmentation de l'apoptose après l'expression du CD72 dans une lignée déficiente en CD72 (Baba *et al.* 2005; Wu & Bondada 2009).

2.3 CD72 et tolérance

En plus de son implication dans la régulation de la prolifération et de la survie, le CD72 joue un rôle dans le maintien des LB auto-réactifs en anergie (Li *et al.* 2008). Ce maintien passerait par la phosphorylation du Cbl-b, E3 ubiquitine ligase impliquée dans le maintien de la tolérance.

3 CD72 et BCR

L'engagement du BCR induit une phosphorylation des motifs ITIM1 et ITIM2 du CD72 avec le recrutement de la protéine SHP-1 sur le ITIM1 et de Grb2, molécule adaptatrice principale de la voie de Ras sur le motif ITIM2 (Tari & Lopez-Berestein 2001; Cady *et al.* 2008). Le recrutement du SHP-1 inhibe la voie Erk et la mobilisation calcique induite par l'engagement du BCR (Adachi *et al.* 2000) alors que la liaison de ITIM2 avec le Grb2 réduit la force du signal inhibiteur donné par ITIM1 (Baba *et al.* 2005).

OBJECTIFS

Les FcγRs jouent un rôle important dans les mécanismes des réactions immunitaires par leur liaison au Fc des IgG. Ils sont impliqués dans de nombreuses réactions comme, la clairance des CI, l'ADCC, la phagocytose et la régulation de la sécrétion des Ig. Deux groupes de FcγRs de faible affinité existent : les FcγRIIa/b/c et les FcγRIIIa/b qui possèdent des distributions cellulaires et des fonctions différentes. Tous ces récepteurs ont une fonction activatrice à l'exception du FcγRIIb qui est le seul récepteur inhibiteur. Ces récepteurs sont souvent co-exprimés à la surface de la cellule influençant son seuil d'activation. Plusieurs polymorphismes de ces récepteurs sont responsables de modifications de leur affinité pour les IgG entraînant des modifications des réponses cellulaires. Enfin certaines infections comme les arboviroses ou le paludisme sont à l'origine de pression de sélection favorisant certains polymorphismes comme le FcγRIIb-232T

Des polymorphismes des FcγRs ont été associés à l'apparition de MAI en particulier au LES dans les populations caucasiennes, asiatiques ou africaines.

La population martiniquaise est une population particulière par son origine ethnique « à majorité africaine avec un brassage génétique caucasien non négligeable » mais aussi par son environnement. En effet, l'insularité et la proximité des autres îles anglaises jouent un rôle important dans ce brassage génétique.

Dans cette population, les pathologies auto-immunes comme le LES et la NMO ont une incidence plus importante que dans les autres départements français avec un pronostic plus grave.

Dans un premier temps nous avons effectué un recensement des différents polymorphismes existants dans la population martiniquaise afro-caribéenne en les comparant aux données de la littérature concernant d'autres populations africaines, asiatiques, afro-américaines et européennes. Cette caractérisation d'une population afro-caribéenne n'a jamais été réalisée. Nous avons recherché les polymorphismes FcγRIIa-R131H (rs1801274), FcγRIIb-I232T (rs1050501), FcγRIIIa-F158V (rs396991), FcγRIIIb-Na1/Na2. Le travail de cette première partie fait l'objet d'une publication en cours de soumission dans Plos One.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la part de ces polymorphismes dans l'incidence du LES en Martinique. Nous avons également évalué la présence des haplotypes Hap1 et Hap2 de CD72 et recherché un lien entre l'haplotype protecteur Hap2 et la présence du polymorphisme FcγRIIb-232T/T. Ce travail fait l'objet d'un deuxième article en cours de soumission dans PlosOne.

Dans une troisième partie nous avons, comme pour les patients LES, étudié l'association des polymorphismes des récepteurs FcγRIIa, FcγRIIb et FcγRIIIb avec deux pathologies auto-immunes démyélinisantes du SNC différentes sur le plan immunopathologique : la NMO et la SEP. Ce travail a fait l'objet d'une publication soumise dans « *The Journal of Neuro Immunology* ».

Le FcγRIIb, par sa fonction inhibitrice, a un rôle clé dans le maintien de la tolérance périphérique. La délétion du FCGR2B induit une augmentation de la réponse humorale ainsi que l'augmentation de la sévérité des MAI (Bolland & Ravetch 2000; Bolland *et al.* 2002; Schmidt & Gessner 2005). La réduction de l'expression du FcγRIIb à la surface des des LB du CG induit leur activation ainsi que leur différenciation en plasmocytes (Jiang *et al.* 1999; Tracey *et al.* 2008; Tiller *et al.* 2010).

Nous avons en dernière partie étudié l'influence du polymorphisme FcγRIIb-232T sur l'activation du BCR chez des patients LES et des témoins porteurs de la forme hétérozygote IT, de la forme homozygote mutée TT ou de la forme sauvage II. Nous avons également étudié l'influence du polymorphisme I232T sur l'expression cellulaire du récepteur, ainsi que sur l'expression des corécepteurs CD19 (activateur) et CD72 (inhibiteur).

RESULTATS

I Etude de la variabilité dans le locus FCGR chez les afro-caribéens(Martinique)

1 Introduction

De nombreuses études ont montré que des variations dans les gènes FCGR entraînaient des modifications fonctionnelles des récepteurs FcγR (Salmon *et al.* 1990; Koene *et al.* 1997; Floto *et al.* 2005; Kono *et al.* 2005). Certaines de ces variations joueraient un rôle protecteur contre des agents pathogènes comme le Plasmodium. En effet ces variants sont présents avec une fréquence beaucoup plus grande dans les populations subissant des pressions de sélection existant dans les zones impaludées comme l’Afrique ou l’Asie (Waisberg *et al.* 2011; Willcocks *et al.* 2010). Par ailleurs une fois le contexte parasitaire éliminé, ces variations génétiques représentent un réel facteur de risque au développement de maladies auto-immunes.

L’expression des récepteurs FcγRs ainsi que leur variation génétique ont un impact sur leur fonctionnalité et influencent de façon certaine la balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs que reçoivent la cellule. Ces variations de réponse soulignent le rôle important des FcγRs dans le maintien de l’homéostasie, de la tolérance ou encore dans la réponse aux infections ou aux immunothérapies. Les effets thérapeutiques des anticorps étant souvent liés à leur captation par les FcRs, il est important de connaître les variabilités des gènes FCGR afin d’optimiser ces thérapies.

Plusieurs études sur les polymorphismes des FCGR ont été réalisées chez les populations asiatiques, afro-américaines et caucasiennes mais il en existe peu sur les populations afro-caribéennes.

Notre travail concerne la population martiniquaise dont le patrimoine génétique est majoritairement africain mais dont l’apport génétique caucasien n’est pas négligeable. La comparaison de nos résultats aux autres études montre que les métissages ont abouti à une population martiniquaise différente de ses origines africaines. Ce travail a fait l’objet d’un article intitulé « variability of FCGRs in caribbean population » en cours de soumission à *PlosOne* (Annexe1)

2 Patients et méthodes

2.1 Groupes d'étude

Nous avons étudié un groupe de 120 témoins sains (109 femmes et 11 hommes) n'ayant pas de maladie auto-immune ni d'infection virale HIV, la plupart ayant été recrutés chez les donneurs de sang de l'EFS de Martinique ainsi que parmi le personnel soignant. Les volontaires inclus dans cette étude ont tous donné leur consentement éclairé et font partie d'un cadre éthique défini par les autorités compétentes (Etude EFIA projet Feder numéro UE-CR Martinique 32107). Les témoins ayant un taux sérique d'anticorps anti-nucléaires en immunofluorescence supérieur à 320 ont été exclus de l'étude. Les données obtenues sont comparées avec celles trouvées par différentes équipes sur d'autres populations : afro-américaines (Li *et al.* 2003; Su *et al.* 2004), africaines (Lassauniere & Tiemessen 2016), asiatiques (Chu *et al.* 2004; Siriboonrit *et al.* 2003; Zhou *et al.* 2010; Kyogoku *et al.* 2002; Chen *et al.* 2006) et caucasiennes (Magnusson, Johanneson, *et al.* 2004; Su *et al.* 2004; Lassauniere & Tiemessen 2016).

2.2 Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait à partir du sang total prélevé sur EDTA à l'aide de la trousse Qiamp DNA blood maxi kit (Qiagen). Après lyse des cellules à 70 °C pendant 10 min dans un tampon supplémenté en protéinase K, le lysat est additionné d'éthanol absolu avant d'être passé sur une colonne de silice. Après 2 lavages l'ADN est récupéré dans un tampon d'élution par centrifugation de 5 min à 4500g.

2.3 Amplification du promoteur du Gene FCGR2B par « LongRange » PCR

L'intérêt de la Long Range PCR dans ce travail est d'amplifier un fragment spécifique au gène étudié contenant la région d'intérêt. En effet l'analyse de la région promotrice du gène FCGR2B est rendue difficile par sa haute homologie avec la région promotrice du FCGR2C. Pour étudier de façon spécifique la région promotrice de FCGR2B, la totalité du gène 15 kb est amplifiée en alignant une amorce sens commune au FCGR2B/2C et une amorce anti-sens s'alignant dans l'exon7 de façon spécifique au FCGR2B (Tableau5).

La PCR est réalisée à l'aide de la trousse « Sequal Prep Long PCR kit with DNTPS » (Invitrogen). Pour chaque réaction 1ng d'ADN et 0,5 μ M de chaque amorce sont utilisés dans un volume réactionnel final de 20 μ l contenant 1X de la solution tampon, 0,5X d'« enhancer »A et 1,8 U de polymérase. La réaction de PCR consiste en une activation initiale de 2 min à 94°C suivi de 10 cycles de 10 s d'activation à 94°C puis 30 s d'alignement des amorces à la température adéquate et enfin 9 min d'extension à 68°C. Ce cycle est repris 25 fois en rallongeant le temps d'extension de 20 s à chaque cycle. Les produits obtenus sont dilués au 1/500 puis utilisés comme matrice pour une PCR nichée afin d'amplifier un fragment ciblé de la région d'intérêt.

2.4 Amplification des gènes FCGR2A, FCGR2B, FCGR3A, et FCGR3B

Les régions d'intérêt sont amplifiées par PCR, à l'aide de la trousse AmpliTaq Gold 360 DNA polymerase (Applied biosystems) dans un thermocycleur GeneAmp PCR system 9700 (Applied biosystems). Le tableau 5 montre les amorces utilisées pour l'ensemble des amplifications et séquençages.

Dans un volume réactionnel de 50 μ l contenant 100ng d'ADN génomique, 2,5 mM de MgCl₂, 200 μ M de DNTP, 0,4 μ M de chaque amorce et 1,25U de la polymérase sont ajoutés. L'amplification est effectuée dans les conditions suivantes :

Une activation de l'enzyme 10 min à 95°C, suivie d'une succession de 30 cycles composés d'une activation 30 s à 95°C, alignement de l'amorce 1min à température optimale pour chaque paire d'amorce (Tableau 5), et 1 min d'extension à 72°C » terminée d'une extension finale de 7 min à 72°C avant que les amplicons ne soient gardés à 4°C. La vérification de la taille des fragments spécifiques de chaque gène (Tableau 5) est effectuée sous Ultra Violet sur un gel d'agarose à 2% contenant un révélateur d'ADN (Midori Green staining). La non contamination des échantillons est vérifiée par l'ajout d'au moins un témoin négatif dans chaque série de PCR. A la suite de cette étape, les amplicons obtenus ont été analysés par séquençage.

2.5 Séquençage

2.5.1 Purification des amplicons destinés au séquençage

Les amplicons sont purifiés sur colonne « tamis moléculaire » dans des plaques de 96 puits MultiScreen 96 Well HTS plate (Merck Millipore) par aspiration à l'aide d'une pompe sous vide du produit résultant de la PCR. Après lavage des colonnes, les amplicons sont récupérés dans de l'eau sous agitation rotative pendant 10 min, puis ils sont dilués et utilisés comme matrice pour la réaction de séquence.

2.5.2 Réaction de séquence

La réaction de séquence est réalisée dans une plaque optique de 96 puits à l'aide de Big Dye 2.3 terminator cycle sequencing Kit (Applied biosystems), pour chaque amorce à 0,16 pMol/μl dans un volume réactionnel de 10 μl. La réaction consiste en 25 cycles successifs de 30 s de dénaturation à 96°C, alignement 15 s à 50°C et élongation 4 min à 60°C avant que les séquences ne soient gardées à 10°C.

Avant la lecture de la plaque, une purification des séquences obtenues est réalisée en additionnant directement dans les puits la solution SAM et la Résine de la trousse BigDye Xterminator Purification Kit (Applied biosystems) suivie d'une agitation de 30 min à forte vitesse. Après une brève centrifugation, les séquences sont lues dans un séquenceur capillaire ABI 3500 (Applied Biosystems) et analysées à l'aide du logiciel SeqScaLe V2.7 (AppliedBiosystems).

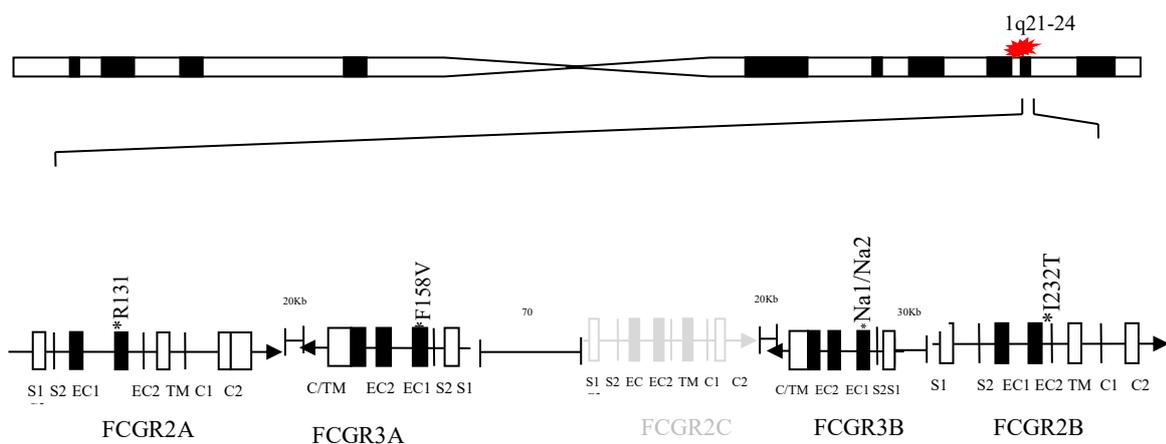


Figure 30 : gènes FCGR et localisation des polymorphismes étudiés

Tableau 5 : Amorces utilisées pour la biologie moléculaire.

	Séquence	Températures d'alignement utilisées	Longueur (paire de base)
FGR2A sens	5'CTG-AGA-CTG-AAA-AAC-CCT-TGG-AAT-C 3'	50	231
FCGR2A antisens	5'GCT-TGT-GGG-ATG-GAG-AAG-GTG-GGA-TCC-AAA 3'		
FCGR2B sens	5'CCT-GCC-TGC-TCA-CAA-ATG-TA 3'	55	375
FCGR2B antisens	5' CTG-AAA-TCC-GCT-TTT-TCC-TG 3'		
FCGR3A sens	5'TAT-TTA-CAG-AAT-GGC-AAA-GG-3'	53	152
FCGR3A antisens	5'-GTG-ATG-GTG-ATG-TTC-ACA-GT-3		
FCGR3B-NA1sens	5'CAT-TGG-TTT-CAC-AAT-GAG-AA 3'	50	141
FCGR3B-NA1 antisens	5'ATG-GAC-TTC-TAG-CTG-CAC 3'		
FCGR3B-NA2 sens	5'CAA-TGG-TAC-AGC-GTG-CTT 3'	55	219
FCGR3B antisens	5'ATG-GAC-TTC-TAG-CTG-CAC 3'		
Promoteur FCGR2B/C sens	5-TGACATACCTCCTTGTCCTTGTT-3'	58	637
Promoteur FCGR2B/C antisens	5'-GCAGTCAGCCCAGTCACTCTCAGT-3'		
Promoteur FCGR2B/2C sens	5'-GCCATCCTGACATACCTCCTT-3'	58	15000
FCGR2B antisens spécifique	5'-CCCAACTTTGTCAGCCTCATC-3'		

2.6 Analyses statistiques

L'écart de la déviation entre les distributions observées et les distributions théoriques de la loi de Hardy Weinberg est mesuré en utilisant un test de χ^2 à un degré de liberté.

La comparaison de la distribution des génotypes et des fréquences alléliques est effectuée par un test de χ^2 . Quand les échantillons théoriques étaient inférieurs à 5, un test de Fisher Exact a été utilisé.

La population caribéenne de notre étude a été prise comme référence pour les mesures d'écart. La différence est considérée significative à partir de $p < 0,05$.

3 Résultats

3.1 Le gène FCGR2A

Nous avons étudié la présence du polymorphisme H131R.

Dans notre cohorte 29,2% des témoins sont homozygotes pour le Fc γ RIIa-131R et 21% sont homozygote pour 131H. La distribution répond aux critères d'équilibre de Hardy-Weinberg. Par rapport aux autres études, nos résultats sont comparables à ceux décrits dans les populations africaines ou d'origine africaine ainsi que dans les populations caucasiennes ($P > 0,05$). Quand la comparaison est faite avec la population asiatique, l'allèle 131R est plus fréquent dans notre population (52,2% versus 19 à 36%). Nous avons également observé une augmentation significative de la fréquence de l'homozygote 131-R (29,4%) ainsi que de la fréquence de porteur de l'allèle 131R (73%) dans notre population par rapport aux populations asiatiques qui présentent respectivement de 3,2% à 9,6% et de 35% à 58% (Tableau 6).

Tableau 6 : Fréquence génotypique, allélique et porteur d'allèle pour le FcγRIIa-R131H

	Martinique (n=120)	Afro- Américain (n=100)	Afro- caribbéens (n=77)	Noirs de l'Afrique de sud (n=131)	Kenyans (n=97)	Nigériens (n=88)	Chinois (n=225)	Chinois (n=129)	Japonais (n=303)	Thai (n=187)	Caucasiens (n=379)	Neerlandais (n=100)
Fréquence génotypique n(%)												
FcγRIIa-R131H												
RR	35(29,2)	23(23)	25(32,5)	41(31,3)	23(23,7)	23(26,1)	22(9,8)	18(14,0)	11(3,6)	18(9,6)	98(25,9)	20(20)
HR	60(50)	50(50)	35(45,5)	64(48,9)	43(44,3)	47(53,4)	100(44,4)	58(45,0)	95(31,4)	76(40,6)	183(48,3)	52(52)
HH	25(21,8)	27(27)	17(22,1)	26(19,8)	31(32)	18(20,5)	103(45,8)	53(41,1)	197(65,0)	93(46,8)	98(25,9)	28(28)
Valeur de p		0,43	0,81	0,93	0,17	0,87	<0,00001*	0,00049*	0,00001*	<0,00001*	0,50	0,22
Fréquence allélique n (%)												
R	129(54,2)	96(48)	85(55,2)	146(55,7)	89(45,9)	93(52,8)	144(32)	94(36,4)	117(19,3)	112(30)	379(50)	92(46)
H	109(45,8)	104(52)	69(44,8)	116(44,3)	105(54,1)	83(47,2)	306(68)	164(63,6)	489(80,7)	262(70)	379(50)	108(54)
Valeur de p		0,19	0,85	0,73	0,08	0,78	<0,00001*	0,00007*	<0,00001*	<0,00001*	0,25	0,087
Fréquence porteur d'allèle n(%)												
R	95(79,83)	73(73)	60(77,9)	105(80,15)	66(68,04)	70(79,54)	122(54,2)	76(58,91)	106(35,0)	94(50,3)	281(74,14)	72(72)
H	84(70,59)	77(77)	52(67,5)	90(68,70)	74(76,3)	65(73,86)	203(90,2)	111(86,04)	292(96,4)	169(90,4)	281(74,14)	80(80)
Valeur de p		0,43	0,93	0,88	0,29	0,83	0,00075*	0,01*	<0,0001*	0,0003*	0,47	0,30

* : test de χ^2 significatif.

3.2 Le gène FCGR2B

Nous avons étudié le polymorphisme I232T ainsi que le polymorphisme 343G/C du promoteur de ce gène.

Nous avons observé une fréquence de 62% de la forme homozygote FcγRIIb-232I et de 17,67% de la forme homozygote 232T. La différence entre la fréquence de la forme hétérozygote observée (20%) et sa fréquence théorique (35%) suggère que cette distribution ne suit pas l'équilibre de Hardy Weinberg. La comparaison de nos résultats aux données de la littérature montre que les fréquences alléliques 232T (28%) ainsi que les fréquences du porteur d'allèle (37,8%) sont comparables à celles retrouvées dans l'étude portant sur les noirs sud-africains (30,6%) ainsi que les kenyans (30,1%) ($p > 0,05$). Par contre ces fréquences sont plus élevées que celles retrouvées dans les populations chinoises (15,6%), japonaises (22,3%) et caucasiennes (11,5 à 13%).

Par ailleurs la population martiniquaise présente la fréquence de la forme homozygote TT la plus élevée (17,6%) quel que soit la population comparée : africaine ou d'origine africaine (2,3-11%), caucasienne (2-4%) ou asiatique (4,7 à 7,3%) (Tableau7).

Tableau 7 : Fréquence génotypique, allélique et porteur d'allèle pour le FcγRIIb-I232T

	Martinique (n=120)	Noirs Afrique du sud (n=131)	Kenyens (n=97)	Nigériens (n=88)	Afro américains (n=149)	Japonais (n= 303)	Chinois (n=225)	Taiwais (n=372)	Thai n=167)	Caucasiens (n= 379)	Neerlandais (n=100)	swiss (n=228)
Fréquence génotypique (%)												
FcγRIIb-I232T												
II	75 (62,2)	61 (46,6)	42 (43,3)	54 (61,4)	79 (53)	183 (60,4)	155 (69)	206 (55)	97 (58,8)	296 (78,1)	81 (81)	171 (75)
IT	24 (20,2)	59 (45)	50 (51,5)	32 (36,4)	53 (36)	104 (34,3)	70 (31)	144 (39)	56 (33,9)	73 (19,3)	15 (15)	53 (23)
TT	21 (17,6)	11 (8,4)	5 (5,2)	2 (2,3)	17 (11)	16 (5,3)	0 (0)	22 (6)	12 (7,3)	10 (2,6)	4 (4)	4 (2)
<i>Valeur de p</i>		0,00008*	<0,00001*	0,001*	0,014*	0,00003*	<0,00001*	<0,0001*	0,004*	<0,00001*	0,0023*	<,00001*
Fréquence allélique no(%)												
I	152 (63,8)	181 (69,1)	134 (69,1)	140 (79,5)	211 (71)	470 (77,6)	380 (84,4)	556 (75)	250 (75,8)	665 (87,7)	177 (88,5)	395 (86,6)
T	66 (27,7)	81 (30,9)	60 (30,1)	36 (20,5)	87 (29)	136 (22,4)	70 (15,6)	188 (25)	80 (24,2)	93 (12,3)	23 (11,5)	61 (13,4)
<i>Valeur de p</i>		0,879	0,88	0,026*	0,79	0,021*	<0,00001*	0,14	0,117	<0,00001*	<0,0001*	<0,00001*
Allele carrier frequency no(%)												
I	98 (82,3)	120 (91,6)	92 (94,8)	86 (97,7)	132 (88,6)	287 (94,7)	225 (100)	350 (94,1)	153 (92,7)	369 (97,4)	96 (96)	224 (98,2)
T	45 (37,8)	70 (53,4)	55 (56,7)	34 (38,6)	70 (47,0)	120 (39,6)	70 (31)	166 (44,6)	68 (41,2)	83 (22)	19 (19)	57 (25)
<i>Valeur de p</i>		0,30	0,28	0,58	0,536	0,655	0,084	0,87	0,888	0,00088*	0,057	0,01*

* : test de χ^2 significatif

Nous avons également étudié le génotype du promoteur de FcγRIIb chez 30 témoins sains martiniquais pour y évaluer la présence du polymorphisme -343G/C.

Dans notre population 94% des témoins sont porteurs de l'allèle sauvage -343G, 6% sont hétérozygotes alors que nous n'avons trouvé aucun témoin homozygote pour l'allèle 343C. Ces résultats sont similaires aux résultats trouvés dans la population afro-américaine (Tableau 8).

Tableau 8 : Fréquence génotypique, allélique et porteur d'allèle du polymorphisme -343G/C du promoteur de FCGR2B.

	Martinique (n=30)	Afro-américains (n=67)	Noirs Afrique du sud (n=131)	Caucasiens Afrique de sud (n=32)	American Caucasiens (n=366)	Américain Caucasien (n=130)
Fréquence génotypique -343 G/C no(%)						
G/G	28 (94)	64 (95)	131 (100)	19 (59.4)	300 (82.0)	100 (77)
G/C	2 (6)	3 (5)	0 (0)	12 (37.5)	63 (17.2)	29 (22)
C/C	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (3.1)	3 (0.8)	1 (<1)
<i>Valeur de p</i>		0,9	0,012	0,0074	0,278	0,126
Fréquence allélique no(%)						
-343G	58 (96.6)	131 (97.7)	262 (100)	50 (78.1)	663 (90.6)	229 (88.07)
-343C	2 (3)	3 (2.3)	0 (0)	14 (21.9)	69 (9.4)	31 (11.9)
<i>Valeur de p</i>		0,40	0,003*	0,002*	0,080	0,048
Fréquence de porteur d'allèle no(%)						
-343G	30 (100)	67 (100)	131 (100)	31 (96.8)	363 (99.2)	129 (99.2)
-343C	2 (6)	3 (5)	0 (0)	13 (40)	66 (18.1)	30 (23)
<i>Valeur de p</i>		0,66	0,0039*	0,011*	0,15	0,081

* : test de χ^2 significatif.

3.3 Le gène FCGR3A

Le polymorphisme 158V/F a été étudié.

Nous avons observé une fréquence de 31,7% de la forme homozygote FcγRIIIa-158F ainsi qu'une fréquence de 39,1% pour la forme homozygote 158V. La fréquence de la forme hétérozygote 158VF de 29% est significativement différente de la fréquence théorique 49% ($P < 0,05$). La distribution des allèles de ce gène ne répond pas aux critères de l'équilibre de Hardy Weinberg.

La comparaison de nos données avec les données publiées sur les autres populations, donne une sur-représentation de l'allèle FcγRIIIa-158V dans la population afro-caribéenne avec 53,4% contre 26,9 % à 30,5% dans la population caucasienne et 28 % à 38,4% dans la population asiatique. L'étude de la fréquence génotypique montre une fréquence significativement plus élevée de l'homozygote 158-V (38,6%) par rapport à la population africaine (2,3% à 9,9%), caucasienne (7% à 9,7%) et asiatique (8,6 % à 14%). L'augmentation de la fréquence du porteur d'allèle 158-V est également significative dans notre population (68,1%) par rapport aux mêmes populations africaine, caucasienne et asiatique (Tableau 9).

Tableau 9 : Fréquence génotypique, allélique et porteur d'allèle du FcγRIIIa-F158V.

	Martinique (n=120)	Noirs de l'Afrique du sud (n=131)	Kenyans (n=97)	Nigériens (n=88)	Chinois (n=225)	Japonais (n=303)	Thaï (n=187)	Caucasiens (n=379)	Néerlandais (n=100)
Fréquence génotypique no (%)									
FcγRIIIa F158V									
FF	38 (31,7)	50 (38,2)	74 (43,8)	46 (52,3)	155	145 (47,8)	64 (34,2)	212 (55,9)	48(48)
FV	35 (29,2)	63 (48,1)	8 (25)	40 (45,5)	94	132 (43,6)	96 (52,3)	130 (34,3)	41(41)
VV	47 (39,1)	13 (9,9)	7 (21,9)	2 (2,3)	16	26 (8,6)	27 (14,4)	37 (9,7)	7(7)
Valeur de p		<0,00001*	<0,00001*	<0,000001*	<0,00001*	<0,00001*	<0,00001*	0,00001*	<0,00001*
Fréquence allélique no (%)									
F	111 (46,6)	169 (63,3)	167 (86,1)	132 (75)	324 (72)	422 (69,6)	224 (59,9)	554 (73,1)	141(69,5)
V	127 (53,4)	98 (36,7)	27 (13,9)	44 (25)	126 (28)	184 (30,4)	150 (40,1)	204 (26,9)	57(30,5)
Valeur de p		0,00017*	<0,00001*	<0,00001*	<0,00001*	<0,00001*	0,001*	<0,00001*	<0,00001*
Fréquence porteur d'allèle no (%)									
F	73 (61,3)	113 (86,2)	82 (84,5)	86 (97,7)	209 (92,8)	277 (91,4)	160 (85,6)	342 (90,3)	89(89)
V	81 (68,1)	76 (58,1)	15 (15,5)	42 (47,7)	110 (48,9)	158 (52,1)	123 (65,8)	167 (44,1)	48(48)
Valeur de p		0,022*	<0,00001*	0,0008*	0,0001*	0,0004*	0,067	<0,00001*	0,0026*

* : test de χ^2 significatif.

3.4 Le gène FCGR3B

La fréquence de l'allèle nul de FCGR3B (1,6%) est en concordance avec les résultats de la littérature. Il existe une fréquence génotypique de la forme homozygote de FcγRIIIb-Na1 de 14,2% et de l'homozygote FcγRIIIb-Na2 de 11,7%. Cette distribution est différente de celle retrouvée dans la population sud-africaine (23% et 39,7%), dans la population asiatique (34% et 11% en moyenne) et enfin dans la caucasienne (17% et 38%) (Tableau 11).

Tableau 10 : Fréquence génotypique, allélique et porteur d'allèle du FcγRIIIb-Na1/Na2.

		Martinique (n=120)	Noirs de l'Afrique du sud (n=131)	Kenyens (n=97)	Nigériens (n=88)	Chinois (n=129)	Japonais (n=303)	Néerlandais (n=100)
Fréquence génotypique n (%)								
FcγRIIIb	Na1,Na1	17 (14,2)	31 (23,6)	–	–	41 (31,8)	116 (38,3)	17 (17)
	Na1,Na2	87 (72,5)	48 (36,6)	–	–	74 (57,4)	145 (47,8)	45 (45)
	Na2,Na2	14 (11,7)	52 (39,7)			14 (10,9)	42 (13,9)	38 (38)
	Nul	2 (1,6)	0 (0)	–	–	–	–	–
Valeur de p			<0,00001*			0,005*	<0,00001*	<0,00001*
Fréquence allélique n (%)								
FcγRIIIB	Na1	120 (51,28)	110 (42)	–	–	156 (60,5)	377 (62,2)	77 (37,7)
	Na2	114 (48,72)	152 (58)	–	–	102 (39,5)	229 (37,8)	127 (62,3)
Valeur de p			0,038*			0,040*	0,0038*	0,0045*
Fréquence de porteur d'allèle n(%)								
FcγRIIIB	Na1	103 (88,03)	79 (60,3)	–	–	115 (89,15)	261 (86,1)	62 (62)
	Na2	100 (85,47)	100 (76,3)	–	–	88 (68,21)	187 (61,7)	83 (83)
Valeur de p			0,197			0,23	0,073	0,141

* : test de χ^2 significatif.

4 Discussion

Dans cette première partie nous avons analysé la distribution des polymorphismes génétiques des récepteurs FcγRIIa-H131R (rs1801274), FcγRIIb-I232T (rs1050501), FcγRIIb-343G>C (rs3219018), FcγRIIIa-F158V (rs396991) et FcγRIIIb-Na1/Na2, dans une cohorte de 120 volontaires martiniquais sains. Historiquement, la population martiniquaise est issue d'un métissage complexe entre les africains (esclaves du golfe de Guinée) et les européens (colons). Cette distribution est comparée à la distribution des mêmes polymorphismes présents dans les populations caucasiennes, asiatiques, africaines ainsi que celles d'origine africaine (afro-américaines) à partir des données de la littérature.

La substitution d'une histidine par une arginine à la position 131 du domaine Ig proximal du FcγRIIa induit un changement dans l'affinité du récepteur pour son ligand. En effet, contrairement au FcγRIIa-131R, le FcγRIIa-131H est capable de se lier de façon très efficace à l'IgG2 (Parren *et al.* 1992). De la même façon, le polymorphisme FcγRIIIa-F158V change l'affinité de ce récepteur (Wu *et al.* 1997). Le FcγR-158V capte plus fortement les IgG1, les IgG3 et les IgG4 contrairement au FcγRIIIa-158F (Koene *et al.* 1997). En ce qui concerne le FcγRIIIb, la forme Na1 permet une meilleure phagocytose à la cellule.

Dans notre population, nous avons observé une sur-représentation des allèles FcγRIIa-131R (faible affinité). Nos résultats sont en concordance avec les résultats de plusieurs travaux sur la population afro-caribéenne du Royaume-Uni (Botto *et al.* 1996), des populations africaines (Lassauniere & Tiemessen 2016), ainsi que des populations caucasiennes (Breunis *et al.* 2008).

En dehors du FCGR2A, la distribution des allèles de FCGR2B, FCGR3A et FCGR3B ne répond pas aux critères de l'équilibre de Hardy Weinberg.

Concernant le FcγRIIIa, en comparaison avec les résultats de la littérature sur les populations africaines, caucasiennes, asiatiques et d'origine africaine, notre population martiniquaise présente la fréquence la plus élevée de l'allèle FcγRIIIa-158V et de la forme homozygote VV. Des études ont montré que cet allèle serait un facteur de risque d'atteinte rénale dans certaines MAI (Alarcon *et al.* 2006)

Enfin, toujours par rapport aux données de la littérature concernant les populations africaines, asiatiques et caucasiennes, il existe une sous-représentation de l'allotype Na1 du FcγRIIIb dans la population afro-caribéenne.

L'allèle 131R du FcγRIIa a été décrit comme étant un allèle protecteur contre les formes les plus graves de la dengue. Cette protection serait liée à un déficit de la phagocytose diminuant ainsi l'infection des macrophages par les virus (Littau *et al.* 1990; Loke *et al.* 2002). Par contre, cette diminution de l'affinité pour les IgG aurait une répercussion sur la clairance des CI, la rupture de tolérance ainsi que la réponse aux immunothérapies. En effet, les patients homozygotes pour les allèles FcγRIIa131-H et FcγRIIa-158V ont une meilleure réponse au traitement par immunothérapies que ce soit dans un contexte auto-immun ou cancéreux (Taniuchi *et al.* 2005; Tutuncu *et al.* 2005; Canete *et al.* 2009; Cornec *et al.* 2012; Liu *et al.* 2016).

Pour le FcγRIIb, une substitution d'une isoleucine par une thréonine à la position 232, au niveau de la partie transmembranaire induit l'exclusion du récepteur du radeau lipidique de la cellule où se trouvent les récepteurs activateurs et, par conséquent, l'action inhibitrice du FcγRIIb-232T ne peut se déclencher (Floto *et al.* 2005). Dans la population martiniquaise, nous avons observé une forte fréquence de l'allèle T232, ce résultat est en accord avec les résultats des études sur les populations afro-américaines et africaines (Li *et al.* 2003; Lassaunier & Tiemessen 2016). Par ailleurs, la population martiniquaise a la plus forte fréquence de l'homozygote 232TT. Cet allèle mineur qui semble avoir un rôle protecteur sur les formes les plus graves de paludisme, a été sélectionné dans les populations exposées ou ancestralement exposées à cette parasitose (Willcocks *et al.* 2010). Dans notre étude, nous avons mis en évidence une augmentation de l'homozygote 232T dans la population caribéenne par rapport aux populations afro-américaines, africaines, asiatiques et caucasiennes. Cet allèle a été associé aux MAI et notamment le LES dans plusieurs populations (Chu *et al.* 2004; Siriboonrit *et al.* 2003; Kyogoku *et al.* 2004). Par contre cette association n'a pas été retrouvée dans la population afro-américaine ou la fréquence allélique est comparable à notre population (Li *et al.* 2003).

L'association de plusieurs polymorphismes des FcRs à la surface de la cellule peut aggraver ou pallier au déficit de fonction induit par certains. Par exemple, les neutrophiles exprimant à la fois FcγRIIa-131HH et FcγRIIb-Na2/Na2 possède une meilleure phagocytose que ceux possédant les autres combinaison (van der Heijden *et al.* 2014), ce qui souligne l'importance de la prise en considération de l'association des polymorphismes des différents récepteurs et non d'un seul récepteur sorti de son contexte cellulaire.

En conclusion, nos résultats suggèrent que la population martiniquaise est bien distincte des autres populations du fait des métissages ainsi que des pressions de sélection liées à l'environnement infectieux. A l'ère des immunothérapies il est important de connaître la répartition de ces différents polymorphismes au niveau de la population mais également à titre individuel pour chaque patient. La forte proportion du polymorphisme TT du FcγRIIb retrouvée chez les martiniquais soulève la question de l'existence d'un lien avec l'émergence du LES aux Antilles, la gravité et la fréquence de cette pathologie étant un problème de santé publique en Martinique.

II FCGR et Lupus

1 Introduction

Le lupus est le prototype des maladies auto-immunes dont l'incidence varie considérablement selon l'ethnie et le lieu où il est étudié. La part de la génétique dans le développement de lupus n'est plus à démontrer. Dans les populations non caucasiennes, le LES est souvent beaucoup plus sévère, les atteintes rénales en particulier y sont plus fréquentes et plus graves. En Martinique où la population est d'ascendance africaine le tableau clinique de LES est sévère et représente la deuxième cause de mise en épuration extra rénale. Cette maladie est en cela un véritable problème de santé publique touchant en moyenne entre 15 et 25 nouveaux malades par an sur la Martinique (Deligny *et al.* 2002).

Les FcγRs sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie et par conséquent les polymorphismes qui modifient l'affinité ou la fonctionnalité de ces récepteurs peuvent être impliqués directement ou indirectement dans la rupture de la tolérance au soi et l'enclenchement des mécanismes physiopathologiques de la maladie

Le lien entre les polymorphismes de ces récepteurs et le LES a été démontré dans plusieurs études sur les populations caucasiennes (Magnusson, Johanneson, *et al.* 2004), afro-américaine (Botto *et al.* 1996; Li *et al.* 2003) et asiatique (Chu *et al.* 2004; Kyogoku *et al.* 2004; Siriboonrit *et al.* 2003; Chen *et al.* 2006). En dehors d'une étude en 1996 sur le gène FCGR2A dans la population afro-caribéenne vivant en Angleterre, aucune autre étude n'a été réalisée sur cette population (Botto *et al.* 1996). Nous avons étudié, pour la première fois chez les patients martiniquais atteints de LES, les polymorphismes FcγRIIa-R131H (rs1801274), FcγRIIb-I232T (rs1050501) FcγRIIIa-F176V (rs396991) et FcγRIIIb-Na1/Na2. Ces travaux font l'objet d'un article intitulé « Association of FCGR and Lupus in Martinique » en cours de correction pour une soumission à *PlosOne*.

2 Patients et méthodes

2.1 Groupes d'étude

Nous avons étudié une cohorte de 131 patients atteints de LES remplissant les critères de l'ACR (American College of Rheumatology) et 120 témoins sains n'ayant pas de maladie auto-immune ni d'infection virale (VIH) recrutés parmi les donneurs de sang de l'EFS de Martinique et du personnel soignant du CHU de la Martinique.

Les patients et les volontaires inclus dans cette étude ont tous donné leur consentement éclairé et font partie d'un cadre éthique défini par les autorités compétentes. Les témoins sains ayant un taux sérique d'anticorps anti-nucléaires en immunofluorescence supérieur à 1/320 ont été exclus de l'étude. Cette étude fait partie d'un projet ayant obtenu des financements FEDER (Etude EFIA projet Feder numéroUE-CR Martinique 32107).

2.2 Amplification

Pour étudier les gènes FCGR2A, 2B, 3A, 3B, nous avons utilisé les mêmes méthodes (PCR, séquençage, révélation) que précédemment décrites dans le chapitre I des résultats.

En ce qui concerne le gène du CD72 : la région d'intérêt du gène est amplifiée en utilisant les amorces suivantes : 6-Fam-5'-TTGGTAAGAGTGAGGGGATGG-3' et une anti-sens non marquée 5'-TACAAGTTTTCTCTCGGGCC-3'. Les conditions d'amplification sont les suivantes : une activation de l'enzyme 10 min à 95°C, suivie d'une succession de 30 cycles composés de 30 s d'activation à 95°C, 1 min d'alignement de l'amorce à 55°C et 1 min d'extension à 72°C, terminée d'une extension finale de 7 min à 72°C avant que les amplicons ne soient gardés à 4°C.

2.3 Analyse de microsatellite

Après la visualisation sur gel des produits de PCR obtenus pour le CD72, ceux-ci sont dilués au 1/10 ou au 1/100 selon l'intensité de la bande puis 0,5 µl de cette dilution sont ajoutés à 9 µl de HiDiTM formamide (Applied Biosystems) et 0,5µl d'un étalon interne 400HD (RoxTM DYE) STANDARD (Applied Biosystems). Après une dénaturation à 95°C et une brève centrifugation, les fragments sont lus par le séquenceur capillaire ABI 3500 (Applied Biosystems) et analysés grâce au logiciel GeneMapper.

2.4 Analyses statistiques

L'écart de la déviation des distributions observées et théoriques de la loi de Hardy Weinberg est mesuré en utilisant un test de χ^2 à un degré de liberté.

La comparaison de la distribution des génotypes et des fréquences alléliques est effectuée par un test de χ^2 . Quand les échantillons théoriques sont inférieurs à 5, un test de Fisher Exact a été utilisé.

La population témoin saine martiniquaise de notre précédente étude a été prise comme référence pour les mesures d'écart. La différence est considérée significative à partir de $p < 0,05$.

3 Résultats

3.1 Patients et témoins

Les 131 patients ayant une maladie lupique sont répartis en 120 femmes et 11 hommes âgés entre 19 à 85 ans (moyenne d'âge de $49,1 \pm 14,8$). Cinq patients présentent exclusivement un lupus cutané et 126 patients souffrent d'un lupus érythémateux disséminé. Parmi ces LES 56 (42,7%) ont une atteinte rénale contre 46 (35,1%) sans atteinte rénale. Le statut vis-à-vis de l'atteinte rénale n'est pas connu chez 24 patients. Les 120 témoins volontaires sains sont répartis en 109 femmes et 11 hommes avec une moyenne d'âge de $53,9 \pm 18,1$ (Tableau 11).

La distribution entre les patients et les témoins étant comparable, nous a réalisé une étude cas/témoins.

Tableau 11 : Comparaison entre les patients LES et les Témoins

	Patients (n=131)	Témoins (n=120)	$X^2(P)$
Hommes n(%)	11 (8,4)	11 (9,2)	0,046 (0,82)
Femmes n(%)	120 (91,6)	109 (90,8)	
Moyenne d'âge $\pm\gamma$	$49,1 \pm 14,8$	$53 \pm 18,1$	

γ : écart type.

3.2 Polymorphisme du promoteur du FCGR2B

Nous avons amplifié et génotypé la région promotrice du gène FCGR2B de 32 patients LES et 30 témoins sains, le génotype commun -343 G/G est présent respectivement chez 95% des patients LES et 94% des témoins. En ce qui concerne le génotype à risque -343C/C, celui-ci n'est retrouvé ni dans la population témoin ni dans le groupe des patients LES. (Tableau 12)

Tableau 12 : Distribution du génotype (-343G/C) du promoteur du FCGR2B.

	Patients (n=34)	Témoins (n=30)
Fréquence génotypique - 343 G/C no(%)		
G/G	32 (95)	28 (94)
G/C	2 (5)	2 (6)
C/C	0 (0)	0 (0)

3.3 FCGR et association au lupus

Comme précédemment avec la population témoin martiniquaise nous avons étudié les différents polymorphismes des FcγRs : le H131R du FcγRIIa, le I232T du FcγRIIb, le 158V/F du FcγRIIIa et le Na1/Na2 du FcγRIIIb.

Aucune différence significative n'est retrouvée entre le groupe témoin et le groupe LES pour les polymorphismes concernant le FcγRIIa et le FcγRIIb.

Par contre pour le FcγRIIIb, il existe une différence significative pour les formes homozygotes Na1 et Na2 qui sont retrouvées respectivement chez 32,6% et 2,3% chez les patients contre 14,5% et 11,9% chez les témoins (p= 0,0002).

La forme homozygote Na1 constitue un risque pour le développement du lupus dans la population martiniquaise (Odd Ratio de 2,84).

En ce qui concerne les fréquences alléliques nous retrouvons une augmentation significative de l'allèle Na1 dans le groupe des patients (64,6%) par rapport au groupe témoin (51,28%) (p=0,0018).

Nous retrouvons également pour le FcγRIIIa une augmentation de l'allèle 158F chez 56,6% des patients contre 46,6% des témoins (p=0,021) (Tableau 13).

Les résultats chez les patients présentant un lupus cutané exclusif étant identiques à ceux des patients présentant une forme systémique, nous ne les avons pas individualisés.

Tableau 13 : Distribution des polymorphismes des FcγRs dans la population lupique martiniquaise et témoins.

		Patients (n=131)	Témoins (n=120)	P	OR
Fréquence génotypique n (%)					
FcγRIIa	H/H	30 (22,1)	25 (21)		
	R/H	56 (42,7)	60 (50)		
	R/R	45 (34,3)	35 (29)	0,546	
FcγRIIb	I/I	73 (55,7)	74 (62)		
	I/T	36 (27,5)	24 (20)		
	T/T	22 (16,8)	22 (18)	0,394	
FcγRIIIa	F/F	59 (45,4)	38 (31,6)		
	F/V	30 (23,8)	35 (29,2)		
	V/V	41 (31,5)	47 (39,2)	0,09	
FcγRIIIb	Na1/Na1	42 (32,6)	17 (14,2)		2,829
	Na1/Na2	84 (65,1)	87 (72,5)		
	Na2/Na2	3 (2,3)	14 (11,7)		0,184
	Nul	2 (1,5)	2 (1,6)	0,0002*	
Fréquence allélique n (%)					
FcγRIIa	H	116 (44,3)	110 (45,8)		
	R	146 (55,7)	130 (54,2)	0,732	
FcγRIIb	I	182 (69,5)	172 (71,7)		
	T	80 (30,5)	68 (28,3)	0,49	
FcγRIIIa	F	148 (56,5)	111 (46,3)		
	V	112 (43,1)	129 (53,7)	0,021*	
FcγRIIIb	Na1	168 (64,6)	121 (50)		1,75
	Na2	90 (34,6)	115 (48)	0,0018*	0,568
Fréquence du porteur d'allèle n (%)					
FcγRIIa	H	86 (65,6)	85 (70,8)		
	R	101 (77,1)	95 (79,2)	0,818	
FcγRIIb	I	109 (83,2)	98 (81,7)		
	T	58 (44,3)	46 (38,3)	0,543	
FcγRIIIa	F	89 (67,9)	73 (60,8)		
	V	71 (54,2)	82 (68,3)	0,144	
FcγRIIIb	Na1	126 (97,7)	104 (86,7)		
	Na2	87 (67,4)	101 (84,2)	0,084	

*: test de χ^2 significatif

OR: odd ratio,

3.4 FCGR2A est associé aux atteintes rénales dans le LES

Nous avons recherché un lien entre les différents polymorphismes et une atteinte rénale chez les patients LES. L'atteinte rénale des patients LES a été confirmée par une ponction biopsie rénale.

Il existe une association entre la présence de l'homozygote FcγRIIa-131R et la présence d'une atteinte rénale chez les patients LES (Odd ratio = 3.41). En effet l'homozygote 131R est retrouvé chez 51,2% des patients avec atteinte rénale contre 23,9% chez les patients LES sans atteinte.

La fréquence allélique du 131R est également plus élevée dans le groupe de LES avec atteinte rénale (67,8%) par rapport au groupe LES sans atteinte rénale (50%) ($p=0,009$). Le risque de développer une atteinte rénale dans le cadre d'un lupus est 2 fois plus élevé en présence de l'allèle 131R.

En ce qui concerne le FcγRIIIa, l'allèle 158V est également plus fortement présent dans le groupe de LES avec atteinte rénale (51%) que sans atteinte (33,3%). La forme homozygote 158V représente également un risque d'atteinte rénale chez les patients LES (Tableau 14).

Aucune association n'est retrouvée entre les polymorphismes des gènes FcγRIIb et FcγRIIIb et l'atteinte rénale chez les patients LES.

Tableau 14 : Génotype et fréquence allélique des FcγRs chez les témoins et les patients avec ou sans atteinte rénale.

		Patients avec atteinte rénale (n=56)	Patients sans atteinte rénale (n=46)	Témoins (n=120)	P	OR
Fréquence génotypique n (%)						
FcγRIIa	H/H	9 (16,1)	11 (23,9)	25 (21)	0,016*	3,41
	H/R	18 (32,1)	24 (52,2)	60 (50)		
	R/R	29 (51,2)	11 (23,9)	35 (29)		
FcγRIIb	I/I	30 (53,6)	25 (54,3)	74 (62)	0,99	
	I/T	16 (28,6)	13 (28,3)	24 (20)		
	T/T	10 (17,8)	8 (17,4)	22 (18)		
FcγRIIIa	FF	21 (37,5)	25 (54,3)	38 (31,6)	0,12	
	FV	13 (23,2)	10 (21,7)	35 (29,2)		
	VV	22 (39,3)	10 (21,7)	47 (39,2)		
FcγRIIIb	Na1/Na1	20 (35,7)	12 (26,1)	17 (14,2)	0,6	
	Na1/Na2	35 (62,5)	31 (67,4)	87 (72,5)		
	Na2/Na2	1 (1,7)	1 (2,2)	14 (11,7)		
	Nul	0 (0)	2 (4,3)	2 (1,6)		
Fréquence allélique n (%)						
FcγRIIa	H	36 (32,1)	46 (50)	110 (45,8)	0,009*	2,11
	R	76 (67,8)	46 (50)	130 (54,2)		
FcγRIIb	I	76 (67,8)	63 (68,5)	172 (71,7)	0,924	
	T	36 (32,1)	29 (31,5)	68 (28,3)		
FcγRIIIa	F	55 (49,1)	60 (66,6)	111 (46,3)	0,012*	2,07
	V	57 (51)	30 (33,3)	129 (53,7)		
FcγRIIIb	Na1	75 (66,9)	75 (69,5)	121 (50)	0,69	
	Na2	37 (31,2)	33 (30,5)	115 (48)		
Fréquence porteur d'allèle n (%)						
FcγRIIa	H	27 (48,2)	35 (76,1)	85 (70,8)	0,101	
	R	47 (83,9)	35 (76,1)	95 (79,2)		
FcγRIIb	I	46 (82,1)	38 (82,6)	98 (81,7)	0,95	
	T	26 (46,4)	21 (45,7)	46 (38,3)		
FcγRIIIa	F	34 (60,7)	35 (76,1)	73 (60,8)	0,109	
	V	35 (62,5)	20 (43,5)	82 (68,3)		
FcγRIIIb	Na1	55 (98,2)	43 (93,5)	104 (86,7)	0,68	
	Na2	36 (64,3)	32 (69,6)	101 (84,2)		

* : test de χ^2 significatif.

OR : odd ratio calculé par rapport aux témoins.

3.5 Le déséquilibre de liaison

Nous avons recherché s'il existait des déséquilibres de liaison entre les gènes FCGR2A, FCGR2B, FCGR3A et FCGR3B pour déterminer si l'association de certains polymorphismes n'était pas le résultat d'une liaison ou d'une transmission en bloc de ces gènes.

Il existe une liaison entre les gènes FCGR2A et FCGR3A ainsi qu'entre FCGR2A et FCGR3B chez les patients LES ($r^2 = 0,03$ et $0,03$ respectivement) ainsi que chez les témoins, cette liaison étant plus forte chez les témoins ($r^2 = 0,04$ et $0,06$ respectivement)

Chez les patients ayant une atteinte rénale, la liaison entre le FCGR2A et le FCGR3A est plus forte ($r^2=0.085$) et il existe une liaison plus faible qui reste significative entre le FCGR3A et FCGR3B (Figure 31).

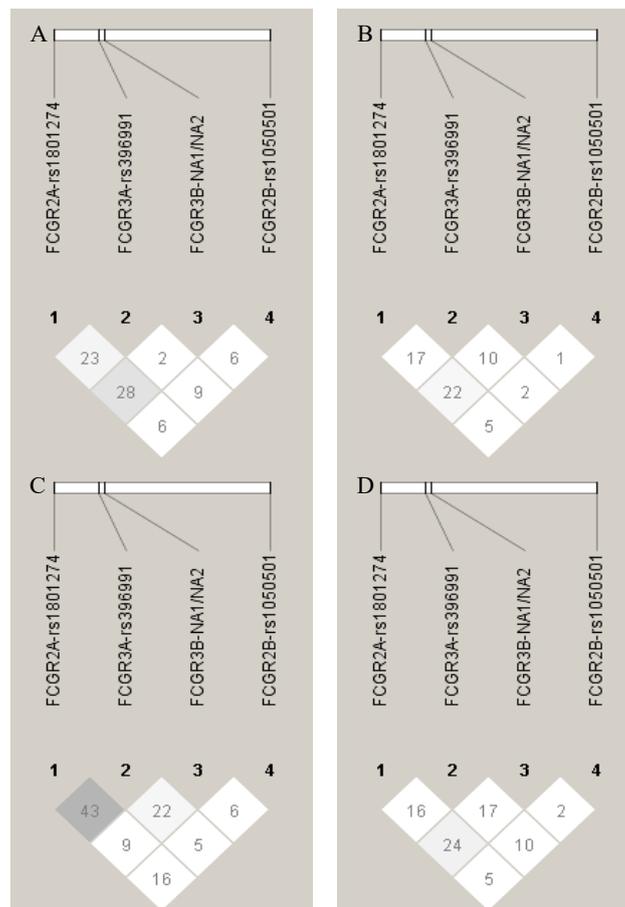


Figure 31 : Déséquilibre de liaison entre les différents gènes. Représentation schématique des D' entre les gènes.

(A) : les témoins, (B) : patients LES, (C) : patients LES avec atteinte rénale, (D) patients LES sans atteinte rénale.

3.6 Association de l'haplotype FcγRIIa-131R FcγRIIIa-158V à l'atteinte rénale

Nous avons recherché si les déséquilibres de liaison précédemment trouvés (FCGR2A-FCGR3A et FCGR3A-FCGR3B) influençaient l'association des polymorphismes présents sur ces gènes et leur impact sur les atteintes rénales dans le LES : polymorphismes 158F/V pour FCGR3A, polymorphismes Na1/Na2 pour FCGR3B et polymorphismes 131R/H pour FCGR2A.

La fréquence de l'haplotype 131R-158V est plus élevée dans le groupe de patients LES avec atteinte rénale (24%) par comparaison avec le groupe de patients LES sans atteinte rénale (18,3%). Cet haplotype est associé à l'augmentation du risque de l'atteinte rénale dans le LES (OR= 2,32) (Tableau 15).

Aucune association significative avec l'atteinte rénale n'est retrouvée pour les autres combinaisons d'haplotypes

Tableau 15 : Haplotypes des différents FcγR chez les témoins, les patients LES et les avec ou sans atteinte rénale.

	LES	Atteinte rénale	sans atteinte rénale	Témoins	OR1	OR
Ila-IIIa						
H-F	51 (23,5)	12 (13,0)	26 (31,7)	44 (19,3)	0,32	
H-V	49 (22,6)	22 (24)	15 (18,3)	63 (27,6)	1,4	0.58
R-F	69 (31,8)	30 (32,6)	28 (34,14)	60 (26,3)		
R-V	48 (22,1)	28 (30,4)	13 (15,8)	61 (26,7)	2,32	0.51
Valeur de p	0,24	0,38	0,01*			
Valeur de p1		0,0093*				
Ila-IIIb						
H-NA1	78 (27)	26 (18)	34 (30)	75 (24)		
H-NA2	57 (20)	43 (29)	25 (22)	69 (22)		
R-NA1	91 (32)	47 (32)	33 (29)	80 (26)		
R-NA2	60 (21)	30 (21)	22 (19)	83 (27)		
Valeur de p	0,18	0,075	0,3619			
Valeur de p1		0,146				
IIIa-IIIb						
F-NA1	81 (32)	34 (30)	32 (36)	62 (23)		
F-NA2	52 (21)	20 (18)	22 (25)	60 (23)		
V-NA1	67 (27)	34 (30)	19 (21)	73 (28)		
V-NA2	50 (20)	25 (22)	16 (18)	69 (26)		
Valeur de p	0,11	0,395	0,076			
Valeur de p1		0,311				

OR et p : odd ratio et p calculés par rapport aux témoins.

OR1 et p1 : odd ratio et p calculés entre patients avec atteinte rénale et sans atteinte rénale.

* : test de χ^2 significatif.

3.7 CD72

La molécule CD72 existe sous deux formes, l'haplotype 1 et l'haplotype 2. Ce dernier (Hap2) aurait un rôle protecteur de l'atteinte rénale chez les patients LES porteurs du polymorphisme 232T (Hitomi *et al.* 2004). Devant le pourcentage important de porteurs de l'allèle 232T du FcγRIIb dans la population martiniquaise témoin, nous avons étudié les haplotypes de la molécule CD72 chez les témoins sains et les patients LES avec ou sans atteinte rénale.

Pour confirmer cette hypothèse de l'haplotype protecteur, nous avons étudié les haplotypes de CD72 par l'analyse de microsatellites. Il existe une légère augmentation de l'haplotype 1 à l'état homozygote dans le groupe des témoins mais cette différence n'est pas significative ($p=0,052$) (Tableau 16). Il n'existe aucune différence significative dans la distribution des allèles et des porteurs d'allèle entre les différents groupes témoins et LES, ni LES avec ou sans atteinte rénale.

Tableau 16 : Distribution des haplotype Hap1 et Hap2 du CD72 chez les témoins, les patients atteints de lupus systémique (LES), ainsi que patients avec et sans atteinte rénale.

	LES (n=126)	LES avec atteinte rénale (n=56)	LES sans atteinte rénale (n=46)	Témoins (n=120)
Fréquence génotypique n (%)				
Hap1 /Hap1	11 (9,2)	6 (10,7)	3 (6,5)	22(18,3)
Hap1 /Hap2	67 (52,6)	30 (53,6)	24 (52,2)	51(42,5)
Hap2 /Hap2	48 (38,2)	20 (35,7)	19 (41,3)	47(39,2)
Valeur de p	0,057	0,282	0,149	
Valeur de p1	0,69			
Fréquence allélique n (%)				
Hap1	89 (35,5)	42 (37,5)	30 (32,6)	95 (39,6)
Hap2	163 (64,5)	70 (62,5)	62 (67,4)	145 (60,4)
Valeur de p	0,32	0,7	0,2	
Valeur de p1	0,46			
Fréquence de porteur d'allèle n (%)				
Hap 1	78 (61,8)	36 (64,3)	27 (58,7)	73 (60,8)
Hap 2	115 (91)	50 (89,3)	43 (93,4)	98 (81,6)
Valeur de p	0,6	0,89	0,55	
Valeur de p1	0,67			

p : calculé par rapport aux témoins.

p1 : calculé entre patients LES avec/ sans atteinte rénale.

3.8 L'haplotype 2 ne joue pas de rôle protecteur contre l'effet de 232T

Pour finir nous avons étudié l'influence des haplotypes du CD72 sur le poids du polymorphisme 232 T du gène FCGR2B dans le développement du lupus. Nous avons étudié la distribution des haplotypes de CD72 selon la présence du génotype 232T chez les patients LES et les témoins. Il n'existe aucune différence significative de la distribution des haplotypes du CD72 dans les différents groupes.

Tableau 17 : Distribution des haplotypes Hap1/Hap2 du CD72 dans les différents groupes génotypiques FCGR2B, chez les témoins, les patients LES et patients LES avec ou sans atteinte rénale.

II	FcγRIIb-II				FcγRIIb-IT				FcγRIIb-TT			
	LES 70	Atteinte rénale n= 30	Sans atteinte rénale n=25	Témoin n=74	LES n=35	Atteinte rénale n=16	Sans atteinte rénale n=13	Témoins n= 34	LES n=21	Atteinte rénale n=10	Sans atteinte rénale n=8	Témoins n=22
Fréquence génotypique n (%)												
Hap1 /Hap1	7 (10)	3 (10)	3 (12)	15 (20,3)	2 (5,7)	1 (6)	0 (0)	5 (15)	2 (10)	2 (2)	0 (0)	2 (9)
Hap1 /Hap2	41 (58,5)	18 (60)	13 (52)	32 (43,2)	17 (48,6)	8 (50)	6 (46)	18 (53)	9 (43)	4 (4)	5 (63)	11 (50)
Hap2 /Hap2	22 (31,4)	9 (30)	9 (36)	27 (36,5)	16 (45,7)	7 (44)	7 (54)	11 (32)	10 (48)	4 (4)	3 (38)	9 (41)
Valeur de p	0,051	0,4	0,5			0,58	0,2			0,68	0,49	
Valeur de p1		0,8				0,5				0,22		
Fréquence allélique n (%)												
Hap1	55 (39)	24 (40)	19 (38)	62 (42)	21 (30)	10 (31)	6 (23)	28 (41)	13 (31)	8 (40)	5 (31)	15 (34)
Hap2	85 (61)	36 (60)	31 (62)	86 (58)	49 (70)	22 (69)	20 (77)	40 (59)	29 (69)	12 (60)	11 (69)	29 (66)
Valeur de p	0,65	0,8	0,62		0,17	0,34	0,10		0,75	0,65	0,83	
Valeur de p1		0,83				0,49				0,59		
Fréquence du porteur d'allèle n (%)												
Hap 1	48 (69)	21 (70)	16 (64)	47 (64)	19 (54)	9 (56)	6 (46)	23 (68)	11 (52)	6 (60)	5 (63)	13 (59)
Hap 2	63 (90)	27 (90)	22 (88)	59 (80)	33 (94)	15 (94)	13 (100)	29 (85)	19 (90)	8 (80)	8 (100)	20 (91)
Valeur de p	0,87	0,94	0,81		0,42	0,58	0,34		0,82	0,82	0,95	
Valeur de p1		0,87				0,68				0,81		

p : calculé par rapport aux témoins.

p1 : calculé entre patients avec atteinte rénale et patients sans atteinte rénale.

4 Discussion

Plusieurs polymorphismes dans les gènes des récepteurs Fc γ Rs qui modifient l'affinité du récepteur pour son ligand ont été associés au LES chez l'homme. Précédemment nous avons montré que la population martiniquaise présentait une augmentation des polymorphismes Fc γ RIIa-131R, Fc γ RIIIa-158V, Fc γ RIIIb-Na1 et Fc γ RIIb-232T. Les MAI étant plus fréquentes et plus graves dans la population caribéenne, le but de notre deuxième étude était d'évaluer l'importance de ces polymorphismes chez les patients LES martiniquais et de mettre en évidence des liens entre ces polymorphismes et le LES et/ou sa gravité en l'occurrence l'atteinte rénale. Dans cette deuxième étude nous avons montré une association entre le Fc γ RIIIa-158F et le Fc γ RIIIb-Na1 avec l'apparition d'un lupus dans la population martiniquaise. Nous avons également mis en évidence une association des allèles 158V et 131R avec une atteinte rénale dans le contexte lupique de cette population martiniquaise.

Sur le récepteur Fc γ RIIa, le polymorphisme (rs 1801274) se traduit par la substitution d'une arginine (R131) par une histidine à la position 131(H131) dans le deuxième domaine extracellulaire du récepteur. Cette substitution augmente l'affinité du récepteur pour son ligand ce qui améliore la phagocytose médiée par les IgG. Le Fc γ RIIa-131H est de plus le seul récepteur FcR capable de lier de façon efficace l'IgG2 (Salmon *et al.* 1990; Warmerdam *et al.* 1991; Salmon *et al.* 1992).

Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence l'association de l'allèle R131 avec le développement du lupus chez les martiniquais ce qui est en concordance avec les études sur la population chinoise (Chu *et al.* 2004). Par contre il existe une association de cet allèle R131 avec l'apparition d'une atteinte rénale chez les patients LES. Cette association a également été retrouvée dans plusieurs populations : afro-américaines (Salmon *et al.* 1992) et caucasiennes (Norsworthy *et al.* 1999; Manger *et al.* 2002; Kyogoku *et al.* 2004; Magnusson, Johanneson, *et al.* 2004) mais les résultats sont contradictoires pour les populations asiatiques (Yap *et al.* 1999; Hatta *et al.* 1999; Sato *et al.* 2001; Siriboonrit *et al.* 2003; Lee *et al.* 2003; Kyogoku *et al.* 2004).

Le polymorphisme F158V (rs 396991) du récepteur FcγIIIa affecte lui aussi l'affinité du récepteur à son ligand. En effet, contrairement à l'allèle 158F, le FcγRIIa-158V a une plus forte affinité au IgG1, IgG3 et lie l'IgG4 (Koene *et al.* 1997; Wu *et al.* 1997). Dans notre population, nous avons mis en évidence une association de l'allèle 158F avec le développement d'un LES. Nos résultats sont en accord avec ceux retrouvés chez les afro-américains et caucasiens. Dans les études sur les populations asiatiques, comme pour le FcγRIIa, les résultats sont contradictoires (Kyogoku *et al.* 2002; Brown *et al.* 2007; Niederer *et al.* 2010).

Une association de l'allèle 158-V avec l'atteinte rénale est retrouvée dans la population afro-caribéenne. L'allèle 158V est décrit comme étant un marqueur de mauvais pronostic (Alarcón *et al.* 2006).

Les allotypes Na1 et Na2 du FcγRIIIb sont aussi associés au lupus, le Na2 qui possède un site de glycosylation supplémentaire est moins affiné pour les IgG1 et les IgG3 (Salmon *et al.* 1990). Nous avons mis en évidence un effet protecteur du Na2 contre le développement du LES dans la population afro-caribéenne. A l'exception d'une étude coréenne (Hong *et al.* 2005), ces résultats ne sont pas retrouvés dans d'autres études (Koene *et al.* 1997; Yap *et al.* 1999; Dijstelbloem *et al.* 2000; Edberg *et al.* 2002; Kyogoku *et al.* 2004).

En ce qui concerne le FcγRIIb, la substitution d'une isoleucine par une thréonine à la position 232 dans la partie transmembranaire (I232T) affecte l'efficacité de la signalisation cellulaire. En effet, la transduction du signal du FcγRIIb-232T est altérée par son incapacité à se colocaliser sur le même radeau lipidique qu'un récepteur activateur (Kono *et al.* 2005; Floto *et al.* 2005).

Des études génétiques de ce polymorphisme ont été menées dans plusieurs populations et ont mis en évidence sa forte association avec le LES chez les asiatiques (Siriboonrit *et al.* 2003; Chu *et al.* 2004; Chen *et al.* 2006; Kyogoku *et al.* 2004). Par contre ce lien n'a pas été retrouvé chez les caucasiens ni chez les américains (Kyogoku *et al.* 2004; Magnusson, Zunec, *et al.* 2004). Dans notre population, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence une association de l'homozygote 232T ni avec le LES ni avec l'atteinte rénale. Notre résultat est en concordance avec ceux retrouvés dans une étude concernant la population afro-américaine où la fréquence de ce polymorphisme chez les patients lupiques est comparable à celui retrouvé dans la population générale.

L'altération fonctionnelle du FcγRIIb-232T qui induit un risque de déclencher une MAI, constitue également un facteur de résistance contre les formes les plus graves de paludisme (Clatworthy *et al.* 2007; Waisberg *et al.* 2011; Willcocks *et al.* 2010). Ce facteur de résistance a donc soumis les populations des régions impaludées à une pression de sélection pour ce polymorphisme, ce qui explique sa fréquence plus importante dans les populations d'Asie du sud et d'Afrique (Willcocks *et al.* 2010). La fréquence de T232 est importante dans notre population puisque sa forme homozygote est retrouvée dans 17% de la population générale.

L'association retrouvée entre ce polymorphisme 232T et le lupus chez les asiatiques peut être expliquée par l'existence d'un déséquilibre de liaison entre ce FcγRIIb-232T et le polymorphisme FcγRIIIa-158F (Hatta *et al.* 1999). Nous n'avons pas retrouvé ce déséquilibre de liaison entre FCGR2B et FCGR3A dans notre population. Par contre dans la population asiatique, plusieurs études ont retrouvé l'existence d'un allèle de susceptibilité pour le LES représenté par l'association des polymorphismes 3A-158F,3B-NA2,2B-232T résultant d'un déséquilibre de liaison entre FCGR2A et FCGR3A et entre FCGR3B et FCGR2B (Chu *et al.* 2004; Tsuchiya & Kyogoku 2005). D'autres associations pourraient être impliquées dans la population martiniquaise en particulier avec des polymorphismes intervenant dans les gènes des FcRlike qui sont encore mal connus mais qui codent pour des récepteurs FcRlike exprimés par les lymphocytes B et ayant des fonctions activatrices et inhibitrices selon le stade de maturation du LB.

Nous avons également étudié un autre polymorphisme du FcγRIIb : l'haplotype -343G/C de la région promotrice du FCGR2B dont le lien avec le LES a été retrouvé dans la population caucasienne (Su *et al.* 2004; Blank *et al.* 2005). Ce polymorphisme modifie l'expression du récepteur à la surface de la cellule (Su *et al.* 2004; Blank *et al.* 2005; Su *et al.* 2007). Nous n'avons pas retrouvé ce polymorphisme dans notre population, ce qui est en accord avec les résultats sur la population afro-américaine (Li *et al.* 2003).

Deux haplotypes majeurs de CD72 contenant 1 ou 2 répétitions de 13 nucléotides dans la huitième région intronique, sont appelés respectivement haplotype1 (Hap1) et haplotype2 (Hap2). L'Hap2 aurait un rôle protecteur du lupus chez les porteurs homozygotes pour FcγRIIb-232T (Hitomi *et al.* 2004). Cet Hap2, par épissage alternatif, augmente la production d'une protéine plus longue qui reste séquestrée dans le réticulum endoplasmique provoquant ainsi le stress du réticulum et l'apoptose du LB (Hitomi *et al.* 2012). L'Hap1 a été associé au lupus et à l'atteinte rénale lupique dans la population japonaise. Dans notre étude nous n'avons pas mis en évidence d'association entre Hap1 et le LES ou son atteinte rénale, ce résultat est en accord avec les résultats des études caucasiennes et thaïlandaises (Hitomi *et al.* 2004). Dans l'étude de Hitomi, le polymorphisme FcγRIIb-232T semble ne conférer une susceptibilité au LES qu'en présence de Hap1 à l'état homozygote. Dans notre population la distribution de CD72 Hap1/Hap2 ne montre aucune différence entre les patients et les témoins quand le génotype de FcγRIIb est pris en compte.

En conclusion, pour la première fois dans une population lupique afro-caribéenne autochtone, les polymorphismes des FcγRs ont été étudiés. Nous avons mis en évidence une association entre le FcγRIIIa-158F et le LES. L'atteinte rénale lupique est associée avec les polymorphismes FcγRIIa-131R et FcγRIIIa-158V. Par contre dans notre population où 17% des martiniquais sont porteurs à l'état homozygote du FcγRIIb-232T, ce polymorphisme n'est pas associé au LES, ni à l'atteinte rénale lupique. De plus, ce résultat ne semble pas être dû à la protection que pourrait amener Hap2 dans notre population puisque sa fréquence est comparable entre les patients et les témoins.

La recherche des allèles de susceptibilité au LES dans la population martiniquaise doit être complétée par l'étude des combinaisons et des déséquilibres de liaison existant entre les gènes proches sur un même chromosome comme les FCGR mais également par les combinaisons avec d'autres gènes de susceptibilité déjà cités individuellement dans d'autres populations comme le gène du PTPN22 ou de STAT4 ou des facteurs de régulation des IFNs.

L'arrivée récente de techniques de séquençage NGS permettra d'effectuer une étude globale de tous ces gènes et de fournir une carte précise des gènes de susceptibilité pour les MAI de la population martiniquaise qui semble se démarquer des autres populations déjà étudiées.

III Maladie auto-immunes démyélinisantes et FCGR

1 Introduction

La neuromyéélite optique et la sclérose en plaque sont deux maladies auto-immunes démyélinisantes du système nerveux central. La NMO a été longtemps considérée comme une entité de la SEP jusqu'à la découverte de la présence sérique de l'anticorps anti-Aquaporine 4 dans 65% de patients NMO (Lennon *et al.* 2005; Jarius *et al.* 2007; Matsuoka *et al.* 2007). En effet ces deux maladies ont une physiopathologie différente puisque le mécanisme immunopathologique majoritaire dans la SEP serait plutôt une cytotoxicité à médiation cellulaire alors que la NMO serait considérée comme une pathologie impliquant surtout le lymphocyte B.

Les récepteurs FcγRs jouent un rôle crucial dans la liaison entre l'immunité humorale et cellulaire et participe au maintien de l'homéostasie (Fossati *et al.* 2001).

Il a été également démontré que ces récepteurs étaient impliqués dans l'établissement du processus inflammatoire au sein de la microglie du système nerveux central (Linnington *et al.* 1988; Storch *et al.* 1998; Kieseier *et al.* 1999).

Afin d'apprécier l'implication des polymorphismes des FcγRs dans le développement de ces maladies auto-immunes démyélinisantes, nous avons étudié les gènes du FcγRIIa, du FcγRIIb et du FcγRIIIb dans un groupe de patients atteints, soit de SEP soit de NMO et nous avons comparé ces résultats avec un groupe de témoins sains martiniquais.

Cette étude est la première étude comparative des polymorphismes des FcγRs entre les patients SEP et les patients NMO. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication intitulé «Human FcγR in martinican with multiple sclerosis and neuromyelitis optica » soumis à « *The Journal of NeuroImmunology* ».

2 Patients et méthodes

2.1 Groupes d'étude

Nous avons étudié un groupe de 90 patients atteints de NMO et 82 patients atteints de SEP ainsi que 120 témoins sains n'ayant pas de maladie auto-immune ni d'infection virale HIV. Les patients et les volontaires inclus dans cette étude ont tous donné leur consentement éclairé et font partie d'un cadre éthique défini par les autorités compétentes. Les patients NMO répondent aux critères de diagnostic décrits par Wingerchuck (Wingerchuk *et al.* 2015) et les patients SEP répondent aux critères de Mc donald (Polman *et al.* 2011).

2.2 Amplification, séquençage et microsatellite

L'étude des gènes FCGR2A, FCGR2B, FCGR3B et CD72 est réalisée comme précédemment décrit dans les chapitre I et II des résultats.

2.3 Détection d'anticorps anti Aquaporine-4

2.3.1 Culture cellulaire

Les cellules HEK (Human Embryonic Kidney) exprimant l'antigène aquaporine 4 M23 ont été offertes gracieusement par le Dr Marignier (Unité INSERM U1028, Lyon). Les cellules HEK non transfectées ont été offertes par l'équipe CNRS : Acteurs de la Pathogenèse des Infections Rétrovirales, Montpellier. Les cellules ont été mises en culture dans un milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) contenant les nutriments et glutamine (GlutaMaxTM)(ThermoFisher) supplémenté avec 10% de sérum de veau décomplementé (Eurocell) et 500 ug /ml de généticine (ThermoFisher). Les cellules sont mises en culture à 37°C dans une atmosphère humide sous 5% de CO₂.

2.3.2 CBA

Les sérums des patients atteints de NMO sont incubés avec les cellules HEK transfectées exprimant l'aquaporine 4 M23 et la ligné HEK non transfectée. La révélation des IgG anti-AQP4 est réalisée après incubation d'un fragment F(ab')₂ anti IgG humaine conjugué à l'allophycocyanine (APC)(Jackson) et lecture par un cytomètre de flux BD FacsCantoII (Becton Dickinson). Les patients ayant un ratio de % cellules transfectées / % cellules non transfectées > 4 sont considérés comme AQP4 positifs.

2.3.3 *Analyses statistiques.*

L'écart de la déviation des distributions observées et théoriques de la loi de Hardy Weinberg est mesuré en utilisant un test de χ^2 à un degré de liberté.

La comparaison de la distribution des génotypes et des fréquences alléliques s'est effectuée par un test de χ^2 .

Quand les échantillons théoriques sont inférieurs à 5, un test de Fisher Exact est utilisé. La population martiniquaise de notre étude précédente a été prise comme référence pour les mesures d'écart. Lorsque $p < 0,05$ la différence est considérée significative.

3 Résultats

3.1 Patients et témoins

Un total de 82 patients ayant une SEP (12 hommes et 70 femmes), 90 patients ayant une NMO (18 hommes et 72 femmes) ainsi que 120 témoins sains non apparentés (11 hommes et 109 femmes) ont été inclus dans notre étude (Tableau 18).

Parmi le groupe des patients NMO, 49 (61,25%) présentent des anticorps anti-AQP4 (AQP4+), 34 (48,8%) sont négatifs (AQP4-) et 7 n'ont pas été testés pour ce marqueur.

Tableau 18 : Comparaison des pourcentages des hommes et des femmes dans les groupes SEP, NMO et témoins.

	SEP (n=82)	NMO (n=90)	Témoins (n=120)	X ² (P)
Hommes n (%)	12 (14,6)	18 (20)	11 (9,2)	5,03 (0,08)
Femmes n (%)	70 (85,4)	72 (80)	109 (90,8)	
Moyenne d'âge± γ	41,3±18,7	49,1±14,7	53±18,10	

γ : écart type

3.2 Fc γ RIIb-232T est associé au NMO mais n'est pas associé à la SEP

De la même façon que pour les patients LES, nous avons étudié les polymorphismes des gènes des récepteurs Fc γ IIa, Fc γ RIIb et Fc γ RIIIb pour les patients NMO et SEP.

La fréquence génotypique du Fc γ RIIa-131R à l'état homozygote est significativement plus élevée dans le groupe des SEP (42%) par comparaison aux témoins (29%) (p=0,045). Le génotype 131R constitue un facteur de risque au développement de la SEP, OR=1,24 (Tableau 19).

Par contre il n'existe aucune différence significative entre les SEP et les NMO ni entre les NMO et les témoins pour ces polymorphismes du Fc γ RIIa.

Tableau 19 : Distribution du FcγRIIa-H131R chez des patients atteints de sclérose en plaque, et des neuromyéélite optique.

		SEP (n=82)	NMO (n=90)	NMO AQP4+ (n=49)	NMO AQP4- (n=34)	Témoins (n=120)	OR
Fréquence génotypique n (%)							
FcγRIIa	H/H	16 (17)	25 (28)	11 (22)	12 (35)	25 (21)	
	R/H	37 (40)	36 (40)	23 (47)	12 (35)	60 (50)	
	R/R	39 (42)	29 (32)	15 (31)	10 (29)	35 (29)	1,24
Valeur de p		0,045*	0,634	0,8522	0,9779		
Valeur de p1		0,1574		0,90			
Fréquence allélique n (%)							
FcγRIIa	H	69 (42)	86 (50)	45 (46)	36 (53)	110 (45,8)	
	R	95 (58)	85 (50)	53 (54)	32 (47)	130 (54,2)	
Valeur de p		0,455	0,372	0,98	0,30		
Valeur de p1		0,132		0,374			
Fréquence de porteur d'allèle n (%)							
FcγRIIa	H	53 (65)	61 (68)	34 (69)	24 (71)	85 (70,8)	
	R	76 (93)	65 (72)	38 (78)	22 (65)	95 (79,2)	
Valeur de p		0,285	0,837	1	0,549		
Valeur de p1		0,24		0,601			

p : calculé contre les témoins.

p1 : calculé entre SEP et NMO ou entre AQP4+/AQP4-.

* : test χ^2 significatif.

En ce qui concerne le FcγRIIb, la fréquence de l'allèle T232 est significativement plus élevée dans le groupe NMO (39%) par rapport aux témoins, (28,3 %) ($p=0,016$) (Tableau 20). Il n'existe aucune différence significative entre les NMO et les SEP. L'allèle 232T représente un facteur de risque du développement de la NMO dans la population martiniquaise. Cette association n'a pas été observée dans le groupe des SEP. De plus une augmentation significative du génotype et de la fréquence allélique 232T est associée au groupe des NMO séronégatifs pour l'anticorps anti-AQP4. Cette association reste à confirmer avec un groupe plus important.

Tableau 20 : Distribution du FcγRIIb-I131T chez des patients atteints de sclérose en plaque, et des patients atteints de neuromyéélite optique.

		SEP(n=82)	NMO (n=90)	NMO AQP4+(n=49)	NMO AQP4-(n=34)	Témoins
Fréquence génotypique n (%) «OR»						
FcγRIIb	I/I	44 (54)	42 (47)	26 (53)	14 (41)	74 (62)
	I/T	21 (26)	25 (28)	16 (33)	7 (21)	24 (20)
	T/T	17 (21)	23 (26)	7 (14) «3,71»	13 (38) «2,76 »	22 (18)
Valeur de p		0,6723	0,207	0,159	0,0148*	
Valeur de p1		0,62		0,012*		
Fréquence allélique n (%) «OR»						
FcγRIIb	I	109 (66)	109 (61)	68 (69)	35 (51)	172 (71,7)
	T	55 (34)	71 (39) «1,64 »	30 (31) «2,13 »	33 (49) «2,38 »	68 (28,3)
Valeur de p		0,265	0,016*	0,6757	0,0018*	
Valeur de p1		0,25		0,0197*		
Fréquence du porteur d'allèle n (%) «OR»						
FcγRIIb	I	65 (79)	67 (74)	42 (86)	21 (62)	98 (81,7)
	T	38 (46)	48 (53)	23 (47)	20 (59)	46 (38,3)
Valeur de p		0,419	0,10	0,6253	0,047*	
Valeur de p1		0,465		0,173		

p : calculé contre les témoins.

p1 : calculé entre SEP et NMO ou entre AQP4+/AQP4-.

* : test χ^2 significatif.

« n » : Odd Ratio

Pour le récepteur FcγRIIIb, il existe une diminution significative du génotype FcγRIIIb Na2 à l'état homozygote dans le groupe SEP (2,4%) par rapport aux témoins (11,7%) (p=0,018). Avec un OR de 0,19 ce génotype pourrait être protecteur contre la SEP. Par ailleurs, il n'existe aucune différence significative dans les fréquences alléliques ni dans la fréquence des porteurs d'allèle entre les SEP, les témoins et le groupe NMO (Tableau 21).

Tableau 21 : Distribution du FcγRIIIb-Na1/Na2 chez des patients atteints de sclérose en plaque, et des neuromyéélite optique.

		SEP(n=82)	NMO (n=90)	NMO AQP4+ (n=49)	NMO AQP4- (n=34)	Témoins (n=120)
Fréquence génotypique n (%) «OR»						
FcγRIIIb	Na1/Na1	14 (17) «1,26»	20 (22)	12 (24)	6(18)	17(14,2)
	Na1/Na2	64 (78)	61 (68)	32 (65)	24(71)	87(72,5)
	Na2/Na2	2 (2,4) «0,19»	6 (7)	3 (6)	3(9)	14(11,7)
	Nul	0 (2)	3 (3)	2 (4)	1(3)	2(1,6)
Valeur de p		0,018*	0,237	0,297	0,657	
Valeur p1		0,1852		0,652		
Fréquence allélique n(%) «OR»						
FcγRIIIb	Na1	92 (57,5)	101 (58)	56 (59,6)	36(54,5)	121(50)
	Na2	68 (42,5)	73 (42)	38 (40,4)	30(45,5)	115(48)
Valeur de p		0,223	0,174	0,172	0,638	
Valeur p1		0,919		0,5277		
Fréquence du porteur d'allèle n (%) «OR»						
FcγRIIIb	Na1	78 (95,1)	81 (90)	44 (55,7)	30(52,6)	104(86,7)
	Na2	66 (80,5°)	67 (74,4)	35 (44,3)	27(47,5)	101(84,2)
Valeur de p		0,527	0,458	0,453	0,8	
Valeur p1		0,923		0,7243		

p : calculé contre témoins.

p1 : calculé entre Sep/NMO ou NMO AQP4+/NMO AQP4-.

* : test χ^2 significatif.

« n » :Odd Ratio.

3.3 Déséquilibre de liaison

Nous avons ensuite étudié les déséquilibres de liaison entre les gènes FCGR2A, FCGR2B et FCGR3B dans le groupe SEP et NMO. Le gène FCGR2A est en équilibre de Hardy Weinberg dans tous les groupes d'étude alors que le gène FCGR3B ne répond pas à cet équilibre dans aucun groupe et que le FCGR2B est en équilibre seulement dans le groupe NMO AQP4+ (Tableau 22).

Il existe une liaison entre les gènes FCGR2A et FCGR3A chez les patients NMO ($r^2 = 0,051$) ainsi que chez les témoins ($r^2 = 0,04$)

Chez les patients NMO séropositif pour l'anticorps anti-AQP4, la liaison entre le FCGR2A et le FCGR3B est plus forte ($r^2=0.1$) et entre le FCGR2A et FCGR2B ($r^2=0,05$). Chez les patients NMO séronégatifs pour l'anticorps anti-AQP4, il existe une liaison entre le FCGR2A et FCGR3B ($r^2=0,043$) et entre le FCGR3B et FCGR2B ($r^2=0,043$) (Figure 32).

Tableau 22 : Equilibre de Hardy weiberg des gènes FCGR2A, 2B et 3B chez les patients SEP et NMO et les témoins.

	% heterozygote observé	%Het théorique	Valeur P (HW)
SEP			
FCGR2A	0,45	0,487	0,614
FCGR2B	0,256	0,446	<0,0001*
FCGR3B	0,8	0,489	0,0003*
NMO			
FCGR2A	0,4	0,49	0,08
FCGR2B	0,278	0,478	0,0001*
FCGR3B	0,70	0,487	<0,00001*
NMO AQP4-			
FCGR2A	0,353	0,498	0,1449
FCGR2B	0,206	0,5	0,0011*
FCGR3B	0,727	0,496	0,022*
NMO AQP4+			
FCGR2A	0,467	0,497	0,864
FCGR2B	0,327	0,425	0,174
FCGR3B	0,681	0,482	0,011*
Témoins			
FCGR2A	0,5	0,497	1
FCGR2B	0,2	0,406	<0,00001*
FCGR3B	0,737	0,5	<0,00001*

* : test de χ^2 significatif.

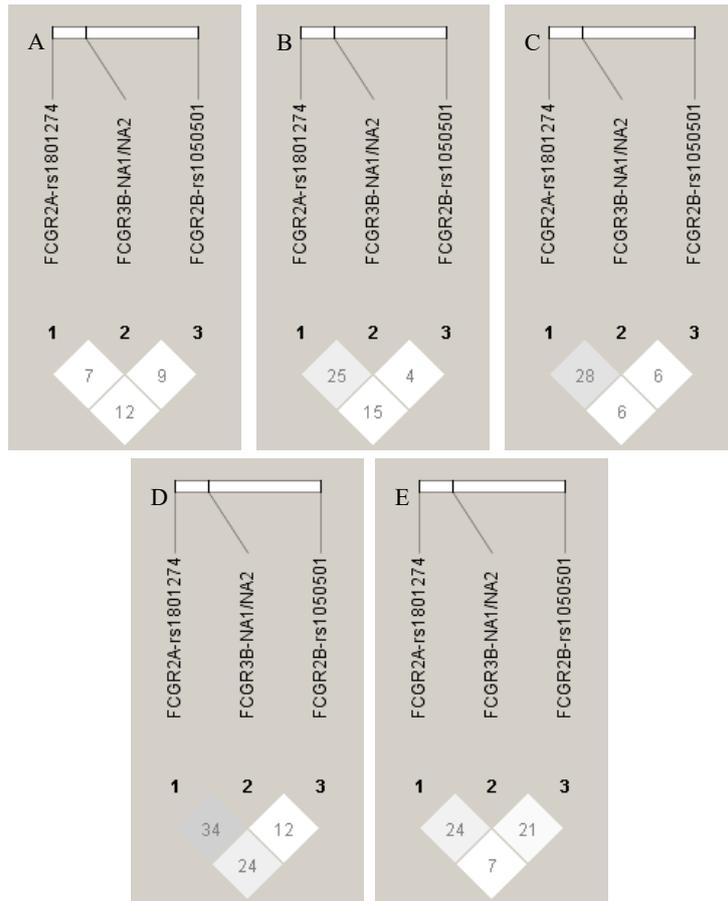


Figure 32 : Déséquilibre de liaison exprimé en D' entre les gènes FCGR2A, FCGR2B et FCGR3B.
 (A) :SEP, (B) :NMO, (C) :témoins, (D) :NMO-AQP4+ et (E) : NMO-AQP4-.

3.4 Haplotypes de CD72

Les haplotypes de CD72 ont été étudiés dans les différents groupes. Il n'existe aucune différence significative dans la distribution des haplotypes de CD72 entre les différents groupes (Tableau 23).

Tableau 23 : distribution des haplotypes Hap1 et Hap2 chez les patients SEP, NMO et témoins

	SEP (N=82)	NMO (N=90)	NMO AQP4+ N=49	NMO AQP- N=34	Témoins N=120
Fréquence génotypique n (%)					
Hap1 /Hap1	11 (13)	11 (12)	7 (14)	4 (12)	22 (18,3)
Hap1 /Hap2	38 (46)	45 (50)	24 (49)	17 (50)	51 (42,5)
Hap2 /Hap2	33 (40)	34 (38)	18 (37)	13 (38)	47 (39,2)
Valeur de p	0,878	0,838	0,768	0,921	
Valeur de p1	0,7412		0,89		
Fréquence allélique n (%)					
Hap1	60 (37)	67 (37)	38 (39)	25 (37)	95 (39,6)
Hap2	104 (63)	113 (63)	60 (61)	43 (63)	145 (60,4)
Valeur de p	0,54	0,623	0,89	0,67	
Valeur de p1	0,9		0,867		
Fréquence porteur d'allèle n (%)					
Hap 1	49 (41)	56 (41)	31 (42)	21 (41)	73 (60,8)
Hap 2	71 (59)	79 (59)	42 (58)	30 (59)	98 (81,6)
Valeur de p	0,75	0,83	0,97	0,84	
Valeur p1	0,916		0,886		

p : calculé contre témoins.

p1 : calculé entre SEP et NMO ou entre NMO AQP4+/AQP4-

Quand les haplotypes sont analysés dans les différents groupes génotypiques du FcγRIIb, nous n'observons aucune différence significative entre les différents groupes (Tableau 24).

Tableau 24 : Distribution des haplotypes Hap1/Hap2 du CD72 dans les différents groupes génotypiques FCGR2B, chez les témoins, les patients SEP, NMO et les Témoins.

II	SEP	NMO	NMO-AQP4+	NMO-AQP4-	Témoins
Hap1/1	8(10)	7(8)	6(12)	1(3)	15(13)
Hap1/2	18(22)	24(27)	13(27)	11(31)	32(27)
Hap2/2	18(22)	11(12)	7(14)	2(6)	27(23)
Valeur de p	0,23	0,34	0,67	0,052	
	0,451		0,3674		
I/T					
Hap1/1	1(1)	2(2)	1(2)	1(3)	5(4)
Hap1/2	10(12)	10(11)	7(14)	2(6)	8(7)
Hap2/2	10(12)	13(14)	8(16)	5(14)	11(9)
Valeur de p	0,23	0,43	0,43	0,7	
	0,769		0,570		
T/T					
Hap1/1	2(2)	2(2)	0(0)	2(6)	2(2)
Hap1/2	10(12)	11(12)	4(8)	4(11)	11(9)
Hap2/2	5(6)	10(11)	3(6)	7(20)	9(8)
Valeur de p	0,75	0,98	0,70	0,52	
	0,3697		0,647		

4 Discussion

Dans cette étude, nous avons comparé la distribution des polymorphismes des FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIb et du CD72 dans une cohorte de martiniquais composée de patients atteints de NMO ou de SEP ainsi que de témoins sains. Nos résultats rapportent une association de l'homozygote FcγRIIa-131R avec la SEP et une association entre le FcγRIIb-232T et la NMO ainsi qu'un effet protecteur du FcγRIIIb-Na2 contre les maladies démyélinisantes du système nerveux central.

Chez les patients ayant une maladie démyélinisante, une surexpression des récepteurs FcγRII et FcγRIII dans les cellules de la microglie a été décrite (Ulvestad *et al.* 1994). Dans les modèles expérimentaux d'encéphalomyélite auto-immune induite par la MOG, l'absence de FcγRIII semble être un facteur de protection contre la maladie (Robbie-Ryan *et al.* 2003). Dans les précédents chapitres, les effets des polymorphismes sur l'affinité du FcγRIIa et du FcγRIIIb vis à vis des sous classes d'IgG ont déjà été décrits. Deux études seulement existent sur les polymorphismes des FcγR dans des cohortes de patients atteints de SEP. Ces études ne montrent aucune association ni du FcγRIIa-131H/R ni du FcγRIIIb-Na1/Na2 avec le développement de la maladie mais une de ces études a retrouvé l'association du FcγRIIa-131R avec la progression de la maladie chez les norvégiens (Myhr *et al.* 1999). Nous avons montré dans la première étude que la population témoin martiniquaise possédait une fréquence plus élevée d'homozygotes R131 ainsi que d'homozygotes FcγRIIIb-Na2 ce qui rend difficile la comparaison entre ces populations ethniquement différentes.

Nous avons également retrouvé une augmentation de l'allèle FcγRIIb-232T chez les NMO par rapport aux témoins. Les anticorps anti-AQP4 sont majoritairement des IgG1 qui peuvent, en l'absence du complément, se lier aux polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et aux macrophages résidant en nombre important dans les lésions de NMO (Ratelade *et al.* 2012). Le polymorphisme FcγRIIb-232T/T augmente la capacité de phagocytose des macrophages par rapport au 232I/I et 232I/T et faciliterait ainsi une réaction pro-inflammatoire. Il est acquis que la fréquence de FcγRIIb-232T varie en fonction de l'origine ethnique. Dans notre population dont l'origine est majoritairement africaine, nous avons observé une grande fréquence de cet allèle qui, en association avec un grand effectif de patients et de témoins, augmentent la force de notre test statistique. Ces résultats doivent être confirmés dans une cohorte plus grande.

Concernant le CD72, l'analyse de la distribution des deux haplotypes Hap1 et Hap2 n'a montré aucune différence entre le groupe NMO et les témoins. Ce résultat montre que l'effet du FcγRIIb-232T sur les patients NMO n'est pas modifié par la présence de Hap2.

En conclusion, cette étude met en évidence des associations de certains polymorphismes FcγR avec des maladies auto-immunes démyélinisantes en Martinique. La différence de résultats entre la SEP et la NMO pourrait être expliquée par les physiopathologies différentes de ces deux maladies.

IV Etudes de l'expression des co-récepteurs du BCR dans les différentes sous populations de lymphocytes B chez les patients LES et de l'impact du polymorphisme I232T sur ces populations B

1 Introduction

Le rôle du LB dans le développement des maladies auto-immunes est maintenant bien établi et ne se limite plus au seul rôle de sécrétion des auto-Ac. En effet, le LB joue un rôle à part entière dans le maintien de l'homéostasie ainsi que dans la présentation des auto-Ag. Les co-récepteurs activateurs et inhibiteurs du récepteur à l'antigène BCR jouent un rôle important dans la régulation de son seuil d'activation et par conséquent de l'activation et la prolifération du lymphocyte B. Une anomalie au niveau de ces co-récepteurs peut être à l'origine de dysrégulation du lymphocyte B et de rupture de tolérance.

Le polymorphisme I232T du récepteur Fc γ RIIb induit une inefficacité du récepteur (Floto *et al.* 2005).

- Nous avons étudié dans une première partie la répartition des sous populations de lymphocytes B en fonction de leur maturation chez les patients atteints de LES par marquage en cytométrie de flux. L'expression de certains co-récepteurs activateurs comme le CD19 et inhibiteurs comme le Fc γ RIIb et le CD72 ont été étudiés au sein de ces différentes sous-populations B chez les patients LES et la population témoin.

- Dans un second temps nous avons étudié l'influence du polymorphisme I232T du récepteur Fc γ RIIb sur l'expression membranaire de ce récepteur ainsi que sur celle du CD19.

- Enfin en dernière partie nous avons étudié l'impact du polymorphisme I232T sur la réponse du lymphocyte B lors de la stimulation du BCR avec ou sans co-engagement du Fc γ RIIb.

2 Patients et méthodes

2.1 Isolement des lymphocytes B du sang périphérique

Les lymphocytes sont isolés du sang total prélevé sur EDTA après centrifugation sur gradient de Ficoll Hypaque puis lavage en milieu RPMI. Les lymphocytes sont enrichis en lymphocytes B par un tri négatif sur billes magnétiques à l'aide de la trousse human B cell enrichment kit EasySep (StemCell technologies). Cette trousse utilise un panel d'Ac reconnaissant les marqueurs membranaires des cellules non B (lymphocytes T, monocytes, plaquettes) et la dextrine fixée sur des billes magnétiques permet la rétention de toutes les cellules hormis les LB après passage dans un aimant, facilitant ainsi la récupération des LB restés en suspension dans le tube. Le pourcentage de pureté en lymphocytes B (90 % minimum) est vérifié après chaque enrichissement par marquage avec un anti-CD19 en cytométrie de flux.

2.2 Stimulation des LB

Les conditions optimales de stimulation (concentration des anticorps stimulants et temps de stimulation) ont été définies lors des travaux de Master2 de Marjory Dufay et Noella Tanasi.

Les LB sont incubés 10 min à 4°C soit avec 50 µg/ml de F(ab)₂ de chèvre anti IgG/A/M humain (life technologiesTM) permettant de stimuler uniquement le BCR soit avec 50 µg/ml d'une IgG de chèvre anti IgG/A/M humain (PierceTM thermo fisher) induisant le co-engagement du BCR et du FcγRIIb. Les lymphocytes sont ensuite stimulés 2 min à 37°C puis fixés 10 min à 4°C avec 500µl du BD Cellfix 1X (BD Biosciences Pharmingen, San diego, CA/USA). Après fixation, les cellules sont lavées 2 fois dans du phosphate buffer saline (PBS) 1X, 10 min à 400 g et à 4°C.

2.3 Cytométrie en flux

2.3.1 Etude de l'expression de protéines de surface et phospho-protéines

L'analyse de l'expression des différents marqueurs membranaires est réalisée par l'utilisation d'anticorps spécifiques couplés à des fluorochromes (Tableau 25). L'analyse des phospho-protéines intracellulaires nécessite au préalable une perméabilisation des LB de 30 min à 4°C par le BD Phosflow™ PERMIII buffer (Biosciences Pharmingen, San diego, CA/USA).

Tableau 25 : Anticorps utilisés en cytométrie de flux .

fluorescéine isothiocyanate (FITC), phycoérythrine (PE), allophycocyanine(APC), PE-cyanine 7 (PE-Cy7), perdinine chlorophyle-cyanine5.5 (PerCP-cy5.5), Brillant violet(BV)

Anticorps	spécificité	hôte	conjugué	isotype	fournisseur
Anti-CD19	Homme	Souris	APC	IgG1	BD Pharmingen™
Anti-CD19	Homme	Souris	APC-H7	IgG1	BD Pharmingen™
Anti-CD24	Homme	Souris	FITC	IgG2	BD Pharmingen™
Anti-CD24	Homme	Souris	PerCP-Cy™5.5	IgG2	BD Pharmingen™
Anti-CD27	Homme	Souris	FITC	IgG1	BD Pharmingen™
Anti-CD27	Homme	Souris	PerCP-Cy™5.5	IgG1	BD Pharmingen™
Anti-CD38	Homme	Souris	PE-CY7	IgG1	BD Pharmingen™
Anti-CD138	Homme	Souris	BV510	IgG1	BD Pharmingen™
Anti-CD32	Homme	Souris	PE		BD Pharmingen™
Anti-CD72	Homme	Souris	FITC	IgG2	BD Pharmingen™
Anti- CD5	Homme	Souris	BV™421	IgG1	BD Horizon™
Anti-ERK1/2(pT202/pY204)	Homme	Souris	PE	IgG1	BD Phosflow™
Anti-SHIP(pT1020)	Homme	Lapin			Ozyme
Anti-IgG	Lapin	Chèvre	FITC	F(ab')2	Jackson
Anti-IgG	lapin	chèvre	Alexa fluor647	F(ab')2	Jackson
Isotype IgG2		souris	Alexa Fluor 647	IgG2	BD Pharmingen™
Isotype IgG1		Souris	FITC	IgG1	BD Pharmingen™
Isotype IgG1		souris	APC	IgG1	BD Pharmingen™
Isotype IgG1		souris	PE	IgG1	BD Pharmingen™
Anti-IgG	Chèvre	Lapin	HRP		Jackson

2.4 Western-blot

2.4.1 *Co-immunoprécipitation*

Après différentes stimulations (Chapitre 2.2), les LB sont lysés 30 min à 4°C sous agitation dans un tampon contenant du triton X100 et un cocktail contenant des inhibiteurs de phosphatases et de protéases. Après une centrifugation 15 min à 15000 g, le lysat est récupéré dans le surnageant et incubé 3h sous agitation à 4°C avec l'anticorps anti-CD32 (Fc γ R2) (BD pharmingen). Puis, après un « préclearing » sur des billes magnétiques de sépharose couplées à la protéine G (protein G Mag Sépharose Xtra GE healthcare life science) et un lavage dans un tampon Tris, les protéines sont solubilisées par chauffage 15 min à 100°C dans un tampon de charge contenant du SDS et du Dithiothréitol.

2.4.2 *Western blot*

Les protéines sont séparées dans un gel de polyacrylamide puis transférées sur une membrane de PVDF (Polyvinylidène difluoride). La membrane est saturée pendant 1h dans un tampon TBS-Tween20 0,1% contenant 5% de lait écrémé, incubée une nuit avec les Ac primaires (Tableau 25) puis 1h avec l'Ac secondaire anti-IgG de chèvre conjugué à l'enzyme *Horse Radish Peroxydase* (HRP) et révélée par le réactif ECL Prime (GE healthcare life science) dans le lecteur Amersham Imager 600RGB (GE healthcare) et analysée par le logiciel ImageQuanTL.

2.5 Analyses statistiques

Les données statistiques sont réalisées avec le logiciel MedCalc en utilisant le test t non apparié et exprimées par l'erreur standard de la moyenne. Lorsque $p < 0,05$, la différence est considérée comme significative.

3 Résultats

3.1 Anomalie dans la distribution des sous-populations des LB

Les différentes sous-populations de LB ont été analysées après un enrichissement des lymphocytes B par tri négatif sur billes magnétiques (pureté 95% minimum) et marquages par plusieurs combinaisons spécifiques d'anticorps conjugués à différents fluorochromes.

Nous avons étudié la distribution des sous-populations des lymphocytes B chez 21 patients LES et 11 contrôles sains. A l'analyse en cytométrie, les LB sont isolés du reste des cellules mononuclées du sang périphérique grâce au marquage de la molécule CD19. Il existe une diminution significative de l'expression de la molécule CD19 à la surface des LB des patients LES par rapport aux témoins sains ($p=0,012$). Par contre, le pourcentage de LB CD19 ne présente pas de différence significative entre les deux groupes (Figure 33).

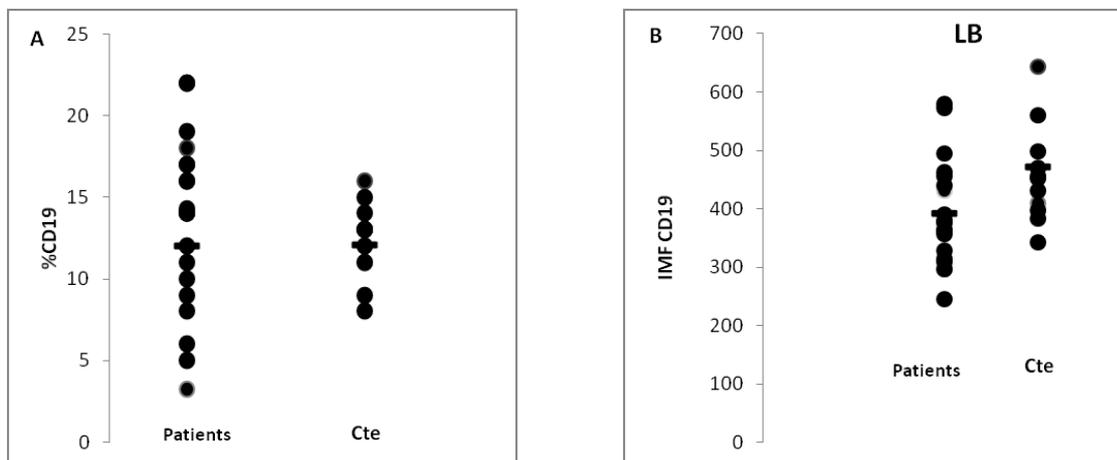


Figure 33 : Analyse de la population LB CD19+ du sang périphérique.

(A) : Fréquence des LB CD19+ par rapport aux cellules mononuclées du sang. (B) : Intensité moyenne de fluorescence du CD19 chez des patients LES et des contrôles sains par cytométrie en flux.

Un marquage par des anticorps dirigés contre les molécules CD19, CD24, CD27 et CD38 a été utilisé pour différencier les LB matures (CD24+, CD38-), les LB transitionnels (CD24fort, CD38fort), les plasmocytes/plasmoblastes (CD27+, CD38fort) et les LB mémoires (CD27+, CD38-).

La diminution de l'intensité moyenne de fluorescence de la molécule CD19 sur les LB des patients (711 ± 117) par rapport aux témoins (911 ± 200) est de nouveau confirmée ($p=0,0162$). Le groupe des patients LES présente une augmentation significative des LB transitionnels (19,8%) ainsi qu'une diminution significative des LB mémoires (8,4%) et des LB naïfs (52,2%) par rapport aux témoins (15,5%, 12,8%, 59,3% respectivement).

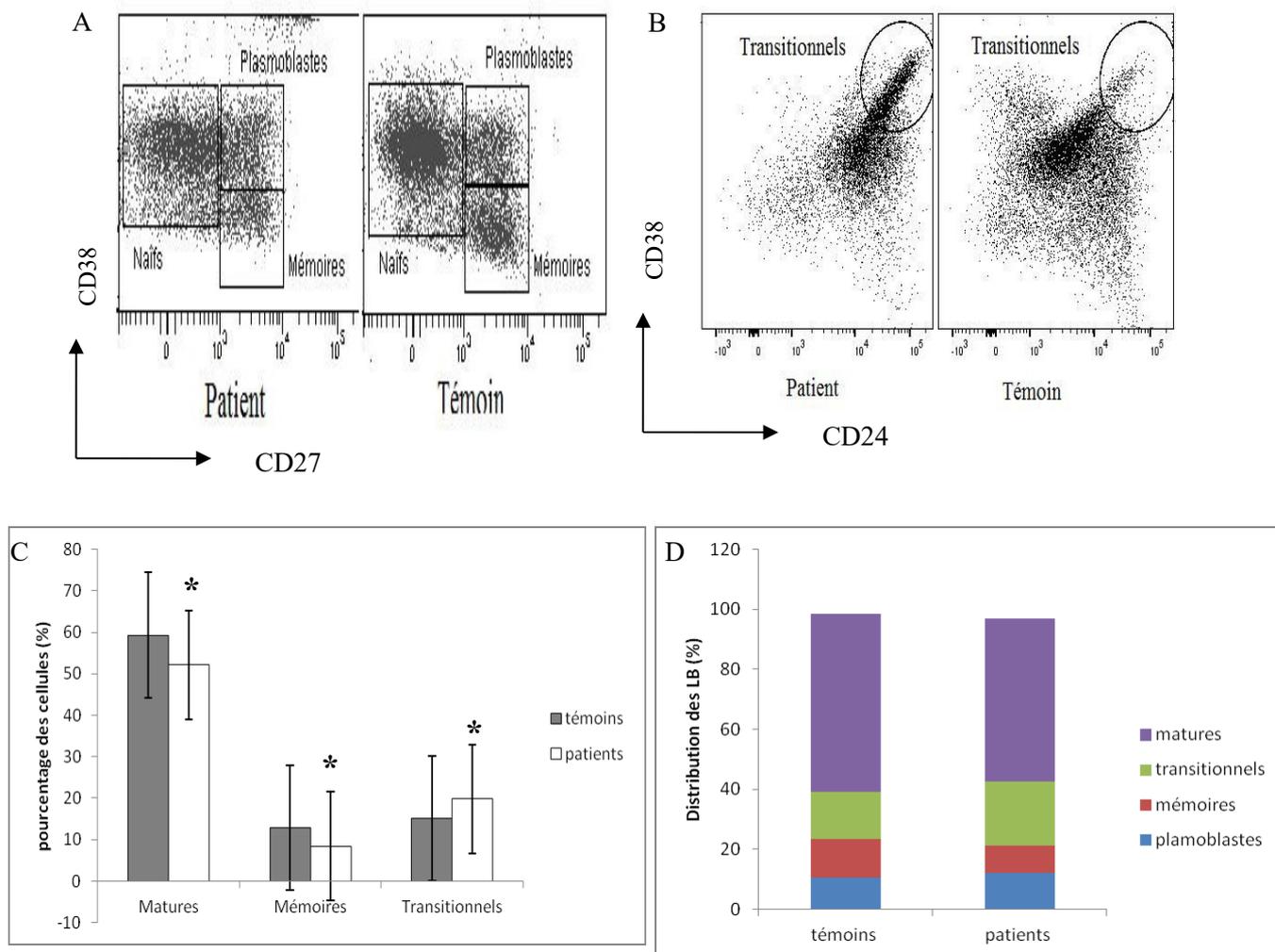


Figure 34 : Distribution des différentes sous-populations lymphocytaires B.

(A) : exemple patient et témoin marquage CD27, CD38, (B) : exemple patient et témoin du marquage CD24,CD38. (C) et (D) : pourcentages des sous population des LB par rapport aux LB CD19+totaux.

Les LB transitionnels peuvent être divisés en LB transitionnels T1 présentant une forte expression de la molécule CD5 (Sims *et al.* 2005; Lee *et al.* 2009) et en LB transitionnels T2 qui expriment peu ou pas de molécule CD5. La répartition des LBT1 et LBT2 dans la population de LB transitionnels présente une différence significative entre les patients et les témoins ($p < 0,05$). Les deux sous-populations de LBT sont équilibrées chez les témoins alors qu'il existe une augmentation significative des LBT2 chez les patients LES (12%) (Figure 35B). Quand on s'intéresse au pourcentage de ces populations LBT1 et LBT2 au sein des LB, il existe une augmentation significative des LBT2 chez les patients par rapport aux témoins (12% vs 4%, $p < 0,0001$), alors que nous n'avons observé aucune différence significative du pourcentage des LBT1 entre les témoins et les patients (Figures 35A, B et C). L'augmentation des LB transitionnels est due à l'augmentation de la sous-population des LBT2 chez les patients par rapport aux témoins (Figure 35C).

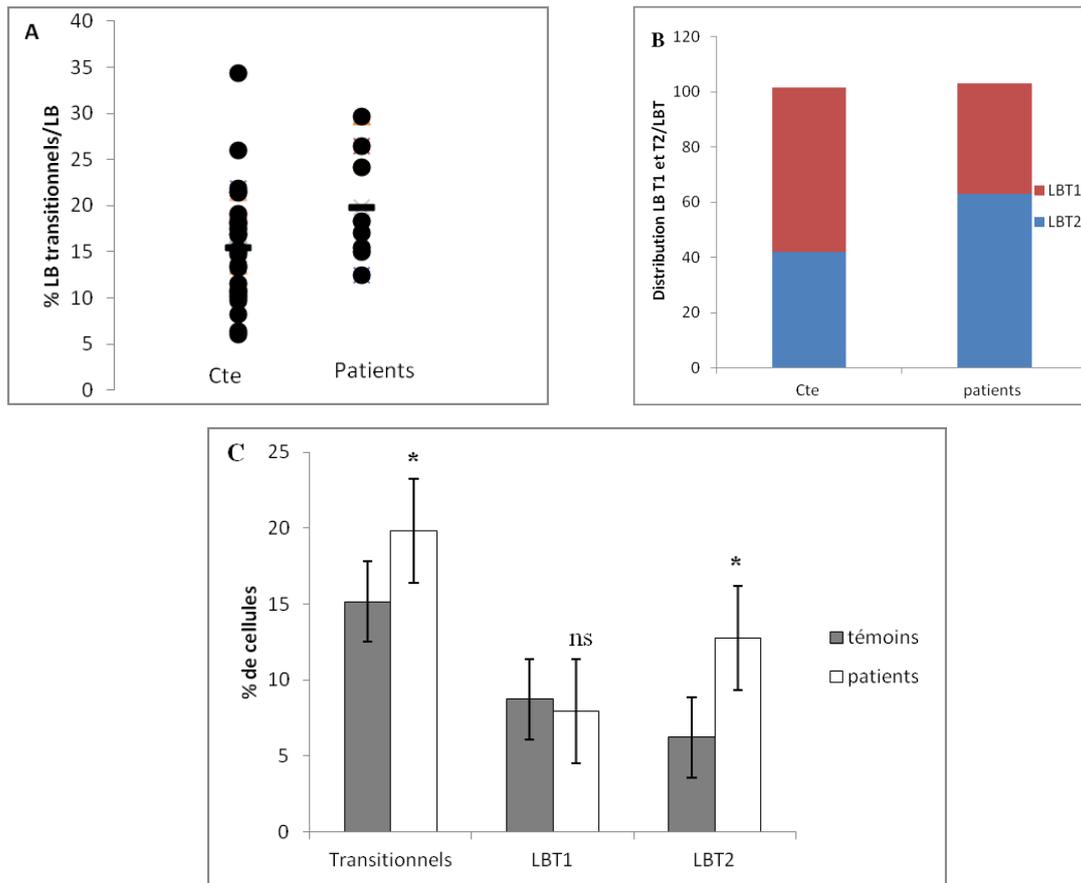


Figure 35 : Distribution des LB transitionnels.

(A) : pourcentage des LB transitionnels chez les témoins (Cte) et les patients, (B) : pourcentage des LBT1 et LBT2 dans les LB transitionnels chez les patients et les témoins, (C) : pourcentage des transitionnels, LBT1 et LBT2 dans les LB totaux.

* différence significative, ns : différence non significative.

3.2 Expression du FcγRIIb

L'expression des molécules FcγRIIb (CD32) à la surface des LB CD19⁺ et des différentes sous-populations a été étudiée par un marquage à saturation avec un anticorps anti-CD32, les résultats sont exprimés en intensité moyenne de fluorescence (IMF). Il existe une diminution de l'expression du FcγRIIb à la surface des LB chez les patients par rapport aux témoins ($p = 0,02$) (Figure 36A). Dans le groupe des témoins, l'expression du récepteur FcγRIIb augmente de façon significative à la surface des B mémoires (19×10^3 ; $p < 10^{-5}$), des plasmocytes (20×10^3 ; $p < 2 \times 10^{-5}$) et des B transitionnels (15×10^3 ; $p < 0,002$) par rapport aux lymphocytes B matures naïfs (11×10^3). Cette augmentation est aussi observée chez les patients LES et concerne les B mémoires ($13,6 \times 10^3$; $p < 7 \times 10^{-4}$) et les plasmocytes (15×10^3 ; $p < 0,03$) mais pas les transitionnels (Figure 36B).

Cette augmentation de CD32 à la surface des lymphocytes B transitionnels des témoins est surtout exprimée par la sous population des LBT2 (Figure 36C)

La comparaison de l'expression de CD32 sur les LB entre les patients et les témoins montre une différence significative au niveau des LB mémoires avec une IMF de $19,6 \times 10^3$ chez les patients contre 15×10^3 chez les témoins ($p = 0,02$) (Figure 36B) ainsi que pour les plasmoblastes avec une IMF de 20×10^3 contre 13×10^3 ($p = 0,02$). Il n'y a pas de différence significative d'expression de CD32 sur les LB transitionnels entre les patients et les témoins. Il existe une diminution de l'expression de CD32 à la surface des LBT2 chez les patients par rapport aux témoins (10^4 contre $1,7 \times 10^4$; $p = 0,03$) mais aucune différence significative pour les LBT1 (Figure 36C).

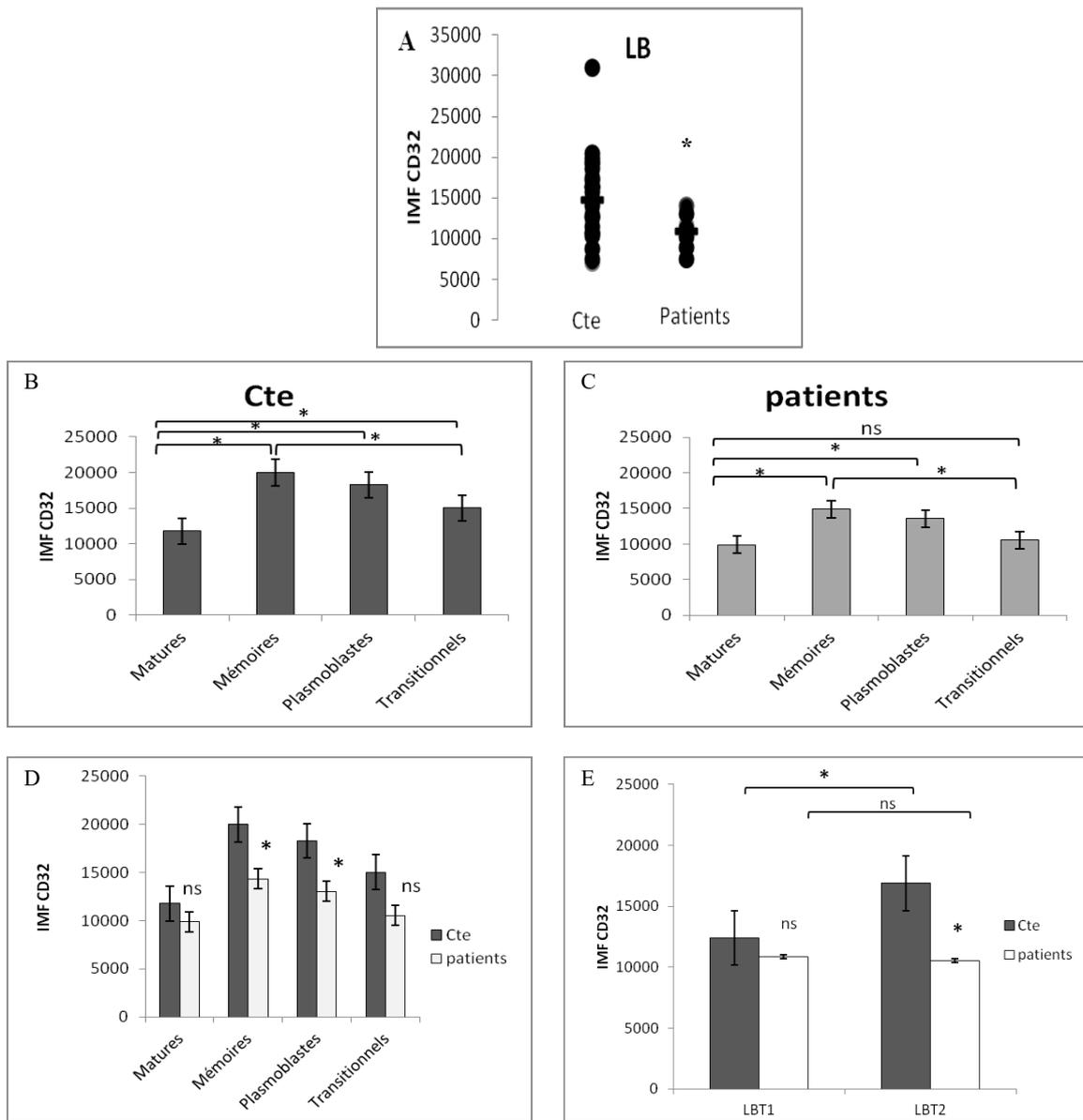


Figure 36 : Intensité moyenne de fluorescence(IMF) du CD32.

(A) : IMF de CD32 sur les LB dans le groupe patients et témoins, (B) : comparaison de l'IMF du CD32 entre les différentes sous population B chez les témoins. (C) : comparaison de l'IMF du CD32 entre les différentes sous population B chez les patients (D) : comparaison de l'IMF du CD32 des différentes sous population B entre les témoins et les témoins. (E) : comparaison de l'IMF du CD32 dans les LBT1 et LBT2 entre les patients et les témoins, * différence significative, ns : différence non significative.

3.3 Expression du CD72

Comme pour le CD32, nous avons étudié l'expression du CD72 à la surface des LB et des sous-populations de LB par un marquage avec un anticorps anti-CD72 mis à saturation. Les résultats sont exprimés en IMF. Dans le groupe témoin, il existe une diminution significative de ce récepteur à la surface des LB mémoires (1843 ; $p < 10^{-3}$) ainsi que sur les plasmoblastes /plasmocytes (2301 ; $p < 10^{-5}$) et une augmentation au sein des LBT (4612) par comparaison aux LB matures (3349, $p = 2 \times 10^{-5}$) (Figure 37A).

Pour les patients, il existe une diminution significative d'expression du CD72 entre les LB mémoires (960) et les B matures naïfs (1947) ($p < 0,01$) (Figure 37B).

La comparaison de l'expression du CD72 entre les patients et les témoins montre une diminution significative sur les LB CD19+ dans le groupe des patients (1957) par rapport aux témoins (3221, $p < 10^{-5}$) (Figure 37C). Cette diminution touche significativement les LB naïfs, les LB mémoires et les LBT (Figure 37D).

L'expression du CD72 au sein des LBT1 et LBT2 est identique entre les deux sous-populations (LBT1 et LBT2) au sein d'un même groupe (Figure 37E).

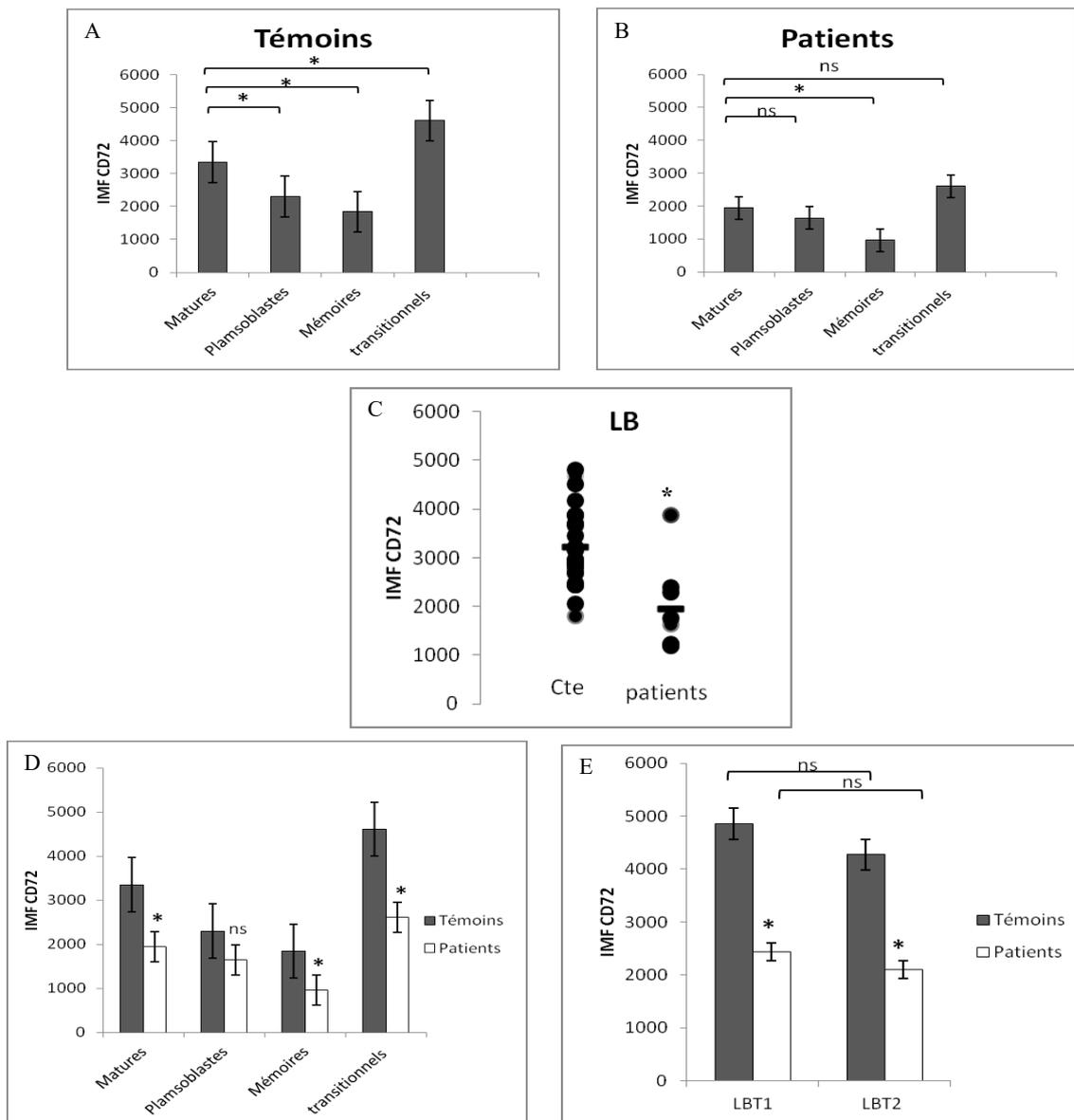


Figure 37 : Intensité moyenne de fluorescence de CD72.

(A) : Comparaison entre les différents sous-populations B dans le groupe témoin, (B) : Comparaison entre les différentes sous-populations B dans le groupe patients, (C) : Comparaison des différentes sous population entre patients et témoins, (D) : Comparaison des différentes sous-population du LB entre les patients et les témoins, (E) : Comparaison entre les LBT1 et LBT2 chez les patients et les témoins. * différence significative, ns : différence non significative.

3.4 Influence du polymorphisme I232T sur l'expression du FcγRIIb.

Nous avons étudié l'influence du polymorphisme I232T sur l'expression du CD32 à la surface des LB. Nous avons divisé le groupe des témoins en trois sous-groupes selon le génotypage du récepteur FcγRIIb-I232T. Nous avons étudié l'expression de CD32 à la surface des LB de 12 témoins sains homozygotes pour l'allèle majeur 232I, 6 témoins sains homozygotes pour l'allèle mineur 232T et 7 témoins hétérozygotes 232IT.

Il existe une augmentation significative de l'expression du FcγRIIb sur les LB des témoins homozygotes pour l'allèle 232T(TT) (17×10^3) par rapport au groupe 232I (II) (13×10^3 , $p=0,01$), alors que l'augmentation n'est pas significative par rapport au groupe hétérozygote 232IT (IT) (Figure 38A).

L'étude détaillée de l'expression du FcγRIIb dans les différentes sous-populations de LB (matures, transitionnels, plasmoblastes/plasmocytes et mémoires) entre les groupes TT et II montre que cette augmentation touche significativement les LB mémoires (22×10^3 contre 17×10^3 , $p=0,04$) ainsi que les LB matures (14×10^3 contre 11×10^3 ; $p=0,03$) (Figure 38B).

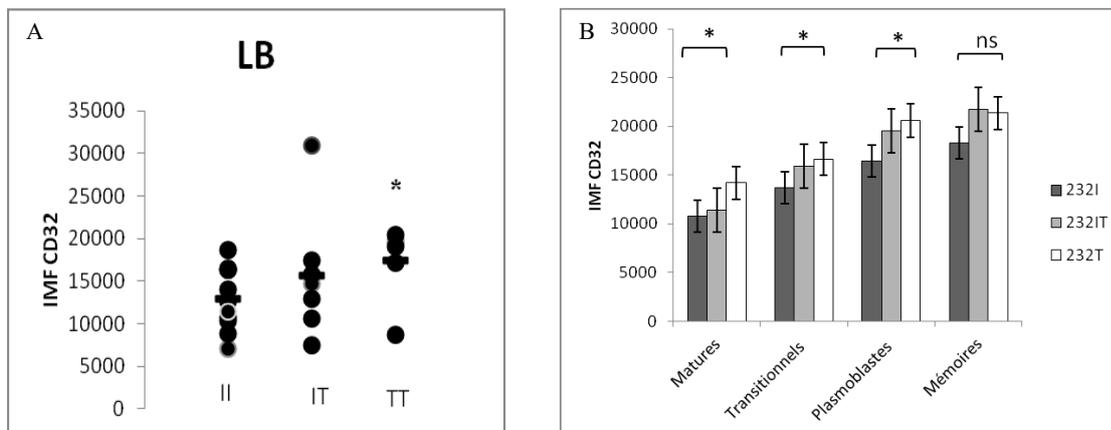


Figure 38 : Intensité moyenne de fluorescente de CD32 dans les différents sous-groupes de 232II, 232IT et 232TT.

(A): à la surface des le LB, (B) : dans les différents sous populations du LB.* différence significative, ns : différence non significative.

3.5 CD19

Nous avons également étudié l'expression de la molécule CD19 au sein de ces 3 sous-groupes. Il existe une diminution significative de l'IMF de CD19 dans le groupe TT (900) par rapport au groupe II (1007) ($p=0,02$) (Figure 39A). Cette baisse d'expression du CD19 dans le groupe TT se produit significativement sur toutes les sous-populations de LB : les LB matures ($p=0,003$), les LB mémoires ($p=0,003$) et les plasmoblastes ($p=0,04$) excepté sur les LBT (Figure 39B).

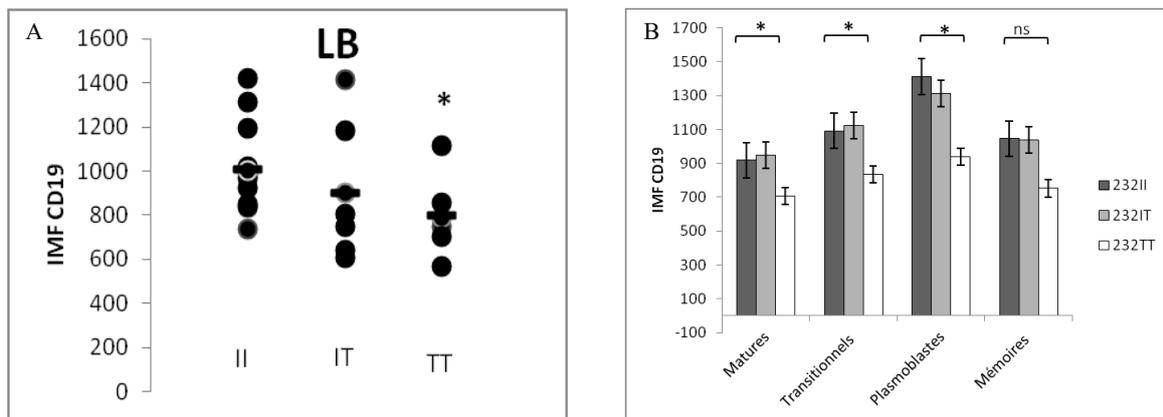


Figure 39 : Comparaison de l'intensité moyenne de fluorescence de CD19.

(A) : à la surface des LB entre les 232II, 232IT, 232TT, (B) à la surface des différents sous population du LB. * différence significative, ns : différence non significative.

3.6 Stimulation des LB et FcγRIIb

Le coengagement du BCR avec le FcγRIIb induit l'activation de celui-ci et la phosphorylation de son motif ITIM par le recrutement de la protéine phosphatase SHIP qui, une fois phosphorylée, inhibe le signal activateur du BCR en déphosphorylant les protéines impliquées dans son activation. Il a été démontré sur des cellules transfectées que le polymorphisme 232T rendait le rapprochement du FcγRIIb et du BCR difficile dans le radeau lipidique (Kono *et al.* 2005; Floto *et al.* 2005).

Le polymorphisme impliquant la région transmembranaire du récepteur l'exclut du radeau lipidique ce qui en empêchant son rapprochement du BCR rend inefficace son action inhibitrice. Nous avons évalué l'effet de ce polymorphisme sur l'activation du LB chez 27 témoins sains et 15 patients LES.

Après stimulation des LB soit par une immunoglobuline totale anti-(IgA, IgM, IgG) appelée anti-IgT permettant la liaison des deux récepteurs soit par un fragment F(ab)'2 anti-IgT activant uniquement le BCR, les phosphorylations de SHIP (témoin d'activation du FcγRIIb) et de Erk (témoin d'activation du BCR) ont été évaluées par des anticorps spécifiques en cytométrie de flux après perméabilisation.

A l'état basal (sans stimulation), il existe une augmentation de la phosphorylation de SHIP dans le groupe de patients LES par rapport aux témoins ($p=0,02$) (Figure 40B) mais aucune différence n'est retrouvée en ce qui concerne la phosphorylation de Erk (Figure 40A).

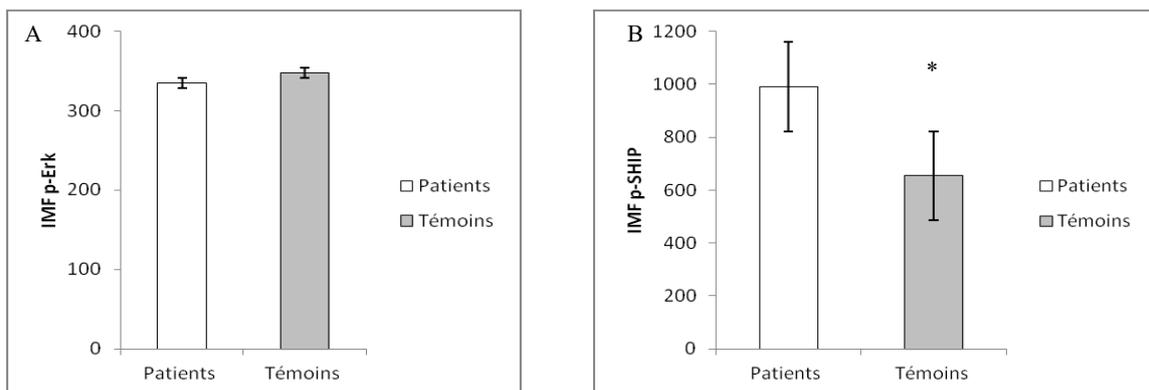


Figure 40 : Phosphorylation de SHIP et de Erk à l'état basal.

(A) : moyenne de l'IMF de phospho Erk chez les patients et chez les témoins. (B) : moyenne de l'IMF de phospho-SHIP chez les patients et chez les témoins. * différence significative.

Pour évaluer l'impact du polymorphisme I232T sur la phosphorylation du SHIP et la régulation négative du LB, nous avons divisé les groupes témoins et patients en sous-groupes selon leur génotype FcγRIIb (II, TT, IT) ; 14 II, 9 IT et 7 TT pour les témoins et 6 II, 5 IT et 4 TT pour les patients.

A l'état basal, nous retrouvons une augmentation significative de la phosphorylation de SHIP dans le sous-groupe TT par rapport aux sous -groupes II ou IT que ce soit chez les patients ($p=0,04$) ou chez les témoins ($p<0,05$) (Figure 41A et B).

Il existe également une augmentation significative de la phosphorylation de SHIP à l'état basal dans le groupe II chez les patients par rapport aux témoins ($p=0,004$). Par ailleurs nous n'avons observé aucune différence significative entre les patients et les témoins dans le groupe IT ($p>0,05$) (Figure 41C).

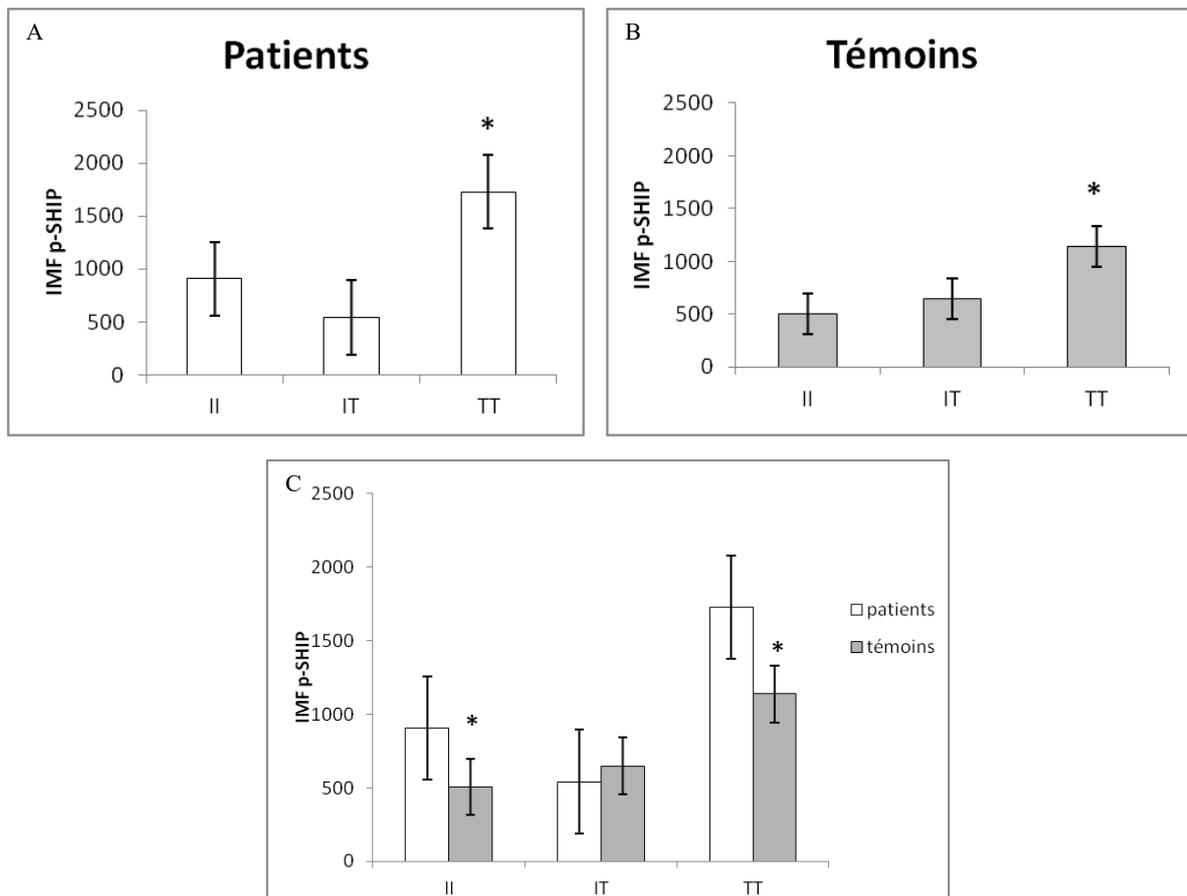


Figure 41 : Phosphorylation de SHIP à l'état basal chez les patients et les témoins II, IT et TT
 (A) : chez les patients. (B) : chez les témoins ;(C) : comparaison entre les patients et les témoins.* différence significative.

Après stimulation du BCR uniquement par le fragment F(ab)'2, nous observons une augmentation de la phosphorylation de Erk par rapport à l'état basal, chez les témoins (539,3 vs 347,7 ; p=0,039) (Figure 42A), suivie d'une augmentation significative de la phosphorylation de SHIP qui passe de 697,2 à 901,7, (p=0,031). Par ailleurs, il n'existe aucune différence significative entre l'état basal et stimulé chez les patients (Figure 42A).

Nos résultats mettent en évidence une augmentation de la phosphorylation de Erk et de SHIP chez les témoins. Par contre, seul le groupe II des témoins, semble avoir une différence significative de l'intensité de la phosphorylation de SHIP par rapport aux deux autres groupes TT et IT (p=0,018) (Figure 42B et C).

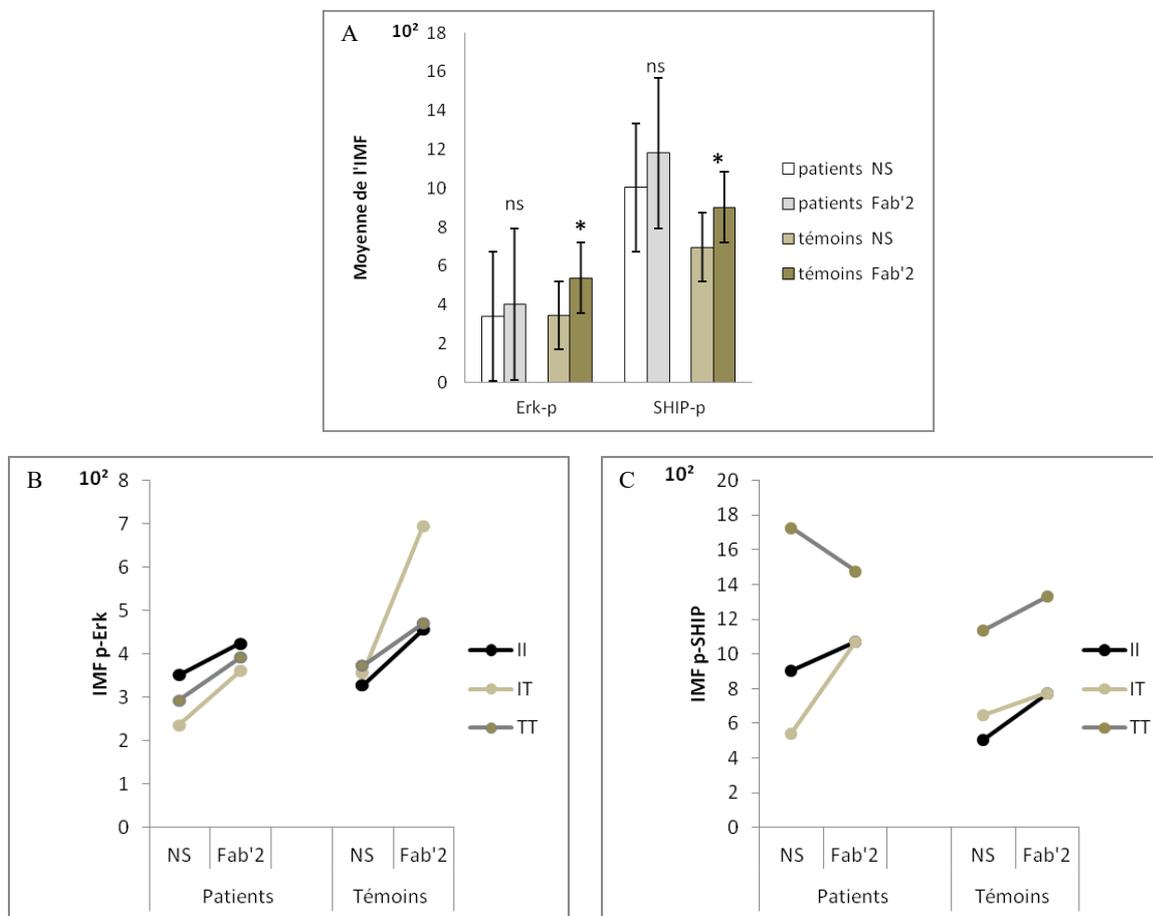


Figure 42 : Phosphorylation de Erk et de SHIP avant et après stimulation par des F(ab)'2 anti Ig des lymphocytes B.

(A) : moyenne de l'IMF de p-Erk et p-SHIP avant (NS), après stimulation avec f(ab)'2. (B) : moyenne de l'IMF de p-Erk avant et après stimulation avec des F(ab)'2 anti Ig dans les groupes II, IT et TT chez les patients et chez les témoins ; (C) : moyenne de l'IMF de p-SHIP avant et après stimulation avec des F(ab)'2 anti Ig dans les groupes II, IT et TT chez les patients et chez les témoins. * différence significative, ns : différence non significative.

Enfin, après stimulation par des IgG anti-IgT (Co engagement de FcγRIIb et du BCR), il existe une augmentation significative de la phosphorylation de SHIP par rapport à l'état basal dans le groupe témoin (p=0,003) mais aucune différence significative de la phosphorylation de Erk pour les deux groupes (p>0,05) (Figure 43A).

Il n'existe aucune différence significative dans la phosphorylation des protéines Erk et SHIP en fonction des allèles II, TT et IT entre l'état basal et stimulé avec un anti-IgT (Figure 43B, C) (p>0,05). Alors que nous observons une augmentation significative de la phosphorylation de SHIP après stimulation (anti-IgT) dans les sous groupes témoins II (p=0,0067) et TT (p=0,034).

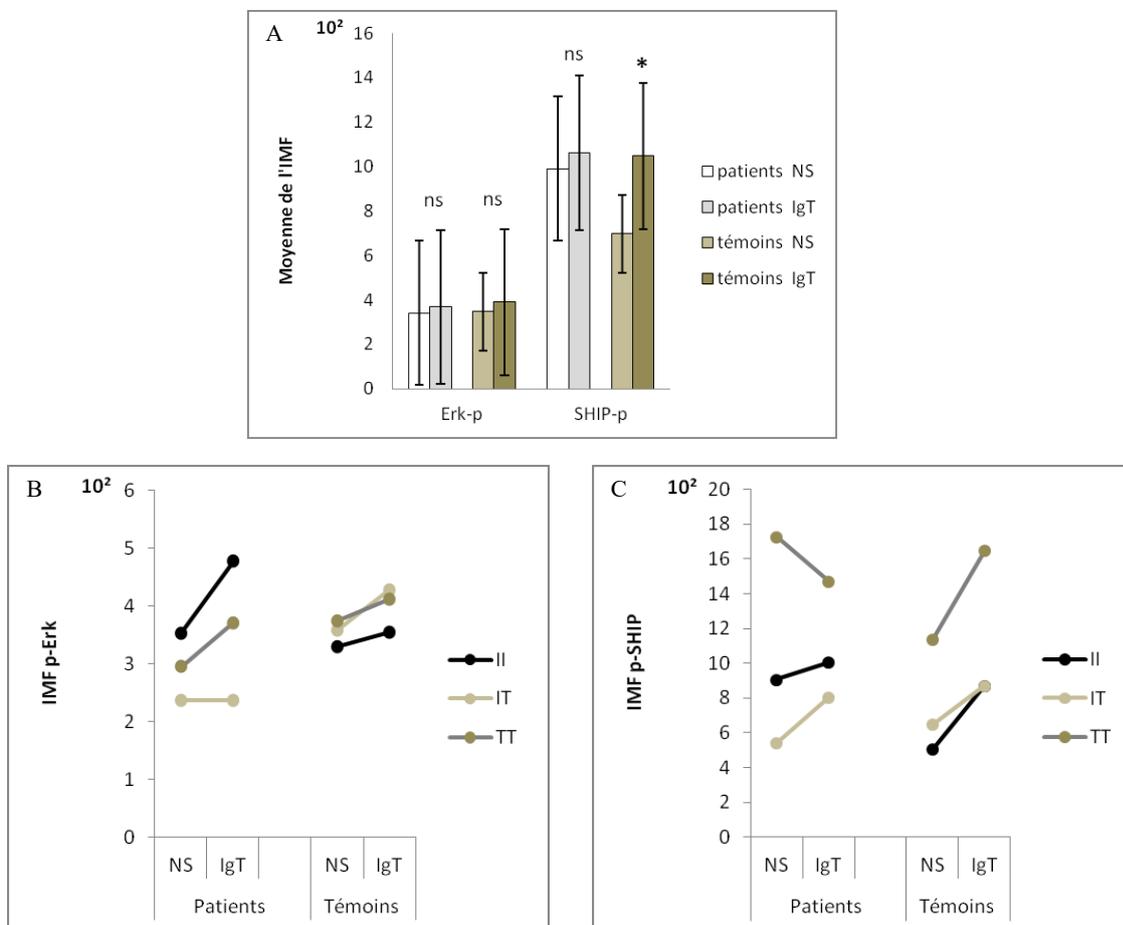


Figure 43 : Phosphorylation de Erk et de SHIP avant et après stimulation par IgG anti-IgT des lymphocytes B

(A) : moyenne de l'IMF de p-Erk et p-SHIP avant (NS), après stimulation avec IgT. (B) : moyenne de l'IMF de p-Erk avant et après stimulation avec un IgT dans les groupes II, IT et TT chez les patients et chez les témoins ; (C) : moyenne de l'IMF de p-SHIP avant et après stimulation avec un IgT dans les groupes II, IT et TT chez les patients et chez les témoins. * différence significative, ns : différence non significative.

Afin de vérifier que l'augmentation de la phosphorylation de SHIP dans le sous groupe TT des témoins est liée à la stimulation de FcγRIIb par IgT, nous avons co-précipité la protéine SHIP phosphorylée (p-SHIP) avec le FcγIIb (Figure 44A). A l'état basal les témoins TT ont une intensité de de p-SHIP (bande à 130 kDa) très faible par rapport aux témoins IT et TT.

La stimulation du BCR des LB sans le récepteur FcγIIb par des F(ab)'2 anti IgT induit une phosphorylation de SHIP dans les 3 groupes (TT, IT, II) avec une intensité de p-SHIP plus faible dans le groupe TT.

La co-stimulation du FcγRIIb et du BCR par un IgG anti IgT induit dans les trois groupes une phosphorylation de SHIP plus importante qu'avec la stimulation par Fab'2. L'intensité de cette phosphorylation est malgré tout plus faible dans le groupe TT que dans les deux autres groupes IT et II (Figure 44B).

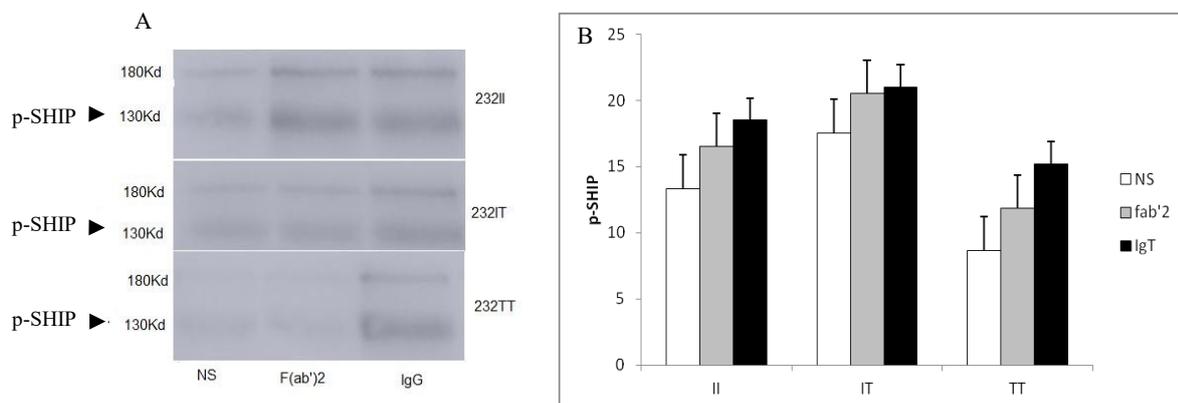


Figure 44 : Immunoprécipitation de p-SHIP avec le FcγRIIb chez des témoins II, IT et TT.

(A): image de gel : phosphorylation de SHIP (bande de 130 Kda) avant la stimulation (NS), après stimulation avec un F(ab'2) ou avec un anti-(IgT), (B) : p-SHIP chez les témoins II, IT et TT avant stimulation NS, après stimulation avec un F(ab'2) (fab'2) ou avec un IgG anti (IgA, IgM, IgG) (IgT).

4 Discussion

L'importance du rôle de LB dans la physiopathologie des maladies auto-immunes n'est plus à démontrer, par contre, les dysfonctionnements du système immunitaire entraînant l'activation et la différenciation des LB auto-réactifs en cellules sécrétrices d'auto-Ac ne sont pas totalement élucidés. Nous avons étudié la distribution des différentes sous-populations de LB dans une cohorte de patient LES.

Il existe une diminution significative de l'intensité moyenne de fluorescence du CD19 témoignant de la diminution de l'expression de CD19 à la surface des LB chez les patients par rapport aux témoins. La protéine CD19 est un co-récepteur activateur du BCR qui, apparaît très tôt au cours du développement et de la différenciation du LB et renforce le signal activateur du BCR (Korganow *et al.* 2010). Le CD19 lors de son co-engagement avec le BCR va enclencher une cascade d'activation dans le LB ainsi que l'activation de la voie de signalisation Akt permettant ainsi la survie du LB. Les souris déficientes en CD19 ont une hypo-réactivité aux signaux transmembranaires du LB alors que des souris transgéniques qui expriment fortement le CD19 présentent une hyper-réactivité de leurs LB ainsi qu'une augmentation de la sécrétion des auto-Ac (Engel *et al.* 1995; Sato *et al.* 1997; Sato *et al.* 2000). Des études sur la population japonaise ont mis en évidence un lien avec le LES et un polymorphisme du gène codant pour CD19 entraînant une baisse de l'expression de celui-ci à la surface des LB. Ce polymorphisme n'a pas été retrouvé chez les européens (Kuroki *et al.* 2002). D'autres études ont retrouvé sur les LB de patients LES cette diminution d'expression du CD19 chez les LES quiescents (Korganow *et al.* 2010) mais également chez les LES actifs (Horton *et al.* 2011). Les patients de notre étude ont un lupus actif mais la plupart sont sous des thérapies plus ou moins lourdes avec probablement une répercussion sur les populations de LB. Culton a mis en évidence une régulation négative du CD19 chez les patients atteints de vascularite ANCA positif (Culton *et al.* 2006). Ces études suggèrent qu'il existerait une dérégulation du mécanisme de CD19 dans les maladies auto-immunes (Korganow *et al.* 2010).

4.1 Répartition des sous-populations du LB

Plusieurs déséquilibres dans la répartition des lymphocytes B au sein des différentes sous-populations ont été décrits dans les MAI. Nous retrouvons dans notre étude une diminution des lymphocytes B mémoires (CD27+ CD38-) et des LB matures naïfs (CD38+ CD27-) ainsi qu'une augmentation des B Transitionnels (CD24fort CD38fort). Par contre l'augmentation des plasmocytes/plasmoblastes (CD27+ CD38fort) n'est pas significative. Ces résultats sont en accord avec plusieurs données de la littérature en dehors de la diminution des B mémoires. En effet, plusieurs équipes retrouvent plutôt une augmentation de cette population (Odendahl *et al.* 2000; Dörner *et al.* 2011). La différence de combinaisons d'anticorps utilisées pour la caractérisation de ces populations de LB pourraient expliquer ces résultats contradictoires car cette expansion toucherait plutôt les LB mémoires ayant switché (CD27+/CD38-,IgD-) (Iwata & Tanaka 2016). D'autres équipes confirment une diminution des LB mémoires et une augmentation des plasmoblastes chez les patients LES (Anolik *et al.* 2004; Rodríguez-Bayona *et al.* 2010; Korganow *et al.* 2010; Iwata & Tanaka 2016).

L'augmentation des LB transitionnels chez les patients par rapport aux témoins est également retrouvée par d'autres équipes (Dörner *et al.* 2009). Dans notre étude cette augmentation est composée essentiellement de LBT2 et pas de LBT1 qui expriment le CD5, ce résultat est en accord avec d'autres études (Sims *et al.* 2005; Blair *et al.* 2010). Plusieurs sous-populations de LB sont décrites comme étant des LB régulateurs comme les LB-1 (CD5+ CD1d) ou les LB de la zone marginale (Carroll & Prodeus 1998; Silverman *et al.* 2008). Les LB transitionnels seraient également à 71% des LB régulateurs (Sims *et al.* 2005; Dörner *et al.* 2009; Blair *et al.* 2009; Lee *et al.* 2009).

Une augmentation des plasmocytes/plasmoblastes est généralement retrouvée chez les LES activés corrélée à l'activité de la maladie. Cette augmentation n'est pas retrouvée chez les patients LES quiescents (Korganow *et al.* 2010). Les patients de notre étude sont des lupus actifs mais sous différents traitements, ce qui induit un biais dans nos résultats en ce qui concerne cette augmentation.

4.2 FcγRIIb

Le FcγRIIb fait partie des récepteurs inhibiteurs du LB et joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie et de la tolérance. Les souris déficientes en FcγRIIb développent des MAI avec des glomérulonéphrites de type lupique (Bolland & Ravetch 2000; Takai 2002). Ce récepteur joue également un rôle dans la régulation de la différenciation des LB naïfs en LB mémoires « switchés » et en plasmocytes (Fukuyama *et al.* 2005). Nous avons retrouvé une augmentation de l'expression du FcγRIIb sur les LB mémoires (CD27+/CD38-) ainsi que sur les plasmoblastes (CD27+/CD38+) plus importante chez les témoins que chez les patients. Ces résultats concordent partiellement avec ceux de l'équipe de Mackay, qui trouve cette augmentation du FcγRIIb uniquement sur les B mémoires mais pas sur les plasmoblastes. Cette différence peut être due à la caractérisation des plasmoblastes car nous avons associé le CD27 au CD38 pour définir les plasmoblastes (CD27+/CD38+) alors que dans l'étude de Mackay seul le CD27 est utilisé (Mackay *et al.* 2006). Par ailleurs nos résultats, du moins sur les LB des témoins, concordent avec l'étude de Tzeng (Tzeng *et al.* 2015). L'expression plus faible du FcγRIIb sur les LB mémoires et les plasmoblastes/plasmocytes des patients est également retrouvée par plusieurs études (Mackay *et al.* 2006; Horton *et al.* 2011).

En présence du polymorphisme FcγRIIb-232T, forme TT, il existe une augmentation significative de l'expression du récepteur FcγRIIb chez les témoins par rapport à la forme sauvage II, cette expression est inversement proportionnelle à l'expression du CD19 qui semble être négativement régulée chez les témoins homozygotes TT. Cette augmentation touche de façon significative les LB naïfs ainsi que les LB mémoires. La diminution de la fonction inhibitrice du FcγRIIb induite par la mutation TT augmenterait l'expression de ce récepteur et diminuerait celle du CD19 afin d'obtenir une régulation normale du seuil d'activation du BCR.

4.3 CD72

L'expression du CD72 est maximale sur les LB transitionnels puis diminue au cours de la différenciation et de l'activation du LB. Le CD72 est impliqué dans la régulation de la différenciation des LB matures en plasmocytes et inhibe la sécrétion des auto-anticorps de faible affinité (Yamazaki *et al.* 2005). Le CD72 fait partie des récepteurs inhibiteurs du LB et participe à l'homéostasie du système immunitaire en augmentant le seuil d'activation du BCR, sa défaillance provoquerait des ruptures de tolérance (Adachi *et al.* 2000; Ravetch & Lanier 2000). Nous observons une diminution plus importante de l'expression du CD72 sur les LB des patients par rapport aux témoins. Des études ont montré qu'une expression anormale du CD72 était associée aux maladies auto-immunes avec une diminution de son expression sur les cellules activées chez les patients LES et dans l'atteinte rénale en particulier (Parnes & Pan 2000; Nakano *et al.* 2007; Pan *et al.* 2008; Vadasz *et al.* 2014). Cette diminution de l'expression serait inversement corrélée avec une augmentation de l'activité de la maladie.

4.4 Stimulation

L'engagement de FcγRIIb initie un mécanisme de rétrocontrôle par l'intermédiaire de la protéine phosphatase SHIP qui vise à atténuer l'activation du BCR, ce mécanisme de régulation joue un rôle important dans la régulation du LB (Mackay *et al.* 2006)

Dans ce travail, nous avons montré que la protéine SHIP peut être recrutée, indépendamment de FcγRIIb, par l'activation du BCR seul. Nos résultats concordent avec ceux des autres études qui démontrent que lors de l'activation du BCR, la molécule SHIP peut se lier directement sur les protéines Iga/β (CD79a et b) du BCR et être phosphorylée lors d'une interaction protéine-protéine où Syk joue un rôle primordial (Tridandapani *et al.* 1997; Barrow & Trowsdale 2006; Mukherjee *et al.* 2012; Getahun & Cambier 2015; Pauls *et al.* 2016). Plusieurs études ont démontré que le recrutement des molécules SHIP et même SHP-1 n'était pas réservé exclusivement aux motifs ITIM et que les motifs ITAM de certains récepteurs activateurs comme le FcαR, le FcγRIIa, le FcεRI et le BCR pouvaient également le faire. Cet effet inverse serait lié à la phosphorylation d'un seul motif ITAM au lieu des deux. (Kimura *et al.* 1997; Peng *et al.* 2010). Par ailleurs d'autres récepteurs inhibiteurs comme les récepteurs FcR-like et en particulier le FCRL5 pourrait recruter par ses motifs ITIM la protéine SHIP-1 lors d'un engagement avec le BCR.

Le polymorphisme FcγRIIb-I232T est associé au lupus dans les populations mélanodermes, le T232 à la particularité de rendre la partie transmembranaire du FcγRIIb hydrophile et d'induire son exclusion du radeau lipidique, cette exclusion ne permettra pas le recrutement de la protéine SHIP par le FcγRIIb et l'inhibition du LB par le FcγRIIb (Floto *et al.* 2005; Kono *et al.* 2005; Liu *et al.* 2010). Nous avons montré dans ce travail que la phosphorylation de SHIP était effective malgré la présence du polymorphisme 232T.

Il existe une différence entre l'intensité de phosphorylation de la protéine SHIP retrouvée en cytométrie de flux et celle retrouvée après immunoprécipitation du FcγRIIb qui peut être expliquée par l'existence d'une phosphorylation de la protéine SHIP indépendante du récepteur inhibiteur et ceci pour pallier à la baisse de son efficacité lors de la présence du polymorphisme TT. D'autres études sur les co-récepteurs sont nécessaires afin de définir précisément les récepteurs impliqués dans cette phosphorylation suppléante.

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

L'objectif principal de notre travail était d'étudier les facteurs de risque pouvant expliquer la prévalence importante et la gravité des maladies auto-immunes dans les populations afro-caribéennes. Ces pathologies surviennent le plus souvent dans un contexte inflammatoire avec un environnement particulier et sur un terrain génétique prédisposé, tous ces facteurs aboutissant à un dérèglement du système immunitaire.

Nous avons débuté cette recherche des facteurs de risque par l'étude de la famille des récepteurs FcγRs. Des travaux ont montré qu'il existait, dans les populations habitant des régions impaludées, la présence d'un polymorphisme I232T altérant les fonctions inhibitrices du récepteur inhibiteur FcγRIIb. De nombreuses études ont également mis en évidence des liens entre l'existence de polymorphismes sur les FcγRs et les pathologies auto-immunes mais ces résultats étaient variables selon les origines des populations.

Dans un premier temps, nous avons établi une cartographie des différents polymorphismes FcγRIIa-R131H (rs1801274), FcγRIIb-I232T (rs1050501), FcγRIIIa-F158V (rs396991), FcγRIIIb-Na1/Na2 dans la population martiniquaise en les comparant aux données de la littérature concernant d'autres populations africaines, asiatiques, africaines-américaines et européennes car il n'existait aucune donnée sur cette population afro-caribéenne en dehors des études sur la population afro-américaine qui partage les mêmes origines africaines.

Cette caractérisation a permis de mettre en évidence une forte proportion des allèles FcγRIIb-T232 et FcγRIIIa-V158 ainsi que des génotypes 232TT et 158VV. Les allèles R131 et T232 sont décrits comme étant des facteurs de risque de développement ou d'aggravation de MAI comme le LES. Ces polymorphismes entraînant une diminution de l'affinité des récepteurs pour les IgG, auraient une répercussion sur la clairance des CI, la rupture de tolérance ainsi que la réponse aux immunothérapies. En effet, les patients homozygotes pour les allèles FcγRIIa131-H et FcγRIIIa-158V ont une meilleure réponse aux immunothérapies que ce soit dans un contexte auto-immun ou cancéreux. Ces résultats démontrent également que la population martiniquaise est bien distincte des autres populations du fait des métissages ainsi que des pressions de sélection liées à l'environnement infectieux.

Le polymorphisme 232T est connu pour entraîner chez la souris une hyper-activation des lymphocytes B ainsi que l'apparition de MAI. La population martiniquaise possédant le plus fort pourcentage de cette mutation, nous avons, dans un deuxième temps, recherché s'il existait un lien entre ce polymorphisme et les MAI comme le LES ou la NMO chez les martiniquais. Nous n'avons pas trouvé de lien entre le 232T et le LES contrairement aux études réalisées dans les populations d'origine asiatique. Le fort pourcentage de la forme homozygote TT et la sur-représentation de l'allèle T dans la population témoin rend difficile la mise en évidence de ce lien dans le groupe des patients lupiques. Par ailleurs nous avons mis en évidence une augmentation de la fréquence de l'homozygote Na1, de l'allèle Na1 et de l'allèle FcγRIIIa-158F chez ces patients LES et une augmentation de l'homozygote FcγRIIa-131R, de l'allèle 131R ainsi que l'allèle 158V chez les patients LES souffrant d'une atteinte rénale. Concernant les maladies démyélinisantes du système nerveux central, les résultats ont montré une augmentation de l'homozygote FcγRIIa-131R et une diminution de l'homozygote FcγRIIIb-Na2 chez les patients SEP ainsi qu'une augmentation de la fréquence allélique de FcγRIIb-232T chez les patients NMO. Une augmentation du nombre de patients NMO AQP4+ et AQP4- est nécessaire afin de pouvoir trouver un lien entre la mutation I232T et la sécrétion d'anti-AQP4.

Afin d'établir un profil de susceptibilité génétique des patients martiniquais d'autres études complémentaires sont nécessaires en particulier en étudiant des associations avec d'autres polymorphismes connus, comme ceux touchant les IRFs ou d'autres gènes impliqués dans la régulation de l'immunité innée et adaptative (PTPN22, C4, Lyn). Les facteurs environnementaux en Martinique sont également à prendre en compte, en particulier l'influence du chlordécone, pesticide organochloré polluant les sols des Antilles, sur la dérégulation de l'immunité spécifique, ce pesticide agissant sur les récepteurs oestrogènes des lymphocytes T et B.

Dans la dernière partie nous avons étudié l'impact du polymorphisme 232T sur les lymphocytes B des témoins et des patients LES.

Le FcγRIIb joue un rôle très important dans le maintien de la tolérance et dans la régulation du passage entre les LB naïfs et LB activés, dans notre étude nous avons retrouvé une diminution significative de l'expression de ce récepteur sur les LB des patients par rapport aux témoins, en particulier sur les LB mémoires et les plasmocytes. Il existe un polymorphisme dans la région promotrice de FCGR2B le -386C/G-120A/T qui induit une diminution de l'expression du récepteur (Blank et al. 2005) et qui est associé au lupus dans la population caucasienne mais nous ne l'avons retrouvé ni chez les témoins ni chez les patients. La diminution de l'expression du FcγRIIb chez les LES n'est donc pas due à ce polymorphisme mais a déjà été retrouvée par d'autres travaux chez les patients LES.

Malgré la diminution de l'expression de FcγRIIb, il existe, chez les patients LES, une augmentation de la phosphorylation de la protéine SHIP à l'état basal qui est plus importante en présence du polymorphisme 232T à l'état homozygote. Ce résultat peut être dû à l'augmentation de l'expression de FcγRIIb observée en présence de 232TT qui est également associée à une diminution de l'expression de CD19. Une étude récente chez des patients atteints du syndrome de Wiskott-Aldrich a montré une diminution du recrutement CD19 associée à une augmentation de la phosphorylation de p-SHIP (Bai et al. 2016). La diminution du CD19 serait une réaction à la sur-activation du BCR en présence de l'homozygote 232TT. L'augmentation de la phosphorylation de la protéine SHIP, même en présence de la mutation 232T, peut être due à l'augmentation de l'activation du BCR qui induirait de façon indirecte sa phosphorylation. Par ailleurs, les patients lupiques de notre étude étant pour la plupart sous traitement et certains probablement en rémission, il existe un biais important dans l'étude fonctionnelle de l'impact de la mutation 232T.

Des études complémentaires de stimulation du BCR en présence des différentes formes homozygotes TT et II sont nécessaires avec des patients sans traitement ou en poussées et en ajoutant d'autres techniques comme l'étude du flux calcique. L'utilisation de techniques en microscopie confocale seraient utiles afin de mettre en évidence les co-localisations de SHIP avec le BCR et les autres récepteurs inhibiteurs comme le CD22 et le CD5 au niveau des radeaux lipidiques.

Des études sur les autres types cellulaires porteurs de ce récepteur FcγRIIb comme les monocytes et les cellules dendritiques sont à envisager afin de visualiser s'il existe un impact de cette mutation TT sur leur fonctionnalité, par exemple il a été démontré que l'action du FcγRIIb pourrait avoir un rôle dans l'aggravation de certaines infections virales comme la dengue.

En conclusion, l'étude des polymorphismes des FCGR met en évidence la singularité de la population martiniquaise qui possède une forte représentation des allèles, FcγRIIB-232T et FcγRIIIa-158 V. Certains de ces polymorphismes comme le 232T et le 131R représentent un risque d'apparition de MAI et sont probablement le résultat d'une pression de sélection liée aux infections virales comme les flavivirus et parasitaires comme le paludisme. Malgré la forte fréquence du FcγRIIb-232TT, seule la NMO semble avoir un lien avec ce polymorphisme.

L'existence de ces polymorphismes est importante à connaître afin de mieux comprendre la physiopathologie des MAI dans la population afrocaribéenne et d'adapter en connaissance certaines immunothérapies.

Par ailleurs au niveau du LB, il existe des variations d'expression membranaire du FcγRIIb ainsi que des sous populations lymphocytaires B chez les patients LES. La présence du polymorphisme 232T sous sa forme TT n'empêche pas la phosphorylation de SHIP suggérant l'existence d'autres mécanismes indépendants du récepteur inhibiteur et aboutissant à une phosphorylation normale. Des études sur les autres co-récepteurs sont nécessaires afin de définir précisément les récepteurs impliqués dans cette phosphorylation suppléante lors de la régulation du lymphocyte B.

L'étude des facteurs de risque impliqués dans la survenue des MAI dans la population caribéenne doit être poursuivie sur les lymphocytes B et étendue aux mécanismes impliqués dans la régulation des cellules dendritiques et macrophagiques afin de mieux comprendre les liens entre les pressions de sélections liées aux maladies infectieuses et l'apparition de ces MAI.

BIBLIOGRAPHIE

- Adachi T, Wakabayashi C, Nakayama T, Yakura H, Tsubata T. 2000. CD72 negatively regulates signaling through the antigen receptor of B cells. *J Immunol Baltim Md* 1950. 164:1223–1229.
- Agliari E, Barra A, Del Ferraro G, Guerra F, Tantari D. 2015. Anergy in self-directed B lymphocytes: A statistical mechanics perspective. *J Theor Biol.* 375:21–31.
- Alarcón-Segovia D, Alarcón-Riquelme ME, Cardiel MH, Caeiro F, Massardo L, Villa AR, Pons-Estel BA, Grupo Latinoamericano de Estudio del Lupus Eritematoso (GLADEL). 2005. Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort. *Arthritis Rheum.* 52:1138–1147.
- Allman D, Pillai S. 2008. Peripheral B cell subsets. *Curr Opin Immunol.* 20:149–157.
- Alugupalli KR, Gerstein RM, Chen J, Szomolanyi-Tsuda E, Woodland RT, Leong JM. 2003. The resolution of relapsing fever borreliosis requires IgM and is concurrent with expansion of B1b lymphocytes. *J Immunol Baltim Md* 1950. 170:3819–3827.
- Amigorena S, Bonnerot C. 1999. Fc receptors for IgG and antigen presentation on MHC class I and class II molecules. *Semin Immunol.* 11:385–390.
- Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP. 2003. The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci.* 4:991–1001.
- Anolik JH, Barnard J, Cappione A, Pugh-Bernard AE, Felgar RE, Looney RJ, Sanz I. 2004. Rituximab improves peripheral B cell abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 50:3580–3590.
- Arnaud L, Fagot JP, Mathian A, Paita M, Fagot-Campagna A, Amoura Z. 2014. Prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in France: a 2010 nation-wide population-based study. *Autoimmun Rev.* 13:1082–1089.
- Asano K, Matsushita T, Umeno J, Hosono N, Takahashi A, Kawaguchi T, Matsumoto T, Matsui T, Kakuta Y, Kinouchi Y, et al. 2009. A genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for ulcerative colitis in the Japanese population. *Nat Genet.* 41:1325–1329.
- Baba T, Fusaki N, Aoyama A, Li DH, Okamura RM, Parnes JR, Hozumi N. 2005. Dual regulation of BCR-mediated growth inhibition signaling by CD72. *Eur J Immunol.* 35:1634–1642.
- Bae SC, Fraser P, Liang MH. 1998. The epidemiology of systemic lupus erythematosus in populations of African ancestry: a critical review of the “prevalence gradient hypothesis.” *Arthritis Rheum.* 41:2091–2099.
- Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, Shark KB, Grande WJ, Hughes KM, Kapur V, et al. 2003. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:2610–2615.
- Ballestar E. 2011. Epigenetic alterations in autoimmune rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 7:263–271.
- Banchereau J, Pascual V, Palucka AK. 2004. Autoimmunity through cytokine-induced dendritic cell activation. *Immunity.* 20:539–550.
- Barrow AD, Trowsdale J. 2006. You say ITAM and I say ITIM, let’s call the whole thing off: the ambiguity of immunoreceptor signalling. *Eur J Immunol.* 36:1646–1653.
- Batten M, Groom J, Cachero TG, Qian F, Schneider P, Tschopp J, Browning JL, Mackay F. 2000. BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J Exp Med.* 192:1453–1466.
- Bell DA, Morrison B, VandenBygaart P. 1990. Immunogenic DNA-related factors. Nucleosomes spontaneously released from normal murine lymphoid cells stimulate

- proliferation and immunoglobulin synthesis of normal mouse lymphocytes. *J Clin Invest.* 85:1487–1496.
- Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, Pascual V. 2003. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med.* 197:711–723.
- Bera O, Cesaire R, Quelvennec E, Quillivic F, De Chavigny V, Ribal C, Semana G. 2001. HLA class I and class II allele and haplotype diversity in Martinicans. *Tissue Antigens.* 57:200–207.
- Bernard-Valnet R, Liblau RS, Vukusic S, Marignier R. 2015. Neuromyelitis optica: a positive appraisal of seronegative cases. *Eur J Neurol.* 22:1511–1518, e82–83.
- Bernard-Valnet R, Marignier R. 2015. [Evolution of Devic's neuromyelitis optica spectrum disorders]. *Presse Médicale Paris Fr* 1983. 44:401–410.
- Bizzoco E, Lolli F, Repice AM, Hakiki B, Falcini M, Barilaro A, Taiuti R, Siracusa G, Amato MP, Biagioli T, et al. 2009. Prevalence of neuromyelitis optica spectrum disorder and phenotype distribution. *J Neurol.* 256:1891–1898.
- Blair PA, Chavez-Rueda KA, Evans JG, Shlomchik MJ, Eddaoudi A, Isenberg DA, Ehrenstein MR, Mauri C. 2009. Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. *J Immunol Baltim Md 1950.* 182:3492–3502.
- Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, Mauri C. 2010. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity.* 32:129–140.
- Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J. 2008. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19:41–52.
- Blank MC, Stefanescu RN, Masuda E, Marti F, King PD, Redecha PB, Wurzbarger RJ, Peterson MGE, Tanaka S, Pricop L. 2005. Decreased transcription of the human FCGR2B gene mediated by the -343 G/C promoter polymorphism and association with systemic lupus erythematosus. *Hum Genet.* 117:220–227.
- Bohnhorst JØ, Bjørgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. 2001. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjögren's syndrome. *J Immunol Baltim Md 1950.* 167:3610–3618.
- Bolland S, Ravetch JV. 2000. Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity.* 13:277–285.
- Bolland S, Yim Y-S, Tus K, Wakeland EK, Ravetch JV. 2002. Genetic modifiers of systemic lupus erythematosus in FcgammaRIIB(-/-) mice. *J Exp Med.* 195:1167–1174.
- Borchers AT, Naguwa SM, Shoenfeld Y, Gershwin ME. 2010. The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 9:A277–287.
- Borrok MJ, Jung ST, Kang TH, Monzingo AF, Georgiou G. 2012. Revisiting the role of glycosylation in the structure of human IgG Fc. *ACS Chem Biol.* 7:1596–1602.
- Botto M, Theodoridis E, Thompson EM, Beynon HL, Briggs D, Isenberg DA, Walport MJ, Davies KA. 1996. Fc gamma RIIa polymorphism in systemic lupus erythematosus (SLE): no association with disease. *Clin Exp Immunol.* 104:264–268.
- Bouaziz J-D, Calbo S, Maho-Vaillant M, Saussine A, Bagot M, Bensussan A, Musette P. 2010. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro. *Eur J Immunol.* 40:2686–2691.

- Breunis WB, Mirre E van, Bruin M, Geissler J, Boer M de, Peters M, Roos D, Haas M de, Koene HR, Kuijpers TW. 2008. Copy number variation of the activating FCGR2C gene predisposes to idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 111:1029–1038.
- Bronson PG, Chaivorapol C, Ortmann W, Behrens TW, Graham RR. 2012. The genetics of type I interferon in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Immunol*. 24:530–537.
- Brooks DG, Qiu WQ, Luster AD, Ravetch JV. 1989. Structure and expression of human IgG FcRII(CD32). Functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple genes. *J Exp Med*. 170:1369–1385.
- Brown EE, Edberg JC, Kimberly RP. 2007. Fc receptor genes and the systemic lupus erythematosus diathesis. *Autoimmunity*. 40:567–581.
- Browning JL. 2006. B cells move to centre stage: novel opportunities for autoimmune disease treatment. *Nat Rev Drug Discov*. 5:564–576.
- Bux J, Stein E-L, Bierling P, Fromont P, Clay M, Stroncek D, Santoso S. 1997. Characterization of a New Alloantigen (SH) on the Human Neutrophil Fcγreceptor IIIb. *Blood*. 89:1027–1034.
- Cabre P, González-Quevedo A, Bonnan M, Saiz A, Olindo S, Graus F, Smadja D, Merle H, Thomas L, Cabrera-Gomez JA. 2009. Relapsing neuromyelitis optica: long term history and clinical predictors of death. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 80:1162–1164.
- Cady CT, Rice JS, Ott VL, Cambier JC. 2008. Regulation of hematopoietic cell function by inhibitory immunoglobulin G receptors and their inositol lipid phosphatase effectors. *Immunol Rev*. 224:44–57.
- Cambier JC. 1995. Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J Immunol Baltim Md 1950*. 155:3281–3285.
- Cambier JC. 1997. Inhibitory receptors abound? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:5993–5995.
- Canete JD, Suarez B, Hernandez MV, Sanmarti R, Rego I, Celis R, Moll C, Pinto JA, Blanco FJ, Lozano F. 2009. Influence of variants of Fc gamma receptors IIA and IIIA on the American College of Rheumatology and European League Against Rheumatism responses to anti-tumour necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 68:1547–1552.
- Capone M, Bryant JM, Sutkowski N, Haque A. 2016. Fc Receptor-Like Proteins in Pathophysiology of B-cell Disorder. *J Clin Cell Immunol*. 7.
- Cariappa A, Tang M, Parg C, Nebelitskiy E, Carroll M, Georgopoulos K, Pillai S. 2001. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity*. 14:603–615.
- Carroll MC, Prodeus AP. 1998. Linkages of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*. 10:36–40.
- Chan OT, Madaio MP, Shlomchik MJ. 1999. The central and multiple roles of B cells in lupus pathogenesis. *Immunol Rev*. 169:107–121.
- Chan VW, Meng F, Soriano P, DeFranco AL, Lowell CA. 1997. Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation. *Immunity*. 7:69–81.
- Chen J-Y, Wang CM, Ma C-C, Luo S-F, Edberg JC, Kimberly RP, Wu J. 2006. Association of a transmembrane polymorphism of Fcγ receptor IIb (FCGR2B) with systemic lupus erythematosus in Taiwanese patients. *Arthritis Rheum*. 54:3908–3917.
- Cherukuri A, Carter RH, Brooks S, Bornmann W, Finn R, Dowd CS, Pierce SK. 2004. B cell signaling is regulated by induced palmitoylation of CD81. *J Biol Chem*. 279:31973–31982.
- Choi J-Y, Ho JH, Pasoto SG, Bunin V, Kim ST, Carrasco S, Borba EF, Gonçalves CR, Costa PR, Kallas EG, et al. 2015. Circulating follicular helper-like T cells in systemic lupus

- erythematosus: association with disease activity. *Arthritis Rheumatol* Hoboken NJ. 67:988–999.
- Chu ZT, Tsuchiya N, Kyogoku C, Ohashi J, Qian YP, Xu SB, Mao CZ, Chu JY, Tokunaga K. 2004. Association of Fcγ receptor IIb polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Chinese: a common susceptibility gene in the Asian populations. *Tissue Antigens*. 63:21–27.
- Chung SA, Taylor KE, Graham RR, Nititham J, Lee AT, Ortmann WA, Jacob CO, Alarcon-Riquelme ME, Tsao BP, Harley JB, et al. 2011. Differential genetic associations for systemic lupus erythematosus based on anti-dsDNA autoantibody production. *PLoS Genet*. 7:e1001323.
- Clatworthy MR, Smith KGC. 2004. FcγRIIb balances efficient pathogen clearance and the cytokine-mediated consequences of sepsis. *J Exp Med*. 199:717–723.
- Clatworthy MR, Willcocks L, Urban B, Langhorne J, Williams TN, Peshu N, Watkins NA, Floto RA, Smith KGC. 2007. Systemic lupus erythematosus-associated defects in the inhibitory receptor FcγRIIb reduce susceptibility to malaria. *Proc Natl Acad Sci*. 104:7169–7174.
- Cohen-Solal JFG, Jeganathan V, Hill L, Kawabata D, Rodriguez-Pinto D, Grimaldi C, Diamond B. 2008. Hormonal regulation of B-cell function and systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 17:528–532.
- Coit P, Jeffries M, Altorok N, Dozmorov MG, Koelsch KA, Wren JD, Merrill JT, McCune WJ, Sawalha AH. 2013. Genome-wide DNA methylation study suggests epigenetic accessibility and transcriptional poising of interferon-regulated genes in naive CD4+ T cells from lupus patients. *J Autoimmun*. 43:78–84.
- Collongues N, Marignier R, Zéphir H, Papeix C, Blanc F, Ritleng C, Tchikviladzé M, Outteryck O, Vukusic S, Fleury M, et al. 2010. Neuromyelitis optica in France: a multicenter study of 125 patients. *Neurology*. 74:736–742.
- Contin-Bordes C, Lazaro E, Pellegrin J-L, Viallard J-F, Moreau J-F, Blanco P. 2009. [Systemic lupus erythematosus: from pathophysiology to treatment]. *Rev Médecine Interne Fondée Par Société Natl Française Médecine Interne*. 30:H9-13.
- Cornall RJ, Cyster JG, Hibbs ML, Dunn AR, Otipoby KL, Clark EA, Goodnow CC. 1998. Polygenic autoimmune traits: Lyn, CD22, and SHP-1 are limiting elements of a biochemical pathway regulating BCR signaling and selection. *Immunity*. 8:497–508.
- Cornec D, Tempescul A, Querellou S, Hutin P, Pers J-O, Jamin C, Bendaoud B, Berthou C, Renaudineau Y, Youinou P. 2012. Identification of patients with indolent B cell lymphoma sensitive to rituximab monotherapy. *Ann Hematol*. 91:715–721.
- Costa-Reis P, Sullivan KE. 2013. Genetics and epigenetics of systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep*. 15:369.
- Cui Y, Sheng Y, Zhang X. 2013. Genetic susceptibility to SLE: recent progress from GWAS. *J Autoimmun*. 41:25–33.
- Culton DA, Nicholas MW, Bunch DO, Zhen QL, Kepler TB, Dooley MA, Mohan C, Nachman PH, Clarke SH. 2006. Similar CD19 Dysregulation in Two Autoantibody-Associated Autoimmune Diseases Suggests a Shared Mechanism of B-Cell Tolerance Loss. *J Clin Immunol*. 27:53–68.
- Cunningham Graham DS, Morris DL, Bhangale TR, Criswell LA, Syvänen A-C, Rönnblom L, Behrens TW, Graham RR, Vyse TJ. 2011. Association of NCF2, IKZF1, IRF8, IFIH1, and TYK2 with systemic lupus erythematosus. *PLoS Genet*. 7:e1002341.
- Daëron M, Latour S, Malbec O, Espinosa E, Pina P, Pasmans S, Fridman WH. 1995. The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma RIIb, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity*. 3:635–646.

- D’Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GRV. 2007. Systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 369:587–596.
- Deapen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy-Burman P, Walker A, Mack TM. 1992. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 35:311–318.
- Deligny C, Thomas L, Dubreuil F, Théodose C, Garsaud AM, Numéric P, Ranlin A, Jean-Baptiste G, Arfi S. 2002. [Systemic lupus erythematosus in Martinique: an epidemiologic study]. *Rev Médecine Interne Fondée Par Société Natl Française Médecine Interne*. 23:21–29.
- Deng Y, Tsao BP. 2014. Advances in lupus genetics and epigenetics. *Curr Opin Rheumatol*. 26:482–492.
- Dieker JWC, van der Vlag J, Berden JHM. 2002. Triggers for anti-chromatin autoantibody production in SLE. *Lupus*. 11:856–864.
- Dijstelbloem HM, Bijl M, Fijnheer R, Scheepers RH, Oost WW, Jansen MD, Sluiter WJ, Limburg PC, Derksen RH, van de Winkel JG, Kallenberg CG. 2000. Fcγ receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus: association with disease and in vivo clearance of immune complexes. *Arthritis Rheum*. 43:2793–2800.
- Dong C, Ptacek TS, Redden DT, Zhang K, Brown EE, Edberg JC, McGwin G, Alarcón GS, Ramsey-Goldman R, Reveille JD, et al. 2014. Fcγ Receptor IIIa Single-Nucleotide Polymorphisms and Haplotypes Affect Human IgG Binding and Are Associated With Lupus Nephritis in African Americans. *Arthritis Rheumatol*. 66:1291–1299.
- Doreau A, Belot A, Bastid J, Riche B, Trescol-Biemont M-C, Ranchin B, Fabien N, Cochat P, Pouteil-Noble C, Trolliet P, et al. 2009. Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol*. 10:778–785.
- Dörner T, Jacobi AM, Lee J, Lipsky PE. 2011. Abnormalities of B cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol Methods*. 363:187–197.
- Dörner T, Jacobi AM, Lipsky PE. 2009. B cells in autoimmunity. *Arthritis Res Ther*. 11:247.
- Duits AJ, Bootsma H, Derksen RH, Spronk PE, Kater L, Kallenberg CG, Capel PJ, Westerdaal NA, Spierenburg GT, Gmelig-Meyling FH. 1995. Skewed distribution of IgG Fc receptor IIa (CD32) polymorphism is associated with renal disease in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum*. 38:1832–1836.
- Edberg JC, Langefeld CD, Wu J, Moser KL, Kaufman KM, Kelly J, Bansal V, Brown WM, Salmon JE, Rich SS, et al. 2002. Genetic linkage and association of Fcγ receptor IIIA (CD16A) on chromosome 1q23 with human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 46:2132–2140.
- El Shikh ME, El Sayed R, Szakal AK, Tew JG. 2006. Follicular dendritic cell (FDC)-FcγRIIB engagement via immune complexes induces the activated FDC phenotype associated with secondary follicle development. *Eur J Immunol*. 36:2715–2724.
- Engel P, Zhou LJ, Ord DC, Sato S, Koller B, Tedder TF. 1995. Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule. *Immunity*. 3:39–50.
- Enzler T, Bonizzi G, Silverman GJ, Otero DC, Widhopf GF, Anzelon-Mills A, Rickert RC, Karin M. 2006. Alternative and classical NF-κB signaling retain autoreactive B cells in the splenic marginal zone and result in lupus-like disease. *Immunity*. 25:403–415.
- Ernst LK, Winkel JG van de, Chiu IM, Anderson CL. 1992. Three genes for the human high affinity Fc receptor for IgG (Fc gamma RI) encode four distinct transcription products. *J Biol Chem*. 267:15692–15700.

- Fanger NA, Wardwell K, Shen L, Tedder TF, Guyre PM. 1996. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 157:541–548.
- Fearon DT. 2000. Innate immunity--beginning to fulfill its promise? *Nat Immunol*. 1:102–103.
- Feng F, Nyland J, Banyai M, Tatum A, Silverstone AE, Gavalchin J. 2010. The induction of the lupus phenotype by estrogen is via an estrogen receptor-alpha-dependent pathway. *Clin Immunol Orlando Fla*. 134:226–236.
- Floto RA, Clatworthy MR, Heilbronn KR, Rosner DR, MacAry PA, Rankin A, Lehner PJ, Ouwehand WH, Allen JM, Watkins NA, Smith KGC. 2005. Loss of function of a lupus-associated Fc gammaRIIb polymorphism through exclusion from lipid rafts. *Nat Med*. 11:1056–1058.
- Foss S, Watkinson R, Sandlie I, James LC, Andersen JT. 2015. TRIM21: a cytosolic Fc receptor with broad antibody isotype specificity. *Immunol Rev*. 268:328–339.
- Fossati G, Bucknall RC, Edwards SW. 2001. Fc gamma receptors in autoimmune diseases. *Eur J Clin Invest*. 31:821–831.
- Frerix M, Stegbauer J, Kreuter A, Weiner SM. 2014. Atherosclerotic plaques occur in absence of intima-media thickening in both systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus: a duplexsonography study of carotid and femoral arteries and follow-up for cardiovascular events. *Arthritis Res Ther*. 16:R54.
- Fukuyama H, Nimmerjahn F, Ravetch JV. 2005. The inhibitory Fc gamma receptor modulates autoimmunity by limiting the accumulation of immunoglobulin G+ anti-DNA plasma cells. *Nat Immunol*. 6:99–106.
- Gamberale R, Fernández-Calotti P, Sanjurjo J, Arrossagaray G, Avalos JS, Geffner J, Giordano M. 2005. Signaling capacity of Fc gammaRII isoforms in B-CLL cells. *Leuk Res*. 29:1277–1284.
- Gateva V, Sandling JK, Hom G, Taylor KE, Chung SA, Sun X, Ortmann W, Kosoy R, Ferreira RC, Nordmark G, et al. 2009. A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 41:1228–1233.
- Getahun A, Cambier JC. 2015. Of ITIMs, ITAMs, and ITAMis: revisiting immunoglobulin Fc receptor signaling. *Immunol Rev*. 268:66–73.
- Ghillani P, André C, Toly C, Rouquette AM, Bengoufa D, Nicaise P, Goulvestre C, Gleizes A, Dragon-Durey MA, Alyanakian MA, et al. 2011. Clinical significance of anti-Ro52 (TRIM21) antibodies non-associated with anti-SSA 60 kDa antibodies: Results of a multicentric study. *Autoimmun Rev*. 10:509–513.
- Gillis C, Gouel-Chéron A, Jönsson F, Bruhns P. 2014. Contribution of Human Fc gammaRs to Disease with Evidence from Human Polymorphisms and Transgenic Animal Studies. *Front Immunol*. 5:254.
- Gómez-Puerta JA, Feldman CH, Alarcón GS, Guan H, Winkelmayer WC, Costenbader KH. 2015. Racial and ethnic differences in mortality and cardiovascular events among patients with end-stage renal disease due to lupus nephritis. *Arthritis Care Res*. n/a-n/a.
- Gotkine M, Vaknin-Dembinsky A. 2012. Neurologic Manifestations of Systemic Immunopathological Diseases. *Curr Treat Options Neurol*. 14:276–292.
- Graham RR, Hom G, Ortmann W, Behrens TW. 2009. Review of recent genome-wide association scans in lupus. *J Intern Med*. 265:680–688.
- Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. 2011. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+CD27+CD43+CD70. *J Exp Med*.
- Grimaldi CM, Hicks R, Diamond B. 2005. B cell selection and susceptibility to autoimmunity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 174:1775–1781.

- Grönhagen CM, Nyberg F. 2014. Cutaneous lupus erythematosus: An update. *Indian Dermatol Online J.* 5:7–13.
- Guerra SG, Vyse TJ, Cunninghame Graham DS. 2012. The genetics of lupus: a functional perspective. *Arthritis Res Ther.* 14:211.
- Guerrier T. 2012. Rôle du TLR9 dans la maturation des lymphocytes B : implication dans la physiologie du syndrome de Gougerot-Sjögren [phdthesis] [Internet]. [place unknown]: Université de Bretagne occidentale - Brest; [cited 2016 Sep 30]. Available from: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00841375/document>
- Guilliams M, Bruhns P, Saeys Y, Hammad H, Lambrecht BN. 2014. The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol.* 14:94–108.
- Han J-W, Zheng H-F, Cui Y, Sun L-D, Ye D-Q, Hu Z, Xu J-H, Cai Z-M, Huang W, Zhao G-P, et al. 2009. Genome-wide association study in a Chinese Han population identifies nine new susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 41:1234–1237.
- Harley JB, Alarcon-Riquelme ME, Criswell LA, Jacob CO, Kimberly RP, Moser KL, Tsao BP, Vyse TJ, Langefeld CD, Nath SK, et al. 2008. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXX, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet.* 40:204–210.
- Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, Johnson LL, Swain SL, Lund FE. 2000. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol.* 1:475–482.
- Hartnell A, Kay AB, Wardlaw AJ. 1992. IFN-gamma induces expression of Fc gamma RIII (CD16) on human eosinophils. *J Immunol Baltim Md 1950.* 148:1471–1478.
- Harwood NE, Batista FD. 2008. New insights into the early molecular events underlying B cell activation. *Immunity.* 28:609–619.
- Hasegawa K, Hayashi T. 2003. Synthetic CpG oligodeoxynucleotides accelerate the development of lupus nephritis during preactive phase in NZB x NZWF1 mice. *Lupus.* 12:838–845.
- Haseley LA, Wisnieski JJ, Denburg MR, Michael-Grossman AR, Ginzler EM, Gourley MF, Hoffman JH, Kimberly RP, Salmon JE. 1997. Antibodies to C1q in systemic lupus erythematosus: characteristics and relation to Fc gamma RIIA alleles. *Kidney Int.* 52:1375–1380.
- Hatta Y, Tsuchiya N, Ohashi J, Matsushita M, Fujiwara K, Hagiwara K, Juji T, Tokunaga K. 1999. Association of Fc gamma receptor IIIB, but not of Fc gamma receptor IIA and IIIA polymorphisms with systemic lupus erythematosus in Japanese. *Genes Immun.* 1:53–60.
- van der Heijden J, Nagelkerke S, Zhao X, Geissler J, Rispens T, van den Berg TK, Kuijpers TW. 2014. Haplotypes of FcγRIIa and FcγRIIb polymorphic variants influence IgG-mediated responses in neutrophils. *J Immunol Baltim Md 1950.* 192:2715–2721.
- Hendriks JJA, Teunissen CE, de Vries HE, Dijkstra CD. 2005. Macrophages and neurodegeneration. *Brain Res Brain Res Rev.* 48:185–195.
- Hinson SR, Roemer SF, Lucchinetti CF, Fryer JP, Kryzer TJ, Chamberlain JL, Howe CL, Pittock SJ, Lennon VA. 2008. Aquaporin-4-binding autoantibodies in patients with neuromyelitis optica impair glutamate transport by down-regulating EAAT2. *J Exp Med.* 205:2473–2481.
- Hinson SR, Romero MF, Popescu BFG, Lucchinetti CF, Fryer JP, Wolburg H, Fallier-Becker P, Noell S, Lennon VA. 2012. Molecular outcomes of neuromyelitis optica (NMO)-IgG binding to aquaporin-4 in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:1245–1250.
- Hitomi Y, Adachi T, Tsuchiya N, Honda Z-I, Tokunaga K, Tsubata T. 2012. Human CD72 splicing isoform responsible for resistance to systemic lupus erythematosus regulates

- serum immunoglobulin level and is localized in endoplasmic reticulum. *BMC Immunol.* 13:72.
- Hitomi Y, Tsuchiya N, Kawasaki A, Ohashi J, Suzuki T, Kyogoku C, Fukazawa T, Bejrachandra S, Siriboonrit U, Chandanayingyong D, et al. 2004. CD72 polymorphisms associated with alternative splicing modify susceptibility to human systemic lupus erythematosus through epistatic interaction with FCGR2B. *Hum Mol Genet.* 13:2907–2917.
- Hogarth PM, Pietersz GA. 2012. Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 11:311–331.
- Honda Y, Otsuka A, Iga N, Kaku Y, Sakurai T, Miyachi Y, Kabashima K. 2015. Perifollicular elastolysis associated with pseudofolliculitis of Behçet's disease. *J Dermatol.* 42:1017–1018.
- Hong CH, Lee JS, Lee HS, Bae SC, Yoo DH. 2005. The association between fcgammaRIIIB polymorphisms and systemic lupus erythematosus in Korea. *Lupus.* 14:346–350.
- Hopkinson ND, Doherty M, Powell RJ. 1993. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Nottingham, UK, 1989–1990. *Br J Rheumatol.* 32:110–115.
- Horton HM, Chu SY, Ortiz EC, Pong E, Cemerski S, Leung IWL, Jacob N, Zalevsky J, Desjarlais JR, Stohl W, Szymkowski DE. 2011. Antibody-mediated coengagement of FcγRIIb and B cell receptor complex suppresses humoral immunity in systemic lupus erythematosus. *J Immunol Baltim Md 1950.* 186:4223–4233.
- Huntington ND, Xu Y, Puthalakath H, Light A, Willis SN, Strasser A, Tarlinton DM. 2006. CD45 links the B cell receptor with cell survival and is required for the persistence of germinal centers. *Nat Immunol.* 7:190–198.
- International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus Genetics (SLEGEN), Harley JB, Alarcón-Riquelme ME, Criswell LA, Jacob CO, Kimberly RP, Moser KL, Tsao BP, Vyse TJ, Langefeld CD, et al. 2008. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PTK, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet.* 40:204–210.
- Ivan E, Colovai AI. 2006. Human Fc receptors: critical targets in the treatment of autoimmune diseases and transplant rejections. *Hum Immunol.* 67:479–491.
- Iwata S, Tanaka Y. 2016. B-cell subsets, signaling and their roles in secretion of autoantibodies. *Lupus.* 25:850–856.
- Izui S, Kobayakawa T, Zryd MJ, Louis J, Lambert PH. 1977. Mechanism for induction of anti-DNA antibodies by bacterial lipopolysaccharides in mice; II. Correlation between anti-DNA induction and polyclonal antibody formation by various polyclonal B lymphocyte activators. *J Immunol Baltim Md 1950.* 119:2157–2162.
- Janko C, Munoz L, Chaurio R, Maueröder C, Berens C, Lauber K, Herrmann M. 2013. Navigation to the graveyard-induction of various pathways of necrosis and their classification by flow cytometry. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 1004:3–15.
- Jarius S, Paul F, Franciotta D, Aktas O, Hohlfeld R, Zipp F, Vincent A. 2007. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica--incorporation of NMO-IgG status. *Nat Clin Pract Neurol.* 3:E1.
- Järvinen TM, Hellquist A, Koskenmies S, Einarsdottir E, Koskinen LLE, Jeskanen L, Berglind L, Panelius J, Hasan T, Ranki A, et al. 2010. Tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 polymorphisms are associated with discoid and subacute cutaneous lupus erythematosus. *Exp Dermatol.* 19:123–131.
- Jasiak-Zatonska M, Kalinowska-Lyszczarz A, Michalak S, Kozubski W. 2016. The Immunology of Neuromyelitis Optica-Current Knowledge, Clinical Implications, Controversies and Future Perspectives. *Int J Mol Sci.* 17:273.

- Jiang N, Reich CF, Monestier M, Pisetsky DS. 2003. The expression of plasma nucleosomes in mice undergoing in vivo apoptosis. *Clin Immunol Orlando Fla.* 106:139–147.
- Jiang Y, Hirose S, Sanokawa-Akakura R, Abe M, Mi X, Li N, Miura Y, Shirai J, Zhang D, Hamano Y, Shirai T. 1999. Genetically determined aberrant down-regulation of FcγRIIB1 in germinal center B cells associated with hyper-IgG and IgG autoantibodies in murine systemic lupus erythematosus. *Int Immunol.* 11:1685–1691.
- Johnson AE, Gordon C, Palmer RG, Bacon PA. 1995. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth. *Arthritis Rheum.* 38:551–558.
- Jönsen A, Gunnarsson I, Gullstrand B, Svenungsson E, Bengtsson AA, Nived O, Lundberg IE, Truedsson L, Sturfelt G. 2007. Association between SLE nephritis and polymorphic variants of the CRP and FcγRIIIa genes. *Rheumatol Oxf Engl.* 46:1417–1421.
- Jovanovic V, Dai X, Lim YT, Kemeny DM, MacAry PA. 2009. Fc gamma receptor biology and systemic lupus erythematosus. *Int J Rheum Dis.* 12:293–298.
- Kaetzel CS. 2014. Coevolution of Mucosal Immunoglobulins and the Polymeric Immunoglobulin Receptor: Evidence That the Commensal Microbiota Provided the Driving Force. *Int Sch Res Not.* 2014:e541537.
- Kaminski DA, Wei C, Qian Y, Rosenberg AF, Sanz I. 2012. Advances in human B cell phenotypic profiling. *Front Immunol.* 3:302.
- Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. 2006. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science.* 313:670–673.
- Karassa FB, Bijl M, Davies KA, Kallenberg CGM, Khamashta MA, Manger K, Michel M, Piette J-C, Salmon JE, Song YW, et al. 2003. Role of the Fcγ receptor IIA polymorphism in the antiphospholipid syndrome: an international meta-analysis. *Arthritis Rheum.* 48:1930–1938.
- Karassa FB, Trikalinos TA, Ioannidis JPA, FcγRIIIa-SLE Meta-Analysis Investigators. 2002. Role of the Fcγ receptor IIA polymorphism in susceptibility to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a meta-analysis. *Arthritis Rheum.* 46:1563–1571.
- Katagiri T, Ogimoto M, Hasegawa K, Arimura Y, Mitomo K, Okada M, Clark MR, Mizuno K, Yakura H. 1999. CD45 negatively regulates lyn activity by dephosphorylating both positive and negative regulatory tyrosine residues in immature B cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 163:1321–1326.
- Kataoka TR, Kumanogoh A, Fukuishi N, Ueshima C, Hirata M, Moriyoshi K, Tsuruyama T, Haga H. 2015. CD72 negatively regulates mouse mast cell functions and down-regulates the expression of KIT and FcεRIα. *Int Immunol.* 27:95–103.
- Kawasaki A, Furukawa H, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Kusaoi M, Matsumoto I, Tohma S, Takasaki Y, Hashimoto H, et al. 2012. Association of PHRF1-IRF7 region polymorphism with clinical manifestations of systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Lupus.* 21:890–895.
- Khoder A, Sarvaria A, Alsuliman A, Chew C, Sekine T, Cooper N, Mielke S, Lavallade H de, Muftuoglu M, Curbelo IF, et al. 2014. Regulatory B cells are enriched within the IgM memory and transitional subsets in healthy donors but are deficient in chronic GVHD. *Blood.* 124:2034–2045.
- Kieseier BC, Storch MK, Archelos JJ, Martino G, Hartung HP. 1999. Effector pathways in immune mediated central nervous system demyelination. *Curr Opin Neurol.* 12:323–336.
- Kimura T, Sakamoto H, Appella E, Siraganian RP. 1997. The negative signaling molecule SH2 domain-containing inositol-polyphosphate 5-phosphatase (SHIP) binds to the

- tyrosine-phosphorylated beta subunit of the high affinity IgE receptor. *J Biol Chem.* 272:13991–13996.
- Kitley J, Woodhall M, Waters P, Leite MI, Devenney E, Craig J, Palace J, Vincent A. 2012. Myelin-oligodendrocyte glycoprotein antibodies in adults with a neuromyelitis optica phenotype. *Neurology.* 79:1273–1277.
- Klimovich VB. 2011. IgM and its receptors: structural and functional aspects. *Biochem Biokhimiia.* 76:534–549.
- Kobayashi T, Ito S, Yasuda K, Kuroda T, Yamamoto K, Sugita N, Tai H, Narita I, Gejyo F, Yoshie H. 2007. The combined genotypes of stimulatory and inhibitory Fc gamma receptors associated with systemic lupus erythematosus and periodontitis in Japanese adults. *J Periodontol.* 78:467–474.
- Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. 1997. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood.* 90:1109–1114.
- Koncz G, Pecht I, Gergely J, Sármay G. 1999. Fc gamma receptor-mediated inhibition of human B cell activation: the role of SHP-2 phosphatase. *Eur J Immunol.* 29:1980–1989.
- Kono H, Kyogoku C, Suzuki T, Tsuchiya N, Honda H, Yamamoto K, Tokunaga K, Honda Z-I. 2005. Fc gammaRIIB Ile232Thr transmembrane polymorphism associated with human systemic lupus erythematosus decreases affinity to lipid rafts and attenuates inhibitory effects on B cell receptor signaling. *Hum Mol Genet.* 14:2881–2892.
- Korganow A-S, Knapp A-M, Nehme-Schuster H, Soulas-Sprauel P, Poindron V, Pasquali J-L, Martin T. 2010. Peripheral B cell abnormalities in patients with systemic lupus erythematosus in quiescent phase: decreased memory B cells and membrane CD19 expression. *J Autoimmun.* 34:426–434.
- Kozyrev SV, Abelson A-K, Wojcik J, Zaghlool A, Linga Reddy MVP, Sanchez E, Gunnarsson I, Svenungsson E, Sturfelt G, Jönsen A, et al. 2008. Functional variants in the B-cell gene BANK1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 40:211–216.
- Kubagawa H, Carroll MC, Jacob CO, Lang KS, Lee K-H, Mak T, McAndrews M, Morse HC, Nolan GP, Ohno H, et al. 2015. Nomenclature of Toso, Fas apoptosis inhibitory molecule 3, and IgM FcR. *J Immunol Baltim Md 1950.* 194:4055–4057.
- Kuhn A, Landmann A. 2014. The classification and diagnosis of cutaneous lupus erythematosus. *J Autoimmun.* 48–49:14–19.
- Kumanogoh A, Watanabe C, Lee I, Wang X, Shi W, Araki H, Hirata H, Iwahori K, Uchida J, Yasui T, et al. 2000. Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling. *Immunity.* 13:621–631.
- Kuroki K, Tsuchiya N, Tsao BP, Grossman JM, Fukazawa T, Hagiwara K, Kano H, Takazoe M, Iwata T, Hashimoto H, Tokunaga K. 2002. Polymorphisms of human CD19 gene: possible association with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese. *Genes Immun.* 3 Suppl 1:S21–30.
- Kyogoku C, Dijstelbloem HM, Tsuchiya N, Hatta Y, Kato H, Yamaguchi A, Fukazawa T, Jansen MD, Hashimoto H, van de Winkel JGJ, et al. 2002. Fc gamma receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: Contribution of FCGR2B to genetic susceptibility. *Arthritis Rheum.* 46:1242–1254.
- Kyogoku C, Tsuchiya N, Wu H, Tsao BP, Tokunaga K. 2004. Association of Fc gamma receptor IIA, but not IIB and IIIA, polymorphisms with systemic lupus erythematosus: A family-based association study in Caucasians. *Arthritis Rheum.* 50:671–673.

- Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, Meller S, Chamilos G, Sebasigari R, Ricciari V, et al. 2011. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* 3:73ra19.
- Lassauniere R, Tiemessen CT. 2016. Variability at the FCGR locus: characterization in Black South Africans and evidence for ethnic variation in and out of Africa. *Genes Immun.* 17:93–104.
- Lau CS, Yin G, Mok MY. 2006. Ethnic and geographical differences in systemic lupus erythematosus: an overview. *Lupus.* 15:715–719.
- Lee HS, Chung YH, Kim TG, Kim TH, Jun JB, Jung S, Bae SC, Yoo DH. 2003. Independent association of HLA-DR and FCgamma receptor polymorphisms in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Oxf Engl.* 42:1501–1507.
- Lee H-S, Kim T, Bang SY, Na YJ, Kim I, Kim K, Kim J-H, Chung Y-J, Shin HD, Kang YM, et al. 2014. Ethnic specificity of lupus-associated loci identified in a genome-wide association study in Korean women. *Ann Rheum Dis.* 73:1240–1245.
- Lee J, Kuchen S, Fischer R, Chang S, Lipsky PE. 2009. Identification and characterization of a human CD5+ pre-naive B cell population. *J Immunol Baltim Md 1950.* 182:4116–4126.
- Lejeune J, Thibault G, Cartron G, Ohresser M, Watier H. 2010. [Implications of receptors for the Fc portion of IgG (FcgammaRs) in mechanism of action of therapeutic antibodies]. *Bull Cancer (Paris).* 97:511–522.
- Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. 2011. Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J Autoimmun.* 36:228–238.
- Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman AS, Hinson SR. 2005. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med.* 202:473–477.
- Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, Nakashima I, Weinshenker BG. 2004. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet Lond Engl.* 364:2106–2112.
- Lessard CJ, Li H, Adrianto I, Ice JA, Rasmussen A, Grundahl KM, Kelly JA, Dozmorov MG, Miceli-Richard C, Bowman S, et al. 2013. Variants at multiple loci implicated in both innate and adaptive immune responses are associated with Sjogren's syndrome. *Nat Genet.* 45:1284–1292.
- Li DH-H, Winslow MM, Cao TM, Chen AH, Davis CR, Mellins ED, Utz PJ, Crabtree GR, Parnes JR. 2008. Modulation of peripheral B cell tolerance by CD72 in a murine model. *Arthritis Rheum.* 58:3192–3204.
- Li FJ, Won WJ, Becker EJ, Easlick JL, Tabengwa EM, Li R, Shakhmatov M, Honjo K, Burrows PD, Davis RS. 2014. Emerging roles for the FCRL family members in lymphocyte biology and disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 382:29–50.
- Li X, Kimberly RP. 2014. Targeting the Fc receptor in autoimmune disease. *Expert Opin Ther Targets.* 18:335–350.
- Li X, Ptacek TS, Brown EE, Edberg JC. 2009. Fcgamma receptors: structure, function and role as genetic risk factors in SLE. *Genes Immun.* 10:380–389.
- Li X, Wu J, Carter RH, Edberg JC, Su K, Cooper GS, Kimberly RP. 2003. A novel polymorphism in the Fcgamma receptor IIB (CD32B) transmembrane region alters receptor signaling. *Arthritis Rheum.* 48:3242–3252.
- Linington C, Bradl M, Lassmann H, Brunner C, Vass K. 1988. Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am J Pathol.* 130:443–454.

- Liou SN, Solomou EE, Dimopoulos MA, Panayiotidis P, Mavrikakis MM, Sfikakis PP. 2001. B-cell kinase lyn deficiency in patients with systemic lupus erythematosus. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res.* 49:157–165.
- Littau R, Kurane I, Ennis FA. 1990. Human IgG Fc receptor II mediates antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Immunol Baltim Md 1950.* 144:3183–3186.
- Liu G, Tu D, Lewis M, Cheng D, Sullivan LA, Chen Z, Morgen E, Simes J, Price TJ, Tebbutt NC, et al. 2016. Fc-gamma Receptor Polymorphisms, Cetuximab Therapy, and Survival in the NCIC CTG CO.17 Trial of Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 22:2435–2444.
- Liu Q, Sasaki T, Kozieradzki I, Wakeham A, Itie A, Dumont DJ, Penninger JM. 1999. SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival. *Genes Dev.* 13:786–791.
- Liu W, Won Sohn H, Tolar P, Meckel T, Pierce SK. 2010. Antigen-induced oligomerization of the B cell receptor is an early target of Fc gamma RIIB inhibition. *J Immunol Baltim Md 1950.* 184:1977–1989.
- Loke H, Bethell D, Phuong CXT, Day N, White N, Farrar J, Hill A. 2002. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor IIa genes. *Am J Trop Med Hyg.* 67:102–106.
- Long Y, Zheng Y, Shan F, Chen M, Fan Y, Zhang B, Gao C, Gao Q, Yang N. 2014. Development of a cell-based assay for the detection of anti-aquaporin 1 antibodies in neuromyelitis optica spectrum disorders. *J Neuroimmunol.* 273:103–110.
- Lopes-Carvalho T, Kearney JF. 2004. Development and selection of marginal zone B cells. *Immunol Rev.* 197:192–205.
- Lund FE. 2008. Cytokine-producing B lymphocytes - key regulators of immunity. *Curr Opin Immunol.* 20:332–338.
- Mackay M, Stanevsky A, Wang T, Aranow C, Li M, Koenig S, Ravetch JV, Diamond B. 2006. Selective dysregulation of the Fc gamma RIIB receptor on memory B cells in SLE. *J Exp Med.* 203:2157–2164.
- Maeda A, Scharenberg AM, Tsukada S, Bolen JB, Kinet JP, Kurosaki T. 1999. Paired immunoglobulin-like receptor B (PIR-B) inhibits BCR-induced activation of Syk and Btk by SHP-1. *Oncogene.* 18:2291–2297.
- Magnusson V, Johanneson B, Lima G, Odeberg J, Alarcón-Segovia D, Alarcón-Riquelme ME, SLE Genetics Collaboration Group. 2004. Both risk alleles for Fc gamma RIIA and Fc gamma RIIIA are susceptibility factors for SLE: a unifying hypothesis. *Genes Immun.* 5:130–137.
- Magnusson V, Zunec R, Odeberg J, Sturfelt G, Truedsson L, Gunnarsson I, Alarcón-Riquelme ME. 2004. Polymorphisms of the Fc gamma receptor type IIB gene are not associated with systemic lupus erythematosus in the Swedish population. *Arthritis Rheum.* 50:1348–1350.
- Mahajan A, Herrmann M, Muñoz LE. 2016. Clearance Deficiency and Cell Death Pathways: A Model for the Pathogenesis of SLE. *Front Immunol.* 7:35.
- Manger K, Repp R, Jansen M, Geisselbrecht M, Wassmuth R, Westerdaal N a. C, Pfahlberg A, Manger B, Kalden JR, van de Winkel JGJ. 2002. Fc gamma receptor IIa, IIIa, and IIIb polymorphisms in German patients with systemic lupus erythematosus: association with clinical symptoms. *Ann Rheum Dis.* 61:786–792.
- Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, McCarthy MI, Ramos EM, Cardon LR, Chakravarti A, et al. 2009. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 461:747–753.

- Marignier R, Bernard-Valnet R, Giraudon P, Collongues N, Papeix C, Zéphir H, Cavillon G, Rogemond V, Casey R, Frangoulis B, et al. 2013. Aquaporin-4 antibody-negative neuromyelitis optica: distinct assay sensitivity-dependent entity. *Neurology*. 80:2194–2200.
- Mathian A, Arnaud L, Amoura Z. 2014. [Physiopathology of systemic lupus erythematosus: a 2014 update]. *Rev Médecine Interne Fondée Par Société Natl Francaise Médecine Interne*. 35:503–511.
- Matsuoka T, Matsushita T, Kawano Y, Osoegawa M, Ochi H, Ishizu T, Minohara M, Kikuchi H, Mihara F, Ohyagi Y, Kira J. 2007. Heterogeneity of aquaporin-4 autoimmunity and spinal cord lesions in multiple sclerosis in Japanese. *Brain J Neurol*. 130:1206–1223.
- Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. 2003. Prevention of Arthritis by Interleukin 10-producing B Cells. *J Exp Med*. 197:489–501.
- Maverakis E, Kim K, Shimoda M, Gershwin ME, Patel F, Wilken R, Raychaudhuri S, Ruhaak LR, Lebrilla CB. 2015. Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: a critical review. *J Autoimmun*. 57:1–13.
- McEwan WA, Mallery DL, Rhodes DA, Trowsdale J, James LC. 2011. Intracellular antibody-mediated immunity and the role of TRIM21. *BioEssays*. 33:803–809.
- Mealy MA, Wingerchuk DM, Greenberg BM, Levy M. 2012. Epidemiology of neuromyelitis optica in the United States: a multicenter analysis. *Arch Neurol*. 69:1176–1180.
- Mebius RE, Kraal G. 2005. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*. 5:606–616.
- Melamed E, Levy M, Waters PJ, Sato DK, Bennett JL, John GR, Hooper DC, Saiz A, Bar-Or A, Kim HJ, et al. 2015. Update on biomarkers in neuromyelitis optica. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2:e134.
- Meyer O. 2005. Lupus érythémateux systémique. *EMC - Rhumatol-Orthopédie*. 2:1–32.
- Minskoff SA, Matter K, Mellman I. 1998. Fc gamma RII-B1 regulates the presentation of B cell receptor-bound antigens. *J Immunol Baltim Md 1950*. 161:2079–2083.
- Mittoo S, Fell CD. 2014. Pulmonary manifestations of systemic lupus erythematosus. *Semin Respir Crit Care Med*. 35:249–254.
- Molokhia M, McKeigue PM, Cuadrado M, Hughes G. 2001. Systemic lupus erythematosus in migrants from west Africa compared with Afro-Caribbean people in the UK. *Lancet Lond Engl*. 357:1414–1415.
- Monteiro RC, Van De Winkel JGJ. 2003. IgA Fc receptors. *Annu Rev Immunol*. 21:177–204.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 19:683–765.
- Moser KL, Kelly JA, Lessard CJ, Harley JB. 2009. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun*. 10:373–379.
- Mukherjee O, Weingarten L, Padberg I, Pracht C, Sinha R, Hochdörfer T, Kuppig S, Backofen R, Reth M, Huber M. 2012. The SH2-domain of SHIP1 interacts with the SHIP1 C-terminus: impact on SHIP1/Ig- α interaction. *Biochim Biophys Acta*. 1823:206–214.
- Myhr KM, Raknes G, Nyland H, Vedeler C. 1999. Immunoglobulin G Fc-receptor (FcgammaR) IIA and IIIB polymorphisms related to disability in MS. *Neurology*. 52:1771–1776.
- Nadler MJ, Matthews SA, Turner H, Kinet JP. 2000. Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor Fc epsilon RI: coupling form to function. *Adv Immunol*. 76:325–355.
- Nagata S. 2010. Apoptosis and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 1209:10–16.

- Nakano S, Morimoto S, Suzuki J, Mitsuo A, Nakiri Y, Katagiri A, Nozawa K, Amano H, Tokano Y, Hashimoto H, Takasaki Y. 2007. Down-regulation of CD72 and increased surface IgG on B cells in patients with lupus nephritis. *Autoimmunity*. 40:9–15.
- Nescakova Z, Bystricky S. 2011. B cells - ontogenesis and immune memory development. *Gen Physiol Biophys*. 30:1–10.
- Nico MMS, Bologna SB, Lourenço SV. 2014. The lip in lupus erythematosus. *Clin Exp Dermatol*. 39:563–569.
- Niederer HA, Clatworthy MR, Willcocks LC, Smith KGC. 2010. FcγRIIB, FcγRIIIB, and systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci*. 1183:69–88.
- Nimmerjahn F, Gordan S, Lux A. 2015. FcγR dependent mechanisms of cytotoxic, agonistic, and neutralizing antibody activities. *Trends Immunol*. 36:325–336.
- Nimmerjahn F, Ravetch JV. 2006. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity*. 24:19–28.
- Nimmerjahn F, Ravetch JV. 2007. Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv Immunol*. 96:179–204.
- Nimmerjahn F, Ravetch JV. 2008. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 8:34–47.
- Niu Z, Zhang P, Tong Y. 2015. Value of HLA-DR genotype in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a meta-analysis. *Int J Rheum Dis*. 18:17–28.
- Nordang GBN, Viken MK, Amundsen SS, Sanchez ES, Flato B, Forre OT, Martin J, Kvien TK, Lie BA. 2012. Interferon regulatory factor 5 gene polymorphism confers risk to several rheumatic diseases and correlates with expression of alternative thymic transcripts. *Rheumatol Oxf Engl*. 51:619–626.
- Norsworthy P, Theodoridis E, Botto M, Athanassiou P, Beynon H, Gordon C, Isenberg D, Walport MJ, Davies KA. 1999. Overrepresentation of the Fcγ receptor type IIA R131/R131 genotype in caucasoid systemic lupus erythematosus patients with autoantibodies to C1q and glomerulonephritis. *Arthritis Rheum*. 42:1828–1832.
- Nossal GJ. 1987. Bone marrow pre-B cells and the clonal anergy theory of immunologic tolerance. *Int Rev Immunol*. 2:321–338.
- O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, Cook WJ, Weaver LK, Ahonen C, Lin L-L, Mantchev GT, Bram RJ, Noelle RJ. 2004. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med*. 199:91–98.
- Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, Feist E, Hiepe F, Burmester GR, Lipsky PE, Radbruch A, Dörner T. 2000. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol Baltim Md 1950*. 165:5970–5979.
- Okon LG, Werth VP. 2013. Cutaneous lupus erythematosus: diagnosis and treatment. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 27:391–404.
- Ono M, Bolland S, Tempst P, Ravetch JV. 1996. Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(γ)RIIB. *Nature*. 383:263–266.
- Ory PA, Clark MR, Kwoh EE, Clarkson SB, Goldstein IM. 1989. Sequences of complementary DNAs that encode the NA1 and NA2 forms of Fc receptor III on human neutrophils. *J Clin Invest*. 84:1688–1691.
- Pan C, Baumgarth N, Parnes JR. 1999. CD72-deficient mice reveal nonredundant roles of CD72 in B cell development and activation. *Immunity*. 11:495–506.
- Pan F, Tang X, Zhang K, Li X, Xu J, Chen H, Ye DQ. 2008. Genetic susceptibility and haplotype analysis between Fcγ receptor IIB and IIIA gene with systemic lupus erythematosus in Chinese population. *Lupus*. 17:733–738.
- Pan W, Zhu S, Yuan M, Cui H, Wang L, Luo X, Li J, Zhou H, Tang Y, Shen N. 2010. MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus

- CD4⁺ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1. *J Immunol Baltim Md 1950*. 184:6773–6781.
- Parks CG, Cooper GS, Nylander-French LA, Sanderson WT, Dement JM, Cohen PL, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS, et al. 2002. Occupational exposure to crystalline silica and risk of systemic lupus erythematosus: a population-based, case-control study in the southeastern United States. *Arthritis Rheum*. 46:1840–1850.
- Parnes JR, Pan C. 2000. CD72, a negative regulator of B-cell responsiveness. *Immunol Rev*. 176:75–85.
- Parren PW, Warmerdam PA, Boeije LC, Arts J, Westerdal NA, Vlug A, Capel PJ, Aarden LA, van de Winkel JG. 1992. On the interaction of IgG subclasses with the low affinity Fc gamma RIIa (CD32) on human monocytes, neutrophils, and platelets. Analysis of a functional polymorphism to human IgG2. *J Clin Invest*. 90:1537–1546.
- Pauls SD, Ray A, Hou S, Vaughan AT, Cragg MS, Marshall AJ. 2016. FcγRIIB-Independent Mechanisms Controlling Membrane Localization of the Inhibitory Phosphatase SHIP in Human B Cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 197:1587–1596.
- Paus D, Phan TG, Chan TD, Gardam S, Basten A, Brink R. 2006. Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J Exp Med*. 203:1081–1091.
- Peng Q, Malhotra S, Torchia JA, Kerr WG, Coggeshall KM, Humphrey MB. 2010. TREM2- and DAP12-dependent activation of PI3K requires DAP10 and is inhibited by SHIP1. *Sci Signal*. 3:ra38.
- Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. 2004. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol*. 22:929–979.
- Petri M, Orbai A-M, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, Bruce IN, Isenberg D, Wallace DJ, Nived O, et al. 2012. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 64:2677–2686.
- Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. 2013. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol*. 131:959–971.
- Pierson ER, Stromnes IM, Goverman JM. 2014. B Cells Promote Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Facilitating Reactivation of T Cells in the Central Nervous System. *J Immunol*. 192:929–939.
- Pincetic A, Bournazos S, DiLillo DJ, Maamary jad, Wang TT, Dahan R, Fiebiger B-M, Ravetch JV. 2014. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*.
- Pinilla-Ibarz J, Chavez JC, Sahakian E. 2013. Ibrutinib: an evidence-based review of its potential in the treatment of advanced chronic lymphocytic leukemia. *Core Evid*.:37.
- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, et al. 2011. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 69:292–302.
- Pritchard NR, Cutler AJ, Uribe S, Chadban SJ, Morley BJ, Smith KG. 2000. Autoimmune-prone mice share a promoter haplotype associated with reduced expression and function of the Fc receptor FcγRII. *Curr Biol CB*. 10:227–230.
- Pugh-Bernard AE, Cambier JC. 2006. B cell receptor signaling in human systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 18:451–455.
- Quan TE, Roman RM, Rudenga BJ, Holers VM, Craft JE. 2010. Epstein-Barr virus promotes interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Arthritis Rheum*. 62:1693–1701.
- Rahman A, Isenberg DA. 2008. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 358:929–939.

- Ramirez M, Quintana G, Diaz-Gallo LM, Caminos J, Garces M, Cepeda L, Rondon F, Restrepo JF, Egea E, Garavito G, et al. 2012. The PTPN22 C1858T variant as a risk factor for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus but not for systemic sclerosis in the Colombian population. *Clin Exp Rheumatol*. 30:520–524.
- Ratelade J, Zhang H, Saadoun S, Bennett JL, Papadopoulos MC, Verkman AS. 2012. Neuromyelitis optica IgG and natural killer cells produce NMO lesions in mice without myelin loss. *Acta Neuropathol (Berl)*. 123:861–872.
- Ravetch JV. 1997. Fc receptors. *Curr Opin Immunol*. 9:121–125.
- Ravetch JV, Bolland S. 2001. Igg Fc Receptors. *Annu Rev Immunol*. 19:275–290.
- Ravetch JV, Lanier LL. 2000. Immune inhibitory receptors. *Science*. 290:84–89.
- Ravetch JV, Perussia B. 1989. Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J Exp Med*. 170:481–497.
- Raychaudhuri S, Thomson BP, Remmers EF, Eyre S, Hinks A, Guiducci C, Catanese JJ, Xie G, Stahl EA, Chen R, et al. 2009. Genetic variants at CD28, PRDM1 and CD2/CD58 are associated with rheumatoid arthritis risk. *Nat Genet*. 41:1313–1318.
- Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Théry C, Rescigno M, Saito T, Verbeek S, Bonnerot C, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S. 1999. Fc gamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med*. 189:371–380.
- Robbie-Ryan M, Tanzola MB, Secor VH, Brown MA. 2003. Cutting edge: both activating and inhibitory Fc receptors expressed on mast cells regulate experimental allergic encephalomyelitis disease severity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 170:1630–1634.
- Rodríguez-Bayona B, Ramos-Amaya A, Pérez-Venegas JJ, Rodríguez C, Brieva JA. 2010. Decreased frequency and activated phenotype of blood CD27 IgD IgM B lymphocytes is a permanent abnormality in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Res Ther*. 12:R108.
- Rothstein TL, Griffin DO, Holodick NE, Quach TD, Kaku H. 2013. Human B-1 cells take the stage. Rose NR, editor. *Year Immunol*. 1285:97–114.
- Saadoun S, Waters P, Bell BA, Vincent A, Verkman AS, Papadopoulos MC. 2010. Intracerebral injection of neuromyelitis optica immunoglobulin G and human complement produces neuromyelitis optica lesions in mice. *Brain J Neurol*. 133:349–361.
- Saito T, Chiba S, Ichikawa M, Kunisato A, Asai T, Shimizu K, Yamaguchi T, Yamamoto G, Seo S, Kumano K, et al. 2003. Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity*. 18:675–685.
- Sakurai D, Zhao J, Deng Y, Kelly JA, Brown EE, Harley JB, Bae S-C, Alarcón-Riquelme ME, Edberg JC, Kimberly RP, et al. 2013. Preferential binding to Elk-1 by SLE-associated IL10 risk allele upregulates IL10 expression. *PLoS Genet*. 9:e1003870.
- Salmon JE, Edberg JC, Brogle NL, Kimberly RP. 1992. Allelic polymorphisms of human Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB. Independent mechanisms for differences in human phagocyte function. *J Clin Invest*. 89:1274–1281.
- Salmon JE, Edberg JC, Kimberly RP. 1990. Fc gamma receptor III on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities. *J Clin Invest*. 85:1287–1295.
- Salmon JE, Millard S, Schachter LA, Arnett FC, Ginzler EM, Gourley MF, Ramsey-Goldman R, Peterson MG, Kimberly RP. 1996. Fc gamma RIIA alleles are heritable risk factors for lupus nephritis in African Americans. *J Clin Invest*. 97:1348–1354.

- Sánchez-Mejorada G, Rosales C. 1998. Fcγ receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in monocytes is independent of Ras. *J Biol Chem.* 273:27610–27619.
- Sato A, Sato Y, Uchida S. 2001. Regulation of regional cerebral blood flow by cholinergic fibers originating in the basal forebrain. *Int J Dev Neurosci Off J Int Soc Dev Neurosci.* 19:327–337.
- Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Takehara K. 2000. Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J Immunol Baltim Md 1950.* 165:6635–6643.
- Sato S, Steeber DA, Jansen PJ, Tedder TF. 1997. CD19 expression levels regulate B lymphocyte development: human CD19 restores normal function in mice lacking endogenous CD19. *J Immunol Baltim Md 1950.* 158:4662–4669.
- Sato T, Ishikawa S, Akadegawa K, Ito T, Yurino H, Kitabatake M, Yoneyama H, Matsushima K. 2004. Aberrant B1 cell migration into the thymus results in activation of CD4 T cells through its potent antigen-presenting activity in the development of murine lupus. *Eur J Immunol.* 34:3346–3358.
- Schmidt RE, Gessner JE. 2005. Fc receptors and their interaction with complement in autoimmunity. *Immunol Lett.* 100:56–67.
- Schultz KR, Klarnet JP, Gieni RS, HayGlass KT, Greenberg PD. 1990. The role of B cells for in vivo T cell responses to a Friend virus-induced leukemia. *Science.* 249:921–923.
- Sellner J, Boggild M, Clanet M, Hintzen RQ, Illes Z, Montalban X, Du Pasquier RA, Polman CH, Sorensen PS, Hemmer B. 2010. EFNS guidelines on diagnosis and management of neuromyelitis optica. *Eur J Neurol.* 17:1019–1032.
- Seshan SV, Jennette JC. 2009. Renal Disease in Systemic Lupus Erythematosus With Emphasis on Classification of Lupus Glomerulonephritis: Advances and Implications. *Arch Pathol Lab Med.* 133:233–248.
- de Sèze J, Kremer L, Collongues N. 2016. Neuromyelitis optica spectrum disorder (NMOSD): A new concept. *Rev Neurol (Paris).* 172:256–262.
- Shen N, Liang D, Tang Y, de Vries N, Tak P-P. 2012. MicroRNAs--novel regulators of systemic lupus erythematosus pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol.* 8:701–709.
- Shlomchik MJ, Craft JE, Mamula MJ. 2001. From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol.* 1:147–153.
- Silverman GJ, Srikrishnan R, Germar K, Goodyear CS, Andrews KA, Ginzler EM, Tsao BP. 2008. Genetic imprinting of autoantibody repertoires in systemic lupus erythematosus patients. *Clin Exp Immunol.* 153:102–116.
- Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. 2005. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood.* 105:4390–4398.
- Siriboonrit U, Tsuchiya N, Sirikong M, Kyogoku C, Bejrachandra S, Suthipinittharm P, Luangtrakool K, Srinak D, Thongpradit R, Fujiwara K, et al. 2003. Association of Fcγ receptor IIb and IIIb polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. *Tissue Antigens.* 61:374–383.
- Slupsky JR. 2014. Does B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukaemia cells differ from that in other B cell types? *Scientifica.* 2014:208928.
- Smith KGC, Clatworthy MR. 2010. FcγRIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nat Rev Immunol.* 10:328–343.
- Sterner RM, Hartono SP, Grande JP. 2014. The Pathogenesis of Lupus Nephritis. *J Clin Cell Immunol.* 5.
- Storch MK, Piddlesden S, Haltia M, Iivanainen M, Morgan P, Lassmann H. 1998. Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Ann Neurol.* 43:465–471.

- Storoni M, Petzold A, Plant GT. 2011. The use of serum glial fibrillary acidic protein measurements in the diagnosis of neuromyelitis optica spectrum optic neuritis. *PLoS One*. 6:e23489.
- Strzelecka A, Kwiatkowska K, Sobota A. 1997. Tyrosine phosphorylation and Fcγ receptor-mediated phagocytosis. *FEBS Lett*. 400:11–14.
- Su K, Li X, Edberg JC, Wu J, Ferguson P, Kimberly RP. 2004. A Promoter Haplotype of the Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif-Bearing FcγRIIb Alters Receptor Expression and Associates with Autoimmunity. II. Differential Binding of GATA4 and Yin-Yang1 Transcription Factors and Correlated Receptor Expression and Function. *J Immunol*. 172:7192–7199.
- Su K, Wu J, Edberg JC, McKenzie SE, Kimberly RP. 2002. Genomic organization of classical human low-affinity Fcγ receptor genes. *Genes Immun*. 3 Suppl 1:S51–56.
- Su K, Yang H, Li X, Li X, Gibson AW, Cafardi JM, Zhou T, Edberg JC, Kimberly RP. 2007. Expression profile of FcγRIIb on leukocytes and its dysregulation in systemic lupus erythematosus. *J Immunol Baltim Md 1950*. 178:3272–3280.
- Subbarao B, Morris J, Baluyut AR. 1988. Properties of anti-Lyb-2-mediated B-cell activation and the relationship between Lyb-2 molecules and receptors for B-cell stimulatory factor-1 on murine B lymphocytes. *Cell Immunol*. 112:329–342.
- Subbarao B, Mosier DE. 1983. Induction of B lymphocyte proliferation by monoclonal anti-Lyb 2 antibody. *J Immunol Baltim Md 1950*. 130:2033–2037.
- Suryani S, Fulcher DA, Santner-Nanan B, Nanan R, Wong M, Shaw PJ, Gibson J, Williams A, Tangye SG. 2010. Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells. *Blood*. 115:519–529.
- Sutterwala FS, Noel GJ, Clynes R, Mosser DM. 1997. Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J Exp Med*. 185:1977–1985.
- 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*. 32:428–444.
- Takai T. 2002. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2:580–592.
- Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, Yuan M, Guo Y, Huang X, Zhou H, de Vries N, Tak PP, et al. 2009. MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum*. 60:1065–1075.
- Tanguay D, Pavlovic S, Piatelli MJ, Bartek J, Chiles TC. 1999. B cell antigen receptor-mediated activation of cyclin-dependent retinoblastoma protein kinases and inhibition by co-cross-linking with Fc gamma receptors. *J Immunol Baltim Md 1950*. 163:3160–3168.
- Tanigaki K, Sundgren N, Khera A, Vongpatanasin W, Mineo C, Shaul PW. 2015. Fcγ Receptors and Ligands and Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 116:368–384.
- Taniuchi S, Masuda M, Teraguchi M, Ikemoto Y, Komiyama Y, Takahashi H, Kino M, Kobayashi Y. 2005. Polymorphism of Fc gamma RIIa may affect the efficacy of gamma-globulin therapy in Kawasaki disease. *J Clin Immunol*. 25:309–313.
- Tao J-H, Zou Y-F, Feng X-L, Li J, Wang F, Pan F-M, Ye D-Q. 2011. Meta-analysis of TYK2 gene polymorphisms association with susceptibility to autoimmune and inflammatory diseases. *Mol Biol Rep*. 38:4663–4672.
- Tari AM, Lopez-Berestein G. 2001. GRB2: a pivotal protein in signal transduction. *Semin Oncol*. 28:142–147.
- Taylor KE, Chung SA, Graham RR, Ortmann WA, Lee AT, Langefeld CD, Jacob CO, Kamboh MI, Alarcon-Riquelme ME, Tsao BP, et al. 2011. Risk alleles for systemic

- lupus erythematosus in a large case-control collection and associations with clinical subphenotypes. *PLoS Genet.* 7:e1001311.
- Tenbrock K, Juang Y-T, Kyttaris VC, Tsokos GC. 2007. Altered signal transduction in SLE T cells. *Rheumatol Oxf Engl.* 46:1525–1530.
- Tiller T, Kofer J, Kreschel C, Busse CE, Riebel S, Wickert S, Oden F, Mertes MMM, Ehlers M, Wardemann H. 2010. Development of self-reactive germinal center B cells and plasma cells in autoimmune Fc gammaRIIB-deficient mice. *J Exp Med.* 207:2767–2778.
- Tobon GJ, Izquierdo JH, canas CA. 2013. B Lymphocytes: Development, Tolerance, and Their Role in Autoimmunity—Focus on Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmun Dis.*:17.
- Tomana M, Schrohenloher RE, Koopman WJ, Alarcón GS, Paul WA. 1988. Abnormal glycosylation of serum IgG from patients with chronic inflammatory diseases. *Arthritis Rheum.* 31:333–338.
- Tracey L, Aggarwal M, García-Cosío M, Villuendas R, Algara P, Sánchez-Beato M, Sánchez-Aguilera A, García JF, Rodríguez A, Camacho FI, et al. 2008. Somatic hypermutation signature in B-cell low-grade lymphomas. *Haematologica.* 93:1186–1194.
- Tridandapani S, Kelley T, Pradhan M, Cooney D, Justement LB, Coggeshall KM. 1997. Recruitment and phosphorylation of SH2-containing inositol phosphatase and Shc to the B-cell Fc gamma immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif peptide motif. *Mol Cell Biol.* 17:4305–4311.
- Tsuchiya N, Kyogoku C. 2005. Role of Fc gamma receptor IIb polymorphism in the genetic background of systemic lupus erythematosus: insights from Asia. *Autoimmunity.* 38:347–352.
- Tutuncu Z, Kavanaugh A, Zvaifler N, Corr M, Deutsch R, Boyle D. 2005. Fc gamma receptor type IIIA polymorphisms influence treatment outcomes in patients with inflammatory arthritis treated with tumor necrosis factor alpha-blocking agents. *Arthritis Rheum.* 52:2693–2696.
- Tüzün E, Tzartos J, Ekizoğlu E, Stergiou C, Zisimopoulou P, Coban A, Shugaiv E, Türkoğlu R, Kürtüncü M, Baykan B, Tzartos S. 2014. Aquaporin-1 antibody in neuromyelitis optical patients. *Eur Neurol.* 72:271–272.
- Tzartos JS, Stergiou C, Kilidireas K, Zisimopoulou P, Thomaidis T, Tzartos SJ. 2013. Anti-aquaporin-1 autoantibodies in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders. *PloS One.* 8:e74773.
- Tzeng S-J, Bolland S, Inabe K, Kurosaki T, Pierce SK. 2005. The B cell inhibitory Fc receptor triggers apoptosis by a novel c-Abl family kinase-dependent pathway. *J Biol Chem.* 280:35247–35254.
- Tzeng S-J, Li W-Y, Wang H-Y. 2015. FcγRIIB mediates antigen-independent inhibition on human B lymphocytes through Btk and p38 MAPK. *J Biomed Sci.* 22:87.
- Uderhardt S, Herrmann M, Oskolkova OV, Aschermann S, Bicker W, Ipseiz N, Sarter K, Frey B, Rothe T, Voll R, et al. 2012. 12/15-lipoxygenase orchestrates the clearance of apoptotic cells and maintains immunologic tolerance. *Immunity.* 36:834–846.
- Ulvestad E, Williams K, Bjerkvig R, Tiekotter K, Antel J, Matre R. 1994. Human microglial cells have phenotypic and functional characteristics in common with both macrophages and dendritic antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol.* 56:732–740.
- Vadacca M, Buzzulini F, Rigon A, Coppolino G, Palma Modoni A, Massa R, Afeltra A. 2006. [Neuropsychiatric lupus erythematosus]. *Reumatismo.* 58:177–186.
- Vadasz Z, Haj T, Balbir A, Peri R, Rosner I, Slobodin G, Kessel A, Toubi E. 2014. A regulatory role for CD72 expression on B cells in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum.* 43:767–771.

- van de Winkel JGJ. 2010. Fc receptors: role in biology and antibody therapy. *Immunol Lett.* 128:4–5.
- Van Den Herik-Oudijk IE, Westerdaal NA, Henriquez NV, Capel PJ, Van De Winkel JG. 1994. Functional analysis of human Fc gamma RII (CD32) isoforms expressed in B lymphocytes. *J Immunol Baltim Md 1950.* 152:574–585.
- Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orru V, Zavattari P, Nika K, Tautz L, Tasken K, Cucca F, et al. 2005. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet.* 37:1317–1319.
- Varrin-Doyer M, Spencer CM, Schulze-Topphoff U, Nelson PA, Stroud RM, Cree BAC, Zamvil SS. 2012. Aquaporin 4-specific T cells in neuromyelitis optica exhibit a Th17 bias and recognize Clostridium ABC transporter. *Ann Neurol.* 72:53–64.
- Viau M, Zouali M. 2005. B-lymphocytes, innate immunity, and autoimmunity. *Clin Immunol Orlando Fla.* 114:17–26.
- Vigato-Ferreira ICC, Toller-Kawahisa JE, Pancoto JAT, Mendes-Junior CT, Martinez EZ, Donadi EA, Louzada-Júnior P, Del Lama JEC, Marzocchi-Machado CM. 2014. FcγRIIIa and FcγRIIIb polymorphisms and associations with clinical manifestations in systemic lupus erythematosus patients. *Autoimmunity.* 47:451–458.
- Viglianti GA, Lau CM, Hanley TM, Miko BA, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. 2003. Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity.* 19:837–847.
- von Boehmer H, Melchers F. 2010. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nat Immunol.* 11:14–20.
- Waisberg M, Tarasenko T, Vickers BK, Scott BL, Willcocks LC, Molina-Cruz A, Pierce MA, Huang C, Torres-Velez FJ, Smith KGC, et al. 2011. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus protects against cerebral malaria in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 108:1122–1127.
- Wang HH, Dai YQ, Qiu W, Lu ZQ, Peng FH, Wang YG, Bao J, Li Y, Hu XQ. 2011. Interleukin-17-secreting T cells in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse. *J Clin Neurosci Off J Neurosurg Soc Australas.* 18:1313–1317.
- Wang Y, Tian Z, Thirumalai D, Zhang X. 2014. Neonatal Fc receptor (FcRn): a novel target for therapeutic antibodies and antibody engineering. *J Drug Target.* 22:269–278.
- Warmerdam PA, van de Winkel JG, Vlug A, Westerdaal NA, Capel PJ. 1991. A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma receptor II is critical for human IgG2 binding. *J Immunol.* 147:1338–1343.
- Weller S, Reynaud C-A, Weill J-C. 2005. Splenic marginal zone B cells in humans: where do they mutate their Ig receptor? *Eur J Immunol.* 35:2789–2792.
- Willcocks LC, Carr EJ, Niederer HA, Rayner TF, Williams TN, Yang W, Scott JAG, Urban BC, Peshu N, Vyse TJ, et al. 2010. A defunctioning polymorphism in FCGR2B is associated with protection against malaria but susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:7881–7885.
- Wilson HA, Winfield JB, Lahita RG, Koffler D. 1979. Association of IgG anti-brain antibodies with central nervous system dysfunction in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 22:458–462.
- Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, Cabre P, Carroll W, Chitnis T, de Seze J, Fujihara K, Greenberg B, Jacob A, et al. 2015. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology.* 85:177–189.
- Wingerchuk DM, Hogancamp WF, O'Brien PC, Weinshenker BG. 1999. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology.* 53:1107–1114.
- Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, Pittock SJ, Weinshenker BG. 2007. The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol.* 6:805–815.

- Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. 2006. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology*. 66:1485–1489.
- Wither JE, Roy V, Brennan LA. 2000. Activated B cells express increased levels of costimulatory molecules in young autoimmune NZB and (NZB x NZW)F(1) mice. *Clin Immunol Orlando Fla*. 94:51–63.
- Wu H-J, Bondada S. 2002. Positive and negative roles of CD72 in B cell function. *Immunol Res*. 25:155–166.
- Wu H-J, Bondada S. 2009. CD72, a coreceptor with both positive and negative effects on B lymphocyte development and function. *J Clin Immunol*. 29:12–21.
- Wu J, Edberg JC, Redecha PB, Bansal V, Guyre PM, Coleman K, Salmon JE, Kimberly RP. 1997. A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest*. 100:1059–1070.
- Xiang Z, Cutler AJ, Brownlie RJ, Fairfax K, Lawlor KE, Severinson E, Walker EU, Manz RA, Tarlinton DM, Smith KGC. 2007. FcγRIIb controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. *Nat Immunol*. 8:419–429.
- Xu L, Li G, Wang J, Fan Y, Wan Z, Zhang S, Shaheen S, Li J, Wang L, Yue C, et al. 2014. Through an ITIM-independent mechanism the FcγRIIB blocks B cell activation by disrupting the colocalized microclustering of the B cell receptor and CD19. *J Immunol Baltim Md 1950*. 192:5179–5191.
- Xu Y, Harder KW, Huntington ND, Hibbs ML, Tarlinton DM. 2005. Lyn tyrosine kinase: accentuating the positive and the negative. *Immunity*. 22:9–18.
- Yada A, Ebihara S, Matsumura K, Endo S, Maeda T, Nakamura A, Akiyama K, Aiba S, Takai T. 2003. Accelerated antigen presentation and elicitation of humoral response in vivo by FcγRIIB- and FcγRI/III-mediated immune complex uptake. *Cell Immunol*. 225:21–32.
- Yamazaki T, Nagumo H, Hayashi T, Sugane K, Agematsu K. 2005. CD72-mediated suppression of human naive B cell differentiation by down-regulating X-box binding protein 1. *Eur J Immunol*. 35:2325–2334.
- Yan J, Harvey BP, Gee RJ, Shlomchik MJ, Mamula MJ. 2006. B cells drive early T cell autoimmunity in vivo prior to dendritic cell-mediated autoantigen presentation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 177:4481–4487.
- Yap SN, Phipps ME, Manivasagar M, Tan SY, Bosco JJ. 1999. Human Fc gamma receptor IIA (FcγRIIA) genotyping and association with systemic lupus erythematosus (SLE) in Chinese and Malays in Malaysia. *Lupus*. 8:305–310.
- Yasutomo K, Horiuchi T, Kagami S, Tsukamoto H, Hashimura C, Urushihara M, Kuroda Y. 2001. Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 28:313–314.
- Youinou P. 2007. B cell conducts the lymphocyte orchestra. *J Autoimmun*. 28:143–151.
- Yu C, Gershwin ME, Chang C. 2014. Diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus: a critical review. *J Autoimmun*. 48–49:10–13.
- Yuasa T, Isono T, Tooyama I, Seto A. 1999. Overproduction of gamma interferon in B/Jas inbred rabbits with herpes simplex virus encephalitis. *Microbiol Immunol*. 43:365–371.
- Yun HR, Koh HK, Kim SS, Chung WT, Kim DW, Hong KP, Song GG, Chang HK, Choe JY, Bae SC, et al. 2001. FcγRIIa/IIIa polymorphism and its association with clinical manifestations in Korean lupus patients. *Lupus*. 10:466–472.
- Zeng D, Lee MK, Tung J, Brendolan A, Strober S. 2000. Cutting edge: a role for CD1 in the pathogenesis of lupus in NZB/NZW mice. *J Immunol Baltim Md 1950*. 164:5000–5004.
- Zhang X. 2013. Regulatory functions of innate-like B cells. *Cell Mol Immunol*. 10:113–121.

- Zhang Z, Song L, Maurer K, Petri MA, Sullivan KE. 2010. Global H4 acetylation analysis by ChIP-chip in systemic lupus erythematosus monocytes. *Genes Immun.* 11:124–133.
- Zheng J, Yin J, Huang R, Petersen F, Yu X. 2013. Meta-analysis reveals an association of STAT4 polymorphisms with systemic autoimmune disorders and anti-dsDNA antibody. *Hum Immunol.* 74:986–992.
- Zheng M, Xing C, Xiao H, Ma N, Wang X, Han G, Chen G, Hou C, Shen B, Li Y, Wang R. 2014. Interaction of CD5 and CD72 is involved in regulatory T and B cell homeostasis. *Immunol Invest.* 43:705–716.
- Zhou X-J, Lv J-C, Yu L, Cui Z, Zhao J, Yang R, Han J, Hou P, Zhao M-H, Zhang H. 2010. FCGR2B gene polymorphism rather than FCGR2A, FCGR3A and FCGR3B is associated with anti-GBM disease in Chinese. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 25:97–101.
- Zotos D, Tarlinton DM. 2012. Determining germinal centre B cell fate. *Trends Immunol.* 33:281–288.
- Zubair A, Frieri M. 2013. Lupus nephritis: review of the literature. *Curr Allergy Asthma Rep.* 13:580–586.

ANNEXES

Article 1: Polymorphisms at
the FCGR locus in the
population of black ancestry
in Martinique, a Windward
Island of the Caribbean

1 **Polymorphisms at the FCGR locus in the African-Caribbean population**
2 **Martinique, a Windward Island of the Caribbean.**

3

4 **Fatima-Ezzahra RADOUANI¹, Maryvonne DUEYMES², Christophe Deligny³, Raymond**
5 **CESAIRE^{4,5} and Georges DOS SANTOS^{4,5,*}**

6 ¹ Laboratoire d'immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Martinique, Fort de France,
7 Martinique.

8 ² Laboratoire d'immunologie, Centre Hospitalier Andrée ROSEMON, Cayenne, Guyane.

9 ³ Service de Médecine interne, Centre Hospitalier Universitaire de Martinique, Fort de France,
10 Martinique.

11 ⁴EA 4537 “ Maladies Infectieuses et tropicales dans la Caraïbe“ Université des Antilles. Centre
12 Hospitalier Universitaire de Martinique, Fort de France, Martinique.

13 ⁵ Laboratoire de virologie, Centre Hospitalier Universitaire de Martinique, Fort de France,
14 Martinique.

15 *Corresponding author

16 E-mail: georges.dos-santos@chu-fortdefrance.fr (GDS)

17

18 Funding: This work was supported by “FEDER-UE-CR Martinique”

19 Abstract

20 This study investigates the functional variants in African-Caribbean individuals from
21 Martinique, a Windward Island of the Caribbean.

22

23 Introduction

24 The low-affinity receptors for the Fc portion of IgG, FcγRII (CD32) and FcγRIII (CD16)
25 provide a critical link between humoral and cellular immunity. They are important in multiple
26 biological processes, including clearance of immune complexes, antibody-dependent cellular
27 cytotoxicity (ADCC), antigen presentation, phagocytosis, regulation of antibody production
28 and activation of inflammatory cells. Functionally, FcγRs are divided into activating or
29 inhibitory receptor depending in the presence of either an immunoreceptor tyrosine-based
30 activating or inhibitory motif in the cytoplasmic domain of receptor itself or associated
31 signaling subunits (1). Co-engagement of the only inhibitory FcγRIIb (2,3) and activating
32 receptors maintains a threshold of cell activation, regulating response, such as phagocytosis,
33 ADCC and release the inflammatory mediators (4,5, 6).

34 Genes encoding the FcγRII and FcγRIII low-affinity receptors families (1) are located at the
35 human 1q23.3 locus. This locus contains five FCGR genes (FCGR2A, FCGR2B, FCGR2C,
36 FCGR3A and FCGR3B). Unlike FcγRII2b, FcγRII2a, 3a and 3b mediate activation signals and
37 phagocytosis in cell lineages such as neutrophils, monocytes and natural killer (NK) cells. All
38 FCGR genes have functional polymorphisms associated with decrease of the surface density of
39 receptor or with alteration of receptor function. In FCGR2A gene a non-synonymous
40 substitution (519G>A, rs1801274) leads to an arginine to histidine change at position 131 (2).
41 FcγRIIa-131H has an increased affinity to human IgG1 and IgG2 (3), a different immune
42 response. In FCGR2B gene, a variant in transcriptional regulatory region, the rs3219018
43 induces G>C substitution at - 386 nucleotide, alters transcriptional activity and leads to
44 decrease in surface expression of FcγRIIb (4,5). In addition, an impairment of the inhibitory
45 function of FcγRIIb due to the conversion of an isoleucine to threonine in the transmembrane
46 domain substitution (FCGR2B-232T, rs 1050501) has been described (6). This impairment of
47 inhibitory function is due to the exclusion of the threonine form of the receptor to partition to
48 lipid raft (6,7). FcγRIII exists in two alternative membrane forms, which result from cell type
49 specific expression of the two genes (8). FcγRIIIa is expressed on the surface of NK cells,
50 monocytes and macrophages and binds to IgG1 and IgG3 subclasses. FcγRIIIa has co-
51 dominantly expressed alleles that affect receptor affinity for ligand. FCGR3A rs3991 is a
52 missense mutation leading to a valine substitution for phenylalanine at amino acid residue 158.
53 The FcγRIIIa-158V form displays higher affinity for IgG1 and IgG3 relative to the
54 FcγRIIIa158F one and is also capable of binding IgG4, while the FcγRIIIa-158F form is not
55 (9). NK cells from FcγRIIIa-158 V homozygous donors exhibit increased calcium influx, and
56 faster apoptosis than those cells from FcγRIIIa-158F homozygous donors (10).

57 The FcγRIIIb mainly expressed on neutrophils has two serologically defined alleles known as
58 NA1 and NA2. The homozygous FcγRIIIb-NA1 has been shown to exhibit a higher phagocytic
59 capacity because it is more efficient in binding immune complexes containing IgG1 and IgG3
60 than homozygous FcγRIIIb-NA2 (11).

61 The Caribbean region has a complex history of population exchange with the African continent
62 as a result of slave trade practices during European colonialism. The population of Martinique
63 (386486, January 2013) is descended from enslaved Africans, mostly but not only introduced
64 from the northern coast of the gulf of Guinea, mixed with some Caucasian mostly of French
65 ancestry, and more recently with Asian and Indians populations (12).

66 A constant finding across studies is the proportion of African ancestry being higher in
67 Caribbean populations compared to those from the America mainland (13). The differences
68 between insular and continental populations of African ancestry underscore the importance of
69 characterizing admixed populations at finer scales and more specifically to investigate relative
70 proportion of deleterious mutations and allele frequencies in order to check if medically
71 relevant genetic variants are geographically restricted. Martinique is a region with an
72 unexplained high autoimmune disease occurrence (14) so as a first step our study explores the
73 distribution of variant alleles of members of the low-affinity FcγRs family, including FcγRIIa-
74 H131R (rs 1801274), FcγRIIb-I232T (rs 1050501), -386G>C (rs 3219018), FcγRIIIa-F158V
75 (rs396991) and FcγRIIIb-NA1:NA2 in a population of 120 unrelated healthy African-
76 Caribbean (AC) from Martinique. This study is the first extensive characterization of variability
77 at the low-affinity FCGR locus in a population of African ancestry living in a Caribbean Island.

78 RESULTS

Table 1 : Distribution of FcGR genotypes in African-Caribbean from Martinique

	FCGR2A		FCGR2B		FCGR3A		FCGR3B	
n=120								
	131 RR	35 (29.2)	232II	75 (62.2)	158FF	38 (31.7)	NA1:NA1	17 (14.2)
	131 HR	60 (50)	232IT	24 (20.2)	158FV	35 (29.2)	NA1:NA2	87 (72.5)
	131 HH	25 (21.8)	232TT	21 (17.6)	158VV	47 (39.1)	NA2:NA2	14 (11.7)
χ^2		0.01		29.81		20.05		26.68
HWE		P>0.90		P<0.001		P<0.001		P<0.001

Numbers in the parentheses indicate the percentage..

79

80 A cohort of 120 AC individuals from Martinique was recruited to explore the genotype, allele
81 and allele carrier distributions of the FCGR2A FCGR2B, FCGR3A and FCGR3B genes. With
82 exception of the FCGR2A gene the distributions in our cohort were not consistent with Hardy-
83 Weinberg equilibrium (Table1).

84

85 Comparisons of the distributions observed on our cohort were compared to those established in
86 other populations worldwide in Tables 2, 3, 4 and 5. The first row of each table shows the
87 results for AC from Martinique and the others rows are data established in African descent,
88 African, Asian and Caucasians populations in previous studies.

89 Table 2 shows the distribution of the FCGR2A SNP, rs1801274, encoding R131H among 120
90 AC. With 29.2% of individuals homozygous for FCGR2A-131R, 21% homozygous for
91 FCGR2A-131H and 50% heterozygous When we compared the distribution in AC there was no
92 significant differences in genotype, allele and allele carrier frequencies with black and
93 caucasian populations. All these populations evidenced significantly lower levels of SNP
94 rs1801274 than Asian populations

95 .

Table 2: Genotype and allele frequencies of FCGR2A gene in healthy individuals from black, asian and caucasian populations																
Country	Black populations							Asian populations					Caucasian populations			
	Martinique	UK	USA	South Africa	Kenya	Kenya	Nigeria	China	China	China	Japan	Thailand	UK	Sweden	Europe	Netherland
References		(15)	(16)	(17)		(17)	(17)	(18)	(19)		(20)	(21)			(17)	(22)
n=	120	77	100	131	344	97	88	225	129	329	303	187	355	184	379	100
FCGR2A genotype frequency																
131 RR	35 (29.2)	25 (32.5)	23 (23)	41 (31.3)	114 (33.1)	23 (23.7)	23 (26.1)	22 (9.8)	18 (14.0)	34 (10.3)	11 (3.6)	18 (9.6)	101 (28.4)	52 (28.2)	98 (25.9)	20 (20)
131 HR	60 (50)	35 (45.5)	50 (50)	64 (48.9)	169 (49.1)	43 (44.3)	47 (53.4)	100 (44.4)	58 (45.0)	152 (46.2)	95 (31.4)	76 (40.6)	177 (49.8)	86 (46.7)	183 (48.3)	52 (52)
131 HH	25 (21.8)	17 (22.1)	27 (27)	26 (19.8)	61 (17.7)	31 (32)	18 (20.5)	103 (45.8)	53 (41.1)	143 (43.4)	197 (65.0)	93 (46.8)	77 (21.6)	46 (25)	98 (25.9)	28 (28)
* P		NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.0001	0.0005	0.0001	0.0001	0.0001	NS	NS	NS	NS
FcGRIIA allele frequency																
131R	130 (54.2)	85 (55.2)	96 (48)	146 (55.7)	397 (57.7)	89 (45.9)	93 (52.8)	144 (32)	94 (36.4)	220 (33.4)	117 (19.3)	112 (30)	379 (53.4)	190 (51.6)	379 (50)	92 (46)
131H	109 (45.8)	69 (44.8)	104 (52)	116 (44.3)	291 (42.3)	105 (54.1)	83 (47.2)	306 (68)	164 (63.6)	438 (66.6)	489 (80.7)	262 (70)	331 (46.6)	178 (48.4)	379 (50)	108 (54)
** P		NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.001	0.001	0.0001	0.0001	0.0001	NS	NS	NS	NS
Allele carrier frequency																
131R	95 (79.83)	60 (77.9)	73 (73)	105 (80.1)	283 (82.2)	66 (68)	70 (79.5)	122 (54.2)	76 (58.9)	186 (56.5)	106 (35.0)	94 (50.3)	278 (78.3)	138 (75.0)	281 (74.1)	72 (72)
131H	85 (70.59)	52 (67.5)	77 (77)	90 (68.7)	230 (66.9)	74 (76.3)	65 (73.9)	203 (90.2)	111 (86)	295 (89.6)	292 (96.4)	169 (90.4)	254 (71.5)	132 (71.7)	281 (74.1)	80 (80)
** P		NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.0009	0.02	0.001	0.0001	0.0004	NS	NS	NS	NS
Numbers in the parentheses indicate the percentage. The χ^2 test was used to compare the frequency of FCGR2A alleles or genotypes in Martinican population to other worldwide populations. * P for χ^2 analysis from 3X2 contingency tables; ** P for χ^2 analysis from 2X2 contingency tables.																

97 Allele and genotype distribution for the FCGR2B polymorphism are summarized in Table 3.
98 The calculated FCGR2B-232T allele frequency in AC (27.5%) is similar to those previously
99 reported in Black individuals (20.5-31.1%), and not significantly different from those
100 calculated in Asian populations, except one from China. The proportion of AC individuals
101 (37.5%) carrying at least one FCGR2B-232T allele is not different from proportion established
102 in Black (38.6-56.7%) or Asian populations (26.3-45%) but significantly superior compared to
103 Caucasian populations (19-25%). The frequency of FCGR2B-232T homozygous individuals
104 (17.2%) among AC is the higher ever observed in healthy populations.
105

Table 3: Genotype and allele frequencies of variants of FCγRIIb in healthy individuals from black, asian and caucasian populations.

Country	Black populations						Asian populations						Caucasian populations			
	Martinique	USA ¹	South Africa ²	Kenya ²	Kenya ³	Nigeria ²	China	China	Taiwan	HK China	Japan	Thailand	UK	Europe ²	Netherland ²	Sweden
Références		(16)	(17)	(17)		(17)	(18)	(19)			(20)	(21)				
n=	120	149	131	97	346	88	225	129	372	1026	303	187	443	379	100	285
FCGR2B genotype frequency																
232II	75 (62.2)	79 (53)	61 (46.6)	42 (43.3)	159 (46.0)	54 (61.4)	155 (69)	51 (60.0)	206 (55)	565 (55.1)	183 (60.4)	97 (58.8)	351 (79.2)	296 (78.1)	81 (81)	225 (79)
232IT	24 (20.2)	53 (36)	59 (45)	50 (51.5)	159 (46.0)	32 (36.4)	70 (31)	30 (35.3)	144 (39)	404 (34.9)	104 (34.3)	56 (33.9)	81 (18.3)	73 (19.3)	15 (15)	49 (17.2)
232TT	21 (17.6)	17 (11)	11 (8.4)	5 (5.2)	28 (8.1)	2 (2.3)	0 (0)	4 (4.7)	22 (6)	57 (5.6)	16 (5.3)	12 (7.3)	11 (2.5)	10 (2.6)	4 (4)	11 (3.9)
* P		0.015	0.001	<0.0001	<0.0001	0.0004	0.0001	0.0038	0.0001	0.0001	0.0001	0.0036	0.0001	0.0001	0.0023	0.0001
FcGRIIB allele frequency																
232I	174 (72.5)	211 (70.8)	181 (69.1)	134 (69.1)	477 (68.9)	140 (79.5)	380 (84.4)	132 (77.6)	556 (75)	1534 (74.8)	470 (77.6)	250 (75.8)	783 (88.4)	665 (87.7)	177 (88.5)	499 (87.6)
232T	66 (27.5)	87 (29.2)	81 (30.9)	60 (30.9)	215 (31.1)	36 (20.5)	70 (15.6)	38 (22.4)	166 (25)	518 (25.2)	136 (22.4)	80 (24.2)	103 (11.6)	93 (12.3)	23 (11.5)	71 (12.4)
** P		NS	NS	NS	NS	NS	0.0002	NS	NS	NS	NS	NS	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Allele carrier frequency																
232I	99 (82.5)	132 (88.6)	120 (91.6)	92 (94.8)	318 (91.9)	86 (97.7)	225 (100)	81 (62.8)	350 (94)	969 (94.4)	287 (94.7)	153 (81.8)	442 (99.8)	369 (97.3)	96 (96)	274 (96.1)
232T	45 (37.5)	70 (47)	70 (53.4)	55 (56.7)	177 (51.1)	34 (38.6)	70 (31.1)	34 (26.3)	166 (44.6)	461 (45)	120 (39.6)	68 (36.4)	92 (20.8)	83 (21.9)	19 (19)	60 (21)
** P		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	<0.0001	<0.01	<0.01	0.0013

Numbers in the parentheses indicate the percentage. The χ^2 test was used to compare the frequency of FCGR2A alleles or genotypes in Martinican population to other worldwide populations. * P for χ^2 analysis from 3X2 contingency tables; ** P for χ^2 analysis from 2X2 contingency tables

108 Next we established the predominance of the variant allele FCGR3A-158V (53.4%) in the AC
109 population (Table 4). Comparisons with Black populations (13.9-36.7%), Asian (28-38.4%) and
110 Caucasian (26.9-30.5%), reveal that this overrepresentation is specific to the AC cohort. The
111 frequency of individual carrying FCGR3A-158V in AC (68.1%) is significantly higher than in
112 African, Caucasian and most Asian populations. Furthermore the AC population from Martinique
113 had the highest frequency of individuals homozygous FCGR3A-158V (39.1%) among all
114 populations studied.

Table 4: Genotype and allele frequencies of variants of FCGR3A in healthy individuals from black, asian and caucasian populations.																
Country	Black populations						Asian populations						Caucasian populations			
	Martinique	USA	South Africa	Kenya	Kenya ^a	Nigeria	China	HK China	China	Japan	Japan	Thailand	UK	Sweden	Europe	Netherlands
References		(16)	(17)			(17)			(19)	(23)	(20)	(21)				
n=	120	953	131	307	97	88	225	355	129	217	303	165	379	197	379	100
FCGR3A genotype frequency :																
158FF	38 (31.7)	413 (43.3)	50 (38.2)	157 (51.1)	74 (43.8)	46 (52.3)	115 (51.1)	133 (37.4)	48 (37.2)	100 (46.1)	145 (47.8)	64 (34.2)	166 (43.7)	86 (43.6)	212 (55.9)	48 (48)
158FV	35 (29.2)	431 (45.6)	63 (48.1)	125 (40.8)	8 (25)	40 (45.5)	94 (41.8)	166 (46.7)	63 (48.8)	99 (45.6)	132 (43.6)	96 (52.3)	178 (46.9)	86 (43.6)	130 (34.3)	41 (41)
158VV	47 (39.1)	109 (11.4)	13 (9.9)	25 (8.1)	7 (21.9)	2 (2.3)	16 (7.1)	56 (15.7)	18 (14.0)	18 (8.3)	26 (8.6)	27 (14.4)	35 (9.2)	25 (12.6)	37 (9.7)	7 (7)
* P		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
FCGR3A allele frequency :																
158F	111 (46.6)	1257 (66)	169 (63.3)	439 (71.5)	167 (86.1)	132 (75)	324 (72)	432 (60.8)	159 (61.6)	299 (68.9)	422 (69.6)	224 (59.9)	510 (67.3)	258 (65.5)	554 (73.1)	141 (69.5)
158V	127 (53.4)	639 (34)	98 (36.7)	175 (28.5)	27 (13.9)	44 (25)	126 (28)	278 (39.2)	99 (38.4)	135 (31.1)	184 (30.4)	150 (40.1)	248 (32.7)	136 (34.5)	204 (26.9)	57 (30.5)
** P		<0.0001	0.0002	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0001	0.008	<0.0001	<0.0001	0.001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Allele carrier frequency :																
158F	73 (61.3)	844 (88.5)	113 (86.2)	282 (91.8)	82 (84.5)	86 (97.7)	209 (92.9)	299 (84.2)	111 (86)	199 (91.7)	277 (91.4)	160 (97)	344 (91)	172 (87.3)	342 (90.)	89 (89)
158V	81 (68.1)	540 (56.7)	76 (34.2)	150 (48.9)	15 (15.5)	42 (47.7)	110 (48.9)	222 (62.5)	81 (62.8)	117 (53.9)	158 (52.1)	123 (74.5)	213 (56.2)	111 (56.3)	167 (44)	48 (48)
** P		<0.001	=0.02	0.0001	<0.0001	0.0009	0.0002	NS	NS	0.001	0.0004	NS	0.001	0.007	<0.0001	0.003
Numbers in the parentheses indicate the percentage. The χ^2 test was used to compare the frequency of FCGR3A alleles or genotypes in Martinican population to other worldwide populations. χ^2 P for χ^2 analysis from 3X2 contingency tables; ** P for χ^2 analysis from 2X2 contingency tables.																

Finally, we studied the frequencies of the FCGR3B allo-phenotypes NA1 and NA2 (Table 5). The distribution of the null allele (1.6%) is in concordance with the previously reported data indicating that less than 1% population lacks the FcγRIIIb phenotype. In our cohort frequencies of the FCGR3B-NA1:NA1, FCGR3B-NA1:NA2 and FCGR3B-NA2:NA2 were 14.2%, 72.5% and 11.7% respectively. These frequencies are not consistent with Hardy Weinberg equilibrium (Table 5). The frequency of FCGR3B-NA1:NA2 genotype (72.5%) is

Table 5: Genotype and allele frequencies of variants of FCγRIIIb in healthy individuals from black, asian and caucasian populations.

Country	Black populations			Asian populations				Caucasian populations		
	Martinique	USA	South Africa	China	China	Japan	Japan	Koene USA+Nether lands	Duits	Netherlands
References		(16)	(17)		(19)	(23)	(20)		(24)	
n=	120	171	131	225	129	217	303	87	69	100
FcGRIIIb genotype frequency :										
NA1:NA1	17 (14.2)	27 (15.9)	31 (23.6)	53 (23.6)	41 (31.8)	92 (42.4)	116 (38.3)	11 (13)	10 (14.5)	17 (17)
NA1:NA2	87 (72.5)	82 (47.9)	48 (36.6)	124 (55.1)	74 (57.4)	100 (46.1)	145 (47.8)	39 (45)	32 (46.4)	45 (45)
NA2:NA2	14 (11.7)	60 (35.2)	52 (39.7)	48 (21.3)	14 (10.9)	25 (11.5)	42 (13.9)	37 (43)	27 (39.1)	38 (38)
Null	2 (1.6)	2 (0.01)	0 (0)							
* P		<0.0001	<0.0001	0.003	0.0009	0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
FcGRIIIb allele frequency :										
NA1	120 (51.3)	136 (40.2)	110 (42)	230 (51.1)	156 (60.5)	284 (65.4)	377 (62.2)	61 (35.1)	52 (37.7)	77 (37.7)
NA2	114 (48.7)	202 (59.8)	152 (58)	228 (48.9)	102 (39.5)	150 (34.6)	229 (37.8)	113 (64.9)	86 (62.3)	127 (62.3)
** P		<0.01	P=0.04	NS	0.04	0.0004	0.004	0.001	0.01	0.004
Allele carrier frequency :										
NA1	103 (88.03)	109 (64.2)	79 (60.3)	177 (78.7)	115 (89.15)	192 (98.5)	261 (86.1)	50 (57.5)	42 (60.9)	62 (62)
NA2	100 (85.47)	142 (84)	100 (76.3)	172 (76.4)	88 (68.21)	125 (57.6)	187 (61.7)	76 (87.3)	59 (85.5)	83 (83)
** P		NS	NS	NS	NS	P=0.027	NS	NS	NS	NS

Numbers in the parentheses indicate the percentage. The χ^2 test was used to compare the frequency of FCGR3B alleles or genotypes in Martinican population to other worldwide populations. * P for χ^2 analysis from 3X2 contingency tables; ** P for χ^2 analysis from 2X2 contingency tables.

significantly superior and the frequency of FCGR3B-NA2:NA2 (11.7) is significantly inferior ($P<0.001$) to those observed in individuals of black ancestry or not.

DISCUSSION

The Caribbean islands populations are the consequence of one of the most complex interactions in recent history among previously diverged human populations. During 18th Martinique received 100 000 to 150 000 African slaves embarked mostly but not only on actual Ouidah (Republic of Benin) the second largest slave port in the [Triangular trade](#). The complexity of the present population in Martinique results also of the separation of slaves of the same ethnic group upon their arrival on plantations. African Americans and African-Caribbean are recognized as populations with greater prevalence and more severe SLE than Caucasians. Functional FcγR polymorphisms have been demonstrated to be associated with inflammatory or autoimmune disease as to susceptibility and severity of numerous infections. As the distribution of FCGR polymorphisms has been reported to display substantial inter-ethnic variation, knowledge of the distribution of multiple FcγR variant genotypes in AC healthy population is critical to interpret future association studies.

Our study established the distribution of variant alleles of members of the low-affinity FCGR family in 120 healthy AC individuals from Martinique. In this population the distributions of genotypes of FCGR2B, FCGR3A and FCGR3B are significantly different from those established in other populations worldwide. The distribution of FCGR2A genotypes in AC was similar to those observed in black or caucasian populations. We also established that except for FCGR2A gene, the genotypic distributions of FCGR alleles are not consistent with Hardy Weinberg equilibrium. Due to its implication in autoimmune disease our initial study was concerning the FcγRIIb. The natural variant FcγRIIb-232T has an altered signaling capacity (6) and the allele 232T is supposed to have a protective role against malaria in black populations. This allele is more common in the southeast Asia (15.6-25.2%) and Africa (20.5-30.9%) where malaria is endemic (25). Not surprisingly this occurrence is the same in populations of African origins as AC of Martinique (27.5%) or African American (29.2%). The frequency of homozygous FcγRIIb-232T (17.6%) among AC individuals is the higher ever observed in any ethnic group. Given the available evidence indicating a deleterious effect of FcγRIIb deficiency it may be surprising that a polymorphism which reduces receptor expression or abrogates its function exists at such level in a healthy population. At this stage we can only postulate that the combination of the history of the AC population (migration, no random mating) and existence in founders of a polymorphism playing a potential role in defense against infection and predisposing to autoimmunity in other ethnic groups have provide a positive evolutionary selection pressure. Polymorphisms in the regulatory region of the human FCGR2B gene have been associated with modification of expression of FcγRIIb receptors in activated B cells in Caucasian SLE patients (26) (4). Our exploration by direct sequencing of the first 573 bp of the promoter region in 30 AC individuals did not permit to identify an individual with homozygous -343 C/C genotype. This finding is in agreement with previous results in African American or African populations (4)

Therefore even if the 232T allele has not been associated to SLE in African American or in African populations we need now to explore the distribution of the FCGR2B genotypes in AC SLE patients. It is also of interest to establish the profile of genes which should protect against potential FCGR genes mutation in AC. One candidate is the gene coding for CD72. This gene has two haplotypes and haplotype 2 is supposed to decrease risk for human SLE conferred by homozygous FcγRIIb-232T genotype by increasing an alternative splicing that leads to a more longer protein which accumulates in reticulum endoplasmic and provokes apoptosis in the B cell (27). In a recent study soluble CD72 was found increased in SLE patients, when compared to healthy individuals but it remains to be established if this is the result of CD72 mutations in SLE or if this is the result of increased CD72 shedding leaving over active B cells with poor regulatory signaling (28).

The AC population of Martinique is the first population where the FcγRIIIa-158V allele is shown to be predominantly expressed. This finding is of real public health importance in Martinique as homozygosity for FCGR2A-158V was postulated to be significant predictor of end-stage renal disease (29). It has been suggested that once the kidney damage is initiated the FcγRIIIa-158V form may cause more activation and greater renal damage. Moreover most studies focusing on identification of association with lupus nephritis or SLE pointed out an association with the FcγRIIIa-158F form in several populations including African Americans (30). However, this association was not confirmed by a recent meta-analysis in the population of African and African American (31). Therefore further studies to explore the possible association between the FcγRIIIa-158V/F polymorphism with SLE and renal diseases in AC population are needed.

It has been considered that malaria has been the strongest known selective pressure in the recent history of the human genome (32). In West African populations previous results suggested that the FCGR2A-131HH genotype should be at the same time a major susceptibility factor for severe malaria (33) and an important protective element from diseases caused by capsulated bacteria as IgG2 requires the presence of the FCGR2A-131H allele to be efficient. Malaria is present in the Caribbean basin since the first voyage of Columbus and firmly established at the time of the slave trade. The frequencies of the FCGR2A-131H/R alleles in the AC population of Martinique do not differ significantly from those observed in African populations. Malaria may have continued to act as selective pressure in the Caribbean since its introduction and the overall balance between protective and deleterious effects of FCGR2A-131H/R alleles existing in ancestral African populations maintained in AC population. The introduction of the yellow fever virus and its vector *Aedes aegypti* to the Caribbean by slave trade ships from Africa parallels the introduction of malaria, the first outbreaks occurred in the Windward Islands of the Caribbean on Barbados in 1647 and Guadalupe in 1648. As the FCGR2A-131R allele is thought to have a protective effect in dengue virus infection (34) it is then tempting to postulate that the same protective effect in another filovirus infection contributed as malaria to maintain in AC population the balance between the FCGR2A-131 alleles. Our results established on a population where colorectal cancer in both sexes strongly increased between 1981 and 2000 (35) and because cetuximab worked best for patients with *KRAS* wild-type colorectal cancers carrying *FCGR2A HH* genotypes (36) legitimate a future evaluation of genotyping as an effective tool to predict the effectiveness of treatment in AC patients.

CONCLUSIONS

Finally our study established that despite a common ancestry African-American and AC populations display significant differences on FcγR genotypes distributions. It has been established that multiple pulses of African migration contributed to genetic ancestry of Islands Caribbean populations whereas the mainland populations of the Caribbean result from a more limited influx of African slaves (13). Furthermore African American ancestry populations from multiple places in USA (27) were shown of ancestry from multiple African ancestral clusters and from different European–Middle Eastern associated ancestral clusters with considerable variation in European and African ancestry among individuals. In Martinique, in relation with the trade associated migration, selection of the most robust labor force, the insularity and the plantation system which restricted random mating, may have contributed to generate a pattern of FcγR genotypes different from the African ancestral pattern or from those observed in African American populations. The differences we observed among population of African ancestry underscore the importance to investigate in admixed populations the existence of specific medically relevant genetic variants.

Patients and methods

Study Subjects

Genomic DNA was isolated from peripheral blood mononuclear cells of participants using QIAamp DNA blood Maxi kit (Qiagen, Les Ulis, France). Blood samples from 120 AC individuals from Martinique (French West Indies) were available for genomic DNA extraction. All participants were healthy unrelated volunteers and were tested for absence of antinuclear antibody (1/320 dilution) to eliminate possible autoimmune disease phenotype. Informed consent was obtained from all participants and the study was approved by Comité de protection des personnes Sud Ouest et Outremer under number 2013-A01610-45.

Genotyping of FCGR2A, FCGR2B and FCGR3A

For FCGR2A-158V/F genotyping assay, a 231 bases pair polymerase chain reaction (PCR) fragment was obtained with primers 5'-CTGAGACTGAAAAACCCTTGGAATC-3' (forward) and 5'-GCTTGTGGGATGGAGAAGGTGGGATCCAAA-3' (reverse). For FCGR2B-232I/T genotyping assay a 350 bases pair PCR fragment was obtained with primers .5'-TATTTACAGAATGGCAAAGG-3' (forward) and 5'-GTGATGGTGATGTTTCACAGT -3' (reverse). For FCGR3A-131R/H genotyping assay a 152 bases pair PCR fragment was obtained with primers 5'-TATTTACAGAATGGCAAAGG-3' forward) and 5'-GTGATGGTGATGTTTCACAGT - 3' (reverse). All PCRs were run in 50 µl containing 100 ng of DNA, 2.5 mM of MgCl₂ , 200µM of dNTPs, 0.4µM each primer and 1.25 unit of AmpliTaq Gold 360 Polymerase (Applied Biosystems). The amplification procedure consisted of initial denaturation at 95°C for 10 minutes, 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing at 50°C (for FCGR2A primers) or 55°C (for FCGR2A primers) or 53°C (for FCGR3A primers) for 1minute and extension at 72°C for 1minute and a final extension at 72°C for 7 min.

All specific purified PCR products were sequenced from both directions using the BigDye Terminators v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing kit. Sequences were run on an ABI 3500 capillary sequencer, and analyzed using SeqScape version 2.7 (Applied Biosystems).

FCGR3B allotyping (NA1 and NA2)

The FCGR3B allotyping assay consisted of a PCR amplification with a forward allotype-specific primers, 5'-CAGTGGTTTCACAATGAGAA-3' (for NA1) or 5'-CCATGGTACAGCGTGCTT-3' (for NA2) and a reverse common primer 5'-ATGGACTIONTCTAGCTGCAC 3'. The amplification procedure consisted of initial denaturation at 95°C for 10 minutes, 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing at 50°C (for NA1 primers) or 55°C (NA2 primers) for 1 minute and extension at 72°C for 1 minute and a final extension at 72°C for 7 min. The amplified DNA fragments of 141 bp (NA1) and 219 bp (NA2) were separated on a 2% agarose gel and visualized by Midori Green staining.

Genotyping of FCGR2B promoter

For genotyping the FCGR2B promoter a long-range PCR was performed using SequalPrep™ Long PCR Kit with dNTPs (Invitrogen, Les Ulis France) to specifically amplify the *FCGR2B* region. The forward primer (5'-GCCATCCTGACATACCTCCTT-3') anneals in the common FCGR-2B/C promoter region and the reverse primer (5'-CCCAACTTTGTCAGCCTCATC-3') anneals at a FCGR2B- specific sequence in exon 7. PCR conditions were: 94°C for 2 minutes, 10 cycles of 94°C for 30 seconds, 58°C for 30 seconds and 68°C for 9 minutes followed by 25 cycles of the same condition + cycle elongation of 20 seconds for each cycle. The 15 kb PCR product (1:1000 dilution) was used as template in a nested PCR reaction to amplify a 628 bp fragment of the promoter region using primer 5'-TGACATACCTCCTTGTCCTTGTT-3' (forward), and primer 5'-GCAGTCAGCCCAGTCACTCTCAGT-3' (reverse). Cycling conditions were: 95°C for 10 min, 30 cycles of 95°C for 1 minute, 58°C for 1 minute, and 72°C for 1 minutes, followed by a final 7min extension at 72°C. After purification PCR products were sequenced from both directions using the BigDye Terminators v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit.

Statistical analysis

Allele frequencies were computed from the observed data and deviations of observed genotypic distributions from expected distribution based on Hardy-Weinberg law were tested using χ^2 test with 1 degree of freedom. χ^2 test was used for comparison of genotype (3x2 contingency table), allele or allele carrier (2x2 contingency table) distributions between the populations. A probability of 0.05 was used to reject the null hypothesis that there was no difference between populations.

References

1. Su K, Wu J, Edberg JC, McKenzie SE, Kimberly RP. Genomic organization of classical human low-affinity Fc γ receptor genes. *Genes Immun.* 2002 Oct;3 Suppl 1:S51-56.
2. Clark MR, Clarkson SB, Ory PA, Stollman N, Goldstein IM. Molecular basis for a polymorphism involving Fc receptor II on human monocytes. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1989 Sep 1;143(5):1731-4.
3. Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, et al. Specificity and affinity of human Fc γ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood.* 2009 Apr 16;113(16):3716-25.

4. Blank MC, Stefanescu RN, Masuda E, Marti F, King PD, Redecha PB, et al. Decreased transcription of the human FCGR2B gene mediated by the -343 G/C promoter polymorphism and association with systemic lupus erythematosus. *Hum Genet.* 2005 Jul;117(2–3):220–7.
5. Su K, Li X, Edberg JC, Wu J, Ferguson P, Kimberly RP. A Promoter Haplotype of the Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif-Bearing FcγRIIb Alters Receptor Expression and Associates with Autoimmunity. II. Differential Binding of GATA4 and Yin-Yang1 Transcription Factors and Correlated Receptor Expression and Function. *J Immunol.* 2004 Jun 1;172(11):7192–9.
6. Floto RA, Clatworthy MR, Heilbronn KR, Rosner DR, MacAry PA, Rankin A, et al. Loss of function of a lupus-associated FcγRIIb polymorphism through exclusion from lipid rafts. *Nat Med.* 2005 Oct;11(10):1056–8.
7. Kono H, Kyogoku C, Suzuki T, Tsuchiya N, Honda H, Yamamoto K, et al. FcγRIIb Ile232Thr transmembrane polymorphism associated with human systemic lupus erythematosus decreases affinity to lipid rafts and attenuates inhibitory effects on B cell receptor signaling. *Hum Mol Genet.* 2005 Oct 1;14(19):2881–92.
8. Ravetch JV, Perussia B. Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J Exp Med.* 1989 Aug 1;170(2):481–97.
9. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, Borne AEGK von dem, Haas M de. FcγRIIIa-158V/F Polymorphism Influences the Binding of IgG by Natural Killer Cell FcγRIIIa, Independently of the FcγRIIIa-48L/R/H Phenotype. *Blood.* 1997 Aug 1;90(3):1109–14.
10. Wu J, Edberg JC, Redecha PB, Bansal V, Guyre PM, Coleman K, et al. A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest.* 1997 Sep 1;100(5):1059–70.
11. Salmon JE, Edberg JC, Kimberly RP. Fc gamma receptor III on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities. *J Clin Invest.* 1990 Apr;85(4):1287–95.
12. Bera O, Cesaire R, Quelvennec E, Quillivic F, De Chavigny V, Ribal C, et al. HLA class I and class II allele and haplotype diversity in Martinicans. *Tissue Antigens.* 2001 Mar 1;57(3):200–7.
13. Moreno-Estrada A, Gravel S, Zakharia F, McCauley JL, Byrnes JK, Gignoux CR, et al. Reconstructing the population genetic history of the Caribbean. *PLoS Genet.* 2013 Nov;9(11):e1003925.
14. Deligny C, Thomas L, Dubreuil F, Théodose C, Garsaud AM, Numéric P, et al. [Systemic lupus erythematosus in Martinique: an epidemiologic study]. *Rev Médecine Interne Fondée Par Société Natl Française Médecine Interne.* 2002 Jan;23(1):21–9.
15. Botto M, Theodoridis E, Thompson EM, Beynon HL, Briggs D, Isenberg DA, et al. Fc gamma RIIa polymorphism in systemic lupus erythematosus (SLE): no association with disease. *Clin Exp Immunol.* 1996 May;104(2):264–8.

16. Salmon JE, Millard S, Schachter LA, Arnett FC, Ginzler EM, Gourley MF, et al. Fc gamma RIIA alleles are heritable risk factors for lupus nephritis in African Americans. *J Clin Invest*. 1996 Mar 1;97(5):1348–54.
17. Lassaunière R, Tiemessen CT. Variability at the FCGR locus: characterization in Black South Africans and evidence for ethnic variation in and out of Africa. *Genes Immun*. 2016 Mar;17(2):93–104.
18. Zhou X-J, Lv J-C, Yu L, Cui Z, Zhao J, Yang R, et al. FCGR2B gene polymorphism rather than FCGR2A, FCGR3A and FCGR3B is associated with anti-GBM disease in Chinese. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2010 Jan;25(1):97–101.
19. Chu ZT, Tsuchiya N, Kyogoku C, Ohashi J, Qian YP, Xu SB, et al. Association of Fc gamma receptor IIb polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Chinese: a common susceptibility gene in the Asian populations. *Tissue Antigens*. 2004 Jan;63(1):21–7.
20. Kyogoku C, Dijstelbloem HM, Tsuchiya N, Hatta Y, Kato H, Yamaguchi A, et al. Fc gamma receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: contribution of FCGR2B to genetic susceptibility. *Arthritis Rheum*. 2002 May;46(5):1242–54.
21. Siriboonrit U, Tsuchiya N, Sirikong M, Kyogoku C, Bejrachandra S, Suthipinittharm P, et al. Association of Fc gamma receptor IIb and IIIb polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. *Tissue Antigens*. 2003 May;61(5):374–83.
22. Breunis WB, van Mirre E, Bruin M, Geissler J, de Boer M, Peters M, et al. Copy number variation of the activating FCGR2C gene predisposes to idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1029–38.
23. Hatta Y, Tsuchiya N, Ohashi J, Matsushita M, Fujiwara K, Hagiwara K, et al. Association of Fc gamma receptor IIIB, but not of Fc gamma receptor IIA and IIIA polymorphisms with systemic lupus erythematosus in Japanese. *Genes Immun*. 1999 Sep;1(1):53–60.
24. Duits AJ, Bootsma H, Derksen RH, Spronk PE, Kater L, Kallenberg CG, et al. Skewed distribution of IgG Fc receptor IIa (CD32) polymorphism is associated with renal disease in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum*. 1995 Dec;38(12):1832–6.
25. Willcocks LC, Carr EJ, Niederer HA, Rayner TF, Williams TN, Yang W, et al. A defunctioning polymorphism in FCGR2B is associated with protection against malaria but susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 27;107(17):7881–5.
26. Su K, Li X, Edberg JC, Wu J, Ferguson P, Kimberly RP. A promoter haplotype of the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing Fc gamma RIIb alters receptor expression and associates with autoimmunity. II. Differential binding of GATA4 and Yin-Yang1 transcription factors and correlated receptor expression and function. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Jun 1;172(11):7192–9.

27. Hitomi Y, Adachi T, Tsuchiya N, Honda Z-I, Tokunaga K, Tsubata T. Human CD72 splicing isoform responsible for resistance to systemic lupus erythematosus regulates serum immunoglobulin level and is localized in endoplasmic reticulum. *BMC Immunol.* 2012;13:72.
28. Vadasz Z, Goldeberg Y, Halasz K, Rosner I, Valesini G, Conti F, et al. Increased soluble CD72 in systemic lupus erythematosus is in association with disease activity and lupus nephritis. *Clin Immunol Orlando Fla.* 2016 Mar;164:114–8.
29. Alarcón GS, McGwin G, Petri M, Ramsey-Goldman R, Fessler BJ, Vilá LM, et al. Time to renal disease and end-stage renal disease in PROFILE: a multiethnic lupus cohort. *PLoS Med.* 2006 Oct;3(10):e396.
30. Koene HR, Kleijer M, Swaak AJ, Sullivan KE, Bijl M, Petri MA, et al. The Fc gammaRIIIA-158F allele is a risk factor for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1998 Oct;41(10):1813–8.
31. Zhu X-W, Wang Y, Wei Y-H, Zhao P-P, Wang X-B, Rong J-J, et al. Comprehensive Assessment of the Association between FCGRs polymorphisms and the risk of systemic lupus erythematosus: Evidence from a Meta-Analysis. *Sci Rep.* 2016 Aug 19;6:31617.
32. Kwiatkowski DP. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *Am J Hum Genet.* 2005 Aug;77(2):171–92.
33. Cooke GS, Aucan C, Walley AJ, Segal S, Greenwood BM, Kwiatkowski DP, et al. Association of Fc gamma receptor IIa (CD32) polymorphism with severe malaria in West Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 Dec;69(6):565–8.
34. Loke H, Bethell D, Phuong CXT, Day N, White N, Farrar J, et al. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor IIa genes. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Jul;67(1):102–6.
35. Dieye M, Veronique-Baudin J, Draganescu C, Azaloux H. Cancer incidence in Martinique: a model of epidemiological transition. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP.* 2007 Apr;16(2):95–101.
36. Liu G, Tu D, Lewis M, Cheng D, Sullivan LA, Chen Z, et al. Fc- γ Receptor Polymorphisms, Cetuximab Therapy, and Survival in the NCIC CTG CO.17 Trial of Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2016 May 15;22(10):2435–44.
37. Li X, Wu J, Carter RH, Edberg JC, Su K, Cooper GS, et al. A novel polymorphism in the Fc gamma receptor IIB (CD32B) transmembrane region alters receptor signaling. *Arthritis Rheum.* 2003 Nov;48(11):3242–52.

Table 6: Genotype and allele frequencies of the FCGR2B promoter haplotypes

Country	Black populations			Caucasian populations		
	Martinique	USA (Blank et al. 2005)	South Africa	South Africa	USA (5)	EUROPE and USA (37)
n	30	67	131	32	366	130
Genotype frequency of -386 G/C n (%)						
G/G	28 (94)	64 (95)	131 (100)	19 (59.4)	300 (82.0)	100 (77)
G/C	2 (6)	3 (5)	0 (0)	12 (37.5)	63 (17.2)	29 (22)
C/C	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (3.1)	3 (0.8)	1 (<1)
χ^2		0.2	8,8	9.81	2.5	4.1
* Significance level		NS	P=0.003	P=0.007	NS	NS
Allele frequency n (%)						
-343 G	58 (96.6)	131 (97.7)	262 (100)	50 (78.1)	663 (90.6)	229 (88.07)
-343 C	2 (3)	3 (2.3)	0 (0)	14 (21.9)	69 (9.4)	31 (11.9)
χ^2		0.2	8.8	9.4	2.5	3.88
** Significance level		NS	P=0.003	P=0.002	NS	P=0.049
Allele carrier frequency no (%)						
-343 G	30 (100)	67 (100)	131 (100)	31 (96.8)	363 (99.2)	129 (99.2)
-343 C	2 (6)	3 (5)	0 (0)	13 (40)	66 (18.03)	30 (23)
χ^2		0.18	8.24	6.26	1.97	3
** Significance level		NS	P=0.04	NS	NS	NS

Article 2: Association of
FCGR with lupus in
Martinican

ASSOCIATION OF FCGR WITH LUPUS IN MARTINICAN

Fatima-Ezzahra RADOUANI¹, Maryvonne DUEYMES², Christophe Deligny³, Raymond CESAIRE^{4,5}, Georges DOS SANTOS^{4,5,*}

¹ Laboratoire d'immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Martinique, Fort de France, Martinique.

² Laboratoire d'immunologie, Centre Hospitalier Andrée ROSEMON, Cayenne, Guyane.

³ Service de Médecine interne, Centre Hospitalier Universitaire de Martinique, Fort de France, Martinique.

⁴ EA 4537 " Maladies Infectieuses et tropicales dans la Caraïbe" Université des Antilles. Centre Hospitalier Universitaire de Martinique, Fort de France, Martinique.

⁵ Laboratoire de virologie, Centre Hospitalier Universitaire de Martinique, Fort de France, Martinique.

*Corresponding author
E-mail: (GDS)

Funding: This work was supported by "FEDER-UE-CR Martinique"

1 Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a prototype of autoimmune disease characterized by high level of autoantibody production, leading to multiple organ inflammation,

Women of childbearing age are more frequently and severally affected than men (1) with an increase of the frequency and severity in African American and Asians than in European (2).

Receptors for Fc portion of IgG (FcγRs) are crucial for regulating the effectors cell and linking humoral to cellular immune response (3). Multiple FcγRs which differ in their ligand affinity, cellular distribution and effectors function. Constitute a clustered gene family on chromosome 1q21-24. Interestingly this region is strongly associated to SLE (4).

In Human, there are three FcγR with high affinity (FcγRI) and the low affinity (FcγRII, FcγRIII), each containing multiple distinct genes and alternative slicing variants (4). Genetic polymorphisms of FcγRIIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa and FcγRIIIb have been associated to SLE and disease phenotype

In *FCGR2A*, a single base change guanine (G) to alanine (A) at nucleotide 494 leads to change of arginine(R) to histidine(H) at 131 position (Clark et al. 1989). This substitution modifies the affinity to receptor (5) and may lead to a different immune response. In *FCGR2B* a nonsynonymous T>C SNP (rs 1050501) that encodes an isoleucine (I) to threonine (T) substitution at 232 position in the transmembrane domain and lead impairment of inhibitory function through the exclusion of receptor from lipid raft (6,7).

FcγRIII exists in two alternative membrane forms (FcγRIIIa and FcγRIIIb), which result from cell type specific expression of the two genes (8). In *FCGR3A*, a point substitution of T to G at nucleotide 559 (rs396991) changes the phenylalanine (F) at amino acid position 158 to valine (V). The FcγRIIIa-158V allele displays higher affinity for IgG1 and IgG3 relative to the 158F (176F) allele (9). Two serologically defined alleles, NA1 and NA2, have been described. Homozygous NA1 has been described to exhibit a higher phagocytic capacity because it is more efficient in binding immune complexes containing IgG1 and IgG3 than homozygous NA2 (Salmon, Edberg, et Kimberly 1990).

CD72 so called Lyb-2 is a 45 Kda type II transmembrane protein containing a C-type Lectin domain expressed in most developmental stage of B cell except plasma cell, CD72 play a negative regulation role of BCR stimulated with IgM ou IgG , (11,12). Genotypically two major haplotype of CD72 have been described containing 1 or two repeats of 13 nucleotides

in intron 8 named haplotype 1 or 2 respectively: haplotype 2 seems to decrease risk for human SLE conferred by FcγRIIb T/T 232 (13) by increasing an alternative splicing that leads to a more longer protein which stay in Reticulum endoplasmic and provoke apoptosis in the B cell (14).

In Martinique, where the population has an Afro-Caribbean origin (15), SLE is most often severe with an increase in kidney injury, and constitute one of the more frequent cause of dialysis in this West Indies Island (16).

In this study, we determined frequencies of FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa and FcγRIIIb polymorphisms in our population in order to explore their potential contributions in the increase of SLE, in the other hand. We explored the CD72 polymorphism in attend to explain the increase of FcγRIIb 232T/T in the control cohort.

2 Materials and methods:

2.1 Subjects

Anticoagulated peripheral blood was obtained from 120 healthy volunteers and from 131 patients fulfilling the revised 1997 American College of Rheumatology (ACR) criteria for SLE . SLE patients were recruited at the Internal Medicine Department of the University Hospital of Martinique at Fort de France. All donors were self-reported originating from Martinique, living in Martinique and provided informed written consent

2.2 Genotyping of *FCGR2A*, *FCGR2B* and *FCGR3A*

For FcγRIIA-158V/F genotyping assay, a 231 bases pair polymerase chain reaction (PCR) fragment was obtained with primers 5'-CTGAGACTGAAAAACCCTTGGAATC-3' (forward) and 5'-GCTTGTGGGATGGAGAAGGTGGGATCCAAA-3' (reverse). For FcγRIIB-232I/T genotyping assay a 350 bases pair PCR fragment was obtained with primers 5'-TATTTACAGAATGGCAAAGG-3' (forward) and 5'-GTGATGGTGTGATGTTACAGT -3' (reverse). For FcγRIIIA-131R/H genotyping assay a 152 bases pair PCR fragment was obtained with primers 5'-TATTTACAGAATGGCAAAGG-3'(forward) and 5'-GTGATGGTGTGATGTTACAGT-3' (reverse). All PCRs were run in 50 µl containing 100 ng of DNA, 2.5 mM of MgCl₂ , 200µM of dNTPs, 0.4 µM each primer and 1.25 unit of AmpliTaq Gold 360 Polymerase (Applied Biosystems). The amplification procedure consisted of an initial denaturation at 95°C for 10 min, 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 50°C (for FCGR2A primers) or 55°C (for FCGR2A primers) or 53°C (for FCGR3A primers) for 1 min and extension at 72°C for 1 min and a final extension at 72°C for 7 min.

All specific purified PCR products were sequenced from both directions using the BigDye Terminators v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing kit. Sequences were run on an ABI 3500 capillary sequencer, and analyzed using SeqScape version 2.7 (Applied Biosystems).

2.3 *FCGR3B* allotyping (NA1 and NA2)

The FCGR3B allotyping assay consisted of a PCR amplification with a forward allotype-specific primers, 5'-CAGTGGTTTTACAATGAGAA-3' (for NA1) or 5'-CCATGGTACAGCGTGCTT-3' (for NA2) and a reverse common primer 5'-ATGGACTTCTAGCTGCAC 3'. The amplification procedure consisted of initial denaturation at 95°C for 10 minutes, 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 50°C (for NA1 primers) or 55°C (NA2 primers) for 1 min and extension at 72°C for 1 min and a final extension at 72°C for 7 min. The amplified DNA

fragments of 141 bp (NA1) and 219 bp (NA2) were separated on a 2% agarose gel and visualized by Midori Green staining.

2.4 Fragment analysis of CD72

The 13 nucleotides repeat in the intron 8 used as haplotype's tag, was studied using simple sequence repeat-PCR using primers 6-Fam-5'-TTGGTAAGAGTGAGGGATGG-3' (forward) and 5'-TACAAGTTTTCTCTCGGGCC-3' (reverse). PCRs were run in 50 μ l containing 100 ng of DNA, 2,5 mM of $MgCl_2$, 200 μ M of dNTPs, 0.4 μ M each primer and 1,25 unit of AmpliTaq Gold 360 Polymerase (Applied Biosystems). Cycling conditions were an initial denaturation at 95°C for 10 min, 40 cycles denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 1 min, extension at 72°C for 1 min and a final extension at 72°C for 7 min. PCR products were separated on a 2% agarose gel and visualized by Midori Green staining. PCR products were diluted (1/10, 1/100). From these dilutions 0.5 μ l were combined with 9 μ l of HiDiTM formamide (Applied Biosystems) and 0.5 μ l of internal sizer GeneScanTM 400HD (RoxTM DYE) STANDARD and run on ABI 3500 capillary sequencer. Analysis and sizing of PCR products were done using GeneMapper software (Applied Biosystems). All used primers are reported in table 1.

2.5 Statistical analysis

Allele frequencies were computed from the observed data and deviations of observed genotypic distributions from expected distribution based on Hardy-Weinberg law were tested using χ^2 test with 1 degree of freedom. For comparison of genotype distributions, a test of χ^2 was performed. When sample numbers were small, the Fisher's exact test was used. African Caribbean population was taken as reference group. *P-values* less than 0.05 were deemed as significant. Linkage disequilibria were also estimated for the four polymorphisms in the study population, using the Haploview software V4.2(17).

3 Results

3.1 Patients and controls

A total of 131 patients with lupus (120 females and 11 males) between the age of 19 and 85 years (mean age \pm SD: 49,11 \pm 14,77), 5 patients had pure cutaneous lupus and 126 SLE patients including 56 (42.74%) patients with lupus nephritis (LN), 46 (35.11%) without nephritis (w/o LN). However, 24 patients remain still undetermined regarding lupus nephritis involvement and 120 unrelated healthy individuals (109 females and 11 males, average 53,9 \pm 18,10). Table1

Patients' Distribution of age is comparable with controls' one which makes the cohort homogenous and allows making case/ control comparison tests.

3.2 FCGR and lupus

131 Martinican patients with lupus and 120 healthy individuals were directly sequenced. Table 3 summarises the genotype and allele frequencies of *FCGR2A*, *FCGR2B*, *FCGR3A* and *FCGR3B*. As shown in table 2, An increase of homozygous NA1 in patients group was observed compared to controls, ($p=0,0002$). Odd Ratio of genotype NA1 for development of SLE was 2.84 (95%,CI: 1.51; 5.35). Allele frequencies of 158F (56.58% versus 46.64%), of 158V (43.08% versus 53.36%), NA1(64.62% versus 51.28%) and NA2 (34.62% versus 48.72%) were significantly different between patients and healthy controls. A significant increase of 158F and NA1 alleles were observed in patients in comparison to healthy individuals ($p < 0.05$), OR of allele 158F and NA1 for development of SLE were (1.5 CI:1.05; 2.12) and (1.7,CI: 1.23; 2.54) respectively. However no significant difference of *FCGR2A* nor *FCGR2B* were observed between patients and health individuals ($p > 0.05$).

3.3 *FCGR2A*H-131-R association to lupus nephritis

We further analyzed the association of *FCGR2A*, *FCGR2B*, *FCGR3A* and *FCGR3B* polymorphisms with lupus nephritis. polymorphisms of the Different *FCGR* for patients with and without nephritis manifestation are listed in Table 3. According to our results, *FCGR2A*-131R seems to be associated with Lupus Nephritis in Martinican. Homozygous 131R was overrepresented in patients with nephritis in comparison with those without nephritis (51.17% versus 23.9%; $p=0.016$). Odd Ratio of genotype 131R for development of nephritis was (OR=3.41; CI: 1.45; 8.05). Allele frequencies analysis showed a significant increase of R131 (67.85% versus 50%; $p=0.009$) and V158 (51% versus 33.3%; $p=0.012$) in patients with

nephritis in comparison with patients without nephritis. Risk to develop nephritis was 2.11 more important in presence of 131R allele, and 2.07 more important with 158 V.

No significant differences were observed in *FCGR2B*-I232T nor in *FCGR3B*-NA1/NA2 frequencies between patients regarding kidney injury.

3.4 Linkage disequilibrium at the *FCGR* locus

LD values were carried out to find an association among the four studied polymorphisms, figure 1 represent graphic of LD measurements in term of D' by Halpoview, SLE patients LD analysis revealed r^2 between *FCGR2A* (rs1801274) *FCGR3A* (rs396991) *FCGR3B*-NA1/NA2 and *FCGR2B* (rs1050501) were 0.03, 0.027 and 0.0 and in healthy individuals were, 0.04, 0.065 and 0.001. a weak but significant LD was observed between *FCGR2A* and *FCGR3B*, *FCGR2A* and *FCGR3A* in healthy control and patients.

When SLE with nephritis was considered, r^2 were 0.085, 0.09 and 0.06, however r between *FCGR3A* an *FCGR3B* were 0.025. a LD was observed between *FCGR2A* and *FCGR3A*

3.5 high risk association of FcγRIIa-R and FcγRIIIa-V alleles to LN

Association of alleles in LD was studied in our cohort (table 4): the frequency of associated 131R-176V allele was increased in patients with nephritis in comparison with those without LN (30.4% vs 15.8% respectively) (p-value =0.0093), A slight increase in 131H-176V was also observed in LN patients (24% vs 18.3%) in comparison with SLE patients without nephritis. In our cohort a high association of 131R- 176-V combined alleles to LN was depicted (OR=2.32, IC). 131H-176V was also less strongly associated (OR=1.4). However no association was found with the others alleles combination.

3.6 CD72

Facing the high frequency of *FCGR2B* T232 in healthy individuals, We examine whether CD72 play a protective role in this group, the CD72 haplotype2/2 Was thought to be protective for SLE when associated with *FCGR2B* 232T, using fragment analysis, we studied CD72. Results are shown in table 5.

A slight difference was observed between patients SLE and healthy individuals. A slight increase in Hap1 genotype in healthy individuals was observed but this difference is not significant (P=0.052), however no significant differences were observed in allele and allele carrier frequencies between patients and controls.

3.7 Hap1/232T genotype combination NOT associated to SLE

Finally we examined whether genetic association of CD72 and *FCGR2B* polymorphisms play a role in susceptibility to SLE, as shown in table 6 ,no significant difference was observed in CD72 distribution haplotypes in our cohort ($p>0.05$), when distribution of CD72 was studied in separate groups regarding genotype of FcγRIIb, no significant differences were observed neither in SLE nor in LN patients and no difference in haplotypes distribution in group carrying homozygous 232T ($p=0.9$)

4. Discussion

Many genetic association studies have been performed amongst human population with SLE, and various protein encoding genes implicated to immunity have been considered as candidates genes, to date. Several polymorphisms in the low-affinity FcγRs, altering IgG-binding affinity, have been associated with SLE in human..

In the present study, we showed an association between *FCGR3A*-176F and *FCGR3B*-NA1 alleles with SLE in addition to association between *FCGR3A*-176V allele and *FCGR2A*-131R allele with lupus nephritis in the Martinican population.

In *FCGR2A*, an arginine to histidine substitution (R131H, rs1801274) increase the affinity of FcγRIIIa binding to IgG2 (18) affecting the phagocytosis mediated by this IgG (19). FcγRIIIa-131H is the only human FcγR that binds IgG2 effectively. Several studies has identified *FCGR2A*-131R as a risk factor to SLE and lupus nephritis (LN) (20–23), this association was confirmed by meta-analysis (24), and associated to lupus and LN in African American (25,26), Caucasians (27–30), in Asian (31–33), and Brazilian (34). However others studies failed to find this association in Chinese and Japanese (35–37). In our population, we failed to demonstrate a significant association of *FCGR2A*-R to SLE, in concordance with the finding of Chu and All in Chinese(38).However, the association of *FCGR2A*-131R allele and homozygous 131R were strongly associated to nephritis lupus in our population (P=0.009 and 0.016) respectively.

In *FCGR3A*, co-dominantly expressed SNP FcγRIIIa-(F176V, rs396991) affects binding affinity as well (39), FcγRIIIa-176V allele displays higher affinity for IgG1, IgG3 And bind to IgG4 relative to the 176F allele (9). The *FCGR3A*-176F allele were associated to SLE in African American and Caucasians, but the association of 176-F allele is not consistent in Asian: the association was found in Japanese (Kyogoku et al. 2002) and by Karassa in a meta analysis, but several studies did not found the association to SLE (40,41).

On the other hand, *FCGR3A*-176F allele was already associated with LN (42,43). Our data indicated in our population the association of *FCGR3A*-176F with SLE rather than lupus nephritis, in concordance with Asians SLE where the *FCGR3A*-176F allele was significantly associated with SLE but not to nephritis lupus (Chu et al. 2004; Kyogoku et al. 2002). However, we have found a strong association between *FCGR3A*-176V allele and LN (p=0.012); our result may corroborate with the finding of Alarcon et al 2006 suggesting that

the 176V homozygosity is a predictor of end stage renal disease, in fact, homozygous. 176V has a high frequency in nephritis lupus patients (37.71%) but the non significance is probably related to the high 176V allele frequency in all Martinican (cité 1ere article).

FcγRIIIb-NA1/NA2 allotypes of the GPI anchored receptor have been associated to SLE. NA2 with 2 potential supplementary glycosylation sites (44) has a less affinity to IgG1 and IgG3 (10). In Asians, the homozygous FcγRIIIb-NA2 appears to be associated to SLE (Chu et al. 2004; Siriboonrit et al. 2003; Hatta et al. 1999), although this allele was thought to be protective from SLE in Korean (45). No association was found in other studies (Kyogoku et al. 2002; Yap et al. 1999; Koene et al. 1997; Dijkstra et al. 2000; Edberg et al. 2002). In our cohort, we found an association between homozygous FcγRIIIb-NA1, and SLE, (OR=2.829), rather than LN in Martinican. However a protective effect of FcγRIIIb-NA2 has been found in our study (OR=0.56), this finding is in concordance with Korean patients (45).

In FcγRIIb, the substitution of Isoleucine to threonine in the position 232(I232T, rs 1050501) in the transmembrane region affect the signaling capacity of receptor, the FcγRIIb-232T which is less efficient in translocating into lipid raft (6,7). Several genetic association studies of FcγRIIb have been reported, in Asian (31,33,38,47), Caucasian (30,48) and American (49), The homozygous FcγRIIb-232T has been depicted to confer susceptibility to SLE in most Asian populations, but not in Korean (50), nor in Caucasian, American european and African, and Indian (51). In our study, the FcγRIIb-I232T was not associated neither to SLE nor to LN, our result was consistent with that of Chinese, Caucasian, African American where the 232T allele showed the same high frequency as our population (cite article 1). The frequency of 232T allele has been reported to vary in ethnic groups, in fact, 232T allele has been shown to be more frequent in population where Malaria was endemic, as 232T allele protect against the more deadly forms of malaria infection (52,53), thus this polymorphism is increased in the descend of the population ancestrally exposed to malaria (54).

Study of combined allele of different *FCGR* is of major interest because most immune cell express at least two FcγR protein when cellular response does not depend of one FcγR but all FcγR expressed in cell surface. In our study, we highlighted an association of 131R-176V SNP with LN.

Genotypically two major haplotype of CD72 have been described containing 1 or two repeats 13 nucleotides in intron 8 named haplotype 1 ou 2 respectively. Haplotype 2 seems

to decrease the risk of human SLE conferred by homozygous 232T (13), increasing an alternative splicing that lead to a longer protein staying in the Reticulum endoplasmic and also provoking apoptosis in the B cell (14). Haplotype 1, has been shown to be associated to SLE and LN in Japanese (13). In this study, no association between CD72-Hap1 and SLE nor LN was found. this is in concordance with the finding in Thais and Caucasian (13). On the other hand, the association of Homozygous FcγRIIb-232T to SLE was depicted only in group carrying CD72-Hap1. In our study, CD72 haplotypes distribution was not different in patients and healthy control whatever the FcγRIIb genotype.

5. References

1. Petri M. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2002 Dec;16(5):847–58.
2. Lau CS, Yin G, Mok MY. Ethnic and geographical differences in systemic lupus erythematosus: an overview. *Lupus*. 2006;15(11):715–9.
3. Fossati G, Bucknall RC, Edwards SW. Fcγ receptors in autoimmune diseases. *Eur J Clin Invest*. 2001 Sep 1;31(9):821–31.
4. Kimberly RP, Salmon JE, Edberg JC. Receptors for immunoglobulin G. Molecular diversity and implications for disease. *Arthritis Rheum*. 1995 Mar;38(3):306–14.
5. Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, et al. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*. 2009 Apr 16;113(16):3716–25.
6. Floto RA, Clatworthy MR, Heilbronn KR, Rosner DR, MacAry PA, Rankin A, et al. Loss of function of a lupus-associated FcγRIIb polymorphism through exclusion from lipid rafts. *Nat Med*. 2005 Oct;11(10):1056–8.
7. Kono H, Kyogoku C, Suzuki T, Tsuchiya N, Honda H, Yamamoto K, et al. FcγRIIB Ile232Thr transmembrane polymorphism associated with human systemic lupus erythematosus decreases affinity to lipid rafts and attenuates inhibitory effects on B cell receptor signaling. *Hum Mol Genet*. 2005 Oct 1;14(19):2881–92.
8. Ravetch JV, Perussia B. Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J Exp Med*. 1989 Aug 1;170(2):481–97.
9. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood*. 1997 Aug 1;90(3):1109–14.
10. Salmon JE, Edberg JC, Kimberly RP. Fc gamma receptor III on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities. *J Clin Invest*. 1990 Apr;85(4):1287–95.
11. Kumanogoh A, Watanabe C, Lee I, Wang X, Shi W, Araki H, et al. Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling. *Immunity*. 2000 Nov;13(5):621–31.
12. Ishida I, Kumanogoh A, Suzuki K, Akahani S, Noda K, Kikutani H. Involvement of CD100, a lymphocyte semaphorin, in the activation of the human immune system via CD72: implications for the regulation of immune and inflammatory responses. *Int Immunol*. 2003 Aug;15(8):1027–34.
13. Hitomi Y, Tsuchiya N, Kawasaki A, Ohashi J, Suzuki T, Kyogoku C, et al. CD72 polymorphisms associated with alternative splicing modify susceptibility to human systemic lupus erythematosus through epistatic interaction with FCGR2B. *Hum Mol Genet*. 2004 Dec 1;13(23):2907–17.
14. Hitomi Y, Adachi T, Tsuchiya N, Honda Z-I, Tokunaga K, Tsubata T. Human CD72 splicing isoform responsible for resistance to systemic lupus erythematosus regulates serum immunoglobulin level and is localized in endoplasmic reticulum. *BMC Immunol*. 2012;13:72.
15. Bera O, Cesaire R, Quelvennec E, Quillivic F, De Chavigny V, Ribal C, et al. HLA class I and class II allele and haplotype diversity in Martinicans. *Tissue Antigens*. 2001 Mar 1;57(3):200–7.

16. Deligny C, Thomas L, Dubreuil F, Théodose C, Garsaud AM, Numéric P, et al. [Systemic lupus erythematosus in Martinique: an epidemiologic study]. *Rev Médecine Interne Fondée Par Société Natl Francaise Médecine Interne*. 2002 Jan;23(1):21–9.
17. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinforma Oxf Engl*. 2005 Jan 15;21(2):263–5.
18. Warmerdam PA, van de Winkel JG, Vlug A, Westerdaal NA, Capel PJ. A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma receptor II is critical for human IgG2 binding. *J Immunol*. 1991 Aug 15;147(4):1338–43.
19. Salmon JE, Edberg JC, Brogle NL, Kimberly RP. Allelic polymorphisms of human Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB. Independent mechanisms for differences in human phagocyte function. *J Clin Invest*. 1992 Apr 1;89(4):1274–81.
20. International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus Genetics (SLEGEN), Harley JB, Alarcón-Riquelme ME, Criswell LA, Jacob CO, Kimberly RP, et al. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PTK, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet*. 2008 Feb;40(2):204–10.
21. Vigato-Ferreira ICC, Toller-Kawahisa JE, Pancoto JAT, Mendes-Junior CT, Martinez EZ, Donadi EA, et al. FcγRIIa and FcγRIIIb polymorphisms and associations with clinical manifestations in systemic lupus erythematosus patients. *Autoimmunity*. 2014 Nov 1;47(7):451–8.
22. Yun HR, Koh HK, Kim SS, Chung WT, Kim DW, Hong KP, et al. FcγRIIIa/IIIA polymorphism and its association with clinical manifestations in Korean lupus patients. *Lupus*. 2001;10(7):466–72.
23. Kobayashi T, Ito S, Yasuda K, Kuroda T, Yamamoto K, Sugita N, et al. The combined genotypes of stimulatory and inhibitory Fc gamma receptors associated with systemic lupus erythematosus and periodontitis in Japanese adults. *J Periodontol*. 2007 Mar;78(3):467–74.
24. Karassa FB, Bijl M, Davies KA, Kallenberg CGM, Khamashta MA, Manger K, et al. Role of the Fcγ receptor IIA polymorphism in the antiphospholipid syndrome: an international meta-analysis. *Arthritis Rheum*. 2003 Jul;48(7):1930–8.
25. Salmon JE, Millard S, Schachter LA, Arnett FC, Ginzler EM, Gourley MF, et al. Fc gamma RIIA alleles are heritable risk factors for lupus nephritis in African Americans. *J Clin Invest*. 1996 Mar 1;97(5):1348–54.
26. Edberg JC, Langefeld CD, Wu J, Moser KL, Kaufman KM, Kelly J, et al. Genetic linkage and association of Fcγ receptor IIIA (CD16A) on chromosome 1q23 with human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2002 Aug;46(8):2132–40.
27. Manger K, Repp R, Jansen M, Geisselbrecht M, Wassmuth R, Westerdaal N a. C, et al. Fcγ receptor IIA, IIIa, and IIIb polymorphisms in German patients with systemic lupus erythematosus: association with clinical symptoms. *Ann Rheum Dis*. 2002 Sep;61(9):786–92.
28. Norsworthy P, Theodoridis E, Botto M, Athanassiou P, Beynon H, Gordon C, et al. Overrepresentation of the Fcγ receptor type IIA R131/R131 genotype in caucasoid systemic lupus erythematosus patients with autoantibodies to C1q and glomerulonephritis. *Arthritis Rheum*. 1999 Sep;42(9):1828–32.
29. Magnusson V, Johanneson B, Lima G, Odeberg J, Alarcón-Segovia D, Alarcón-Riquelme ME, et al. Both risk alleles for FcγRIIA and FcγRIIIA are susceptibility factors for SLE: a unifying hypothesis. *Genes Immun*. 2004 Mar;5(2):130–7.

30. Kyogoku C, Tsuchiya N, Wu H, Tsao BP, Tokunaga K. Association of Fcγ receptor IIA, but not IIB and IIIA, polymorphisms with systemic lupus erythematosus: A family-based association study in Caucasians. *Arthritis Rheum*. 2004 Feb;50(2):671–3.
31. Siriboonrit U, Tsuchiya N, Sirikong M, Kyogoku C, Bejrachandra S, Suthipinittharm P, et al. Association of Fcγ receptor IIb and IIIb polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. *Tissue Antigens*. 2003 May;61(5):374–83.
32. Lee HS, Chung YH, Kim TG, Kim TH, Jun JB, Jung S, et al. Independent association of HLA-DR and FCγ receptor polymorphisms in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Oxf Engl*. 2003 Dec;42(12):1501–7.
33. Kyogoku C, Dijstelbloem HM, Tsuchiya N, Hatta Y, Kato H, Yamaguchi A, et al. Fcγ receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: contribution of FCGR2B to genetic susceptibility. *Arthritis Rheum*. 2002 May;46(5):1242–54.
34. Bazilio AP, Viana VST, Toledo R, Woronik V, Bonfá E, Monteiro RC. Fc γ receptor RIIa polymorphism: a susceptibility factor for immune complex-mediated lupus nephritis in Brazilian patients. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2004 Jun;19(6):1427–31.
35. Yap SN, Phipps ME, Manivasagar M, Tan SY, Bosco JJ. Human Fc γ receptor IIA (FcγRIIA) genotyping and association with systemic lupus erythematosus (SLE) in Chinese and Malays in Malaysia. *Lupus*. 1999;8(4):305–10.
36. Sato A, Sato Y, Uchida S. Regulation of regional cerebral blood flow by cholinergic fibers originating in the basal forebrain. *Int J Dev Neurosci Off J Int Soc Dev Neurosci*. 2001 Jun;19(3):327–37.
37. Hatta Y, Tsuchiya N, Ohashi J, Matsushita M, Fujiwara K, Hagiwara K, et al. Association of Fc γ receptor IIIB, but not of Fc γ receptor IIA and IIIA polymorphisms with systemic lupus erythematosus in Japanese. *Genes Immun*. 1999 Sep;1(1):53–60.
38. Chu ZT, Tsuchiya N, Kyogoku C, Ohashi J, Qian YP, Xu SB, et al. Association of Fcγ receptor IIb polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Chinese: a common susceptibility gene in the Asian populations. *Tissue Antigens*. 2004 Jan;63(1):21–7.
39. Wu J, Edberg JC, Redecha PB, Bansal V, Guyre PM, Coleman K, et al. A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest*. 1997 Sep 1;100(5):1059–70.
40. Niederer HA, Clatworthy MR, Willcocks LC, Smith KGC. FcγRIIB, FcγRIIIB, and systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Jan;1183:69–88.
41. Brown EE, Edberg JC, Kimberly RP. Fc receptor genes and the systemic lupus erythematosus diathesis. *Autoimmunity*. 2007 Dec;40(8):567–81.
42. Jönsen A, Gunnarsson I, Gullstrand B, Svenungsson E, Bengtsson AA, Nived O, et al. Association between SLE nephritis and polymorphic variants of the CRP and FcγRIIIa genes. *Rheumatol Oxf Engl*. 2007 Sep;46(9):1417–21.
43. Dong C, Ptacek TS, Redden DT, Zhang K, Brown EE, Edberg JC, et al. Fcγ Receptor IIIa Single-Nucleotide Polymorphisms and Haplotypes Affect Human IgG Binding and Are Associated With Lupus Nephritis in African Americans. *Arthritis Rheumatol*. 2014 May 1;66(5):1291–9.
44. Bux J. Human neutrophil alloantigens. *Vox Sang*. 2008 May;94(4):277–85.
45. Hong CH, Lee JS, Lee HS, Bae SC, Yoo DH. The association between fcγRIIIB polymorphisms and systemic lupus erythematosus in Korea. *Lupus*. 2005;14(5):346–50.

46. Dijkstra HM, Bijl M, Fijnheer R, Scheepers RH, Oost WW, Jansen MD, et al. Fcγ receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus: association with disease and in vivo clearance of immune complexes. *Arthritis Rheum.* 2000 Dec;43(12):2793–800.
47. Chen J-Y, Wang CM, Ma C-C, Luo S-F, Edberg JC, Kimberly RP, et al. Association of a transmembrane polymorphism of Fcγ receptor IIb (FCGR2B) with systemic lupus erythematosus in Taiwanese patients. *Arthritis Rheum.* 2006;54(12):3908–17.
48. Magnusson V, Zuneć R, Odeberg J, Sturfelt G, Truedsson L, Gunnarsson I, et al. Polymorphisms of the Fc gamma receptor type IIB gene are not associated with systemic lupus erythematosus in the Swedish population. *Arthritis Rheum.* 2004 Apr;50(4):1348–50.
49. Li X, Wu J, Carter RH, Edberg JC, Su K, Cooper GS, et al. A novel polymorphism in the Fcγ receptor IIB (CD32B) transmembrane region alters receptor signaling. *Arthritis Rheum.* 2003 Nov 1;48(11):3242–52.
50. Jeon J-Y, Kim K-Y, Kim B-S, Jung J-Y, Kim H-A, Suh C-H. <i>FcγRIIB</i> Gene Polymorphisms Are Associated with Disease Risk and Clinical Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus in Koreans. *Tohoku J Exp Med.* 2015;236(3):185–91.
51. Pradhan V, Patwardhan M, Nadkarni A, Ghosh K. Fc γ R IIB gene polymorphisms in Indian systemic lupus erythematosus (SLE) patients. *Indian J Med Res.* 2011 Aug;134:181–5.
52. Waisberg M, Tarasenko T, Vickers BK, Scott BL, Willcocks LC, Molina-Cruz A, et al. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus protects against cerebral malaria in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jan 18;108(3):1122–7.
53. Clatworthy MR, Willcocks L, Urban B, Langhorne J, Williams TN, Peshu N, et al. Systemic lupus erythematosus-associated defects in the inhibitory receptor FcγRIIb reduce susceptibility to malaria. *Proc Natl Acad Sci.* 2007 Apr 24;104(17):7169–74.
54. Willcocks LC, Carr EJ, Niederer HA, Rayner TF, Williams TN, Yang W, et al. A defuncting polymorphism in FCGR2B is associated with protection against malaria but susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Apr 27;107(17):7881–5.

	Patients (n=131)	Healthy control (n=120)	$\chi^2(P)$
Males n(%)	11(8.4)	11(9.17)	
Females n(%)	120(91.6)	109(90.83)	0.046(0.82)
Age means+-SD	49,11+-14,77	53+-18,10	

Table 1 : patients and healthy control distribution

		Patients (n=131)	Controls (n=120)	P	OR
Genotype frequency no(%)					
FcγRIIa	H/H	30(22.09)	25(21)		
	R/H	56(42.75)	60(50)		
	R/R	45(34.35)	35(29)	0.546	
FcγRIIb	I/I	73(55.73)	74(62)		
	I/T	36(27.48)	24(20)		
	T/T	22(16.79)	22(18)	0.394	
FcγRIIIa	F/F	59(45.38)	38(31.6)		
	F/V	30(23.8)	35(29.2)		
	V/V	41(31.54)	47(39.2)	0.09	
FcγRIIIb	Na1/Na1	42(32.56)	17(14.2)		2.829
	Na1/Na2	84(65.12)	87(72.5)		
	Na2/Na2	3(2.33)	14(11.7)		0.184
	Nul	2(1.52)	2(1.6)	0.0002*	
Allele frequency no(%)					
FcγRIIa	H	116(44.27)	110(45.8)		
	R	146(55.73)	130(54.2)	0.732	
FcγRIIb	I	182(69.47)	172(71.7)		
	T	80(30.53)	68(28.3)	0.49	
FcγRIIIa	F	148(56.48)	111(46.3)		
	V	112(43.08)	129(53.7)	0.021*	
FcγRIIIb	Na1	168(64.62)	121(50)		1.75
	Na2	90(34.62)	115(48)	0.0018*	0.568
allele carrier frequency no(%)					
FcγRIIa	R	86(65.65)	85(70.8)		
	H	101(77.1)	95(79.2)	0.818	
FcγRIIb	I	109(83.21)	98(81.7)		
	T	58(44.27)	46(38.3)	0.543	
FcγRIIIa	F	89(67.94)	73(60.8)		
	V	71(54.2)	82(68.3)	0.144	
FcγRIIIb	Na1	126(97.67)	104(86.7)		
	Na2	87(67.44)	101(84.2)	0.084	

Table 2 :distribution of FcγR polymorphism in Martinican lupus and controls

		LN (n=56)	w/o LN (n=46)	Control (n=120)	P	OR
Genotype frequency no(%)						
FcyRIIa	H/H	9(16.07)	11(23.9)	25(21)	0.016*	3.41
	H/R	18(32.14)	24(52.2)	60(50)		
	R/R	29(51.17)	11(23.9)	35(29)		
FcyRIIb	I/I	30(53.57)	25(54.3)	74(62)	0.99	
	I/T	16(28.57)	13(28.3)	24(20)		
	T/T	10(17.85)	8(17.4)	22(18)		
FcyRIIIa	FF	21(37.5)	25(54.3)	38(31.6)	0.12	
	FV	13(23.21)	10(21.7)	35(29.2)		
	VV	22(39.28)	10(21.7)	47(39.2)		
FcyRIIIb	Na1/Na1	20(35.71)	12(26.08)	17(14.2)	0.6	
	Na1/Na2	35(62.5)	31(67.4)	87(72.5)		
	Na2/Na2	1(1.7)	1(2.2)	14(11.7)		
	Nul	0(0)	2	2(1.6)		
Allele frequency no (%)						
FcyRIIa	H	36(32.14)	46(50)	110(45.8)	0.009*	2.11
	R	76(67.85)	46(50)	130(54.2)		
FcyRIIb	I	76(67.85)	63(68.5)	172(71.7)	0.924	
	T	36(32.14)	29(31.5)	68(28.3)		
FcyRIIIa	F	55(49.10)	60(66.6)	111(46.3)	0.012*	2.07
	V	57(51)	30(33.3)	129(53.7)		
FcyRIIIb	Na1	75(66.9)	75(69.5)	121(50)	0.69	
	Na2	37(31.25)	33(30.5)	115(48)		
Allele carrier frequency no(%)						
FcyRIIa	H	27(48.2)	35(76.1)	85(70.8)	0.101	
	R	47(83.9)	35(76.1)	95(79.2)		
FcyRIIb	I	46(82.1)	38(82.6)	98(81.7)	0.95	
	T	26(46.4)	21(45.7)	46(38.3)		
FcyRIIIa	F	34(60.7)	35(76.1)	73(60.8)	0.109	
	V	35(62.5)	20(43.5)	82(68.3)		
FcyRIIIb	Na1	55(98.21)	43(93.5)	104(86.7)	0.68	
	Na2	36(64.3)	32(69.6)	101(84.2)		

Table 3 : Genotype and alleles frequencies of FCGR in LN and lupus without nephritis.

	SLE	LN	w/o nephritis	Cte	OR1	OR
Ila-IIIa						
H-F	51(23.5)	12(13.0)	26(31.7)	44(19.3)	0.32	
H-V	49(22.6)	22(24)	15(18.3)	63(27.6)	1.4	0.58
R-F	69(31.8)	30(32.6)	28(34.14)	60(26.3)		
R-V	48(22.1)	28(30.4)	13(15.8)	61(26.7)	2.32	0.51
<i>p-Value</i>	0.24	0.38	0.01*			
<i>p-Value1</i>		0.0093*				
Ila-IIIb						
H-NA1	78(27)	26(18)	34(30)	75(24)		
H-NA2	57(20)	43(29)	25(22)	69(22)		
R-NA1	91(32)	47(32)	33(29)	80(26)		
R-NA2	60(21)	30(21)	22(19)	83(27)		
<i>p-Value</i>	0.18	0.075	0.3619			
<i>p-Value1</i>		0.146				
IIIa-IIIb						
F-NA1	81(32)	34(30)	32(36)	62(23)		
F-NA2	52(21)	20(18)	22(25)	60(23)		
V-NA1	67(27)	34(30)	19(21)	73(28)		
V-NA2	50(20)	25(22)	16(18)	69(26)		
<i>p-Value</i>	0.11	0.395	0.076			
<i>p-Value1</i>		0.311				

Table 4: alleles association distribution in SLE, LN and lupus without nephritis

p: calculated vs healthy individuals

p1: calculated between LN and LWN

Cte: healthy controls

OR calculated against control

OR1 calculated between LN and W/O LN

	Total SLE (n=126)	SLE with nephritis (n=56)	SLE without nephritis (n=46)	Healthy controls (n=120)
Genotype frequency				
Hap1 /Hap1	11(9.2)	6(10.7)	3(6.5)	22(18.3)
Hap1 /Hap2	67(52.6)	30(53.6)	24(52.2)	51(42.5)
Hap2 /Hap2	48(38.2)	20(35.7)	19(41.3)	47(39.2)
<i>p-Value</i>	0.057	0.282	0.149	
<i>p-Value 1</i>		0.69		
Allele frequency				
Hap1	89(35.5)	42(37.5)	30(32.6)	95(39.6)
Hap2	163(64.5)	70(62.5)	62(67.4)	145(60.4)
<i>p-Value</i>	0.32	0.7	0.2	
<i>p-Value 1</i>		0.46		
Allele carrier frequency				
Hap 1	78(61.8)	36(64.3)	27(58.7)	73(60.8)
Hap 2	115 (91)	50(89.3)	43(93.4)	98(81.6)
<i>p-Value</i>	0.6	0.89	0.55	
<i>p-Value 1</i>		0.67		

Table 5 : haplotypes and allele frequencies distribution of CD72.

p:calculated against healthy controls

p1:calculated between SLE with and without nephritis.

II	FcyRIIb-II				FcyRIIb-IT				FcyRIIb-TT			
	SLE	ln	lwn	Cte	SLE	ln	lwn	Cte	SLE	ln	lwn	Cte
	70									10		
Genotype frequency												
Hap1 /Hap1	7	3	3	15	2	1	0	5	2	2	0	2
Hap1 /Hap2	41	18	13	32	17	8	6	18	9	4	5	11
Hap2 /Hap2	22	9	9	27	16	7	7	11	10	4	3	9
<i>p-value</i>	0.051	0.4	0.5			0.58	0.2			0.68	0.49	
<i>p-Value 1</i>		0.8				0.5				0.22		
Allele frequency												
Hap1	55	24	19	62	21	10	6	28	13	8	5	15
Hap2	85	36	31	86	49	22	20	40	29	12	11	29
<i>p-value</i>	0.65	0.8	0.62		0.17	0.34	0.10		0.75	0.65	0.83	
<i>p-Value 1</i>		0.83				0.49				0.59		
Allele carrier frequency												
Hap 1	48	21	16	47	19	9	6	23	11	6	5	13
Hap 2	63	27	22	59	33	15	13	29	19	8	8	20
<i>p-value</i>	0.87	0.94	0.81		0.42	0.58	0.34		0.82	0.82	0.95	
<i>p-Value 1</i>		0.87				0.68				0.81		

Table 6: distribution of CD72 haplotypes in FcyRIIb genotypes

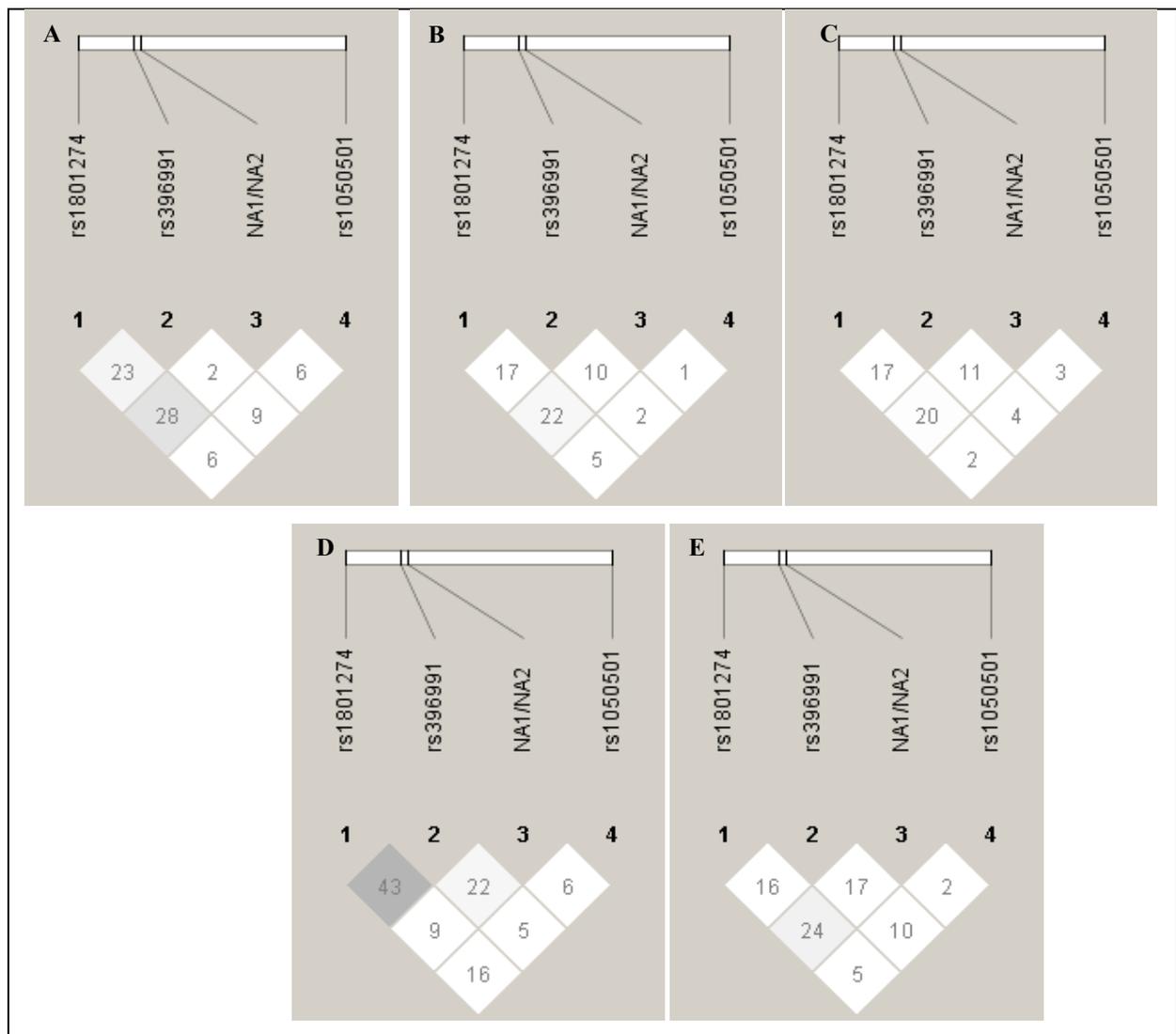


Figure 1: LD plot of *FCGR* genetic pair-wise D' values observed are shown within the diagonal boxes (A)Healthy control, (B) patients (C) SLE , (D) SLE with nephritis, (E) SLE without nephritis

Article 3: Human FcγR in
Martinican with Multiple
Sclerosis and Neuromyelitis
Optica

Human FcγR in Martinican with Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica

**Fatima-Ezzahra RADOUANI^a, Georges DOS SANTOS^{a,b}, Fabienne DANTIN^c,
Raymond CESAIRE^{a,b,c}, Maryvonne DUEYMES^d, Philippe CABRE^e**

^a EA 4537 “ Maladies Infectieuses et tropicales dans la Caraïbe“ Université des Antilles. Laboratoire de virologie du Centre Hospitalier Universitaire de Martinique, Fort de France, Martinique.

^b Laboratoire de virologie, Centre Hospitalier Universitaire de Martinique, Fort de France, Martinique.

^c Laboratoire d’immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Martinique, Fort de France, Martinique.

^d Laboratoire d’immunologie, Centre Hospitalier Andrée ROSEMON, Cayenne, Guyane.

^e Département de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire de Martinique, Fort de France, Martinique.

Maryvonne DUEYMES and Philippe CABRE. Seniors authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Maryvonne DUEYMES, Laboratoire d’immunologie, Centre Hospitalier Andrée ROSEMON, Cayenne, Guyane, Phone : 00596696014439 ; maryvonne.dueymes@chu-fortdefrance.fr

Funding: This work was supported by “FEDER-UE-CR Martinique” in the field of CARNOMAD II, N°33142.

Abstract

Multiple sclerosis (MS) and neuromyelitis optica (NMO) are inflammatory demyelinating diseases (IDDs) of the central nervous system (CNS). We investigated in an Afro-Caribbean population, associations of receptors of Fc portion of IgG of (FcγRs) with the risk of MS and NMO. We showed in MS a significant increase in homozygous FcγRIIa-131R (42 % vs healthy controls 29%, $p<0.05$) and a significant decrease in homozygous FcγRIIIb-NA2 (2% vs healthy controls 11 %, $p=0.018$). Likewise, a significant increase of FcγRIIb-232T allele was observed in NMO when compared to healthy controls (39% vs 28.3%, $p=0.016$). The difference of associated polymorphisms of FcγRs in MS and NMO underlines the physiopathological differences between these two IDD of CNS.

Keywords

FcγR, Multiple sclerosis, neuromyelitis optica, I232T genotype, afro-Caribbean

1 Introduction

Neuromyelitis optica (NMO) and Multiple Sclerosis (MS) are autoimmune inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system with unknown etiology. NMO has been considered to be a subtype of MS for a long time until the discovery of Anti-Aquaporin-4 Antibody (Jarius et al., 2007; Lennon et al., 2005, 2004; Matsuoka et al., 2007), which able to class NMO as a distinct entity. Immunity system appears to be involved in the demyelination and axonal damage (Cross et al., 2001; Wingerchuk et al., 2001). MS is considered to be a Th1 mediated disease while NMO is considered to be mainly a humoral disease.

Receptors of Fc portion of IgG (FcγRs) play an important role in linking humoral to cellular immune response and play a central role in homeostasis of immune system (Fossati et al., 2001). FcγRs have been thought to be involved in inflammatory process in microglial in CNS (Kieseier et al., 1999; Linington et al., 1988; Storch et al., 1998). In Human, there are three FcγR, the high affinity (FcγRI) and the low affinity (FcγRII, FcγRIII), each containing multiple distinct genes and alternative slicing variants (Kimberly et al., 1995). Several variants and polymorphisms were thought to be involved in auto-immunity disease, such as Systemic Lupus Erythematosus, Rheumatoid Arthritis, and Kawasaki disease (Harley et al., 2009; Raychaudhuri et al., 2009; Shrestha et al., 2012). *FcγRIII* exists in two alternative membrane forms (*FcγRIIIa* and *FcγRIIIb*), which result from cell type specific expression of the two genes (Ravetch and Perussia, 1989).

CD72 so called Lyb-2 is a 45 Kda type II transmembrane containing a C-type lectin domain protein expressed in most developmental stage of B cell except plasma cell, CD72 play a negative regulation role of BCR stimulated with IgM ou IgG (Ishida et al., 2003; Kumanogoh et al., 2000).

Traditionally, African Caribbean population from Martinique was considered to be protected against MS, but this dogma was contradicted, as incidence of MS (2.27/100 000) is nearby the incidence of MS in Caucasian's Population (Cabre et al., 2009, 2001) which increases the MS/NMO ratio (Cabre et al., 2005). In addition, NMO was described to be in high frequency in African population descent (Flanagan et al., 2016) compared to that observed in Caucasians (Asgari et al., 2011).

In this study, we estimated for the first time frequencies of FCGR2A, FCGR2B, FCGR3B (Figure 1), and CD72 polymorphisms in MS and NMO African Caribbean cohort.

2 Materials and methods

2.1 Subjects

Anticoagulated peripheral blood was obtained from 120 healthy volunteers, 90 NMO patients and 82 MS patients. Patients were recruited at the Neurological Department of the University Hospital of Martinique at Fort de France. All donors were self-reported originating from Martinique, living in Martinique and provided informed written consent. NMO patients fulfilled the most recent diagnostic criteria for NMO spectrum disorders (Wingerchuk et al., 2015). MS patients satisfied the 2010 Mc Donald criteria (Polman et al., 2011).

2.2 Genotyping of *FCGR2A* and *FCGR2B*

Genomic DNA was purified from peripheral blood mononuclear cells of healthy subjects using QIAamp DNA blood Maxi kit (Qiagen). For PCRs the following primers were used: 5'-CTGAGACTGAAAAACCCTTGGAATC-3' (forward) and 5'-GCTTGTGGGATGGAGAAGGTGGGATCCAAA-3' (reverse) for *FCGR2A*; 5'-CCTGCCTGCTCACAAATGTA-3' (forward) and 5'-CTGAAATCCGCTTTTTTCCTG-3' (reverse) for *FCGR2B* gene. PCRs were run in 50 µl containing 100 ng of DNA, 2,5 mM of MgCl₂, 200 µM of dNTPs, 0.4 µM each primer and 1,25 unit of AmpliTaq Gold 360 Polymerase (Applied Biosystems). Cycling conditions were: an initial denaturation at 95°C for 10 min, 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C (for *FCGR2B* primers) or 50°C (for *FCGR2A* primers) for 1 min, and extension at 72°C for 1 min and a final extension at 72°C for 7 min. The amplified DNA fragments of 231 bp (*FCGR2A*), 350 bp (*FCGR2B*) were visualized in a 2% agarose gel containing Midori Green staining. PCR products were purified and sequenced using the BigDye Terminators v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing kit. Sequences were run on ABI 3500 capillary sequencer, and analyzed using SeqScape version 2.7.

2.3 *FCGR3B* allotyping (NA1 and NA2)

The NA1 and NA2 allotypes were amplified using forward allotype specific primers, 5'-CAGTGGTTTCACAATGAGAA-3' for NA1 and 5'-CCATGGTACAGCGTGCTT-3' for NA2 and a (reverse) common primer 5'-ATGGAATTCTAGCTGCAC 3'. PCRs were run as previously described. The cycling conditions were: an initial denaturation at 95°C for 10 min, 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 50°C (NA1 primers) or 55°C (NA2

primers) for 1 min , and extension at 72°C for 1 min and a final extension at 72°C for 7 min. The amplified DNA fragments of 141 bp (NA1) and 219 bp (NA2) were separated on a 2% agarose gel and visualized by Midori Green staining.

2.4 Fragment analysis of CD72

The 13 nucleotides repeat in the intron 8 used as haplotype's tag, was studied using simple sequence repeat-PCR using primers 6-Fam-5'-TTGGTAAGAGTGAGGGATGG-3' (forward) and 5'-TACAAGTTTTCTCTCGGGCC-3' (reverse).PCRs were run in 50 µl containing 100 ng of DNA, 2,5 mM of MgCl₂ , 200 µM of dNTPs, 0.4 µM each primer and 1,25 unit of AmpliTaq Gold 360 Polymerase (Applied Biosystems). Cycling conditions were: an initial activation step for 10 min at 95°C, 40 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 1 min and extension at 72°C for 1min and a final extension at 72°C for 7 min. PCR products were separated on a 2% agarose gel and visualized by Midori Green staining. PCR products were diluted (1/10, 1/100). From these dilutions 0.5 µl were combined with 9 µl of HiDi™formamide (Applied Biosystems) and 0.5 µl of internal sizerGeneScan™ 400HD (Rox™DYE) STANDARD andrun onABI 3500 capillary sequencer. Analysis and sizing of PCR products were done using GeneMapper software (Applied Biosystems).

2.5 Statistical analysis

Allele frequencies were computed from the observed data and deviations of observed genotypic distributions from expected distribution based on Hardy-Weinberg law were tested using χ^2 test with 1 degree of freedom. For comparison of genotype distributions, a test of χ^2 was performed. When sample numbers were small, the Fisher's exact test was used. African Caribbean population was taken as reference group. *P-values* less than 0.05 were deemed as significant. Linkage disequilibria were also estimated for the four polymorphisms in the study population, using the Haploview softwareV4.2(Barrett et al., 2005).

3 Results

3.1 Patients and controls

A total of 82 patients with MS (12 males and 70 females), 90 patients with NMO (18 males and 72 females) and 120 unrelated healthy individuals (109 females and 11 males) were included (Table 1). Regarding AQP4 antibodies, 49 NMO patients (61.25%) were positive, 34 (37.8%) were negative and 7 (5.5%) still undetermined.

3.2 Genotypes Frequencies

Eighty two patients with MS, 90 with NMO and 120 healthy individuals were directly sequenced using BigDye 2.3 terminator sequencing kit on an ABI 3500 sequencer. Tables 2, 3, and 4 summarise, the genotype, allele, and alleles carrier frequencies of *FCGR2A*, *FCGR2B* and *FCGR3B*. As shown in Table 3, a significant increase of 232T allele was observed in NMO when compared to healthy controls (39% vs 28.3%, $p=0.016$). The Odds Ratio for 232T allele to development of NMO was 1.65 CI (1.09-2.49). However, no significant difference was observed in MS patients in comparison to controls for *FcγRIIb*.

In MS patients, genotype frequency of *FcγRIIa-R131H* was significantly different when compared to healthy individuals (Table 2) with an increase in homozygous *FcγR-131R* (42 %) versus healthy controls (29%, $p<0.05$). The odds ratio of homozygous *FcγRIIa-131R* to develop MS was 1.79 CI (1.01-3.17). However, when the comparison was made between MS and NMO, no significant difference was observed.

The *FCGR3B* NA1/NA2 genotypes distribution showed a difference between MS patients and healthy individuals since homozygous *FCGR3B-NA1* was observed in higher frequency in MS patients in comparison to healthy controls ($p=0.018$) (table 4). The OR for homozygous NA1 to develop MS was 1.26 CI (0.58-2.73) whereas, homozygous NA2 was shown to have a protective effect in healthy controls, OR=0.19 CI (0.04-0.86). However no significant differences were observed in the others groups.

3.2 Linkage disequilibrium

We next studied the linkage disequilibrium (LD) of *FCGR2A*, *FCGR2B* and *FCGR3B* in our population. *FCGR2B* was consistent to HWE ($p > 0.05$) only in NMO Aqp4+ and *FCGR3B* was not consistent to HWE in any group.

LD values were generated to look for an association among the three studied polymorphisms. Figure 2 represents graphic of LD measurements in term of D' by Halpoview. NMO patients LD analysis revealed r^2 between *FCGR2A* (rs1801274), *FCGR3B-NA1/NA2* and *FCGR2B* (rs1050501) were 0.051, 0.013 and 0.03 between *FCGR3B* and *FCGR2B*. In healthy individuals were 0.065, 0.001 and 0.02 a weak but significant LD was observed between *FCGR2A* and *FCGR3B*, in NMO patients and healthy controls. When groups were formed regarding Aqp4 status, in NMO Aqp4+, r^2 between *FCGR2A*, *FCGR3B* and *FCGR2B* were 0.10, 0.023 and 0.05 between *FCGR3B* and *FCGR2B*. A significant LD was observed between *FCGR2A* and *FCGR3B* and *FCGR2A* and *FCGR2B* in NMO Aqp4 positive. MS patients LD analysis revealed r^2 between *FCGR2A* (rs1801274) *FCGR3B-NA1/NA2* and *FCGR2B* (rs1050501) were 0.003, 0.011 and 0.005. In MS patients no LD was observed between the three polymorphisms.

3.3 Haplotypes frequencies

We next studied association of haplotypes in our cohort. *FCGR2B-FCGR3B* haplotypes did not differ between any groups but a null frequency of Homozygous 232I-NA2 haplotype was observed in MS patients vs Controls (0% vs 14%: $p < 0.05$) suggesting protective effect of this haplotype.

3.4 Distribution of CD72 haplotypes.

CD72 haplotypes frequencies were analyzed as well. No significant difference was observed in patients neither in comparison with healthy controls nor in comparison between patients groups (all p values $\sup 0.05$).

4 Discussion

In this study, we compared the distribution of *FcγRIIa*, *FcγRIIb*, *FcγRIIIb* and CD72 polymorphisms in Martinican groups of MS, NMO patients and ethnically matched healthy controls. Our results suggest in MS an association between homozygous *FcγRIIa*-131R allele and a protection of homozygous *FcγRIIIb*-NA2. In patients with demyelinating diseases, an overexpression of *FcγRII* and *FcγRIII* receptors in microglia was underlined (Ulvestad et al., 1994). In the MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis, the lack of *FcγRII* enhances susceptibility to demyelinating disease whereas the lack of *FcγRIII* seems to protect against disease (Robbie-Ryan et al., 2003). In *FCGR2A*, arginine (R) to histidine (H) change at 131 position (Clark et al., 1989) increases affinity to human IgG2 and 3 (Bruhns et al., 2009), and may lead to a different immune response. Two serologically defined alleles, NA1 and NA2, have been described. Homozygous NA1 has been described to exhibit a higher phagocytic capacity because it more efficient in binding immune complexes containing IgG1 and IgG3 than homozygous NA2 (Salmon et al., 1990). To date, the two studies that focused on *FcγRs* polymorphism in MS patients (Breij et al., 2003; Myhr et al., 1999), showed that neither *FcγRIIa*-R131H nor *FcγRIIIb*-NA1/NA2 were associated to MS. However, an association of disease outcome was found in the first study (Myhr et al., 1999) since homozygous *FcγRIIa*-131R was associated to a bad disease course in Norwegian MS patients, but not in Dutch. This difference may be the effect of ethnical differences, which make Comparison between our results and Dutch or Norwegians somehow complicated because of genetics differences. Indeed, in our healthy cohort, the frequency of homozygous R-131 is higher than in Dutch one (29% vs 24%). On the other hand, our team has shown in a previous study the homozygous *FcγRIIIb*-NA2 and NA2 allele occur more frequently in Caucasians than in Caribbeans, which can explain our discordance with previous findings.

We also demonstrated that the *FcγRIIb*-232T allele was higher in NMO patients in comparison to controls. In *FCGR2B*, a nonsynonymous T>C SNP (rs 1050501) that encodes an isoleucine (I) to threonine (T) substitution at 232 position in the transmembrane domain leads to impairment of inhibitory function through the exclusion of receptor from lipid raft (Floto et al., 2005; Kono et al., 2005). Anti-aqp4 is an IgG class 1, that can bind neutrophils, eosinophils, and macrophages which are abundant in NMO lesions in absence of complement which highlights the effect of *FcγRs* in NMO (Ratelade et al., 2012). Macrophages from *FcγRIIb*-232T/T show a greater phagocytic capacity than those expressing

232I/I or I/T. Taking together, 232T may promote pro-inflammatory reaction. It's acquired that the FcγRIIb-232T allele frequency vary depending on ethnicity (Chu et al., 2004; Kyogoku et al., 2002; Siriboonrit et al., 2003). In our population (African descent), a high frequency of T232 allele was shown, which enhances the power of association study. It's for great of interest to indicate that the 232T allele was not associated to SLE in our population. In spite of large sample size and the high occurrence of 232T allele in our population. However, we think that these results should be taken with great care and should be confirmed in a large sample to conclude firmly to an association of 232T and NMO. FcγRs genes constitute a clustered loci in chromosome 1, haplotypes analysis demonstrate a role of *FcγRIIIB-Na2*- containing haplotypes. When haplotype groups were formed, sample size of each group was drastically decreased, and was not sufficient to make the association study. Again, our cohort should be enlarged to have optimal size of sample in order to bring out a strong significant association of haplotypes and these two demyelinating diseases.

Genotypically, two major haplotype of CD72 have been described containing 1 or two repeats 13 nucleotides in intron 8 named haplotype 1 or 2 respectively; haplotype 2 seems to decrease risk for human SLE conferred by FcγRIIb T/T 232 (Hitomi et al. 2004) by increasing a alternative splicing that leads to a more longer protein which still in Reticulum endoplasmic and provoke apoptosis in the B cell (Hitomi et al., 2012). When CD72 haplotypes distribution were analyzed, no differences were observed between NMO and healthy controls; this results suggests that the difference in effect of FcγRIIb-232T between NMO and controls is not modified by Hap2 effect.

In conclusion, this study highlights the association of some FcγRs polymorphisms and demyelinating autoimmune diseases; the difference of associated polymorphisms in MS and NMO underlines the physiopathological differences between MS and NMO.

5 conflicts of interest

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose.

6 Acknowledgements

The authors thank the Martinique DRCI Staff for their help to obtain financial support.

Cedric Contaret as Research Clinician Assistant involved in CARNOMAD II study

5 References

- Asgari, N., Owens, T., Frøkiær, J., Stenager, E., Lillevang, S.T., Kyvik, K.O., 2011. Neuromyelitis optica (NMO) – an autoimmune disease of the central nervous system (CNS). *Acta Neurol. Scand.* 123, 369–384. doi:10.1111/j.1600-0404.2010.01416.x
- Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J., Daly, M.J., 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 21, 263–265. doi:10.1093/bioinformatics/bth457
- Breijl, E.C.W., van der Pol, W.-L., van Winsen, L., Jansen, M.D., Dijkstra, C.D., van de Winkel, J.G.J., Uitdehaag, B.M.J., 2003. No association of Fc gamma RIIa, Fc gamma RIIIa and Fc gamma RIIIb polymorphisms with MS. *J. Neuroimmunol.* 140, 210–215.
- Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D.A., Fernandez, N., Jorieux, S., Daëron, M., 2009. Specificity and affinity of human Fc gamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113, 3716–3725. doi:10.1182/blood-2008-09-179754
- Cabre, P., González-Quevedo, A., Bonnan, M., Saiz, A., Olindo, S., Graus, F., Smadja, D., Merle, H., Thomas, L., Cabrera-Gomez, J.A., 2009. Relapsing neuromyelitis optica: long term history and clinical predictors of death. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 80, 1162–1164. doi:10.1136/jnnp.2007.143529
- Cabre, P., Heinzlef, O., Merle, H., Buisson, G.G., Bera, O., Bellance, R., Vernant, J.C., Smadja, D., 2001. MS and neuromyelitis optica in Martinique (French West Indies). *Neurology* 56, 507–514.
- Cabre, P., Signate, A., Olindo, S., Merle, H., Caparros-Lefebvre, D., Béra, O., Smadja, D., 2005. Role of return migration in the emergence of multiple sclerosis in the French West Indies. *Brain J. Neurol.* 128, 2899–2910. doi:10.1093/brain/awh624
- Chu, Z.T., Tsuchiya, N., Kyogoku, C., Ohashi, J., Qian, Y.P., Xu, S.B., Mao, C.Z., Chu, J.Y., Tokunaga, K., 2004. Association of Fc gamma receptor IIb polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Chinese: a common susceptibility gene in the Asian populations. *Tissue Antigens* 63, 21–27.
- Clark, M.R., Clarkson, S.B., Ory, P.A., Stollman, N., Goldstein, I.M., 1989. Molecular basis for a polymorphism involving Fc receptor II on human monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 143, 1731–1734.
- Cross, A.H., Trotter, J.L., Lyons, J., 2001. B cells and antibodies in CNS demyelinating disease. *J. Neuroimmunol.* 112, 1–14.
- Flanagan, E.P., Cabre, P., Weinshenker, B.G., St Sauver, J., Jacobson, D.J., Majed, M., Lennon, V.A., Lucchinetti, C.F., McKeon, A., Matiello, M., Kale, N., Wingerchuk, D.M., Mandrekar, J., Sagen, J.A., Fryer, J.P., Borders Robinson, A., Pittock, S.J., 2016. Epidemiology of aquaporin-4 autoimmunity and neuromyelitis optica spectrum. *Ann. Neurol.* doi:10.1002/ana.24617
- Floto, R.A., Clatworthy, M.R., Heilbronn, K.R., Rosner, D.R., MacAry, P.A., Rankin, A., Lehner, P.J., Ouwehand, W.H., Allen, J.M., Watkins, N.A., Smith, K.G.C., 2005. Loss of function of a lupus-associated Fc gamma RIIb polymorphism through exclusion from lipid rafts. *Nat. Med.* 11, 1056–1058. doi:10.1038/nm1288
- Fossati, G., Bucknall, R.C., Edwards, S.W., 2001. Fc gamma receptors in autoimmune diseases. *Eur. J. Clin. Invest.* 31, 821–831. doi:10.1046/j.1365-2362.2001.00881.x
- Harley, I.T.W., Kaufman, K.M., Langefeld, C.D., Harley, J.B., Kelly, J.A., 2009. Genetic susceptibility to SLE: new insights from fine mapping and genome-wide association studies. *Nat. Rev. Genet.* 10, 285–290. doi:10.1038/nrg2571
- Hitomi, Y., Adachi, T., Tsuchiya, N., Honda, Z.-I., Tokunaga, K., Tsubata, T., 2012. Human CD72 splicing isoform responsible for resistance to systemic lupus erythematosus

- regulates serum immunoglobulin level and is localized in endoplasmic reticulum. *BMC Immunol.* 13, 72. doi:10.1186/1471-2172-13-72
- Hitomi, Y., Tsuchiya, N., Kawasaki, A., Ohashi, J., Suzuki, T., Kyogoku, C., Fukazawa, T., Bejrachandra, S., Siriboonrit, U., Chandanayingyong, D., Suthipinittharm, P., Tsao, B.P., Hashimoto, H., Honda, Z., Tokunaga, K., 2004. CD72 polymorphisms associated with alternative splicing modify susceptibility to human systemic lupus erythematosus through epistatic interaction with FCGR2B. *Hum. Mol. Genet.* 13, 2907–2917. doi:10.1093/hmg/ddh318
- Ishida, I., Kumanogoh, A., Suzuki, K., Akahani, S., Noda, K., Kikutani, H., 2003. Involvement of CD100, a lymphocyte semaphorin, in the activation of the human immune system via CD72: implications for the regulation of immune and inflammatory responses. *Int. Immunol.* 15, 1027–1034.
- Jarius, S., Paul, F., Franciotta, D., Aktas, O., Hohlfeld, R., Zipp, F., Vincent, A., 2007. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica--incorporation of NMO-IgG status. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 3, E1. doi:10.1038/ncpneuro0501
- Kieseier, B.C., Storch, M.K., Archelos, J.J., Martino, G., Hartung, H.P., 1999. Effector pathways in immune mediated central nervous system demyelination. *Curr. Opin. Neurol.* 12, 323–336.
- Kimberly, R.P., Salmon, J.E., Edberg, J.C., 1995. Receptors for immunoglobulin G. Molecular diversity and implications for disease. *Arthritis Rheum.* 38, 306–314.
- Kono, H., Kyogoku, C., Suzuki, T., Tsuchiya, N., Honda, H., Yamamoto, K., Tokunaga, K., Honda, Z.-I., 2005. FcγRIIB Ile232Thr transmembrane polymorphism associated with human systemic lupus erythematosus decreases affinity to lipid rafts and attenuates inhibitory effects on B cell receptor signaling. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2881–2892. doi:10.1093/hmg/ddi320
- Kumanogoh, A., Watanabe, C., Lee, I., Wang, X., Shi, W., Araki, H., Hirata, H., Iwahori, K., Uchida, J., Yasui, T., Matsumoto, M., Yoshida, K., Yakura, H., Pan, C., Parnes, J.R., Kikutani, H., 2000. Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling. *Immunity* 13, 621–631.
- Kyogoku, C., Dijstelbloem, H.M., Tsuchiya, N., Hatta, Y., Kato, H., Yamaguchi, A., Fukazawa, T., Jansen, M.D., Hashimoto, H., van de Winkel, J.G.J., Kallenberg, C.G.M., Tokunaga, K., 2002. Fcγ receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: contribution of FCGR2B to genetic susceptibility. *Arthritis Rheum.* 46, 1242–1254. doi:10.1002/art.10257
- Lennon, V.A., Kryzer, T.J., Pittock, S.J., Verkman, A.S., Hinson, S.R., 2005. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J. Exp. Med.* 202, 473–477. doi:10.1084/jem.20050304
- Lennon, V.A., Wingerchuk, D.M., Kryzer, T.J., Pittock, S.J., Lucchinetti, C.F., Fujihara, K., Nakashima, I., Weinshenker, B.G., 2004. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet Lond. Engl.* 364, 2106–2112. doi:10.1016/S0140-6736(04)17551-X
- Linington, C., Bradl, M., Lassmann, H., Brunner, C., Vass, K., 1988. Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am. J. Pathol.* 130, 443–454.
- Matsuoka, T., Matsushita, T., Kawano, Y., Osoegawa, M., Ochi, H., Ishizu, T., Minohara, M., Kikuchi, H., Mihara, F., Ohyagi, Y., Kira, J., 2007. Heterogeneity of aquaporin-4 autoimmunity and spinal cord lesions in multiple sclerosis in Japanese. *Brain J. Neurol.* 130, 1206–1223. doi:10.1093/brain/awm027

- Myhr, K.M., Raknes, G., Nyland, H., Vedeler, C., 1999. Immunoglobulin G Fc-receptor (FcγR) IIA and IIIB polymorphisms related to disability in MS. *Neurology* 52, 1771–1776.
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J.A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F.D., Montalban, X., O'Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A.J., Waubant, E., Weinshenker, B., Wolinsky, J.S., 2011. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann. Neurol.* 69, 292–302. doi:10.1002/ana.22366
- Ratelade, J., Zhang, H., Saadoun, S., Bennett, J.L., Papadopoulos, M.C., Verkman, A.S., 2012. Neuromyelitis optica IgG and natural killer cells produce NMO lesions in mice without myelin loss. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 123, 861–872. doi:10.1007/s00401-012-0986-4
- Ravetch, J.V., Perussia, B., 1989. Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J. Exp. Med.* 170, 481–497.
- Raychaudhuri, S., Thomson, B.P., Remmers, E.F., Eyre, S., Hinks, A., Guiducci, C., Catanese, J.J., Xie, G., Stahl, E.A., Chen, R., Alfredsson, L., Amos, C.I., Ardlie, K.G., BIRAC Consortium, Barton, A., Bowes, J., Burtt, N.P., Chang, M., Coblyn, J., Costenbader, K.H., Criswell, L.A., Crusius, J.B.A., Cui, J., De Jager, P.L., Ding, B., Emery, P., Flynn, E., Harrison, P., Hocking, L.J., Huizinga, T.W.J., Kastner, D.L., Ke, X., Kurreeman, F.A.S., Lee, A.T., Liu, X., Li, Y., Martin, P., Morgan, A.W., Padyukov, L., Reid, D.M., Seielstad, M., Seldin, M.F., Shadick, N.A., Steer, S., Tak, P.P., Thomson, W., van der Helm-van Mil, A.H.M., van der Horst-Bruinsma, I.E., Weinblatt, M.E., Wilson, A.G., Wolbink, G.J., Wordsworth, P., YEAR Consortium, Altshuler, D., Karlson, E.W., Toes, R.E.M., de Vries, N., Begovich, A.B., Siminovitch, K.A., Worthington, J., Klareskog, L., Gregersen, P.K., Daly, M.J., Plenge, R.M., 2009. Genetic variants at CD28, PRDM1 and CD2/CD58 are associated with rheumatoid arthritis risk. *Nat. Genet.* 41, 1313–1318. doi:10.1038/ng.479
- Robbie-Ryan, M., Tanzola, M.B., Secor, V.H., Brown, M.A., 2003. Cutting edge: both activating and inhibitory Fc receptors expressed on mast cells regulate experimental allergic encephalomyelitis disease severity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 170, 1630–1634.
- Salmon, J.E., Edberg, J.C., Kimberly, R.P., 1990. Fc gamma receptor III on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities. *J. Clin. Invest.* 85, 1287–1295. doi:10.1172/JCI114566
- Shrestha, S., Wiener, H., Shendre, A., Kaslow, R.A., Wu, J., Olson, A., Bowles, N.E., Patel, H., Edberg, J.C., Portman, M.A., 2012. Role of activating FcγR gene polymorphisms in Kawasaki disease susceptibility and intravenous immunoglobulin response. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 5, 309–316. doi:10.1161/CIRCGENETICS.111.962464
- Siriboonrit, U., Tsuchiya, N., Sirikong, M., Kyogoku, C., Bejrachandra, S., Suthipinittharm, P., Luangtrakool, K., Srinak, D., Thongpradit, R., Fujiwara, K., Chandanayingyong, D., Tokunaga, K., 2003. Association of FcγR IIB and IIIB polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. *Tissue Antigens* 61, 374–383.
- Storch, M.K., Piddlesden, S., Haltia, M., Iivanainen, M., Morgan, P., Lassmann, H., 1998. Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Ann. Neurol.* 43, 465–471. doi:10.1002/ana.410430409
- Ulvestad, E., Williams, K., Bjerkvig, R., Tiekotter, K., Antel, J., Matre, R., 1994. Human microglial cells have phenotypic and functional characteristics in common with both macrophages and dendritic antigen-presenting cells. *J. Leukoc. Biol.* 56, 732–740.

- Wingerchuk, D.M., Banwell, B., Bennett, J.L., Cabre, P., Carroll, W., Chitnis, T., de Seze, J., Fujihara, K., Greenberg, B., Jacob, A., Jarius, S., Lana-Peixoto, M., Levy, M., Simon, J.H., Tenenbaum, S., Traboulsee, A.L., Waters, P., Wellik, K.E., Weinshenker, B.G., International Panel for NMO Diagnosis, 2015. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology* 85, 177–189. doi:10.1212/WNL.0000000000001729
- Wingerchuk, D.M., Lucchinetti, C.F., Noseworthy, J.H., 2001. Multiple sclerosis: current pathophysiological concepts. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 81, 263–281.

A Tables

	MS(n=82)	NMO(n=90)	Controls(n=120)	
Males	12	18	11	
Female	70	72	109	X ² =5.03p=0.0807
Mean Age (SD)	41.3 (18.7)	49.1 (14.7)	53.9 (18.1)	

Table A.2 : Distribution of male and female in our cohort

		MS (n=82)	NMO (n=90)	NMO AQP4+(n=49)	Cte(n=120)	OR(95%CI)
Genotype frequency no (%)						
FcγRIIa	H/H	16 (17)	25 (28)	11 (22)	25 (21)	
	R/H	37 (40)	36 (40)	23 (47)	60 (50)	
	R/R	39 (42)	29 (32)	15 (31)	35 (29)	1.79 (1.01, 3.17)
χ ² (P-value)		3.989 (0.045)	0.226 (0.634)	0.1034 (0.8522)		
*χ ² (P-value)		1.99 (0.1574)				
Allele frequency no (%)						
FcγRIIa	H	69 (42)	86 (50)	45 (46)	110 (45.8)	
	R	95 (58)	85 (50)	53 (54)	130 (54.2)	
χ ² (P-value)		0.5 (0.455)	0.79 (0.372)	0.0002 (0.98)		
*χ ² (P-value)		2.268(0.132)				
Allele carrier Frequency no (%)						
FcγRIIa	H	53 (65)	61 (68)	34 (69)	85 (71)	
	R	76 (93)	65 (72)	38 (78)	95 (79)	
χ ² (P-value)		1.14 (0.285)	0.042 (0.837)	0 (1)		
*χ ² (P-value)		1.37 (0.24)				

Table A.2: Genotype, allele and allele carrier frequency of FcγRIIa-R131H in control (Cte), multiple sclerosis (MS), Neuromyelitis optica (NMO) and NMO Aqp4+. χ² calculated in 2x2 contingency table FcγRIIa-131RR vs 131RH+HH.

*χ² calculated between MS and NMO.

		MS (n=82)	NMO (n=90)	NMO AQP4+ (n=49)	Cte (n=120)	OR (95 % CI)
Genotype frequency no (%)						
FcγRIIb	I/I	44 (54)	42 (47)	26 (53)	74 (62)	
	I/T	21 (26)	25 (28)	16 (33)	24 (20)	
	T/T	17 (21)	23 (26)	7 (14)	22 (18)	
χ^2 (P-value)		0.17 (0.6723)	1.586 (0.207)	1.983 (0.159)		
* χ^2 (P-value)		0.924 (0.62)				
Allele frequency no (%)						
FcγRIIb	I	109 (66)	109 (61)	68 (69)	172 (71.7)	
	T	55 (34)	71 (39)	30 (31)	68 (28.3)	1.65 (1.09- 2.49)
χ^2 (P-value)		1.24 (0.265)	5.721 (0.016*)	0.175 (0.6757)		
* χ^2 (P-value)		1.28 (0.25)				
Allele carrier Frequency no (%)						
FcγRIIb	I	65 (79)	67 (74)	42 (86)	98 (82)	
	T	38 (46)	48 (53)	23 (47)	46 (38)	
χ^2 (P-value)		0.653 (0.419)	2.643 (0.10)	0.239 (0.6253)		
* χ^2 (P-value)		0.53 (0.465)				

Table A.3: Genotype, allele and allele carrier frequency of FcγRIIb I232T in control, MS, NMO and NMO AQP4+. χ^2 calculated in 2x2 contingency table FcγRIIb-232TT vs 232IT+232II between patients and Cte. * χ^2 calculated between MS and NMO

		MS (n=82)	NMO (n=90)	NMO AQP4+ (n=49)	Cte (n=120)	OR (95% CI)
Genotype frequency no (%)						
FcγRIIIb	NA1/NA1	14 (17)	20 (22)	12 (24)	17 (14.2)	1.26 (0.58, 2.73)
	NA1/NA2	64 (78)	61 (68)	32 (65)	87 (72.5)	
	NA2/NA2	2 (2)	6 (7)	3 (6)	14 (11.7)	0.19 (0.04, 0.86)
	Nul	0 (2)	3 (3)	2 (4)	2 (1.6)	
χ^2 (P-value)		5.6 (0.018)	1.397 (0.237)	1.086 (0.297)		
* χ^2 (P-value)		1.756 (0.1852)				
Allele frequency no (%)						
FcγRIIIb	Na1	92 (58)	101 (58)	56 (60)	121 (51)	
	Na2	68 (43)	73 (42)	38 (40)	115 (49)	
χ^2 (P-value)		1.48 (0.223)	1.847 (0.174)	1.858 (0.172)		
* χ^2 (P-value)		0.01 (0.919)				
Allele carrier Frequency no (%)						
FcγRIIIb	Na1	78 (95)	81 (90)	44 (90)	104 (93)	
	Na2	66 (80)	67 (74)	35 (71)	101 (90)	
χ^2 (P-value)		0.399 (0.527)	0.549 (0.458)	0.56 (0.453)		
* χ^2 (P-value)		0.0093 (0.923)				

Table A.4: Genotypes, allele and allele carrier frequency of FcγRIIIb-Na1/Na2 in control, MS, NMO and NMO AQP4+.

χ^2 FcγRIIIb-NA2/NA2 vs NA1/NA1+ NA1/NA2.

* χ^2 calculated between NMO and MS or NMO AQP4+ and NMO AQP4.

B Figures

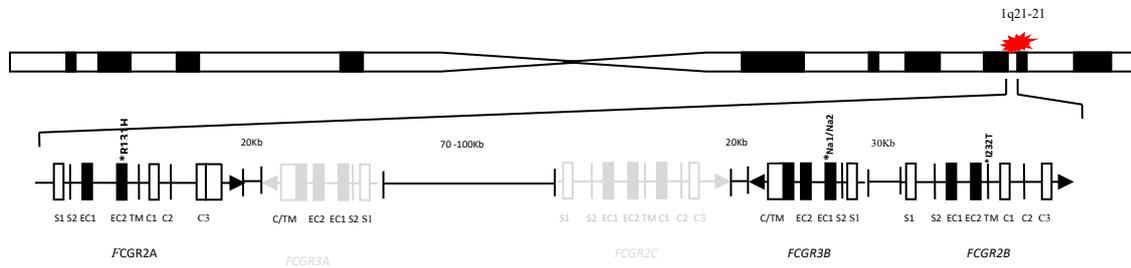


Figure B.1: A cluster of FCGR genes at 1q21-24.

Grey tint represent non studied genes. Exons are represented by rectangles; asterisks represent studied polymorphisms; S: signal peptide; EC: extracellular Ig like domaine; TM: Transmembrane domain; C: Cytoplasmic domain. Spires represent transcriptional sens.

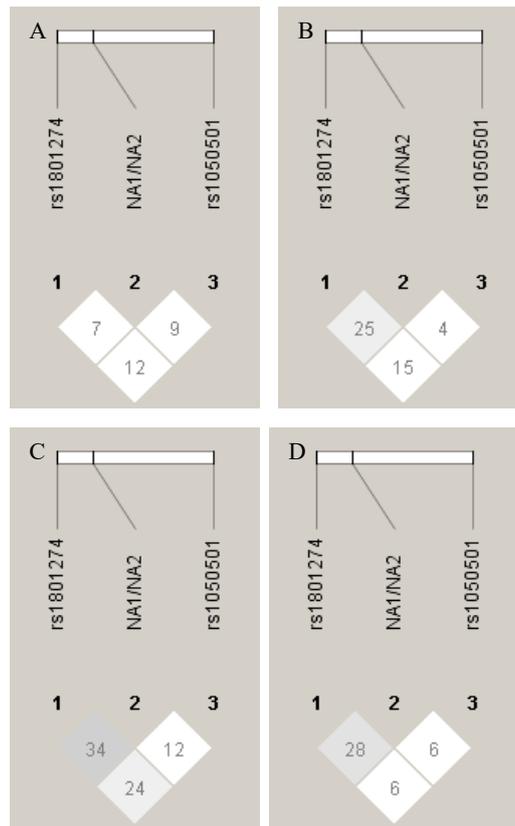


Figure B.2: LD plot of FCGR genetic locus

In MS patients (A), NMO patients (B), NMO AQP4+ patients (C) and healthy individuals (D), the three polymorphisms are presented by alignment of FCGR genes order from centromere to telomere and pair-wise D' values observed are shown within the diagonal boxes.