



# Université Paris Descartes

**Ecole doctorale Bio SPC**

*INSERM U1163, Institut Imagine, Immunogenetics of pediatric autoimmune diseases*

## **Pathophysiologie des défauts génétiques du Lupus Erythémateux disséminé pédiatrique**

*Implications du stress du réticulum endoplasmique et de la voie  
PI3K dans le développement de l'auto-immunité*

Par Matthieu MONCAN

Thèse de doctorat d'Immunologie

Dirigée par Pierre Quartier-dit-Maire

Présentée et soutenue publiquement le 26 Mars 2019

Devant un jury composé de :

Pr. Benjamin TERRIER

Président du Jury

Pr. Alexandre BELOT

Rapporteur

Pr. Pauline SOULAS-SPRAUEL

Rapporteur

Dr. Pierre QUARTIER-DIT-MAIRE

Directeur de thèse

Dr. Frédéric RIEUX-LAUCAT

Responsable scientifique – Institut Imagine

Dr. Yosra MESSAI

Responsable scientifique – Arthritis R&D

Dr. Guillaume LEFEVRE

Examineur – CHU de Lille

*Il ne faut pas vivre dans l'aisance ignoble, mais par le travail, l'effort et la lutte !  
La plus haute forme de succès vient à l'homme qui n'a peur ni du danger, ni du  
travail et qui, par conséquent, obtient le triomphe suprême !*

Traduit de « The Strenuous Life » de Théodore Roosevelt, 1899.  
Découvert grâce à Keno Don Rosa, « The Sharpie of the Culebra Cut », 2001.

# Remerciements

Il y a une quantité astronomique de personnes que je me dois de remercier aujourd'hui. Chacune d'entre elle, d'une façon directe ou indirecte, m'a apporté un soutien personnel que je n'ai pas oublié ou un soutien professionnel qui a permis à ce travail de voir le jour. Et je souhaiterai aujourd'hui qu'ils soient remerciés pour leur aide, leur engagement, leur inspiration ou leur sympathie. Toutes ces petites choses qui m'ont aidé, soutenu et porté jusqu'à l'aboutissement de cette thèse.

En premier lieu je souhaiterai remercier mes parents et ma famille proche. Comme à mon habitude je n'ai pas de mots envers eux parce que tout me semble couler de source. Certaines choses sont évidentes et un regard ou un geste d'approbation sont parfois plus éloquents que n'importe quels mots. J'ai vécu et ait été élevé dans ce contexte d'expression et s'il m'a parfois blessé, je l'ai toutefois toujours compris et n'ait jamais douté de la sincérité de ces petits signes ou de ces gestes. J'ai été d'autant plus touché lorsque ces dernières semaines, ces petites choses sont devenues de plus en plus éloquentes et qu'elles m'ont transmises une fois encore ce que je savais déjà. Pour toutes ces petites choses, ces petits gestes et ces petites attentions, je vous remercie encore toutes et tous (et je maintiens que parmi eux, il y en a une que l'on se doit d'appeler « Mamie » et non « Nana » mais c'est un autre débat).

Après la famille vient ma compagne. Nous nous sommes rencontrés, nous nous sommes découverts, nous avons compris les problèmes de l'autre et nous nous sommes soutenus en conséquence. La confiance a fini par naître et les sentiments ont finis par fleurir d'eux-mêmes. Depuis lors nous n'avons pas cessé de faire de notre mieux pour protéger ou accompagner l'autre dans toutes les difficultés que nous avons rencontrées. Ces huit années d'étude ont été semées d'embuches qui pouvaient parfois me sembler insurmontables, parfois mettre mes nerfs à l'épreuve, parfois me faire dire que ça n'en valait pas la peine. Je renouvelle aujourd'hui encore mes sentiments et ma confiance à celle qui n'a cessé de me soutenir et de m'aider à travers ces épreuves depuis presque dix ans maintenant. Je souhaiterai également remercier ses parents, qui bien que n'ayant pas de lien direct avec moi, ont toujours fait preuve d'une grande bienveillance à mon égard et envers mon travail.

La catégorie suivante est un peu spéciale. Ce sont des gens qui ne me connaissent pas et que je n'ai d'ailleurs pour la plupart jamais rencontré à quelques exceptions près. Toutefois, je souhaiterai aujourd'hui les remercier car leur travail m'a apporté beaucoup de joie, de rires et d'inspirations. Je souhaiterai remercier tous les auteurs, illustrateurs, compositeurs et autres développeurs qui ont jalonné mes expériences culturelles depuis mon plus jeune âge. Stan Lee, Don Rosa, Carl Barks, Tetsuya Takahashi, Yasuyuki Honne, J. Michael Straczynski, Brian Michael Bendis, Mark Bagley, Craig Kyle, Chris Yost, Satoru Iwata, Dan Slott, Matt Younberg, Frank Angones, Motoi Sakuraba, Hiroyuki Sawano, Jun Senoue et bien d'autres encore. Toutes ces personnes ont nourri et participé à la création de mon imaginaire et au développement de mon sens critique. Ces personnes m'ont inspirée, m'ont encouragées à rêver et ont partagé avec des millions d'autres leur réflexion sur le monde actuel et les leçons qu'ils en ont tiré. Ensembles, ils m'ont encouragé à réfléchir sur les choses qui me révoltaient et à travailler aussi dur que possible pour viser l'objectif qui me permettrait à la fois de m'épanouir et d'accomplir quelque chose dont je serai fier. C'est grâce à eux que très jeune, malgré ma timidité maladive et mon manque de confiance en moi, j'ai décidé de me diriger vers la carrière de chercheur et la génétique. Bien que j'ai encore énormément d'étapes à franchir, je souhaiterai profiter de cette occasion pour les remercier. Beaucoup de gens me disent souvent que je devrais sourire plus, que je devrais donner l'image de quelqu'un de plus heureux et cesser de voir le verre à moitié vide. Ces personnes ne m'ont jamais vu en train de profiter des travaux des noms cités plus tôt.

Vient ensuite une catégorie trop oubliée. Ils sont pourtant le fil rouge de cette histoire. Je souhaiterai donc remercier tous les professeurs de biologie qui m'ont fait découvrir la science, m'ont appris à la connaître et à l'apprécier. Mme Ragault, Mr Guilbaut, Mme Behue et Mme Alcaïde ont chacun contribué à mon avancée dans mes études, ils m'ont apporté au fur et à mesure de ma progression la confirmation que j'avais probablement trouvé ma voie et m'ont encouragé à poursuivre sur cette route. Je les en remercie grandement et espère qu'ils ne perdront pas leur envie de partager leur savoir et leur goût de la pédagogie. A ces personnes s'ajoutent ceux qui ont partagés avec moi leur enseignement : Olivier, Antonin et Renaud pour qui je garde toujours une petite pensée même si nos contacts se font rares. Avec eux, je souhaiterai également remercier Quentin qui a toujours su faire preuve de bienveillance, de respect et d'une grande écoute à mon égard. Je sais qu'il sera toujours d'un grand soutien pour moi et j'espère qu'il sait que je serai toujours prêt à faire de même pour lui.

Pour finir, je souhaiterais bien évidemment remercier les personnes les plus proches de ce projet à commencer par : les patients qui ont acceptés de participer à cette étude ; le Dr Frédéric Rieux-Laucat qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a permis de prendre la relève du travail préliminaire de Nadia Jeremiah qui a identifié et confirmé la mutation *ERN1* ; Aude Magérus-Chatinet, Fabienne Mazerolles, Marie-Claude Stolzenberg et Olivier Pellé qui chacun furent toujours prêts à répondre à mes questions et celles des autres thésards, même les plus absurdes ; tous les autres membres temporaires du laboratoire avec qui j'ai eus le privilège de travailler : Laura Barnabei, Sonia Meynier, Jérôme Hadjadj et Floriane Carallis pour ne citer qu'eux. Enfin, je souhaiterais remercier toutes les personnes de l'Institut Imagine qui m'ont été d'un grand secours scientifique ou d'un grand soutien psychologique dans les heures les plus sombres (21h30 à 0h45 et 5h30 à 7h30) ou les plus déprimantes (vacances scolaires, week-end et jours fériés) de cette thèse : Carolina Ugenti, Elodie Dandelot, Steicy Sobrino, Emmanuel Martin, Marie-Thérèse El-Daher, Briec Pérot et tous ceux que j'ai encore oublié car ma mémoire des noms est tout simplement pitoyable.

Encore une fois, merci à tous, vous avez tous contribué d'une façon ou d'une autre à l'écriture de ce manuscrit et à la génération des résultats présents dans cet ouvrage que cela soit par un bonjour un Jeudi matin à 8h, par un coup de main apporté par simple générosité, une partie jouée à 22h pour rigoler ou une simple phrase tapée sur un clavier.

Moncan Matthieu

# Abstract

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a chronic inflammatory autoimmune disease characterized by high titers of anti-nuclear antibodies and variable clinical manifestations. To better understand the pathogenesis of SLE, we performed exome sequencing in patients presenting pediatric or familial cases of SLE in order to detect monogenic variants involved in the development of SLE. We found a heterozygous deleterious mutation in the *ERN1* gene in a family presenting SLE, Sjögren Syndrome, Hashimoto Thyroiditis and limited cutaneous Systemic sclerosis. The mutation segregates in the family following an autosomal dominant mutation with incomplete penetrance. *ERN1* encodes for IRE1 $\alpha$ , the main inductor of the Unfolded Protein Response, a cell fate regulating transcriptional program activated upon endoplasmic reticulum (ER) stress. B-EBV cell line derived from the patient presents delayed and extended splicing of XBP1 in response to tunicamycin as well as IL6 overexpression and resistance to extrinsic apoptosis induction. Western Blots on the extrinsic pathways proteins revealed a diminished expression of Caspase-3. Diminution was confirmed to be linked to a reduced stability of Caspase-3 mRNA in the patient owing to improved IRE1 $\alpha$  RNase activity. Taken together these results suggest a direct link between autoimmunity and UPR through sustained activation of IRE1 $\alpha$ .

# Liste des principales abréviations

ADNdb / sb – ADN double brin / simple brin

AGS – Syndrome Aicardi-Goutières

AN / ANA – Antigènes nucléaires / Auto-anticorps anti-antigène nucléaires

APC – Cellule présentatrice d'antigène

APDS – Activated phosphoinositide 3-kinase- $\delta$  syndrome

BCR – B-Cell Receptor

B-EBV – Lymphocyte B immortalisés par le virus Epstein-Barr

CA – Corps Apoptotiques

CNX / CRT – Calnexine / Calréticuline

DC – Cellule dendritique

EGF – Epidermal Growth Factor

ERAD – ER-associated degradation

GAP – GTPase activating proteins

GDP / GTP – Guanosine diphosphate / triphosphate

GEF – Guanine Nucleotide-Exchange Factor

GFR – Growth Factor Receptor

GLS – Golgi Localisation Sequence

GWAS – Genome Wide Association Studies

IFN/I – Interféron de type I

IFNAR – Interféron  $\alpha/\beta$  receptor

ISG – Interféron Stimulated Genes

KAL – Kinase activation loop

KEN – Kinase-Extension Nuclease

LB – Lymphocyte B

LB<sub>T</sub> – Lymphocyte B transitionnels

LB<sub>P</sub> – Lymphocyte B périphériques

LB<sub>MZ</sub> – Lymphocyte B de la Zone Marginale

LLO – Lipid-Linked Oligosaccharide

LT – Lymphocyte T

LT<sub>DN</sub> – Lymphocyte T double négatif

LT<sub>FH</sub> – Lymphocyte T Follicular Helper

LES – Lupus Erythémateux Systémique

MAM – Mitochondria-associated ER membranes

MOMP – Mitochondria Outer Membrane Permeabilization

NEF – Nucleotide-exchange factor

NET - Nuclear Extracellular Trap

NK – Natural Killer

PBMC – Cellules mononucléaires périphériques sanguines

pDC – Cellule dendritique plasmacytoïde

PDI – Protein Disulfide-Isomérase

PPDI – Phosphatidylinositol

PTI – Purpuras thrombocytopénique idiopathique

RE – Réticulum Endoplasmique

RIDD – Regulated IRE1-Dependant Decay

ROS – Reactive Oxygen Species

SAVI – STING-Associated Vasculopathy with onset in Infancy

SGS – Syndrome Gougerot-Sjögren

SPENCD – Spondyloenchondrodysplasie

SRP – Signal recognition particle

SSCL – Sclérose systémique cutanée limitée

TH – Thyroïdite d'Hashimoto

TLR – Toll-Like Receptor

uORF – upstream Open Reading Frame

UPR – Unfolded Protein Response

UPRE – Unfolded Protein Response Element

WES – Whole Exome Sequencing

# Sommaire

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<hr/>	
<b>PARTIE I : LUPUS ERYTHEMATEUX SYSTEMIQUE</b>	<b>1</b>
A / DESCRIPTION DE LA MALADIE	1
1. HISTORIQUE ET DEFINITION	1
2. DIAGNOSTIQUE	2
3. EPIDEMIOLOGIE ET MORTALITE	5
B / PATHOPHYSIOLOGIE DU LUPUS ERYTHEMATEUX SYSTEMIQUE	7
1. DEVELOPPEMENT DE LA MALADIE	7
2. ACCESSIBILITE DES ANTIGENES DU SOI	10
i. DESCRIPTION	10
ii. <i>DNASE1, DNASE1L3</i>	11
iii. COMPLEMENT	12
3. INDUCTION DES INTERFERONS DE TYPE I	13
i. DESCRIPTION	13
ii. TOLL-LIKE RECEPTORS	15
iii. SENSEURS D'ACIDE NUCLEIQUES CYTOSOLIQUES	16
4. PERTE DE TOLERANCE	16
i. DESCRIPTION	16
ii. <i>PRKCD</i>	18
5. AUTRES SYNDROMES MONOGENIQUES LIES AU LUPUS	20
i. CONTEXTE DANS L'ETUDE	20
ii. SYNDROME AICARDI-GOUTIERES	20
iii. SAVI	22
iv. <i>SPENCD</i>	22
v. SYNDROME DE NOONAN	23
6. SYNDROME DE GOUGEROT-SJÖGREN	24
i. CONTEXTE DANS L'ETUDE	24
ii. PATHOPHYSIOLOGIE DU SYNDROME DE GOUGEROT-SJÖGREN	25
<b>PARTIE II : STRATEGIE EXPERIMENTALE</b>	<b>28</b>
A / CRITERES D'INCLUSION, EXOME ET MODELE CELLULAIRE	28
B / DESCRIPTION DES FAMILLES ETUDIEES	31
1. FAMILLE A – <i>ERN1</i>	31
2. FAMILLE B – <i>PIK3R2</i>	35

<b>PARTIE III : <i>ERN1</i> ET UNFOLDED PROTEIN RESPONSE</b>	<b>37</b>
A / FONCTION ET CONTROLE QUALITE DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE	37
B / IDENTIFICATION D' <i>ERN1</i> CHEZ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	40
C / GESTION DE L'UPR CHEZ LES MAMMIFERES	42
1. INTRODUCTION AUX VOIES IRE1 $\alpha$ , ATF6 ET PERK	42
2. CINETIQUE ET CONSEQUENCES DE L'UPR	45
3. REGULATION DE L'ACTIVITE D'IRE1 $\alpha$	48
i. STRUCTURE D'IRE1 $\alpha$	48
ii. MODELES D'ACTIVATION D'IRE1 $\alpha$	49
iii. DESACTIVATION D'IRE1 $\alpha$	53
iv. UPROSOME	54
4. LIENS ENTRE L'UPR ET L'IMMUNITE	57
i. UPR ET FONCTION DES CELLULES IMMUNITAIRES	58
ii. CONVERGENCE ENTRE L'UPR ET LES VOIES DE SIGNALISATION IMMUNITAIRES	59
iii. IRE1A DANS LES MALADIES AUTO-IMMUNES	62
<b>PARTIE IV : PIK3R2 ET VOIE PI3K</b>	<b>65</b>
A / VOIE PI3K	65
B / STRUCTURE DE P110 $\delta$ ET P85 $\beta$ ET INHIBITION DU COMPLEXE PI3K $\delta$	66
C / PI3K $\delta$ DANS L'IMMUNITE	67
1. EXEMPLES DE FONCTIONS IMMUNITAIRES DE PI3K $\delta$	67
2. PI3K ET LE LES	69
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>71</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>77</b>
<b>PARTIE I : ANALYSE FONCTIONNELLE ET MOLECULAIRE D'IRE1<math>\alpha</math></b>	<b>77</b>
<b>PARTIE II : ANALYSE DE L'EXPRESSION D'IRE1<math>\alpha</math></b>	<b>81</b>
<b>PARTIE III : ANALYSE DE L'UNFOLDED PROTEIN RESPONSE</b>	<b>84</b>
<b>PARTIE IV : PERTURBATIONS IMMUNITAIRES INDUITES PAR LA MUTATION D'IRE1<math>\alpha</math></b>	<b>88</b>
<b>PARTIE V : ANALYSE DE LA VOIE PI3K</b>	<b>96</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>98</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>106</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>108</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b>	<b>127</b>

# Introduction

## Partie I : Lupus Erythémateux Systémique

### A / Description de la maladie

#### 1. Historique et définition

Le Lupus Erythémateux Disséminé ou Lupus Erythémateux Systémique (LES) est une maladie auto-immune et inflammatoire chronique. Elle fut décrite pour la première fois par Hippocrate qui observa l'apparition d'ulcérations cutanées qu'il appela « Herpes esthiomenos », correspondant aujourd'hui à la dermatose érosive. Le nom « Lupus » vient du terme latin désignant le loup. Il fut utilisé dès le Moyen-Âge pour décrire cette maladie, à cause de ces éruptions cutanées sur le visage, rappelant par son aspect, les blessures induites par les morsures de loup. Plus tard, cette association se perdit pour être remplacée par celle du masque de loup vénitien dont la forme rappelle également celle des éruptions cutanées du LES. Le terme de lupus fut ainsi utilisé de façon inadéquate pour désigner toute maladie impliquant une ulcération ou une nécrose du visage ou des membres inférieurs jusqu'à la moitié du XIX<sup>ème</sup> siècle.

En 1833 est publiée la première description précise du lupus par Laurent Theodore Biett et son étudiant Pierre Louis Alpheé Cazenave, utilisant le terme de « Lupus érythémateux », signifiant rouge en grec, et qui fut également utilisé pour désigner l'observation des atteintes ulcéreuses de la peau. Dans cette publication, Cazenave décrit le lupus comme :

*« Une pathologie rare qui attaque essentiellement le visage et se développe principalement chez les jeunes femmes qui ne souffrent d'aucune autre maladie. Des plaques rouges et rondes, légèrement épaisses, de la taille d'un shilling, augmentent graduellement en taille et se répandent parfois sur la partie supérieure du visage. Les contours sont proéminents et le centre, qui garde sa couleur naturelle, reste plat. Les plaques provoquent de la chaleur et des rougeurs mais ni douleurs ni démangeaisons. Il s'agit essentiellement d'une affection chronique bien que son apparence indique le contraire. »*

L'aspect systémique de la maladie quant à lui ne commença à être observé qu'à partir de 1872 par Moriz Kaposi qui décrit les premiers signes systémiques de la maladie incluant : fièvre, perte de poids, lymphadénopathie, anémie et arthrite. Mais ce n'est que trente ans plus tard que le terme fut utilisé pour définir le lupus par Sir William Osler qui observa chez plusieurs patients des atteintes cardiaques, pulmonaires et rénales couplées à une manifestation cutanée du lupus. Le XX<sup>ème</sup> siècle fut ensuite émaillé de plusieurs découvertes qui révélèrent peu à peu l'aspect clinique très hétérogène du lupus. L'association entre le LES et la photosensibilité, le phénomène de Raynaud, des manifestations cliniques sans atteinte cutanée et la présence d'anticorps anti-nucléaires sont autant de découvertes qui permirent d'aboutir à une description moderne et une meilleure compréhension du LES. <sup>1</sup>

De nos jours, le Lupus Erythémateux Systémique est décrit comme une maladie auto-immune caractérisée par une forte hétérogénéité clinique représentée par les diverses atteintes rénales, cardiaques, neurales et cutanées qu'elle provoque. L'état de santé des patients atteints par cette maladie chronique varie en fonction des états de poussée et de rémission de la maladie, qui peuvent être corrélés avec les titres de certains auto-anticorps pathogéniques<sup>2,3</sup>. Ces anticorps dirigés contre le soi, se forment suite à une dérégulation dans le développement ou la fonction des différents acteurs de l'immunité. La fixation de ces anticorps contre des protéines du soi va détourner l'action naturelle du système immunitaire envers les pathogènes contre son hôte. Ce changement de cible a pour conséquence l'induction de symptômes inflammatoires et de dégâts tissulaires à des endroits variés du corps, qui dépendent de la protéine ciblée par l'auto-anticorps. Cette variabilité induite par le type d'auto-anticorps produit est à la base de l'hétérogénéité clinique du lupus.

## 2. Diagnostique

La variabilité clinique du lupus pose un problème récurrent vis-à-vis de son diagnostic. Son large phénotype clinique d'auto-immunité systémique se croise souvent avec d'autres maladies auto-immune et inflammatoires, nécessitant la mise au point de critères diagnostiques de plus en plus précis pour le définir. Ces critères, publiés en 1982 par l'American College of Rheumatology (ACR)<sup>4</sup>, considèrent que le diagnostic de LED ne peut être posé, avec une

sensibilité et une spécificité de 96%, que si le patient présente, quelle que soit la date de survenue, au moins quatre des onze symptômes suivants :

- Rash malaire
- Rash discoïde
- Photosensibilité
- Ulcérations buccales ou nasopharyngées
- Arthrite non érosive touchant au moins deux articulations périphériques ou plus
- Pleurésie ou péricardite
- Atteinte rénale (protéinurie persistante)
- Atteinte neurologiques (convulsions ou psychose)
- Atteinte hématologique (anémie hémolytique, leuco, lympho ou thrombopénie)
- Anomalie immunologique (anticorps anti-ADN natif, anti-Sm, antiphospholipides)
- Anticorps anti-nucléaires

En 1997, l'ACR révisa une première fois ces critères mais sans obtenir de validation à cause d'une forte perte de la sensibilité qui passa de 96% à 83% et cela malgré une spécificité identique aux critères de 1982. En 2012, le groupe « Systemic Lupus International Collaborating Clinics » (SLICC), publia un nouveau protocole diagnostique pour le lupus<sup>5</sup> afin de réviser les critères de 1982 en prenant en compte les limites reconnues de ce modèle tels que :

- Le **biais envers les symptômes cutanés** avec quatre critères dédiés alors que d'autres organes n'en ont qu'un ;
- L'**absence de prise en compte de la diminution du complément** pourtant considéré comme un des plus forts critères de diagnostic du LES ;
- L'**inclusion** dans les critères de diagnostic **de la positivité aux anticorps antiphospholipides** qui pourrait amener à des confusions entre le LES et les syndromes antiphospholipides primaires ;

- Le besoin de **généraliser les critères diagnostic à tous les groupes ethniques** afin de prendre en compte les fréquences variées d'apparition de certains symptômes de LES qui ont été observées notamment chez les afro-américains et les japonais ;
- La **redéfinition de certains critères** en fonction de l'expérience obtenue par les pratiques médicales actuelles, notamment envers les critères rénaux et neurologiques de 1982 **qui ne reflètent pas toute l'étendue des phénotypes lupiques**.
- L'**ajout de critères provenant de praticiens spécialisés non rhumatologues** régulièrement amenés à diagnostiquer un lupus tels que les dermatologues, néphrologues et neurologues.<sup>6</sup>

De ce fait, le nouveau protocole de diagnostic exige que le patient présente au moins quatre critères de diagnostic du LED avec au moins un critère clinique et un critère immunologique ou bien présente une néphrite lupique prouvée par une biopsie avec présence d'anticorps anti-nucléaires ou anti-ADN double brin (ADNdb). Ce choix a pour but d'éviter que des diagnostics de LED ne soient posés sur la base de critères uniquement cliniques ou uniquement sérologiques. En effet, le LED étant considéré comme une maladie clinique dirigée par des auto-anticorps, il est nécessaire d'en vérifier les deux aspects. La révision du SLICC utilise les critères suivants :

#### *Critères cliniques*

- Lupus cutané aigu ou subaigu
- Lupus cutané chronique
- Ulcérations orales ou nasales
- Alopécie non cicatricielle
- Synovites ou arthralgies impliquant plus de deux articulations
- Sérites (pleurésie ou péricardite)
- Atteinte rénale (protéinurie persistante)
- Atteinte neurologique (convulsions, psychose, mononévrite multiple, myélite, neuropathie périphérique ou atteinte des nerfs craniens, syndrome confusionnel aigu)

#### *Critères immunologiques*

- Anticorps antinucléaires
- Anticorps anti-ADNdb
- Anticorps anti-Sm
- Positivité aux anticorps antiphospholipides (déterminée par la présence d'un anticoagulant circulant, une sérologie syphilitique faussement positive, un titre moyen ou fort d'anticorps anti-cardiolipine ou la présence d'anticorps anti-β2-glycoprotéine 1)
- Diminution du complément
- Test de Coombs direct positif

- Anémie hémolytique
- Leucopénie ou lymphopénie
- Thrombopénie

Ces nouveaux critères de définition du LES permettent de poser un diagnostic avec une sensibilité accrue à 97% comparée à l'ACR de 1997, mais avec une perte de spécificité qui n'atteint plus que 84%. En Juin 2018, lors du congrès de l'European League Against Rheumatism (EULAR) d'Amsterdam, le Dr Martin Aringer présenta un nouveau protocole de diagnostic du LES atteignant 96% de sensibilité et 93% de spécificité.<sup>7</sup> Ce protocole se base sur l'utilisation de la mesure du titre d'anticorps anti-nucléaires comme critère d'entrée pour le diagnostic du LES. Une fois ce critère vérifié, l'équipe du Dr Aringer a attribué un score aux divers symptômes connus du lupus en fonction de leur fréquence de liaison à la maladie. Si la somme des scores des symptômes du patient atteint 10 ou plus, le diagnostic du LES est validé.

### 3. Epidémiologie et mortalité

Les études épidémiologiques du LES nous renseignent sur l'incidence, la prévalence et les différentes tendances observées dans cette maladie en fonction de critères variés tels que la zone géographique, l'âge de développement de la maladie, le genre, l'origine ethnique ainsi que l'époque d'observation de ces paramètres. Ces données une fois rassemblées et analysées permettent de poser les observations suivantes :

- **Il existe une forte variation géographique dans l'incidence et la prévalence du LES.** Ces variations peuvent être le reflet soit des différences génétiques présentes dans les populations analysées, soit des variations environnementales rencontrées par ces mêmes populations. Le développement du lupus étant grandement influencé par l'exposition aux ultraviolets (UV), une exposition plus forte et continue dans le temps peut en partie expliquer ces variations.
- **On retrouve une forte prédominance du LES chez les femmes.** De multiples études épidémiologiques présentent toutes un sex-ratio augmenté en faveur des femmes avec des résultats allant de 2:1 à 15:1. Cette différence est minimale avant dix ans avec un ratio proche de 1:1, puis atteint un pic sur la période recouvrant la trentaine à la

cinquantaine avant de se réduire à nouveau jusqu'à un ratio d'environ 3:1 aux âges plus avancés.<sup>8</sup> Plusieurs études ont tenté de démontrer le lien entre le LES et le génotype XX ainsi qu'avec la production d'estrogènes et de prolactine qui sont connus pour moduler la réponse immunitaire<sup>9-10</sup>. Toutefois, ces études ne parviennent pas à expliquer entièrement la différence observée vis-à-vis du sex-ratio, certaines femmes ne développant le LES qu'après avoir atteint la ménopause.

- **Les personnes d'origine Africaine sont plus susceptibles de développer le LES.** L'incidence et la prévalence de la maladie sont plus fortes dans ces populations ethniques, intermédiaires chez les hispaniques et les asiatiques et faibles chez les caucasiens. Ces observations ont principalement été faites en Europe et aux USA. Si certaines études tentent de relier cette observation à une hypothèse de changement d'interaction entre la génétique et l'environnement pour les populations ayant émigré d'Afrique, des études supplémentaires sont nécessaires pour étayer cette explication.
- **La prévalence du LES semble augmenter au fil des années.** Si cette augmentation peut être influencée par les changements de méthodologie employée entre les études, la forte majorité d'entre elles ont observé la même population avec les mêmes méthodes au fil du temps. Leurs résultats montrent une augmentation de la prévalence et de l'incidence du LES au fil du temps, à l'exception près du Royaume-Unis et des USA qui montrent une diminution de l'incidence. L'augmentation de la prévalence peut être liée à une augmentation des facteurs de risques du LES mais également à une survie accrue des patients sur le long terme grâce à une meilleure prise en charge médicale au fil des années.<sup>11</sup>

En effet, alors que les patients diagnostiqués lupiques présentent un taux de mortalité accru d'un facteur compris entre 2 et 5 comparé à une personne en bonne santé, le taux de mortalité du LES a subi une forte diminution depuis les années 70 où la survie des patients sur 5 ans était seulement de 50% contre 96% dans les années 2000.<sup>12</sup> Ce taux de survie reste élevé à 93% de survie pour 10 ans, puis descend à 76% sur 15 ans.<sup>13</sup> Malgré les progrès faits sur le diagnostic et les traitements à court terme, les taux de survie sur le long terme n'ont pas évolué ces vingt dernières années. Parmi les **causes de mortalité dans le LES** on retrouve principalement : les causes liées à l'activité de la maladie telles que les **insuffisances rénales et les atteintes neurologiques**, les **infections** dans le cadre de l'utilisation des traitements immunosuppresseurs et les **maladies cardiovasculaires**. Dans les premières années de la

maladie, la mort survient principalement par les néphrites lupiques ou les lupus neurologiques, tandis que les causes de mort tardives concentrent principalement les complications liées au traitement et aux dégâts à long-terme du LES.<sup>13</sup>

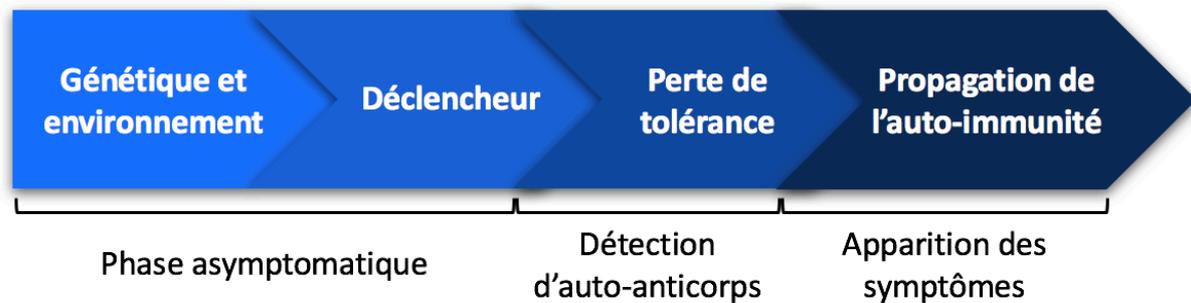
L'association de ces deux paramètres que sont l'augmentation du taux de survie sur le long-terme et l'incapacité à prévenir les causes de comorbidité induisent un fort coût global des soins publics pour les patients atteints de LES dont l'étendue varie en fonction du degré d'activation de la maladie (1093-14,614\$ par patient et par an).<sup>14</sup> Ces patients perdent également en qualité de vie à cause des lourds symptômes provoqués par la maladie telles que les inflammations articulaires et la fatigue chronique. Une étude réalisée au Royaume-Unis a montré que près de 75% d'entre eux subissent des désagréments qui limitent leur capacité à gérer leurs activités quotidiennes, tandis que 15% seulement parviennent à travailler à plein temps. Une forte proportion d'entre eux déclarent également avoir besoin de l'assistance de professionnels de santé mais également de proches pour gérer leur maladie au quotidien<sup>15</sup>. Le LES semble également avoir un fort impact sur leur situation sociale et financière puisque 89% rapportent avoir une capacité réduite à sociabiliser, 76% ont changé de situation professionnelle avec parmi eux, 52% qui ont cessé toute activité sur le marché du travail.<sup>16</sup> Il est donc essentiel de parvenir à mieux comprendre l'étiologie du LES afin de pouvoir mieux prévenir et traiter cette maladie auto-immune au lourd poids économique et de santé publique.

## B / Pathophysiologie du Lupus Erythémateux Systémique

### 1. Développement de la maladie

Le modèle actuel de la pathogénèse du lupus comporte trois phases. La première correspond au risque inhérent à chaque individu. Chaque personne est plus ou moins susceptible de développer un lupus en fonction des variants génétiques qu'il porte et des facteurs de risque présents dans son environnement. Cet état de susceptibilité est donc plus ou moins fort selon l'individu, mais ne suffit pas à déclencher la maladie. La seconde étape correspond à l'intervention d'un déclencheur. Ce stimulus va provoquer une perte de la tolérance au soi grâce à l'effet additif de son action et du degré de susceptibilité à la maladie propre à l'individu. La perte de la tolérance aura ensuite pour conséquence la création d'auto-anticorps contre des éléments du soi. Ces auto-anticorps vont s'accumuler avec le temps jusqu'à devenir observables

lors d'un examen sérologique et cela bien que le développement de la maladie soit totalement asymptomatique<sup>17</sup>. La dernière étape consiste à la formation de complexes immuns entre ces auto-anticorps et le soi, induisant une réponse immunitaire et une inflammation chronique aboutissant à des dégâts tissulaires et à l'apparition des symptômes du LES. (Figure 1)



**Figure 1 : Schéma des étapes de développement du lupus – inspiré de Tsokos & al, 2016.** Un premier état de susceptibilité à la maladie est induit par la présence chez l'individu de facteurs génétiques et environnementaux le prédisposant au développement d'une auto-immunité. Un facteur déclencheur tel qu'une infection, l'exposition aux UV ou à une toxine va provoquer une perte de la tolérance provoquant la génération d'auto-anticorps. Ces premières phases sont asymptomatiques même pendant le développement des auto-anticorps. Ce n'est que lorsque l'auto-immunité se propage par exemple par l'induction d'une inflammation chronique ou bien la perte de la régulation du système que les symptômes de la maladie apparaissent. Plus tard, le LES est caractérisé par des phases de rémission et de rechutes accompagnées de comorbidité associées au LES.

Le LES étant une maladie extrêmement hétérogène, l'étude de ses facteurs déclencheurs est d'un grand intérêt afin de mieux comprendre les diverses origines de cette maladie ainsi que d'identifier les différentes fonctions cellulaires clés dans son développement. Parmi les observations faites dans l'étude du LES on retrouve la présence d'agrégations familiales de ces maladies qui pourraient trouver leur origine soit dans la génétique, soit dans des conditions environnementales partagées entre les individus apparentés<sup>18</sup>. Les diverses études sur les jumeaux monozygotes ont pu mesurer un taux de concordance pour le LES entre les jumeaux variant de 11 à 57% en fonction des cohortes et du modèle expérimental utilisé<sup>19-22</sup>. Ce faible taux souligne que le LES ne peut être expliqué uniquement par la présence de facteurs génétiques ou environnementaux et que la concordance des deux est importante pour son développement.

De multiples facteurs environnementaux, génétiques et épigénétiques ont été reliés au développement du LES (Tableau 1). Les mécanismes par lesquels ces facteurs interviennent dans le déclenchement du lupus sont nombreux et variés. Toutefois, ils peuvent être regroupés en trois voies principales : l'augmentation de l'accessibilité aux antigènes du soi, l'activation

d'une inflammation chronique et la perte de la tolérance. Les deux premiers groupes peuvent avoir pour conséquence de provoquer la perte de la tolérance, mais les trois aboutissent à la production d'auto-anticorps, facteur central dans le développement de la maladie.

Facteurs	Description	Voie affectée
<i>Facteurs environnementaux</i>		
Ultraviolets	▪ Apoptose des kératinocytes <sup>23</sup>	Auto-antigènes
Hormones	▪ Augmentation de la survie et de l'activation de B auto-réactifs <sup>24,25</sup>	Tolérance
Infections virales	▪ Virus Epstein-Barr : Réactivité croisée avec EBNA-1 <sup>26</sup> ▪ Rétrovirus endogènes : Réactivité croisée avec p30 <sup>gag</sup> <sup>27</sup> , diminution de l'expression de Fas <sup>28</sup>	Tolérance
<i>Facteurs génétiques</i>		
PTPN22	▪ Diminution du seuil d'activation nécessaire au récepteur des LT <sup>29,30</sup>	Tolérance
TYK2	▪ Augmentation de la signalisation IFN de type I <sup>31,32</sup>	Inflammation
ITGAM	▪ Diminution de la phagocytose des complexes immuns et des éléments reconnus par le complément <sup>33,34</sup>	Auto-antigènes
<i>Facteurs épigénétiques</i>		
Hypométhylation	▪ Augmentation de l'expression des gènes stimulés par IFN (ISG) <sup>35</sup>	Inflammation
Modifications post-traductionnelles d'histones	▪ Hyperacétylation : Augmentation de l'expression de gènes cibles d'IRF1 <sup>36</sup>	Inflammation
Hydroxyméthylation des cytosines	▪ Induit l'hypométhylation de gènes impliqués dans le LES <sup>37</sup>	Tolérance
		Inflammation
MicroARN	▪ Hyperactivation des LB <sup>38</sup> ▪ Hyperactivation des LT <sup>39</sup>	Tolérance

**Tableau 1 : Exemples de facteurs environnementaux, génétiques et épigénétiques augmentant la susceptibilité au LES.**

Les facteurs capables d'induire un lupus ou plus globalement une maladie auto-immune sont donc nombreux et variés. Si leur étude permet de réaliser des associations entre un facteur donné et le développement de la maladie, ces éléments ne permettent que de poser des hypothèses de base sur le fonctionnement du lupus. Un exemple concret correspond aux études génétiques telles que le Genome Wide Association Studies (GWAS). Le GWAS est une méthode permettant, à l'aide une cohorte de contrôles et de patients atteints d'une maladie particulière, de réaliser une association entre un locus génique et la maladie étudiée. Plus l'association est forte, plus le facteur de risque lié au locus est grand et plus le locus est finement déterminé, plus il a de chances de révéler un gène en particulier. Toutefois, la portée des variants et des gènes identifiés par GWAS s'avère souvent limitée avec des variants conférant un risque relatif généralement inférieur à 2, comme c'est le cas avec les exemples cités dans le Tableau 1<sup>40</sup>. Le facteur de risque étant peu élevé et les variants étant plus ou moins fréquents dans la population, ils induisent le LES de façon polygénique. La participation partielle et additive de multiples variants capable d'augmenter la susceptibilité au lupus, ainsi que celle de l'environnement et de l'épigénétique, induit une complexité supplémentaire pour démontrer par

des études cellulaires et moléculaires le mécanisme reliant la pathologie au variant détecté par GWAS. C'est pour cette raison que l'étude des variants rares, à fort impact sur la maladie, représente un intérêt croissant pour la pathophysiologie des maladies auto-immunes. Ces lupus monogéniques permettent, lorsque des variants candidats sont détectés dans des cas familiaux ou pédiatriques, de mettre à jour de nouvelles voies de développement du lupus. Dans la suite de ce chapitre sur la pathophysiologie du lupus, nous nous intéresserons donc à la description des trois grandes voies de développement du LED et citerons en exemples plusieurs gènes impliqués dans le développement de ces formes monogéniques du lupus.

## 2. Accessibilité des antigènes du soi

### i. Description

L'augmentation de l'accessibilité des antigènes du soi peut être provoquée par deux mécanismes principaux : la perturbation spatiale ou temporelle de l'expression d'une protéine du soi ou bien la présence de cette protéine dans l'espace extracellulaire par la perturbation des systèmes de mort cellulaire ou de phagocytose des déchets cellulaires. Dans le premier cas, on retrouve l'exemple de l'expression à la membrane plasmique d'antigènes nucléaires (SSA/Ro, RNP et Sm) par les kératinocytes après exposition aux UV<sup>41</sup>. Cette expression inappropriée à la membrane de ces antigènes nucléaires les rend accessibles aux anticorps anti-nucléaires isolés à partir du sérum des patients lupiques, démontrant que ce phénomène d'expression spatiale perturbée peut induire l'auto-immunité.

Dans le second cas, la mort cellulaire par nécrose est un phénomène fortement immunogène puisqu'il provoque par éclatement de la cellule, la libération dans l'espace extracellulaire d'antigènes du soi et de cytokines pouvant être reconnus par des lymphocytes T et B auto-réactifs. Afin de limiter ce phénomène, les cellules utilisent un système de mort programmée : l'apoptose. L'apoptose comporte les étapes suivantes : la fragmentation de l'ADN, la formation de protubérances à la membrane plasmique et l'expulsion de ces protubérances hors de la cellule sous la forme de corps apoptotiques dans lesquels restent emprisonnés les antigènes du soi intracellulaires. L'apoptose constitue donc un système de destruction « propre » permettant de diminuer l'impact de la mort sur l'environnement extracellulaire en piégeant les différents composants de la cellule détruite dans des corps

apoptotiques (CA). L'ADN étant l'une des cibles les plus courantes des auto-anticorps dans le lupus, sa fragmentation et son stockage dans les CA permet de diminuer le risque d'activation des lymphocytes auto-réactifs capables de les reconnaître. Ces CA bien que non immunogènes, doivent toutefois être récupérés par les cellules phagocytaires telles que les macrophages ou les cellules dendritiques afin d'être correctement dégradés. La forte augmentation des CA, qu'elle soit due à une apoptose augmentée<sup>23</sup> ou à un dysfonctionnement de la phagocytose des débris cellulaires<sup>34</sup>, provoque un risque accru de développement du lupus car elle augmente la disponibilité des antigènes du soi aux cellules immunitaires lorsque les CA deviennent nécrotiques et libèrent leur contenu de façon similaire à une nécrose cellulaire<sup>42</sup>. L'équilibre existant entre la production de CA ou de débris cellulaires et leur élimination par les phagocytes joue un rôle crucial dans le LES. L'importance de ce phénomène est illustrée par les quelques gènes mutés dont les variants ont été reliés au LES. Parmi eux on retrouve des gènes impliqués dans la dégradation des acides nucléiques dans l'espace extracellulaire (*DNASE1*, *DNASE1L3*) ainsi que l'opsonisation des débris cellulaires (*CIQA*, *CIQB*, *CIQC*, *C4*, *C2*).

## ii. DNASE1, DNASE1L3

*DNASE1* et *DNASE1L3* sont des gènes homologues codants pour des endonucléases spécifiques des ADN simples et doubles brins. La *DNASE1* est exprimée par les glandes exocrines et endocrines<sup>43,44</sup> avant d'être exportée dans le sérum où la diminution de son activité corrèle avec le LES<sup>45</sup>. L'expression de *DNASE1L3* en revanche est presque strictement réduite aux macrophages présents dans le foie et la rate<sup>46,47</sup>. Le rôle de ces enzymes est de dégrader les ADN présents dans la cellule ; sous forme native en cas de nécrose ou de nucléosome en cas d'apoptose ; afin de diminuer leur potentiel immunogène pour le système immunitaire. Lorsque ces enzymes sont produites en plus faible quantité ou voient leur activité amoindrie, l'équilibre entre leur action de dégradation et la production d'antigènes nucléaires est perturbé et augmente le risque de développer des auto-anticorps nucléaires. Cette notion fut démontrée par *Napirei et al* qui sont parvenus à générer des modèles murins hétérozygotes et homozygotes déficients en DNase I. Les souris hétérozygotes et homozygotes ont commencé à l'âge de 6-8 mois à présenter des symptômes du lupus avec la présence d'anticorps anti-nucléosomes et ADN simple brins (ADNsb) ainsi que des signes de glomérulonéphrite, soutenant l'hypothèse du lien entre le LES et *DNASE1*.<sup>48</sup> Enfin, quatre patients porteurs de mutations dans ce gène ont été rapportés, dont trois avec de hauts taux d'anticorps anti-ADN double brins (ADNdb).<sup>49,50</sup> Le

cas de *DNASE1L3* est similaire, puisqu'il fut également retrouvé chez des patients lupique ou des patients avec un syndrome de vascularite urticarienne hypocomplémentémique qui présentent également un lupus. Tous ces patients ont également en commun une sérologie positive aux anticorps anti-nucléaires et anti-ADNdb.<sup>47,51</sup> Enfin, une mutation délétère homozygote de *DNASE1L3* a été retrouvée dans les modèles de souris MRL et NZB/W F1, l'apparition de cette même mutation dans deux modèles murins indépendants suggère fortement l'implication de ce gène dans le développement du phénotype lupique de ces souris.<sup>52</sup>

### iii. Complément

Si la dégradation des antigènes nucléaires est importante, la phagocytose des débris cellulaires et corps apoptotiques les contenant l'est toute autant. Les gènes du complément ont donc été très tôt associés aux formes monogéniques du lupus. Parmi eux, on retrouve notamment les acteurs de la voie classique du complément qui comprend : C1q, C1r, C1s, C4 et C2. La voie classique du complément est spécialisée dans la détection des complexes immuns et des corps apoptotiques. La protéine C1q est synthétisée par l'association de deux hétérodimères C1a-C1b et d'un homodimère C1c tous synthétisés par leur gène respectif *CIQA*, *CIQB*, *CIQC*. Lorsque C1q se lie à la région constante (Fc) des IgM ou IgG ou bien directement à la membrane des corps apoptotiques par fixation avec la calréticuline, cela provoque un changement de conformation qui expose un site de liaison pour le complexe C1r et C1s. Leur association forme le complexe C1 qui, par clivage de C4 (C4a/C4b) et C2 (C2a/C2b) permettra la formation de la C3 convertase par association entre C4b et C2b. La C3 convertase pourra ensuite cliver la protéine C3 (C3a/C3b). C3b a la capacité d'opsoniser les pathogènes et les complexes immuns avant d'être reconnu par les récepteurs du complément présents à la surface des cellules phagocytaires. Les mutations des gènes du complément peuvent donc avoir pour conséquence de compromettre la phagocytose des corps apoptotiques et complexes immuns, induisant donc potentiellement un lupus (Figure 2).

**Figure 2 : Schéma de la voie classique du complément – Adapté de *Immunobiology 6th Edition, Janeway & al, 2005*.** La voie classique du complément s'active par la reconnaissance de complexes immuns ou de corps apoptotiques par le complexe C1q. C1q s'associe ensuite avec le complexe C1r/C1s pour permettre le clivage de C4 et C2. Les fragments de C4 et C2 s'associent pour former la C3 convertase. La C3 convertase clive à son tour C3 afin de donner C3b. C3b a la capacité d'opsoniser les pathogènes et les complexes immuns afin de stimuler leur phagocytose.

De plus, au-delà de la capacité du complément à réguler la phagocytose des débris cellulaires, il est nécessaire de rappeler son rôle à la fois en tant qu'inhibiteur de la production d'interféron de type I (IFN/I) ainsi qu'en tant que protecteur de la tolérance immune. Ce premier rôle est réalisé grâce à sa capacité à se lier au récepteur membranaire LAIR-1 présent sur les monocytes et les cellules dendritiques (DC) dont la transduction du signal provoque un signal inhibiteur de la différenciation et de la fonction des DC. Ce faisant, la liaison de C1q à ces cellules provoque une diminution de la production d'IFN/I par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)<sup>53</sup>. De plus, l'existence d'un biais de liaison des complexes immuns liés à C1q en faveur des monocytes participe également de façon passive à cette diminution de production de cytokines pro-inflammatoires<sup>54</sup>. Enfin, le second rôle de protecteur de la tolérance immune est quant à lui médié par l'activation de CR1 sur les lymphocytes B (LB) qui permet de diminuer leur seuil d'activation et donc de préserver la tolérance en émettant des signaux inhibiteurs aux LB auto-réactifs<sup>55,56</sup>. Le complément étant un acteur majeur dans l'immunité et la préservation de la tolérance, plusieurs publications ont pu lier des mutations dans certains de ces gènes avec le développement du LES. Ainsi, on estime que la prévalence du LES ou des phénotypes de types lupiques pour les mutations des gènes du complexe C1q atteint 90%, faisant de ce complexe le facteur majeur d'induction du LES parmi les gènes du complément<sup>57,58</sup>. Parmi les patients identifiés présentant des mutations dans les gènes *CIQ*, on retrouve une fois encore dans la plupart d'entre eux la présence d'anticorps anti-nucléaires.<sup>59-62</sup>

### 3. Induction des interférons de type I

#### i. Description

L'induction d'une inflammation chronique par les IFN/I est un phénomène pouvant avoir des origines variées qui aboutiront à la sécrétion par les cellules compétentes de cytokines pro-inflammatoires induisant une différenciation et une activation incontrôlée de plusieurs acteurs majeurs du système immunitaire. Si la majorité des cellules sont capables de produire des IFN/I en petite quantité, les cellules productrices majeure de ces IFN sont les pDC. Les IFN/I vont ensuite activer les récepteurs de l'IFN (Interferon- $\alpha/\beta$  receptor – IFNAR) exprimés de façon ubiquitaire. L'activation de cette voie provoquera ensuite la production d'Interferon Stimulated Genes (ISGs) qui sont responsables du phénotype inflammatoire observés chez les patients. Les pDC jouent donc un rôle majeur dans la pathogénèse du LES par leur capacité à engendrer une réponse inflammatoire chronique si une mutation où un stimulus provoque une

activation incontrôlée de leur fonction. L'activation de la production d'IFN/I peut être due à la détection d'acides nucléiques viraux, de complexes auto-immuns avec des acides nucléiques du soi provenant de cellules nécrotiques ou encore de complexes de protéines reliant l'ADN ou l'ARN comme HMGB1 et LL37, libérés après la NETose (NET - Nuclear Extracellular Trap) des cellules Natural Killer (NK)<sup>63</sup>. La NETose étant un processus de mort cellulaire programmé qui provoque la libération du matériel nucléaire des NK dans l'espace extracellulaire afin de piéger les pathogènes, elle peut devenir extrêmement immunogène si son fonctionnement est altéré.

Parmi les trois mécanismes cités, tous ont un point commun puisqu'ils convergent vers les systèmes de détection des acides nucléiques (AN). Les AN étrangers sont des marqueurs de la présence d'une activité virale pour les cellules. Toutefois, le système immunitaire doit être capable de différencier ses propres AN de ceux générés par un pathogène. Ainsi la cellule dispose de plusieurs stratégies pour distinguer les AN du soi et du non soi. Parmi ces stratégies on retrouve :

- **L'expression de détecteurs** capables de reconnaître les AN du non soi.
- La **localisation précise** dans les différents compartiments cellulaires **de ces détecteurs** afin de favoriser leur contact avec des AN étrangers et limiter la reconnaissance des AN du soi.
- La **reconnaissance de caractéristiques exclusives aux pathogènes** telles que les long ARNdb, les motifs CpG dans les ADNsb ou encore certaines structures secondaires des AN pathogéniques.
- La **modification des AN du soi** afin de les distinguer des AN du non soi comme la méthylation des ARN et ADN.
- La **dégradation des AN du soi cytosoliques** afin d'empêcher leur reconnaissance par les senseurs des AN.

Toutes ces stratégies reposent sur la sensibilité et la spécificité de ces senseurs d'AN afin qu'ils puissent engendrer une réponse immune adéquate. Une activation inadéquate des voies de ces récepteurs par des mutations, une localisation erronée ou un surplus d'AN du soi non dégradés peuvent tous induire une forte expression d'IFN/I par les pDC qui aboutiront au

développement du LES ou d'autres maladies auto-immunes et inflammatoires. Il existe deux groupes principaux de détecteurs des AN reliés au LES : les récepteurs de type Toll (TLR) et les senseurs d'acides nucléiques cytosoliques.

## ii. Toll-Like Receptors

Les TLR sont des récepteurs membranaires de reconnaissance de motifs moléculaires ayant la capacité de reconnaître des motifs conservés entre les pathogènes. Chaque TLR est capable de reconnaître plusieurs types de motifs différents et sont également dispersés dans différents compartiments de la cellule afin de former un réseau de surveillance permanent capable de détecter la présence de pathogènes et d'induire une réponse immunitaire adéquate. TLR7 et TLR9 sont deux de ces récepteurs membranaires dont la fonction est liée au développement du LES. Ces TLRs, qui résident dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE), sont transférés dans les endosomes grâce à la protéine UNC93B1 qui assure leur bonne localisation cellulaire ce qui limite leur accès aux auto-antigènes mais améliore celui aux antigènes étrangers.<sup>64</sup>

TLR9 est un senseur de nucléotides activé par la liaison avec des dinucléotides CpG non méthylés. Ces dinucléotides sont envoyés dans les endosomes où se trouve TLR9 afin d'activer une réponse pro-inflammatoire adéquate par la voie NF- $\kappa$ B.<sup>65</sup> Chez des patients atteints de lupus, on retrouve un nombre accru de LB et de monocytes exprimant TLR9 lorsque la maladie est fortement active comparé à ceux présentant une activation plus modérée. De plus, la quantité de ces cellules exprimant TLR9 corrèle avec les niveaux d'anticorps anti-ADNdb.<sup>66</sup> Une suractivation ou une surexpression de TLR9 peut donc induire une inflammation chronique capable d'induire le LES. De façon analogue, TLR7 reconnaît les ARNs<sub>b</sub> présents dans les endosomes et est capable d'induire la production d'IFN/I une fois activé.<sup>67</sup> L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de TLR7 permet d'empêcher l'apparition de lésions rénales et pulmonaires chez des souris MRL/lpr.<sup>68</sup> De plus, la diminution de l'expression de TREML4, une protéine clé dans la transduction du signal de TLR7, par des shRNA a démontré l'importance de son rôle dans la production d'IFN/I et par conséquent, dans l'activation des macrophages, DC et neutrophiles<sup>69</sup>. Ces deux exemples démontrent l'importance de la bonne expression, activation et localisation des TLR dans le développement du lupus. Une dérégulation de l'un de ces facteurs peut aboutir à l'activation chronique ou plus importante de leur voie de signalisation,

provoquant une expression accrue de cytokines pro-inflammatoires et l'activation du système immunitaire<sup>70</sup>. C'est la raison pour laquelle certains polymorphismes des gènes de la signalisation de TLR7 et TLR9 ont été associés au lupus, notamment *IRF5* et *IRF7*<sup>71</sup>. En ce qui concerne l'aspect monogénique du lupus induit par la voie des TLR, une mutation d'*ACP5* a été identifiée comme responsable de l'induction du LES. *ACP5* code la protéine TRAP, une phosphatase qui interagit avec l'ostéopontine dans les pDCs. La diminution de l'expression ou de la fonction de TRAP provoque une augmentation de la phosphorylation d'ostéopontine qui en retour, induit une translocation nucléaire augmentée d'IRF7 et de p65 de la voie NFκB après stimulation de TLR9. Cette mutation d'*ACP5* provoque donc une surexpression des ISG et par conséquent augmente fortement les risques d'induction du lupus<sup>72,73</sup>.

### iii. Senseurs d'acide nucléiques cytosoliques

Les senseurs d'acide nucléiques cytosoliques ont, comme TLR7 et 9, une fonction de reconnaissance d'AN du non soi, mais présentent d'autres facultés, motifs de reconnaissance ou localisation. On retrouve par exemple ceux ayant pour fonction de détecter les acides nucléiques pour activer une réponse immunitaire et ceux qui ont pour fonction de les dégrader afin d'éviter l'activation de cette réponse à cause d'une trop forte quantité d'AN du soi. Toutefois, les gènes en question étant principalement liés à un autre syndrome inflammatoire, le syndrome Aicardi-Goutières (AGS), avec lequel certains cas de LES se chevauchent, ils seront abordés dans un autre chapitre dédié à la présentation de ces maladies.

## 4. Perte de tolérance

### i. Description

La perte de la tolérance correspond à la reconnaissance par les lymphocytes T (LT) ou LB d'antigènes du soi induisant la formation d'auto-anticorps. La synthèse des anticorps nécessitant l'activation des LB, une perturbation dans le développement ou la fonction de ces cellules ainsi que des divers partenaires de leur activation peut provoquer le développement du LES. Par conséquent, plusieurs études sont parvenues à démontrer l'existence de défauts dans les mécanismes de sécurité qui prémunissent de l'apparition des LT et LB auto-réactifs. Ces

défauts peuvent être observés depuis les cellules présentatrices d'antigènes (APC), en passant par les LT, jusqu'aux LB. Les divers exemples cités ci-dessous suivront ce même parcours.

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes capable de phagocyter les antigènes du soi et du non soi afin de les présenter sur des molécules de CMH de classe II. Lorsque ces cellules sont immatures, elles n'ont pas encore rencontré de pathogènes et présentent donc des épitopes du soi. Leur action est tolérogène puisqu'elle permet de provoquer la délétion ou l'anergie des T auto-réactifs dans les ganglions lymphatiques. En revanche, en présence d'une inflammation et donc de pathogènes environnants, ces cellules vont devenir matures et ont une plus grande chance de phagocyter un antigène étranger et de le présenter aux LT, initiant ainsi une réponse contre ce pathogène. La capacité d'un DC à inhiber ou à activer un LT provient en grande partie de l'expression de protéines inhibitrices ou stimulatrices à leur surface. Leur profil d'expression varie en fonction de l'état immature ou mature des DC. Partant de ce principe, les DC immatures expriment la protéine PD-L1 qui a pour rôle de supprimer la fonction des LT auto-réactifs reconnaissant les épitopes du soi. Toutefois, une étude a démontré que dans le LES, les DC immatures expriment de façon réduite PD-L1, diminuant leur capacité à réguler les LT auto-réactifs.<sup>74</sup>

Le phénotypage des LT dans le lupus nous renseigne sur les différentes sous-populations pouvant jouer un rôle dans sa pathophysiologie. Ainsi on retrouve une plus forte proportion de LT double négatifs ( $LT_{DN}$ )  $CD4^+/CD8^-$  chez les patients lupiques.<sup>75</sup> Cette augmentation des  $LT_{DN}$  provient en partie des  $LT_{CD8^+}$  qui, après stimulation par CD3/CD28, diminuent leur expression de CD8. Cette modification d'expression change également le profil cytokinique de ces cellules qui expriment alors plus fortement IL1, IL8 et IL17. Ce profil cytokinique permet non seulement de provoquer une réponse pro-inflammatoire, mais également d'apporter un soutien au développement des LB et à leur production d'auto-anticorps par l'action d'IL17, qui promeut le changement de classe des anticorps.<sup>76</sup> Les  $LT_{DN}$  étant les principaux producteurs d'IL17 dans le LES<sup>75</sup>, leur intérêt dans le développement de cette maladie se fait croissant puisque les patients LES présentent un taux d'IL17 qui corrèle avec la gravité de la maladie.<sup>77</sup> De plus, les  $LT_{DN}$  ont également été montrés comme causaux dans la production d'anticorps anti-ADN dans le LES.<sup>78</sup>

De façon analogue aux deux premiers exemples, les LT folliculaires ( $LT_{FH}$ ) sont une sous-population dont le nombre est augmenté dans les souris MRL/lpr<sup>79</sup> avec une corrélation entre leur présence accrue et l'activité de la maladie chez les patients<sup>80,81</sup>. La forte émergence de  $LT_{FH}$  est issue d'une surexpression d'OX40L sur les APC, elle-même provoquée par une activation soutenue de TLR7. Cette surexpression envoie un signal promouvant le changement des  $LT_{CD4^+}$  naïfs et mémoires en  $T_{FH}$  fonctionnels<sup>82</sup>, capables d'exprimer IL21 pour soutenir les LB auto-réactifs. Cette cascade d'évènement explique de ce fait la corrélation observée entre la propension de  $LT_{FH}$  activé et les titres d'auto-anticorps chez les patients.<sup>83</sup>

Pour conclure, deux exemples supplémentaires illustrent la perte de la tolérance par des défauts d'activation des LB. Le premier montre la capacité des LB transitionnels ( $LB_T$ ) à se différencier en LB de la zone marginale ( $LB_{MZ}$ ) par activation via TLR9. Ces  $LB_{MZ}$  sont alors capables de produire des anticorps avec changement de classe sans qu'il n'y ait engagement de leur récepteur avec un LT.<sup>84</sup> Ces résultats font écho à ceux de *Papadimitraki et al*, cités plus haut, montrant que le nombre de LB exprimant une plus grande quantité de TLR9 corrèle avec la production accrue d'anticorps anti-ADNdb.<sup>66</sup> Enfin, le second exemple montre que la surexpression de BAFF, une cytokine essentielle à la survie et à la maturation des LB périphérique ( $LB_p$ ), permet de sauver des LB auto-réactifs qui auraient dû être éliminés par phénomène de concurrence en périphérie.<sup>85</sup> Cette dépendance à BAFF des LB auto-réactifs fut également confirmée par une autre étude qui démontra que la forte concurrence entre les LB auto-réactifs et les LB matures naïfs pour BAFF, diminue l'accès des premiers à cette cytokine activatrice. Ainsi, lorsque BAFF est surexprimé, les LB auto-réactifs ont une plus grande chance de survivre en contrant les signaux de morts induits par le récepteur B (B-Cell Receptor – BCR) et transduits jusqu'à la protéine pro-apoptotique BIM.<sup>86</sup>

## ii. PRKCD

*PRKCD* code la protéine PKC $\delta$ , une protéine kinase exprimée de façon ubiquitaire. PKC $\delta$  est importante pour la régulation de la survie, la prolifération et l'apoptose. Elle possède un grand nombre de résidus tyrosines phosphorylables ainsi qu'un site de clivage qui expliquent la complexité de son activation et des différents rôles qu'elle joue en fonction des stimuli reçus et des substrats sur lesquelles elle exerce son activité. Parmi les partenaires capables d'induire

l'activation de PKC $\delta$ , on retrouve notamment, la voie mTOR, PDK1, PI3K, Src et PYK2. Chacune de ces voies peut phosphoryler l'un des 11 sites de phosphorylation de PKC $\delta$ , induisant ainsi différents profils d'activation et par conséquent différents profils d'action de PKC $\delta$ <sup>87-89</sup>.

Dans l'immunité, PKC $\delta$  est d'une grande importance pour la tolérance au soi induite par la sélection des LB. Outre le fait que PKC $\delta$  soit phosphorylé par activation du BCR et des récepteurs BAFF, des souris KO pour PKC $\delta$  montrent une induction diminuée de l'apoptose chez les LB<sub>T</sub> suite à l'activation du BCR. La sélection négative des LB<sub>T</sub> dans la rate se trouve donc moins efficace. De plus, PKC $\delta$  agissant comme un régulateur négatif de la signalisation du BCR, son absence provoque un fort signal continu du BCR, promouvant la différenciation des LB<sub>T</sub> en LB<sub>MZ</sub> ou LB<sub>FH</sub>, aidant ainsi ces LB<sub>T</sub> auto-réactifs à continuer à se développer jusqu'au stade mature, tout en les rendant extrêmement sensible à une activation future par un antigène du soi.<sup>90</sup> La même équipe ayant observé que la déficience en PKC $\delta$  rendait les LB indépendant de tout signal induit par le récepteur BAFF, a démontré que cette indépendance provenait d'un mécanisme actif, induit par BAFF, qui empêche la translocation inductrice d'apoptose de PKC $\delta$  dans le noyau.<sup>91</sup> Une absence de PKC $\delta$  pourrait donc provoquer une résistance naturelle à l'apoptose induite chez les LB auto-réactifs par la concurrence avec les LB matures naïfs pour BAFF. Enfin, les souris KO pour PKC $\delta$  présentent également une prolifération augmentée des LB et cela même en absence de toute stimulation.<sup>92</sup>

Des cas de lupus monogéniques liés à des mutations récessives de *PRKCD* ont été observées chez plusieurs patients. Une première étude a montré qu'une mutation faux sens sur un résidu très conservé, provoque une diminution de la phosphorylation de PKC $\delta$ , générant une protéine inactive ainsi qu'une perte de stabilité diminuant la quantité globale de PKC $\delta$  présente dans les cellules des patients. Cette perte provoque une augmentation de la prolifération des B ainsi qu'une résistance à l'apoptose chez les LB des patients.<sup>93</sup> Concordant avec cette première étude de *Belot et al.*, *Pullabhatla et al* ont montré une association entre les LES et des variants de *PRKCD*<sup>94</sup>, tandis que plusieurs autres cas de mutation de *PRKCD* associées à un lupus ou à des symptômes associés ainsi qu'une hyper prolifération des LB ont été rapportés. Ces éléments confirment l'implication de *PRKCD* dans le maintien de la tolérance B ainsi que son lien avec le développement de l'auto-immunité et le LES.<sup>95</sup>

## 5. Autres syndromes monogéniques liés au lupus

### i. Contexte dans l'étude

Les gènes présentés précédemment dans cette étude peuvent présenter des variants augmentant fortement la susceptibilité au LES. Ils sont considérés comme causaux dans la maladie puisque le LES est la principale conséquence du défaut fonctionnel qu'ils induisent. Toutefois, certains variants monogéniques, à l'origine d'autres maladies telles que le syndrome Aicardi-Goutières ou le syndrome de Noonan, présentent parfois chez les patients souffrant de ces maladies, des symptômes proches du lupus. Certains de ces patients, dans de rares cas, sont également diagnostiqués lupiques en plus de leur pathologie première. La pathophysiologie de ces maladies présente beaucoup de similitudes avec celle du lupus du point de vue des mécanismes perturbés par ces mutations monogéniques. Les familles participant à notre étude ne présentant pas uniquement des lupus mais également d'autres symptômes entrant dans le large spectre des maladies auto-immunes, il est nécessaire de présenter brièvement quelques exemples de mutations monogéniques liées à ces syndromes présentant des phénotypes auto-immuns chevauchant avec le LES.

### ii. Syndrome Aicardi-Goutières

Le syndrome Aicardi-Goutières (AGS) est une maladie précoce et progressive du cerveau provoquée par une inflammation chronique. L'AGS est caractérisé par des calcifications des ganglions de la base, des anomalies de la matière blanche ainsi que des atrophies du cerveau. La présence récurrente de lymphocytose dans le fluide cébrospinal suggère l'implication de l'inflammation dans cette maladie, confirmée par l'expression accrue d'IFN/I observée chez les patients. De nombreux gènes ont été associés à l'AGS tels que : *TREX1*, *RNASEH2A*, *RNASE2HB*, *RNASEH2C*, *SAMHD1*, *ADAR1* et *IFIH1*.

*TREX1* code une exonucléase visant les ADN génomiques simples et double brins. Des défauts de son activité provoquent en conséquence une augmentation de la quantité d'AN dans le cytosol, augmentant les risques d'activation chronique de la production d'IFN/I. Plusieurs cas de patients lupiques porteurs de mutations *TREX1* ont été répertoriés, ceux-ci présentant régulièrement des formes neurologiques du lupus.<sup>96-102</sup> En revanche, bien que la RNaseH2 soit

une enzyme également impliquée dans la dégradation des AN, notamment des complexes ARN/ADN, son association avec le lupus reste très faible, avec une étude ayant découvert des variants rares affectant la fonction de ses gènes dans seulement deux patients LES parmi une cohorte de 600 malades.<sup>103</sup>

*SAMHD1* code une enzyme capable de dégrader les désoxyribonucléoside triphosphate (dNTP). L'équilibre des stocks de dNTP étant très important pour la stabilité génomique, des déficiences de cette enzyme provoquent des dommages à l'ADN rendant les cellules plus sensibles à un stress génotoxique et activant l'expression de gènes impliqués dans la signalisation des dommages de l'ADN ainsi que les ISGs.<sup>104</sup> Un patient souffrant à la fois d'AGS et de LES a également été rapporté comme portant des mutations biallélique de *SAMHD1*.<sup>105</sup>

*IFIH1* (ou *MDA5*) est un gène produisant une protéine appartenant à la famille des senseurs cytosoliques d'AN. Plus précisément, la protéine IFIH1 est capable de détecter les ARNdb dans le cytosol de la cellule, signes de la présence d'une activité virale, afin d'induire la production d'IFN/I. Quatre patients porteurs de mutations gain de fonction d'*IFIH1* avec un LES ont été répertoriés, la mutation provoquant une augmentation de la synthèse d'IFN/I ainsi qu'une forte ISG.<sup>106-108</sup> Ce mécanisme d'induction du LES par IFIH1 est potentiellement mis en cause dans le cas des mutations d'*ADAR1* pour lesquelles deux cas de LES ont été présentés.<sup>106</sup> *ADAR1* code une enzyme capable convertir les adénosines contenus dans les ARNdb en inosines. Ce mécanisme, ciblant principalement les séquences Alu<sup>109</sup>, change radicalement la structure et la stabilité des ARNdb ainsi que la nature des protéines qu'ils codent puisque les inosines sont reconnus comme des guanosines. Les mutations d'*ADAR1* étant de type perte de fonction, trois hypothèses ont été proposées pour expliquer l'induction d'IFN/I observée chez ces patients. La première est que la perte de l'activité d'*ADAR1* augmenterait la stabilité des certains ARNdb, générant une augmentation de leur quantité dans la cellule, induisant ensuite l'ISG par activation d'*IFIH1*. La seconde propose que le changement des adénosines en inosines empêcherait la reconnaissance par IFIH1 de la plupart des ARNdb ciblés par *ADAR1*, limitant ainsi son activation par des ARNdb endogènes. Enfin, le dernier modèle propose que l'absence de cette modification aurait un effet délétère sur un ARNdb en particulier qui aurait une fonction de suppression de l'induction de l'IFN.<sup>110,111</sup>

### iii. SAVI

Le SAVI (STING-Associated Vasculopathy with onset in infancy) est une interféronopathie caractérisée par une inflammation systémique précoce, des manifestations pulmonaires telles que des fibroses, ainsi que des vasculopathies cutanées. Le SAVI est induit par des mutations du gène *TMEM173* codant la protéine STING. STING est essentiel à la réponse aux ADN cytosoliques.<sup>112</sup> En effet, cGAS, une protéine capable de détecter les ADNdb, va générer une molécule de signalisation appelée cGAMP en réponse à la liaison à ces ADN cytosoliques. cGAMP est ensuite reconnaissable par STING qui va induire une réponse pro-inflammatoire par activation de la voie NF-κB et d'IRF3.<sup>113</sup> STING semble partager une certaine association avec le lupus. En effet *Jeremiah & al.* ont rapporté la présence d'une mutation gain de fonction de STING dans une famille présentant un syndrome inflammatoire et des symptômes lupiques.<sup>114</sup> De plus, une autre étude a présenté une corrélation entre les patients atteints de LES et la capacité de leur sérum à induire dans des modèles cellulaires *in vitro* la synthèse d'IFN/I et l'activation d'une ISG. Cette capacité d'induction était perdue dans les cellules KO pour *TMEM173* et était également exclusive aux patients atteints de LES, les patients souffrant d'autres maladies auto-immunes (Syndrome de Sjogren et sclérose systémique) ne parvenant pas à induire une réponse similaire.<sup>115</sup> Ces données soulignent donc le lien potentiel entre la voie STING, le SAVI et le LES, tous reliés par la synthèse des IFN/I.

### iv. SPENCD

La spondyloenchondrodysplasie (SPENCD) est une maladie caractérisée par des déformations squelettiques, des anomalies neuronales telles que les calcifications cérébrales ainsi que des symptômes auto-immuns. Cette maladie étant considéré comme une interféronopathie due à la présence d'une forte production d'IFN/I, elle présente donc plusieurs points communs avec l'AGS et surtout le LES d'un point de vue autant phénotypique que pathophysiologique. Des mutations d'*ACP5*, un gène codant TRAP, une phosphatase visant principalement l'ostéopontine, ont été reliés au développement de la maladie.<sup>73</sup> L'ostéopontine est une protéine essentielle à la transduction du signal de TLR9 pour l'activation de l'expression d'IFNα.<sup>116</sup> Des mutations inactivatrices d'*ACP5* induiraient donc une hyperphosphorylation de l'ostéopontine et par conséquent une hyperactivation de la voie de TLR9 et de la production

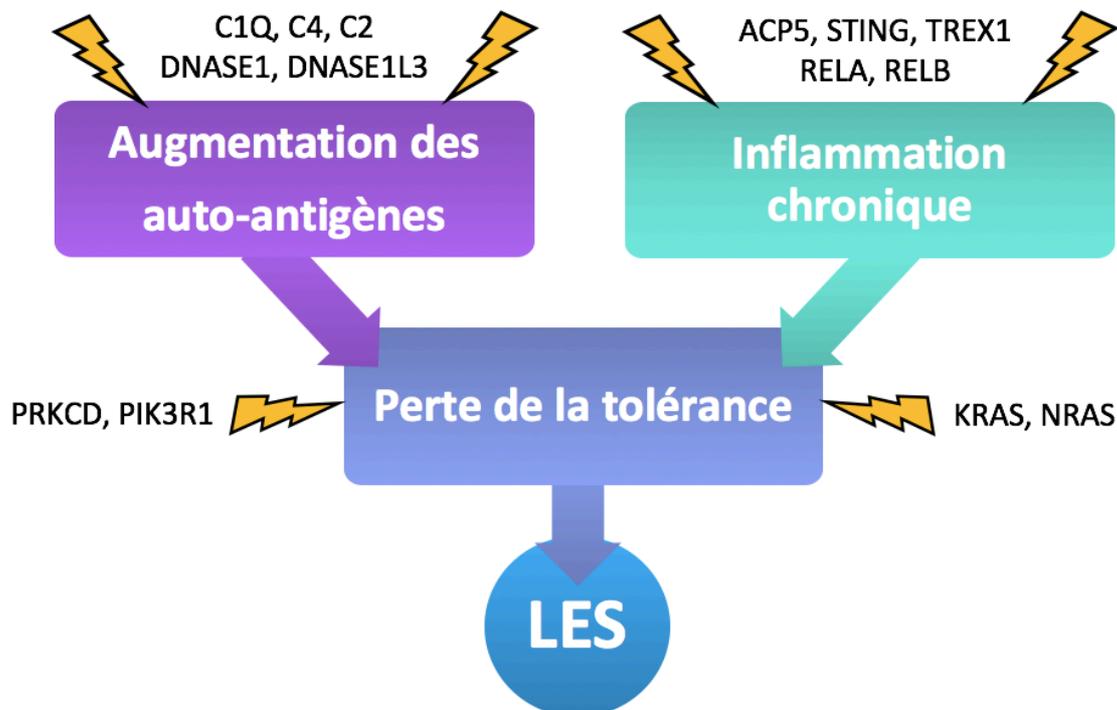
d'IFN $\alpha$ . Plusieurs patients souffrant de SPENCD dû à des mutations d'*ACP5* ont également développés un LES.<sup>73,117,118</sup>

#### v. Syndrome de Noonan

Le syndrome de Noonan est une maladie congénitale trouvant son origine dans les mutations activatrices de la voie RAS. Les patients atteints de ce syndrome présentent une petite taille, des troubles neurologiques, cardiaques ainsi qu'une dysmorphie faciale. Une proportion non négligeable de ces patients présente également des symptômes lupiques.<sup>119-124</sup> Dans l'immunité, l'activation de la voie RAS peut-être associé à l'engagement du TCR ainsi qu'à l'activation des récepteurs de facteurs de croissance (GFR : Growth Factor Receptor), en particulier les cytokines. Une suractivation de cette voie dans les LT serait donc en mesure d'induire une auto-immunité en plus d'un syndrome de Noonan. Après stimulation du TCR ou d'un GFR, une protéine GEF (Guanine Nucleotide-Exchange Factor) telle que SOS1 pour les GFR ou RASGRP1 pour le TCR, va entraîner la perte d'un groupe guanosine diphosphoate (GDP) de RAS (*KRAS*, *NRAS*, *HRAS*) et l'acquisition d'une guanosine triphosphate (GTP) permettant aux protéines RAS d'activer les RAF kinases (*RAF1*, *BRAF*, *ARAF*) puis la voie MAPK. Les protéines RAS peuvent repasser de l'état GTP à l'état GDP via leur activité GTPase intrinsèque et l'intervention de GAP (GTPase activating proteins).

Parmi les gènes de la voie RAS pour lesquels un variant a été rapporté dans des cas de lupus, on retrouve notamment *KRAS*<sup>123</sup>, *PTPN11*<sup>124</sup> et *SHOC2*<sup>125</sup>. Certaines mutations de ces gènes associées au syndrome de Noonan ont fait l'objet d'analyses moléculaires permettant de comprendre leur impact sur la protéine produite. Ces études, bien que n'étant pas réalisées sur les mêmes variants que ceux retrouvés dans le LES, offrent donc des exemples pouvant expliquer les mécanismes d'induction d'une suractivation de la voie RAS par des mutations de ces gènes. Ainsi donc, certaines mutations de *KRAS* provoquent une activité GTPase intrinsèque défaillante ou bien une absence de réponse aux GAPs, provoquant une sur-activation de la voie par perte de ce rétrocontrôle négatif.<sup>126</sup> La plupart des mutations identifiées de *PTPN11* se situent dans les domaines N-SH2 et PTP stabilisant SHP2 sous sa forme inactive. Les mutations de *PTPN11* empêcheraient l'inhibition du domaine PTP, induisant une activation continue de la voie de signalisation RAS/MAPK.<sup>127,128</sup> Enfin, la protéine *SHOC2* a pour rôle de déphosphoryler PP1C, une phosphatase capable d'induire la voie RAS par déphosphorylation

de RAF1, avant de provoquer son transport à la membrane où se trouve son substrat. Or, un variant de *SHOC2* décrit dans la littérature provoque la N-myristoylation de sa protéine, une modification post-traductionnelle facilitant l'ancrage des protéines aux membranes cellulaires. En conséquence, SHOC2 qui est normalement exprimé de façon homogène dans la membrane, voit sa localisation intracellulaire concentrée à la membrane. Cette localisation ciblée à la membrane provoque une déphosphorylation prolongée de RAF1 et donc une activation soutenue de la voie RAS.<sup>129</sup>



**Figure 3 : Schéma-bilan des voies impliquées dans le développement du LES.** L'augmentation des auto-antigènes et l'inflammation chronique sont des facteurs capables d'induire une perte de la tolérance. Cette perte de tolérance permet ensuite de générer des auto-anticorps, principaux effecteurs des dégâts tissulaires observés dans le LES. Les flèches jaunes sont reliées à divers gènes dont des mutations monogéniques ont été reliées au LES.

## 6. Syndrome de Gougerot-Sjögren

### i. Contexte dans l'étude

Le syndrome de Gougerot-Sjögren (SGS), tout comme l'AGS peut parfois se chevaucher avec le LES. Dans notre étude, les familles de patients observées présentent toutes un phénotype semblable avec LES ou présence d'auto-anticorps, phénomène de Raynaud ainsi que SGS. Notre étude étant basée sur l'étude de formes monogéniques du LES, la présence

récurrence du SGS dans les familles étudiées suggèrent que nos mutations d'intérêt touchent des voies communes dans la pathophysiologie de ces deux maladies. Les exemples de cas monogéniques de maladie auto-immunes présentant des chevauchements entre l'AGS, le SPENCD et le LES soutiennent également l'idée selon laquelle le LES et le SGS pourraient partager une voie de développement commune. La dernière partie de notre chapitre abordera donc la pathophysiologie du SGS afin d'apporter quelques éclaircissements sur les mécanismes pouvant expliquer l'apparition récurrente de cas de SGS chez les familles étudiées.

## ii. Pathophysiologie du syndrome de Gougerot-Sjögren

Le SGS est une maladie auto-immune caractérisée par des infiltrats lymphocytaires touchant les glandes salivaires et lacrymales, provoquant des sécheresses buccales et oculaires (xérostomie et kéroconjonctivite sèche respectivement) ; le SGS provoque également des lymphomes comme principale complication. Cette maladie est estimée comme la seconde plus courante maladie auto-immune systémique derrière l'arthrite rhumatoïde (AR) et devant le LES. La pathophysiologie du SGS est centrée sur l'activation chronique des LB caractérisée par la production soutenue d'auto-anticorps anti-Ro/SSA et La/SSB ainsi que par le développement de structures semblables à des centres germinatifs (CG-like) dans les glandes touchées par la maladie.

Le SGS est une maladie qui se déclare par l'action combinée de l'immunité innée et acquise. A l'image du LES, un fond de susceptibilité aux maladies auto-immunes rend les individus plus ou moins sensibles à son développement face à l'intervention d'un déclencheur. Les infections virales font partie des premiers suspects en tant que déclencheur du SGS. En effet, les organes principalement touchés étant les glandes lacrymales et salivaires, des zones de contact avec les pathogènes, et la pathogénèse de la maladie étant fortement liée à l'expression des IFN/I et II, les infections virales des cellules épithéliales apparaissent comme un excellent candidat pour expliquer le déclenchement du SGS. En effet, une infection virale va provoquer à la fois l'activation mais également la mort cellulaire parmi les cellules épithéliales touchées. Ces deux facteurs vont promouvoir la libération dans l'espace extracellulaire de chemokines attirant principalement les pDC ainsi que de complexes ribonucléoprotéiques Ro/SSA et La/SSB dont les auto-anticorps sont régulièrement observés dans le SGS. Les DC une fois arrivés dans les glandes vont s'activer et produire des IFN/I, IL6

et IL12 qui auront pour effet de faire migrer les lymphocytes dans la zone active ainsi que de provoquer la sécrétion de BAFF par les cellules épithéliales et les pDC eux-mêmes. *In situ*, les LB capables de reconnaître Ro/SSA et La/SSB induiront une production d'auto-anticorps qui formeront des complexes immuns capables d'induire à leur tour, la sécrétion d'IFN/I, provoquant une inflammation chronique.<sup>130</sup> Parmi les indices soutenant ce modèle d'induction par infection virale et production d'IFN on retrouve principalement :

- La capacité du virus Epstein-Barr (EBV) à induire une réponse IFN en activant la signalisation TLR3 chez les DC par production d'ARNdb ; ainsi qu'à provoquer la sécrétion de ces même ARNdb couplés à la protéine La, un antigène du soi central dans le SGS.<sup>131</sup>
- L'activation de TLR3 dans un modèle lupique de souris NZB/W F1 par un agoniste provoque l'activation du système immunitaire ainsi inflammation accélérée des glandes salivaires.<sup>132</sup>
- La présence de cellules produisant de l'IFN $\alpha$  dans les infiltrats lymphocytaires observés dans des biopsies de glandes salivaires chez des patients atteints de SGS.<sup>133</sup>
- La capacité du sérum de ces mêmes patients à induire l'expression d'IFN $\alpha$  par des cellules mononucléaires périphériques sanguines (PBMC) ; par l'action des complexes immuns formés après mise en contact de cellules apoptotiques ou nécrotiques avec le sérum des patients.<sup>133</sup>
- Une expression augmentée d'ISG après stimulation *in vitro* de cellules épithéliales de glandes salivaires ainsi qu'une présence confirmée de pDC dans les glandes salivaires des patients.<sup>134</sup>

Toutefois, malgré les résultats concordant avec cette hypothèse, aucune n'est parvenue à présenter une association reproductible entre une infection virale et le développement du SGS. Cette absence d'association peut provenir du fait que le stimulus viral ne soit plus détectable au moment de l'apparition des symptômes de la maladie. Une étude a par exemple put montrer dans un modèle de souris lupiques qu'une infection par un cytomégalovirus murin visant les glandes salivaires provoque dans un délai de trois mois des infiltrats leucocytaires sans aucune détection virale du CMV et cela, alors que les souris non infectées ne développement jamais de

complications des glandes salivaires malgré leur fond auto-immun.<sup>135</sup> Une autre explication pourrait être trouvée dans la surexpression de séquences rétrovirales endogènes qui induiraient la maladie.

Si cette réaction immunitaire innée à la présence de pathogènes viraux des cellules épithéliales semble expliquer l'origine de la production d'IFN/I et donc de l'inflammation chronique, elle n'est qu'un point de départ potentiel pour le développement du SGS. L'activation de l'inflammation va provoquer le recrutement des lymphocytes au niveau du tissu touché grâce à l'expression par les cellules épithéliales de CXCR5 et CXCL13. Ces protéines vont provoquer le recrutement des LT<sub>FH</sub> et des LB pour créer des structures CG-like observées dans les glandes salivaires de patients SGS.<sup>136</sup> L'action conjointe de la production de BAFF par les cellules monocytes, macrophages, pDC et cellules épithéliales ainsi que l'aide apportée par les LT<sub>FH</sub> dans les structures CG-like vont permettre de favoriser la survie, la division et la maturation des LB qui pourront se différencier en plasmocytes et LB mémoires afin d'induire la production d'auto-anticorps anti Ro/SSA et La/SSB.<sup>137</sup> La production de BAFF dans les cellules immunitaires citées quant à elle est principalement induite par les IFN/I et II<sup>138,139</sup>, tandis qu'elle est stimulée dans les cellules épithéliales salivaires par les infections virales présentant des ARNdb.<sup>140</sup> On retrouve donc bien cette notion dans le SGS selon laquelle l'immunité innée va induire un terrain propice au développement de l'immunité acquise qui finira par provoquer une auto-immunité.

La pathophysiologie du SGS et du LES présentent donc quelques points communs. Bien que le phénomène central qui dirige l'évolution de la maladie et l'apparition des symptômes soit différent, les deux maladies partagent certains traits comme l'induction de l'inflammation par induction des TLR et sécrétion par les pDCs ainsi que par la stimulation des LB pour induire une perte de la tolérance et la production d'anticorps anti-nucléaires.

## Partie II : Stratégie expérimentale

### A / Critères d'inclusion, Exome et Modèle cellulaire

Le LES est une maladie pouvant avoir de multiples origines et son étiologie est complexe. Les études réalisées à ce jour ont permis d'identifier certains mécanismes impliqués dans la maladie, comme la phagocytose via le complément, la détection des acides nucléiques et leur dégradation, ou la voie de signalisation contrôlée par *PRKCD*. Cependant une étude basée sur des modèles mathématiques a montré que le nombre de gènes retrouvés dans le LES n'explique qu'environ 15% de l'héritabilité de la maladie, démontrant ainsi que d'autres variants et voies impliquées restent à découvrir.<sup>141</sup>

Le but de notre étude est d'identifier et de caractériser de nouveaux variants monogéniques impliqués dans le développement du LES afin de développer des cribles permettant de mieux stratifier les patients lupiques ainsi qu'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour participer au développement de traitements plus ciblés. Le laboratoire a fait l'hypothèse que les formes pédiatriques du LES sont associées à un risque génétique beaucoup plus important, ce qui peut faciliter l'identification de nouvelles causes monogéniques de prédisposition. Cette hypothèse est soutenue par deux études différentes. La première par *Webb & al.*, a démontré que les patients présentant un LES précoce présentaient un phénotype plus sévère de LES que ceux ayant développé un LES à l'âge adulte avec notamment des protéinuries, une anémie hémolytique et des anticorps anti-ADNdb.<sup>142,143</sup> Les auteurs ont également montré que les formes précoces de la maladie sont liées à une présence accrue de variants augmentant le risque de développer un LES chez des jeunes patients d'origine Africaine.<sup>142</sup> La seconde de *Alcaïs & al.* présente un modèle selon lequel la prédisposition à subir une infection par un pathogène donné est principalement médiée par des défauts monogéniques lorsque l'infection a lieu à un âge précoce. Par opposition, cette même prédisposition suit un modèle complexe (contribution environnementale, infection secondaire, etc...) ou polygénique avec l'âge.<sup>144</sup> Nous pensons que ce modèle proposé pour expliquer la susceptibilité des patients à certains pathogènes peut également s'appliquer aux maladies auto-immunes (Figure 4). Enfin, la diminution du ratio du déséquilibre sexuel observable dans le lupus pédiatrique comparé à l'âge adulte soutient également l'hypothèse d'un impact génétique plus important dans les lupus d'apparition précoce.<sup>8,142</sup>

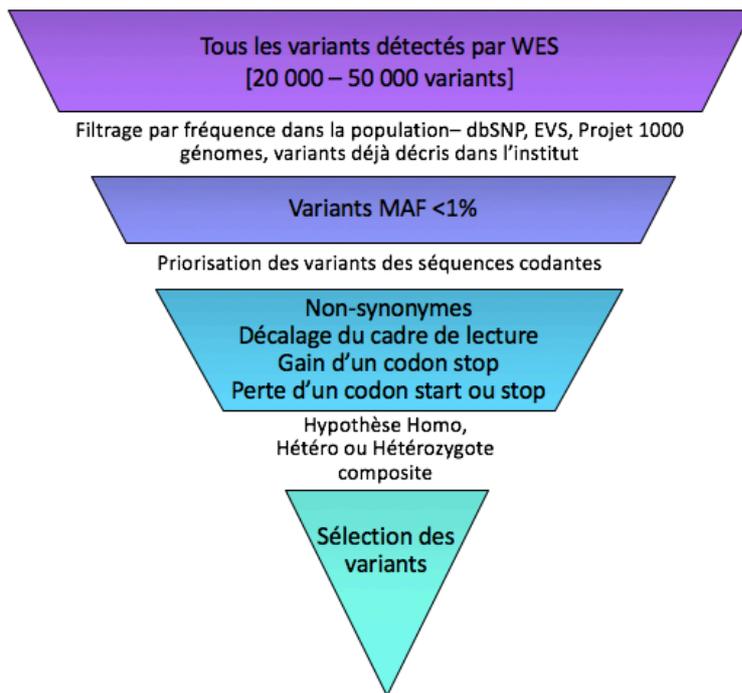
**Figure 4 : Modèle du risque génétique de développement d'une maladie auto-immune en fonction de l'âge – Adapté d'Alcaïs & al, 2010.** La courbe rouge représente le risque de développer une auto-immunité dans le cas d'une origine monogénique tandis que la courbe verte correspond à risque lié à une origine complexe ou polygénique.

Partant de cette hypothèse, le laboratoire a recruté une cohorte de patients atteints de lupus à début précoce ou de formes familiales. Les causes connues de syndromes associées au lupus ont le plus souvent été préalablement exclues (Tableau 2).

<b>Critères d'inclusion</b>	
<b>Diagnostic de LES</b>	
<i>Première manifestation avant 10 ans</i>	<i>LES chez un apparenté du 1<sup>er</sup> degré</i>
<i>Parents consanguins</i>	<i>Syndrome lupique</i>
<b>Dosage du complément (CH50) normal chez les patients LES en rémission</b>	
<b>Consentement éclairé du patient</b>	
<b>Critères d'exclusion</b>	
Déficience héritée du complément	
Présence d'une autre maladie associée avec un risque accru de LES : Syndrome de Klinefelter, maladie granulomateuse chronique, SPENCD, Syndrome Aicardi-Goutières	

**Tableau 2 : Critères d'inclusion et d'exclusion des patients dans l'étude.**

Plus d'une centaine de patients ont été étudiés par séquençage de l'exome complet des patients (WES – Whole Exome Sequencing). Le WES permet d'identifier entre 20 000 et 50 000 variants candidats chez un individu. Plusieurs filtres sont ensuite appliqués afin de diminuer le nombre de variants candidats. Un premier filtre est réalisé sur la fréquence du variant dans la population mondiale. Par comparaison avec des bases de données telles que dbSNP, EVS, le projet 1000 génomes ainsi que la base de données de l'Institut Imagine comprenant les variants déjà décrits dans l'institut, nous récupérons les variants dont la fréquence de l'allèle mineur (MAF – Minor Allele Frequency) est inférieure à 1%. Puis, nous priorisons les variants situés dans les séquences codantes du génome ainsi que ceux provoquant un changement non-synonyme, un décalage du cadre de lecture, l'apparition d'un codon stop ou la perte d'un codon initiateur ou codon stop (Figure 5).



**Figure 5 : Stratégie de sélection des variants obtenus par Whole Exome Sequencing (WES).** Le WES détecte un grand nombre de variants parmi les membres de la famille étudiés. Un premier filtrage est réalisé en fonction de la fréquence des variants dans la population. Seuls les variants dont la fréquence de l'allèle mineur (MAF) est inférieure à 1% dans la population mondiale sont sélectionnés. Enfin, seuls les variants présents dans les zones codantes sont conservés avant d'être classés en fonction du modèle proposé par leur répartition dans la famille.

La liste des variants restants est ensuite croisée avec la ségrégation de la maladie et du variant en question dans la famille pour vérifier s'il satisfait une hypothèse d'hérédité probable. Enfin, les derniers variants présents dans la liste sont sélectionnés en fonction du gène dans lequel ils sont situés ainsi qu'en fonction de l'impact de la mutation sur la protéine prédit par les analyses *in silico*. Par conséquent, notre système de filtrage des variants obtenus favorise la découverte de mutations à fort impact sur les protéines impliquées dans le système immunitaire et néglige les variants impliqués dans la régulation transcriptionnelle du gène associé.

Bien que cette stratégie a déjà été réalisée avec succès dans le cas d'une mutation gain de fonction identifiée dans le gène *TMEM173* codant pour la protéine STING identifié chez des patients atteints d'un syndrome inflammatoire appelé SAVI (STING-Associated Vasculopathy with onset in Infancy)<sup>114</sup>, elle est parfois limitée par l'accessibilité du matériel biologique. Les traitements médicaux donnés au patient, la faible fréquence des visites à l'hôpital, l'impossibilité d'accéder à certains membres essentiels de la famille ou encore le décès du patient sont des événements qui peuvent limiter, altérer ou stopper toute nouvelle récupération du matériel biologique nécessaire à la réalisation du projet. Afin de limiter les besoins en cellules primaires, des lignées de lymphocytes B immortalisées par le virus Epstein-Barr (B-EBVs) sont générées en laboratoire à partir des PBMCs extraits de prélèvements sanguins de

patients. Ces cellules ayant un temps de doublement rapide d'environ 24h, elles permettent d'obtenir une grande quantité de matériel biologique : ADN, ARNm et protéines ; sans nécessité de redemander des échantillons sanguins. Les premiers tests fonctionnels et moléculaires sont réalisés sur les B-EBVs avant d'être répétés sur des cellules primaires de patient.

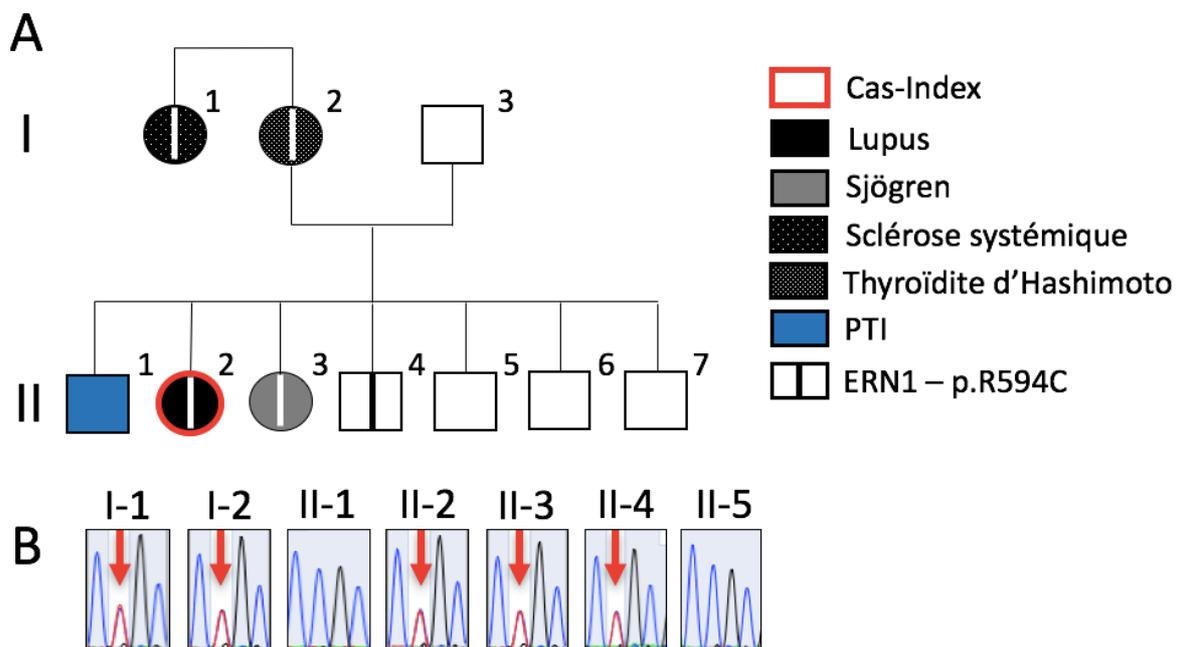
Les B-EBVs existent sous deux formes principales : pré-immortelles et post-immortelles.<sup>145</sup> Les pré-immortelles sont les cellules générées après infection des LB par EBV, ces cellules prolifèrent fortement et restent proches génotypiquement et phénotypiquement des LB primaires. Toutefois, leurs télomères se raccourcissant, ces cellules finissent par mourir au maximum après 160 divisions (entre 2 et 3 mois de culture). Seules vont survivre les B-EBV post-immortelles. Ces cellules vont développer une meilleure activité télomérase suite aux forts changements génotypiques qu'elles subissent : aneuploïdie, mutations, modification de leur profil de méthylation, etc...<sup>146-149</sup> En comparaison, les B-EBV pré-immortels conservent un profil d'expression génique semblable à leur homologue primaire, confirmant leur fiabilité lorsqu'utilisés sur de courtes périodes. Sur le long terme en revanche, leur profil d'expression tend à s'uniformiser entre les lignées, augmentant grandement le risque de faux négatifs au niveau transcriptionnel.<sup>150</sup> Par conséquent, afin de limiter les artefacts liés à l'utilisation des B-EBVs, toutes les expériences sont réalisées à partir de stocks qui furent congelés dès la lignée établie. Les cellules une fois mises en culture ne furent pas utilisées pour des périodes supérieures à 2 mois. Ces précautions d'utilisation permettent de diminuer les risques liés à l'utilisation des B-EBVs. Toutefois, il est nécessaire de ne pas négliger l'effet du virus sur la physiologie de la cellule, la voie NF- $\kappa$ B ainsi que la réponse à IL1 pouvant être activée ou réprimée respectivement.<sup>151,152</sup>

## B / Description des familles étudiées

### 1. Famille A – ERN1

La famille A est composée de dix individus répartis sur deux générations. Parmi eux, cinq personnes présentent un phénotype auto-immuns avec : un lupus [II-2], un syndrome de Gougerot-Sjögren [II-3], un purpuras thrombocytopénique idiopathique (PTI) [II-1], une thyroïdite d'Hashimoto (TH) [I-2] et une sclérose systémique cutanée limitée (SSCL) [I-1]. Tous les patients hormis II-1 présentent des auto-anticorps anti-antigène nucléaires (ANA),

ainsi que d'autres auto-anticorps spécifiques à chaque cas comme des anti-ADN, SSA, SSB, TPO, M2, GP210 et des anti-centromères. L'agrégation familiale ainsi que le diagnostic à l'âge de 6 ans d'une thyroïdite d'Hashimoto chez I-2 suggère une origine génétique aux phénotypes auto-immuns observés (Figure 6). Un WES fut réalisé chez les individus I-2, II-2 et II-3. Après application des filtres cités précédemment, trois gènes présentant un variant hétérozygote furent retenus : *ERN1* (c.1780C>T ; p.R594C), *IRAK4* (c.1336A>T ; p.D422V) et *GMPS* (c.1097A>G ; p.Q366R).



**Figure 6 : Arbre généalogique et séquençage d'ERN1 dans la famille A. (A)** Arbre généalogique de la famille A. **(B)** Séquençage de Sanger du gène ERN1 montrant le variant observé chez les divers membres de la famille séquencés. La flèche rouge vise le nucléotide muté.

Les scores PolyPhen, SIFT et CADD obtenus par analyse *in silico* de ces trois mutations sont rapportés dans le tableau. Les résultats montrent que la mutation d'*ERN1* est la plus délétère sur la fonction de sa protéine, suivie par la mutation *GMPS* également fortement néfaste, puis par la mutation *IRAK4* dont les scores sont plus modérés avec une potentielle tolérance vis-à-vis de la fonction de la protéine. La base de données génomique gnomAD (Genome Aggregation Database) qui répertorie les données de séquençage provenant d'un grand nombre d'exomes ou de génomes entiers provenant d'individus non apparentés montre que l'allèle muté d'*ERN1* observé chez notre patiente n'a été rapporté qu'une seule fois à l'état hétérozygote ; l'allèle muté d'*IRAK4* n'est pas observé, tout comme celui porté par *GMPS*. Ces

résultats montrent que chacun de ces allèles sont extrêmement rares dans la population mondiale, soulignant leur potentiel effet délétère pour leur porteur (Tableau 3).

Gène	Polyphen [ <i>HumVar</i> ]	SIFT	CADD Score	Fréquence gnomAD
<i>ERN1</i>	0.999	0	32	5.89317e-06
	<b>Probablement délétère</b>	<b>Affecte la fonction</b>	<b>Délétère</b>	<b>Rare</b>
<i>IRAK4</i>	0.563	0.36	26.5	0
	<b>Possiblement délétère</b>	<b>Toléré</b>	<b>Délétère</b>	<b>Rare</b>
<i>GMPS</i>	0.888	0	27.1	0
	<b>Possiblement délétère</b>	<b>Affecte la fonction</b>	<b>Délétère</b>	<b>Rare</b>

Tableau 3 : Analyse *in silico* des variants candidats obtenus par Whole Exome Sequencing

La ségrégation familiale de chacun de ces allèles varie également dans la famille. La mutation *ERN1* est présente chez cinq individus différents, quatre malades et un porteur sain : I-1, I-2, II-2, II-3, II-4. Cette répartition soutient un modèle de mutation autosomale dominante avec une pénétrance incomplète. Elle n'explique en revanche pas le développement du PTI observé chez II-1. Toutefois, il est possible que ce PTI soit associé à un fond génétique ou environnemental partagé entre les individus augmentant leur susceptibilité à l'auto-immunité. *ERN1* est impliqué dans la régulation du stress du réticulum endoplasmique (RE), un processus permettant de rétablir l'homéostasie de cet organe. Le stress du RE, bien que sans rapport apparent avec l'immunologie, est pourtant intrinsèquement lié à l'auto-immunité. En effet, plusieurs études ont montré que l'apparition du stress du RE précède le développement d'une auto-immunité comme dans le diabète de type I et l'arthrite rhumatoïde.<sup>153,154</sup> La mutation découverte dans ce gène semble donc être un bon candidat pour expliquer la pathogénèse du LES chez la patiente.

La mutation *IRAK4* est uniquement restreinte aux patients présentant des auto-anticorps, soutenant un modèle de mutation autosomale dominante à pénétrance complète. La protéine *IRAK4* étant un composant majeur de la signalisation *IL1*, cette mutation semble être un bon candidat. Toutefois, les mutations d'*IRAK4* déjà décrites dans la littérature provoquent l'apparition d'un phénotype d'immunodéficience et sont récessives. En effet les mutations inactivatrices d'*IRAK4* provoquent une perte de réponse au LPS et à l'*IL1*, induisant une plus forte susceptibilité aux infections bactériennes, causant des infections mortelles chez les patients sans autre symptôme apparent.<sup>155</sup> L'analyse *in silico* indique une potentielle tolérance de la mutation observée. De plus, il faudrait éventuellement faire l'hypothèse d'une mutation gain de fonction qui entrainerait éventuellement une hyper sensibilité des cellules à l'*IL1*. Les

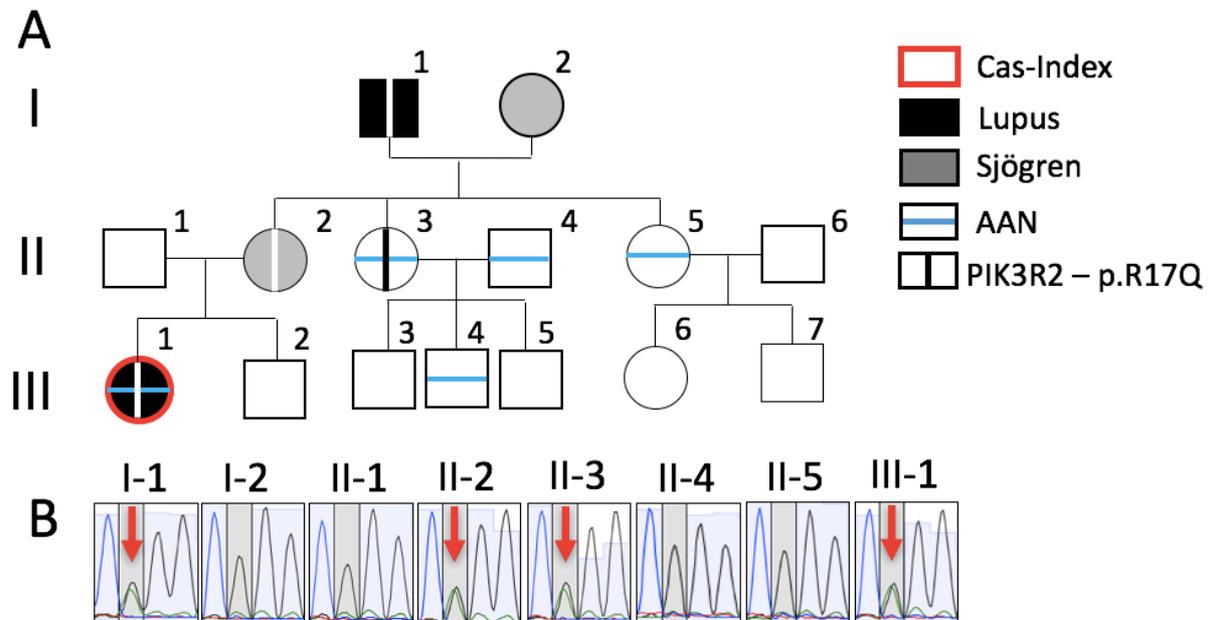
pathologies associées à une dérégulation de la voie IL1 sont généralement des maladies rhumatologiques inflammatoires. L'absence de tels symptômes chez les patients étudiés et l'impossibilité de tester la voie d'induction de l'IL1 dans notre modèle B-EBV<sup>152</sup> nous ont conduit à ne pas favoriser l'étude de ce variant. Néanmoins nous ne pouvons pas exclure complètement que ce variant participe secondairement au développement de la pathologie.

Enfin, le variant *GMPS* est observable chez tous les membres de la famille malades mais également chez II-5, un autre individu sain. La mutation *GMPS* soutient donc le même modèle de répartition que la mutation *ERNI*. Toutefois, cela n'explique pas la variabilité clinique et biologique observée, introduite par le profil atypique du patient II-1 comparé aux autres membres de la famille. De plus, *GMPS* est un gène codant pour la GMP synthase, une protéine impliquée dans la synthèse de la guanine. La GMP est donc essentielle pour la synthèse d'ADN, ARN mais également la production de GTP une molécule essentielle à la transduction de signaux de nombreuses voies cellulaires. Toutefois, seul un lien indirect entre *GMPS* et l'auto-immunité a été décrit à l'heure actuelle. En effet, la localisation nucléaire ou cytoplasmique de *GMPS* est médiée par son ubiquitinylation par TRIM21.<sup>156</sup> Or, TRIM21 est une protéine reconnue comme auto-antigène dans le SGS et le LES, de plus son activité ubiquitine ligase permet également de réguler les IRF (IFN regulatory factors), des facteurs de transcription essentiels à la production des IFN.<sup>157</sup> Toutefois, le modèle de régulation de *GMPS* ne présentant pas TRIM21 comme un substrat potentiel de la protéine mais bien comme un régulateur qui n'est pas influencé par l'activité de *GMPS*, le lien potentiel entre des défauts d'activité *GMPS* et le développement de l'auto-immunité via TRIM21 reste obscur.

En conclusion, l'analyse *in silico* des mutations retrouvées par WES, la pertinence des modèles pour la répartition des mutations et des phénotypes auto-immuns ainsi que les liens observés dans la littérature entre les gènes impliqués et l'auto-immunité tendent à présenter le variant *ERNI* (c.1780C>T ; p.R594C) comme le meilleur candidat pour notre étude. Toutefois, ce modèle étant basé sur une hypothèse de pénétrance incomplète et n'expliquant pas l'apparition d'un patient PTI chez un patient non muté, il n'est pas possible d'exclure la présence dans cette famille d'un autre facteur environnemental ou génétique (le variant d'*IRAK4* ou un autre variant particulier à ce patient) participant au développement d'une auto-immunité.

## 2. Famille B – PIK3R2

La famille B est composée de quinze individus répartis sur trois générations. Quatre d'entre elles présentent une auto-immunité avec trois cas de LES [I-1 ; II-5 ; III-1] et deux cas de SGS [I-2 ; II-2] et cinq personnes sur les sept testés présentent des anticorps anti-nucléaires quel que soit leur phénotype clinique [II-3 ; II-4 ; II-5 ; III-1 ; III-4] (Figure 7). La patiente II-2 présente également un phénomène de Raynaud. Un WES a été réalisé sur les individus II-2, II-3 et III-1, révélant 8 variants différents et gènes candidats associés : *RNF220*, *SRBD1*, *DRD3*, *SVEP1*, *BICC1*, *NOTCH3*, *FAM227A* et *PIK3R2*. Parmi ces gènes, *PIK3R2* (c.50G>A ; p.R17Q) est le candidat que nous avons retenu en priorité. Bien que le score Polyphen soit faible, les autres scores prédisent un effet délétère de ce variant (Tableau 4).



**Figure 7 : Arbre généalogique et séquençage de PIK3R2 dans la famille B. (A)** Arbre généalogique de la famille B. AAN : Anticorps anti-nucléaires. **(B)** Séquençage de Sanger du gène PIK3R2 montrant le variant observé chez les divers membres de la famille séquençés. La flèche rouge vise le nucléotide muté.

Gène	Polyphen [ <i>HumVar</i> ]	SIFT	CADD Score	Fréquence gnomAD
<i>PIK3R2</i>	0.062	0.01	26	1.19756e-05
	Bénin	Affecte la fonction*	Délétère	Rare

**Tableau 4 : Analyse in silico du variant candidat PIK3R2 obtenus par Whole Exome Sequencing.** L'étoile indique une fiabilité faible du score SIFT obtenu due à un faible nombre de séquences couvrant la zone ciblée.

En effet, *PIK3R2* code p85 $\beta$ , l'un des deux partenaires avec p85 $\alpha$  de p110. L'association de p85 et p110 forme le complexe PI3K, un activateur majeur de la voie AKT/mTOR. Ensembles, PI3K/AKT/mTOR forment une voie essentielle au fonctionnement de l'immunité, celle-ci pouvant être activée par stimulation du récepteur T, B, IL4 et IL2. Des mutations de cette voie ont été reliées au développement de l'APDS (Activated phosphoinositide 3-kinase- $\delta$  syndrome). Cette maladie est une immunodéficiência primaire est caractérisée par des infections récurrentes occasionnant des dégâts tissulaires des voies respiratoires, des oreilles et des sinus, ainsi que par la survenue de cytopénies auto-immunes. Les patients souffrent également d'infections virales sévères persistantes ou récurrentes par des virus appartenant à la famille des herpes virus pouvant causer une mort prématurée chez certains individus. Ces symptômes sont indicateurs d'une déficiéncia B et T.<sup>158</sup>

Les mutations gain de fonction de *PIK3CD* (p110 $\delta$ ) et *PIK3R1* (p85 $\alpha$ ) sont les principaux inducteurs de l'APDS par hyper-activation de leur protéine respective. Toutefois, deux mutations perte de fonction ont également été décrites comme induisant des immunodéficiéncias, bien que le phénotype clinique ne corresponde pas strictement à l'APDS avec une colite associée à une hypogammaglobulinémie chez l'une (*PIK3R1*)<sup>159</sup> et des infections sinopulmonaires accompagnées d'arthrite septique également avec hypogammaglobulinémie chez l'autre (*PIK3CD*).<sup>160</sup> A ce jour, aucune mutation de *PIK3R2* n'a été relié au développement d'une auto-immunité ou de l'APDS. En revanche, des cas de syndrome mégalencéphalique<sup>161</sup> ou de polymicrogyrie ont été rapportés<sup>162</sup>, montrant le potentiel pathologique de la mutation d'intérêt. Étant donné que la voie PI3K/AKT/mTOR est importante dans de multiples types cellulaires et que des phénotypes d'immunodéficiéncia induits par des mutations de ses membres ont été décrits, nous posons l'hypothèse que la mutation identifiée dans cette famille être associée au phénotype auto-immun observé selon un modèle autosomal dominant. Toutefois, la présence d'un cas de Sjögren ainsi que celle d'anticorps anti-nucléaires chez des membres non porteurs de la mutation ne permet pas d'exclure la participation d'un autre variant monogénique ou d'un fond génétique ou environnemental propice au développement d'une auto-immunité.

## Partie III : *ERN1* et Unfolded Protein Response

### A / Fonctions et contrôle qualité du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est l'un des plus larges organelles de la cellule. Il cumule plusieurs fonctions telles que la synthèse et le transport protéique, le stockage du calcium et la synthèse des lipides. Parmi elles, la synthèse des protéines membranaires et sécrétées est d'une importance majeure puisque ces protéines forment environ 30% du protéome total. Pour les cellules sécrétoires, l'importance de ce système de traduction et de maturation est capitale, puisqu'il est régulièrement mis à l'épreuve par la nécessité de leur fonction à générer une forte production de protéines telles que des anticorps, des cytokines, des enzymes ou encore des hormones.

Lors de la synthèse protéique, des ribosomes vont former des complexes avec des ARNm sur la membrane du RE. La traduction de ces ARNm va commencer par la synthèse d'une séquence signal du côté N-terminal du peptide en cours de synthèse qui sera reconnue par la SRP (Signal recognition particle). Cette séquence va permettre la liaison du complexe ARNm-ribosome-polypeptide-SRP sur un récepteur SRP à la surface du RE.<sup>163</sup> Une fois en contact avec ce récepteur, le peptide pourra être internalisé dans le RE après passage à travers un translocon formé par les protéines Sec61 et TRAM réparties dans la bicouche lipidique du RE.<sup>164</sup> Le peptide signal est ensuite clivé par une protéine signal peptidase, laissant le reste du polypeptide prêt à être maturé dans la lumière du RE. Dans le cas d'une protéine transmembranaire, c'est au cours de cette première étape de traduction que les larges séquences hydrophobiques ou les séquences d'ancrage à la membrane, typiques de cette famille de protéines, seront reconnues afin d'être déplacées du translocon à la membrane du RE (Figure 8a).<sup>163</sup>

Une fois les polypeptides synthétisés sous formes naissantes, ils doivent subir une étape de maturation dans le RE. Cette maturation consiste à leur donner leur structure finale en trois dimensions ainsi que les modifications post-traductionnelles nécessaires à leur fonction. Ce processus passe par plusieurs étapes : la glycosylation, la formation de ponts disulfures et l'oligomérisation, chacune d'entre elle étant médiée par des protéines chaperonnes spécifiques exprimées dans le RE. Les parties cytosoliques des protéines membranaires peuvent également

interagir avec des protéines chaperonnes présentes dans le cytosol pour s'assurer de leur bonne conformation.

Lorsque les polypeptides rentrent dans la lumière du RE, les résidus qui les composent peuvent former un grand nombre d'interactions incompatibles avec leur fonction première. Ce sont les protéines chaperonnes telles que BiP (Binding immunoglobulin Protein ou GRP78) qui vont se fixer aux régions hydrophobes ou prompts à s'agréger. En se fixant à l'une de ces régions, elles empêchent celles-ci de participer à la formation d'une structure indésirable avec les autres régions de la même protéine. Une fois les autres régions repliées en fonction de leurs interactions chimiques, BiP se détache pour laisser la zone libérée participer aux dernières étapes de conformation. Dans le cas où des zones mal repliées se seraient déjà formées, la liaison de BiP à la zone ciblée et l'utilisation d'ATP va permettre de défaire ces liaisons dysfonctionnelles pour permettre de rediriger le cycle de conformation dans la bonne direction (Figure 8b).<sup>165</sup>

Si certaines liaisons dans les protéines immatures peuvent se faire naturellement par interactions chimiques entre les acides aminés proches, d'autres telles que les ponts disulfures nécessitent l'implication des chaperonnes de la famille des PDI (Protein Disulfide-Isomérase). Les PDI sont nécessaires à la formation des ponts disulfures entre deux résidus cystéine, des liaisons covalentes fortes et cruciales pour la structure finale de la protéine sécrétée (Figure 8c).<sup>165</sup>

Enfin, les protéines subissent une étape essentielle de glycosylation lors de leur entrée dans le RE. Cette glycosylation, qui correspond à l'addition du complexe LLO (Lipid-Linked Oligosaccharide) est la principale marque de reconnaissance permettant la distinction entre les protéines naissantes et maturées dans le RE. Ce complexe est formé de deux résidus N-acetylglucosamine fixés à la protéine, de neuf mannose et de trois glucoses. Lorsque les protéines ont subi les premières étapes de maturation dans le RE, les glucosidases GI et GII vont retirer deux des trois résidus glucose qui constituent le LLO. Ce résidu devenu monoglycosylé va devenir le substrat de deux chaperonnes qui ne peuvent interagir avec les protéines sans LLO : la calnexine (CNX) et la calreticuline (CRT). La CRX et la CRT vont, comme BiP, apporter leur contribution pour donner à la protéine sa forme finale. Une fois cette étape passée, l'activité de GII interviendra de nouveau sur le complexe LLO, enlevant le dernier

résidu glucose restant. Le polypeptide mature sera ensuite présenté à l'UGGT (UDP-glucose-glycoprotein-glucosyltransferase) qui détecte les résidus hydrophobes encore accessibles sur la protéine, signes d'une mauvaise conformation de cette dernière (Figure 8d).<sup>165</sup>

**Si la protéine est bien conformée**, elle sera dirigée vers le Golgi grâce à la formation de vésicules COPII, où elles pourront subir d'autres étapes de maturation avant d'être libérées dans la membrane ou l'espace extracellulaire (Figure 8e). **Si la protéine est mal conformée**, l'UGGT va rajouter un glucose sur le LLO pour que la protéine repasse dans le cycle CNX/CRT. Toutefois, le nombre de fois où ce cycle peut être répété est limité. En effet, chaque protéine sortant du contrôle qualité instauré par l'UGGT rencontre une ER  $\alpha$ -mannosidase I, enlevant un résidu mannosidase du complexe LLO. En perdant ce résidu, la protéine diminue son affinité avec la CNX et la CRT tandis qu'elle augmente sa capacité à interagir avec GII et UGGT. La perte d'un trop grand nombre de résidus mannose va donc aboutir à la fin du cycle de formation de la protéine qui ne pourra plus être correctement conformée et sera ensuite dirigée vers les protéines EDEM (ER degradation enhancing  $\alpha$ -mannosidase like proteins). Les protéines EDEM réaliseront la retro-translocation de la protéine mal conformée dans le cytosol où elle sera dégradée par le système de poly-ubiquitinylation du protéasome.<sup>166</sup> Ce processus, appelé ERAD (ER-associated degradation) est le principal élément d'élimination des protéines mal conformées dans le RE (Figure 8f).

**Figure 8 : Maturation des protéines dans le réticulum endoplasmique – d'après McCaffrey & al 2016. (a) Translocation** : Le polypeptide est synthétisé par le ribosome en commençant par le peptide signal. La SRP cible le peptide signal et amène le complexe ribosome-ARNm-polypeptide au translocon composé des protéines Sec61 et TRAM pour que la protéine en formation soit internalisée dans le RE. Le complexe LLO est ajouté à la protéine par OST. **(b) Chaperonnes** : BiP s'accroche aux peptides en cours de formation de façon ATP-dépendante. ERdj et NEF facilitent les échanges d'ATP pour provoquer la liaison/dissociation de BiP. **(c) Formation des ponts disulfures** : PDI oxyde les résidus cystéines pour créer des ponts disulfures. Ero1, PrxIV et Gpx7/8 soutiennent l'activité de PDI en le maintenant en forme oxydée ou en transformant le dioxygène formé en peroxyde. **(d) Cycle Calnexine / Calréticuline** : Les glucosidases GI et GII retirent deux résidus glucose du complexe LLO sur le polypeptide en cours de formation. La CNX et la CRT procèdent aux dernières étapes de formation de la structure 3D du polypeptide. La glucosidase GII enlève le dernier résidu glucose puis UGGT vérifie qu'il n'y a plus de zone hydrophobe accessible sur la protéine. Si UGGT détecte une zone mal conformée, il rajoute un glucose au complexe LLO pour relancer le cycle CNX/CRT. Dans le cas contraire, la protéine est envoyée à l'export. Dans les deux situations, une mannosidase retire un mannose au complexe LLO. **(e) Export** : Si la protéine est bien conformée après passage dans le cycle CNX/CRT, elle est orientée vers le Golgi par formation d'une vésicule de transport par les protéines COPII. **(f) ERAD** : Si la protéine perd trop de résidus mannose après plusieurs passages dans le cycle Cnx/Crt, la perte des résidus mannose diminue son affinité de liaison avec CNX/CRT et augmente celle avec les protéines EDEM. La protéine mal conformée est ensuite amenée au protéasome pour être dégradée après poly-ubiquitinylation.

Le stress du RE correspond à l'accumulation d'un trop grand nombre de protéines mal conformées que le RE ne peut plus gérer. La déprivation en glucose<sup>167</sup>, une dérégulation de la

gestion des stocks de calcium du RE<sup>168</sup> ou de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)<sup>169</sup>, une infection virale<sup>170</sup>, une hypoxie<sup>171</sup> ou une activité altérée du protéasome<sup>172</sup> sont tous des phénomènes capables de perturber le bon fonctionnement du RE, provoquant ainsi un stress pour cet organite. La présence de ce stress induit une réponse transcriptionnelle appelée UPR (Unfolded Protein Response), dont *ERN1* est le principal activateur.

## B / Identification d'*ERN1* chez *Saccharomyces cerevisiae*

*ERN1* et sa protéine IRE1p (Inositol-Requiring Enzyme 1 protein) ont été pour la première fois identifiés dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans le cadre d'une étude visant à identifier des gènes impliqués dans le métabolisme des phosphatidylinositol (PPDI), un phospholipide, constituant majeur des membranes cellulaires. Isolé à partir d'une souche de levure auxotrophe pour les inositols, la protéine fut décrite comme une protéine kinase présentant une structure semblable à un récepteur ; les auteurs faisant référence à son profil hydrophatique comprenant quatre régions avec : un peptide signal, un domaine hydrophilique N-terminal, un autre C-terminal et une région transmembranaire. Ce profil étant semblable à celui du récepteur EGF (Epidermal Growth Factor), les auteurs posèrent l'hypothèse que cette protéine kinase était essentielle pour l'activation ou l'expression d'un facteur majeur impliqué dans la synthèse des lipides.<sup>173</sup>

Plus tard, *Cox & al.* entreprirent des recherches dans le but d'identifier le facteur responsable de l'UPR dans le même modèle de levure. L'UPR était alors caractérisé dans *Saccharomyces cerevisiae* comme un programme transcriptionnel permettant de synthétiser en grande quantité des protéines chaperonnes telles que BiP et PDI. L'accumulation de protéines mal conformées induite expérimentalement, par la tunicamycine qui bloque leur glycosylation ou le  $\beta$ -mercaptoethanol un agent réducteur affectant la formation des ponts disulfures, provoque l'expression transcriptionnelle de ces protéines chaperonnes. Un facteur de transduction du signal est donc nécessaire pour détecter la présence de stress du RE puis activer l'UPR. En utilisant un système rapporteur lacZ lié à UPRE (Unfolded Protein Response Element), une séquence régulatrice liée à la transcription de *KAR2*, le gène codant pour BiP ; *Cox & al.* générèrent des mutants défectifs pour l'induction de la  $\beta$ -galactosidase après activation du stress du RE, identifiant ainsi *ERN1*. Des tests complémentaires montrèrent que

la souche de levure mutée ne pouvait induire l'expression de BiP ou PDI mais était également devenue extrêmement sensible à l'induction du stress du RE qui causa la mort cellulaire. Bien que ne pouvant encore expliquer le lien entre l'auxotrophie des souches mutées d'*ERN1* pour les phospholipides inositols et leur sensibilité accrue au stress du RE, les auteurs présentèrent la première preuve du rôle central d'*ERN1* dans la détection du stress du RE et l'induction de l'UPR.<sup>174</sup>

IRE1p fut ensuite l'objet de plusieurs études qui permirent d'élucider son mode d'action chez *Saccharomyces cerevisiae*. IRE1p, une protéine transmembranaire du RE, est exprimée sous forme de monomère inactif. L'accumulation de protéines mal conformées va permettre son oligomérisation et son activation par trans-autophosphorylation via son activité kinase cytosolique.<sup>175,176</sup> Cette trans-autophosphorylation va ensuite induire son activité RNase, capable d'épisser l'ARNm de *HAC1*, un gène codant le facteur transcription HAC1p, exprimé dans la levure sous deux formes transcriptionnelles : induite (HAC1p<sup>i</sup>) et non induite (HAC1p<sup>u</sup>). Toutefois, l'ARNm de la forme induite n'est détectable qu'en présence de stress du RE.<sup>177</sup> En effet, l'ARNm de HAC1p<sup>u</sup> contient un intron dit « non classique » car ne présentant pas les mêmes séquences consensus que les autres et dont l'épissage est indépendant de l'activité du spliceosome.<sup>178</sup> Cet intron, lorsqu'il est épissé, provoque un décalage du cadre de lecture modifiant la structure de la partie C-terminale de la protéine. En absence de stress, HAC1p<sup>u</sup> est rapidement dégradé par poly-ubiquitinylation.<sup>177</sup> En présence de stress en revanche, l'ARNm de HAC1p est épissé par l'activation d'IRE1p.<sup>179</sup> Les deux extrémités épissées de l'ARNm sont ensuite reliées par l'ARNt ligase Rlg1p pour générer HAC1p<sup>i</sup>, une protéine dont le changement de cadre de lecture lui confère une activité transcriptionnelle capable d'induire l'UPR.<sup>178</sup> (Figure 9)

**Figure 9 : Voie IRE1p-HAC1 chez *Saccharomyces cerevisiae* – d'après Patil & Walter 2001.** Dans la levure, l'ARNm de HAC1<sup>u</sup> (non épissé) est exprimé de façon constitutive, mais la protéine n'est presque pas détectable à cause de la partie C-terminale (en rouge) qui induit sa poly-ubiquitinylation et sa dégradation rapide par le protéasome. En présence de stress du RE, les protéines mal conformées peuvent se lier au domaine luminal N-terminal d'IRE1p. Cette liaison provoque la dimérisation et l'autophosphorylation d'IRE1p. L'activation du domaine RNase d'IRE1p permet alors l'épissage spécifique de l'ARNm de HAC1<sup>u</sup> (non épissé) en HAC1<sup>i</sup> (épissé). Une fois l'épissage réalisé, la protéine ligase Rlg1p va reliquer les deux extrémités de l'ARNm d'HAC pour former HAC1<sup>i</sup>. Cet épissage non conventionnel permet de générer un décalage du cadre de lecture provoquant la traduction d'une nouvelle séquence peptidique en C-terminal (vert). Cette séquence permet d'obtenir une forme fonctionnelle du facteur de transcription codé par le gène *HAC1*. Hac1p<sup>i</sup> étant actif, cette protéine est capable d'induire la transcription des gènes cibles de l'UPR en se fixant sur les séquences régulatrices UPRE.

## C / Gestion de l'UPR chez les mammifères

### 1. Introduction aux voies IRE1 $\alpha$ , ATF6 et PERK

Tout comme chez la levure, l'UPR représente la réponse adaptative à la présence d'un stress dans le RE chez les mammifères. Toutefois, IRE1p n'est plus le seul récepteur capable d'induire cette réponse. La réponse au stress du RE est médié par l'activation de trois récepteurs transmembranaires du réticulum endoplasmique : IRE1 $\alpha$ , PERK et ATF6. Parmi ces trois voies, IRE1 $\alpha$  est la voie la plus conservée à travers le vivant, celle-ci étant présente depuis la levure *Saccharomyces cerevisiae* jusqu'aux mammifères.<sup>180</sup> La dénomination d'IRE1p reste par convention d'écriture réservée à la protéine exprimée par la levure, tandis que les dénominations IRE1 $\alpha$  et IRE1 $\beta$  ont été adoptées pour les deux paralogues d'IRE1 retrouvés chez les mammifères. Le premier paralogue *ERN1* code IRE1 $\alpha$ , la protéine d'intérêt identifiée dans la famille A et qui est exprimée de façon ubiquitaire. Le second, *ERN2*, code IRE1 $\beta$ , dont l'expression est limitée aux tissus gastro-intestinaux et respiratoires.<sup>181</sup> Les formes ancestrales des voies PERK et ATF6 sont plus récentes dans l'évolution ; absentes dans la levure on peut toutefois les trouver chez d'autres organismes multicellulaires telles que *Caenorhabditis elegans* ou *Drosophila Melanogaster*.<sup>180</sup>

IRE1 $\alpha$ , PERK et ATF6 sont toutes les trois des protéines transmembranaires du RE composées d'une partie luminaire dédiée à la détection du stress du RE et d'une partie cytosolique dévolue à l'activation de l'UPR. IRE1 $\alpha$  présente deux domaines cytosoliques : RNase et kinase. PERK partage un domaine luminaire similaire à celui d'IRE1 $\alpha$  mais ne présente dans le cytosol qu'un domaine sérine/thréonine kinase (Ser/Thr). Enfin ATF6 ne partage pas d'homologie particulière au niveau luminaire ou cytosolique avec PERK et IRE1 $\alpha$ . En revanche, ATF6 présente dans le cytosol un domaine comprenant un facteur de transcription de type bZIP. En absence de stress, ces trois récepteurs sont liés à la protéine chaperonne BiP qui les maintient par cette liaison sous forme inactive. Toutefois, en présence d'une trop grande concentration de protéines mal conformées, BiP ayant une préférence de liaison pour les protéines en cours de formation, va se détacher des trois récepteurs, permettant ainsi leur activation.<sup>182</sup> (Figure 10)

**Figure 10 : Modèle d'activation de l'UPR – Adapté de Todd & al 2008 :** (A) En absence de stress, les protéines subissent un cycle normal de formation dans le réticulum endoplasmique. Les protéines transmembranaires ATF6, IRE1 $\alpha$  et PERK sont liés à BiP qui les maintient sous forme inactive. (B) En présence de stress et donc d'accumulation de protéines mal conformées, BiP va se détacher des trois inducteurs de l'UPR, provoquant la révélation des séquences de localisation au Golgi pour ATF6 (GLS), la dimérisation / oligomérisation et trans-autophosphorylation d'IRE1 $\alpha$  ainsi que celle de PERK. L'activation de ces trois senseurs du stress du RE va induire l'UPR.

La voie IRE1 $\alpha$  va s'activer après dimérisation, voir oligomérisation et trans-autophosphorylation de ses domaines RNase et kinase. L'activation de ces domaines permet d'initier quatre formes de signalisation différentes : la voie IRE1 $\alpha$ -XBP1, le RIDD, la voie JNK et la voie NF- $\kappa$ B. **La voie IRE1 $\alpha$ -XBP1**, fortement semblable à la voie IRE1p-HAC1, est activée lorsque l'ARNm de XBP1u (XBP1 non épissé) subit un épissage non conventionnel de 26 nucléotides. Cet épissage provoque la suppression d'un intron dont l'absence provoque un décalage du cadre de lecture aboutissant à la formation du facteur de transcription XBP1s (XBP1 épissé). En effet, le décalage permet la traduction d'un site de transactivation fonctionnel dans la partie C-terminale de XBP1s. En absence d'épissage, XBP1u ne possède pas ce domaine de transactivation et ne peut donc pas activer la transcription.<sup>183-185</sup> Une fois épissé, l'ARNm d'XBP1 est reliqué grâce à la ligase RtcB avant d'être traduit.<sup>186-188</sup> XBP1s peut ensuite induire l'expression de protéines chaperonnes, de protéines de l'ERAD, ainsi que la synthèse de lipides pour augmenter la taille et donc la capacité du RE.<sup>189,190</sup> **Le RIDD (Regulated IRE1-Dependant Decay)** basé sur l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  a pour fonction de dégrader des ARNm contenant une séquence consensus présente dans une structure secondaire afin de limiter l'entrée de nouveaux polypeptides dans le RE.<sup>191</sup> Toutefois, d'autres cibles tels que des micro ARN (miARN) peuvent être visés par le RIDD, provoquant des changements de régulation post-transcriptionnelles ayant des conséquences diverses. En effet, les modèles actuels proposent que l'activité basale du RIDD, qui peut avoir lieu sans activation du stress, a un effet protecteur sur la cellule, tandis qu'une activité augmentée en cas de stress trop fort va induire l'apoptose.<sup>192</sup> L'activation des **voies JNK et NF- $\kappa$ B** serait quant à elle dépendante de la fixation de partenaires protéiques sur le domaine kinase d'IRE1 $\alpha$ . Parmi ces partenaires, on retrouve la protéine TRAF2 permettant la liaison d'ASK1 et ainsi l'activation de la voie JNK pour induire l'autophagie, et l'apoptose.<sup>193-195</sup> Il en est de même pour NF- $\kappa$ B, dont l'activation par phosphorylation de son inhibiteur I $\kappa$ B se fait par l'intermédiaire de TRAF2 afin d'influer sur la survie cellulaire (Figure 11).<sup>196,197</sup>

De façon semblable à IRE1 $\alpha$ , la voie PERK va s'activer par oligomérisation et trans-autophosphorylation. Une fois actif, PERK peut phosphoryler eIF2 $\alpha$ , l'un des composants majeurs du complexe d'initiation de la traduction. Cette phosphorylation va induire un arrêt global de la traduction, mais également une traduction sélective de certains ARNm.<sup>198</sup> Ce processus présente deux avantages : il diminue, à l'image du RIDD, la quantité de polypeptides entrant dans le RE en empêchant la traduction de la majorité des protéines, mais il permet tout de même la traduction de certains ARNm impliqués dans l'UPR. Ainsi, l'arrêt traductionnel global induit par la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  par PERK permet la traduction sélective d'ARNm comprenant des séquences dites « uORF » (upstream Open Reading Frame) dans la partie 5'UTR de l'ARNm. Ces séquences qui limitent la traduction des ARNm qui les portent à l'état basal sont les mêmes qui permettent leur traduction spécifique lorsqu'eIF2 $\alpha$  est phosphorylé.<sup>199</sup> Dans la voie PERK, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  induit alors la traduction du facteur de transcription ATF4. ATF4 va permettre d'initier une réponse anti-oxydante aidant à la gestion des ROS produits lors de la formation des ponts disulfures, une augmentation de la capacité du RE à former les protéines et une augmentation de l'autophagie.<sup>200-202</sup> En revanche, si le stress dure trop longtemps, la voie PERK-ATF4 induira une réponse pro-apoptotique (Figure 11).<sup>182,199</sup>

Pour ATF6, le détachement de BiP permet de révéler les séquences de localisation au Golgi présentes sur son domaine luminal. Une fois transporté dans le Golgi, les protéases S1P et S2P vont provoquer une coupure de la protéine, libérant son domaine cytosolique.<sup>203</sup> Le fragment ainsi obtenu forme un facteur de transcription nommé ATF6f qui migrera dans le noyau pour activer la transcription de protéines chaperonnes, des protéines de l'ERAD ainsi qu'XBP1u. De plus, ATF6f et XBP1s étant capables former des hétérodimères entre eux, leurs programmes d'expression génique peuvent se chevaucher (Figure 11).<sup>204,205</sup>

**Figure 11 : Schéma de l'UPR induite – Adapté de Hetz & Papa 2018.** La présence de protéines mal conformées induit l'activation d'IRE1 $\alpha$ , PERK et ATF6. IRE1 $\alpha$  une fois activé va se dimériser et s'auto-transphosphoryler, activant la voie XBP1, la voie JNK, la voie NF- $\kappa$ B et le RIDD. L'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  va épisser l'ARNm d'XBP1 en retirant un intron de 26 nucléotides. L'ARNm d'XBP1 est reliqué par RTCB pour donner l'ARNm d'XBP1s. Cet ARNm code pour le facteur de transcription XBP1s, disposant de son domaine de transactivation grâce au décalage de lecture induit par l'épissage de son ARNm. L'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  provoque également le livage d'ARNm et de miARN, ce qui diminue la quantité de protéines traduites et change la régulation de certains gènes. L'activité kinase d'IRE1 $\alpha$  active les voies JNK et NF- $\kappa$ B. PERK s'active de façon similaire à IRE1 $\alpha$  par dimérisation et auto-transphosphorylation. Son activation lui confère une activité kinase permettant de phosphoryler eIF2 $\alpha$ . eIF2 $\alpha$  phosphorylé va bloquer la traduction des ARNm sauf de ceux dotés d'une séquence uORF comme ATF4. Le facteur de transcription ATF4, normalement réprimé à l'état basal est ainsi traduit et actif. GADD34, une protéine induite par ATF4, agit comme un rétro-contrôle négatif en provoquant la déphosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . ATF6 révèle ses séquences de localisation au golgi lors de sa dissociation avec BiP. Une fois dans le golgi, les protéases S1P et S2P vont le cliver pour libérer la partie C-terminale cytosolique appelée ATF6f qui correspond à un facteur de transcription de type bZIP. L'activation de ces trois voies correspond à l'UPR.

## 2. Cinétique et conséquences de l'UPR

L'UPR est un processus finement régulé dans le temps qui s'adapte en fonction du stress induit. Un stress aigu ou chronique, fort ou long n'aura donc pas les mêmes conséquences sur la cellule, chacun introduisant une réponse différente de la part de l'UPR. Le modèle actuel de la gestion du stress par l'UPR se compose de quatre réponses différentes.

**La première phase** est régie par les mécanismes de réduction de la charge du RE. Durant cette phase, la quantité de protéines mal conformées est réduite par l'action conjointe de l'arrêt de la traduction induite par PERK<sup>206</sup>, la dégradation des nouveaux ARNm à destination du RE par le RIDD<sup>191</sup> et la dégradation des protéines mal conformées du RE par induction de l'autophagie via la voie JNK.<sup>207</sup> **La seconde phase** intervient par l'activation des facteurs de transcription XBP1, ATF6f et ATF4. XBP1 va induire la production de lipides pour augmenter la taille du RE afin d'augmenter sa capacité de stockage de protéines<sup>208,209</sup> et l'action couplée d'XBP1 et ATF6f va permettre d'augmenter l'expression des protéines chaperonnes et des protéines composants l'ERAD.<sup>204</sup> ATF4 va de son côté participer au maintien d'un bon équilibre oxydatif dans le RE pour maintenir les meilleures conditions possibles à la conformation des protéines.<sup>201</sup> Les deux premières phases de l'UPR ont donc une activité protectrice dédiée au retour à l'homéostasie du RE en déployant plusieurs stratégies susceptibles de réduire la quantité de protéines mal conformées. (Figure 12)

Lorsque le stress perdure malgré les contre-mesures induites par l'UPR, une phase de transition intervient. **Cette troisième phase** qui n'est pas encore bien décrite, permet d'induire « l'UPR terminal », un changement de transcription destiné à induire l'apoptose de la cellule. La troisième phase est alors caractérisée par l'expression induite de CHOP par ATF4. CHOP est un facteur de transcription capable d'induire l'expression de GADD34. GADD34 est une sous-unité régulatrice d'un complexe phosphatase capable de déphosphoryler eIF2 $\alpha$  et par conséquent de rétablir la production normale de protéines malgré l'activation de PERK, augmentant ainsi le stress si celui-ci n'a pas été résolu. CHOP active également la transcription d'ERO1 $\alpha$ , une protéine capable de transférer les électrons libres générés par la synthèse de ponts disulfures sur des molécules de dioxygène, générant ainsi du peroxyde, augmentant le stress oxydatif de la cellule.<sup>210,211</sup> Enfin, CHOP réprime l'expression de BCL-2, un facteur anti-

apoptotique central dans la voie intrinsèque mitochondriale de l'apoptose.<sup>212</sup> Enfin, durant la phase de transition, il y a diminution de l'épissage de XBP1 ce qui indiquerait une diminution de l'activation d'IRE1 $\alpha$ .<sup>213,214</sup> La voie IRE1 $\alpha$ -XBP1 étant une voie pro-survie, la perte de cette voie et l'activation de la voie ATF4-CHOP sensibiliseraient la cellule à l'apoptose. (Figure 12)

**La quatrième et dernière phase de l'UPR** agit directement sur différents acteurs de la voie intrinsèque de l'apoptose. L'apoptose intrinsèque est activée lorsqu'il y a génération à la membrane de la mitochondrie du complexe MOMP (Mitochondria Outer Membrane Permeabilization). Ce complexe forme des pores dans la mitochondrie, provoquant la libération de cytochrome c dans le cytoplasme. Le cytochrome c, par la formation de l'apoptosome, va induire l'apoptose par activation de Caspase-9 puis Caspase-3.<sup>215</sup> La génération du complexe MOMP est gérée par les protéines de la famille BCL-2. Cette famille présente des protéines à la fois pro- et anti-apoptotiques ayant des fonctions antagonistes les unes envers les autres. Parmi les protéines de la famille BCL-2 impliqués dans le stress du RE, on retrouve l'anti-apoptotique BCL-2 et les pro-apoptotiques BIM, NOXA et PUMA. Ces quatre protéines de la même famille ont des fonctions antagonistes aboutissant à l'existence d'une balance entre les pro- et les anti-apoptotiques. Lorsque les anti-apoptotiques sont majoritaires, ils inhibent l'activation de BAX et BAK, les protéines responsables de la formation du complexe MOMP. Lorsqu'au contraire les pro-apoptotiques sont majoritaires, BAX et BAK vont pouvoir se diriger vers la membrane de la mitochondrie pour la perméabiliser. L'UPR est donc capable d'induire un changement dans la balance des pro- et anti-apoptotiques de la famille des protéines BCL-2 afin d'activer l'apoptose. Ce changement passe par la répression de l'anti-apoptotique BCL-2 par CHOP<sup>212</sup> et l'activation transcriptionnelle par CHOP de BIM<sup>216</sup> ; et par p53 et CHOP de NOXA et PUMA.<sup>217</sup> Toutefois, si p53 a été montré comme induit en cas de stress du RE et nécessaire à l'induction de NOXA et PUMA, le mécanisme capable d'induire son activation en cas de stress du RE n'a pas encore été élucidé.

**Figure 12 : Cinétique de la signalisation de l'UPR – Adapté de Woehlbier & Hetz, 2011.**<sup>218</sup> Les conséquences de l'UPR varient en fonction de l'amplitude et de la durée du stress. Pendant le stress, l'activité d'IRE1 $\alpha$  et de PERK est symbolisée par une courbe bleue ou rouge. **Une première phase de réponse immédiate (en jaune)** provoque l'autophagie, la dégradation des ARNm par le RIDD et l'inhibition de la traduction par PERK afin d'aider à résoudre le stress. PTP1B, HSP72, BAX-BAK et AIP1 sont des partenaires protéiques d'IRE1 $\alpha$  appartenant à l'UPRosome, pour lesquels on suppose un rôle dans la modulation de l'activité d'IRE1 $\alpha$ . **Une seconde phase de réponse adaptative (en vert)** correspond à la durée pendant laquelle l'activité d'XBP1s, ATF6f et ATF4 permet d'induire l'adaptation du RE au stress. Il y a alors augmentation de la capacité du RE à former les protéines par augmentation des protéines chaperonnes, augmentation de l'efficacité de l'ERAD et amélioration de la gestion de l'équilibre d'oxydo-réduction du RE. **Une phase de transition (en orange)** est initiée lorsque les inhibiteurs d'IRE1 $\alpha$  appartenant à l'UPRosome diminuent son activité (PP2A, RACK1, BI-1). L'inhibition d'IRE1 $\alpha$  couplée au prolongement du stress et donc de l'UPR, induit une réponse transcriptionnelle principalement médiée par CHOP qui va sensibiliser la cellule à

l'apoptose. GADD34 va également stopper l'inhibition de la traduction, augmentant encore le stress. **L'UPR terminal (en bleu)** est activé lorsque la balance des protéines BCL-2 penche vers les pro-apoptotiques BIM, PUMA et NOXA dont l'expression augmentée vont induire l'activation de BAX et BAK et donc la formation du complexe MOMP, provoquant l'apoptose par la voie mitochondriale.

Pour conclure, si la présence d'un stress chronique semble aboutir de façon inévitable à l'apoptose à cause de l'activation des voies pro-apoptotiques, il existe toutefois un mécanisme d'adaptation passif capable d'utiliser de façon sélective la réponse pro-survie de l'UPR. Ce mécanisme, supposé être utilisé de façon physiologique par les cellules sécrétoires telles que les LB permettrait à ces cellules régulièrement confrontées à une augmentation du stress de répondre par la voie adaptative de l'UPR. Par conséquent, la majorité de la population cellulaire sera capable de survivre même en présence d'un stress chronique physiologique. Cette hypothèse présentée par *Rutkowski & al*, propose que lorsque le stress est trop robuste ou persistant, les régulateurs négatifs de l'UPR ne peuvent stopper l'activation du programme apoptotique induit par CHOP. En revanche, lorsque le stress est plus modéré, l'activation générale d'IRE1 $\alpha$ , PERK et ATF6 s'en trouverait diminuée, provoquant une expression plus faible d'ATF4, CHOP et GADD34, sans qu'il n'y ait d'activation sélective d'un partenaire ou d'un autre. Un stress modéré ne parviendrait donc pas à atteindre le seuil nécessaire à l'activation de l'apoptose. Si ce stress modéré n'a pas induit la mort, il a toutefois permis la surexpression de protéines chaperonnes et l'adaptation du RE au stress, augmentant sa capacité à gérer un nouvel épisode de stress plus fort en diminuant l'activation des voies de l'UPR. La présence répétée de stress modérés et physiologiques dans les cellules sécrétoires permettrait donc de préparer physiologiquement ces cellules en cas de stress chronique ou sévère, diminuant leur sensibilité à l'apoptose induite par l'UPR. Cette hypothèse est valorisée par :

- La capacité de résistance à l'apoptose des cellules à de faibles traitements d'inducteurs du stress du RE sur de longues durée. On retrouve une activation confirmée de l'UPR ainsi qu'un taux de division diminué mais constant par rapport à des contrôles.
- L'activation confirmée des trois voies de l'UPR malgré ce faible stress, confirmant une activation normale non spécifique d'une des voies.
- La diminution d'expression de CHOP et GADD34 dans un cas de stress modéré comparé à un stress fort.

- Une activation atténuée des voies de l'UPR en réponse à un stress fort chez des cellules adaptées par des traitements à long terme d'inducteurs du stress.
- Une instabilité sélective des ARNm et protéines pro-apoptotiques (CHOP, ATF4, GADD34) comparée aux anti-apoptotiques (BiP, GRP94 et p58<sup>IPK</sup>).
- La phénocopie observée dans des MEF KO pour UGGT1, le gène responsable de la production d'UGGT, dont l'absence provoque un stress chronique chez ces cellules avec une augmentation de l'expression des chaperonnes par l'UPR, mais pas des protéines pro-apoptotiques comme CHOP et GADD34.

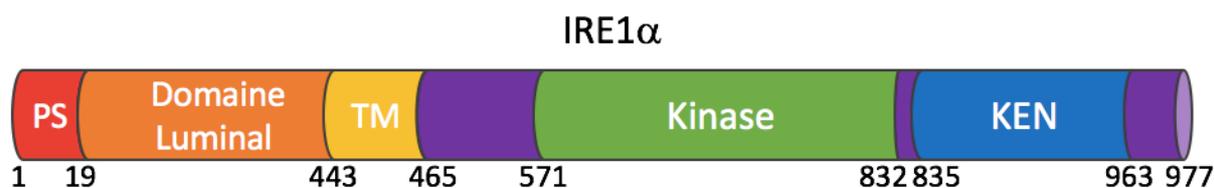
En conséquence, les auteurs concluent que l'induction chronique d'un faible stress du RE va permettre de diminuer la sensibilité au stress grâce à un phénomène d'adaptation du RE. Celui-ci contenant déjà un nombre plus élevé de protéines chaperonnes, induit une activation moindre de l'UPR face à de nouveaux épisodes de stress. Cette forme « adaptée » du RE au stress verrait le jour grâce à la différence de stabilité observée des ARNm et formes protéiques des protéines chaperonnes comparées aux protéines pro-apoptotiques.<sup>219</sup>

D'autres éléments importants de la régulation de l'apoptose par l'UPR ont également été décrits dans la littérature. Toutefois, ces mécanismes principalement liés à IRE1 $\alpha$  nécessitent d'aborder les différents aspects de la régulation de son activité avant de pouvoir les décrire.

### 3. Régulation de l'activité d'IRE1 $\alpha$

#### i. Structure d'IRE1 $\alpha$

IRE1 $\alpha$  est une protéine transmembranaire du RE avec une partie N-terminale luminale et une partie C-terminale cytosolique. La partie N-terminale comprend deux domaines distincts, le peptide signal dédié à la localisation d'IRE1 $\alpha$  dans le RE et le domaine luminal permettant l'activation de la protéine en cas de stress du RE. La séquence hydrophobe transmembranaire permet la jonction entre la partie luminale et cytosolique qui elle, contient les domaines d'activité kinase et RNase (domaine KEN : Kinase-Extension nuclease) (Figure 13).<sup>220</sup>



**Figure 13 : Structure de la protéine IRE1 $\alpha$ .** La protéine IRE1 $\alpha$  est constituée d'un domaine comprenant le peptide signal (PS) d'adressage au réticulum endoplasmique ; un domaine luminal responsable de l'activation de la protéine ; un domaine transmembranaire (TM) hydrophobe pour l'ancrage de la protéine dans la membrane du réticulum ; un domaine kinase nécessaire à la trans-autophosphorylation de la protéine ainsi qu'à la phosphorylation de ses partenaires protéiques ; et un domaine RNase (KEN) permettant l'épissage de l'ARNm d'XBP1 ainsi que l'activité RIDD de dégradation des ARNm.

## ii. Modèles d'activation d'IRE1 $\alpha$

Deux modèles principaux ont été proposés pour expliquer le processus d'activation d'IRE1 $\alpha$  par son domaine luminal. Le premier modèle propose que l'association entre la protéine chaperone BiP et IRE1 $\alpha$  sur son domaine luminal a un effet inhibiteur, provoquant le maintien de la protéine sous forme de monomère inactif. Cette inhibition ne peut prendre fin que lorsque la présence excessive de protéines mal conformées provoque la dissociation de BiP qui a une préférence de liaison pour ces protéines en cours de formation. Cette dissociation permettrait par la suite à IRE1 $\alpha$  de passer sous la forme d'un dimère ou d'un oligomère afin de s'auto-phosphoryler et de s'activer. BiP agirait donc comme un interrupteur par liaison ou dissociation de celui-ci avec IRE1 $\alpha$ . Ce modèle fut longtemps celui adopté pour expliquer l'activation d'IRE1 $\alpha$  et cela bien qu'il fut invalidé chez la levure. En effet, il fut démontré que la dissociation de BiP n'était pas responsable de l'activation d'IRE1p, mais avait un effet régulateur permettant de diminuer la sensibilité d'IRE1p au stress en cours de résolution afin de stopper l'UPR. Dans la levure, BiP agit donc comme un inhibiteur permettant de réguler plus finement l'activation d'IRE1p, mais n'agissant pas comme un régulateur absolu. En se liant à la protéine, il empêche toute nouvelle formation d'oligomères et facilite le désassemblage des oligomères encore actifs pour désactiver les signaux induits par IRE1p.<sup>221,222</sup> (Figure 14)

**Figure 14 : Modèle d'activation d'IRE1 $\alpha$  par dissociation de BiP – Adapté de Hetz & Glimcher, 2009.** IRE1 $\alpha$  est maintenu sous forme de monomère inactif par son association avec la protéine chaperonne BiP. En présence de protéines mal conformées, BiP va se détacher d'IRE1 $\alpha$  permettant sa dimérisation et sa trans-autophosphorylation afin d'initier ses activités kinase et RNase.

Le second modèle quant à lui, considère comme suggéré chez la levure que la dissociation de BiP n'est pas nécessaire à l'activation d'IRE1 $\alpha$  et que la liaison de protéines mal conformées au domaine luminal d'IRE1 $\alpha$  suffirait à son activation. Ce dernier modèle voit son origine dans la structure du domaine luminal d'IRE1 $\alpha$  capable de former un sillon de liaison de peptides similaire à celui observable sur le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité).<sup>223</sup> Ces observations réalisées par cristallographie de la protéine IRE1p de la levure ont été complétées par des tests montrant la capacité d'IRE1p à lier directement une protéine présentant un défaut de conformation constant induit par une mutation *in vivo*. Un test similaire *in vitro* réalisé sur IRE1p purifié a ensuite montré que la protéine pouvait se lier directement à des peptides puis s'oligomériser en absence de tout autre facteur.<sup>224</sup>

Toutefois, les variations de structure entre IRE1p et IRE1 $\alpha$  vont à l'encontre de ce modèle chez l'humain. Deux structures secondaires du domaine luminal sont critiques pour l'activation d'IRE1, baptisées IF1<sup>L</sup> et IF2<sup>L</sup> (Interface luminal 1 et 2). IF1<sup>L</sup> est responsable chez la levure de la formation du sillon capable de recevoir les peptides mal conformés. Lors de la dimérisation d'IRE1p, les domaines IF1<sup>L</sup> de chaque monomère d'IRE1p interagissent pour former un sillon composé de deux hélices alpha symétriques. IF2<sup>L</sup> quant à lui, offre une seconde zone d'interface permettant à IRE1p de former des oligomères. Ces deux domaines sont à la base du processus d'activation d'IRE1p chez la levure. Cependant, pour IRE1 $\alpha$ , les deux domaines IF1<sup>L</sup> sont trop rapprochés pour former un sillon capable de recevoir des peptides. De plus, les domaines IF2<sup>L</sup> d'IRE1 $\alpha$  ne peuvent former de liaisons à cause de la présence d'une hélice- $\alpha$  absente chez IRE1p qui cause un encombrement stérique.<sup>225</sup>

En 2017, l'équipe du Dr Peter Walter présenta les résultats de leur analyse moléculaire et structurale d'IRE1 $\alpha$ , proposant un nouveau modèle d'activation pour la protéine. Leurs observations furent les suivantes :

- IRE1 $\alpha$  est bien capable de lier des polypeptides mal conformés avec un biais de liaison envers les polypeptides enrichis en cystéine, tyrosine, tryptophane et arginine. L'aspartate, le glutamate, la glutamine, la valine et la sérine sont en revanche peu favorisés.
- Le profil de reconnaissance des peptides d'IRE1 $\alpha$  et de BiP présentent plusieurs similarités, suggérant que l'activation d'IRE1 $\alpha$  serait entièrement dépendante du degré de saturation de

liaison entre BiP et les protéines mal conformées. Toutefois, de fortes différences dans leur capacité à lier des polypeptides restent omniprésentes avec IRE1 $\alpha$  tolérant les prolines et les histidines tandis que BiP ne peut les lier. Inversement, BiP tolère les thréonines tandis que IRE1 $\alpha$  est défavorable à leur liaison. La sensibilité d'IRE1 $\alpha$  à la détection du stress n'est donc pas dépendante de la forte présence de BiP dans le RE.

- La mesure des scores d'affinité de liaison entre IRE1 $\alpha$  et les deux meilleurs peptides d'interaction identifiés dans l'article, est semblable à celle observée entre les protéines chaperonnes et les protéines mal conformées. Les liaisons d'IRE1 $\alpha$  suivent donc un mode d'interaction semblable avec des contacts rapides et limités dans le temps. Ces contacts ont besoin d'un minimum de douze peptides enrichis en acides aminés aromatiques, hydrophobiques et en arginine. L'affinité pour un polypeptide mal conformé d'IRE1 $\alpha$  augmente avec le nombre de répétition de ces séquences d'acides aminés favorables à cette liaison.
- La liaison de peptides avec IRE1 $\alpha$  est capable d'induire des changements conformationnels. La liaison du peptide va induire un changement permettant de passer IRE1 $\alpha$  d'une forme fermée à une forme ouverte, libérant ainsi la région IF2<sup>L</sup> pour permettre l'oligomérisation d'IRE1 $\alpha$ .

L'équipe conclut par ses observations le modèle suivant : IRE1 $\alpha$  est capable de détecter le stress du RE par liaison directe avec des protéines mal conformées. Cette liaison induit un changement de conformation permettant de rendre accessible les régions IF2<sup>L</sup> du domaine luminale, induisant l'oligomérisation d'IRE1 $\alpha$ . Cette oligomérisation, juxtapose les domaines cytosoliques d'IRE1 $\alpha$ , permettant leur activation par trans-autophosphorylation tout en rassemblant les domaines RNase et en les positionnant dos à dos.<sup>226</sup> Les auteurs, bien qu'en accord avec les études démontrant le phénomène de liaison et de détachement de BiP n'expliquent pas dans cette étude la fonction de ce phénomène. Enfin, la même équipe décrivait quelques années plus tôt la présence de trois états différents d'IRE1 $\alpha$  dans la membrane du RE : un état inactif activable par le stress du RE (i), un état actif sous forme d'oligomère capable d'induire l'épissage d'XBP1 (ii) et un état réfractaire au stress mais réversible dans lequel IRE1 $\alpha$  entre après une activation prolongée (iii), empêchant cette forme de réponse à un stress non résolu. La forme inactive et réfractaire n'étant pas reconnues par les anticorps anti-IRE1 $\alpha$

phosphorylé, l'article suggère que la déphosphorylation d'IRE1 $\alpha$  joue un rôle inhibiteur majeur pour empêcher la réactivation d'IRE1 $\alpha$  en présence d'un stress non résolu.<sup>227</sup> Cet état réfractaire participerait à l'inhibition prolongée d'IRE1 $\alpha$  et donc à la transition vers l'UPR terminal et l'apoptose. (Figure 15)

**Figure 15 : Modèle d'activation d'IRE1 $\alpha$  par liaison directe aux protéines mal conformées – Adapté de Li & al, 2010 et Karagöz & al, 2017. (A)** IRE1 $\alpha$  se présente dans la membrane sous trois formes fonctionnelles différentes : une forme inactive et réfractaire au stress, obtenue après inhibition d'IRE1 $\alpha$  suite à un stress chronique ; une forme inactive inductible au stress et une forme active sous forme d'oligomère capable d'induire l'épissage d'XBP1. Ces trois formes peuvent correspondre à la forme de monomère, de dimère ouvert ou fermé et d'oligomère décrites dans le modèle décrit en 7B. **(B)** [1] Les différentes formes d'IRE1 $\alpha$ , monomère ou dimère fermés et ouverts sont présents en équilibre dans la membrane du RE en absence de stress. [2] En présence de stress, la liaison de protéines mal conformées va permettre de stabiliser IRE1 $\alpha$  dans sa forme ouverte, induisant un changement de conformation rendant accessible les régions IF2<sup>L</sup>. [3] Plusieurs dimères d'IRE1 $\alpha$  se rassemblent et se lient par les régions IF2<sup>L</sup> accessibles pour former des oligomères d'IRE1 $\alpha$  actifs. [4] Lorsque le RE retourne à l'homéostasie, les oligomères se détachent et redeviennent des monomères inactifs. Les schémas ne représentent que le domaine luminal d'IRE1 $\alpha$ .

De récentes publications ont toutefois pu apporter un nouveau modèle expliquant la relation complexe entre IRE1 $\alpha$  et BiP. En effet, *Sundaram et al.* observent la présence en absence de stress du RE de plusieurs groupes d'homo-oligomères d'IRE1 $\alpha$  de tailles diverses. L'activation du stress semble également ne pas faire apparaître de nouveaux complexes de plus grandes taille qui auraient pu correspondre à des oligomères d'ordre supérieur. Toutefois, l'abondance du complexe à taille la plus faible réagit au stress, diminuant en cas d'activation, puis réapparaissant après retour à l'homéostasie. Seule la surexpression d'IRE1 $\alpha$  permet de faire apparaître des complexes de taille supérieure, un constat qui semble s'expliquer par la faible expression d'IRE1 $\alpha$  ( $\approx$  416 molécules/cellule) comparé aux deux autres inducteurs de l'UPR, PERK ( $\approx$  2299 molécules/cellule) et ATF6 (15 598 molécules/cellule), dans les cellules de mammifères.<sup>228,229</sup> La présence marquée à l'état basal de formes oligomères d'IRE1 $\alpha$  suggère qu'un second mécanisme est nécessaire pour gérer l'équilibre entre ces différentes formes. (Figure 16)

**Figure 16 : Modèle d'activation de l'UPR par équilibre des formes monomères et oligomères des inducteurs présentes dans la membrane du RE – d'après Sundaram & al 2018.** En absence de stress, les trois inducteurs de l'UPR sont observables sous formes simples et complexes dans la membrane du RE et cela malgré leur liaison à BiP. BiP prévient l'activation inappropriée de ces inducteurs en empêchant leur liaison directe avec des protéines mal conformées (IRE1 $\alpha$ , PERK) ou en masquant leur séquence de localisation au Golgi (ATF6). En présence de stress, BiP se détache des trois inducteurs permettant la disparition des formes simples de PERK au profit de la formation d'oligomères de plus haut ordre que ceux observés à l'état basal. IRE1 $\alpha$  en revanche, ne forme pas de complexes de plus haut ordre potentiellement à cause de sa faible présence dans la membrane du RE. Toutefois, les formes les moins complexes tendent à disparaître au profit des formes complexes de façon similaire à PERK. Il y a donc un changement dans l'équilibre des formes monomères-dimères-oligomères d'IRE1 $\alpha$  au profit des dimères et oligomères et cela, sans induire la formation d'oligomères d'ordre supérieurs comme observé chez PERK.

*Amin-Wetzel & al.* ont alors proposés le modèle suivant : la co-chaperonne ERdj4 se lie à IRE1 $\alpha$  à l'état basal et provoque la liaison entre IRE1 $\alpha$  et BiP en stimulant l'activité ATPase de BiP, formant un complexe IRE1 $\alpha$ -BiP déstabilisant la capacité à IRE1 $\alpha$  à former des dimères. Erdj4 se détache d'IRE1 $\alpha$  une fois BiP fixée à IRE1 $\alpha$ . GRP170, une NEF (Nucleotide-exchange factor) va remplacer l'ADP lié à BiP par un ATP, stoppant l'effet inhibiteur de BiP sur IRE1 $\alpha$  et cela dans un cycle continu. Toutefois, en présence d'un stress du RE, la présence de protéines mal conformées va décaler cet équilibre vers un plus grand nombre d'IRE1 $\alpha$  activés sous formes de dimères et d'oligomères, les protéines mal conformées entrant en compétition avec la liaison à BiP et Erdj4.<sup>230</sup> Ce nouveau modèle en accord avec les précédentes études menées sur BiP et IRE1 $\alpha$  permet de faire co-exister les deux modèles phares de l'activation d'IRE1 $\alpha$ . IRE1 $\alpha$  serait donc bien capable de lier directement des protéines mal conformées pour s'oligomériser et serait déjà présent sous cette forme à l'état basal. Mais les cycles de liaison et dissociation de BiP et IRE1 $\alpha$  maintiennent le faible pool d'IRE1 $\alpha$  dans la membrane dans un état d'équilibre entre ses diverses formes qui limite sa signalisation en absence de stress. Toutefois, ce modèle est encore sujet à débat, puisque plusieurs études ont souligné le caractère ATP-indépendant de la dissociation de BiP et IRE1 $\alpha$  (Figure 17).<sup>231,232</sup>

**Figure 17 : Modèle d'interaction entre IRE1 $\alpha$ , BiP et Erdj4 – Adapté de Amin-Wetzel & al, 2017. (A)** IRE1 $\alpha$  en forme de monomère libre est capable de se dimériser pour s'activer. Cet état peut être modifié par liaison d'Erdj4 sur IRE1 $\alpha$  qui va augmenter l'activité ATPase de BiP, transformant son GTP en GDP. BiP-GDP ayant une préférence de liaison pour IRE1 $\alpha$ , va se lier à lui et provoquer un changement de conformation empêchant toute dimérisation. Erdj4 lui, se détache d'IRE1 $\alpha$  une fois IRE1 $\alpha$  lié à BiP. La protéine GRP78 va être capable de changer le GDP de BiP en GTP, augmentant sa préférence de liaison pour les protéines mal conformées et diminuant son affinité pour IRE1 $\alpha$ , provoquant sa dissociation. IRE1 $\alpha$  peut reprendre une conformation neutre capable d'être activée par le stress du RE. **(B)** Les différentes formes d'IRE1 $\alpha$  (monomère libre, lié à Erdj4, lié à BiP ou dimère) sont présents en équilibre dans la membrane du RE à l'état basal. En absence de stress, une proportion plus grande d'Erdj4 et BiP sont libres car non liés à des protéines mal conformées, induisant un excès d'IRE1 $\alpha$  inactif par liaison préférentielle de BiP avec IRE1 $\alpha$ . En présence de stress, le pool de BiP est maintenu auprès des protéines mal conformées, diminuant le taux d'IRE1 $\alpha$  réfractaires au stress et permettant d'induire l'UPR.

### iii. Désactivation d'IRE1 $\alpha$

Les premières études sur l'activation et la désactivation d'IRE1 $\alpha$  soulignaient l'effet de la phosphorylation sur la protéine. L'autophosphorylation induirait l'activité d'IRE1 $\alpha$ , tandis que sa déphosphorylation l'inhiberait.<sup>227,233</sup> Toutefois, des études sur l'effet de mutations dans le domaine kinase ont montré l'existence d'une activité RNase soutenue d'IRE1p dans la levure en absence d'autophosphorylation de la protéine, suggérant que le rôle du domaine

kinase serait d'inhiber le domaine RNase et non de l'activer.<sup>234,235</sup> Cette hypothèse est soutenue par une publication montrant l'implication de la voie AKT-mTOR dans la régulation d'IRE1 $\alpha$ .<sup>236</sup> Lors d'un stress du RE, la voie AKT-mTOR est inhibée laissant IRE1 $\alpha$  s'activer. Avec le temps, la voie se réactive et inhibe l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  en promouvant les contacts entre le RE et la mitochondrie, ce processus étant dépendant de la phosphorylation d'IRE1 $\alpha$ . Sans cette phosphorylation, la réactivation de la voie AKT-mTOR ne permet pas l'inhibition de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$ . L'auto-phosphorylation d'IRE1 $\alpha$  serait donc un mécanisme de rétro-contrôle négatif nécessitant l'intervention d'autres événements cellulaires grâce auxquels elle provoque l'arrêt de l'activité d'IRE1 $\alpha$ . En promouvant les contacts RE-mitochondrie, la voie AKT-mTOR permet de rétablir les MAMs (mitochondria-associated ER membranes) qui servent de plate-forme de signalisation entre le RE et la mitochondrie en facilitant notamment le trafic des lipides et du calcium entre les deux organites<sup>237</sup> et dans lesquelles on retrouve une présence accrue d'IRE1 $\alpha$  (Figure 18).<sup>238</sup>

**Figure 18 : Modèle de désactivation d'IRE1 $\alpha$  par la voie AKT/mTOR – d'après Sanchez-Alvarez & al, 2017. (A)** Après activation du stress, IRE1 $\alpha$  est activé tandis que la voie AKT/mTOR est inhibée et que les MAMs sont rompus. Avec le rétablissement de la signalisation AKT, les MAMs sont rétablis et IRE1 $\alpha$  est inactivé. **(B)** Si la voie AKT/mTOR n'est pas restaurée et que les MAMs ne sont pas rétablis ou si IRE1 $\alpha$  n'est pas phosphorylé, il y a défaut d'inactivation d'IRE1 $\alpha$ , laissant l'activité RNase de la protéine se prolonger avec le temps jusqu'à l'inactivation naturelle de la protéine.

#### iv. UPRosome

Les études présentées précédemment pour expliquer les modèles d'activation et d'inhibition d'IRE1 $\alpha$  sont basées sur des analyses biochimiques des différents états observés de la protéine à l'état basal et en cas de stress du RE. Toutefois, ces études ne présentent pas les variations des différentes activités d'IRE1 $\alpha$  telles que l'épissage d'XBP1, le RIDD et l'activation des voies JNK et NF- $\kappa$ B. De plus, l'aspect à la fois protecteur et pro-apoptotique de ces voies, observées en fonction des modèles cellulaires ou d'activation du stress utilisés (Voir Partie III-C-1), dépeignent IRE1 $\alpha$  comme une lame à double tranchant, pouvant à la fois protéger contre le stress ou sensibiliser la cellule à la mort cellulaire. Ces observations posent l'hypothèse qu'au-delà des modèles d'activation et d'inhibition d'IRE1 $\alpha$ , il existe un autre niveau de régulation permettant de réguler plus finement chacune de ces activités en fonction des types cellulaires et du type de stress rencontré (aigu, chronique, faible ou fort).

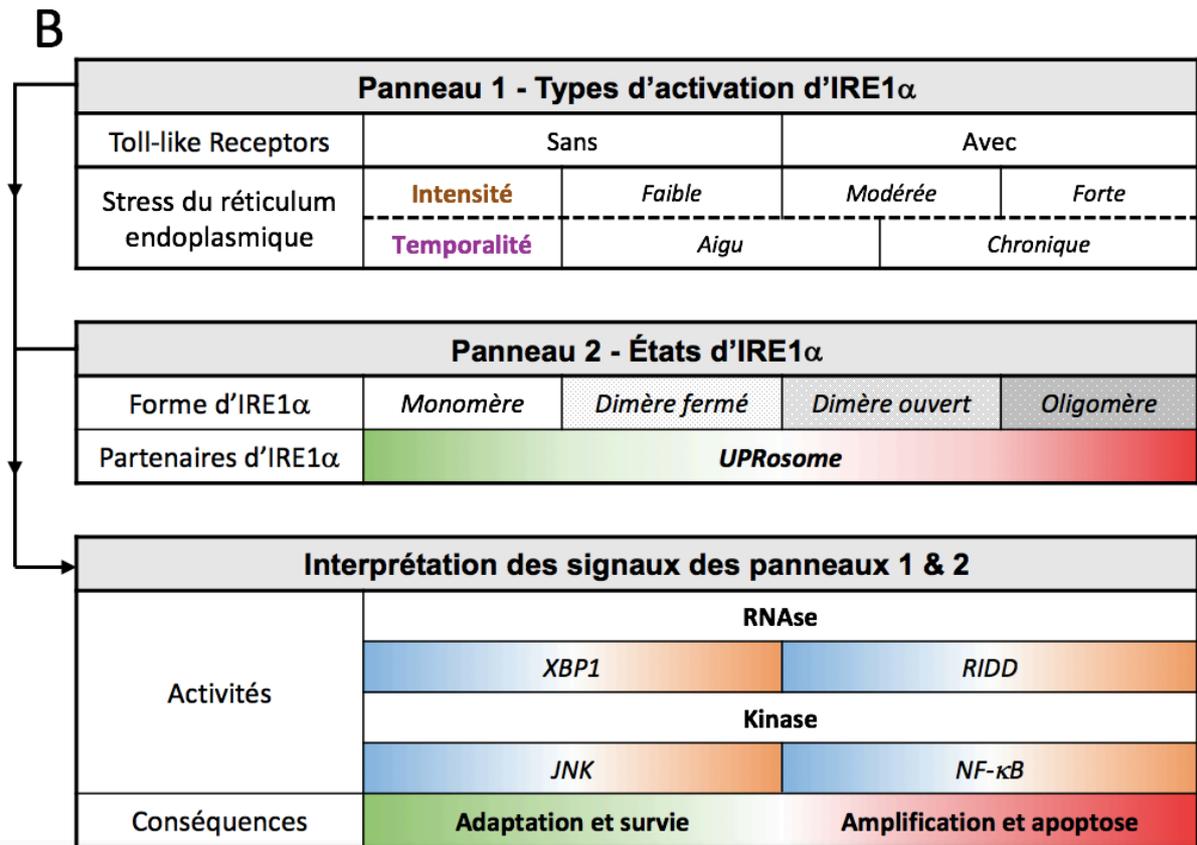
Plusieurs équipes se sont alors penchés sur la possibilité que des partenaires protéiques pouvaient influencer les niveaux d'activité de chacune des voies influencées par IRE1 $\alpha$ , permettant de faire la différence entre une activité pro-adaptative et une activité pro-apoptotique. L'ensemble de ces partenaires dédiés à la régulation d'IRE1 $\alpha$  est appelé UPRosome. L'UPRosome correspond donc à la formation d'une plate-forme composée de plusieurs protéines formant un complexe autour d'IRE1 $\alpha$ . Ces partenaires protéiques vont influencer l'activation, l'inhibition et les niveaux d'activité des diverses voies d'IRE1 $\alpha$  afin d'aboutir à une réponse optimale de l'UPR en fonction des situations rencontrées. Toutefois, la majeure partie de ces partenaires n'ont été observés que dans des études isolées qui n'ont été ni répétées, ni vérifiées dans d'autres modèles cellulaires et ne peuvent donc pas être généralisés. En conséquence, nous n'aborderont que le système BAX-BAK et BI-1, dont la présence et l'effet ont été rapportés dans plusieurs revues ou bien ont été observés dans des modèles *in vivo*.

Les protéines BAX et BAK comme présenté en C-ii sont nécessaires à l'induction de l'apoptose par perméabilisation de la membrane mitochondriale. Lorsqu'ils sont activés par le décalage d'équilibre entre les pro- et anti-apoptotiques de la famille BCL-2, ces deux protéines vont se déplacer jusqu'à la membrane de la mitochondrie pour y former des pores. Or, ce même complexe BAX-BAK semble être impliqué dans la régulation de l'activité d'IRE1 $\alpha$ . *Hetz & al* ont généré des souris KO pour BAX et BAK puis ont testé plusieurs conditions de stimulation du stress par injection intra-péritonéale de tunicamycine. Leurs observations rapportent la présence d'une diminution de la phosphorylation de JNK lors de l'induction du stress mais pas par induction avec TNF $\alpha$  ; une diminution de l'abondance d'XBP1 dans le noyau ainsi que de l'expression de ses cibles transcriptionnelles ; ainsi qu'une absence d'effet néfaste sur la signalisation PERK. Ces premières observations tendent à montrer que BAX et BAK sont nécessaires pour une induction optimale de la signalisation IRE1 $\alpha$ . Pour confirmer que ces observations ne sont pas dues aux autres fonctions connues de ces protéines, les auteurs ont généré des souris déficientes en BCL-2 sans observer de défaut similaire, invalidant l'hypothèse d'un défaut d'équilibre en pro- et anti-apoptotique mais ont également ré-exprimé dans leur modèle KO une version dirigée à la mitochondrie de BAX. Cette version mutée ne rétablit pas la signalisation IRE1 $\alpha$  mais restaure et amplifie la susceptibilité à l'apoptose, montrant que la présence observée de BAX et BAK à la membrane du RE aurait un effet protecteur. Pour confirmer leurs résultats, les auteurs ont montré que les souris KO pour IRE1 $\alpha$  montrent un

phénotype similaire à celui des double KO BAX et BAK, qu'IRE1 $\alpha$  co-immunoprécipite avec BAX et BAK et que cette interaction, augmentée en présence de stress, nécessite une liaison entre le domaine C-terminal d'IRE1 $\alpha$  et les domaines BH3 et BH1 de BAX et BAK. Les auteurs concluent que BAX et BAK interagissent avec IRE1 $\alpha$  en présence de stress afin de moduler son activité.<sup>239</sup>

BI-1 (Bax Inhibitor-1) est une protéine transmembranaire du RE appartenant à la famille des protéines BCL-2. Cette protéine a un effet anti-apoptotique qui protège les cellules contre les signaux de mort cellulaire, notamment en cas de stress du RE.<sup>240</sup> Plusieurs rapports ont souligné l'effet inhibiteur de BI-1 sur l'activité d'IRE1 $\alpha$ , généralement rapportée par l'observation d'une sur-activation de la voie IRE1 $\alpha$ -XBP1 ou inversement d'une diminution de celle-ci en cas de surexpression de BI-1.<sup>241,242</sup> *Lisbona & al.* ont apporté les premières lumières sur les origines mécanistiques de cet effet en confirmant dans un premier temps l'hyperactivation de la voie XBP1 dans des MEF KO pour BI-1, puis et montrant que cette hyperactivation était liée à une inactivation retardée d'IRE1 $\alpha$ . L'inhibition fut confirmée *in vivo* dans des souris déficientes en BI-1. Leur étude confirme également par analyse *in vitro* la capacité d'IRE1 $\alpha$  et BI-1 à former un complexe. Les auteurs proposent l'hypothèse que BAX, BAK et BI-1 sont en compétition pour des sites de liaison similaires. BAX et BAK aideraient donc à l'activation d'IRE1 $\alpha$ , tandis que BI-1 interviendrait pour inhiber son activité.<sup>243</sup>

Pour conclure, l'UPR est un système complexe dédié à la détection du stress du réticulum endoplasmique et à la détermination du destin de la cellule affectée : l'adaptation ou l'apoptose. Le choix de l'une ou l'autre de ses conséquences est médié par un nombre conséquent de facteurs, augmentant de façon drastique la complexité de ce phénomène. Cette complexité, observée autant dans les mécanismes d'activation des voies de l'UPR que dans la régulation des phénomènes qui en découlent n'a pas encore été complètement expliquée (Figure 19).



**Figure 19 : Activités et conséquences de l'activité d'IRE1 $\alpha$  en fonction du type d'activation et de l'UPRosome - Adapté de Hetz & Glimcher, 2009. (A)** Schéma simplifié d'IRE1 $\alpha$  sous forme de dimère actif et de l'UPRosome. Les protéines en bleu font partie de l'UPRosome et permettent la régulation de l'activité d'IRE1 $\alpha$ . Les protéines en jaune sont des partenaires permettant la transduction du signal induit par l'activité kinase d'IRE1 $\alpha$ . **(B)** Tableau bilan des différents facteurs influant sur l'activité d'IRE1 $\alpha$  et les conséquences provoquées. Le type d'activation d'IRE1 $\alpha$  et l'état d'IRE1 $\alpha$  forment deux panneaux de signalisation. L'association des facteurs présents sur ces deux panneaux vont former une combinaison de signaux aboutissant à une réponse dirigée vers l'adaptation ou la mort cellulaire. Un seul changement de l'un de ces paramètres peut donc faire varier les conséquences fonctionnelles de l'UPR. Les motifs à point montrent une activité croissante d'IRE1 $\alpha$ . Les variations de bleu et d'orange indique des variations d'intensité d'activité. Les variations de vert et de rouge indiquent un changement de conséquence de la signalisation d'IRE1 $\alpha$  pour l'UPR.

#### 4. Liens entre l'UPR et l'immunité

Le réticulum endoplasmique ayant un rôle central dans la cellule, des dysfonctions de son homéostasie ou de sa régulation ont fréquemment été observées dans la pathogénèse de diverses maladies telles que les maladies neurodégénératives<sup>244</sup>, pulmonaires<sup>245</sup>, cardiovasculaires<sup>246</sup>, le cancer<sup>247</sup>, le diabète de type I et II<sup>248</sup>, les infections virales<sup>249</sup> et les maladies inflammatoires.<sup>250</sup> Parmi eux, les trois derniers exemples soulignent un potentiel lien fonctionnel entre l'UPR et l'immunité. Les différentes études centrées sur l'UPR et l'immunité ont donc pu révéler la nécessité d'un UPR fonctionnel pour le développement et la fonction de certaines cellules immunitaires.

### i. UPR et fonction des cellules immunitaires

L'induction de l'UPR est une étape nécessaire à la fonction ou à la différenciation de certaines cellules immunitaires. Parmi elles on retrouve notamment les plasmocytes, les cellules de Paneth et les DCs. Dans les **lymphocytes B**, la différenciation en plasmocytes producteurs d'anticorps ne peut avoir lieu sans une activation préalable de l'UPR afin de permettre à la cellule d'améliorer sa fonction sécrétoire pour la synthèse des immunoglobulines (Ig).<sup>251</sup> En effet la perte d'expression d'XBP1 chez un modèle KO de souris provoque un défaut de différenciation des LB en plasmocytes, de la production d'IgM et de la synthèse d'IL6, une cytokine essentielle à la fonction et à la prolifération des plasmocytes.<sup>252</sup> La diminution d'expression des IgM a été reliée à une hyperactivation de l'activité RIDD d'IRE1 $\alpha$  dans les LB de souris KO pour XBP1, provoquant la dégradation des ARNm de la chaîne  $\mu$  des IgM.<sup>253</sup> La surexpression d'XBP1 au contraire, provoque une augmentation de la production d'IgM.<sup>252</sup> Si dans un premier temps l'activation de la voie IRE1 $\alpha$ -XBP1 avait été attribuée à l'augmentation des besoins du RE des LB à cause de la forte synthèse des Ig, cette théorie fut réfutée par la démonstration que cette activation a lieu avant la synthèse des Ig<sup>254</sup> et même en cas d'absence d'IgM, provoquée par la délétion génique de la chaîne lourde des IgM dans un modèle murin.<sup>255</sup> Plus tard, l'activation de la voie IRE1 $\alpha$ -XBP1 dans les plasmocytes en cours de différenciation a été reliée à l'activation des LB par LPS ou IL4. Cette activation provoquait également la répression spécifique de la voie PERK, montrant que des signaux immunitaires pouvaient réguler les inducteurs de l'UPR.<sup>256</sup>

Dans les **cellules de Paneth**, des cellules épithéliales intestinales responsables de la production de peptides antimicrobiens dans la zone gastro-intestinales, la délétion d'XBP1 dans un modèle de souris provoque une perte presque complète de leur population. Les seules cellules survivantes présentent une perte de leur architecture ainsi qu'une forte diminution de la synthèse de granules. La perte d'XBP1 provoque également une entérite et une hyper-réactivité aux inducteurs de colites, démontrant la capacité d'une perturbation de l'UPR à induire une perte de la tolérance par un défaut de développement des cellules de Paneth.<sup>257</sup> La déficience spécifique d'XBP1 dans les cellules épithéliales intestinales ou les cellules de Paneth de souris a également été montré comme un facteur d'induction des maladies inflammatoires

de l'intestin par hyperactivation d'IRE1 $\alpha$  et par conséquent de la voie NF- $\kappa$ B.<sup>258</sup> Cette observation fut également soutenue par l'association génétique de variants d'XBP1 avec la maladie de Crohn et les colites ulcéreuses.<sup>257</sup>

Les **cellules dendritiques** quant à elle, présentent des effets délétères de la perte d'expression d'XBP1 dans deux sous-populations en particuliers : les pDC et les CD8 $\alpha^+$ . En effet, *Iwakoshi & al.* ont montrés que la délétion d'XBP1 dans les DC provoquait une réduction globale du nombre de DC avec un effet plus sévère chez les pDC, probablement due à une sensibilité accrue à l'apoptose pendant la différenciation. De plus, la surexpression par transduction d'XBPs dans les progéniteurs hématopoïétiques améliore le développement des pDCs dans les souris WT mais sauve également le phénotype chez les souris XBP1 KO, confirmant l'importance de la voie pour leur survie et leur développement. L'observation de la présence d'un épissage constitutif d'XBP1 dans les DC WT permet de poser l'hypothèse selon laquelle la voie XBP1 permettrait d'inhiber l'apoptose naturelle des DC en cours de formation. De façon similaire aux LB, l'activation de la voie semble permettre le développement du système de sécrétion de la cellule en augmentant la taille du RE avant que la différenciation en pDC ne soit terminée. Un défaut d'activation de cette voie provoque donc une diminution de la production d'IFN/I par ces pDCs.<sup>259</sup> Dans les DC CD8 $\alpha^+$ , l'absence d'IRE1 $\alpha$  et d'XBP1 dans ce sous-type provoque des anomalies structurelles qui ne semblent pas affecter leur fonction sécrétoire. En revanche, leur fonction de présentation croisée des antigènes aux LT CD8 $^+$  est fortement impactée.<sup>260</sup>

## ii. Convergence entre l'UPR et les voies de signalisation immunitaires

L'UPR a donc un rôle important à jouer dans divers acteurs de l'immunité. Si jusque-là les exemples fonctionnels décrits étaient principalement basés sur la voie XBP1 et l'hyperactivation de l'activité RIDD d'IRE1 $\alpha$ , l'UPR est également capable d'induire directement des voies de signalisation connues dans l'immunité notamment la voie NF- $\kappa$ B et la voie JNK.

**La voie NF- $\kappa$ B** dispose de deux facteurs d'activation dans l'UPR : PERK et IRE1 $\alpha$ . En effet, l'induction d'un stress du RE va provoquer l'activation de PERK et donc l'inhibition de

la traduction protéique. Cette inhibition va provoquer un déséquilibre dans le ratio existant entre NF- $\kappa$ B et son inhibiteur I $\kappa$ B en faveur du facteur de transcription. En effet, I $\kappa$ B étant une protéine à la stabilité réduite comparée à NF- $\kappa$ B, sa concentration va se réduire progressivement jusqu'à induire une activation passive de la voie, indépendamment de toute phosphorylation d'I $\kappa$ B.<sup>261</sup> Une autre étude, bien qu'en accord avec la capacité de la voie PERK à induire la voie NF- $\kappa$ B par inhibition de la traduction, n'observe pas de diminution de la quantité d'I $\kappa$ B mais confirme en revanche la dissociation entre I $\kappa$ B et NF- $\kappa$ B.<sup>262</sup> Le mécanisme à l'œuvre dans l'activation PERK-dépendante de la voie NF- $\kappa$ B reste donc à l'étude. Le facteur d'activation de la voie NF- $\kappa$ B par IRE1 $\alpha$  est le même que celui de **la voie JNK**, qui elle ne présente pas d'autres facteurs d'activation dans l'UPR. Ce facteur est la protéine adaptatrice TRAF2 qui, par liaison avec le domaine kinase d'IRE1 $\alpha$ , va permettre la phosphorylation d'I $\kappa$ B pour stopper son activité inhibitrice sur NF- $\kappa$ B d'une part<sup>196,197</sup> ; et enclencher la voie des MAP kinases, induisant donc JNK et consécutivement le facteur de transcription AP-1 d'autre part.<sup>195,263,264</sup>

**Figure 20 : Induction des voies NF- $\kappa$ B et JNK par l'UPR – d'après Zhang & Kaufman, 2008.** L'activation d'IRE1 $\alpha$  permet le recrutement de la protéine adaptatrice TRAF2. TRAF2 permet la phosphorylation par IRE1 $\alpha$  d'IKK et de JNK. La phosphorylation d'IKK permet de phosphoryler I $\kappa$ B, stoppant son activité inhibitrice et activant NF- $\kappa$ B. La phosphorylation de JNK permet d'activer le facteur de transcription AP1. L'atténuation traductionnelle par activation de la voie PERK permet de modifier l'équilibre I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B en faveur de NF- $\kappa$ B, améliorant l'activation de la voie.

Si ces deux voies constituent les deux exemples les plus connus pour la liaison entre la signalisation de l'UPR et la signalisation immunitaire, d'autres voies ont par la suite été découvertes, révélant l'UPR comme une plate-forme agissant en coopération avec le système immunitaire pour induire la production de certaines cytokines, activer l'inflammation ou bien encore moduler la présentation des antigènes sur le CMH de classe I (Figure 21). Ces éléments, principalement reliés à IRE1 $\alpha$  et PERK, sont cités ci-dessous :

- La voie IRE1 $\alpha$ -XBP1 peut être induite par TLR4 et TLR2 dans les macrophages en absence de stress du RE afin de promouvoir la transcription d'IL6, TNF et IFN $\beta$ . Cette induction par les TLR est indépendante de MyD88 mais requiert l'intervention de NOX2 et de TRAF6.<sup>265</sup>
- La surexpression d'IL6, dépendante de l'activité kinase d'IRE1 $\alpha$ , est également soutenue par l'activation de NOD1 et NOD2.<sup>266</sup>

- XBP1 est également capable d'induire la transcription de miR-346. miR-346 provoque la diminution de l'expression de TAP1 et des gènes *HLA-B*, *HLA-C* et *HLA-F*. La diminution de l'expression des gènes du CMH de classe I, couplée à celle de TAP1, un transporteur nécessaire à la migration des peptides antigéniques intracellulaires dans le réticulum endoplasmique afin qu'ils soient chargés sur le CMH, provoque une diminution globale de la présentation des peptides sur le CMH-I à la membrane.<sup>267</sup>
- La diminution de la présentation des antigènes sur le CMH de classe I est également provoquée par l'activité RIDD d'IRE1 $\alpha$  qui dégrade l'ARNm de *TAPBP* dans les DC CD8 $\alpha^+$ . *TAPBP* code pour la tapasine, une protéine permettant l'association de TAP1 aux molécules de CMH-I.<sup>260</sup>
- Le RIDD induit la dégradation du miR-17, un inhibiteur de l'expression de TXNIP, une protéine capable d'activer par liaison l'inflammasome NLRP3, provoquant l'induction d'IL1- $\beta$ . L'induction de TXNIP est également liée à PERK. En effet, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  provoque l'expression du facteur de transcription ATF5, augmentant l'induction de TXNIP et donc de NLRP3. L'activation par TXNIP de l'inflammasome NLRP3 est l'un des éléments majeurs de l'induction de l'apoptose par l'UPR terminal.<sup>268,269</sup>
- La voie PERK peut être réprimée par TLR3 et 4. La transduction du signal de TLR3 et 4 via TICAM1 va induire l'activation d'eIF2B, inhibant eIF2 $\alpha$  en retour, empêchant ainsi tout arrêt de la traduction. Cette inhibition prévient l'expression de CHOP, permettant d'activer le stress du RE tout en évitant l'induction de l'UPR terminal. Le rôle protecteur de cette inhibition a été confirmé dans un modèle murin, où la perte de TICAM1 provoque une surexpression de CHOP, induisant la mort cellulaire et la dérégulation de la rate, du foie et des reins chez des souris, après traitement par de fortes doses de LPS.<sup>270,271</sup>
- L'activation de CHOP permet d'augmenter l'expression d'IL6<sup>272</sup>, IL8<sup>273</sup>, IFN $\beta$ <sup>274</sup> et IL23p19<sup>275</sup>.

Les exemples cités démontrent l'existence d'un réseau interconnectant l'UPR et l'immunité. Le rôle de l'UPR peut se jouer soit au niveau du développement des cellules immunitaires, soit au niveau de la fonction de ces cellules grâce à l'activation ou la répression spécifique d'une des voies de l'UPR. L'UPR agit donc en synergie avec la réponse immune

pour la rendre pleinement fonctionnelle. Des défauts de l'UPR peuvent par conséquent influencer sur l'induction d'une auto-immunité. Un exemple récent lié à la voie PERK correspond à la description d'une cohorte de patients atteints de LES et présentant une surexpression de CHOP et de GADD34, la voie d'induction de l'IFN $\beta$ <sup>274</sup> citée plus haut. Cette induction corrèle avec l'expression importante d'IFN/I chez ces patients, reliant ainsi l'UPR au lupus par l'induction chronique de cette famille d'IFN, bien que le mécanisme d'induction de CHOP et GADD34 dans le LES ne soit pas encore décrits.<sup>276</sup>

**Figure 21 : Liens entre IRE1 $\alpha$  et l'immunité – adapté de Navid & Colbert, 2017.** IRE1 $\alpha$  représente une plate-forme de contact entre le stress du RE et l'immunité. Inductible par une signalisation TLR/TRAF6 en absence de stress, IRE1 $\alpha$  peut induire l'activation de la voie NF-kB et JNK. Son activité kinase et RNase permet d'induire l'activation de plusieurs cytokines pro-inflammatoires ainsi que de diminuer la présentation des antigènes sur le CMH de classe I. L'induction du stress du RE par les pathogènes pourrait donc induire une réponse de la part de la voie IRE1 $\alpha$ , soutenant les voies immunitaires indépendantes de l'UPR.

### iii. IRE1 $\alpha$ dans les maladies auto-immunes

D'autres exemples concrets, démontrant l'importance de la fonction d'IRE1 $\alpha$  dans le développement de l'auto-immunité ont pu être décrits dans la littérature. Parmi les maladies concernées on retrouve notamment : le diabète de type I, la spondylarthrite ankylosante, l'arthrite rhumatoïde, la sclérose systémique et le lupus.

Le cas du diabète et de la spondylarthrite reposent sur la propension de certaines protéines à être naturellement difficiles à conformer ou à devenir mal conformées à la suite d'une mutation. C'est le cas de la pro-insuline et d'HLA-B27. Une mutation ponctuelle de l'insuline provoque son accumulation dans le RE, induisant un fort stress dans les cellules  $\beta$  du pancréas aboutissant à une inflammation et à l'apoptose des cellules  $\beta$ .<sup>277,278</sup> L'induction de ce phénotype dans les souris Akita, un modèle murin d'étude du diabète du type I qui porte cette mutation, pouvait être diminuée par inhibition de la fonction kinase d'IRE1 $\alpha$ , montrant son implication dans l'inflammation induite par l'UPR, provoquant le phénotype diabétique observé.<sup>279</sup> Dans le cas d'HLA-B27, cette protéine est naturellement complexe à former pour le RE, induisant donc un stress dans des conditions physiologiques.<sup>280,281</sup> Ce stress, observé dans des cas de spondylarthrite ankylosante cause une réponse pro-inflammatoire induite par l'UPR avec la sécrétion notamment d'IL23 par la voie XBP1.<sup>282,283</sup>

Pour l'arthrite, c'est une activation par les TLR, indépendante du stress du RE, qui semble être à l'origine de la réponse pro-inflammatoire et du phénotype auto-immun. En effet, il a été montré dans un modèle murin d'arthrite rhumatoïde, que la délétion spécifique d'IRE1 $\alpha$  dans la lignée myéloïde avait un effet protecteur. Le même effet fut également observé par utilisation d'inhibiteurs spécifiques d'IRE1 $\alpha$ , permettant de diminuer la production de cytokines inflammatoires résultantes d'une stimulation par les TLR.<sup>284</sup> Cet effet fut confirmé dans des fibroblastes synoviaux de patients atteints d'arthrite rhumatoïde, où l'activation de la voie IRE1 $\alpha$ -XBP1 par TLR4 et TLR2 fut confirmée comme inductrice de l'expression d'IL6 et TNF, deux cytokines importantes dans la pathogénèse de l'arthrite rhumatoïde.<sup>285</sup>

La sclérose systémique est une maladie caractérisée par la dysfonction des fibroblastes, causant des fibroses sur divers organes par surexpression de multiples composants de la matrice extracellulaire. L'expression de ces facteurs peut être influencée par l'épissage d'XBP1 et le RIDD. Le RIDD dégrade le miRNA-150, un répresseur des protéines composants les fibroses, tandis qu'XBP1 augmente la capacité du RE, aidant les fibroblastes à sécréter plus de protéines de la matrice.<sup>209,286</sup> L'utilisation de l'inhibiteur d'IRE1 $\alpha$  4 $\nu$ 8C réduit le phénotype de fibrose dans les modèles murins ainsi que dans des myofibroblastes isolés de patients isolés atteints de sclérose systémique.

Enfin, dans le lupus, les anticorps anti-ADN simples et doubles brins purifiés à partir de sérum de patients peuvent faire une réaction croisée avec la protéine HERP, une protéine transmembranaire du RE impliquée dans l'ERAD.<sup>287</sup> En effet, une immunisation de souris BALB/c par la protéine HERP provoque l'apparition d'anticorps anti ADNdb, montrant que certains épitopes d'HERP pourraient induire la production de ces auto-anticorps dans la maladie. HERP étant une protéine peu exprimée en condition normale et rapidement polyubiquitinylée<sup>288</sup> et sa présence ayant été confirmée sur la membrane des corps apoptotiques, une augmentation UPR-dépendante de son expression pourrait induire une auto-immunité chez des sujets sains. L'expression de HERP dans les PBMCs, corrèle également avec l'activité de la maladie chez les patients observés.<sup>287</sup> La caractérisation additionnelle de l'UPR dans le lupus a montré une expression augmentée d'XBP1s et de CHOP<sup>289</sup> ainsi qu'un effet protecteur contre le lupus de la délétion de la voie IRE1 $\alpha$ -XBP1 dans un modèle murin de lupus.<sup>290</sup> De futures

études sont donc encore nécessaires pour déterminer précisément le rôle de la voie dans la pathogénèse de la maladie.

## Partie IV : PIK3R2 et voie PI3K

### A / Voie PI3K

La famille des PI3K est un groupe de protéines kinases capables de phosphoryler les phosphoinositides de la membrane plasmique. Cette famille de protéines est subdivisée en quatre autres classes IA, IB, II et III. p85 $\beta$ , codée par le gène d'intérêt *PIK3R2*, fait partie de la classe IA composée de p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\delta$ , p85 $\alpha$  et p85 $\beta$ . Parmi eux, p110 $\alpha$  et p110 $\beta$  sont exprimés de façon ubiquitaires, tandis que p110 $\delta$  est exprimé principalement dans les leucocytes.<sup>158,291</sup> Ces protéines constituent les sous-unités des complexes PI3K, composés d'un isoforme de p110 contenant l'activité catalytique kinase et d'un isoforme de p85, constituant la sous-unité inhibitrice du complexe.<sup>291</sup> Une fois actifs, les différents complexes PI3K peuvent intervenir dans un panel très large de fonctions tels que la croissance et la mobilité cellulaire, la réorganisation du cytosquelette, la synthèse protéique, le métabolisme cellulaire et la différenciation des cellules immunitaires.<sup>292</sup> La voie PI3K étant donc centrale dans la cellule avec de multiples partenaires, fonctions et mécanismes différents, le reste du chapitre s'intéressera principalement la signalisation liée à la sous-unité catalytique p110 $\delta$ , principale inductrice des fonctions immunes de la voie PI3K, dont les mutations activatrices ont été décrites dans l'APDS.<sup>158</sup> Toutefois, il est nécessaire de garder à l'esprit que certains récepteurs, voies ou fonctions peuvent être redondantes entre les différents isoformes de la voie PI3K. La dérégulation de l'un de ses membres peut donc dans certains cas être compensés par les autres, confirmant la forte complexité de cette voie.

Le complexe PI3K $\delta$ , formé par la liaison entre la sous-unité catalytique p110 $\delta$  et une sous-unité inhibitrice p85, permet la transduction du signal provenant de récepteurs de cytokines, des TLRs, du BCR et du TCR.<sup>293</sup> A l'état basal, la formation de ce complexe permet de maintenir p110 $\delta$  sous forme inactive mais également de protéger p110 $\delta$  de la dégradation et de provoquer son recrutement à la membrane plasmique en cas d'activation de la voie.<sup>158</sup> Ce n'est que lorsque la sous-unité p85 rencontre l'un de ses ligands, par association directe avec les récepteurs activés ou par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice, que la liaison p85-p110 $\delta$  est perdue, permettant ainsi à p110 $\delta$  de phosphoryler les phosphoinositides PI(4,5)P<sub>2</sub> en PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (PIP<sub>3</sub>). La formation de PIP<sub>3</sub> à la membrane va servir de point d'ancrage aux protéines contenant des domaines d'homologie pleckstrin (PH) telles qu'AKT à la membrane

cellulaire, permettant ensuite leur activation. Parmi les protéines régulatrices de cette voie, on retrouve notamment la protéine PTEN, une phosphatase capable de reconverter  $PIP_3$  en  $PI(4,5)P_2$  (Figure 22).

**Figure 22 : Schéma d'activation de la voie PI3K – Adapté de Burke & Williams, 2014.** Un ligand va induire l'activation d'un récepteur membranaire tels que le BCR, CD19 ou les récepteurs de tyrosine kinase. La phosphorylation de ce récepteur après activation va permettre la liaison de p85 au récepteur. Cette liaison détache p85 et p110, permettant à p110 de réaliser son activité de phosphorylation de PIP2 en PIP3 permettant l'induction de la voie PI3K. PTEN, agit comme un répresseur de la voie en déphosphorylant PIP3.

## B / Structure de p110 $\delta$ et p85 $\beta$ et inhibition du complexe PI3K $\delta$

p110 $\delta$  est une protéine kinase constituée : d'un domaine de liaison adaptateur (ABD) permettant la liaison à p85, un domaine de liaison à Ras (RBD), un domaine C2 qui permet de lier les membranes, un domaine hélicale de fonction encore inconnue et un domaine kinase séparé en un lobe N-terminal et un lobe C-terminal. La protéine régulatrice p85 quant à elle, dispose de trois domaines SH2 capable de créer des liaisons avec p110 $\delta$  ou ses ligands activateurs : un N-terminal nommé nSH2, un C-terminal nommé cSH2 et un domaine intermédiaire entouré par les deux premiers nommé iSH2. Elle présente également un domaine SH3 ainsi qu'un domaine BH entouré par deux régions riches en prolines.

L'ensemble de ces domaines sont nécessaires à la régulation de p110 $\delta$  et donc à l'activation de la voie PI3K. Tout d'abord, le domaine ABD et le domaine iSH2 forment la principale liaison reliant p110 $\delta$  à p85. A partir de cette première liaison, trois types de liaisons inactivatrices vont se former : (1) le domaine nSH2 de p85 va interagir avec les domaines C2, le domaine hélicale et le lobe C-terminal du domaine kinase ; (2) le domaine iSH2 de p85 va également interagir avec le domaine C2 ; (3) le domaine cSH2 va contribuer à l'inhibition par liaison avec le lobe C-terminal du domaine kinase. Ces diverses liaisons participent chacune à l'inhibition de p110 $\delta$ , mais peuvent être désengagées grâce à la liaison de p85 à des tyrosines phosphorylées présentes sur les récepteurs ou les protéines adaptatrices capables d'activer la voie PI3K. La liaison des domaines SH2 de p85 à ces activateurs va permettre de déstabiliser ces diverses liaisons inhibitrices, permettant à p110 $\delta$  de recouvrer son activité catalytique (Figure 23).<sup>292</sup>

## C / PI3K $\delta$ dans l'immunité

### 1. Exemples de fonctions immunitaires de PI3K $\delta$

PI3K $\delta$  présente des activités variées allant du développement et du maintien de la fonction des lymphocytes à la capacité à générer des opposées pro ou anti-inflammatoires dans les cellules de la lignée myéloïde. Par exemple, le développement des LB dans la moelle osseuse semble se dérouler normalement chez des souris déficientes en p85 $\alpha$  et p110 $\delta$ . Une fois que les LB immatures quittent la moelle osseuse, ils se différencient en trois sous-types de LB transitionnels différents : les LB folliculaires (LB<sub>FO</sub>) observés dans les follicules de la rate et les ganglions lymphatiques, les LB de la zone marginale (LB<sub>MZ</sub>) retrouvés dans la zone susmentionnée de la rate et les LB<sub>1</sub> qui colonisent les cavités péritonéales et pleurales. Or, les LB<sub>FO</sub> sont observables en nombre réduit tandis que les LB<sub>1</sub> péritonéaux et les LB<sub>MZ</sub> de la rate sont presque absents chez les souris p85 $\alpha$  et p110 $\delta$  KO. De plus, la voie PI3K fut montrée comme requise pour la survie des LB immatures et matures.<sup>294-299</sup> En conséquence, une étude a permis de démontrer à la fois l'existence d'une fonction redondante de p110 $\alpha$  et p110 $\delta$  pour le développement des LB dans la moelle osseuse mais également que l'absence de certains types de LB transitionnels proviendrait d'un défaut dans la transduction du signal antigène-dépendante du BCR, ce défaut étant lié à une absence de p110 $\delta$ . p110 $\delta$  est donc fonctionnel mais remplaçable pour l'activation dite « tonique » antigène indépendante du BCR chez les LB immatures ; tandis que son activité est essentielle pour la signalisation du BCR une fois le stade de LB transitionnel atteint.<sup>300</sup>

Du côté des LT, l'absence de p110 $\delta$  dans des modèles murins provoque une déficience de la prolifération et de la différenciation des LT en réponse à un antigène qui ne pouvait être corrigée par l'ajout de cytokines exogènes.<sup>301</sup> De plus, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de p110 $\delta$  provoque la perte de l'activation soutenue de p110 $\delta$  qui s'avère être nécessaire pour la production d'IFN $\gamma$ .<sup>302</sup> Enfin, l'utilisation d'une souris présentant une mutation ponctuelle de p110 $\delta$  supprimant son activité kinase a montré une diminution de la capacité suppressive des

T<sub>reg</sub>, confirmant son rôle dans l'induction ou la répression d'un facteur encore non identifié participant à cette fonction.<sup>303</sup>

Plusieurs observations de la fonction de PI3K $\delta$  ont également été rapportées dans la lignée myéloïdes, notamment chez les neutrophiles, les macrophages et les DC. Dans les neutrophiles, une gestion fine et précise de la génération de ROS est nécessaire pour permettre la dégradation des pathogènes et la migration des neutrophiles sans causer de dégâts à la cellule elle-même. La génération des ROS par les neutrophiles est dépendante d'un processus en deux étapes médié par la reconnaissance d'un signal inflammatoire induit par TNF- $\alpha$  et la reconnaissance d'un pathogène. Ces deux étapes induisent des signaux cellulaires dépendants de la voie PI3K. Une étude a alors démontré grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des divers isoformes de PI3K que la production de ROS chez les neutrophiles humains était dépendante de l'activation de PI3K $\delta$  en réponse à un pré-traitement inflammatoire par TNF- $\alpha$ . Cette étape de « priming » des neutrophiles, essentielle à la production de ROS, est fortement inhibée par la présence d'un inhibiteur de p110 $\delta$ . Le signal induit par les motifs pathogéniques serait en revanche induit par p110 $\gamma$ .<sup>304</sup> De plus, la voie PI3K semble affecter les capacités de migration des neutrophiles. En effet, l'accumulation de PIP3 à un endroit particulier de la cellule génère un signal directionnel nécessaire pour la locomotion des neutrophiles. La déplétion ou la surexpression des PI3K de classe I peut donc affecter le processus de migration.<sup>305,306</sup> Or, il apparaît qu'avec l'âge, la capacité migratoire des neutrophiles est altérée, avec une diminution de leur chimiotaxie. L'analyse des neutrophiles démontre la présence d'une activité accrue des voies PI3K $\gamma$  et PI3K $\delta$  qui corrèle avec le défaut de migration, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces deux voies permettant de corriger la fonction migratoire des neutrophiles.<sup>307</sup>

Un phénomène similaire est observé chez les macrophages vis-à-vis de l'augmentation de l'expression de PI3K $\delta$  chez des sujets âgés. Dans les macrophages de souris âgées, l'activité de la voie PI3K est augmentée après stimulation par TLR2 et TLR4 comparé à des souris jeunes. Cette activité augmentée provoque une réponse anti-inflammatoire par la sécrétion d'IL10 et la régulation négative de cytokines pro-inflammatoires. Ce phénomène est partiellement corrigé par l'utilisation d'inhibiteurs des PI3K de classe I.<sup>308</sup> De façon analogue, le même inhibiteur est également capable de diminuer la production d'IL10 induite par activation de PI3K via TLR3

chez des macrophages infectés par BCG (Bacille de Calmette-Guérin ou *Mycobacterium bovis*).<sup>309</sup>

Dans les DC, l'activité de p110 $\delta$  permet de gérer la réponse de TLR4 au LPS. En effet, TLR4 peut reconnaître le LPS à la membrane plasmique et transduire un signal pro-inflammatoire par ses partenaires TIRAP et MyD88. En revanche, lorsque TLR4 est activé dans les endosomes, c'est une réponse anti-inflammatoire qui est induite par association avec TRAM et TRIF. L'activité de p110 $\delta$  est nécessaire pour induire l'internalisation de TLR4 ainsi que la dissociation et dégradation de TIRAP stoppant ainsi les signaux inflammatoires et permettant à TRAM-TRIF de gérer l'induction d'IL10 et d'IFN $\beta$ .<sup>310</sup> Enfin, les inhibiteurs de p110 $\delta$  ont mis à jour son rôle dans la translocation nucléaire d'IRF7 nécessaire à la production d'IFN de type I par les pDC.<sup>311</sup>

Ces quelques exemples démontrent le rôle joué par p110 $\delta$  et la voie PI3K dans l'immunité. La capacité de cette voie à jouer des rôles à la fois pour et contre l'inflammation la place comme un candidat important dans le développement des maladies auto-immunes ou au contraire celui des immunodéficiences.

## 2. PI3K et le LES

L'association entre la voie PI3K et l'immunodéficiences a déjà été abordée dans le chapitre 3b avec l'APDS, où des patients atteints de ce syndrome présentaient des mutations activatrices de p110 $\delta$  et p85 $\alpha$  provoquant une immunodéficiences. Si à l'heure actuelle, aucun article n'a présenté l'existence de mutations d'un membre de la voie PI3K induisant un LES, la voie PI3K n'est pas négligée dans l'étude de cette maladie auto-immune. En effet, une attention toute particulière est accordée à p110 $\delta$  et p110 $\gamma$  dans l'étude du LES.

Chez des patients lupiques, la voie PI3K est fréquemment activée dans les PBMC, notamment dans les phases actives de la maladie. PI3K $\delta$  en particulier est activé dans les LT périphériques et son activité corrèle avec l'accumulation de T effecteurs et mémoires. Ces même cellules montrent une AICD diminuée (activation-induced cell death) qui peut être

corrigée par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de p110 $\delta$  mais pas de p110 $\gamma$ , montrant l'importance de la voie PI3K dans le maintien de la tolérance.<sup>312</sup>

Les modèles murins sont également fréquemment utilisés afin de tester les inhibiteurs de PI3K. Dans le modèle de souris lupique BXSB, l'utilisation d'un inhibiteur de PI3K $\delta$  diminue la protéinurie et améliore la fonction rénale, améliorant la survie des souris. Cette amélioration corrèle avec une présence diminuée de dépôts d'anticorps auto-immuns et de protéines du complément dans les reins.<sup>313</sup> Des observations similaires ont été faites dans le modèle MRL/lpr avec utilisation d'un inhibiteur spécifique de PI3K $\gamma$  : l'utilisation de cet inhibiteur empêche la perte de poids des souris, prolonge leur durée de vie, diminue leur niveau d'auto-anticorps anti-ADN ainsi que leur protéinurie.<sup>314</sup> Enfin, dans ce même modèle, une analyse plus poussée a montré que l'inhibition de p110 $\delta$  permet de réduire le nombre excessif de B et de T activés et mémoires, ainsi que les niveaux de TNF- $\alpha$  et d'infiltration des macrophages dans les reins.<sup>315</sup> Ces premières études confirment l'implication de la voie PI3K dans le LES, montrant la présence d'une activation accrue de la voie et une implication de p110 $\delta$  et p110 $\gamma$ . Notre protéine d'intérêt, p85 $\beta$ , étant un inhibiteur naturel de la voie par liaison directe à p110 $\delta$ , une diminution de son expression ou de son activité pourrait induire une sur-activation de la voie semblable à celle observée dans les patients et souris lupiques, participant donc à la pathogénèse de la maladie dans la famille B.

# Matériel et Méthodes

## *In silico Analysis*

*In silico* have been done on the following websites :

HOPE	<a href="http://www.cmbi.ru.nl/hope/input/#">http://www.cmbi.ru.nl/hope/input/#</a>
SIFT	<a href="https://sift.bii.a-star.edu.sg/www/SIFT_seq_submit2.html">https://sift.bii.a-star.edu.sg/www/SIFT_seq_submit2.html</a>
Polyphen	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/</a>
CADD Score	<a href="https://cadd.gs.washington.edu/score">https://cadd.gs.washington.edu/score</a>
M-FOLD	<a href="http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form">http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form</a>

## *Mutant IRE1 $\alpha$ transphosphorylation and RNase activity tests*

These tests were realized thanks to a collaboration with the team of Dr. Franck Sicheri from the Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute. Transphosphorylation assay has been measured through the incorporation of radioactive phosphate on a yeast-kinase-dead mutant of Ire1p (yIRE1). A radiography has been done after the migration of proteins on a SDS-Page gel. The incorporation of radioactive phosphate has been processed with various murine versions of IRE1a either WT or carrying a mutation on the 594 residue (mIRE1). Signals from the upper part comes from autophosphorylation of mIRE1 while signals from the lower part are from the transphosphorylation of yIRE1 by mIRE1.

IRE1 RNase activity test has been realized on a substrate RNA carrying the same stem-loop sequence present on XBP1 mRNA. 5' and 3' end were modified with the addition of Alexa Fluor 647 or Black Hole Quencher 3 respectively. Tested IRE1 orthologues were activated in vitro and the fluorescence signals were measured.

## *Cell lines*

B-EBV cell lines were created from PBMC isolated from patient's blood conserved on heparine tubes. They were immortalized in Imagine Institute CRB laboratory (Biological Ressources Center). B-EBV were kept between 0.5 and  $1 \times 10^6$  cells /mL in RPMI (Gibco)

completed with 10% of FBS (Gibco) and 1% of Pen/Strep (Gibco). Cells were kept in culture at 37°C with 5% of CO<sub>2</sub>.

*ERN1* KO B-EBV cell line was generated by using the lentiCRISPR-pXPR\_001 plasmid developed by the Zhang Team (Addgene plasmid # 52961 ; <http://n2t.net/addgene:52961> ; RRID:Addgene\_52961). The guide sequence was designed to target the exon 2 of *ERN1* with the online software [crispr.mit.edu](http://crispr.mit.edu) (<http://crispr.mit.edu>). The guide sequence and the primers used to insert it in the plasmid are written below :

Guide sequence <i>ERN1</i> Exon 2	5' - GATGGCAGCCTGTATACGCT - 3'
Forward primer	5' - CACCGGATGGCAGCCTGTATACGCT - 3'
Reverse primer	5' - AAACAGCGTATACAGGCTGCCATCC - 3'

The lentiviral plasmid has been sent to the VVTG platform (Viral vectors and gene transfer) of the SFR Necker in order to be incorporated in lentiviruses. The plasmid was transduced in control B-EBV at 10, 20 and 40 MOI (Multiplicity of Infection). Cells were kept under treatment with puromycin at 1µg/mL for two weeks. Cellular cloning was performed in 96 well plate in 100µL with three different dilutions at 0.015, 0.15 and 1.5 cells/mL in RPMI with 20% of FBS, 1% Pen/Strep and 1% of Fungizone (Eurobio). Isolated clones were sequenced and an homozygous mutant KO for *ERN1* was confirmed by Western Blot.

### ***ER stress induction and transcription inhibition***

B-EBV were plated at 1x10<sup>6</sup> cells/mL and kept in culture for 24H before stimulation. Stimulation were performed for various timepoints with 1 or 5µg/mL of tunicamycin (TOCRIS Biosciences) or with 1µg/mL of Actinomycin D (Sigma).

### ***Sequencing***

Sequencing were performed on DNA or cDNA after amplification of the region of interest by PCR. Sequencing reaction was performed according to the manufacturer with BigDye Terminator v3.1 Cycle (Applied Biosystem). Sequences were read on a 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Used primers are listed below :

<i>ERN1</i> Exon 2 Genomic	Forward	5' - GCCCATGGATTATTTTCAGAAT - 3'
	Reverse	5' - AAAACGTGCTTCTTTAACTGATG - 3'
<i>ERN1</i> Exon 15 Genomic	Forward	5' - CAGTGACCTAGACGCATGGA - 3'
	Reverse	5' - GGGGGACCACCCTGTTACAA - 3'
<i>ERN1</i> Exon 15 cDNA	Forward	5' - GTCTGGCCCGTACTCAGAGA - 3'
	Reverse	5' - GAGCGATCCAGCCTTCTGT - 3'
PIK3R2 Exon 2 Genomic	Forward	5' - AATGGTGGACCCAGTGACGA - 3'
	Reverse	5' - TTGGAGATCCCATTGCCTCAC - 3'

### **Western Blots**

Proteins were extracted with a mix of RIPA Buffer (Thermo Fisher), proteases and phosphatases inhibitors (Sigma) following manufacturer instructions. Western Blot were done on NuPage and Bolt gels (Thermo Fisher). PERK Western Blot were specifically performed on 8% Bolt Gels to achieve a good migration. Protein transfer were performed with iBlot2 on nitrocellulose or PVDF membrane for ER stress proteins and extrinsic apoptosis pathways respectively. Revelations were performed either with Odyssey CLx (Licor) or Chemidoc (Biorad) for nitrocellulose or PVDF membrane respectively. Separation of cytoplasmic and nucleic proteins were performed with the NE-PER kit (Thermo Fisher). Western Blot antibodies are listed below :

<b>Protein of interest</b>	<b>Clone / Reference</b>	<b>Manufacturer</b>
IRE1 $\alpha$	14C10 / #3294	Cell Signalling
$\beta$ -Actin	AC-15 / #AM4302	Thermo Fisher
XBP1s	143F / #647501	BioLegend
Laminin A/C	4C11 / #4777	Cell Signalling
$\alpha$ -Tubulin	#2144	Cell Signalling
PERK	C33E10 / #3192	Cell Signalling
Ku70	E-5 / sc-17789	Santa Cruz
AKT (Pan)	40D4 / #2920	Cell Signalling
Phospho-AKT (Ser473)	D9E / #4060	Cell Signalling
Caspase-8	1C12 / #9746	Cell Signalling
FLIP	D16A8 / #8510	Cell Signalling
Caspase-3	8G10 / #9665	Cell Signalling
Goat Anti-Mouse 680RD	926-68070	Li-Cor
Goat Anti-Rabbit 680RD	926-68071	Li-Cor
Goat Anti-Mouse 800CW	926-32210	Li-Cor

Goat Anti-Rabbit 800CW	926-32211	Li-Cor
m-IgGk BP-HRP	Sc-516102	Santa Cruz
Mouse anti-rabbit IgG-HRP	Sc-2357	Santa Cruz

### ***RNA extraction, retrotranscription and qPCR***

RNA extractions were performed with the RNeasy Mini Kit (QIAGEN). cDNA was synthesised with Quantitect Reverse Transcription kit (QIAGEN) after mRNA quantification on NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. cDNA were amplified by qPCR with SYBR Green or TaqMan buffer (Applied biosystems). qPCR were performed on a Viia7 (Applied Biosystems). Primers are listed below :

<b>SYBR Green</b>		
<i>Gene</i>	<i>Direction</i>	<i>Sequence</i>
XBP1s	Forward	5' – TGCTGAGTCCGCAGCAGGTG – 3'
	Reverse	5' – GCTGGCAGGCTCTGGGGAAG – 3'
XBP1u	Forward	5' – CAGACTACGTGCACCTCTGC – 3'
	Reverse	5' – CCAGAATGCCCAACAGGATA – 3'
ERN1	Forward	5' – GACGACGTGGACTACAAGATGT – 3'
	Reverse	5' – CCTTGGGGAACGGGTACTTC – 3'
EDEM1	Forward	5' – CAAGTGTGGGTACGCCACG – 3'
	Reverse	5' – AAAGAAGCTCTCCATCCGGTC – 3'
DNAJB9	Forward	5' – AAAATAAGAGCCCGGATGCT – 3'
	Reverse	5' – AAGCACTGTGTCCAAGTGTATCA – 3'
DNAJC3	Forward	5' – TCCACTTGGAGAGCACGAC – 3'
	Reverse	5' – AAATGCAAACAAGCCTCTGG – 3'
TNF $\alpha$	Forward	5' – TGCTTGTTCCCTCAGCCTCTT – 3'
	Reverse	5' – GGTTTGCTACAACATGGGCT – 3'
IFN $\beta$	Forward	5' – CAGCAATTTTCAGTGTGAGAAGC – 3'
	Reverse	5' – TCATCCTGTCCTTGAGGCAGT – 3'
IL6	Forward	5' – CCACTCACCTCTTCAGAACG – 3'
	Reverse	5' – AGTGCCTCTTTGCTGCTTTC – 3'
Caspase-3 <i>Clivage site n°2</i>	Forward	5' –TGTATGCCAAGTGAGAAGATGGT– 3'
	Reverse	5' –ACCTGACTGGAAGTTTGAGGT– 3'
<b>TAQMAN</b>		
<i>Gene</i>	<i>Thermo Fisher Reference</i>	<i>Primer Reference</i>
IFI44L	4331182	Hs00915292_m1
IFIT1	4331182	Hs01911452_s1
IFI27	4331182	Hs01086370_m1
RSAD2	4331182	Hs00369813_m1
SIGLEC1	4331182	Hs00988063_m1
ISG15	4331182	Hs03929097_s1

XBP1 ratio is calculated as following :  $(RQ^{XBP1s} / (RQ^{XBP1s} + RQ^{XBP1u})) * 100$ . RQ are calculated by using the  $\Delta C_T$  method :  $\Delta C_T = C_T \text{ target gene} - C_T \text{ housekeeping gene}$ .  $\Delta \Delta C_T = \Delta C_T \text{ sample} - \Delta C_T \text{ reference sample}$ .  $RQ = 2^{-\Delta \Delta C_T}$ . The reference used for the calculation of the  $\Delta \Delta C_T$  is noted on the Y axis of each qPCR, usually the control of the same condition. For the XBP1 ratio, the  $\Delta C_T$  reference sample is the unstimulated sample of the same cell line. The IFN score is calculated by performing the mean of the RQ from all the genes tested.  $\Delta C_T$  reference sample is the equivalent negative control sample.

## ***ELISA***

IL6 ELISA was performed with the Human IL6 High Sensitivity kit from Invitrogen. Tests were performed on patient's plasma.

## ***IRE1 $\alpha$ overexpression***

Plasmid pCDH-CMV-MCS-EF1-CopGFP-T2A-Puro containing *ERN1* cDNA was a gift from Dr Eric Chevet. Directed mutagenesis was performed with Q5 Site-directed mutagenesis Kit (NEB) to introduce the c.1780C>T mutation. Primers used to introduce the mutation are listed below :

Forward Primer	5' - GGCATGTTTGACAACACTGCGACGTGGCCGT - 3'
Reverse Primer	5' - ACGGCCACGTCGCAGTGGTCAAACATGCC - 3'

Transitory transfection of the different versions of the plasmid were performed in HEK293 control cell line with lipofectamine 2000 (Invitrogen). Transfection rates were confirmed with GFP induction by flow cytometry. Proteins were extracted and revealed as stated previously.

## ***Apoptosis Assay and membrane labelling***

A Ficoll is performed to remove dead cells from B-EBV cell culture with a Lymphocyte separation medium (Eurobio) 48H before the assay. 200 000 cells are plated in triplicates in 200uL in a 96 well plate and let in culture 24H. The next day, stimulation are performed by

removing 100uL of media and adding 100uL of media combined with following apoptosis inducers : staurosporine 0.5ng/mL (Invitrogen), etoposide 40uM (Merck), Cycloheximine 1ug/mL (Sigma), Trail Killer 1000ng/mL (COGER), Ramig 10ug/mL (Interchim), Apo1.3 100ng/mL (COGER). FASL is coming from the supernatant of murine neuronal cells culture. These cells are transfected in order to express murine FAS-L protein on vesicles, able to induce human FAS receptor. Each batch of FASL is tested beforehand on control cells. 100uL of FASL supernatant was used to induce the apoptosis. Apoptosis was measured by flow cytometry on a Fortessa X-20 (BD Biosciences) with Annexin V FITC (Miltenyi) and Propidium Iodide. Antibodies used for membrane receptors expression analysis are listed below :

CD19-FITC	HIB19 / #555412	BD Biosciences
CD95-Pacific Blue	DX2 / #2128095	Sony
DR4-PE	DJR1 / #2136025	Sony
DR5-APC	DJR2-4 / #2137035	Sony
Iso-FITC	MOPC-21 / #2600550	Sony
Iso-PacificBlue	MHK-49 / #2182615	Sony
Iso-PE	MOPC-21 / #551436	BD Biosciences
Iso-APC	MOPC-21 / #550854	BD Biosciences

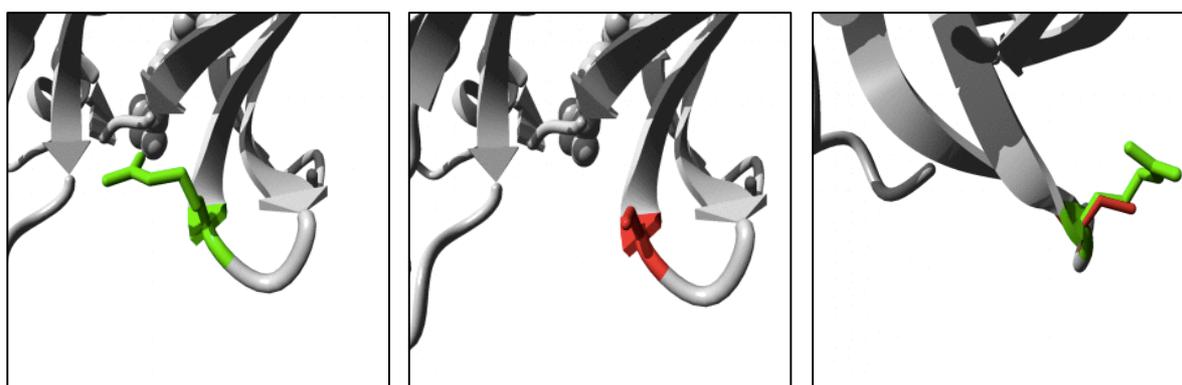
### *Statistical tests*

Bilateral Student t-test paired or impaired were used. Significance threshold are the following : \* < 5% ; \*\* < 1% ; \*\*\* < 0.1%.

# Résultats

## Partie I : Analyse fonctionnelle et moléculaire d'IRE1 $\alpha$

IRE1 $\alpha$  est une protéine transmembranaire possédant une activité kinase et une activité RNase. Des mutations d'*ERN1* pourraient donc avoir un impact sur l'une ou l'autre de ces activités. Une analyse *in silico* a été réalisée avec le logiciel en ligne HOPE afin de pouvoir poser une première hypothèse sur l'effet du variant p.R594C sur la protéine. Cette méthode permet d'analyser les conséquences structurelles d'une mutation sur une protéine d'intérêt.<sup>316</sup> Les résultats de l'analyse sont présentés ci-dessous :



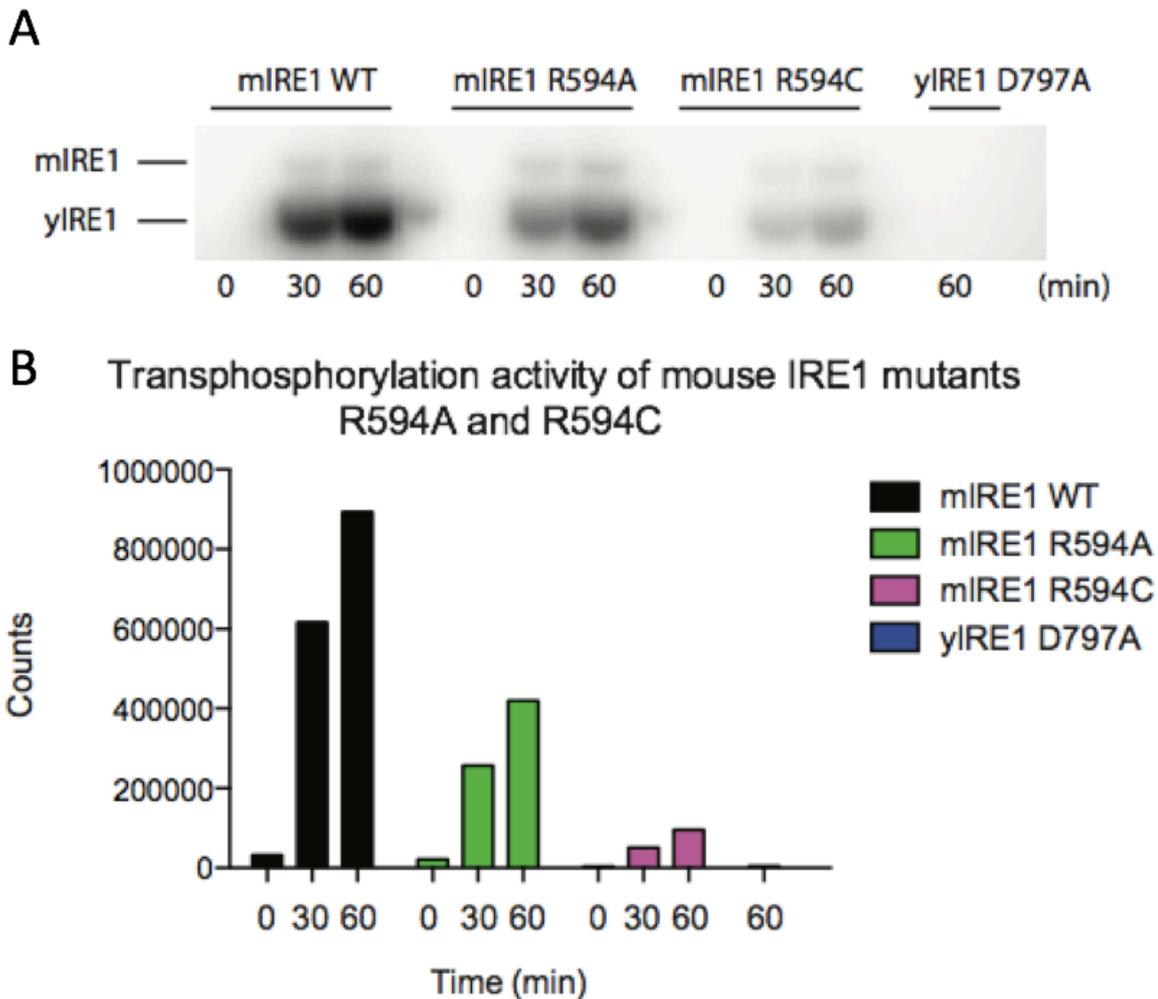
**Figure 24 : Images de la structure 3D d'IRE1 $\alpha$  centrée sur l'acide aminé 594. Panel gauche :** Représentation (en vert) de l'arginine présente dans la protéine WT. L'arginine possède une longue chaîne latérale ainsi qu'une charge électrique positive. **Panel central :** Représentation (en rouge) de la cystéine présente dans la protéine mutée. La cystéine possède une chaîne latérale courte ainsi qu'une charge électrique neutre. Elle est également plus hydrophobique que l'arginine et aura ainsi tendance à s'orienter vers l'intérieur de la protéine. **Panel droit :** Représentation superposée des deux acides aminés. *Images obtenues sur HOPE.*

Allèle	WT	R594C
Taille du résidu	Grand	Petit
Charge électrique	Positive	Neutre
Hydrophobicité	-	Plus hydrophobique
Interactions internes	Pont salin avec D592, D593, Q643	Perte d'interactions ioniques
Domaine touché	Protéine kinase, liaison à l'ATP.	
Conservation du résidu	Résidu très conservé	-
Prédiction	-	Probablement délétère

**Tableau 5 : Résumé des résultats d'analyse de HOPE.** L'analyse *in silico* par HOPE permet de juger de l'effet d'une mutation en comparant les modifications physico-chimique induites par le variant ainsi qu'en vérifiant le domaine dans lequel se trouve le résidu impacté et le degré de conservation de celui-ci dans l'évolution. HOPE prédit un effet délétère de la mutation sur la fonction kinase d'IRE1 $\alpha$  et la capacité à lier un groupement phosphate du domaine dans lequel se trouve la mutation.

La substitution de l'arginine en cystéine provoque des changements chimiques induisant une perte d'interaction ionique avec trois autres résidus de la protéine. Les deux premiers, D592 et D593, voisins de R594, sont proches d'un site de phosphorylation en position 599. Le troisième, Q643, est également un site de phosphorylation d'IRE1 $\alpha$ .<sup>317</sup> Le résidu étant conservé à travers les espèces<sup>318</sup>, il est probable que la mutation R594C provoque une perturbation de la phosphorylation d'IRE1 $\alpha$ . Une absence ou un changement dans la capacité d'IRE1 $\alpha$  à être phosphorylé sur ces résidus pourrait induire une modification de son activité. En effet, la mutation K599A d'IRE1 $\alpha$  a déjà été identifiée comme provoquant un défaut d'activité kinase et RNase dans la protéine.<sup>319</sup> De plus, bien que la phosphorylation d'IRE1 $\alpha$  ait un effet régulateur encore partiellement décrit sur l'activité de la protéine, plusieurs études ont souligné son aspect critique pour la fonction d'IRE1 $\alpha$ .<sup>227,233-236</sup>

Afin de déterminer l'impact de la mutation sur les activités kinase et RNase d'IRE1 $\alpha$ , des tests de transphosphorylation et de clivage d'ARN ont été réalisés à partir de versions mutées d'IRE1. Dans l'expérience de transphosphorylation, la protéine yIRE1<sup>D797A</sup>, forme mutée d'IRE1 de levure dépourvue de toute activité kinase et donc incapable de s'auto-phosphoryler, est mise en contact *in vitro* avec différentes formes d'IRE1. Après activation de la protéine, l'incorporation par yIRE1<sup>D797A</sup> de phosphate radioactif est observée afin de déterminer la capacité de la forme d'IRE1 testée à réaliser la transphosphorylation. Les résultats montrent que la forme murine WT d'IRE1 $\alpha$  est capable de phosphoryler yIRE1<sup>D797A</sup>. En revanche, les formes mutées de mIRE1 sur le résidu 594 perdent fortement en efficacité comparé au WT, montrant que ce résidu est important pour l'activité de transphosphorylation d'IRE1 $\alpha$ . Le contrôle négatif confirme que le mutant yIRE1<sup>D797A</sup> est incapable de se transphosphoryler puisqu'aucun signal radioactif n'est détecté (Figure 25A et 25B).

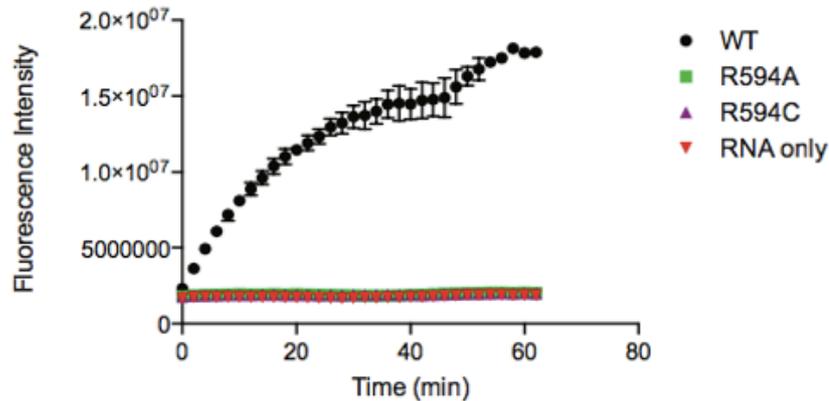


**Figure 25 : Test de la capacité d'IRE1 à réaliser une transphosphorylation. (A)** Radiographie d'un gel SDS-Page montrant l'incorporation de phosphate radioactif sur yIRE1<sup>D797A</sup>. La bande du dessus correspond à l'auto-phosphorylation de la version d'IRE1 testée. La bande du dessous correspond à la transphosphorylation de yIRE1<sup>D797A</sup>. **(B)** Quantification du signal radioactif de transphosphorylation de yIRE1<sup>D797A</sup> par les différentes formes testées d'IRE1. Résultats obtenus par collaboration avec l'équipe de Franck Sicheri de l'Université de Toronto.

L'expérience de clivage d'ARN s'appuie sur la capacité d'IRE1 $\alpha$  à cliver les ARN comprenant la séquence consensus CU<sup>(A/C)</sup>GCA<sup>(C)</sup>G<sup>(A)</sup> présente au bout d'une structure en tige-boucle (Figure 26A).<sup>192,320</sup> Afin de tester l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$ , un ARN substrat contenant la structure en tige-boucle et la séquence consensus reconnue par IRE1 $\alpha$  est modifié en 5' et en 3' par l'ajout d'une sonde fluorescente et d'un quencher empêchant l'émission du signal lumineux. Les formes murines d'IRE1 WT et mutées ainsi que le substrat sont ensuite exprimées dans la levure afin de déterminer si le substrat est clivable ou non par la protéine. Lorsque l'ARNm substrat est clivé, la séparation de la molécule fluorescente en 5' et du quencher en 3' permet l'observation d'un signal lumineux. On observe alors que seule la forme WT de mIRE1 est capable d'induire l'activité RNase avec clivage de l'ARNm substrat. Les

mutants R584A et R594C ne montrent aucune intensité de fluorescence comparé au contrôle négatif (Figure 26B).

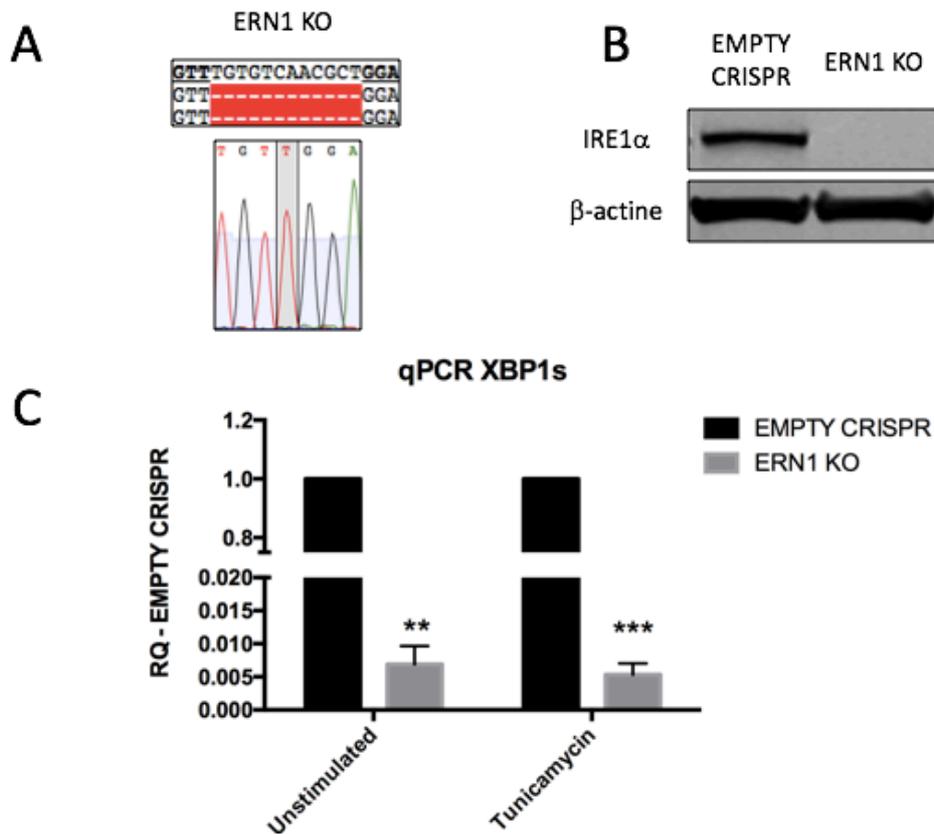
### B Mouse IRE1 mutants R594A and R594C Ribonuclease Activity



**Figure 26 : Test de l'activité RNase d'IRE1. (A)** Schéma représentant la structure en tige-boucle et la séquence reconnue par l'activité RNase d'IRE1. Un premier exemple est illustré avec l'ARN de XBP1 qui possède deux de ces régions afin d'exciser les 26 nucléotides nécessaires à la formation de l'ARNm de XBP1s. Un second exemple est donné avec l'ARNm de la protéine SPARC, une cible identifiée de l'activité RIDD d'IRE1. *D'après Maurel & al 2014.* **(B)** Quantification de la fluorescence observée après activation des différentes formes d'IRE1 en contact avec un substrat ARN clivable. *Résultats obtenus par collaboration avec l'équipe de Franck Sicheri de l'Université de Toronto.*

Collectivement, les résultats des analyses *in silico* et *in vitro* soutiennent l'hypothèse d'une mutation délétère induisant une forte diminution la capacité d'IRE1 $\alpha$  à se transphosphoryler ainsi qu'une perte totale de l'activité RNase. Toutefois, le modèle expérimental utilisé dans le test d'activité RNase se rapporte à un cas de mutation homozygote, ce qui n'est pas le cas chez la patiente. Il est possible que la mutation IRE1 $\alpha$  observée induise soit une haplo-insuffisance soit un effet dominant négatif. Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus dans la lignée B-EBV créée à partir des PBMC de la patiente à un cas de perte total de fonction, une lignée KO d'IRE1 $\alpha$  a été générée à l'aide d'un système CRISPR-Cas9 utilisant une séquence guide visant l'exon 2 d'IRE1 $\alpha$ . Le plasmide a été introduit dans les B-EBV par transduction lentivirale afin d'être intégré dans le génome. Après sélection à la puromycine et séparation des clones survivants, un clone KO pour IRE1 $\alpha$  a été identifié. Le clone isolé présente une délétion homozygote de 12 nucléotides de l'exon 2 sans changement de cadre de lecture. La mutation, résidant dans le domaine luminal, induit le changement d'une phénylalanine en leucine ainsi que la délétion de 4 acides aminés (Figure 27A). Un Western Blot utilisant un anticorps spécifique d'IRE1 $\alpha$  a révélé que cette mutation était suffisante pour provoquer une absence totale d'expression de la protéine (Figure 27B). Une qPCR visant

XBP1s a confirmé l'incapacité de la lignée KO IRE1 $\alpha$  à générer la forme épissée d'XBP1 même après induction du stress du RE (Figure 27C).



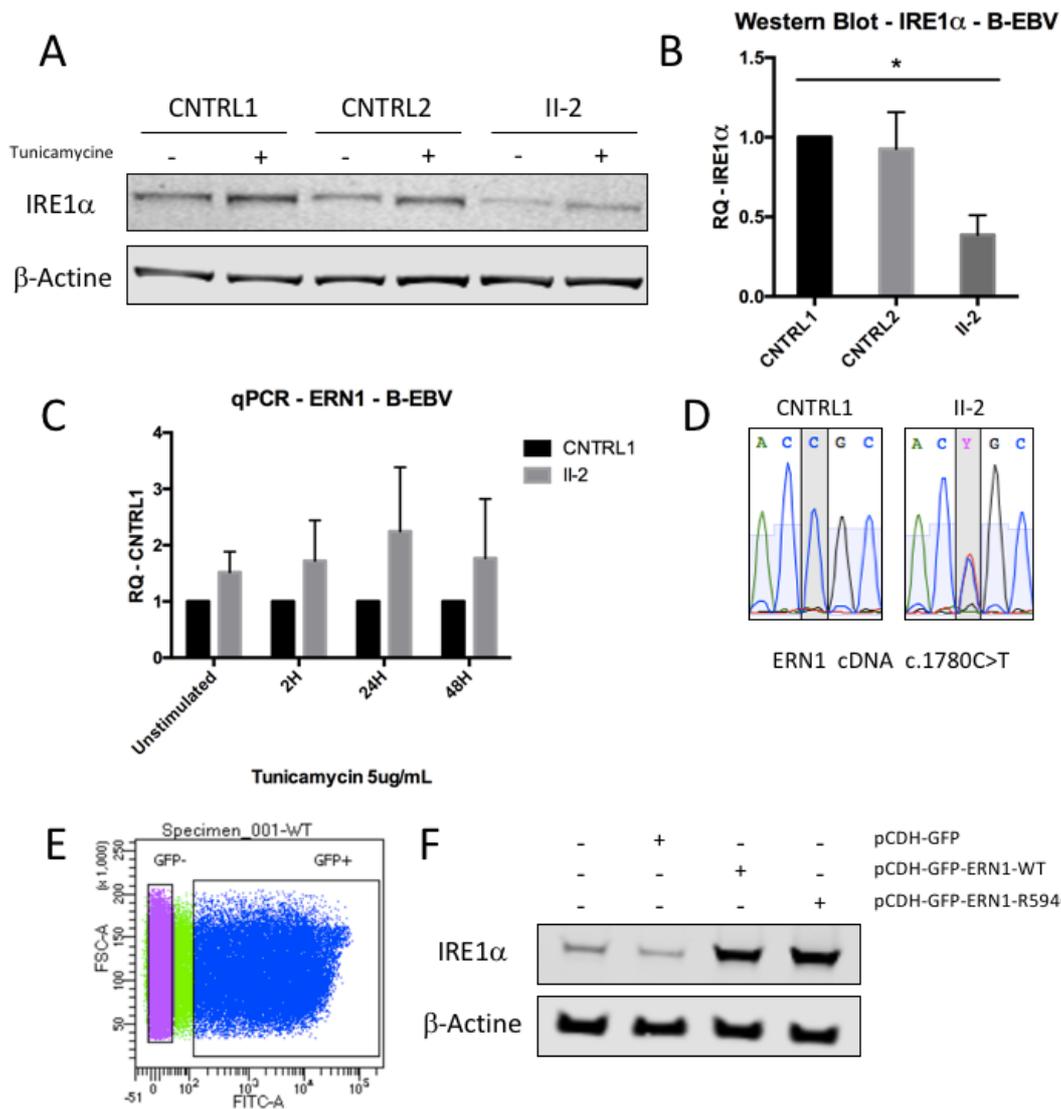
**Figure 27 : Génération d'une lignée B-EBV KO pour IRE1 $\alpha$ .** (A) Séquençage de l'ADN de la lignée KO IRE1 $\alpha$ . Le clone muté présente une délétion homozygote de 12 nucléotides dans l'exon 2 d'IRE1 $\alpha$ . (B) Western Blot révélant la protéine IRE1 $\alpha$ . La lignée KO est comparée avec une lignée transduite avec le vecteur CRISPR-Cas9 vide sans séquence guide (EMPTY CRISPR). (C) qPCR visant l'ARNm de XBP1s après stimulation 24H avec de la tunicamycine à 5 $\mu$ g/mL. La lignée ERN1 KO montre une présence résiduelle d'XBP1s 100 à 200 fois inférieure à la lignée CRISPR vide. L'activité résiduelle peut être dû à un bruit de fond ou un épissage non spécifique d'XBP1. N=3

## Partie II : Analyse de l'expression d'IRE1 $\alpha$

Une analyse de l'expression d'IRE1 $\alpha$  au niveau de l'ARNm et de la protéine a été réalisée afin de déterminer si le variant d'IRE1 $\alpha$  observé chez la patiente induit une haplo-insuffisance ou un effet dominant négatif. Un Western Blot réalisé sur les protéines totales dans des lignées contrôle et la lignée B-EBV de la patiente II-2 montre une diminution de moitié de l'expression d'IRE1 $\alpha$  totale (Figure 28A, B). Une analyse complémentaire de l'ADNc par qPCR et séquençage a ensuite révélé que la lignée II-2 exprimait une quantité similaire d'IRE1 $\alpha$  au niveau transcriptionnel et que l'ARNm de la version mutée d'IRE1 $\alpha$  était bien

exprimé dans la cellule, sans produit d'épissage anormal. Ces premiers résultats suggèrent que la transcription d'IRE1 $\alpha$  n'est pas perturbée chez II-2 et que la diminution de l'expression d'IRE1 $\alpha$  observée pourrait être liée à une instabilité (Figure 28C, D). Afin de confirmer cette hypothèse, la forme WT et la forme mutée d'IRE1 $\alpha$  ont été clonés dans un plasmide sous contrôle d'un promoteur fort et contenant la molécule fluorescente GFP. La construction est transfectée avec de la lipofectamine dans une lignée HEK293 afin de vérifier si la forme mutée d'IRE1 $\alpha$  était bien exprimée dans une autre lignée cellulaire humaine. Une analyse au cytomètre de flux a confirmé une moyenne de transfection d'environ 38% (Figure 28E). Les protéines ont été extraites des cellules non triées et un Western Blot a été réalisé pour révéler l'expression d'IRE1 $\alpha$ . Les résultats montrent une surexpression induite par le plasmide des formes WT et mutée d'IRE1 $\alpha$ , confirmant que la forme mutée est exprimée et stable dans la lignée HEK293 (Figure 28F).

Ces résultats suggèrent que la forme mutée d'IRE1 $\alpha$  observée chez II-2 est probablement exprimée dans la lignée B-EBV. Toutefois, aucun des résultats présentés n'explique la diminution de l'expression protéique d'IRE1 $\alpha$  total observée chez la patiente. Cette diminution pourrait être due à des variations naturelles interlignées comme le suggère l'absence de significativité du test statistique réalisé lors de la comparaison entre la seconde lignée contrôle testée et la lignée II-2. En effet, la variabilité des mesures de quantification ne permet pas de confirmer une différence significative à 5%. L'expérience devra être répétée dans des cellules primaires issues de II-2 afin de vérifier si la diminution observée dans les B-EBVs est due à une variabilité d'expression des différentes lignées ou s'il s'agit d'un phénotype propre à cette lignée en particulier. Les résultats actuels ne nous permettent donc pas de favoriser l'haplo-insuffisance ou l'effet dominant négatif comme modèle pour expliquer l'induction du LES chez la patiente.



**Figure 28 : Analyse de l'expression transcriptionnelle et protéique d'IRE1 $\alpha$  dans des lignées B-EBV. (A)** Western Blot réalisées sur des protéines issues de lignées B-EBV de contrôles et de II-2 avec ou sans induction du stress par la tunicamycine. Les trois lignées réagissent à l'induction du stress par une augmentation faible de l'expression protéique d'IRE1 $\alpha$ . La lignée II-2 semble exprimer une quantité réduite d'IRE1 $\alpha$  par rapport aux contrôles. Traitement à la tunicamycine pendant 8H à 1 $\mu$ g/mL **(B)** Quantification protéique d'IRE1 $\alpha$  réalisée à partir de trois Western Blots indépendants. Les résultats présentent une quantité relative à la lignée contrôle 1. Seule la différence observée entre le contrôle 1 et la lignée II-2 est considéré comme significative selon les tests statistiques. N=3 **(C)** qPCR visant l'expression d'ERN1 dans les B-EBVs avec et sans stimulation du stress du RE à différents temps par la tunicamycine à 5 $\mu$ g/mL. N=3 **(D)** Séquençage des ADNc issus de la rétro-transcription des ARNm extraits des lignées B-EBV contrôle et II-2. Le séquençage vise la mutation ERN1 observée sur l'ADNc. **(E)** Résultat de cytométrie en flux montrant l'apparition de cellules GFP+ positives par stimulation avec le laser FITC après transfection du plasmide pCDH-GFP contenant les différentes formes d'IRE1 $\alpha$  testées. **(F)** Western Blot révélant l'expression de la protéine IRE1 $\alpha$  dans des HEK293 après transfection par le plasmide pCDH-GFP avec ou sans ERN1 exprimé sous promoteur CMV. N=2

## Partie III : Analyse de l'Unfolded Protein Response

IRE1 $\alpha$  est l'inducteur ancestral de l'UPR dans l'évolution. La mutation IRE1 $\alpha$  pourrait donc avoir des conséquences sur le programme transcriptionnel associé à cette voie. Une première analyse par qPCR a été réalisée sur la capacité d'épisser l'ARNm d'XBP1 dans la lignée B-EBV de la patiente II-2. Le ratio d'XBP1s/XBP1 total montre que la patiente est capable d'induire un ratio d'activation similaire à celui d'une lignée contrôle. Toutefois, la régulation temporelle de la voie IRE1 $\alpha$ -XBP1 semble fortement perturbée chez II-2. En effet, chez le contrôle on observe après induction du stress par la tunicamycine une augmentation du ratio dès 2H et jusqu'à 8H après induction. Puis, entre 24H et 32H ce ratio diminue en faveur d'XBP1u, témoignant d'une diminution de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$ . Enfin, 48H après stimulation, le ratio XBP1 retourne à l'équilibre, signe d'un retour du RE à l'homéostasie. Ces variations font écho aux phases décrites par *Woehlbier & Hetz* où la période 2H-8H correspondrait à la phase 2 de réponse adaptative avec une voie IRE1 $\alpha$ -XBP1 active, tandis que la période 24H-32H correspondrait aux phases 3 et 4 de transition avec inhibition d'IRE1 $\alpha$ . Une fois le stress terminé, le ratio d'XBP1 retourne donc à l'état basal.<sup>218</sup>

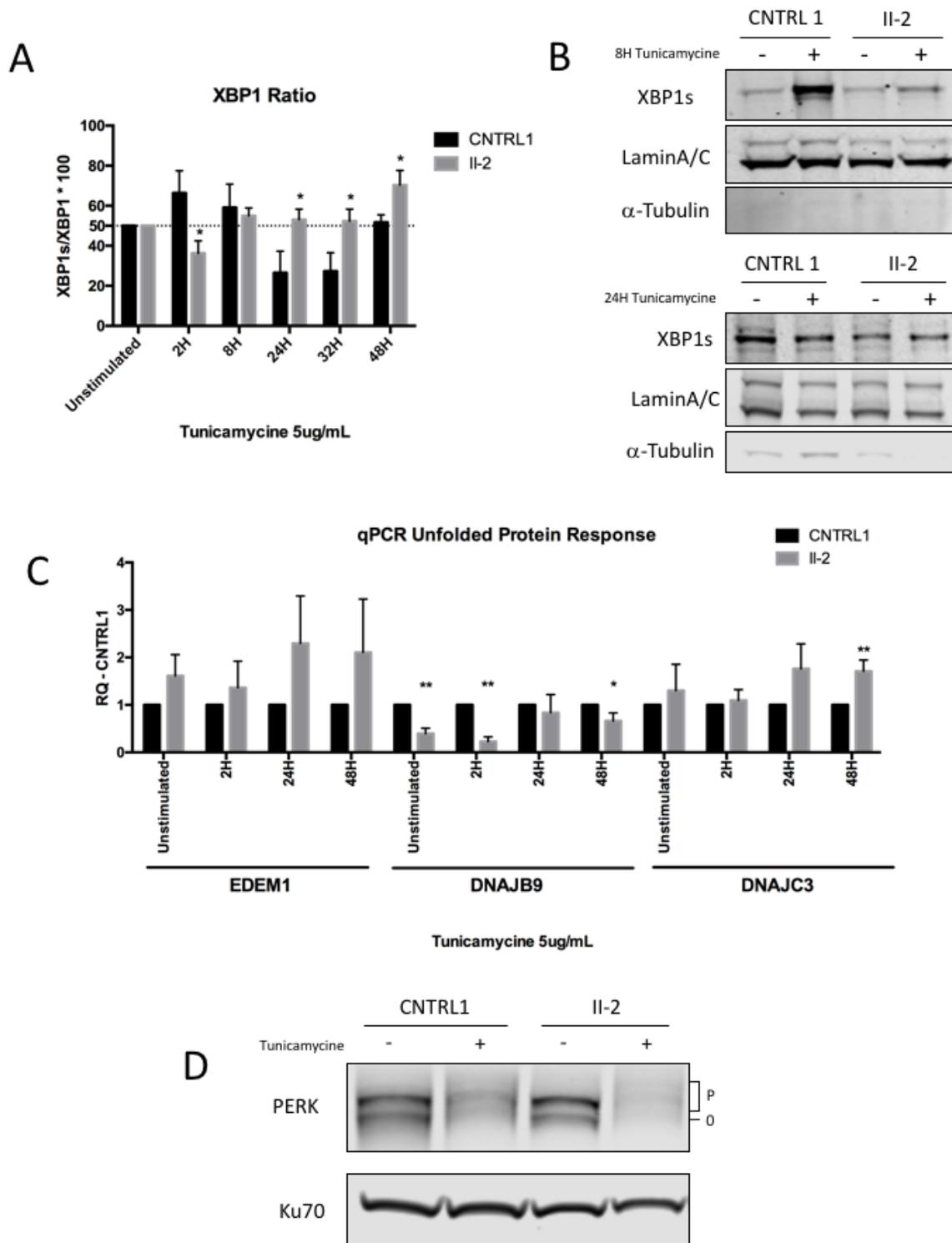
En revanche, la lignée II-2 présente à 2H une diminution du ratio d'XBP1 par comparaison avec le contrôle 1, liée à la diminution d'épissage d'XBP1s. Le ratio rejoint ensuite un niveau comparable à celui du contrôle à 8H puis reste stable de 24H à 32H pour finalement atteindre un pic d'activation comparable à celui du contrôle à 2H. La voie IRE1 $\alpha$ -XBP1 semble donc voir son activité retardée dans le temps, modifiant complètement sa cinétique. De plus, alors que le stress du réticulum endoplasmique semble être résolu après 48H de stimulation chez le contrôle, la voie IRE1 $\alpha$ -XBP1 ne faiblit pas et continue d'augmenter en intensité avec un épissage plus actif d'XBP1 à 48H (Figure 29A). Ce retard d'activation et cette augmentation tardive suggèrent que l'activation d'IRE1 $\alpha$  serait perturbée chez la patiente. Toutefois, au lieu d'être perdue, la fonction RNase d'IRE1 $\alpha$  semble au contraire ne plus pouvoir être inhibée après induction du stress, un phénotype qui pourrait s'expliquer par une perte potentielle d'une phosphorylation inhibitrice d'IRE1 $\alpha$  comme suggéré dans certaines publications et par les résultats *in silico* de notre étude.<sup>227,233-236</sup>

Afin de confirmer ces résultats, une extraction des protéines nucléaires des B-EBV a été réalisée chez un contrôle et la patiente après stimulation à la tunicamycine. Les résultats révèlent après 8H de stimulation une présence diminuée d'XBP1s dans le noyau chez a patiente comparé à la lignée contrôle. En revanche, 24H après stimulation, cette différence n'est plus observable, indiquant donc que la voie XBP1 est bien activable avec une intensité similaire à celle du contrôle, mais avec un retard d'exécution (Figure 29B).

La voie IRE1 $\alpha$ -XBP1 étant visiblement perturbée dans la lignée B-EBV II-2, des qPCR ciblant *EDEMI* (EDEM), *DNAJB9* (ERdj4) et *DNAJC3* (p58<sup>IPK</sup>), trois cibles transcriptionnelles d'XBP1, ont été réalisées afin de déterminer l'impact de cette perturbation sur l'UPR.<sup>190</sup> Les qPCR d'*EDEMI* et de *DNAJC3* ne révèlent pas de différences dans l'induction de ces gènes après stimulation par la tunicamycine. Toutefois, *DNAJB9* montre à l'état basal, 2H et 48H une diminution significative de son niveau d'expression comparé au contrôle. Ce résultat suggère que le défaut de la voie XBP1 a un impact sur la transcription de certains gènes de l'UPR, pouvant par conséquent influencer sur les conséquences fonctionnelles de ce programme transcriptionnel (Figure 29C). L'absence de différence observable chez *EDEMI* et *DNAJC3* est probablement dû à l'activation conjointe de ces gènes par XBP1 et ATF6f. En effet, contrairement à *DNAJB9* dont l'activation est uniquement médiée par XBP1, Yamamoto & al. ont démontré que l'expression d'*EDEMI* et *DNAJC3* était également régulée par ATF6f. Les résultats suggèrent donc que l'activation de la voie ATF6 à l'état basal et après induction de l'UPR permet de compenser la perte d'activation de la voie IRE1 $\alpha$ -XBP1. D'autres gènes cibles exclusifs à XBP1 devraient être testés afin de confirmer le défaut d'induction transcriptionnel observé chez II-2 tels que *SERP1* (RAMP4). De façon similaire, des gènes exclusifs à la voie ATF6 devront être testés pour confirmer les résultats observés avec *EDEMI* et *DNAJC3* ; tels que *HSPA5* (BiP) et *HSP90B1* (GRP94).<sup>204</sup>

Enfin, afin de vérifier que les défauts observés de la voie IRE1 $\alpha$  n'influent pas sur l'activation des autres voies, un Western Blot mesurant la forme totale de PERK a été réalisé. PERK étant fortement phosphorylé après activation, les conditions de migration ont été optimisées afin de mettre en évidence la différence de migration des différentes formes phosphorylées de PERK.<sup>321</sup> On observe que la lignée contrôle et la lignée II-2 présentent une activation similaire de PERK après stimulation par la tunicamycine (Figure 29D). Dans leur ensemble, les résultats confirment que la voie IRE1 $\alpha$ -XBP1 est impactée par la mutation

présentée par la patiente II-2. Toutefois, les autres voies de l'UPR ne semblent pas être perturbées. En effet, la voie ATF6 semble parvenir à compenser la perte d'XBP1 pour l'induction des gènes que ces deux facteurs de transcription régulent en commun. De plus, la voie PERK n'étant pas activée à l'état basal et celle-ci répondant normalement à l'induction du stress dans la lignée II-2, les résultats suggèrent que la gestion du stress du RE est faiblement altérée chez la patiente et que le défaut induit par la mutation se limite aux voies induites par IRE1 $\alpha$ .



**Figure 29 : Analyse de l'UPR et des conséquences de la mutation sur la voie IRE1 $\alpha$ -XBP1. (A)** Ratio XBP1 obtenu par qPCR réalisée sur lignées B-EBV après stimulation du stress du RE par la tunicamycine à 5 $\mu$ g/mL pour 2H, 8H, 24H, 32H et 48H. N=3 **(B)** Western Blot montrant la localisation nucléaire d'XBP1s après stimulation pendant 8H ou 24H de B-EBV par la tunicamycine à 5 $\mu$ g/mL. L'expression de la laminine A/C et l'absence d' $\alpha$ -tubuline permettent de confirmer la pureté de la séparation des protéines cytoplasmiques et nucléaires. N=2 **(C)** qPCR réalisée sur B-EBV montrant l'expression de trois cibles transcriptionnelles d'XBP1s : EDEM1, DNAJC3 et DNAJB9. L'induction de la voie XBP1 est réalisée par stimulation à la tunicamycine à 5 $\mu$ g/mL. N=3 **(D)** Western Blot montrant la phosphorylation de PERK après induction du stress du réticulum endoplasmique pendant 8H par la tunicamycine à 5 $\mu$ g/mL. « 0 » indique la forme non phosphorylée de PERK. « P » indique le retard de migration induit par la phosphorylation de PERK. N=2

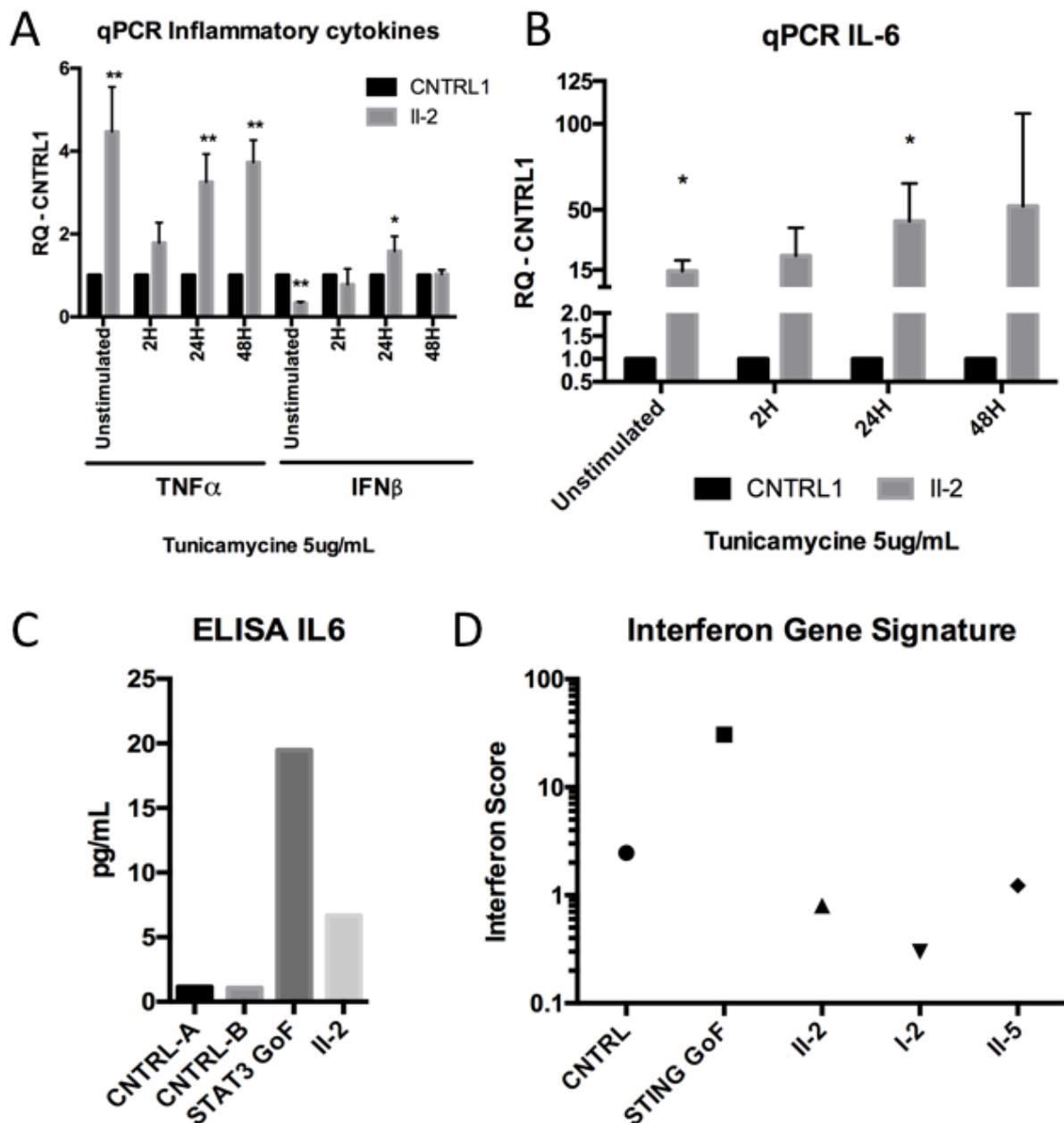
## **Partie IV : Perturbations immunitaires induites par la mutation d'IRE1 $\alpha$**

IRE1 $\alpha$  étant capable d'induire l'expression de TNF $\alpha$ , IFN $\beta$  et IL6, l'expression de ces trois cytokines a été vérifiée par qPCR. Si l'expression de TNF $\alpha$  est effectivement plus élevée, le facteur d'induction semble trop faible pour avoir une influence sur le développement de l'auto-immunité. L'expression d'IFN $\beta$  au contraire est diminuée à l'état basal, mais les niveaux se normalisent par rapport au contrôle en cas d'induction du stress du RE (Figure 30A). Il est donc peu probable que ces cytokines aient une incidence sur la pathogénèse du LES chez II-2. En revanche, l'expression d'IL6 est fortement augmentée à l'état basal ainsi qu'après induction du stress (Figure 30B). L'augmentation d'expression d'IL6 observée dans la lignée B-EBV de la patiente II-2 a été confirmée par un test ELISA réalisé sur un échantillon de plasma de la patiente. Bien qu'inférieure à celle d'un patient porteur d'une mutation gain de fonction de STAT3 stimulant l'expression d'IL6, cette augmentation est d'environ 7x par rapport aux contrôles (Figure 30C). Ces expériences suggèrent qu'il existe une surexpression constitutive de l'IL6 dans les lignées B, qui est probablement liée à la présence de la mutation. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour confirmer que l'expression d'IL6 est bien dépendante de l'activité d'IRE1 $\alpha$ .

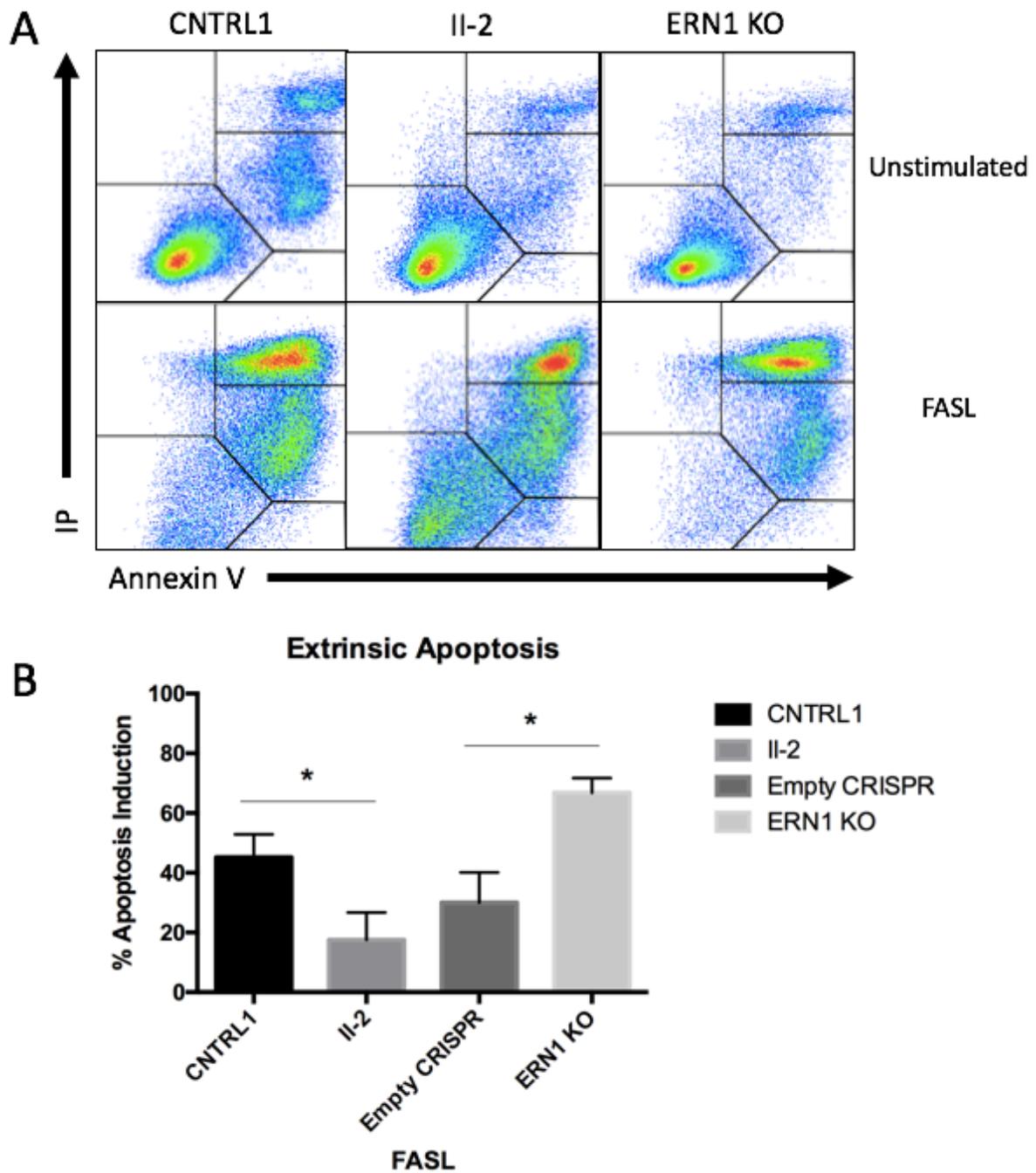
Enfin, dans le but de confirmer que la pathogénèse de la patiente n'est pas liée à l'induction d'IFN/I, une signature interféron a été réalisée sur les PBMCs et apparaît comme négative chez le cas-index et deux autres membres de la famille (Figure 30D). Le développement du phénotype auto-immun observé dans la famille A n'est donc probablement pas dû à une surexpression d'IFN/I.

L'UPR étant capable d'influer sur le destin cellulaire, une mutation d'IRE1 $\alpha$  pourrait donc orienter les cellules immunitaires vers une survie accrue ou au contraire une apoptose précoce. Dans le premier cas, la survie permettrait à des cellules auto-immunes de se développer en échappant aux signaux de mort induits par la tolérance. Dans le second cas, une apoptose accrue pourrait au contraire provoquer une forte perte des cellules immunitaires régulatrices ou bien générer un nombre accru de corps apoptotiques, induisant ainsi un lupus. Un test

d'apoptose a donc été réalisé sur les B-EBV afin de déterminer si elles présentent un défaut fonctionnel lié à l'apoptose. L'induction de la mort cellulaire par stimulation de la voie FAS montre une résistance partielle mais significative à l'apoptose extrinsèque chez II-2. Le résultat opposé est en revanche observé dans les B-EBV ERN1 KO avec une apoptose accrue après stimulation de FAS membranaire par FASL (Figure 31A, 31B).

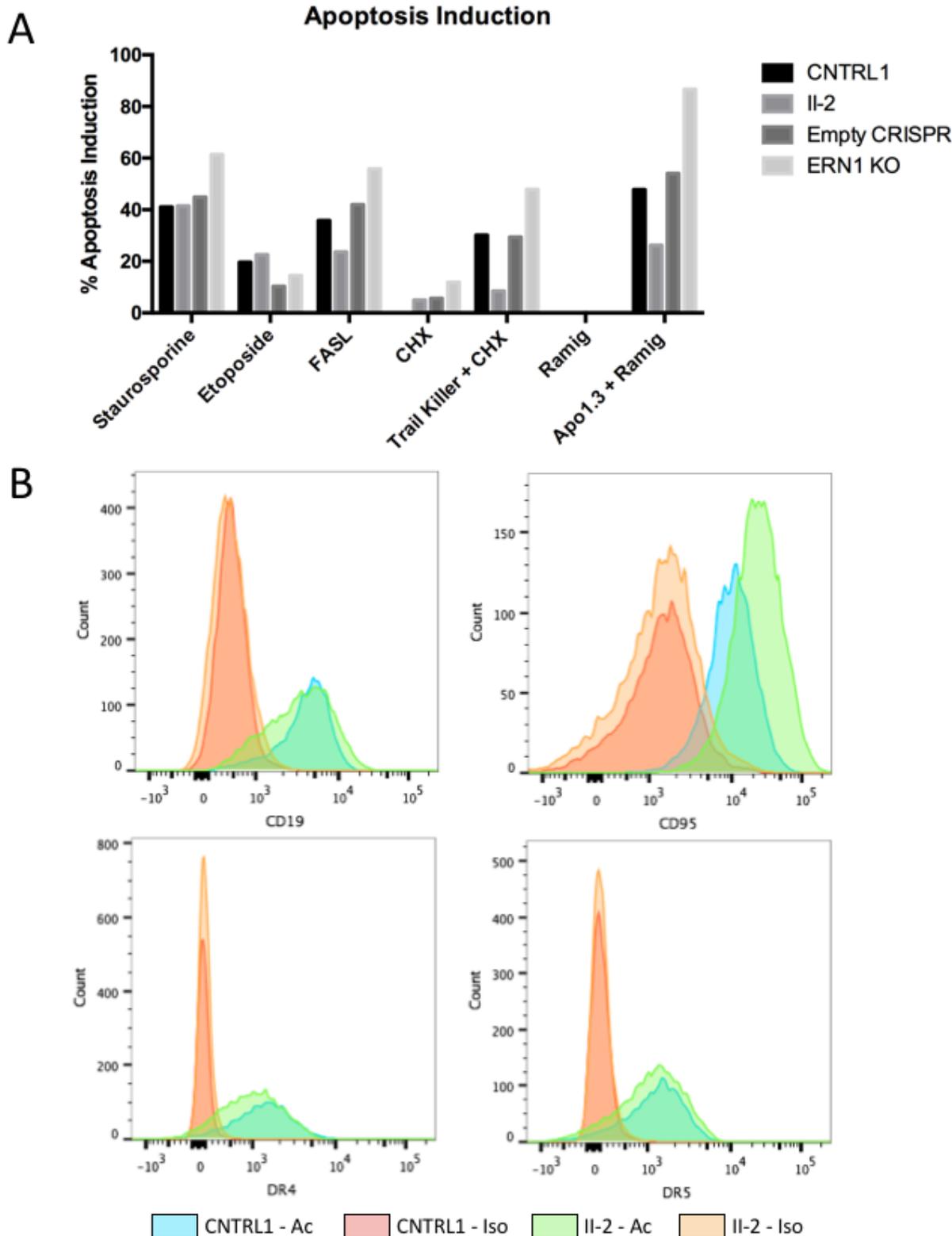


**Figure 30 : Tests de la fonction cytokinique de la famille A.** (A) qPCR ciblant TNF $\alpha$ , IFN $\beta$  et (B) IL6 dans des B-EBV issus d'un contrôle et de la patiente, traités avec de la tunicamycine à 5ug/mL. N=3 (C) Test ELISA révélant la concentration d'IL6 mesurée dans des plasmas issus de deux contrôles, la patiente II-2 et un patient porteur d'une mutation gain de fonction (GoF) de STAT3 qui provoque une surexpression d'IL6. N=1 (D) Score Interféron obtenu dans les PBMCs à partir de qPCR visant plusieurs gènes stimulés par les IFN/I. La signature IFN est comparée à celle d'un patient porteur d'une mutation STING gain de fonction qui provoque une surexpression d'IFN/I. N=1



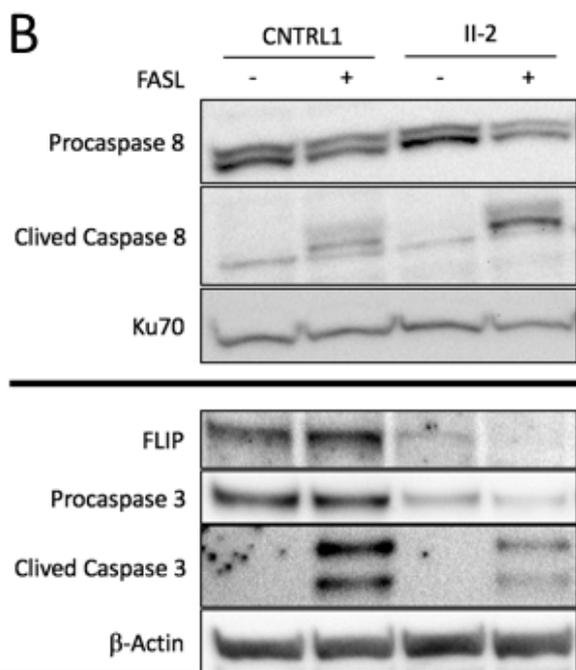
**Figure 31 : Analyse de l'apoptose extrinsèque induite par FASL dans des B-EBV. (A)** Cytométrie en flux des lignées B-EBV contrôle, II-2 et ERN1 KO après induction de l'apoptose extrinsèque par FASL. Les cellules sont marquées à l'Annexin V pour observer l'induction du signal apoptotique ainsi qu'à l'IP afin de marquer les cellules poreuses après la mort cellulaire. Les cellules vivantes sont donc Annexin V<sup>-</sup>/IP<sup>-</sup>, les cellules en cours d'apoptose sont Annexin V<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup> et les cellules mortes sont Annexin V<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>. N=3 **(B)** Quantification de l'apoptose induite à partir de la quantité observée de cellules mortes par cytométrie en flux après induction de l'apoptose extrinsèque par FASL. N=3

Afin de confirmer ces résultats, une nouvelle expérience d'apoptose a été réalisée avec d'autres inducteurs de la voie extrinsèque ainsi qu'avec des inducteurs de la voie intrinsèque de l'apoptose. L'apoptose induite par mise en contact des B-EBV avec la staurosporine, un inhibiteur de kinases, et avec l'étoposide, un composé induisant l'apoptose par induction de dégâts à l'ADN, est semblable chez le contrôle et la patiente II-2, confirmant que le défaut d'apoptose induit par la mutation ERN1 est spécifique à la voie extrinsèque. En revanche, la lignée ERN1 KO montre une apoptose accrue en réponse à la staurosporine, confirmant l'aspect pro-survie de la voie IRE1 $\alpha$  dans la cellule. L'induction de la voie extrinsèque par stimulation de FAS membranaire avec FASL et la combinaison de l'Apo1.3 et du ramig confirme les résultats obtenus précédemment avec une diminution de l'apoptose induite chez II-2, mais une augmentation dans la lignée *ERN1* KO. Enfin, l'induction de la voie extrinsèque par activation du récepteur membranaire TRAIL met également en évidence une résistance plus importante des cellules de la patiente (Figure 32A). Afin de confirmer que la résistance à l'apoptose extrinsèque n'est pas la conséquence d'une diminution de l'expression des récepteurs FAS et TRAIL à la membrane, une mesure de leur taux d'expression à la membrane a été réalisée par cytométrie en flux. Les résultats confirment une expression normale des récepteurs TRAIL à la membrane (DR4, DR5) ainsi qu'une expression maintenue voir augmentée de FAS (CD95) à la membrane chez II-2 (Figure 32B). Ces résultats préliminaires doivent être répétés afin d'être confirmés.



**Figure 32 : Analyse de l'apoptose induite dans des B-EBV. (A)** Quantification de l'apoptose induite à partir de la quantité observée de cellules mortes par cytométrie en flux. N=1 **(B)** Expression à la membrane des marqueurs cellulaires CD19, CD95, DR4 et DR5. L'expression de CD19 est utilisée comme gène de ménage afin de confirmer que les variations observables de CD95, DR4 et DR5 ne viennent pas d'une expression différentielle globale de récepteurs à la membrane. Ac : Anticorps visant le marqueur d'intérêt. Iso : isotype contrôle de l'anticorps d'intérêt. N=1

Les cellules de la patiente II-2 présentant une résistance à l'apoptose extrinsèque, des Western Blot ciblant plusieurs acteurs majeurs de cette voie ont été réalisés afin de déterminer si l'un d'entre eux pourrait être impliqué dans ce défaut d'apoptose (Figure 33A).<sup>322</sup> Les Western Blot révèlent une expression similaire de la pro-caspase-8 à l'état basal et une quantité accrue de Caspase-8 clivée chez II-2 après induction de l'apoptose extrinsèque par FAS. De plus, l'expression de FLIP, un inhibiteur de la voie, est également diminuée chez II-2. Ces deux observations indiquent que la résistance à l'apoptose n'est pas associée aux étapes préliminaires au niveau du DISC (Death Inducing Signaling Complex) le complexe d'initiation de l'apoptose extrinsèque. Toutefois, le Western Blot révélant Caspase-3 montre une forte diminution de l'expression de la pro-caspase-3 ainsi que de son clivage. Caspase-3 étant l'un des derniers membres de la voie avant activation de l'apoptose, sa diminution d'expression est en accord avec nos résultats de résistance à l'apoptose et cela malgré les observations faites sur Caspase-8 et FLIP (Figure 33B).



**Figure 33 : Analyse de la voie extrinsèque de l'apoptose – adapté de Ramaswamy & al, 2011. (A)** Schéma simplifié de la voie extrinsèque. La liaison de FASL à FAS permet le rassemblement de plusieurs récepteurs FAS et l'assemblage du complexe de transduction de signal FADD. L'assemblage de FADD permet le clivage de la procaspase-8 en caspase-8 active, une activité qui peut être inhibée par c-FLIP. Une fois activée, la caspase-8 induit une cascade de signalisation aboutissant au clivage de la pro-caspase-3 provoquant ainsi l'apoptose. **(B)** Western Blot révélant plusieurs protéines majeures de la voie extrinsèque de l'apoptose. Les B-EBV furent stimulés par ajout de FASL. N=2

*Lhomond & al.* ont déterminés une liste d'ARNm clivés par l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  *in vitro* dans laquelle on retrouve l'ARNm de Caspase-3.<sup>323</sup> Afin de déterminer la position du site de restriction d'IRE1 $\alpha$  dans Caspase-3, la séquence de l'ARNm de *CASP3* a été comparée à la séquence consensus reconnue par le domaine RNase d'IRE1 $\alpha$ .<sup>192,320</sup> La séquence consensus est présente à trois reprises dans l'ARNm de *CASP3* (Figure 34A). La séquence consensus devant se trouver au bout d'une structure en tige-boucle, les séquences proches ont été analysées grâce au logiciel en ligne M-FOLD afin de déterminer la capacité de l'ARNm de *CASP3* à générer une structure secondaire au niveau de ces séquences consensus.<sup>324</sup> Dans les exemples présentés par *Oikawa & al.*, la séquence consensus identifiée qui est la cible du RIDD est présente dans son intégralité dans la

boucle formée par la structure secondaire de l'ARNm, probablement afin de permettre à IRE1 $\alpha$  de reconnaître la séquence consensus en la rendant plus accessible à son domaine RNase.<sup>320</sup> Par comparaison, les résultats obtenus par M-FOLD pour la séquence consensus n°1 indiquent que celle-ci, bien que proche de la boucle, voit son site de coupure présent dans la structure en tige, la rendant donc probablement inaccessible au domaine RNase d'IRE1 $\alpha$ . La séquence n°2 en revanche, est entièrement présente dans la boucle comme montré par *Oikawa & al.* Enfin, la séquence n°3 est présente dans une structure en boucle plus petite. Si son site de coupure est bien présent dans la boucle, la séquence consensus se retrouve partiellement dans la tige, diminuant les chances que ce site soit reconnu par IRE1 $\alpha$  (Figure 34B).

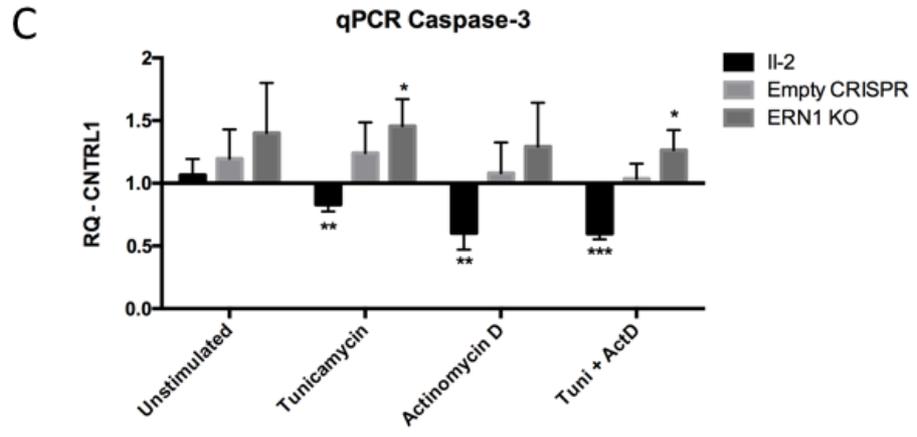
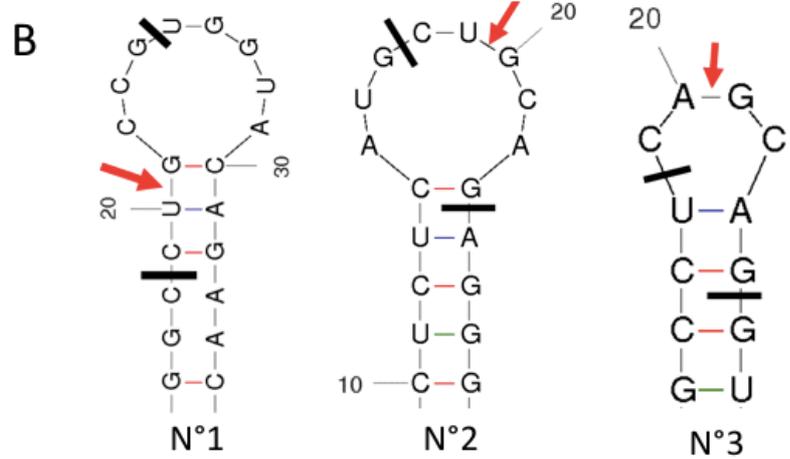
Partant des résultats de cette analyse *in silico*, une qPCR utilisant des oligonucléotides spécifiques de la région entourant la zone de clivage n°2, le meilleur site de restriction candidat pour le clivage par l'activité RIDD d'IRE1 $\alpha$ , a été mise au point. La qPCR est ensuite réalisée sur des B-EBV traitées à la tunicamycine pour induire le stress du RE ou à l'actinomycine D afin de stopper la transcription de nouveaux ARNm. Cette expérience permet de vérifier la stabilité de l'ARNm de Caspase-3 en présence ou absence de stress du RE. Les résultats montrent une expression semblable de l'ARNm de Caspase-3 à l'état basal entre la lignée contrôle, la lignée de la patiente II-2 et la lignée ERN1 KO. En revanche, le traitement à la tunicamycine seule suffit à montrer une tendance de l'ARNm de Caspase-3 à diminuer de façon significative chez la patiente, tandis que son niveau d'expression augmente dans la lignée ERN1 KO. Cette même tendance est conservée lors de l'utilisation de l'actinomycine D seule ou de l'utilisation conjointe de la tunicamycine et de l'actinomycine D. Ces résultats confirment que la stabilité de l'ARNm de Caspase-3 est diminuée dans la lignée B-EBV de la patiente II-2 et que cette stabilité est influençable par l'activation d'IRE1 $\alpha$ . Ces résultats suggèrent donc une activité accrue du RIDD chez la patiente, induisant une diminution d'expression de la Caspase-3 et donc une résistance à l'apoptose (Figure 34C).

**A**

```

ACATCTCCCGGGGGGGGGCCGGAAGCAGTGCAGACCGGGCTCTAGCCGATGGGTGCTATTGTGAGCGGTTGAGAAGAGTTTC
GTGAGTGGCTCGCAGCTCATACCTGTGGCTGTGATCCGTGGCCACAGCTGGTGGCGTCGCCCTTGAATCCAGGCCGTTGAGGAGTT
AGCGAGCCCTGCTCACACTCGGGCTCTGGTTTTCTGGTGGGTGTGCCCTGCACCTGCCTCTCCCCCAATCTCATTAATAAAGGAT
CCAGGAGAACACTGAAAATCAGTGGATTCAAAAATCCATFAAAAATTTGGAACCAAGATCATAATGGAAGCGAATCAATGGACT
CTGGAATATCCCTGGACAACAGTTATAAAAATGGATTATCCCTGAGATGGGTTTATGTATAATAATTAATAAAGAAATTTTCATAAAA
GCACGGGAATGACATCTCGGTCTGGTACAGATGTCGATGCAGCAAACTCAGGGAAAACATTCAGAACTTGAATATGAAATCAGGA
ATAAAAATGATCTTACACCTGGAAGAAATGTGGAATGATGCGTGAATTTCTAAAGAAATCACAGCAAAAGGAGCAGTTTTCAGAG
GTGTCTCTGAGCAATGGTGAAGAAAGAAATTAATTTTGGAAACAAATGGACCTGTGACCTGAAAAAATAACAACTTTTTCAGAG
GGGATCGTTGATAGAGTCTAACTGGAAAACCAAACTTTTCATTAATTCAGGCCTGGCTGGTACAGAACTGGACTCTGGCATTGAGA
CAGACAGTGGTGTGATGATGACATGGCGTGTCAAAAATACCAAGTGGAGGCGGACTTCTGTATGCATATCCACAGCACCTGGTT
ATTATCTTGGCGAAATCAAAAGATGGCTCCTGGTTCATCCAGTCGCTTGTGCCATGCTGAAAACAGATAGCCGACAAGCTTGAAT
TTATGCACATTTTACCCGGTTAACCGAAAGTGGCAACAGAAATTTGAGTCTTTTCCCTTGACGCTACTTTTCATGCAAGAAAC
AGATTCATGATTTTCCATGCTCACAAGAACTCTATTTTATCACAGAAATGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
ATGCCAAGTGAGAAGATGGTATATTTGGTACTGTATTTCCCTCTCATTTGACCTACTCTCATGCTGCAGAGGCTACTTTAAGACAT
ACTCCTCCATCAAAATAGAACCTATGAGCTACCTCAAATCCAGTCAGTGTGCAATGAAATTAATAGGAATAAATAAAA
AATGGATACGGTGCAGTCAATATGAGAGGCAATGATTGTTAATTTACAGCTTTCATGATTAGCAAGTTACAGTGTGCTGTGCTAT
CAATTTCAAGTAAATGTAAGAAAGTAAACATGGAATGAAATTTTATGATATCCCCCACTTAAGACTGTGTATCTAGTT
TTGTCAAACGTAGAAAATCATGATGTGGAAGAACTAGGCCATCTGTGGCATGTCAAAGGCTCAAACCTTTATTTAGAATTGATA
TACACCGATGACTTAACTGCCATTTTAGACCAATTTATCTGGGATTTAGTGTGTGTCTGAAACATTTTGTGTAAGAAA
AATAAATAAATGTTTAAATTTGAGAAAGAACTAATAATTTTATGTGAGAGAAAGTGTGAGCAAACTAACTTGAAGCTAA
AACTTAACATTCATAGAGGGGTGGAGTTTAACTGTAAAGTGTCAATATGCCCCTGGATCTACCAGCATAAATATCTCTGATTTGT
CCCTATGCATATCAGTTGAGCTTCATATACCAGCAATATATCTGAAGAGCTATTATATAAAAACCCCAAACTGTGATTATTAGCCA
GGTAATGTGAATAAATCTATAGGAACATATGAAATACAATTAATAATAAACAGTGGAAATATAAGGAAAGCAATAAATGAATGG
GCTGAGCTGCTGTAACCTGAGAGTAGATGGTTGAGCCTGAGCAGAGACATGACTCAGCCTGTCCATGAAAGCAGAGCCATGGC
CAGCAGAGAGGGCTACAGCCCAATTTCTCCATACGCACTGGTATGTGTGGATGATGCTGCCAGGCGCCATCGCCAGTAAAGAA
TGAAGCAATCAGAACTTGTGAAGTGGAAATGTTCTAAAGTGGTGGAGCAATAAAAATCATAGTACTCTTTGTAGCAAAATCTT
AAGTATGTTATTTCTGTGAAGTTTACAACTCAAGGAAATAGTAATGTTTATATCTTACTGAAGAAAGACCTATAGCA
CAATGACTCTAGCGCATCTCAGCCGAGCCAGCTGAGCCCTCAGCCGGAGCCAGCTCCAGCCTCTGGGCTGCGGAGC
CGTCACTGCACCAACTCTCACTGGCTGTCAGTATGACATTTACGGGAGATTTCTGTCTCAAAAATGAGCTGCGCATTTGTCAA
TGACAGTTCTTTTCTTACTAGACCTGTAACCTTTCTAAATACACATAGCATGTAATGGTATCTTAAAGTGTGTTCTATGTGAC
AATTTTGTACAAAATTTGTTATTTCCATTTTATTTCAAAAATACATTCAAAATTAATAAATTA

```

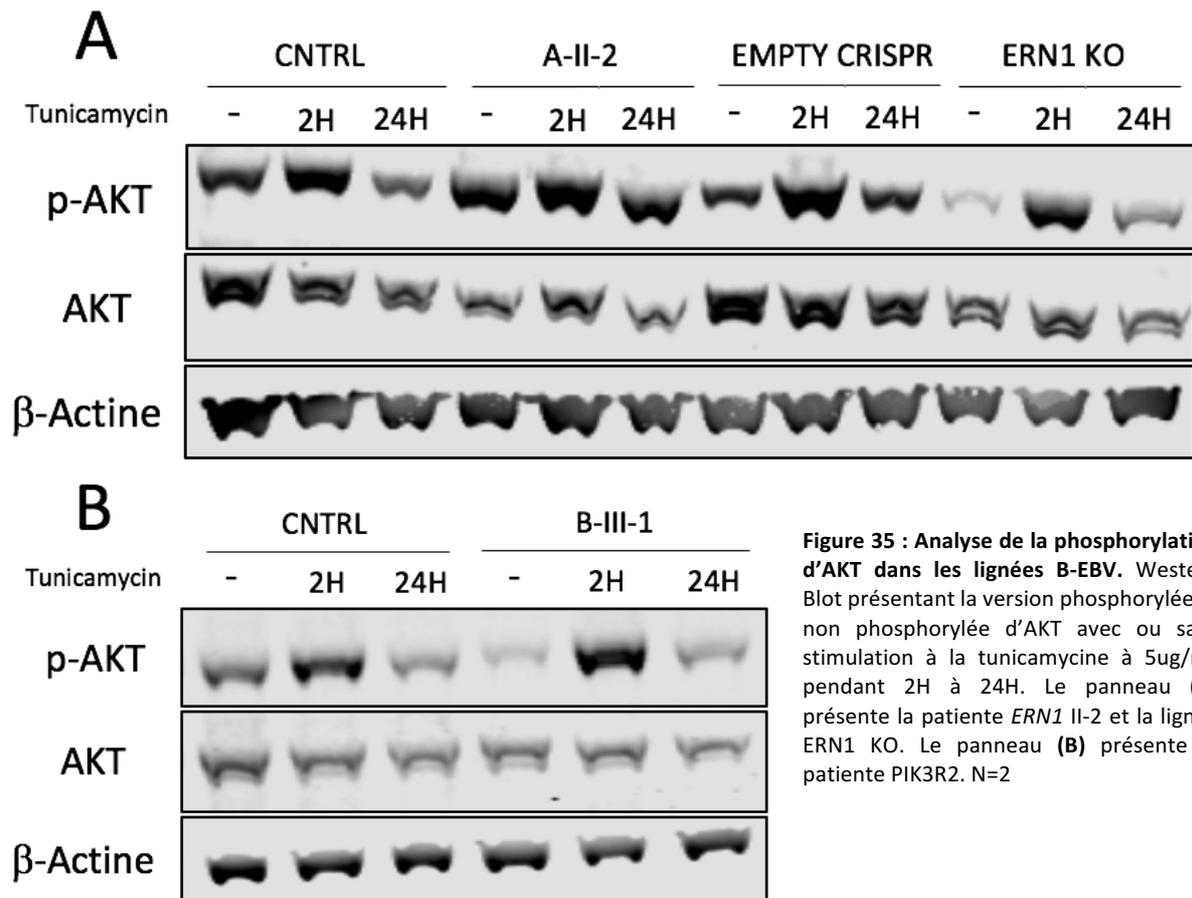


**Figure 34 : Analyse de l'activité du RIDD sur l'ARNm de Caspase-3. (A)** Séquence de l'ARNm de Caspase-3. Les séquences en jaune correspondent aux régions 5' et 3' UTR. La séquence bleue correspond au codon initiateur et la séquence rouge au codon stop. Les séquences en violet représentent les 3 séquences consensus du RIDD trouvées dans l'ARNm de Caspase-3. **(B)** Analyse in silico de la structure secondaire de l'ARNm de Caspase-3. Les barres noires entourent la séquence consensus du RIDD. La flèche rouge indique la zone de coupure induite par le domaine RNase d'IRE1 $\alpha$ . **(C)** Analyse par qPCR de la stabilité de l'ARNm de Caspase-3 par stimulation de B-EBV avec de la tunicamycine à 5ug/mL ou de l'Actinomycine D à 1ug/mL pendant 8H. N=3

## Partie V : Analyse de la voie PI3K

Afin de déterminer si la régulation d'IRE1 $\alpha$  pourrait être altérée par des variations d'activation de la voie PI3K, un Western Blot a été réalisé sur les lignées B-EBV de patient pour vérifier la phosphorylation d'AKT. En effet, *Sanchez-Alvarez & al.* ont montré que l'inhibition d'IRE1 $\alpha$  est soumise aux variations de la voie PI3K en réaction à l'induction du stress du RE. Le modèle présenté dans cette étude montre que la voie PI3K est inhibée après activation du stress du RE tandis qu'IRE1 $\alpha$  est activé en réponse à ce stress. L'inhibition de la voie PI3K est temporaire et conduit à la déphosphorylation et l'inhibition d'IRE1 $\alpha$ . En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de la voie AKT/mTOR pendant l'induction du stress afin d'empêcher sa réactivation, provoque un changement conséquent dans la cinétique d'activation d'IRE1 $\alpha$ , laissant sa signalisation se prolonger dans le temps. Ce changement de cinétique serait donc dépendant de la réactivation de la voie PI3K. Les expériences complémentaires présentées dans leur étude proposent que la régulation d'IRE1 $\alpha$  est lié à la présence de MAM (Mitochondrial-Associated Membrane), des domaines membranaires du RE en contact avec la mitochondrie et dans lesquels la présence d'IRE1 $\alpha$  a été confirmée.<sup>238,325</sup> Le stress du RE disloque ces MAMs tandis que leur restauration est dépendante de la réactivation de la voie PI3K. IRE1 $\alpha$ , la voie PI3K et les MAMs formeraient donc une boucle de régulation répondant au stress du RE et participant à la régulation de l'UPR.<sup>236</sup> L'expérience a donc été réalisée dans les lignées B-EBV mutante d'*ERN1* ainsi que dans la lignée de la patiente mutée pour *PIK3R2* afin d'observer si cette mutation provoque une dérégulation de l'activation de la voie PI3K (Figure 35).

Les résultats des Western Blot révèlent que la voie AKT est plus fortement activée 2H après induction du stress par la tunicamycine dans les contrôles et la lignée *ERN1* KO. La quantité d'AKT phosphorylée diminue ensuite au bout de 24H. La phosphorylation d'AKT semble également plus faible à l'état basal dans la lignée KO, confirmant un possible lien entre IRE1 $\alpha$  et la voie PI3K/AKT dans les B-EBV. En revanche, bien que les résultats semblent suggérer une activation plus forte de la voie PI3K/AKT chez la patiente II-2, cette observation ne fut pas reproductible (Figure 35A). Enfin, la patiente III-1 porteuse de la mutation *PIK3R2* semble comme la lignée *ERN1* KO avoir une phosphorylation moins active d'AKT à l'état



**Figure 35 : Analyse de la phosphorylation d'AKT dans les lignées B-EBV.** Western Blot présentant la version phosphorylée et non phosphorylée d'AKT avec ou sans stimulation à la tunicamycine à 5ug/mL pendant 2H à 24H. Le panneau (A) présente la patiente *ERN1* II-2 et la lignée *ERN1* KO. Le panneau (B) présente la patiente *PIK3R2*. N=2

basal. En revanche, l'activation de la voie par le stress du RE est toujours possible et ne semble pas être perturbée (Figure 35B). Cette expérience devra être répétée avec d'autres conditions expérimentales spécifiques de l'étude de la voie PI3K : une mise en culture en condition de privation de facteurs de croissance permettra d'observer de façon plus fine l'activation de la voie PI3K tandis que l'utilisation d'inducteurs de la voie PI3K tels que l'OKT3, activant la voie par l'intermédiaire du TCR, devrait permettre de mieux comprendre la régulation de la voie PI3K dans ces lignées de patients. Ces résultats préliminaires semblent indiquer un lien entre le stress du RE et la voie PI3K ainsi qu'un potentiel défaut d'activation à l'état basal d'activation de la voie chez III-1. Toutefois, ces résultats devront être confirmés pour conclure.

# Discussion

Les résultats présentés dans ces travaux proposent une nouvelle voie impliquée dans la pathogénèse du LES. Cette voie, dépendante de l'activité RIDD d'IRE1 $\alpha$ , induit une résistance à l'apoptose extrinsèque en diminuant la stabilité de l'ARNm de Caspase-3. Cette résistance à l'apoptose induite par FAS et TRAIL permettrait aux lymphocytes B auto-réactifs d'échapper aux mécanismes de la tolérance, provoquant un risque plus élevé de développer une auto-immunité.

La mutation d'IRE1 $\alpha$  p.R594C provoque à l'état homozygote une forte diminution de la transphosphorylation d'IRE1 $\alpha$  et une perte totale de son activité RNase. Cette perte d'activité pourrait être liée à une modification structurale dû à la perte de liaison entre les résidus 594 et les résidus 592, 593 et 643 d'IRE1 $\alpha$ . Notamment, liaison du résidu avec l'acide aminé 643 est probablement importante. En effet plusieurs études ont décrit ces dernières années l'effet de divers inhibiteurs sur l'activité d'IRE1 $\alpha$  et se sont attachés à expliquer le mécanisme d'inhibition de la protéine par des analyses fonctionnelles et structurales. Parmi ces études, *Concha & al.* ont décrit les effets inverses d'inhibiteurs de kinase sur l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  : le GSK2850163 (GSK) et la staurosporine (STS).<sup>326</sup>

Le GSK est un inhibiteur sélectif d'IRE1 $\alpha$  capable d'inhiber à la fois l'activité kinase et l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$ . Cette inhibition est provoquée grâce à l'interaction de GSK avec deux résidus particuliers Q612 et K599, provoquant le déplacement d'un domaine d'IRE1 $\alpha$  appelé « boucle d'activation kinase » (KAL : Kinase activation loop), dont la phosphorylation est importante pour l'activité d'IRE1 $\alpha$ . En effet, des mutations des trois sites de phosphorylation S724, S726 et S729 du domaine KAL diminuent la capacité d'IRE1 $\alpha$  à épisser XBP1. De plus, une co-transfection dans un modèle cellulaire KO pour *ERN1* de plasmides contenant la version WT et la version triple mutante d'IRE1 $\alpha$  provoque un retard d'épissage d'XBP1 avec une différence plus marquée aux temps précoces (2H/4H), un phénotype observable dans les B-EBV de la patiente II-2.<sup>327</sup>

La STS en revanche est un inhibiteur non spécifique d'IRE1 $\alpha$ . La STS est capable d'inhiber l'activité kinase, mais pas l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$ . Au contraire, sa liaison avec la forme déphosphorylée inactive d'IRE1 $\alpha$  est capable d'induire son activité RNase sans provoquer d'autophosphorylation. La STS se lie au domaine de liaison à l'ADP d'IRE1 $\alpha$  par interaction avec les résidus Q643, C645 et H692. Or ce domaine de liaison à l'ADP est également important pour l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$ .<sup>327</sup> De plus, cette liaison n'a aucun effet sur le domaine KAL.<sup>326</sup>

Ces études décrivent par conséquent l'importance de deux domaines particuliers présents dans le domaine kinase d'IRE1 $\alpha$  : le domaine KAL qui contient trois résidus phosphorylables essentiels à la fonction globale d'IRE1 $\alpha$  et le domaine de liaison à l'ADP dont l'association avec l'ADP ou un autre composé capable de mimer cette liaison est capable de bloquer l'activité kinase, tout en conservant une activité RNase intacte. En plus des travaux effectués sur les inhibiteurs et leur capacité à lier ces domaines, l'étude de mutations ponctuelles d'ERN1 ont également souligné leur importance dans l'activité d'IRE1 $\alpha$ . Parmi les exemples observables, on retrouve la mutation K599A présente dans le domaine KAL qui produit un mutant perdant toute activité kinase et RNase<sup>319</sup>, tandis que les mutations I642A et I642G provoquent des pertes partielles ou totales de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  respectivement.<sup>328</sup>

L'ensemble de ces résultats ainsi que la forte conservation du résidu 594 à travers l'évolution suggèrent qu'une mutation de cet acide aminé peut avoir des conséquences importantes pour la structure et la régulation de l'activité d'IRE1 $\alpha$ . Ces conséquences, observées à l'état homozygote dans les tests *in vitro* tendent à montrer que la boucle d'activation kinase serait le domaine le plus affecté par cette mutation. En effet, la perte d'activité RNase et la forte diminution de l'activité kinase sont des phénotypes similaires à ceux induits par la mutation K599A ou bien l'inhibiteur GSK. De plus, l'expérience de co-expression du triple mutant et de la version WT d'*ERN1* montrant un retard d'épissage d'XBP1 semblable à celui observé chez la patiente II-2, suggère donc la présence d'un défaut similaire induit par la mutation R594C.

Toutefois, une différence majeure reste à noter par rapport à ce modèle, puisque contrairement à la patiente II-2, l'épissage d'XBP1 n'est pas maintenu dans le temps comparé

à une lignée contrôle. Les niveaux d'activation, bien que différents entre le WT et la lignée transfectée, respectent une cinétique semblable.<sup>327</sup> Il existe donc un autre niveau de régulation lié au domaine KAL d'IRE1 $\alpha$ . En effet, si certaines études montrent que la phosphorylation du domaine KAL est nécessaire pour l'activité RNase d'XBP1, d'autres au contraire montrent dans la levure l'existence d'une activité RNase en absence de toute phosphorylation comme expliqué dans l'Introduction Partie III-C-3-iii.<sup>234,235</sup> Si cette observation aurait pu être expliquée par le fait que cette caractéristique soit exclusive à la levure, cette possibilité a été réfutée par *Sanchez-Alvarez & al.* qui ont montré dans un modèle cellulaire humain qu'un triple mutant pour les résidus phosphorylés du domaine KAL était capable d'induire l'épissage d'XBP1 et cela de façon prolongée dans le temps comparé à un contrôle.<sup>236</sup>

L'ensemble de ces observations nous permettent de poser l'hypothèse que la mutation R594C d'IRE1 $\alpha$  va induire un changement structurel de la protéine avec un fort impact sur le domaine KAL d'IRE1 $\alpha$ . Cette perturbation va influencer sur la structure et/ou sur la phosphorylation des résidus phosphorylables du domaine KAL, provoquant une diminution de l'activité kinase et une perte de l'activité RNase. Toutefois, la mutation étant retrouvée à l'état hétérozygote, la formation de dimère et/ou d'oligomères d'IRE1 $\alpha$  permet de restaurer partiellement l'activité d'IRE1 $\alpha$ , induisant un retard d'épissage d'XBP1. En revanche, si l'activité globale d'IRE1 $\alpha$  est préservée grâce à la formation des groupes d'homo-oligomères WT et d'hétéro-oligomères WT-Mutants, la forme mutée d'IRE1 $\alpha$  ne pouvant être phosphorylée, elle induit un gain de fonction en stoppant l'activité inhibitrice de la déphosphorylation d'IRE1 $\alpha$ , provoquant ainsi une activité prolongée dans le temps (Figure 13B). Cette activité prolongée modifie la cinétique d'activation d'IRE1 $\alpha$ , permettant à celui-ci d'empêcher l'apparition de l'UPR terminal par maintien de la voie pro-survie IRE1 $\alpha$ -XBP1 et promouvant également l'activité du RIDD capable de cliver l'ARNm de Caspase-3, induit une résistance à l'apoptose extrinsèque. Cette modification de l'activité d'IRE1 $\alpha$  induit ainsi un phénotype protecteur face à la mort cellulaire induite par les mécanismes de la tolérance immunitaire, permettant ainsi aux cellules auto-réactive d'induire une auto-immunité.

**Figure 4 : Modèle d'activation normal et pathologique d'IRE1 $\alpha$  proposé à partir de l'analyse de la mutation R594C d'IRE1 $\alpha$  – Adapté de Sanchez-Alvarez & al, 2017 (A)** En condition physiologique, le stress du RE active la fonction RNase d'IRE1 $\alpha$  et provoque son oligomérisation pour augmenter cette activité. L'inhibition d'IRE1 $\alpha$ , dépendante de sa déphosphorylation permet d'éteindre rapidement son activité. (B) La mutation R594C provoque un défaut de phosphorylation de la forme mutée d'IRE1 $\alpha$ , provoquant une résistance à l'inhibition induite par l'UPRosome. L'absence de phosphorylation permet de maintenir une activité RNase sur une plus grande durée, augmentant l'effet protecteur pro-survie d'IRE1 $\alpha$ .

Si les résultats de notre étude permettent de poser une hypothèse sur l'influence de la mutation R594C d'IRE1 $\alpha$  sur le développement du LES, ceux-ci sont à l'heure actuelle insuffisants pour démontrer formellement l'implication des défauts de cette voie de l'UPR dans l'auto-immunité. En effet, bien que plusieurs indices dans le phénotype présenté par la patiente II-2 ou la lignée *ERN1* KO suggèrent fortement une implication de la voie IRE1 $\alpha$  dans les voies étudiées, aucune des expériences présentées ne démontre un lien direct de cause à effet entre le phénotype auto-immun observé et la mutation *ERN1*. L'expression augmentée d'IL6 qui est un facteur indicateur d'une activation d'IRE1 $\alpha$ <sup>329</sup>, le phénotype opposé de résistance ou de mort accrue à l'apoptose présentés respectivement par la patiente et la lignée *ERN1* KO, de même que la stabilité diminuée de l'ARNm de Caspase-3 chez la patiente et au contraire augmentée dans la lignée *ERN1* KO sous tous trois des signes d'une dérégulation cellulaire liée à *ERN1*. Enfin, il reste possible que le variant d'IRAK4 identifiée dans cette famille contribue, avec la mutation d'*ERN1* à l'émergence de la pathologie. La voie de signalisation de l'IL1 ne pouvant être étudiée sur les lignées B-EBV, il sera nécessaire de tester cette hypothèse sur des cellules non transformées. L'absence de nouveaux prélèvements pendant la durée de ce travail n'a en effet pas permis de réaliser ces expériences, mais leur obtention récente devrait permettre de résoudre cette question.

Par conséquent, ces résultats préliminaires doivent être soutenus par de nouvelles expériences permettant de prouver de façon irréfutable l'implication d'IRE1 $\alpha$  dans le développement du LES. Dans un premier temps, il est nécessaire de parvenir à **obtenir une réversion du phénotype observé dans le modèle B-EBV** de la patiente II-2. En effet, l'utilisation d'un shRNA permettant de diminuer l'expression d'IRE1 $\alpha$  permettrait de confirmer l'implication de la protéine en provoquant une réversion de la production d'IL6 ainsi qu'une perte de la résistance à l'apoptose. Par la suite, notre étude ne s'étant concentrée que sur le modèle B-EBV obtenu chez la patiente, il est nécessaire de **vérifier si un phénotype similaire est observable sur des cellules primaires** issues des PBMCs de la patiente. Dans cette optique, des lymphocytes T primaires seront activés à partir de PBMCs et seront utilisés

pour réaliser un test d'apoptose ainsi que des Western Blot visant IRE1 $\alpha$  et Caspase-3. Ces tests permettront de confirmer que la résistance à l'apoptose par dégradation de Caspase-3 n'est pas limitée qu'à la lignée immortalisée B-EBV et détermineront également si la diminution de l'expression d'IRE1 $\alpha$  observée chez la patiente est un phénotype réel à intégrer dans notre modèle ou un artefact.

Une fois ces vérifications effectuées, il sera nécessaire de réaliser des panels permettant d'analyser d'autres populations immunitaires notamment les LT et les DC. Les LT subissant tous comme les LB une pression de sélection contre les clones auto-réactifs, le mécanisme décrit dans notre modèle pourrait également s'appliquer à eux. Quant aux DC, l'influence d'IRE1 $\alpha$  sur la présentation des antigènes sur le CMH de classe I pourrait modifier leur fonction tolérogène et provoquer l'activation de lymphocytes auto-réactifs. De plus, l'activation induite de l'inflammasome par IRE1 $\alpha$  (Introduction-Partie III-C-4-ii) et la production consécutive de cytokines inflammatoires pourrait provoquer l'activation du système immunitaire. Cela ne semble pas être le cas dans la famille présentée pour les interférons de type-I mais d'autres cytokines, tel que l'IL6 pourraient être impliquées. Notamment il est nécessaire de **vérifier si le phénotype observé en particulier la résistance à l'apoptose extrinsèque est limité aux LB ou bien s'il est généralisable à d'autres types cellulaires**. Enfin, il faudrait vérifier si la production anormale d'IL6 est également impliquée dans cette résistance à l'apoptose qui est aujourd'hui le mécanisme le plus pertinent pour expliquer une rupture de la tolérance au soi et l'apparition de manifestations auto-immunes. En effet, dans la lignée de souris MRL, qui développe des traits lupiques à environ 20 semaines, la survenue de la maladie est plus précoce (8 à 12 semaines) lorsque la voie Fas est mutée comme dans les souris MRL-lpr.

Bien que notre hypothèse s'appuie à la fois sur des résultats obtenus *in silico* et *in vitro* ainsi que sur une étude de la littérature actuelle d'IRE1 $\alpha$ , d'autres expériences fonctionnelles et structurales sont nécessaires pour en confirmer la validité. Parmi elles sont envisageables :

- La vérification de l'activité kinase d'IRE1 $\alpha$ ,
- L'observation de la structure du mutant,
- La réalisation d'un test mesurant la capacité du mutant à interagir avec lui-même ou une version WT de la protéine,
- La vérification de son profil de phosphorylation,

- L'identification des partenaires protéiques de l'UPRosome et d'un possible changement de sa constitution induit par la mutation IRE1 $\alpha$ ,
- L'observation de l'influence de la mutation sur le profil d'oligomérisation d'IRE1 $\alpha$  dans le RE.

L'ensemble de ces points nécessitent des éclaircissements et seront des informations cruciales pour la confirmation du modèle proposé. L'activation de la voie kinase d'IRE1 $\alpha$  ne fut pas abordée à la fois par manque de temps et par choix stratégique, la voie NF- $\kappa$ B étant fortement influencée par la présence d'EBV dans notre modèle cellulaire<sup>151</sup>, la priorité fut donnée à l'étude de la voie RNase. En revanche, l'étude de la voie JNK devrait pouvoir être réalisé dans les B-EBVs.

Enfin, d'autres éléments non discutés dans les résultats soutiennent l'hypothèse de l'implication d'IRE1 $\alpha$  dans le développement du LES. En effet, un modèle murin porteur de la mutation R594C à l'état hétérozygote dans la lignée C57BL/6 a été généré grâce à une collaboration avec l'équipe du Dr Pauline Soulas-Sprauel. Ces souris actuellement à l'étude présentent les caractéristiques suivantes :

- Une absence de défaut d'expression transcriptionnelle et protéique d'IRE1 $\alpha$ , suggérant que la diminution observée serait dû à un artefact issue de la lignée B-EBV de la patiente II-2.
- Une perte partielle de l'expression d'XBPs semblable à celle observée dans notre étude.
- Une dérégulation de l'homéostasie des LB et LT périphériques avec une augmentation du nombre de LB dans la rate et une diminution des LT naïfs dans la rate et les ganglions lymphatiques.
- Une sécrétion accrue d'anticorps par les LB exclusive aux IgM.
- Le développement d'auto-anticorps IgM et IgG dans un sous-groupe de souris mutées.

Ces résultats semblent confirmer que la mutation R594C d'IRE1 $\alpha$  induit un état de susceptibilité accrue à l'auto-immunité par la dérégulation des lymphocytes aboutissant à la génération d'auto-anticorps. De plus, au cours de cette étude, d'autres familles présentant des mutations de gènes impliqués dans l'UPR ont été identifiées au laboratoire (Tableau 6). La présence dans ces familles souffrant d'atteintes auto-immunes d'autres mutations d'*ERN1*, mais

également de mutations d'*EIF2AK3* (PERK) et *PPP1R15A* (GADD34) renforce l'idée que l'étude de l'UPR est nécessaire à la compréhension du développement de l'auto-immunité.

Gène	Mutation	Phénotype
<i>ERN1</i>	p.T944A	Hépatite à cellule géante et Anémie hémolytique auto-immune
	p.R781W	Lymphohistiocytose hémophagocytaire, Arthrite et Adénopathie
<i>EIF2AK3</i>	p.I305V	Ulcères oraux, Phénomène de Raynaud, Arthralgie
<i>PPP1R15A</i>	p.V190M	PTI, Arthralgie, Anticorps anti-nucléaires, SGS, LES, Raynaud

Tableau 6 : Liste des mutations des gènes impliqués dans l'UPR retrouvés dans des familles atteintes de syndromes auto-immuns présentés au laboratoire.

Parmi les limites de cette étude, il est nécessaire de rappeler que celle-ci s'appuie exclusivement sur l'induction du stress du réticulum par la tunicamycine, un inhibiteur de la glycosylation des protéines qui provoque l'accumulation de ces protéines en formation non glycosylées dans le RE. L'usage de cet inhibiteur fut préféré dans notre étude à cause des lourds effets secondaires induits par d'autres inducteurs du stress connus tels que la Brefaldine A qui bloque le transport des protéines du RE au Golgi en inhibant la liaison entre les protéine COP-I et la membrane du RE ; ou encore la thapsigargine qui provoque un relargage du calcium du RE en inhibant les pompes SERCA du RE responsables du transport actif du calcium cytosolique dans le RE. De plus, *Bergmann & al.* ont démontrés dans la lignée HEK293 que l'induction de l'UPR par ces composés ont des conséquences variées qui ne peuvent reproduire fidèlement des évènements induits par une accumulation physiologique des protéines mal conformée. Parmi les différences observées par cette étude entre l'induction chimique du stress et l'induction par accumulation induite de la production de protéines mutées mal conformées, les auteurs rapportent que l'induction transcriptionnelle de cibles de l'UPR par les inducteurs chimiques n'est pas toujours reflétée au niveau protéique alors que l'induction par les protéines conformées semble conforme aux analyses transcriptionnelle.<sup>330</sup> Il est donc nécessaire lors de l'étude de l'UPR d'obtenir un modèle cellulaire comprenant un système d'expression inductible d'une protéine mal conformée.

Enfin, dans le cas de *PIK3R2*, le premier résultat obtenu semble indiquer une faible diminution de l'activation de la voie à l'état basal. Un tel phénotype, s'il se confirme, indiquerait que la mutation *PIK3R2* serait de type gain de fonction car elle augmenterait la capacité de p85 $\beta$  à inhiber l'activation de p110. Toutefois, cette hypothèse nécessite encore de nombreuses expériences pour pouvoir être défendue puisque les B-EBV de la patiente III-1

répondent positivement en phosphorylant AKT après induction du stress du RE. Cependant, ce résultat n'exclut pas l'hypothèse proposée puisque le stress du RE pourrait induire la phosphorylation d'AKT par une autre voie que la voie PI3K. Afin de confirmer l'hypothèse de gain de fonction, il est donc primordial de tester l'activation de la voie par induction classique de la voie PI3K. Une fois cette vérification effectuée, des tests supplémentaires sur l'activation des cibles transcriptionnelles et sur les fonctions dépendantes de l'activation de PI3K seront nécessaires pour tirer les premières conclusions sur le mécanisme physiopathologique à l'origine du LES observé chez la patiente. De plus, le tableau clinique de la famille et la répartition de la mutation ne permettent pas d'exclure l'hypothèse qu'un autre variant soit causal dans la maladie ou que d'autres facteurs génétiques ou environnementaux favorisent l'apparition de l'auto-immunité dans cette famille.

# Conclusion

Afin de comprendre la pathophysiologie du lupus nous étudions des formes familiales ou pédiatriques de ce syndrome dans le but de découvrir de nouvelles formes monogéniques du LES. L'étude de ces formes monogéniques permet de découvrir et caractériser de nouvelles voies impliquées dans le développement de cette maladie avec pour objectif de développer des cribles diagnostiques permettant de mieux stratifier les patients ainsi que de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques pour les patients souffrant de défauts de ces voies.

Notre projet a permis de mettre à jour deux nouvelles mutations résidant dans les gènes *ERN1* et *PIK3R2*. *ERN1*, codant IRE1 $\alpha$ , est le principal inducteur d'un programme transcriptionnel activé en réponse à l'accumulation dans le réticulum endoplasmique de protéines mal conformées. L'activation et la modulation d'IRE1 $\alpha$  sont essentielles pour déterminer le destin cellulaire en réponse à ce stress. Nos résultats indiquent que la mutation d'IRE1 $\alpha$ , identifiée dans une famille souffrant de plusieurs syndromes auto-immuns dont un cas de lupus, provoquerait une modification de la cinétique de son activation, induisant une résistance à l'apoptose extrinsèque par diminution de la stabilité de l'ARNm de Caspase-3 et l'activation augmentée dans le temps de sa fonction pro-survie liée à l'épissage d'XBP1. L'induction de cette résistance permettrait en retour aux cellules immunitaires auto-réactives telles que les lymphocytes B ou T d'initier une réponse auto-immune en échappant à la mort induite par les mécanismes de la tolérance. *PIK3R2*, codant p85 $\beta$ , est un régulateur de la voie PI3K, s'associant à p110 afin de moduler son transport à la membrane tout en le maintenant sous forme inactive. En cas d'activation par induction du TCR ou détection de facteurs de croissance, p85 $\beta$  se détachera de p110, activant ainsi la voie PI3K. Des mutations gain de fonction de *PRKCD* (p110 $\delta$ ) et *PIK3R1* (p85 $\alpha$ ) provoquant une activation constitutive de la voie ont déjà été identifiées comme inductrices de l'APDS, un syndrome d'immunodéficience ; la mutation *PIK3R2* semble être un bon candidat pour expliquer le développement de l'auto-immunité dans cette famille et nécessitera une attention toute particulière.

Les résultats de cette étude renforcent l'idée proposée par la littérature scientifique actuelle que la protéine IRE1 $\alpha$  possède une fonction importante dans l'immunité,

complémentaire à celle de l'adaptation de la cellule au stress du réticulum endoplasmique. Si les résultats obtenus dans le modèle B-EBV utilisé dans notre laboratoire se confirment dans les cellules primaires de la patiente et le modèle murin actuellement à l'étude, nous proposons que l'épissage d'XBP1 soit utilisé comme critère de discrimination pour les patients dont l'auto-immunité serait dû à une activation défectueuse de la voie IRE1 $\alpha$ . Si la proportion de patients atteints d'une auto-immunité propre à cette voie se multiplie, la mise au point d'un test d'analyse transcriptionnel des cibles de l'UPR, similaire à celui utilisé pour la détection des signatures interféron, permettrait de généraliser ce critère de discrimination aux trois voies de l'UPR. L'utilisation d'un tel test permettrait ainsi de déterminer si un patient est atteint d'une auto-immunité induite par l'UPR ainsi que d'identifier laquelle des voies de l'UPR est impliquée dans ce défaut. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques d'IRE1 $\alpha$ , PERK ou ATF6 en fonction des cas rencontrés permettrait ainsi d'agir directement sur la cause de la maladie. De façon plus pragmatique, si la résistance à l'apoptose est observée sur les lymphocytes T en condition de stress du RE ou en présence d'IL6, ce test fonctionnel pourrait être utilisé pour stratifier les patients. Enfin, si la production exacerbée d'IL6 se confirme également, cela pourrait représenter un biomarqueur intéressant et facile d'accès, suggérant l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-IL6 pour renforcer l'arsenal thérapeutique.

Ce travail indique que les causes monogéniques qui prédisposent à la survenue du lupus sont certainement très variées et qu'il faut donc continuer ces études génétiques par « Next Generation Sequencing » afin de décrire les différentes causes génétiques potentiellement associées et de pouvoir identifier de nouvelles cibles thérapeutiques spécifiques.

# Bibliographie

- 1 Mallavarapu, R. K. & Grimsley, E. W. The history of lupus erythematosus. *South Med J* **100**, 896-898, doi:10.1097/SMJ.0b013e318073c9eb (2007).
- 2 Hung, W. T. *et al.* Antinucleosome antibodies as a potential biomarker for the evaluation of renal pathological activity in patients with proliferative lupus nephritis. *Lupus* **20**, 1404-1410, doi:10.1177/0961203311417033 (2011).
- 3 Li, T. *et al.* Anti-nucleosome antibodies outperform traditional biomarkers as longitudinal indicators of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* **54**, 449-457, doi:10.1093/rheumatology/keu326 (2015).
- 4 Tan, E. M. *et al.* The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **25**, 1271-1277 (1982).
- 5 Petri, M. *et al.* Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **64**, 2677-2686, doi:10.1002/art.34473 (2012).
- 6 Petri, M. & Magder, L. Classification criteria for systemic lupus erythematosus: a review. *Lupus* **13**, 829-837, doi:10.1191/0961203304lu2019oa (2004).
- 7 Aringer M, C. K., Brinks R *et al.* Validation of New Systemic Lupus Erythematosus Classification Criteria [abstract]. *Arthritis Rheumatol.*, doi:10.1136/annrheumdis-2018-eular.3679 (2018).
- 8 Margery-Muir, A. A., Bundell, C., Nelson, D., Groth, D. M. & Wetherall, J. D. Gender balance in patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* **16**, 258-268, doi:10.1016/j.autrev.2017.01.007 (2017).
- 9 Cunningham, M. & Gilkeson, G. Estrogen receptors in immunity and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* **40**, 66-73, doi:10.1007/s12016-010-8203-5 (2011).
- 10 Shelly, S., Boaz, M. & Orbach, H. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmun Rev* **11**, A465-470, doi:10.1016/j.autrev.2011.11.009 (2012).
- 11 Rees, F., Doherty, M., Grainge, M. J., Lanyon, P. & Zhang, W. The worldwide incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: a systematic review of epidemiological studies. *Rheumatology (Oxford)* **56**, 1945-1961, doi:10.1093/rheumatology/kex260 (2017).
- 12 Ocampo-Piraquive, V., Nieto-Aristizabal, I., Canas, C. A. & Tobon, G. J. Mortality in systemic lupus erythematosus: causes, predictors and interventions. *Expert Rev Clin Immunol* **14**, 1043-1053, doi:10.1080/1744666X.2018.1538789 (2018).
- 13 Fors Nieves, C. E. & Izmirlly, P. M. Mortality in Systemic Lupus Erythematosus: an Updated Review. *Curr Rheumatol Rep* **18**, 21, doi:10.1007/s11926-016-0571-2 (2016).
- 14 Zhu, T. Y., Tam, L. S. & Li, E. K. Cost-of-illness studies in systemic lupus erythematosus: A systematic review. *Arthritis Care Res (Hoboken)* **63**, 751-760, doi:10.1002/acr.20410 (2011).
- 15 Morgan, C., Bland, A. R., Maker, C., Dunnage, J. & Bruce, I. N. Individuals living with lupus: findings from the LUPUS UK Members Survey 2014. *Lupus* **27**, 681-687, doi:10.1177/0961203317749746 (2018).
- 16 Kent, T., Davidson, A., Newman, D., Buck, G. & D'Cruz, D. Burden of illness in systemic lupus erythematosus: results from a UK patient and carer online survey. *Lupus* **26**, 1095-1100, doi:10.1177/0961203317698594 (2017).
- 17 Arbuckle, M. R. *et al.* Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* **349**, 1526-1533, doi:10.1056/NEJMoa021933 (2003).

- 18 Alarcon-Segovia, D. *et al.* 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, doi:10.1002/art.20999 (2005).
- 19 Deapen, D. *et al.* A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **35**, 311-318 (1992).
- 20 Perdriger, A., Werner-Leyval, S. & Rollot-Elamrani, K. The genetic basis for systemic lupus erythematosus. *Joint Bone Spine* **70**, 103-108 (2003).
- 21 Ballestar, E. Epigenetics lessons from twins: prospects for autoimmune disease. *Clin Rev Allergy Immunol* **39**, 30-41, doi:10.1007/s12016-009-8168-4 (2010).
- 22 Barbhaiya, M. & Costenbader, K. H. Environmental exposures and the development of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* **28**, 497-505, doi:10.1097/BOR.0000000000000318 (2016).
- 23 Kuhn, A. *et al.* Accumulation of apoptotic cells in the epidermis of patients with cutaneous lupus erythematosus after ultraviolet irradiation. *Arthritis Rheum* **54**, 939-950, doi:10.1002/art.21658 (2006).
- 24 Grimaldi, C. M. Sex and systemic lupus erythematosus: the role of the sex hormones estrogen and prolactin on the regulation of autoreactive B cells. *Curr Opin Rheumatol* **18**, 456-461, doi:10.1097/01.bor.0000240354.37927.dd (2006).
- 25 Saha, S., Gonzalez, J., Rosenfeld, G., Keiser, H. & Peeva, E. Prolactin alters the mechanisms of B cell tolerance induction. *Arthritis Rheum* **60**, 1743-1752, doi:10.1002/art.24500 (2009).
- 26 McClain, M. T. *et al.* Early events in lupus humoral autoimmunity suggest initiation through molecular mimicry. *Nat Med* **11**, 85-89, doi:10.1038/nm1167 (2005).
- 27 Query, C. C. & Keene, J. D. A human autoimmune protein associated with U1 RNA contains a region of homology that is cross-reactive with retroviral p30gag antigen. *Cell* **51**, 211-220 (1987).
- 28 Chu, J. L., Drappa, J., Parnassa, A. & Elkon, K. B. The defect in Fas mRNA expression in MRL/lpr mice is associated with insertion of the retrotransposon, ETn. *J Exp Med* **178**, 723-730 (1993).
- 29 Bottini, N. *et al.* A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* **36**, 337-338, doi:10.1038/ng1323 (2004).
- 30 International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus, G. *et al.* 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, doi:10.1038/ng.81 (2008).
- 31 Watford, W. T. & O'Shea, J. J. Human tyk2 kinase deficiency: another primary immunodeficiency syndrome. *Immunity* **25**, 695-697, doi:10.1016/j.immuni.2006.10.007 (2006).
- 32 Jarvinen, T. M. *et al.* Tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 polymorphisms are associated with discoid and subacute cutaneous lupus erythematosus. *Exp Dermatol* **19**, 123-131, doi:10.1111/j.1600-0625.2009.00982.x (2010).
- 33 Han, S. *et al.* Evaluation of imputation-based association in and around the integrin-alpha-M (ITGAM) gene and replication of robust association between a non-synonymous functional variant within ITGAM and systemic lupus erythematosus (SLE). *Hum Mol Genet* **18**, 1171-1180, doi:10.1093/hmg/ddp007 (2009).
- 34 Cui, Y., Sheng, Y. & Zhang, X. Genetic susceptibility to SLE: recent progress from GWAS. *J Autoimmun* **41**, 25-33, doi:10.1016/j.jaut.2013.01.008 (2013).

- 35 Coit, P. *et al.* Renal involvement in lupus is characterized by unique DNA methylation changes in naive CD4<sup>+</sup> T cells. *J Autoimmun* **61**, 29-35, doi:10.1016/j.jaut.2015.05.003 (2015).
- 36 Zhang, Z. *et al.* Interferon regulatory factor 1 marks activated genes and can induce target gene expression in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol* **67**, 785-796, doi:10.1002/art.38964 (2015).
- 37 Zhao, M. *et al.* Increased 5-hydroxymethylcytosine in CD4(+) T cells in systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* **69**, 64-73, doi:10.1016/j.jaut.2016.03.001 (2016).
- 38 Liu, Y. *et al.* MicroRNA-30a promotes B cell hyperactivity in patients with systemic lupus erythematosus by direct interaction with Lyn. *Arthritis Rheum* **65**, 1603-1611, doi:10.1002/art.37912 (2013).
- 39 Stagakis, E. *et al.* Identification of novel microRNA signatures linked to human lupus disease activity and pathogenesis: miR-21 regulates aberrant T cell responses through regulation of PDCD4 expression. *Ann Rheum Dis* **70**, 1496-1506, doi:10.1136/ard.2010.139857 (2011).
- 40 Tsokos, G. C., Lo, M. S., Costa Reis, P. & Sullivan, K. E. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol* **12**, 716-730, doi:10.1038/nrrheum.2016.186 (2016).
- 41 LeFeber, W. P. *et al.* Ultraviolet light induces binding of antibodies to selected nuclear antigens on cultured human keratinocytes. *J Clin Invest* **74**, 1545-1551, doi:10.1172/JCI111569 (1984).
- 42 Silva, M. T. Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Lett* **584**, 4491-4499, doi:10.1016/j.febslet.2010.10.046 (2010).
- 43 Lacks, S. A. Deoxyribonuclease I in mammalian tissues. Specificity of inhibition by actin. *J Biol Chem* **256**, 2644-2648 (1981).
- 44 Takeshita, H. *et al.* Mouse deoxyribonuclease I (DNase I): biochemical and immunological characterization, cDNA structure and tissue distribution. *Biochem Mol Biol Int* **42**, 65-75 (1997).
- 45 Skiljevic, D. *et al.* Serum DNase I activity in systemic lupus erythematosus: correlation with immunoserological markers, the disease activity and organ involvement. *Clin Chem Lab Med* **51**, 1083-1091, doi:10.1515/cclm-2012-0521 (2013).
- 46 Rodriguez, A. M. *et al.* Identification, localization, and expression of two novel human genes similar to deoxyribonuclease I. *Genomics* **42**, 507-513, doi:10.1006/geno.1997.4748 (1997).
- 47 Al-Mayouf, S. M. *et al.* Loss-of-function variant in DNASE1L3 causes a familial form of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* **43**, 1186-1188, doi:10.1038/ng.975 (2011).
- 48 Napirei, M. *et al.* Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. *Nat Genet* **25**, 177-181, doi:10.1038/76032 (2000).
- 49 Bodano, A., Amarelo, J., Gonzalez, A., Gomez-Reino, J. J. & Conde, C. Novel DNASE I mutations related to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **50**, 4070-4071, doi:10.1002/art.20721 (2004).
- 50 Yasutomo, K. *et al.* Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* **28**, 313-314, doi:10.1038/91070 (2001).
- 51 Ozcakar, Z. B. *et al.* DNASE1L3 mutations in hypocomplementemic urticarial vasculitis syndrome. *Arthritis Rheum* **65**, 2183-2189, doi:10.1002/art.38010 (2013).
- 52 Wilber, A., O'Connor, T. P., Lu, M. L., Karimi, A. & Schneider, M. C. Dnase1l3 deficiency in lupus-prone MRL and NZB/W F1 mice. *Clin Exp Immunol* **134**, 46-52 (2003).

- 53 Son, M., Santiago-Schwarz, F., Al-Abed, Y. & Diamond, B. C1q limits dendritic cell differentiation and activation by engaging LAIR-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E3160-3167, doi:10.1073/pnas.1212753109 (2012).
- 54 Santer, D. M. *et al.* C1q deficiency leads to the defective suppression of IFN- $\alpha$  in response to nucleoprotein containing immune complexes. *J Immunol* **185**, 4738-4749, doi:10.4049/jimmunol.1001731 (2010).
- 55 Jozsi, M., Prechl, J., Bajtay, Z. & Erdei, A. Complement receptor type 1 (CD35) mediates inhibitory signals in human B lymphocytes. *J Immunol* **168**, 2782-2788 (2002).
- 56 Kremlitzka, M. *et al.* Complement Receptor Type 1 Suppresses Human B Cell Functions in SLE Patients. *J Immunol Res* **2016**, 5758192, doi:10.1155/2016/5758192 (2016).
- 57 Truedsson, L., Bengtsson, A. A. & Sturfelt, G. Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* **40**, 560-566, doi:10.1080/08916930701510673 (2007).
- 58 Belot, A. & Cimaz, R. Monogenic forms of systemic lupus erythematosus: new insights into SLE pathogenesis. *Pediatr Rheumatol Online J* **10**, 21, doi:10.1186/1546-0096-10-21 (2012).
- 59 Bhattad, S. *et al.* Early Complement Component Deficiency in a Single-Centre Cohort of Pediatric Onset Lupus. *J Clin Immunol* **35**, 777-785, doi:10.1007/s10875-015-0212-y (2015).
- 60 Olsson, R. F. *et al.* Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in the Treatment of Human C1q Deficiency: The Karolinska Experience. *Transplantation* **100**, 1356-1362, doi:10.1097/TP.0000000000000975 (2016).
- 61 Stegert, M., Bock, M. & Trendelenburg, M. Clinical presentation of human C1q deficiency: How much of a lupus? *Mol Immunol* **67**, 3-11, doi:10.1016/j.molimm.2015.03.007 (2015).
- 62 Gomes, R. C. *et al.* Features of 847 Childhood-Onset Systemic Lupus Erythematosus Patients in Three Age Groups at Diagnosis: A Brazilian Multicenter Study. *Arthritis Care Res (Hoboken)* **68**, 1736-1741, doi:10.1002/acr.22881 (2016).
- 63 Garcia-Romo, G. S. *et al.* Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* **3**, 73ra20, doi:10.1126/scitranslmed.3001201 (2011).
- 64 Barton, G. M., Kagan, J. C. & Medzhitov, R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* **7**, 49-56, doi:10.1038/ni1280 (2006).
- 65 Honda, K. *et al.* Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* **434**, 1035-1040, doi:10.1038/nature03547 (2005).
- 66 Papadimitraki, E. D. *et al.* Expansion of toll-like receptor 9-expressing B cells in active systemic lupus erythematosus: implications for the induction and maintenance of the autoimmune process. *Arthritis Rheum* **54**, 3601-3611, doi:10.1002/art.22197 (2006).
- 67 Barbalat, R., Ewald, S. E., Mouchess, M. L. & Barton, G. M. Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu Rev Immunol* **29**, 185-214, doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101340 (2011).
- 68 Pawar, R. D. *et al.* Inhibition of Toll-like receptor-7 (TLR-7) or TLR-7 plus TLR-9 attenuates glomerulonephritis and lung injury in experimental lupus. *J Am Soc Nephrol* **18**, 1721-1731, doi:10.1681/ASN.2006101162 (2007).
- 69 Ramirez-Ortiz, Z. G. *et al.* The receptor TREML4 amplifies TLR7-mediated signaling during antiviral responses and autoimmunity. *Nat Immunol* **16**, 495-504, doi:10.1038/ni.3143 (2015).

- 70 Shen, N. *et al.* Sex-specific association of X-linked Toll-like receptor 7 (TLR7) with male systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 15838-15843, doi:10.1073/pnas.1001337107 (2010).
- 71 Niewold, T. B. Interferon alpha as a primary pathogenic factor in human lupus. *J Interferon Cytokine Res* **31**, 887-892, doi:10.1089/jir.2011.0071 (2011).
- 72 An, J. *et al.* Tartrate-Resistant Acid Phosphatase Deficiency in the Predisposition to Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol* **69**, 131-142, doi:10.1002/art.39810 (2017).
- 73 Briggs, T. A. *et al.* Tartrate-resistant acid phosphatase deficiency causes a bone dysplasia with autoimmunity and a type I interferon expression signature. *Nat Genet* **43**, 127-131, doi:10.1038/ng.748 (2011).
- 74 Mozaffarian, N., Wiedeman, A. E. & Stevens, A. M. Active systemic lupus erythematosus is associated with failure of antigen-presenting cells to express programmed death ligand-1. *Rheumatology (Oxford)* **47**, 1335-1341, doi:10.1093/rheumatology/ken256 (2008).
- 75 Apostolidis, S. A., Crispin, J. C. & Tsokos, G. C. IL-17-producing T cells in lupus nephritis. *Lupus* **20**, 120-124, doi:10.1177/0961203310389100 (2011).
- 76 Crispin, J. C. & Tsokos, G. C. Human TCR-alpha beta+ CD4- CD8- T cells can derive from CD8+ T cells and display an inflammatory effector phenotype. *J Immunol* **183**, 4675-4681, doi:10.4049/jimmunol.0901533 (2009).
- 77 Wong, C. K. *et al.* Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. *Clin Immunol* **127**, 385-393, doi:10.1016/j.clim.2008.01.019 (2008).
- 78 Shivakumar, S., Tsokos, G. C. & Datta, S. K. T cell receptor alpha/beta expressing double-negative (CD4-/CD8-) and CD4+ T helper cells in humans augment the production of pathogenic anti-DNA autoantibodies associated with lupus nephritis. *J Immunol* **143**, 103-112 (1989).
- 79 Yang, X. *et al.* T follicular helper cells mediate expansion of regulatory B cells via IL-21 in Lupus-prone MRL/lpr mice. *PLoS One* **8**, e62855, doi:10.1371/journal.pone.0062855 (2013).
- 80 Choi, J. Y. *et al.* Circulating follicular helper-like T cells in systemic lupus erythematosus: association with disease activity. *Arthritis Rheumatol* **67**, 988-999, doi:10.1002/art.39020 (2015).
- 81 Le Coz, C. *et al.* Circulating TFH subset distribution is strongly affected in lupus patients with an active disease. *PLoS One* **8**, e75319, doi:10.1371/journal.pone.0075319 (2013).
- 82 Jacquemin, C. *et al.* OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. *Immunity* **42**, 1159-1170, doi:10.1016/j.immuni.2015.05.012 (2015).
- 83 Simpson, N. *et al.* Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **62**, 234-244, doi:10.1002/art.25032 (2010).
- 84 Guerrier, T., Youinou, P., Pers, J. O. & Jamin, C. TLR9 drives the development of transitional B cells towards the marginal zone pathway and promotes autoimmunity. *J Autoimmun* **39**, 173-179, doi:10.1016/j.jaut.2012.05.012 (2012).
- 85 Thien, M. *et al.* Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity* **20**, 785-798, doi:10.1016/j.immuni.2004.05.010 (2004).
- 86 Lesley, R. *et al.* Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity* **20**, 441-453 (2004).

- 87 Steinberg, S. F. Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cdelta. *Biochem J* **384**, 449-459, doi:10.1042/BJ20040704 (2004).
- 88 Salzer, E., Santos-Valente, E., Keller, B., Warnatz, K. & Boztug, K. Protein Kinase C delta: a Gatekeeper of Immune Homeostasis. *J Clin Immunol* **36**, 631-640, doi:10.1007/s10875-016-0323-0 (2016).
- 89 Duquesnes, N., Lezoualc'h, F. & Crozatier, B. PKC-delta and PKC-epsilon: foes of the same family or strangers? *J Mol Cell Cardiol* **51**, 665-673, doi:10.1016/j.yjmcc.2011.07.013 (2011).
- 90 Limnander, A. *et al.* Protein kinase Cdelta promotes transitional B cell-negative selection and limits proximal B cell receptor signaling to enforce tolerance. *Mol Cell Biol* **34**, 1474-1485, doi:10.1128/MCB.01699-13 (2014).
- 91 Mecklenbrauker, I., Kalled, S. L., Leitges, M., Mackay, F. & Tarakhovsky, A. Regulation of B-cell survival by BAFF-dependent PKCdelta-mediated nuclear signalling. *Nature* **431**, 456-461, doi:10.1038/nature02955 (2004).
- 92 Miyamoto, A. *et al.* Increased proliferation of B cells and auto-immunity in mice lacking protein kinase Cdelta. *Nature* **416**, 865-869, doi:10.1038/416865a (2002).
- 93 Belot, A. *et al.* Protein kinase cdelta deficiency causes mendelian systemic lupus erythematosus with B cell-defective apoptosis and hyperproliferation. *Arthritis Rheum* **65**, 2161-2171, doi:10.1002/art.38008 (2013).
- 94 Pullabhatla, V. *et al.* De novo mutations implicate novel genes in systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* **27**, 421-429, doi:10.1093/hmg/ddx407 (2018).
- 95 Nanthapaisal, S. *et al.* Early-Onset Juvenile SLE Associated With a Novel Mutation in Protein Kinase C delta. *Pediatrics* **139**, doi:10.1542/peds.2016-0781 (2017).
- 96 de Vries, B. *et al.* TREX1 gene variant in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* **69**, 1886-1887, doi:10.1136/ard.2009.114157 (2010).
- 97 Ellyard, J. I. *et al.* Identification of a pathogenic variant in TREX1 in early-onset cerebral systemic lupus erythematosus by Whole-exome sequencing. *Arthritis Rheumatol* **66**, 3382-3386, doi:10.1002/art.38824 (2014).
- 98 Fredi, M. *et al.* Typing TREX1 gene in patients with systemic lupus erythematosus. *Reumatismo* **67**, 1-7, doi:10.4081/reumatismo.2015.782 (2015).
- 99 Lee-Kirsch, M. A. *et al.* Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* **39**, 1065-1067, doi:10.1038/ng2091 (2007).
- 100 Namjou, B. *et al.* Evaluation of the TREX1 gene in a large multi-ancestral lupus cohort. *Genes Immun* **12**, 270-279, doi:10.1038/gene.2010.73 (2011).
- 101 Ramantani, G. *et al.* Expanding the phenotypic spectrum of lupus erythematosus in Aicardi-Goutieres syndrome. *Arthritis Rheum* **62**, 1469-1477, doi:10.1002/art.27367 (2010).
- 102 Batu, E. D. Monogenic systemic lupus erythematosus: insights in pathophysiology. *Rheumatol Int*, doi:10.1007/s00296-018-4048-7 (2018).
- 103 Gunther, C. *et al.* Defective removal of ribonucleotides from DNA promotes systemic autoimmunity. *J Clin Invest* **125**, 413-424, doi:10.1172/JCI78001 (2015).
- 104 Kretschmer, S. *et al.* SAMHD1 prevents autoimmunity by maintaining genome stability. *Ann Rheum Dis* **74**, e17, doi:10.1136/annrheumdis-2013-204845 (2015).
- 105 Ramantani, G. *et al.* Aicardi-Goutieres syndrome and systemic lupus erythematosus (SLE) in a 12-year-old boy with SAMHD1 mutations. *J Child Neurol* **26**, 1425-1428, doi:10.1177/0883073811408310 (2011).
- 106 Crow, Y. J. *et al.* Characterization of human disease phenotypes associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, ADAR, and IFIH1. *Am J Med Genet A* **167A**, 296-312, doi:10.1002/ajmg.a.36887 (2015).

- 107 Pettersson, M. *et al.* Further evidence for specific IFIH1 mutation as a cause of Singleton-Merten syndrome with phenotypic heterogeneity. *Am J Med Genet A* **173**, 1396-1399, doi:10.1002/ajmg.a.38214 (2017).
- 108 Van Eyck, L. *et al.* Brief Report: IFIH1 Mutation Causes Systemic Lupus Erythematosus With Selective IgA Deficiency. *Arthritis Rheumatol* **67**, 1592-1597, doi:10.1002/art.39110 (2015).
- 109 Levanon, E. Y. *et al.* Systematic identification of abundant A-to-I editing sites in the human transcriptome. *Nat Biotechnol* **22**, 1001-1005, doi:10.1038/nbt996 (2004).
- 110 Rice, G. I. *et al.* Mutations in ADAR1 cause Aicardi-Goutieres syndrome associated with a type I interferon signature. *Nat Genet* **44**, 1243-1248, doi:10.1038/ng.2414 (2012).
- 111 Roers, A., Hiller, B. & Hornung, V. Recognition of Endogenous Nucleic Acids by the Innate Immune System. *Immunity* **44**, 739-754, doi:10.1016/j.immuni.2016.04.002 (2016).
- 112 Liu, Y. *et al.* Activated STING in a vascular and pulmonary syndrome. *N Engl J Med* **371**, 507-518, doi:10.1056/NEJMoa1312625 (2014).
- 113 Ishikawa, H. & Barber, G. N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **455**, 674-678, doi:10.1038/nature07317 (2008).
- 114 Jeremiah, N. *et al.* Inherited STING-activating mutation underlies a familial inflammatory syndrome with lupus-like manifestations. *J Clin Invest* **124**, 5516-5520, doi:10.1172/JCI79100 (2014).
- 115 Kato, Y. *et al.* Apoptosis-derived membrane vesicles drive the cGAS-STING pathway and enhance type I IFN production in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* **77**, 1507-1515, doi:10.1136/annrheumdis-2018-212988 (2018).
- 116 Shinohara, M. L. *et al.* Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol* **7**, 498-506, doi:10.1038/ni1327 (2006).
- 117 Bilginer, Y. *et al.* Three cases of spondyloenchondrodysplasia (SPENCD) with systemic lupus erythematosus: a case series and review of the literature. *Lupus* **25**, 760-765, doi:10.1177/0961203316629000 (2016).
- 118 Girschick, H., Wolf, C., Morbach, H., Hertzberg, C. & Lee-Kirsch, M. A. Severe immune dysregulation with neurological impairment and minor bone changes in a child with spondyloenchondrodysplasia due to two novel mutations in the ACP5 gene. *Pediatr Rheumatol Online J* **13**, 37, doi:10.1186/s12969-015-0035-7 (2015).
- 119 Amoroso, A. *et al.* The unusual association of three autoimmune diseases in a patient with Noonan syndrome. *J Adolesc Health* **32**, 94-97 (2003).
- 120 Alanay, Y., Balci, S. & Ozen, S. Noonan syndrome and systemic lupus erythematosus: presentation in childhood. *Clin Dysmorphol* **13**, 161-163 (2004).
- 121 Lisbona, M. P., Moreno, M., Orellana, C., Gratacos, J. & Larrosa, M. Noonan syndrome associated with systemic lupus erythematosus. *Lupus* **18**, 267-269, doi:10.1177/0961203308094996 (2009).
- 122 Lopez-Rangel, E. *et al.* Systemic lupus erythematosus and other autoimmune disorders in children with Noonan syndrome. *Am J Med Genet A* **139**, 239-242, doi:10.1002/ajmg.a.31017 (2005).
- 123 Leventopoulos, G., Denayer, E., Makrythanasis, P., Papapolychroniou, C. & Fryssira, H. Noonan syndrome and systemic lupus erythematosus in a patient with a novel KRAS mutation. *Clin Exp Rheumatol* **28**, 556-557 (2010).
- 124 Quaio, C. R. *et al.* Autoimmune disease and multiple autoantibodies in 42 patients with RASopathies. *Am J Med Genet A* **158A**, 1077-1082, doi:10.1002/ajmg.a.35290 (2012).

- 125 Bader-Meunier, B. *et al.* Are RASopathies new monogenic predisposing conditions to the development of systemic lupus erythematosus? Case report and systematic review of the literature. *Semin Arthritis Rheum* **43**, 217-219, doi:10.1016/j.semarthrit.2013.04.009 (2013).
- 126 Schubert, S. *et al.* Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nat Genet* **38**, 331-336, doi:10.1038/ng1748 (2006).
- 127 Keilhack, H., David, F. S., McGregor, M., Cantley, L. C. & Neel, B. G. Diverse biochemical properties of Shp2 mutants. Implications for disease phenotypes. *J Biol Chem* **280**, 30984-30993, doi:10.1074/jbc.M504699200 (2005).
- 128 Martinelli, S. *et al.* Diverse driving forces underlie the invariant occurrence of the T42A, E139D, I282V and T468M SHP2 amino acid substitutions causing Noonan and LEOPARD syndromes. *Hum Mol Genet* **17**, 2018-2029, doi:10.1093/hmg/ddn099 (2008).
- 129 Cordeddu, V. *et al.* Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nat Genet* **41**, 1022-1026, doi:10.1038/ng.425 (2009).
- 130 Nocturne, G. & Mariette, X. Advances in understanding the pathogenesis of primary Sjogren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol* **9**, 544-556, doi:10.1038/nrrheum.2013.110 (2013).
- 131 Iwakiri, D. *et al.* Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3. *J Exp Med* **206**, 2091-2099, doi:10.1084/jem.20081761 (2009).
- 132 Nandula, S. R., Scindia, Y. M., Dey, P., Bagavant, H. & Deshmukh, U. S. Activation of innate immunity accelerates sialoadenitis in a mouse model for Sjogren's syndrome-like disease. *Oral Dis* **17**, 801-807, doi:10.1111/j.1601-0825.2011.01839.x (2011).
- 133 Bave, U. *et al.* Activation of the type I interferon system in primary Sjogren's syndrome: a possible etiopathogenic mechanism. *Arthritis Rheum* **52**, 1185-1195, doi:10.1002/art.20998 (2005).
- 134 Gottenberg, J. E. *et al.* Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjogren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2770-2775, doi:10.1073/pnas.0510837103 (2006).
- 135 Fleck, M., Kern, E. R., Zhou, T., Lang, B. & Mountz, J. D. Murine cytomegalovirus induces a Sjogren's syndrome-like disease in C57Bl/6-lpr/lpr mice. *Arthritis Rheum* **41**, 2175-2184, doi:10.1002/1529-0131(199812)41:12<2175::AID-ART12>3.0.CO;2-I (1998).
- 136 Amft, N. *et al.* Ectopic expression of the B cell-attracting chemokine BCA-1 (CXCL13) on endothelial cells and within lymphoid follicles contributes to the establishment of germinal center-like structures in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* **44**, 2633-2641 (2001).
- 137 Salomonsson, S. *et al.* Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* **48**, 3187-3201, doi:10.1002/art.11311 (2003).
- 138 Lavie, F. *et al.* Increase of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) after rituximab treatment: insights into a new regulating system of BAFF production. *Ann Rheum Dis* **66**, 700-703, doi:10.1136/ard.2006.060772 (2007).
- 139 Litinskiy, M. B. *et al.* DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL. *Nat Immunol* **3**, 822-829, doi:10.1038/ni829 (2002).
- 140 Ittah, M. *et al.* Viruses induce high expression of BAFF by salivary gland epithelial cells through TLR- and type-I IFN-dependent and -independent pathways. *Eur J Immunol* **38**, 1058-1064, doi:10.1002/eji.200738013 (2008).

- 141 So, H. C., Gui, A. H., Cherny, S. S. & Sham, P. C. Evaluating the heritability explained by known susceptibility variants: a survey of ten complex diseases. *Genet Epidemiol* **35**, 310-317, doi:10.1002/gepi.20579 (2011).
- 142 Webb, R. *et al.* Early disease onset is predicted by a higher genetic risk for lupus and is associated with a more severe phenotype in lupus patients. *Ann Rheum Dis* **70**, 151-156, doi:10.1136/ard.2010.141697 (2011).
- 143 Hoffman, I. E. *et al.* Juvenile-onset systemic lupus erythematosus: different clinical and serological pattern than adult-onset systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* **68**, 412-415, doi:10.1136/ard.2008.094813 (2009).
- 144 Alcais, A. *et al.* Life-threatening infectious diseases of childhood: single-gene inborn errors of immunity? *Ann N Y Acad Sci* **1214**, 18-33, doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05834.x (2010).
- 145 Sugimoto, M., Tahara, H., Ide, T. & Furuichi, Y. Steps involved in immortalization and tumorigenesis in human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Cancer Res* **64**, 3361-3364, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0079 (2004).
- 146 McCarthy, N. S., Allan, S. M., Chandler, D., Jablensky, A. & Morar, B. Integrity of genome-wide genotype data from low passage lymphoblastoid cell lines. *Genom Data* **9**, 18-21, doi:10.1016/j.gdata.2016.05.006 (2016).
- 147 Londin, E. R. *et al.* Whole-exome sequencing of DNA from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and EBV-transformed lymphocytes from the same donor. *BMC Genomics* **12**, 464, doi:10.1186/1471-2164-12-464 (2011).
- 148 Oh, J. H. *et al.* Genotype instability during long-term subculture of lymphoblastoid cell lines. *J Hum Genet* **58**, 16-20, doi:10.1038/jhg.2012.123 (2013).
- 149 Grafodatskaya, D. *et al.* EBV transformation and cell culturing destabilizes DNA methylation in human lymphoblastoid cell lines. *Genomics* **95**, 73-83, doi:10.1016/j.ygeno.2009.12.001 (2010).
- 150 Caliskan, M., Pritchard, J. K., Ober, C. & Gilad, Y. The effect of freeze-thaw cycles on gene expression levels in lymphoblastoid cell lines. *PLoS One* **9**, e107166, doi:10.1371/journal.pone.0107166 (2014).
- 151 Cahir McFarland, E. D., Izumi, K. M. & Mosialos, G. Epstein-barr virus transformation: involvement of latent membrane protein 1-mediated activation of NF-kappaB. *Oncogene* **18**, 6959-6964, doi:10.1038/sj.onc.1203217 (1999).
- 152 Skinner, C. M., Ivanov, N. S., Barr, S. A., Chen, Y. & Skalsky, R. L. An Epstein-Barr Virus MicroRNA Blocks Interleukin-1 (IL-1) Signaling by Targeting IL-1 Receptor 1. *J Virol* **91**, doi:10.1128/JVI.00530-17 (2017).
- 153 Park, Y. J., Yoo, S. A. & Kim, W. U. Role of endoplasmic reticulum stress in rheumatoid arthritis pathogenesis. *J Korean Med Sci* **29**, 2-11, doi:10.3346/jkms.2014.29.1.2 (2014).
- 154 Tersey, S. A. *et al.* Islet beta-cell endoplasmic reticulum stress precedes the onset of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse model. *Diabetes* **61**, 818-827, doi:10.2337/db11-1293 (2012).
- 155 Picard, C. *et al.* Clinical features and outcome of patients with IRAK-4 and MyD88 deficiency. *Medicine (Baltimore)* **89**, 403-425, doi:10.1097/MD.0b013e3181fd8ec3 (2010).
- 156 Reddy, B. A. *et al.* Nucleotide biosynthetic enzyme GMP synthase is a TRIM21-controlled relay of p53 stabilization. *Mol Cell* **53**, 458-470, doi:10.1016/j.molcel.2013.12.017 (2014).
- 157 Yoshimi, R., Ishigatsubo, Y. & Ozato, K. Autoantigen TRIM21/Ro52 as a Possible Target for Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Int J Rheumatol* **2012**, 718237, doi:10.1155/2012/718237 (2012).

- 158 Lucas, C. L., Chandra, A., Nejentsev, S., Condliffe, A. M. & Okkenhaug, K. PI3Kdelta and primary immunodeficiencies. *Nat Rev Immunol* **16**, 702-714, doi:10.1038/nri.2016.93 (2016).
- 159 Conley, M. E. *et al.* Agammaglobulinemia and absent B lineage cells in a patient lacking the p85alpha subunit of PI3K. *J Exp Med* **209**, 463-470, doi:10.1084/jem.20112533 (2012).
- 160 Zhang, K. J., Husami, A., Marsh, R. & Jordan, M. B. Identification of a phosphoinositide 3-kinase (PI-3K) p110  $\delta$  (PIK3CD) deficient individual. *J. Clin. Immunol.* **33**, 673-674 (2013).
- 161 Riviere, J. B. *et al.* De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat Genet* **44**, 934-940, doi:10.1038/ng.2331 (2012).
- 162 Mirzaa, G. M. *et al.* Characterisation of mutations of the phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit, PIK3R2, in perisylvian polymicrogyria: a next-generation sequencing study. *Lancet Neurol* **14**, 1182-1195, doi:10.1016/S1474-4422(15)00278-1 (2015).
- 163 Schwarz, D. S. & Blower, M. D. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci* **73**, 79-94, doi:10.1007/s00018-015-2052-6 (2016).
- 164 Chakrabarti, A., Chen, A. W. & Varner, J. D. A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnol Bioeng* **108**, 2777-2793, doi:10.1002/bit.23282 (2011).
- 165 McCaffrey, K. & Braakman, I. Protein quality control at the endoplasmic reticulum. *Essays Biochem* **60**, 227-235, doi:10.1042/EBC20160003 (2016).
- 166 Aebi, M., Bernasconi, R., Clerc, S. & Molinari, M. N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem Sci* **35**, 74-82, doi:10.1016/j.tibs.2009.10.001 (2010).
- 167 Ma, Y. & Hendershot, L. M. ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem Neuroanat* **28**, 51-65, doi:10.1016/j.jchemneu.2003.08.007 (2004).
- 168 Rao, R. V., Ellerby, H. M. & Bredesen, D. E. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* **11**, 372-380, doi:10.1038/sj.cdd.4401378 (2004).
- 169 Frand, A. R., Cuzzo, J. W. & Kaiser, C. A. Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends Cell Biol* **10**, 203-210 (2000).
- 170 He, B. Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. *Cell Death Differ* **13**, 393-403, doi:10.1038/sj.cdd.4401833 (2006).
- 171 Sawada, N. *et al.* Involvement of hypoxia-triggered endoplasmic reticulum stress in outlet obstruction-induced apoptosis in the urinary bladder. *Lab Invest* **88**, 553-563, doi:10.1038/labinvest.2008.21 (2008).
- 172 Paschen, W. Endoplasmic reticulum: a primary target in various acute disorders and degenerative diseases of the brain. *Cell Calcium* **34**, 365-383 (2003).
- 173 Yamashita, J.-I. N. a. S. IRE1 encodes a putative protein kinase containing a membrane-spanning domain and is required for inositol phototrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* **6**, 1441-1446, doi:10.1111/j.1365-2958.1992.tb00864.x (1992).
- 174 Cox, J. S., Shamu, C. E. & Walter, P. Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* **73**, 1197-1206 (1993).
- 175 Shamu, C. E. & Walter, P. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J* **15**, 3028-3039 (1996).

- 176 Welihinda, A. A. & Kaufman, R. J. The unfolded protein response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Oligomerization and trans-phosphorylation of Ire1p (Ern1p) are required for kinase activation. *J Biol Chem* **271**, 18181-18187 (1996).
- 177 Cox, J. S. & Walter, P. A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* **87**, 391-404 (1996).
- 178 Sidrauski, C., Cox, J. S. & Walter, P. tRNA ligase is required for regulated mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* **87**, 405-413 (1996).
- 179 Sidrauski, C. & Walter, P. The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* **90**, 1031-1039 (1997).
- 180 Mori, K. Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals. *J Biochem* **146**, 743-750, doi:10.1093/jb/mvp166 (2009).
- 181 Bertolotti, A. *et al.* Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1beta-deficient mice. *J Clin Invest* **107**, 585-593, doi:10.1172/JCI11476 (2001).
- 182 Hetz, C. & Papa, F. R. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell* **69**, 169-181, doi:10.1016/j.molcel.2017.06.017 (2018).
- 183 Calfon, M. *et al.* IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**, 92-96, doi:10.1038/415092a (2002).
- 184 Shen, X. *et al.* Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell* **107**, 893-903 (2001).
- 185 Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. & Mori, K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**, 881-891 (2001).
- 186 Jurkin, J. *et al.* The mammalian tRNA ligase complex mediates splicing of XBP1 mRNA and controls antibody secretion in plasma cells. *EMBO J* **33**, 2922-2936, doi:10.15252/emj.201490332 (2014).
- 187 Kosmaczewski, S. G. *et al.* The RtcB RNA ligase is an essential component of the metazoan unfolded protein response. *EMBO Rep* **15**, 1278-1285, doi:10.15252/embr.201439531 (2014).
- 188 Lu, Y., Liang, F. X. & Wang, X. A synthetic biology approach identifies the mammalian UPR RNA ligase RtcB. *Mol Cell* **55**, 758-770, doi:10.1016/j.molcel.2014.06.032 (2014).
- 189 Acosta-Alvear, D. *et al.* XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cell* **27**, 53-66, doi:10.1016/j.molcel.2007.06.011 (2007).
- 190 Lee, A. H., Iwakoshi, N. N. & Glimcher, L. H. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* **23**, 7448-7459 (2003).
- 191 Hollien, J. & Weissman, J. S. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science* **313**, 104-107, doi:10.1126/science.1129631 (2006).
- 192 Maurel, M., Chevet, E., Tavernier, J. & Gerlo, S. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends Biochem Sci* **39**, 245-254, doi:10.1016/j.tibs.2014.02.008 (2014).
- 193 Nishitoh, H. *et al.* ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* **16**, 1345-1355, doi:10.1101/gad.992302 (2002).
- 194 Castillo, K. *et al.* BAX inhibitor-1 regulates autophagy by controlling the IRE1alpha branch of the unfolded protein response. *EMBO J* **30**, 4465-4478, doi:10.1038/emboj.2011.318 (2011).

- 195 Urano, F. *et al.* Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* **287**, 664-666 (2000).
- 196 Hu, P., Han, Z., Couvillon, A. D., Kaufman, R. J. & Exton, J. H. Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol Cell Biol* **26**, 3071-3084, doi:10.1128/MCB.26.8.3071-3084.2006 (2006).
- 197 Kaneko, M., Niinuma, Y. & Nomura, Y. Activation signal of nuclear factor-kappa B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Biol Pharm Bull* **26**, 931-935 (2003).
- 198 Walter, P. & Ron, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**, 1081-1086, doi:10.1126/science.1209038 (2011).
- 199 McQuiston, A. & Diehl, J. A. Recent insights into PERK-dependent signaling from the stressed endoplasmic reticulum. *F1000Res* **6**, 1897, doi:10.12688/f1000research.12138.1 (2017).
- 200 Harding, H. P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H. & Ron, D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* **5**, 897-904 (2000).
- 201 Harding, H. P. *et al.* An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* **11**, 619-633 (2003).
- 202 B'Chir, W. *et al.* The eIF2alpha/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res* **41**, 7683-7699, doi:10.1093/nar/gkt563 (2013).
- 203 Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T. & Mori, K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* **10**, 3787-3799, doi:10.1091/mbc.10.11.3787 (1999).
- 204 Yamamoto, K. *et al.* Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell* **13**, 365-376, doi:10.1016/j.devcel.2007.07.018 (2007).
- 205 Shoulders, M. D. *et al.* Stress-independent activation of XBP1s and/or ATF6 reveals three functionally diverse ER proteostasis environments. *Cell Rep* **3**, 1279-1292, doi:10.1016/j.celrep.2013.03.024 (2013).
- 206 Harding, H. P., Zhang, Y. & Ron, D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**, 271-274, doi:10.1038/16729 (1999).
- 207 Ogata, M. *et al.* Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* **26**, 9220-9231, doi:10.1128/MCB.01453-06 (2006).
- 208 Shaffer, A. L. *et al.* XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* **21**, 81-93, doi:10.1016/j.immuni.2004.06.010 (2004).
- 209 Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K. & Brewer, J. W. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **167**, 35-41, doi:10.1083/jcb.200406136 (2004).
- 210 Marciniak, S. J. *et al.* CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* **18**, 3066-3077, doi:10.1101/gad.1250704 (2004).
- 211 Zhang, K. & Kaufman, R. J. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* **454**, 455-462, doi:10.1038/nature07203 (2008).
- 212 McCullough, K. D., Martindale, J. L., Klotz, L. O., Aw, T. Y. & Holbrook, N. J. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and

- perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* **21**, 1249-1259, doi:10.1128/MCB.21.4.1249-1259.2001 (2001).
- 213 Lin, J. H. *et al.* IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* **318**, 944-949, doi:10.1126/science.1146361 (2007).
- 214 Lin, J. H., Li, H., Zhang, Y., Ron, D. & Walter, P. Divergent effects of PERK and IRE1 signaling on cell viability. *PLoS One* **4**, e4170, doi:10.1371/journal.pone.0004170 (2009).
- 215 Youle, R. J. & Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 47-59, doi:10.1038/nrm2308 (2008).
- 216 Puthalakath, H. *et al.* ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* **129**, 1337-1349, doi:10.1016/j.cell.2007.04.027 (2007).
- 217 Li, J., Lee, B. & Lee, A. S. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J Biol Chem* **281**, 7260-7270, doi:10.1074/jbc.M509868200 (2006).
- 218 Woehlbier, U. & Hetz, C. Modulating stress responses by the UPRosome: a matter of life and death. *Trends Biochem Sci* **36**, 329-337, doi:10.1016/j.tibs.2011.03.001 (2011).
- 219 Rutkowski, D. T. *et al.* Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol* **4**, e374, doi:10.1371/journal.pbio.0040374 (2006).
- 220 Wu, H., Ng, B. S. & Thibault, G. Endoplasmic reticulum stress response in yeast and humans. *Biosci Rep* **34**, doi:10.1042/BSR20140058 (2014).
- 221 Kimata, Y., Oikawa, D., Shimizu, Y., Ishiwata-Kimata, Y. & Kohno, K. A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. *J Cell Biol* **167**, 445-456, doi:10.1083/jcb.200405153 (2004).
- 222 Pincus, D. *et al.* BiP binding to the ER-stress sensor Ire1 tunes the homeostatic behavior of the unfolded protein response. *PLoS Biol* **8**, e1000415, doi:10.1371/journal.pbio.1000415 (2010).
- 223 Credle, J. J., Finer-Moore, J. S., Papa, F. R., Stroud, R. M. & Walter, P. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18773-18784, doi:10.1073/pnas.0509487102 (2005).
- 224 Gardner, B. M. & Walter, P. Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* **333**, 1891-1894, doi:10.1126/science.1209126 (2011).
- 225 Zhou, J. *et al.* The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14343-14348, doi:10.1073/pnas.0606480103 (2006).
- 226 Karagoz, G. E. *et al.* An unfolded protein-induced conformational switch activates mammalian IRE1. *Elife* **6**, doi:10.7554/eLife.30700 (2017).
- 227 Li, H., Korennykh, A. V., Behrman, S. L. & Walter, P. Mammalian endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 signals by dynamic clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 16113-16118, doi:10.1073/pnas.1010580107 (2010).
- 228 Kulak, N. A., Pichler, G., Paron, I., Nagaraj, N. & Mann, M. Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nat Methods* **11**, 319-324, doi:10.1038/nmeth.2834 (2014).
- 229 Sundaram, A., Appathurai, S., Plumb, R. & Mariappan, M. Dynamic changes in complexes of IRE1alpha, PERK, and ATF6alpha during endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* **29**, 1376-1388, doi:10.1091/mbc.E17-10-0594 (2018).
- 230 Amin-Wetzel, N. *et al.* A J-Protein Co-chaperone Recruits BiP to Monomerize IRE1 and Repress the Unfolded Protein Response. *Cell* **171**, 1625-1637 e1613, doi:10.1016/j.cell.2017.10.040 (2017).

- 231 Carrara, M., Prischi, F., Nowak, P. R. & Ali, M. M. Crystal structures reveal transient PERK luminal domain tetramerization in endoplasmic reticulum stress signaling. *EMBO J* **34**, 1589-1600, doi:10.15252/embj.201489183 (2015).
- 232 Kopp, M. C., Nowak, P. R., Larburu, N., Adams, C. J. & Ali, M. M. In vitro FRET analysis of IRE1 and BiP association and dissociation upon endoplasmic reticulum stress. *Elife* **7**, doi:10.7554/eLife.30257 (2018).
- 233 Qiu, Y. *et al.* A crucial role for RACK1 in the regulation of glucose-stimulated IRE1alpha activation in pancreatic beta cells. *Sci Signal* **3**, ra7, doi:10.1126/scisignal.2000514 (2010).
- 234 Chawla, A., Chakrabarti, S., Ghosh, G. & Niwa, M. Attenuation of yeast UPR is essential for survival and is mediated by IRE1 kinase. *J Cell Biol* **193**, 41-50, doi:10.1083/jcb.201008071 (2011).
- 235 Rubio, C. *et al.* Homeostatic adaptation to endoplasmic reticulum stress depends on Ire1 kinase activity. *J Cell Biol* **193**, 171-184, doi:10.1083/jcb.201007077 (2011).
- 236 Sanchez-Alvarez, M., Del Pozo, M. A. & Bakal, C. AKT-mTOR signaling modulates the dynamics of IRE1 RNase activity by regulating ER-mitochondria contacts. *Sci Rep* **7**, 16497, doi:10.1038/s41598-017-16662-1 (2017).
- 237 Vance, J. E. MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond. *Biochim Biophys Acta* **1841**, 595-609, doi:10.1016/j.bbaliip.2013.11.014 (2014).
- 238 Mori, T., Hayashi, T., Hayashi, E. & Su, T. P. Sigma-1 receptor chaperone at the ER-mitochondrion interface mediates the mitochondrion-ER-nucleus signaling for cellular survival. *PLoS One* **8**, e76941, doi:10.1371/journal.pone.0076941 (2013).
- 239 Hetz, C. *et al.* Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science* **312**, 572-576, doi:10.1126/science.1123480 (2006).
- 240 Chae, H. J. *et al.* BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell* **15**, 355-366, doi:10.1016/j.molcel.2004.06.038 (2004).
- 241 Bailly-Maitre, B. *et al.* Hepatic Bax inhibitor-1 inhibits IRE1alpha and protects from obesity-associated insulin resistance and glucose intolerance. *J Biol Chem* **285**, 6198-6207, doi:10.1074/jbc.M109.056648 (2010).
- 242 Bailly-Maitre, B. *et al.* Cytoprotective gene bi-1 is required for intrinsic protection from endoplasmic reticulum stress and ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2809-2814, doi:10.1073/pnas.0506854103 (2006).
- 243 Lisbona, F. *et al.* BAX inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1alpha. *Mol Cell* **33**, 679-691, doi:10.1016/j.molcel.2009.02.017 (2009).
- 244 Perri, E. R., Thomas, C. J., Parakh, S., Spencer, D. M. & Atkin, J. D. The Unfolded Protein Response and the Role of Protein Disulfide Isomerase in Neurodegeneration. *Front Cell Dev Biol* **3**, 80, doi:10.3389/fcell.2015.00080 (2015).
- 245 Osorio, F., Lambrecht, B. & Janssens, S. The UPR and lung disease. *Semin Immunopathol* **35**, 293-306, doi:10.1007/s00281-013-0368-6 (2013).
- 246 Zhou, A. X. & Tabas, I. The UPR in atherosclerosis. *Semin Immunopathol* **35**, 321-332, doi:10.1007/s00281-013-0372-x (2013).
- 247 Manie, S. N., Lebeau, J. & Chevet, E. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 3. Orchestrating the unfolded protein response in oncogenesis: an update. *Am J Physiol Cell Physiol* **307**, C901-907, doi:10.1152/ajpcell.00292.2014 (2014).
- 248 Iwawaki, T. & Oikawa, D. The role of the unfolded protein response in diabetes mellitus. *Semin Immunopathol* **35**, 333-350, doi:10.1007/s00281-013-0369-5 (2013).

- 249 Smith, J. A. A new paradigm: innate immune sensing of viruses via the unfolded protein response. *Front Microbiol* **5**, 222, doi:10.3389/fmicb.2014.00222 (2014).
- 250 Bettigole, S. E. & Glimcher, L. H. Endoplasmic reticulum stress in immunity. *Annu Rev Immunol* **33**, 107-138, doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112116 (2015).
- 251 Reimold, A. M. *et al.* Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* **412**, 300-307, doi:10.1038/35085509 (2001).
- 252 Iwakoshi, N. N. *et al.* Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nat Immunol* **4**, 321-329, doi:10.1038/ni907 (2003).
- 253 Benhamron, S. *et al.* Regulated IRE1-dependent decay participates in curtailing immunoglobulin secretion from plasma cells. *Eur J Immunol* **44**, 867-876, doi:10.1002/eji.201343953 (2014).
- 254 van Anken, E. *et al.* Sequential waves of functionally related proteins are expressed when B cells prepare for antibody secretion. *Immunity* **18**, 243-253 (2003).
- 255 Hu, C. C., Dougan, S. K., McGehee, A. M., Love, J. C. & Ploegh, H. L. XBP-1 regulates signal transduction, transcription factors and bone marrow colonization in B cells. *EMBO J* **28**, 1624-1636, doi:10.1038/emboj.2009.117 (2009).
- 256 Ma, Y., Shimizu, Y., Mann, M. J., Jin, Y. & Hendershot, L. M. Plasma cell differentiation initiates a limited ER stress response by specifically suppressing the PERK-dependent branch of the unfolded protein response. *Cell Stress Chaperones* **15**, 281-293, doi:10.1007/s12192-009-0142-9 (2010).
- 257 Kaser, A. *et al.* XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* **134**, 743-756, doi:10.1016/j.cell.2008.07.021 (2008).
- 258 Adolph, T. E. *et al.* Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature* **503**, 272-276, doi:10.1038/nature12599 (2013).
- 259 Iwakoshi, N. N., Pypaert, M. & Glimcher, L. H. The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *J Exp Med* **204**, 2267-2275, doi:10.1084/jem.20070525 (2007).
- 260 Osorio, F. *et al.* The unfolded-protein-response sensor IRE-1 $\alpha$  regulates the function of CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells. *Nat Immunol* **15**, 248-257, doi:10.1038/ni.2808 (2014).
- 261 Deng, J. *et al.* Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* **24**, 10161-10168, doi:10.1128/MCB.24.23.10161-10168.2004 (2004).
- 262 Jiang, H. Y. *et al.* Phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF-kappaB in response to diverse cellular stresses. *Mol Cell Biol* **23**, 5651-5663 (2003).
- 263 Ozcan, U. *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **306**, 457-461, doi:10.1126/science.1103160 (2004).
- 264 Navid, F. & Colbert, R. A. Causes and consequences of endoplasmic reticulum stress in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol* **13**, 25-40, doi:10.1038/nrrheum.2016.192 (2017).
- 265 Martinon, F., Chen, X., Lee, A. H. & Glimcher, L. H. TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat Immunol* **11**, 411-418, doi:10.1038/ni.1857 (2010).
- 266 Keestra-Gounder, A. M. *et al.* NOD1 and NOD2 signalling links ER stress with inflammation. *Nature* **532**, 394-397, doi:10.1038/nature17631 (2016).
- 267 Bartoszewski, R. *et al.* The unfolded protein response (UPR)-activated transcription factor X-box-binding protein 1 (XBP1) induces microRNA-346 expression that targets

- the human antigen peptide transporter 1 (TAP1) mRNA and governs immune regulatory genes. *J Biol Chem* **286**, 41862-41870, doi:10.1074/jbc.M111.304956 (2011).
- 268 Osowski, C. M. *et al.* Thioredoxin-interacting protein mediates ER stress-induced beta cell death through initiation of the inflammasome. *Cell Metab* **16**, 265-273, doi:10.1016/j.cmet.2012.07.005 (2012).
- 269 Lerner, A. G. *et al.* IRE1alpha induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell Metab* **16**, 250-264, doi:10.1016/j.cmet.2012.07.007 (2012).
- 270 Woo, C. W. *et al.* Adaptive suppression of the ATF4-CHOP branch of the unfolded protein response by toll-like receptor signalling. *Nat Cell Biol* **11**, 1473-1480, doi:10.1038/ncb1996 (2009).
- 271 Woo, C. W., Kutzler, L., Kimball, S. R. & Tabas, I. Toll-like receptor activation suppresses ER stress factor CHOP and translation inhibition through activation of eIF2B. *Nat Cell Biol* **14**, 192-200, doi:10.1038/ncb2408 (2012).
- 272 Hattori, T., Ohoka, N., Hayashi, H. & Onozaki, K. C/EBP homologous protein (CHOP) up-regulates IL-6 transcription by trapping negative regulating NF-IL6 isoform. *FEBS Lett* **541**, 33-39 (2003).
- 273 Marjon, P. L., Bobrovnikova-Marjon, E. V. & Abcouwer, S. F. Expression of the pro-angiogenic factors vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 by human breast carcinomas is responsive to nutrient deprivation and endoplasmic reticulum stress. *Mol Cancer* **3**, 4, doi:10.1186/1476-4598-3-4 (2004).
- 274 Clavarino, G. *et al.* Protein phosphatase 1 subunit Ppp1r15a/GADD34 regulates cytokine production in polyinosinic:polycytidylic acid-stimulated dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 3006-3011, doi:10.1073/pnas.1104491109 (2012).
- 275 Goodall, J. C. *et al.* Endoplasmic reticulum stress-induced transcription factor, CHOP, is crucial for dendritic cell IL-23 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 17698-17703, doi:10.1073/pnas.1011736107 (2010).
- 276 Plazy, C. *et al.* Letter to the Editor: Protein phosphatase 1 subunit Ppp1r15a/GADD34 is overexpressed in systemic lupus erythematosus and related to the expression of type I interferon response genes. *Autoimmun Rev* **18**, 211-213, doi:10.1016/j.autrev.2018.09.007 (2019).
- 277 Wang, J. *et al.* A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse. *J Clin Invest* **103**, 27-37, doi:10.1172/JCI4431 (1999).
- 278 Ron, D. Proteotoxicity in the endoplasmic reticulum: lessons from the Akita diabetic mouse. *J Clin Invest* **109**, 443-445, doi:10.1172/JCI15020 (2002).
- 279 Ghosh, R. *et al.* Allosteric inhibition of the IRE1alpha RNase preserves cell viability and function during endoplasmic reticulum stress. *Cell* **158**, 534-548, doi:10.1016/j.cell.2014.07.002 (2014).
- 280 Chatzikyriakidou, A., Voulgari, P. V. & Drosos, A. A. What is the role of HLA-B27 in spondyloarthropathies? *Autoimmun Rev* **10**, 464-468, doi:10.1016/j.autrev.2011.01.011 (2011).
- 281 Chen, B. *et al.* Role of HLA-B27 in the pathogenesis of ankylosing spondylitis (Review). *Mol Med Rep* **15**, 1943-1951, doi:10.3892/mmr.2017.6248 (2017).
- 282 Wang, Q. *et al.* The ataxia telangiectasia mutated kinase pathway regulates IL-23 expression by human dendritic cells. *J Immunol* **190**, 3246-3255, doi:10.4049/jimmunol.1201484 (2013).
- 283 Marquez, S. *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress Sensor IRE1alpha Enhances IL-23 Expression by Human Dendritic Cells. *Front Immunol* **8**, 639, doi:10.3389/fimmu.2017.00639 (2017).

- 284 Qiu, Q. *et al.* Toll-like receptor-mediated IRE1alpha activation as a therapeutic target for inflammatory arthritis. *EMBO J* **32**, 2477-2490, doi:10.1038/emboj.2013.183 (2013).
- 285 Savic, S. *et al.* TLR dependent XBP-1 activation induces an autocrine loop in rheumatoid arthritis synoviocytes. *J Autoimmun* **50**, 59-66, doi:10.1016/j.jaut.2013.11.002 (2014).
- 286 Heindryckx, F. *et al.* Endoplasmic reticulum stress enhances fibrosis through IRE1alpha-mediated degradation of miR-150 and XBP-1 splicing. *EMBO Mol Med* **8**, 729-744, doi:10.15252/emmm.201505925 (2016).
- 287 Hirabayashi, Y. *et al.* The endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, is a potential triggering antigen for anti-DNA response. *J Immunol* **184**, 3276-3283, doi:10.4049/jimmunol.0900670 (2010).
- 288 Li, W., Tu, D., Brunger, A. T. & Ye, Y. A ubiquitin ligase transfers preformed polyubiquitin chains from a conjugating enzyme to a substrate. *Nature* **446**, 333-337, doi:10.1038/nature05542 (2007).
- 289 Wang, J. *et al.* Deficiency of IRE1 and PERK signal pathways in systemic lupus erythematosus. *Am J Med Sci* **348**, 465-473, doi:10.1097/MAJ.0000000000000328 (2014).
- 290 Todd, D. J. *et al.* XBP1 governs late events in plasma cell differentiation and is not required for antigen-specific memory B cell development. *J Exp Med* **206**, 2151-2159, doi:10.1084/jem.20090738 (2009).
- 291 Stark, A. K., Sriskantharajah, S., Hessel, E. M. & Okkenhaug, K. PI3K inhibitors in inflammation, autoimmunity and cancer. *Curr Opin Pharmacol* **23**, 82-91, doi:10.1016/j.coph.2015.05.017 (2015).
- 292 Burke, J. E. & Williams, R. L. Synergy in activating class I PI3Ks. *Trends Biochem Sci* **40**, 88-100, doi:10.1016/j.tibs.2014.12.003 (2015).
- 293 Okkenhaug, K. Signaling by the phosphoinositide 3-kinase family in immune cells. *Annu Rev Immunol* **31**, 675-704, doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095946 (2013).
- 294 Fruman, D. A. *et al.* Impaired B cell development and proliferation in absence of phosphoinositide 3-kinase p85alpha. *Science* **283**, 393-397 (1999).
- 295 Suzuki, H. *et al.* Xid-like immunodeficiency in mice with disruption of the p85alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Science* **283**, 390-392 (1999).
- 296 Oak, J. S., Chen, J., Peralta, R. Q., Deane, J. A. & Fruman, D. A. The p85beta regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase has unique and redundant functions in B cells. *Autoimmunity* **42**, 447-458 (2009).
- 297 Okkenhaug, K. *et al.* Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice. *Science* **297**, 1031-1034, doi:10.1126/science.1073560 (2002).
- 298 Clayton, E. *et al.* A crucial role for the p110delta subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation. *J Exp Med* **196**, 753-763 (2002).
- 299 Jou, S. T. *et al.* Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110delta in signaling by the B-cell receptor complex. *Mol Cell Biol* **22**, 8580-8591 (2002).
- 300 Ramadani, F. *et al.* The PI3K isoforms p110alpha and p110delta are essential for pre-B cell receptor signaling and B cell development. *Sci Signal* **3**, ra60, doi:10.1126/scisignal.2001104 (2010).
- 301 Okkenhaug, K. *et al.* The p110delta isoform of phosphoinositide 3-kinase controls clonal expansion and differentiation of Th cells. *J Immunol* **177**, 5122-5128 (2006).
- 302 Soond, D. R. *et al.* PI3K p110delta regulates T-cell cytokine production during primary and secondary immune responses in mice and humans. *Blood* **115**, 2203-2213, doi:10.1182/blood-2009-07-232330 (2010).

- 303 Patton, D. T., Wilson, M. D., Rowan, W. C., Soond, D. R. & Okkenhaug, K. The PI3K p110delta regulates expression of CD38 on regulatory T cells. *PLoS One* **6**, e17359, doi:10.1371/journal.pone.0017359 (2011).
- 304 Condliffe, A. M. *et al.* Sequential activation of class IB and class IA PI3K is important for the primed respiratory burst of human but not murine neutrophils. *Blood* **106**, 1432-1440, doi:10.1182/blood-2005-03-0944 (2005).
- 305 Stephens, L., Ellson, C. & Hawkins, P. Roles of PI3Ks in leukocyte chemotaxis and phagocytosis. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 203-213 (2002).
- 306 Hirsch, E. *et al.* Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* **287**, 1049-1053 (2000).
- 307 Sapey, E. *et al.* Phosphoinositide 3-kinase inhibition restores neutrophil accuracy in the elderly: toward targeted treatments for immunosenescence. *Blood* **123**, 239-248, doi:10.1182/blood-2013-08-519520 (2014).
- 308 Fallah, M. P., Chelvarajan, R. L., Garvy, B. A. & Bondada, S. Role of phosphoinositide 3-kinase-Akt signaling pathway in the age-related cytokine dysregulation in splenic macrophages stimulated via TLR-2 or TLR-4 receptors. *Mech Ageing Dev* **132**, 274-286, doi:10.1016/j.mad.2011.05.003 (2011).
- 309 Bai, W. *et al.* TLR3 regulates mycobacterial RNA-induced IL-10 production through the PI3K/AKT signaling pathway. *Cell Signal* **26**, 942-950, doi:10.1016/j.cellsig.2014.01.015 (2014).
- 310 Aksoy, E. *et al.* The p110delta isoform of the kinase PI(3)K controls the subcellular compartmentalization of TLR4 signaling and protects from endotoxic shock. *Nat Immunol* **13**, 1045-1054, doi:10.1038/ni.2426 (2012).
- 311 Guiducci, C. *et al.* PI3K is critical for the nuclear translocation of IRF-7 and type I IFN production by human plasmacytoid dendritic cells in response to TLR activation. *J Exp Med* **205**, 315-322, doi:10.1084/jem.20070763 (2008).
- 312 Suarez-Fueyo, A., Barber, D. F., Martinez-Ara, J., Zea-Mendoza, A. C. & Carrera, A. C. Enhanced phosphoinositide 3-kinase delta activity is a frequent event in systemic lupus erythematosus that confers resistance to activation-induced T cell death. *J Immunol* **187**, 2376-2385, doi:10.4049/jimmunol.1101602 (2011).
- 313 Wang, Y., Zhang, L., Wei, P., Zhang, H. & Liu, C. Inhibition of PI3Kdelta improves systemic lupus in mice. *Inflammation* **37**, 978-983, doi:10.1007/s10753-014-9818-0 (2014).
- 314 Barber, D. F. *et al.* PI3Kgamma inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. *Nat Med* **11**, 933-935, doi:10.1038/nm1291 (2005).
- 315 Suarez-Fueyo, A. *et al.* Inhibition of PI3Kdelta reduces kidney infiltration by macrophages and ameliorates systemic lupus in the mouse. *J Immunol* **193**, 544-554, doi:10.4049/jimmunol.1400350 (2014).
- 316 Venselaar, H., Te Beek, T. A., Kuipers, R. K., Hekkelman, M. L. & Vriend, G. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics* **11**, 548, doi:10.1186/1471-2105-11-548 (2010).
- 317 The UniProt, C. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* **45**, D158-D169, doi:10.1093/nar/gkw1099 (2017).
- 318 Adzhubei, I. A. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* **7**, 248-249, doi:10.1038/nmeth0410-248 (2010).
- 319 Tirasophon, W., Welihinda, A. A. & Kaufman, R. J. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev* **12**, 1812-1824 (1998).

- 320 Oikawa, D., Tokuda, M., Hosoda, A. & Iwawaki, T. Identification of a consensus element recognized and cleaved by IRE1 alpha. *Nucleic Acids Res* **38**, 6265-6273, doi:10.1093/nar/gkq452 (2010).
- 321 Yang, L. *et al.* A Phos-tag-based approach reveals the extent of physiological endoplasmic reticulum stress. *PLoS One* **5**, e11621, doi:10.1371/journal.pone.0011621 (2010).
- 322 Ramaswamy, M., Deng, M. & Siegel, R. M. Harnessing programmed cell death as a therapeutic strategy in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* **7**, 152-160, doi:10.1038/nrrheum.2010.225 (2011).
- 323 Lhomond, S. *et al.* Dual IRE1 RNase functions dictate glioblastoma development. *EMBO Mol Med* **10**, doi:10.15252/emmm.201707929 (2018).
- 324 Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**, 3406-3415 (2003).
- 325 Verfaillie, T. *et al.* PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress. *Cell Death Differ* **19**, 1880-1891, doi:10.1038/cdd.2012.74 (2012).
- 326 Concha, N. O. *et al.* Long-Range Inhibitor-Induced Conformational Regulation of Human IRE1alpha Endoribonuclease Activity. *Mol Pharmacol* **88**, 1011-1023, doi:10.1124/mol.115.100917 (2015).
- 327 Prischi, F., Nowak, P. R., Carrara, M. & Ali, M. M. Phosphoregulation of Ire1 RNase splicing activity. *Nat Commun* **5**, 3554, doi:10.1038/ncomms4554 (2014).
- 328 Han, D. *et al.* IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell* **138**, 562-575, doi:10.1016/j.cell.2009.07.017 (2009).
- 329 Junjappa, R. P., Patil, P., Bhattarai, K. R., Kim, H. R. & Chae, H. J. IRE1alpha Implications in Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Development and Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Front Immunol* **9**, 1289, doi:10.3389/fimmu.2018.01289 (2018).
- 330 Bergmann, T. J. *et al.* Chemical stresses fail to mimic the unfolded protein response resulting from luminal load with unfolded polypeptides. *J Biol Chem* **293**, 5600-5612, doi:10.1074/jbc.RA117.001484 (2018).

# Table des figures

## FIGURES

---

FIGURE 1 : SCHEMA DES ETAPES DE DEVELOPPEMENT DU LUPUS	8
FIGURE 2 : SCHEMA DE LA VOIE CLASSIQUE DU COMPLEMENT	12
FIGURE 3 : SCHEMA-BILAN DES VOIES IMPLIQUEES DANS LE DEVELOPPEMENT DU LES	24
FIGURE 4 : MODELE DU RISQUE GENETIQUE DE DEVELOPPEMENT D'UNE MALADIE AUTO-IMMUNE EN FONCTION DE L'AGE	29
FIGURE 5 : STRATEGIE DE SELECTION DES VARIANTS OBTENUS PAR WHOLE EXOME SEQUENCING	30
FIGURE 6 : ARBRE GENEALOGIQUE ET SEQUENÇAGE D'ERN1 DANS LA FAMILLE A	32
FIGURE 7 : ARBRE GENEALOGIQUE ET SEQUENÇAGE DE PIK3R2 DANS LA FAMILLE B	35
FIGURE 8 : MATURATION DES PROTEINES DANS LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE	39
FIGURE 9 : VOIE IRE1P-HAC1 CHEZ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	41
FIGURE 10 : MODELE D'ACTIVATION DE L'UPR	43
FIGURE 11 : SCHEMA DE L'UPR INDUITE	44
FIGURE 12 : CINETIQUE DE LA SIGNALISATION DE L'UPR	46
FIGURE 13 : STRUCTURE DE LA PROTEINE D'IRE1A	49
FIGURE 14 : MODELE D'ACTIVATION D'IRE1A PAR DISSOCIATION DE BiP	49
FIGURE 15 : MODELE D'ACTIVATION D'IRE1A PAR LIAISON DIRECTE AUX PROTEINES	52
FIGURE 16 : MODELE D'ACTIVATION DE L'UPR PAR EQUILIBRE DES FORMES MONOMERES ET OLIGOMERES DES INDUCTEURS PRESENTES DANS LA MEMBRANE DU RE	52
FIGURE 17 : MODELE D'INTERACTION ENTRE IRE1A, BiP ET ERDJ4	53
FIGURE 18 : MODELE DE DESACTIVATION D'IRE1A PAR LA VOIE AKT/MTOR	54
FIGURE 19 : ACTIVITES ET CONSEQUENCES DE L'ACTIVITE D'IRE1A EN FONCTION DU TYPE D'ACTIVATION ET DE L'UPROSOME	57
FIGURE 20 : INDUCTION DES VOIES NF-KB ET JNK PAR L'UPR	60
FIGURE 21 : LIENS ENTRE IRE1A ET L'IMMUNITE	62
FIGURE 22 : SCHEMA D'ACTIVATION DE LA VOIE PI3K	66
FIGURE 23 : SCHEMA DES DOMAINES DE P110 $\delta$ ET P85 REPRESENTANT LEURS LIAISONS STRUCTURELLES ET INHIBITRICES	67
FIGURE 24 : IMAGES DE LA STRUCTURE 3D D'IRE1A CENTREE SUR L'ACIDE AMINE 594	77
FIGURE 25 : TEST DE LA CAPACITE D'IRE1 A REALISER UNE TRANSPHOSPHORYLATION	79
FIGURE 26 : TEST DE L'ACTIVITE RNASE D'IRE1	80
FIGURE 27 : GENERATION D'UNE LIGNEE B-EBV KO POUR IRE1A	81
FIGURE 28 : ANALYSE DE L'EXPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE ET PROTEIQUE D'IRE1A DANS DES LIGNEES B-EBV	83
FIGURE 29 : ANALYSE DE L'UPR ET DES CONSEQUENCES DE LA MUTATION SUR LA VOIE IRE1A-XBP1	87
FIGURE 30 : TESTS DE LA FONCTION CYTOKINIQUE DE LA FAMILLE A	89
FIGURE 31 : ANALYSE DE L'APOPTOSE EXTRINSEQUE INDUITE PAR FASL DANS DES B-EBV	90
FIGURE 32 : ANALYSE DE L'APOPTOSE INDUITE DANS DES B-EBV	92
FIGURE 33 : ANALYSE DE LA VOIE EXTRINSEQUE DE L'APOPTOSE	93
FIGURE 34 : ANALYSE DE L'ACTIVITE DU RIDD SUR L'ARNM DE CASPASE-3	95
FIGURE 35 : ANALYSE DE LA PHOSPHORYLATION D'AKT DANS LES LIGNEES B-EBV	97
FIGURE 36 : MODELE D'ACTIVATION NORMAL ET PATHOLOGIQUE D'IRE1A PROPOSE A PARTIR DE L'ANALYSE DE LA MUTATION R594C D'IRE1A	111

## **TABLEAUX**

---

TABLEAU 1 : EXEMPLES DE FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX, GENETIQUES ET EPIGENETIQUES AUGMENTANT LA SUSCEPTIBILITE AU LES	9
TABLEAU 2 : CRITERES D'INCLUSION ET D'EXCLUSION DES PATIENTS DANS L'ETUDE	29
TABLEAU 3 : ANALYSE IN SILICO DES VARIANTS CANDIDATS OBTENUS PAR WES	33
TABLEAU 4 : ANALYSE IN SILICO DU VARIANT CANDIDANT PIK3R2 OBTENU PAR WES	35
TABLEAU 5 : RESUME DES RESULTATS D'ANALYSE DE HOPE	77
TABLEAU 6 : LISTE DES MUTATIONS DES GENES IMPLIQUES DANS L'UPR RETROUVES DANS DES FAMILLES ATTEINTES DE SYNDROMES AUTO-IMMUNS PRESENTES AU LABORATOIRE	104