



HAL
open science

Approche immunoprotéomique : valeurs et limites pour l'identification de réactivités discriminantes d'anticorps auto-immuns

Sylvain Dubucquoi

► **To cite this version:**

Sylvain Dubucquoi. Approche immunoprotéomique : valeurs et limites pour l'identification de réactivités discriminantes d'anticorps auto-immuns. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2012. Français. NNT : 2012LIL2S036 . tel-00842782

HAL Id: tel-00842782

<https://theses.hal.science/tel-00842782>

Submitted on 9 Jul 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse

Pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Lille 2
Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue par

Sylvain Dubucquoi

Le 21 décembre 2012

Approche immunoprotéomique :

**Valeurs et limites pour l'identification de réactivités
discriminantes d'anticorps auto-immuns.**

JURY

Professeur Myriam **LABALETTE** : Présidente
Professeur Jean Louis **PASQUALI** : Rapporteur
Professeur Frédéric **BATTEUX** : Rapporteur
Professeur David **LAUNAY** : Examineur
Docteur Sébastien **LACROIX-DESMAZES** : Examineur
Professeur Lionel **PRIN** : Directeur de thèse

Ce travail n'aurait jamais pu être exposé sous cette forme sans l'aide de trois personnes :

- *Le Docteur Didier LEFRANC et Madame Virginie DUTOIT-LEFEVRE qui ont orchestré toute la mise en œuvre technique des méthodes qui seront développées dans ce document.*
- *Le professeur Lionel PRIN qui m'a accompagné dans les ultimes étapes de rédaction.*

J'espère ne pas avoir trahi votre confiance. Je vous exprime mes plus sincères remerciements et ma plus vive sympathie.

*Aux miens, merci de votre indéfectible soutien, et de votre bonne humeur
Puisse la Curiosité vous donner cette insatiable envie de comprendre...*

Remerciements

À mes rapporteurs et juges,

Les Professeur Jean Louis PASQUALI et Frédéric BATTEUX

Vous avez immédiatement accepté de juger ce travail. Je vous remercie de l'attention que vous avez bien voulu y porter, et des conseils et corrections que vous m'avez apportés, malgré les délais qui vous ont été accordés pour la rédaction du rapport.

À mes examinateurs et juges,

Madame le Professeur Myriam HOUACHE-LABALLETTE

Myriam, tu m'as fait le grand plaisir d'accepter de juger ce travail malgré les charges qui sont les tiennes. Ton soutien, tes encouragements sont une aide précieuse. Ta rigueur, ton investissement à la bonne marche du service sont des exemples pour moi. Je suis heureux de travailler avec toute l'équipe à tes côtés. Un grand merci, très sincèrement.

Monsieur le Docteur Sébastien-Lacroix Desmazes

Vous avez spontanément accepté de juger ce travail, alors que vous ignoriez combien vos propres travaux avaient été fondateurs pour notre équipe. C'est un réel plaisir que de partager avec vous notre vision du fonctionnement du système immunitaire.

Monsieur le Professeur David LAUNAY

David, tu me fais l'amitié de juger ce travail. Je sais pourtant combien tes journées (et tes nuits !) sont remplies. J'y suis très sensible. Je suis sincèrement très heureux que nos chemins se soient croisés et combien nous profitons de ton énergie pour faire avancer ce projet d'immunoprotéomique et tant d'autres dans ce passionnant domaine des maladies auto-immunes et de la Médecine Interne.

À mon directeur de thèse, Le Professeur Lionel PRIN

J'ai le plaisir de travailler à vos côtés depuis 1997. Vous m'avez accordé beaucoup de confiance, c'est une chance pour moi. Les épreuves de la vie quotidienne nous ont rapprochés, et vous m'avez fait le plaisir de partager vos réflexions, vos connaissances avec ô combien de passion ! J'ai énormément appris avec vous, tant sur le plan professionnel (philosophique ;-)) que personnel (« c'est au travers des yeux des autres qu'on se voit le mieux »).
Votre gentillesse et votre générosité sont exemplaires. J'espère pouvoir à mon tour partager l'enseignement (tant dans le fond que dans la forme) que vous m'avez prodigué, avec les élèves que j'aurai moi-même à former.
Enfin, le soin que vous avez mis à la relecture de ce document m'a beaucoup touché, je tiens encore à vous exprimer toute ma reconnaissance.

Je tiens également à remercier

Monsieur le Professeur Jean Paul DESSAINT.

Vous m'avez accueilli au sein de votre service dès 1992.

Ce que je sais de l'Immunologie, je vous le dois pour l'essentiel, et le reste, vous m'avez donné l'envie de le découvrir.

Vous m'avez appris mon métier de biologiste et de responsable. Vous m'avez accordé votre confiance. Je vous dois beaucoup.

Merci, sincèrement.

Et encore ...

Mesdames Séverine BRABANT et Anne Sophie DELEPLANCQUE, Vincent ELSERMANS

Sans l'aide que vous m'avez apportée dans la gestion quotidienne de notre Unité

Fonctionnelle, je n'aurais pas pu m'engager vers cette nouvelle voie. Merci.

J'ai besoin de vous.

J'ai la chance d'avoir une équipe technique formidable. Vous êtes une famille pour moi. Vous m'avez appris beaucoup. GRAND MERCI à vous toutes (et tous !)

Chantal, Elisabeth, Sandrine, Laure, Jérôme, Cédric, Sylvie, Dominique, Julie, Isabelle.

Un clin d'œil particulier à Carine qui m'a souvent évité de verser dans l'auto-apitoiement, ces dernières semaines.

Mesdames les secrétaires, Sylvie, Yamina, Pascale. Venir vous saluer le matin est une bouffée d'oxygène. Merci pour toute l'aide que vous nous apportez au quotidien et votre constante bonne humeur.

Vingt ans à arpenter les couloirs du laboratoire d'immunologie, nécessairement, ça crée des liens. À évoquer votre prénom, un sourire me vient. Merci de toute la sympathie que vous me témoignez :

Véro, Véronique (!), Jacques, Virginie, Malika pour le « Cellulaire »

Sylviane, Dominique, Pascale, Johan, Maryse, Eve-Marie, Céline, Cécile, Liliane, Colette, pour le « HLA »

A Françoise DUFOSSÉ, pour notre complicité qui s'exprime au travers de l'humour, merci.

Aux plus jeunes recrues, que j'ai eu la chance de former en partie :

Isabelle RAYMOND-TOP, et Vincent ELSERMANS (tu as de la chance tu es remercié deux fois, mais tu le mérites). Toute l'équipe compte beaucoup sur vous deux : restez tels que vous êtes, simples, humains et enthousiastes. Vincent, si tu trouves des fautes d'orthographe, c'est que je sais que tu aimes les corriger ☺.

A toute l'équipe du « CESI », auquel j'ajoute Monsieur le Professeur Jean Rousseau. Merci pour tout ce travail fait ensemble, et pour la bonne humeur partagée.

<http://biologiepathologie.chru-lille.fr/>

A ceux qui travaillent au pôle Recherche de la Faculté de Médecine, je tiens à leur exprimer ma sympathie

J'ai déjà remercié mon ami Didier, mais je tiens encore à lui dire tout le plaisir que j'ai eu à travailler avec lui depuis qu'il a intégré le laboratoire. « Tu as mis mes rêves d'immunologie en musique, Camarade ». Ta façon de tout expliquer avec simplicité force le respect. Encore un grand merci pour ta générosité et pour toutes ces anecdotes que tu m'as racontées avec tant d'humour.

Virginie, c'est un réel plaisir que de travailler avec toi. C'est aussi une grande fierté pour moi que d'avoir un peu accompagné ton parcours. Je tiens à saluer ta rigueur, ta capacité de travail, ton humanité. Merci pour tout.

Mon ami Guillaume a eu l'intelligence de t'épouser (tu as beaucoup de chance aussi, ne vas pas te monter la tête ;-)). Je vous remercie tous les deux, vous êtes des exemples qui me permettent d'espérer encore. La vie puisse vous épargner les tourments.

Maité, Vincent, vous avez eu la chance d'être formés par Virginie. En retour nous avons la chance que vous partagiez notre quotidien (oui Vincent, tu es à peine parti qu'on souhaite déjà que tu reviennes !). Merci pour ce travail de qualité que vous avez mené avec enthousiasme durant cette année 2012.

Merci Bénédicte, Marine votre sympathie me touche

A ceux qui fréquentent le laboratoire, ou l'ont fréquenté

Patrick VERMERSCH, Jérôme de SEZE, Hélène ZÉPHIR (et ceux qui vous sont proches) : je suis heureux de graviter autour du monde de la Neurologie et des Neurologues qui l'habitent. Merci de la confiance que vous m'accordez.

Elisabeth SOLAU-GERVAIS, Emmanuelle PROUST-LEMOINE, merci pour ces moments de sympathie partagés dans le travail, et de la confiance là encore, accordée. (oui, les finances aussi ! ;-)

Guillaume LEFÈVRE, la meilleure chose qui te sois arrivé, c'est faire de l'immunologie. J'espère que tu en es convaincu. Nous, nous le sommes et on va en profiter. Merci pour tout ce tu nous as déjà apporté, et tout ce qu'on va maintenant partager. Je m'en fais déjà une grande joie.

À tous nos étudiants de DEA, Master...et autres stagiaires, merci, j'ai beaucoup appris auprès de vous.

Merci à Madame Laurence FOFANA, pour son aide matérielle et la sympathie qu'elle m'a toujours réservée.

Merci à Monsieur Nick BARTON, pour son soutien linguistique, sa disponibilité et sa gentillesse « so british ».

Puisque ces mystères nous dépassent, feignons d'en être les organisateurs.

Jean COCTEAU, extrait « des Mariés de la Tour Eiffel »

| | |
|--|-----------|
| ABRÉVIATIONS | 5 |
| RÉSUMÉ & ABSTRACT | 9 |
| INTRODUCTION..... | 12 |
| INTRODUCTION GÉNÉRALE | 13 |
| I] ONTOGÉNIE, SURVIE ET DÉVELOPPEMENT DES LYMPHOCYTES B : RÔLE DE LA RECONNAISSANCE DU SOI | 16 |
| <i>I-A] Autoréactivité et homéostasie des lymphocytes B ?</i> | <i>16</i> |
| Introduction | 16 |
| 1) Ontogénie et développement des lymphocytes B « B2 » | 17 |
| 1-1) Une première étape critique : la constitution du pré-BCR | 17 |
| 1-2) Signaux de survie délivrés au LB immature qui exprime le pré-BCR | 19 |
| 2) Signaux de survie du pré-B au B immature | 22 |
| 2-1) Du pré-BCR au BCR | 22 |
| 2-2) Le « BCR editing » : une révision élargie pour protéger et/ou pour diversifier ? | 23 |
| 2-3) Conclusion | 26 |
| 3) Devenir du lymphocyte B immature au sortir de la moelle osseuse..... | 27 |
| 3-1) Rôle du BCR et de BAFF | 28 |
| 3-2) LB T2 : une cellule « carrefour » | 31 |
| 4) Facteurs de survie des cellules B et homéostasie | 40 |
| 4-1) Cellules matures | 40 |
| 4-2) Cellules mémoire | 41 |
| 4-3) Plasmocytes | 41 |
| <i>I B] Immunité innée et homéostasie des lymphocytes B</i> | <i>42</i> |
| 1) Système du complément et autoréactivité | 43 |
| 1-1) Récepteurs du complément et dualité fonctionnelle | 43 |
| 1-2) Récepteurs du complément et autoréactivité B | 44 |
| 1-3) Système du complément et autoréactivité B | 44 |
| 2) Récepteurs Toll like (TLR) et autoréactivité. | 45 |
| 2-1) TLR et lymphocytes B | 45 |
| 2-2) Ligands des TLR | 46 |
| <i>I-C] Synthèse.....</i> | <i>49</i> |
| II] LE RÉPERTOIRE DES ANTICORPS ; LA PLACE DE L'AUTORÉACTIVITÉ | 50 |
| <i>II A] Le répertoire des Ac et autoréactivité physiologique.....</i> | <i>51</i> |
| 1) Répertoire adaptatif et autoréactivité | 51 |
| 2) Répertoires naturels des anticorps : ses caractéristiques..... | 52 |
| 2-1) Propriétés des Ac naturels : des caractéristiques encore mal définies. | 53 |
| 2-2) Cible des Ac naturels | 54 |
| 2-3) Répertoire naturel : ontogénie, développement et régulation | 57 |
| 2-4) Le réseau idiotypique | 60 |
| <i>II B] Répertoire des Ac et autoréactivité pathologique.</i> | <i>61</i> |
| 1) Autoréactivité pathologique : facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux. | 62 |
| 1-1) Auto-immunité et contrôle de la réponse auto-immune. | 63 |
| 1-2) Facteurs de susceptibilité spécifiques des LB. | 66 |
| 2) Souffrance cellulaire et autoréactivité..... | 68 |

| | |
|---|-----------|
| 2-1) Mécanismes physiologiques : Signaux émis par la cellule en apoptose | 69 |
| 2-2) Réponse de la cellule phagocytaire | 70 |
| III] CONCLUSION | 74 |
| IV] OBJECTIF : RECHERCHE DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS DANS LES MALADIES AUTO-IMMUNES | 75 |
| Le premier axe | 76 |
| Le deuxième axe | 76 |
| MÉTHODES..... | 77 |
| A] IMMUNO-EMPREINTE MONODIMENSIONNELLE | 78 |
| I] Aspect technique | 78 |
| II] Analyse des images d'immuno-empreinte..... | 78 |
| 1) Repérage des bandes de réactivités | 78 |
| 2) Analyse statistique | 79 |
| B] IMMUNOPROTÉOMIQUE BIDIMENSIONNELLE | 81 |
| 1) <i>Extraction protéique</i> | 81 |
| 2) <i>Iso-électrofocalisation</i> | 81 |
| - Réhydratation des strips. | 81 |
| - Isoélectrofocalisation (IEF)..... | 81 |
| 3) <i>Electrophorèse bidimensionnelle</i> | 81 |
| 4) <i>Caractérisation moléculaire</i> | 81 |
| C] RECHERCHE DE SIMILITUDES DE SÉQUENCE : | 82 |
| RÉSULTATS ET DISCUSSION | 83 |
| I] IDENTIFICATION DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS D'AUTO-IMMUNITÉ : UNE PREMIÈRE APPROCHE CONVENTIONNELLE | 84 |
| 1) La désamination enzymatique : processus physiologique | 84 |
| 2) Citrullination et polyarthrite rhumatoïde | 84 |
| 3) Citrullination et sclérose en plaques..... | 85 |
| Article 1 | 87 |
| Article 2 | 92 |
| 4) Synthèse de ces travaux et discussion des articles 1et 2 | 99 |
| II] IDENTIFICATION DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS DE L'AUTO-IMMUNITÉ : UNE NOUVELLE APPROCHE SANS <i>A PRIORI</i> | 100 |
| 1) L'analyse sans « <i>a priori</i> » du répertoire autoréactif permet-elle de révéler la signature d'un processus pathologique ? | 100 |
| 2) Analyse globale des profils de réactivités sériques chez des patients souffrants de pathologies neurologiques centrales à composante auto-immune : Sclérose en plaques, neuro-lupus, neuro-Sjögren. | 101 |
| Article 3 | 103 |
| Article 4 | 113 |
| Article 5 | 123 |
| 3) Synthèse des résultats obtenus et discussion des articles 3,4 et 5..... | 137 |
| III] QUEL EST LE SENS DES MODIFICATIONS DU RÉPERTOIRE DES AUTO-ANTICORPS OBSERVÉES. | 143 |
| 1) Impact des thérapeutiques sur ces profils de réactivité. | 143 |
| Article 6 | 144 |
| 2) Synthèse des résultats et discussion de l'article 6 | 152 |
| 3) Analyse des profils de réactivité des IgG sériques dans le modèle d'EAE | 154 |
| Article 7 | 155 |
| 4) Synthèse des résultats et discussion de l'article 7 | 167 |
| 5) Valeur prédictive des modifications de profils de réactivités. | 168 |
| Article 8 | 169 |
| 6) Synthèse des résultats et discussion de l'article 8 | 177 |

| | |
|---|-----|
| 7) Quelle sont les parts respectives des répertoires naturel et adaptif qui se modifient au cours des pathologies auto-immunes ?..... | 177 |
| Article 9 | 179 |
| 7) Synthèse des résultats et discussion de l'article 9 | 204 |



DISCUSSION GÉNÉRALE.....205

PERSPECTIVES205

Comment optimiser les conditions de ciblage des antigènes d'intérêt afin de disposer de sondes diagnostiques performantes ? 206

Comment intégrer les notions de plasticité du répertoire autoréactif et situer la place du répertoire naturel et/ ou adaptatif pour mieux appréhender la signification des profils singuliers d'autoréactivité dans un contexte pathologique ? 217

CONCLUSION.....219

ANNEXES221

Annexe 1. 222

Annexe 2. 223

Annexe 3. 224

Annexe 4. 225

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES226

TABLE DES TABLEAUX ET FIGURES



| | |
|---|-----|
| Tableau 1 : Caractéristiques des antigènes les définissant comme cibles privilégiées de l'autoréactivité | 15 |
| Figure 1 : Différentes étapes de maturation des lymphocytes B dits B2, dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires. | 17 |
| Figure 2 : Conséquence de l'association (ou non) de la chaîne lourde C μ et du substitut de chaîne légère (« SLC ») | 18 |
| Figure 3 : Signaux de survie engagés par le pré-BCR au stade de cellule immature dans la moelle osseuse | 21 |
| Figure 4 : La sélection clonale selon le modèle classique | 24 |
| Figure 5 : Poids de la relation pouvant exister entre « expression du BCR » et « l'auto-immunité » pour la constitution du répertoire périphérique. | 26 |
| Figure 6 : Avantages liés au caractère autoréactif du pré-BCR et du BCR. | 27 |
| Tableau 2 : Phénotype des LB en fonction de leur stade de maturation | 28 |
| Figure 7 : Équilibre des signaux délivrés aux lymphocytes B immatures au stade transitionnel T2. | 31 |
| Figure 8 : le LB T2 est une cellule « carrefour ». | 32 |
| Figure 9 : Différentes voies de production des lymphocytes MZB. | 34 |
| Figure 10 : Figure 1 extraite de l'article de Wardeman <i>et al.</i> | 35 |
| Figure 11 : Étapes d'activation du LB Fo par un exo-Ag au sein de l'organe lymphoïde secondaire. Place des différents acteurs. | 38 |
| Figure 12 : Comme pour le LB T2, la complémentarité des signaux délivrés par le BCR et BAFF est nécessaire à la survie des LB matures | 41 |
| Figure 13 : Ensemble des récepteurs exprimés par le LB mature et capacités d'interaction avec différents partenaires de la réponse immunitaire. | 43 |
| Tableau 3 : Présentation des différents TLR chez l'homme | 47 |
| Figure 14 : Maturation des LB B2 et constitution du répertoire. Siège des différents niveaux de contrôles et mécanismes impliqués. | 49 |
| Figure 15 : Multiplicité des fonctions des LB : quel est le rôle de la reconnaissance antigénique dans le contrôle de ces fonctions ? | 50 |
| Figure 16 : Schéma représentatif de l'ensemble des auto-antigènes susceptibles d'être reconnus par les Ac naturels | 56 |
| Tableau 4 : fonctions associées aux Ac naturels | 58 |
| Figure 17 : Représentation schématique des homonculus et immunculus | 60 |
| Figure 18 : Autoréactivités physiologique et pathologique. | 63 |
| Tableau 5 : Exemples de facteurs de contrôle de la réponse immunitaire | 64 |
| Figure 19 : Impact des gènes dans le contrôle de la réponse immunitaire | 65 |
| Tableau 6 : Facteurs prédisposant à l'émergence d'une maladie auto-immune. | 66 |
| Tableau 7 : Anomalies de l'ontogénie et de l'homéostasie des LB pouvant conduire à une autoréactivité pathologique. | 68 |
| Figure 20 : Six questions pour illustrer les éléments du contrôle de la réponse immunitaire (« tolérance » ou « réponse inflammatoire ») dans la gestion de l'élimination des cellules en apoptose. | 73 |
| Tableau 8 : Tableau de données fictives pour illustrer les performances de la LDA. | 80 |
| Tableau 9 : Antigènes cibles de réactivités décrites comme spécifiques de pathologies dans différentes maladies et même chez le sujet sain | 142 |
| Figure 21 : Figure 4 extraite de l'article d'Almeras <i>et al.</i> | 153 |
| Figure 23 : Principes méthodologiques de l'IPBDF | 222 |
| Figure 24 : Démarche IPBDF visant à repérer la cible antigénique des Ac anti-SS-A/Ro 52. | 223 |
| Figure 25 : Antigène SS-A/Ro 52, cible de réactivités croisées. | 224 |
| Figure 26 : Différentes alternatives d'immunoprotéomique pour l'identification des antigènes-cibles de réactivités discriminantes. | 225 |

ABRÉVIATIONS

A **AA** : Amino Acides
Ac : Anticorps
ADN : Acide Désoxyribonucléique
Ag : antigène
AID : Activation Induced cytidine Deaminase
APECED : Autoimmune Poly-Endocrinopathie Exodermal Dystrophy
APRIL : a proliferation inducing ligand
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm : ARN messenger

B **BAFF** : B cell Activating Factor of the TNF superFamily
BAFF-R : BAFF receptor
BCC : bleu de Coomassie colloïdal
Bcl : B cell lymphoma
BCMA : B Cell Maturation Antigen
BCR : B cell Receptor
Blimp-1 : B lymphocyte-induced maturation protein 1
BLK : B lymphoid kinase

C **C1q** : Facteur du complément C1q
C4, C2 : facteur du complément C4, C2...
CD : Cluster de Différenciation
CD40L : CD40 Ligand
CDF : Cellules Dendritiques Folliculaires
CDR : Complementarity Determining Regions
CG : Centre Germinatif
CI : Complexes Immuns
CLR : Récepteurs de type Lectine C
CMH : Complexe majeur d'Histocompatibilité
CpG : Cytosine-phosphate-Guanosine
CR2 : Complement Receptor de type 2
CRP : C reactive Protein
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
CXCL : C-X-C Chemokine Ligand
CXCR : C-X-C Chemokine Receptor

D **DAF** : Decay Accelerating Factor
DAMP : Damage-Associated Molecular Pattern
DAMP : Damage associated molecular patterns
db : double brin

E **EBV** : Epstein-Barr virus
ELISA : enzyme-linked immunosorbent Assay

F **FcγR** : Récepteur pour le fragment Fc des IgG

FOXO : forkhead transcription factor O

FR : Facteur Rhumatoïde

G **Gas-6** : growth arrest-specific 6

H **HLA** : Human Leukocyte Antigen

HMGB1 : high-mobility group box protein1

hnRNP : Heterogeneous ribonucleoprotein particle

HSP : Heat-Shock Protein

I **ICAM-1** : Intercellular Adhesion molecule-1

IEMD : Immuno-Électrophorèse MonoDimensionnelle

IFI : ImmunoFluorescence Indirecte

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL : interleukine

IRM : Imagerie par résonance magnétique

IPBDC : ImmunoProtéomique BiDimensionnelle en Fluorescence

IPBDF : ImmunoProtéomique BiDimensionnelle Conventionnelle

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

ITIM : Immunoreceptor Tyrosine Inhibition Motif

J
K **KDa** : kilodalton
KO : Knock Out

L **LB** : Lymphocyte B
LB Fo : LB folliculaire

LB T1 : Lymphocyte B Transitionnel de type 1

LB T2 : Lymphocyte B Transitionnel de type 2

LB T3 : Lymphocyte B Transitionnel de type 3

LDA : Linear Discriminant Analysis

LDL : Low Density Lipoprotein

LES : Lupus Erythémateux Systémique

LIEx : lymphocytes intraépithéliaux

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique
Lox-1 : lectin like LDL oxidised particle receptor
Lpr : Lupus prone (mice)
LPS : lipopolysaccharide
LT : Lymphocyte T
LT : Lymphocyte T
LTFH : LT Follicular Helper
LTh : Lymphocyte T helper

M **MAB-2** : Microtubule-Associated Protein 2

MAI : Maladie Auto-Immune
MAP kinase : Mitogen-Activated Protein kinase
MBP : Myelin Basic Protein
MCP : Membran Cofactor Protein
MFG-E8 : milk-fat-globule-EGF factor 8
MLR : mixed lymphocyte reaction
MUQ : muqueuse
MyD88 : Myeloid Differentiation primary-response protein 88
MZB : Marginal Zone LB

N **NFκB** : Nuclear Factor κB
NGS : Neurosjögren

NK : Natural Killer
NL : Neurolupus
NLR : Nucleotide Binding Oligomerization Domain like Receptors
NMO : neuromyélie optique
NOD : Non Obese Diabetic
NZB : New Zealand Black (mouse)
NZW : New Zealand White (mouse)

O **ODN** : oligodésoxynucléotide
OLP : organe lymphoïde primaire

OLS : Organe Lymphoïde Secondaire

P **PAD** : peptidyl-arginine-deiminases

PAMP : pathogen associated molecular patterns
PBS : phosphate buffered saline
PD-1 : Programmed cell death protein 1
PDCD-1 : Programmed cell death protein 1 (voir PD-1)
PI3K : Phosphoinositide 3 kinase
PKC : Protein Kinase C
PLCy2 : Phospholipase Cy2
PLP : Proteo-lipo protein
PNN : Polynucléaire Neutrophile
poly(I:C) : Acide polyinosinique-polycytidylique
PPMS : Primary Progressive Multiple Sclerosis

PR : Polyarthrite Rhumatoïde
PRR : Pathogen Recognition Receptor
PTAI : Purpura thrombopénique auto-immun
PVDF : PolyVinylidèneFluorure

Q

R **RAG** : recombination activating gènes

RAGE : receptor for advanced glycation end-products
RE : réticulum endoplasmique
RLR : Retinoïc-Acid-Inductible-Genes-Like
RNP : ribonucleoprotein particle, particule ribonucléoprotéique
RP105 : protéine radioprotectrice de 105kD
RRMS : Remittent Relapsing Multiple Sclerosis

S **S1P1** : Sphingosin-1-Phosphate Receptor 1

SAMP : Self Associated Molecular Pattern
SEP : Sclérose en plaques
SERPA : Serological Proteomic Approach
SGS : Syndrome de Gougerot-Sjögren
SHE : syndromes d'hyperéosinophilie essentielle
SIAE : Sialic Acid Acetyl Esterase
SIGLEC : sialic acid binding immunoglobulin-like lectin
SLC : Surrogate Light Chain
SLE : Systemic Lupus Erythematosus
SPMS : Secondary Progressive Multiple Sclerosis
STAT : Signal Transducers and Activator of Transcription
SVF : Sérum de veau foetal

T

TAC1 : Transmembrane Activator and CAML Interactor
TAI : Thyroïdites Auto-Immunes
TCR : T Cell Receptor
TdT : Terminal deoxynucleotidyl Transferase
TGF : Transforming Growth Factor
TIR : domaine Toll/IL-1R
TLR : Toll-like receptor
TNF : Tumor Necrosis Factor
TOF : Time of Flight

TRAF: TNF-Receptor Associated Factor

Treg : LT régulateur

TSP-1 : Thrombospondin 1

U

V

W

X

Y

Z

ZM : Zone Marginale



RÉSUMÉ & ABSTRACT

Résumé

Dans le cadre du diagnostic biologique des maladies auto-immunes, les auto-anticorps sont généralement recherchés par des méthodes qui utilisent des antigènes (ou peptides) présélectionnés. De telles techniques ont des limites qui pourraient être contournées par de nouvelles approches. Dans le premier temps de ce travail, nous rapportons l'intérêt d'évaluer les réactivités d'auto-anticorps vis-à-vis de cibles modifiées par des processus post traductionnels, comme la citrullination dans le cadre diagnostique de la polyarthrite rhumatoïde. Cette approche ne peut toutefois pas être transposée à toutes les pathologies auto-immunes, et notamment la sclérose en plaques. Dans un deuxième temps, notre démarche s'est élargie à l'analyse globale de la réactivité des immunoglobulines G sériques dirigée contre différents extraits d'antigènes tissulaires, notamment issus du cerveau. Malgré la grande hétérogénéité des réponses interindividuelles, il a été possible d'observer des profils de réactivités distinguant les sujets sains de patients souffrant de différentes pathologies à composantes auto-immunes. Cette signature sérologique permet également de distinguer les profils auto-immuns associés à différentes maladies et même de distinguer leurs formes cliniques. Dans le modèle expérimental développé au laboratoire, nous avons observé que des modifications de ces profils apparaissent de façon précoce et peuvent être liées à une évolution péjorative ou favorable de la maladie auto-immune. Ces résultats ont été confirmés dans la sclérose en plaques, où l'étude menée chez des patients ne présentant qu'un syndrome clinique isolé, a montré que les profils de réactivité sérique des IgG sont déjà marqués de l'empreinte de la maladie qui se révélera cliniquement en moyenne trois ans plus tard. De façon intéressante, d'autres travaux ont montré que le répertoire des IgM pouvait également être perturbé au cours d'un processus auto-immun dont la pathogénie repose sur un dysfonctionnement des lymphocytes T (syndrome APECED). Ces résultats suggèrent que des mécanismes T dépendants mais aussi T indépendants pèsent sur la constitution et l'entretien du répertoire auto-immun pathologique.

Pour identifier les cibles des réactivités discriminantes révélées par cette première approche, nous avons développé une technique de caractérisation moléculaire faisant appel à la technique immunoprotéomique. Alors que les pathologies humaines et les modèles animaux étudiés sont principalement des pathologies spécifiques d'organe, les antigènes tissulaires qui ont été identifiés comme cibles des réactivités spécifiquement associées à ces pathologies sont des antigènes ubiquitaires, et non des antigènes spécifiques d'organe. Ces résultats posent la question de l'implication réelle de ces cibles dans la physiopathologie des maladies auto-immunes. Ils illustrent également l'impérative nécessité de connaître les limites des résultats apportés par les méthodes d'immunoprotéomique.

La caractérisation de la signature sérologique d'un processus pathologique, au travers de l'analyse des perturbations globales des réactivités sériques qui lui sont associées, offre des perspectives intéressantes tant en termes de prise en charge du patient qu'en termes de compréhension physiopathologique des maladies auto-immunes. Elle pourrait aboutir à d'utiles débouchés thérapeutiques. Ces attentes justifient pleinement l'investissement qui a été mis en place par notre laboratoire dans le cadre de sa validation méthodologique.

Abstract

In autoimmune diseases, specific autoantibodies detected in patients' sera are usually investigated by techniques using purified self-antigens and/or relevant peptides from preselected targets. Such a restrictive view may be overcome by using new biological techniques to improve the diagnostic procedure. In a first step, we evaluated the impact of slight changes in target self-antigens related to post-translational modifications, such as citrullination. In view of the weak results obtained, we further focused on some properties of the humoral response. We studied the global self-reactive IgG antibody patterns against a large panel of antigens derived from different target tissue extracts, especially brain antigens. Despite inter-individual differences, some reactivities allowed us to discriminate between the immune profiles of healthy individuals and those of patients. The self-reactive footprints can also differentiate distinct autoimmune diseases and their clinical forms. When we induced experimental autoimmune diseases, dynamic changes occurred at the early phases with significant patterns related to pathogenic or protective events. A pathological distortion of the self-reactive antibody repertoire was also found in clinically isolated syndromes predictive of multiple sclerosis. Despite the predominant organ-specific symptoms in the clinical and experimental situations studied, discriminant self-IgG reactivities mostly involved ubiquitous antigens rather than organ specific targets. Interestingly, discriminant IgM reactivities targeting both tissue-specific and ubiquitous antigens were also specifically observed in a T-dependent autoimmune disease (autoimmune polyendocrinopathy syndrome), suggesting that T-cell-dependent but also T-cell-independent mechanisms might be involved in pathological changes in the self-reactive repertoire. Although these footprints have allowed the identification of useful new biomarkers, their pathophysiological relevance remains to be defined. The molecular characterization of specific antigenic targets in autoimmune disease is a critical step towards understanding the pathological mechanisms and developing useful diagnostic and therapeutic tools. In this perspective, we emphasize the need for accurate methodological approaches. Our analysis of self-reactive footprints highlights the potent role of complementary events related to putative dysfunction in the innate/natural immune response in autoimmune diseases.

INTRODUCTION

Comment définir le « soi » ? Plusieurs auteurs considèrent le « soi » immunologique comme une simple métaphore qui ne reposerait sur aucun argument scientifique robuste : « le « soi » est une sorte d'axiome destiné à donner l'illusion d'un consensus par le recours à un vocabulaire non défini » (Tauber, A.I. 1994; Moulin, AM 1990; Pradeu, T. 2005). En fait de nombreuses définitions ont été proposées. En est-il une qui soit satisfaisante, ou le « soi » est-il un concept insaisissable ? Le « soi » a d'abord été opposé au « non soi ». Cette notion évoquée depuis plus d'un demi-siècle, est encore citée dans de nombreux ouvrages pédagogiques d'immunologie. Elle affirme que c'est le caractère étranger (« non-soi ») de l'antigène qui le distingue du « soi » et est à l'origine d'une réponse immunitaire essentiellement défensive. Nous verrons que cette notion de discrimination peut légitimement être contestée aujourd'hui. Selon FM Burnet (Burnet et Fenner 1941), durant la période fœtale ou immédiatement post-natale, le système immunitaire s'éduquerait à tolérer tout antigène alors présent dans l'organisme en construction, qu'il soit endogène (issu du patrimoine génétique) ou exogène (environnemental). Après cette période critique, l'organisme préserverait son intégrité contre l'introduction de nouveaux antigènes qu'il jugerait comme une agression étrangère. C'est une vision dite « internaliste » d'un système immunitaire qui serait fermé précocement à « l'extériorité ». Cette hypothèse ne peut plus être retenue au regard des connaissances récemment acquises sur l'importance de l'héritage antigénique pour la mise en place et le maintien du système immunitaire. C'est aussi pour cette raison que la définition du « soi » résumée aux notions « d'organisme dans son ensemble » (Burnet et al. 1941), de « déterminisme génétique » (Burnet, F.M. et Fenner, F. 1948) ou de « répertoire immunologique primordial figé » (Burnet, F.M. 1970) n'est pas satisfaisante. Par ailleurs de nombreux arguments plaident pour juger que le « non soi » n'est pas l'objet d'un rejet systématique par le système immunitaire : tolérance materno-fœtale, chimérisme, interactions avec les micro-organismes commensaux (voire pathogènes), antigènes alimentaires sont autant d'exemples qui témoignent d'une vision trop restrictive d'un « non-soi » rejeté s'opposant à un « soi toléré ». À cette vision internaliste, se substitue donc aujourd'hui une vision « externaliste » où le système immunitaire est ouvert sur le monde extérieur par lequel il se construit. Comment situer alors, l'identité biologique d'un individu ? La remise en question d'un « soi » immunologique ne signifie pas l'absence d'identité biologique mais indique que la vision que le système immunitaire a du « soi », se construit par l'interaction de facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux. L'histoire, ou l'héritage antigénique d'un individu pèse de façon permanente sur la construction, le maintien et l'équilibre de

l'ensemble du système immunitaire. Ainsi un organisme ne serait pas, comme l'évoquait FM Burnett, le produit du déploiement de potentialités présentes dès ses origines et qu'il aurait à préserver contre toute influence étrangère nécessairement néfaste. Au contraire, certains auteurs soulignent aujourd'hui l'importance de la notion de « continuité » pour la construction de l'identité biologique. Le « soi », pour le système immunitaire, serait « *ce qui change de façon très progressive* ». Associée à des capacités d'auto-reconnaissance régulatrices, cette évolution lente d'adaptation de l'organisme à l'environnement préserverait l'homéostasie du système immunitaire (Pradeu, T. et Carosella, E.D. 2006). S'il existe un soi peptidique présenté par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) classique qui façonne le répertoire des lymphocytes T (LT) et indirectement celui des lymphocytes B (LB) (coopération T-B), les modalités de reconnaissance d'un soi non peptidique ne doivent pas être négligées. Différentes études ont montré qu'il existe des récepteurs autoréactifs chez les individus sains. Ces récepteurs seraient capables de reconnaître de façon privilégiée des molécules antigéniques qui répondent à des caractéristiques moléculaires restrictives. Selon P.H. Plotz (Plotz 2003) sur les 60 à 120 000 protéines exprimées par un organisme, « seules » 2 à 6 % (soit entre 1 200 et ~ 7 000 d'entre elles) seraient de bons auto-antigènes candidats. Les propriétés structurales pré-requises pour ce type d'auto-reconnaissance sont présentées (tableau 1).

Substituer la notion de « *continuité* » à la notion de « soi figé » ; la notion « *d'adaptation* » à celle de « discrimination » nourrissent de nouvelles interrogations sur la définition du « soi » (Pradeu, T. et Carosella, E.D. 2004). Ce « soi » peut-il n'être qu'un constituant de l'organisme toléré par le système immunitaire ? Différents mécanismes ont été décrits pour expliquer cette tolérance : délétions clonales centrale et périphérique (Laouar, Y. et Viret, C. 1999), réédition des récepteurs (Nemazee 2006), régulation intrinsèque et extrinsèque des signaux cognitifs (Basten et Silveira 2010). Quels sont alors les antigènes cibles de cette tolérance qui qualifierait le « soi » ? Si ce « soi » est changeant, quelles sont alors les contraintes qui pèsent sur le système immunitaire pour maintenir l'intégrité de l'organisme ? Devant ces nombreuses questions concernant la place de l'autoréactivité dans l'économie du système immunitaire, nous nous sommes particulièrement intéressés à la construction et à la régulation de ce répertoire B autoréactif. Nous verrons que ce répertoire a différentes facettes qui sont difficiles à appréhender (répertoire naturel, répertoire adaptatif naïf, répertoire adaptatif éduqué, place de la mémoire...). Son approche peut être facilitée par l'étude des anticorps (Ac) sériques, plus aisément accessibles grâce à la mise en place et à l'optimisation de nouveaux outils d'analyses, tels que l'immunoprotéomique. Cette approche a un double avantage. Elle évalue le « soi reconnu » et permet d'identifier le « soi

exposé ». Nous verrons les avantages, mais aussi les limites d'une telle approche.

Propriétés des antigènes conduisant à la persistance d'une autoréactivité périphérique

Propriétés structurales

Amino-acides (AA) chargés
Épitopes répétés
Structure en hélice
Association aux acides nucléiques
Séquences désialylées

Catabolisme et devenir après la mort cellulaire

Clivage par les caspases ou les nucléases
Phosphorylation ou déphosphorylation
Déamination (transglutaminase) ; ubiquitinylation ; déimination (citrullination)
Localisation dans les « blebs »
Relargage dans l'espace extracellulaire

Concentration et microenvironnement

Forte concentration locale du fait d'une augmentation rapide du niveau d'expression
Forte concentration locale liée à la persistance de l'antigène
Facteurs locaux tissus-spécifiques

Propriétés pro-inflammatoires

Fixation du complément
Propriétés chimio-attractantes
Fixation directe sur les récepteurs des cellules présentatrices d'Ag
Expression liée à la présence d'un pathogène

Tableau 1 : Caractéristiques des antigènes les définissant comme cibles privilégiées de l'autoréactivité (Plotz 2003).

I] Ontogénie, survie et développement des lymphocytes B : rôle de la reconnaissance du soi

I-A] Autoréactivité et homéostasie des lymphocytes B ?

Introduction

Les lymphocytes B sont des cellules de l'immunité dont les fonctions de participation aux mécanismes de défense, et de contrôle de la réponse immunitaire sont de mieux en mieux connues : cellules productrices d'Ac, présentatrices d'antigènes, régulatrices. On distingue deux lignages différents B1 et B2 des lymphocytes B. Chez l'homme, l'existence des lymphocytes B1 est controversée, alors que chez la souris, ils se développent essentiellement durant la vie fœtale, au niveau du foie et se distribuent dans les séreuses (péritoine, plèvre) et probablement dans certaines muqueuses (la *lamina propria* de l'intestin notamment, où ils produiraient des IgA sécrétoires (Montecino-Rodriguez et Dorshkind 2006)). Ces cellules possèderaient des capacités d'auto renouvellement de sorte qu'il n'en serait plus produit chez la souris adulte. Les lymphocytes B2 se développent durant toute la vie d'un individu au sein de la moelle osseuse et d'autres organes lymphoïdes secondaires, notamment la rate. Du lymphocyte pro-B au plasmocyte, il est décrit différentes étapes et lieux de maturation (figure 1). Nous détaillerons ces différentes étapes afin d'apprécier la part respective de la reconnaissance des auto-antigènes dans les mécanismes mis en place pour la construction du répertoire immunitaire, les fonctions et l'entretien du pool de ces lymphocytes B (homéostasie lymphocytaire B).

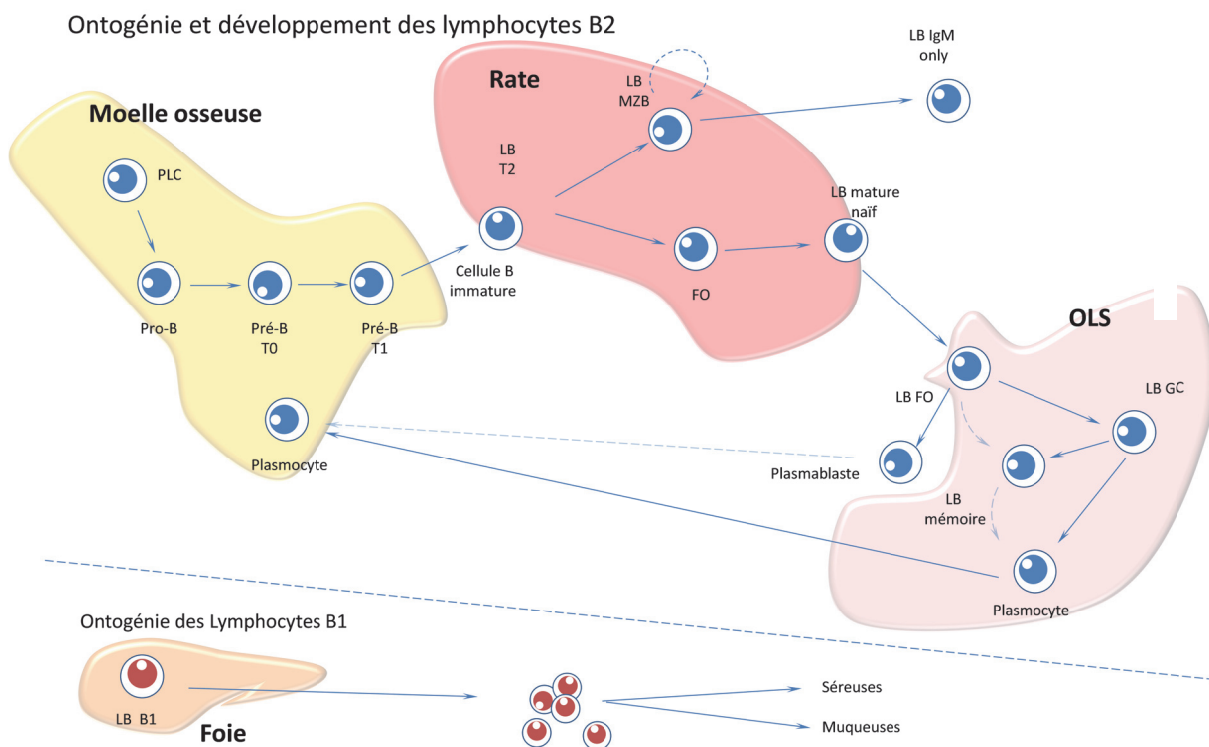


Figure 1 : Différentes étapes de maturation des lymphocytes B dits B2, dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires.

Rappel : Chez la souris, les lymphocytes B1 se développent durant la vie fœtale dans le foie et colonisent les séreuses, les muqueuses et peut-être certains organes lymphoïdes secondaires.

1) Ontogénie et développement des lymphocytes B « B2 »

La description classique des différentes étapes de développement de ces cellules a un caractère quelque peu artificiel dans le sens où les événements semblent se succéder dans le temps et dans l'espace. *In vivo*, ces mécanismes ont une dimension temporo-spatiale plus complexe. Ils peuvent parfois être concomitants ou encore apparaître à différents stades de maturation (pro et/ou pré-B), voire dans différents organes lymphoïdes (moelle osseuse et/ou rate).

1-1) Une première étape critique : la constitution du pré-BCR

Dans la moelle osseuse, issu d'un progéniteur lymphoïde commun aux lignées T, NK et B (Hardy et Hayakawa 2001), le lymphocyte pro-B exprime les recombinaisons Rag-1 et Rag-2 qui permettent les réarrangements aléatoires des segments de gènes *D-J* puis *V-DJ* et enfin *VDJ-C* de la chaîne lourde μ (IgM) des immunoglobulines. L'enzyme « *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT) » intervient également pour ajouter des nucléotides entre les segments *D* et *J* et *V* et *DJ* et conserver le cadre ouvert de lecture (« N

diversité », CDR3). Il s'agit d'une étape importante de la vie précoce des lymphocytes B. La chaîne μ ainsi formée va s'associer dans le cytoplasme du pro-B à un substitut de chaîne légère : la « *Surrogate Light Chain (SLC)* » pour former le pré-BCR (Hardy *et al.* 2001). Chez la souris, la SLC est formée de l'association de deux fragments protéiques $C\lambda 5$ et $V\text{pr}\acute{e}B$. Cette association entre $C\mu$ et SLC, si elle est fonctionnelle, permet l'expression membranaire d'un pré-récepteur : le « pré-BCR ». Plusieurs situations peuvent découler de cette expression fonctionnelle (ou non) du pré-BCR à la membrane. Elle fait l'objet d'un contrôle de qualité ou « *checkpoint* » au cours duquel le lymphocyte B survivra (ou non) et poursuivra (ou non) sa différenciation. Le caractère fonctionnel du pré-BCR est apprécié par sa capacité à transduire un signal d'activation *via* les deux chaînes $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ co-localisées avec ce pré-récepteur. Les différentes situations rencontrées lors de cette étape d'assemblage du pré-BCR et leurs conséquences sont résumées dans la figure 2 (Hendriks et Middendorp 2004; Mårtensson *et al.* 2007; F. Mackay *et al.* 2010).

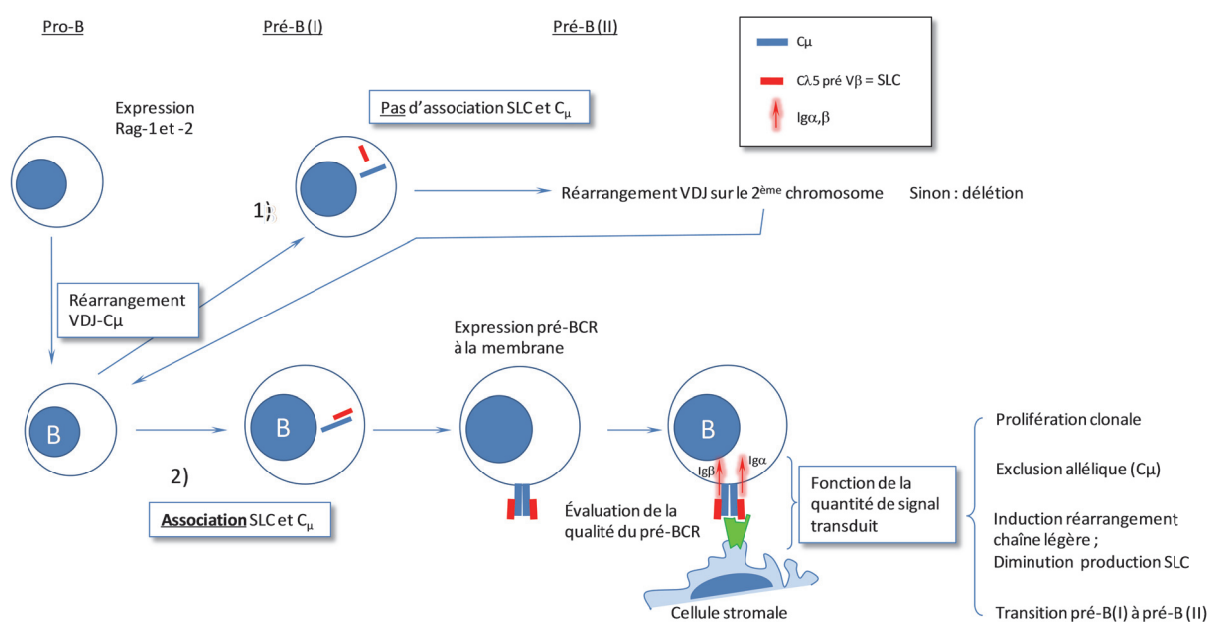


Figure 2 : Conséquence de l'association (ou non) de la chaîne lourde $C\mu$ et du substitut de chaîne légère (« SLC ») d'après (Hendriks *et al.* 2004; Mårtensson *et al.* 2007; F. Mackay *et al.* 2010).

L'association n'est pas possible : le lymphocyte pro-B ne peut survivre que si le réarrangement des gènes du 2^{ème} chromosome est fonctionnel.

L'association entre $C\mu$ et la SLC est possible et conduit à l'expression du pré-BCR à la membrane : cette expression membranaire traduit la bonne qualité de la chaîne μ . Différentes conséquences s'ensuivent en fonction de la quantité de signal transduit par les chaînes $Ig\alpha$ et $Ig\beta$.

1-2) Signaux de survie délivrés au LB immature qui exprime le pré-BCR

Le lymphocyte pro-B subit donc un contrôle de qualité au travers de l'évaluation du caractère fonctionnel de l'association de la chaîne μ et de la SLC. Ce *checkpoint* repose sur l'évaluation de la quantité de signaux de survie que la cellule peut recevoir, signaux qui l'engageront à suivre le programme de maturation : soit la cellule reçoit suffisamment de signaux de survie et elle s'engage dans la voie de maturation, soit elle n'en reçoit pas et sa survie est compromise à court terme. Le LB immature peut recevoir plusieurs types de signaux au sein de la moelle osseuse, conditionnant sa survie. Nous les envisagerons successivement **pour positionner le rôle de la reconnaissance d'auto-antigènes dans la maturation à ce stade de différenciation.**

1-2-a) Signaux indépendants du pré-BCR

Le pro-BCR : Avant même l'expression du pré-BCR la survie du lymphocyte pro-B semble liée à l'expression d'un récepteur (appelé pro-BCR) qui serait composé de la calnexine associée aux chaînes $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ (Kurosaki *et al.* 2010). Combinée à l'interaction de l'IL-7 et son ligand, l'agrégation de différents pro-BCR semble capable de délivrer un signal qualifié de « tonique », c'est-à-dire indépendant d'un signal « BCR spécifique » (F. Mackay *et al.* 2010). Il semble en fait que ces signaux toniques renforcent d'autres signaux de signalisation plus qu'ils n'assurent à eux seuls la survie cellulaire.

Signaux dépendants de facteurs de croissance : On a vu que l'IL-7 constituait un facteur de survie des cellules B immatures chez la souris. La chimiokine CXCL-12 (SDF-1) délivre aussi, par l'interaction avec le récepteur CXCR4, des signaux de survie dès le stade de cellule pro-B, mais probablement aussi, aux stades ultérieurs. Évidemment, ces facteurs, délivrés de façon isolée, ne suffisent pas à entretenir la survie à long terme des cellules immatures, notamment une fois qu'elles sont sorties de la moelle osseuse. Au stade de maturation pro- ou pré-B, le B-Cell Activating Factor (BAFF) semble peu intervenir comme facteur de survie. Deux arguments appuient cette assertion : d'une part la faible expression du récepteur de BAFF à la surface des cellules B immatures dans la moelle osseuse. D'autre part, les souris dont on a invalidé le gène de BAFF présentent une lymphopénie périphérique sévère, mais une densité de population B immatures normale au sein de la moelle osseuse (F. Mackay *et al.* 2010). À ce stade de différenciation au sein de la moelle osseuse, la notion de niche de microenvironnement stromal est capital pour assurer la survie des cellules en développement.

1-2-b) Signaux dépendants du pré-BCR (figure 3)

Ils sont là encore de 2 types.

Ils peuvent être liés aux seules propriétés de la SLC.

- (i) Une région particulière n'appartenant pas à la superfamille des immunoglobulines de la chaîne $\lambda 5$ de la SLC permettrait l'auto-agrégation de différents pré-BCR et donc de rassembler dans un microenvironnement favorable les molécules $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ nécessaires à la transduction des signaux de survie et de maturation de la cellule pré-B. Il est à noter que la cellule B immature exprime quantitativement plus de pré-BCR de membrane qu'une cellule mature. Ce phénomène pourrait faciliter la co-agrégation de récepteurs (Ubelhart *et al.* 2010).
- (ii) La région pré-V β de la SLC (chez la souris) contient une extension protéique (une « queue »), composée d'AA chargés positivement qui peuvent entrer en contact avec d'autres molécules membranaires, chargées négativement et exprimées à la surface des cellules stromales, en contact étroit avec les cellules B en développement (von Boehmer et Melchers 2010).

Ils peuvent être dépendants du domaine VDJ porté par la chaîne μ .

On ne retrouve dans la littérature qu'un nombre restreint de ligands (auto-antigènes) décrits comme capables d'interagir avec le « paratope » du pré-BCR aux phases précoces du développement des lymphocytes B. Le manque de description peut être lié à la difficulté d'étude de ce répertoire pré-immun, mais aussi parce que pendant longtemps on a considéré qu'un signal « tonique » (indépendant du pré-BCR) pouvait suffire à engager le pro-B vers la voie de la différenciation.

Certains auto-antigènes semblent néanmoins reconnus par les pré-BCR à ce stade : la galectine 1, l'héparane sulfate, l'insuline sont généralement cités (Hendriks *et al.* 2004) ; les protéines et les glycolipides de membrane, les acides nucléiques également (Pillai *et al.* 2011). Selon les travaux de H. Plotz (Plotz 2003), on peut penser que les cellules en apoptose présentes dans l'environnement stromal médullaire expriment certains auto-antigènes qui peuvent être reconnues par les cellules B immatures, même de façon temporaire puisque les « macrophages à corps tangible » ont pour fonction de les éliminer rapidement (Basten *et al.* 2010). Il semble toutefois que le LB exprimant un « paratope » constitué de la combinaison de la SLC et de la chaîne μ nouvellement formée, contribue par son interaction avec un auto-antigène, à engager la cellule immature vers les stades ultérieurs de différenciation cellulaire. Un CDR3 long (celui de la chaîne μ) (H. Wardemann

et al. 2003) mais aussi une composition riche en AA chargés positivement (tels que l'arginine par exemple), conduit par une interaction avec un épitope chargé négativement à l'engagement du BCR et à la délivrance de signaux de survie (von Boehmer *et al.* 2010). Il semble donc que reconnaître des auto-antigènes avec une bonne affinité donne un avantage sélectif aux lymphocytes immatures qui expriment de tels pré-BCR (Köhler *et al.* 2008).

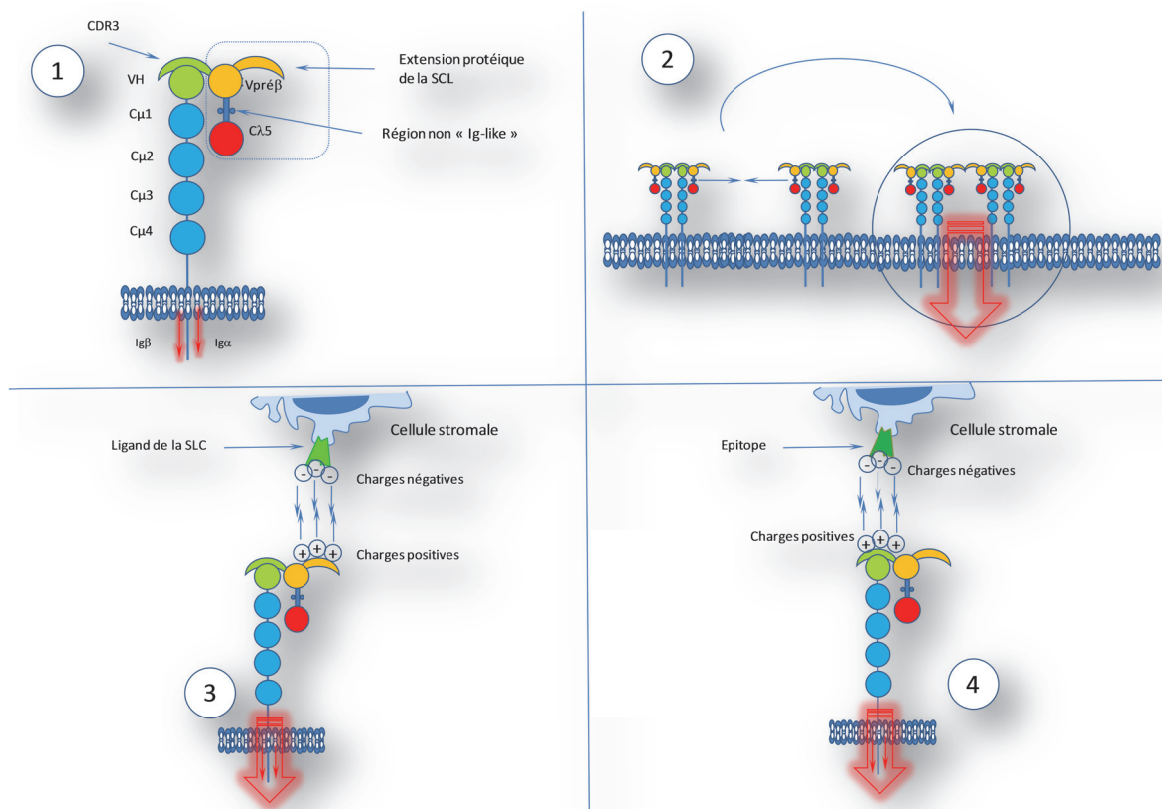


Figure 3 : Signaux de survie engagés par le pré-BCR au stade de cellule immature dans la moelle osseuse (inspiré de (Ubelhart *et al.* 2010; von Boehmer *et al.* 2010))

- ❶ Organisation moléculaire du substitut de chaîne légère
- ❷ Signal tonique dépendant d'une région de structure différente de celles des immunoglobulines au sein de la SLC. Elle permet un rapprochement de différents pré-BCR constituant un environnement favorable à la transmission de signaux de survie
- ❸ La SLC est composée d'une queue protéique riche en AA chargés positivement qui peuvent reconnaître des ligands chargés négativement sur la cellule stromale peuplant la niche de développement des cellules B immatures dans la moelle osseuse.
- ❹ Le paratope lui-même, dans sa région CDR3, particulièrement si elle est composée d'AA chargés positivement peut engager des interactions avec des antigènes exprimés par la cellule stromale (auto-antigènes) conduisant à la transduction de signaux. Les ligands connus pour ce type d'interaction sont actuellement peu nombreux : galectine 1, héparane sulfate, insuline ; mais aussi apoptosomes (antigènes exprimés au cours de l'apoptose).

À ce stade d'expression du pré-BCR, on peut donc constater que la qualité de ces signaux ont, au moins chez la souris, une importance relative pour la survie cellulaire. Ils apparaissent assez peu « contraignants » pour la préservation de cette cellule en voie de différenciation. Il semble que ce soit surtout la capacité de la chaîne lourde, nouvellement constituée, à s'associer à la chaîne légère qui soit évaluée, plus que la qualité du paratope en lui-

même. Cette interprétation est toutefois en contradiction avec le dogme de la sélection négative précoce des clones (dangereux) autoréactifs, mais fait écho à ce qui a été décrit chez d'autres animaux tels que le poulet (bourse de Fabricius) mais aussi chez des mammifères tels que le mouton (plaques de Peyer iléales), ou le lapin (appendice) (Weill et Reynaud 2005). Pour ne prendre que l'exemple du lapin, il est en effet décrit que pour tous les LB immatures un unique gène *VH* se réarrange avec le gène constant des immunoglobulines au stade de pré-B. Seuls quelques AA de la région « framework » de la chaîne lourde semblent importants pour l'évaluation fonctionnelle du pré-BCR ainsi formé. Après l'étape de contrôle de qualité, certifiant la capacité de combinaison de la chaîne lourde et de la SLC (et ultérieurement de la « vraie » chaîne légère), le paratope sera modifié soit dans l'appendice, soit dans les plaques de Peyer par un phénomène de conversion de gènes et d'hypermutations qui apportent la diversification du répertoire des Ac.

1-2-c) Conclusion

Au stade pré-B, la qualité de reconnaissance du paratope pourrait avoir un rôle limité et l'autoréactivité pourrait même constituer un avantage sélectif pour la survie. Ainsi, il a été estimé que 15 à 20 millions de lymphocytes B immatures sortent quotidiennement de la moelle osseuse. Soixante quinze à 80 % de ces cellules exprimeraient un BCR autoréactif (H. Wardemann *et al.* 2003). La transmission de signaux par le pré-BCR aura de multiples conséquences sur les fonctions cellulaires : outre la survie, on va voir qu'ils vont conduire à la prolifération cellulaire mais aussi à la réactivation des enzymes RAG1 et RAG2 conduisant au réarrangement des gènes codant la chaîne légère des immunoglobulines.

2) Signaux de survie du pré-B au B immature

Parmi les conséquences immédiates du « test de conformité » du pré-BCR, le réarrangement des gènes codant la chaîne légère pour la constitution du BCR et sa révision, sont essentielles.

2-1) Du pré-BCR au BCR

Deux événements importants suivent le contrôle de qualité du pré-BCR : une **expansion clonale** et un **phénomène de maturation du BCR**. L'expansion clonale est un phénomène utile car elle permet d'augmenter de façon importante le nombre de LB qui ont franchi la première étape de sélection (en effet il a été vérifié que la chaîne μ est capable de s'associer à la chaîne légère). La maturation du récepteur exprimé par le LB immature se fait, elle, à deux niveaux. D'une part, par l'induction du réarrangement des gènes codant la (« vraie ») chaîne légère. D'autre part, par un processus de

révision du BCR (« *BCR editing* ») qui vise à réarranger une nouvelle fois des gènes *V(D)J* des chaînes légères (plus exceptionnellement des chaînes lourdes) des immunoglobulines afin de réduire le potentiel d'auto-réactivité des LB produits et de diversifier le répertoire des cellules B (c'est-à-dire élargir leur capacité de reconnaissance).

Il a été estimé qu'une cellule pro- (ou pré)-B peut vivre de façon consécutive, plusieurs fois cette séquence d'événements (essentiellement s'ils ne sont pas fonctionnels) : réarrangement des chaînes légères κ (sur les deux chromosomes) puis en cas de réarrangement non fonctionnel, recombinaison des gènes sur la chaîne λ , (sur les 2 chromosomes éventuellement); *BCR editing*. Ainsi de nouvelles alternatives de réarrangement sont offertes au LB, tant que tous les moyens n'ont pas été épuisés pour permettre à la cellule d'accéder au stade de maturation suivant (Halverson *et al.* 2004). Plusieurs phases de *BCR editing* peuvent elles-mêmes se succéder chez la souris et, selon des modèles mathématiques, il est estimé que chaque LB mature aura réarrangé la chaîne légère en moyenne 2,5 fois (Nemazee 1998).

2-2) Le « *BCR editing* » : une révision élargie pour protéger et/ou pour diversifier ?

2-2-1) Vision classique du « *BCR editing* »

D'un point de vue finaliste, on peut comprendre qu'il peut être utile de réviser un récepteur non fonctionnel. Quelle peut être toutefois l'utilité de réactiver la machinerie de réarrangement de gènes pour un récepteur qui a été jugé comme fonctionnel ? Selon la vision classique proposée par FM Burnett, il faut rappeler la situation générée par la constitution du répertoire immunitaire. On a vu en effet, que l'organisme produit quotidiennement 15 à 20 millions de LB dans la moelle osseuse, que la production des immunoglobulines est le fait d'un réarrangement stochastique de gènes qui peut nécessairement conduire à générer des récepteurs auto-réactifs, que les contraintes de survie sont initialement peu drastiques et même que l'auto-réactivité du pré-BCR est un bon moyen de vérifier que la chaîne μ sera capable de s'associer à la chaîne légère. De ce même point de vue, on peut donc concevoir que l'organisme a prévu un « garde-fou » pour se prémunir du risque d'auto-réactivité en périphérie : il s'agit d'un second *checkpoint*, intervenant après le contrôle de qualité du pré-BCR. Celui-ci ne vise pas à décider de la vie ou de la mort du LB selon la conformité ou non de son récepteur, mais plutôt un mécanisme de modifications du paratope généré par l'intensité du signal transduit par le BCR combiné aux chaînes $Ig\alpha$ et $Ig\beta$. Ce mécanisme a deux finalités : il apporte un grand potentiel de diversité du répertoire, puisque rappelons-le, les cellules qui vivent ces événements sont

en train de se diviser. Enfin, par le changement du paratope il peut amener à réduire le risque d'auto-réactivité du BCR. Ces données sont en accord avec la théorie de délétion clonale proposée par F.M. Burnet (Burnet, F.M. 1970). Selon ce dogme (figure 4), toute cellule B (ou T) reconnaissant un auto-antigène est, soit éliminée par apoptose, soit mise en état d'anergie (Rolink et Melchers 2002). Pour les lymphocytes B, (pour les LT, il n'a pas encore été décrit¹) s'ajoute le phénomène de *BCR editing* qui permet de les sauver du processus de délétion clonale. Il semble que ce processus soit d'ailleurs privilégié aux dépens des mécanismes de mort cellulaire qui ne surviendraient qu'en cas d'épuisement du phénomène de révision paratopique. Le *BCR editing* permettrait ainsi d'épargner un large contingent cellulaire (Halverson, Torres, et Pelanda 2004).

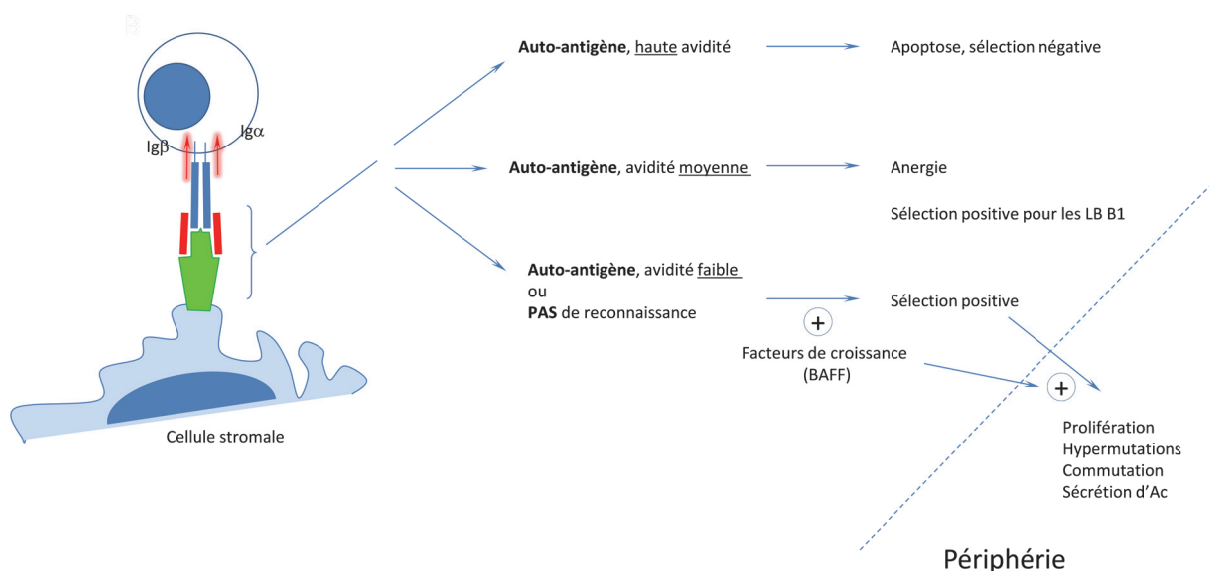


Figure 4 : La sélection clonale selon le modèle classique : Les conséquences de l'interaction du paratope avec un ligand selon les différentes constantes d'affinité mises en jeu. Vision en accord avec la théorie de la délétion clonale proposée par FM Burnet.

Les LB autoréactifs sont éliminés s'ils présentent un BCR de haute avidité pour un auto-antigène. Ils sont placés en anergie pour des BCR de moyenne avidité.

Seuls les LB dont le BCR ne réagit pas avec un auto-antigène et qui reçoivent des signaux de survie supplémentaires (BAFF) peuvent survivre en périphérie.

La sélection positive des LB B1 serait possible grâce à la reconnaissance avec une faible avidité d'auto-antigène. (D'après (Rolink et al. 2002)).

On a vu plus haut que c'est la transduction des signaux de survie par le pré-BCR qui conduit au réarrangement des gènes de chaîne légère par le biais de la réactivation des gènes *RAG*. Il semble que ces mêmes signaux transmis par le pré-BCR soient aussi importants pour conduire au processus de *BCR editing*. En effet des travaux rapportent que l'inactivation de la SLC

¹ Mais il semble exister d'autres mécanismes de conversion paratopique voir (Luning Prak et al. 2011).

conduit chez la souris à une majoration du nombre de cellules B matures et autoréactives périphériques et du taux d'auto-anticorps sériques détectables, suggérant, selon ces auteurs, que c'est l'expression de la SLC qui conduit à la sélection négative (ou au *BCR editing*) si les cellules expriment un potentiel d'autoréactivité (R. A. Keenan *et al.* 2008). En l'absence de SLC, le phénomène de *BCR editing* ne se mettrait plus en place et les cellules auto-réactives ne seraient plus éliminées.

2-2-2) Vision actuelle des fonctions du « BCR editing »

Le *BCR editing* vise donc à modifier le paratope d'un récepteur pourtant fonctionnel par une nouvelle recombinaison des gènes *V(D)J*, lui conférant alors une autre spécificité, c'est-à-dire la capacité de reconnaître un autre antigène que celui qui a conduit à la survie initiale du lymphocyte B. Certains points invitent à s'interroger sur l'intérêt du *BCR editing* : a-t-il pour but premier de réduire le risque d'auto-immunité, et/ou de promouvoir la diversité qu'il apporte au répertoire B ? C'est la question que posent S. Herzog et H. Jumaa (Herzog et Jumaa 2012). En effet, la révision paratopique par *BCR editing* concerne préférentiellement (quasi exclusivement) la chaîne légère (Luning Prak *et al.* 2011). Or la spécificité paratopique, et notamment l'autoréactivité, du BCR semble essentiellement supportée par la chaîne lourde (c'est-à-dire quelle que soit la chaîne légère associée). Le remodelage des chaînes légères par une nouvelle combinaison de gènes semblerait donc peu influencer le potentiel autoréactif du paratope du LB au sortir de la moelle osseuse. C. Vetterman et HM Jäck proposent que l'autoréactivité du BCR crée, par la qualité des signaux qu'elle engage (notamment la réduction de l'expression de la chaîne α du récepteur pour l'IL-7), offre des conditions optimales pour la prolifération cellulaire aux dépens de la différenciation (Vettermann et Jäck 2010). L'expression d'un BCR autoréactif conduirait donc à une intense expansion clonale des LB dont le BCR est fonctionnel (encore une fois parce que la chaîne lourde peut s'associer à la chaîne légère) et dans le même temps conduirait à la diversification du répertoire par le processus de *BCR editing* (Herzog *et al.* 2012). Ces réflexions sont synthétisées dans la figure 5.

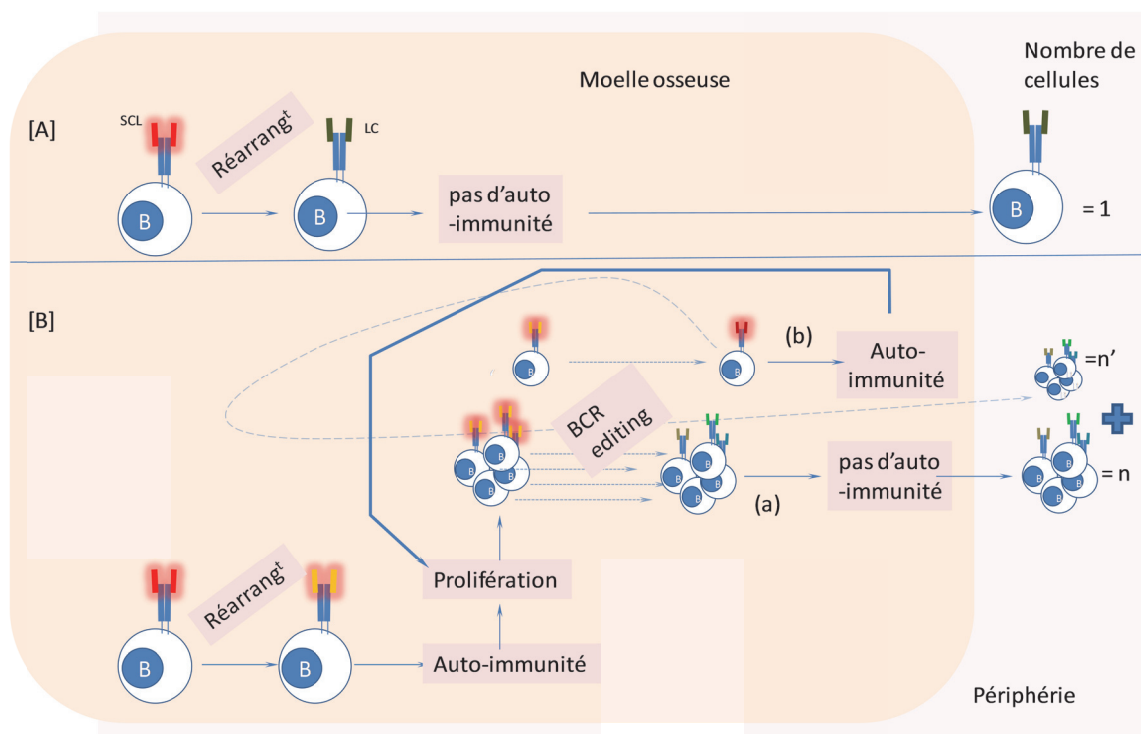


Figure 5 : Poids de la relation pouvant exister entre « expression du BCR » et « l'auto-immunité » pour la constitution du répertoire périphérique.

[A] le réarrangement conduit à l'expression d'un BCR non autoréactif. Le LB est « sélectionné positivement » et peut sortir de la moelle osseuse. Sa représentation périphérique est en revanche très faible (« une seule » cellule en périphérie).

[B] le réarrangement et la combinaison des chaînes lourde et légère conduisent à l'expression d'un BCR autoréactif. Ce mécanisme conduit à 2 phénomènes :

1) la prolifération de la cellule ;

2) la révision de son paratope. Ce processus de « BCR editing » crée de la diversité dans le répertoire des cellules filles. Les paratopes des cellules filles sont à leur tour, testés :

(a) ils ne sont pas autoréactifs, les cellules sortent de la moelle osseuse. Leur nombre (n) est important.

(b) ils sont autoréactifs : la (les) cellule(s) recommence(nt) le processus « prolifération/ BCR editing »... jusqu'à ce que leur paratope satisfasse aux critères de sélection (« n' » cellules sortent de la moelle osseuse) ou que le processus s'épuise ; la cellule autoréactive entrerait alors en apoptose. C'est un moyen potentiellement séduisant pour peupler la périphérie d'une population quantitativement importante et au répertoire diversifié.

2-3) Conclusion

Au stade de cellule immature la capacité de reconnaissance d'antigènes du « soi » semble apporter de nombreux avantages sélectifs aux LB. Au stade d'expression du pré-BCR l'auto-reconnaissance conduit à la survie et à la prolifération cellulaire. Elle conduit également à réactiver les gènes *RAG* permettant l'expression de la chaîne légère. Au stade d'expression du BCR, la reconnaissance du soi conduirait encore une fois à la prolifération cellulaire mais aussi au processus de diversification du répertoire par la mise en place du processus de *BCR editing* qui vise à

protéger l'organisme de cellules à potentiel autoréactif, mais aussi à diversifier le répertoire immunitaire des Ac produits (figure 6).

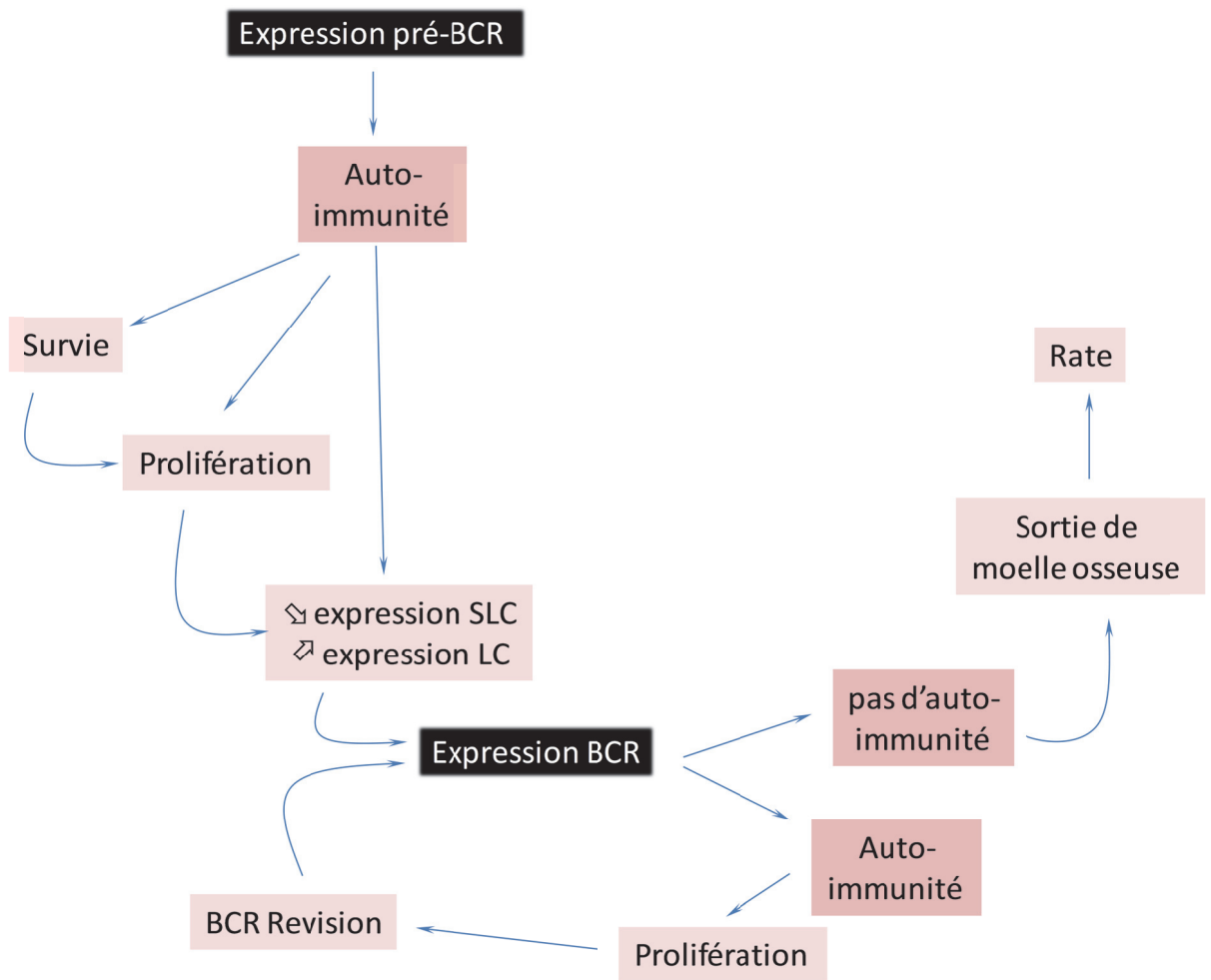


Figure 6 : Avantages liés au caractère autoréactif du pré-BCR et du BCR.

3) Devenir du lymphocyte B immature au sortir de la moelle osseuse

Un grand nombre de signaux vont contrôler la survie, la différenciation, et la domiciliation des cellules B immatures hors de la moelle osseuse. Nous ne documenterons ici que les rôles du BCR et de BAFF et décrivons les différentes étapes de maturation des LB T1, T2, MZB et LB Fo. Au sortir de la moelle osseuse, la majorité des lymphocytes B expriment une IgM de membrane, ils sont encore immatures, à un stade appelé transitionnel « T1 ». Ils migrent vers la rate où ils colonisent les follicules lymphoïdes et acquièrent l'expression du CD23 à leur membrane (stade T2) et pour une partie d'entre eux, l'IgD (Cariappa et Pillai 2002; Allman et Pillai 2008). Ils acquièrent donc un certain nombre de marqueurs phénotypiques de membrane qui les caractérisent selon leur stade de maturation (tableau 2), extrait de (Bemark *et al.* 2012). On rappellera également que les différentes étapes de maturation (jusqu'au T2) peuvent aussi se poursuivre dans la

moelle osseuse. Au cours de leur séjour splénique, les cellules B transitionnelles vont vivre différents événements qui, tant en termes de sélection que de différenciation, pèseront sur leur devenir et leurs fonctions.

| | Pré-B | T1 | T2 | T3 | Fo naïf | MZB (IgM only) | Mémoire switchée | Plasma-blaste |
|------|----------|-----|-----|-----|---------|----------------|------------------|---------------|
| IgM | Hi | Hi | Hi | Low | Low | Hi | - | - |
| IgD | Low | Low | Hi | Hi | Hi | Low | - | - |
| CD5 | Hi | Hi | Low | - | - | ± | - | - |
| CD10 | + | + | Low | - | - | | - | - |
| CD20 | Hi | hi | + | + | + | + | + | - |
| CD21 | - ou Low | + | + | + | + | + | + | |
| CD23 | ± | + | + | + | + | - | Low | |
| CD24 | Hi | Hi | Int | Low | Low | Int | Int | |
| CD38 | Hi | Hi | Int | - | - | | + | Hi |
| CD27 | - | - | - | - | - | + | + | + |
| CD1c | - | - | - | - | - | + | - | - |

Tableau 2 : Phénotype des LB en fonction de leur stade de maturation

(extrait de (Bemark *et al.* 2012)). Les cases vides correspondent à des absences de description ou des données contradictoires

3-1) Rôle du BCR et de BAFF

Dans la moelle osseuse, la capacité de reconnaissance des antigènes du soi est un épisode critique, déterminant la survie, la multiplication et la diversification du répertoire des lymphocytes B. On a vu aussi que selon l'étude de Wardeman *et al.* près de 75 % des cellules exprimeraient un répertoire autoréactif au sortir de la moelle osseuse (probablement de faible affinité), c'est-à-dire au stade T1 (H. Wardemann *et al.* 2003). Au sein de la rate, la maturation des cellules B va se poursuivre, et aboutira au stade de cellules B matures naïves qui représentent la majorité des cellules B circulantes. Toujours selon les études de cette équipe, seules 15 à 20 % de ces cellules B matures naïves auraient encore un répertoire autoréactif (H. Wardemann et M.C Nussenzweig 2007). Entre ces deux stades, un événement majeur d'épuration et de diversification du répertoire autoréactif s'est poursuivi (Chung *et al.* 2003). Plus encore, chez les souris élevées en conditions *germ-free*, si le nombre de lymphocytes B transitionnels T2 est normal, le nombre de lymphocytes B matures est réduit, soulignant que l'environnement pèse bien sur la génération et/ou la préservation des cellules B non autoréactives (Loder *et al.* 1999).

3-1-1) Lymphocytes B en compétition pour l'accès aux signaux de survie

Il existe donc au sein de la rate d'autres points de contrôle du développement des lymphocytes B. Ils impliquent principalement deux protéines d'expression membranaire : le BCR lui-même et le récepteur du facteur de croissance spécifique des lymphocytes B, le *B cell Activating Factor of the TNF superFamily* (BAFF) et les molécules apparentées (APRIL). Dans la moelle osseuse, on a vu que les signaux transmis par le BCR (les Ig α et Ig β et les tyrosine-kinases associées) sont des éléments essentiels à la survie des cellules immatures. Dans la rate, parallèlement à la progression dans le processus de maturation cellulaire, les conséquences liées à la transmission de signaux par le BCR, ont changé. Il a été rapporté que l'expression de facteurs anti-apoptotiques tels que la cycline D2, Bcl-X_L et A1 n'était plus induite par la stimulation *via* le BCR (Chung *et al.* 2003). L'acquisition de nouvelles molécules d'expression membranaire pourrait y contribuer : ainsi le CD19 et le CD21 par leur association au BCR modifieraient la quantité de signaux transmis par l'agrégation de nouvelles phosphotyrosine-kinases. Il semble ainsi qu'un signal de forte affinité engagé par le BCR conduise à un processus de mort cellulaire *via* Bim et la cascade de caspases (Casola 2007). On se trouverait donc au sein de la rate dans une situation inverse à celle qu'on observait dans la moelle osseuse, avec un engagement vers la mort cellulaire quand on sollicite le BCR. Toutefois un facteur extrinsèque à la cellule B va contrebalancer ces événements, permettant de trouver un état d'équilibre qui préserverait les cellules utiles à l'organisme, tout en éliminant celles potentiellement dangereuses. Ce facteur est la cytokine BAFF qui se trouve toutefois en concentration limitée. Une compétition pour son accès se met donc en place entre les cellules, générant un processus de sélection pour la survie. Seules les cellules qui ont accès à une concentration suffisante de ce facteur de croissance, survivront. Alors que les lymphocytes B immatures présents dans la moelle osseuse y étaient insensibles, au stade de LB T2, ils expriment désormais le récepteur BAFF-R. Rappelons que ce facteur de survie et de différenciation est produit par les cellules stromales et par les macrophages au sein de la rate. Il agit en inhibant les signaux de mort induits par Bim et la cascade des caspases (engagées par le BCR). L'interaction BAFF et BAFF-R augmente l'expression des différents membres de la famille de Bcl-2 et augmente la voie de signalisation non classique NF- κ B. On notera que BAFF agit sur la cellule B T2 sans induire de prolifération. Après cette étape de différenciation au contact de BAFF, les propriétés du LB changent : un signal passant désormais par le BCR ne sera plus pro-apoptotique mais conduira au contraire à la prolifération ; un second contact avec BAFF induit là encore un fort effet de prolifération clonale (Rolink *et al.* 2002; F. Mackay *et al.* 2010).

3-1-2) Différents scénarios possibles

Pour résumer ce qui se passe pour un LB au stade de maturation T2, nous pouvons envisager différentes situations (figure 7)

- Le LB immature exprime un BCR peu autoréactif (faible quantité de signaux transmis) : les besoins du LB en BAFF pour survivre sont faibles, la cellule sera donc préservée car elle peut être utile sans être dangereuse.
- Le LB immature exprime un BCR très autoréactif (forte quantité de signaux transmis par l'interaction auto-antigène – Ig membranaire). Il y a une forte probabilité pour qu'il soit éliminé. Toutefois différentes situations peuvent se présenter :
 - i) Les concentrations de BAFF sont limitées car il existe une large population de lymphocytes B (« conditions physiologiques ») : il y a compétition entre elles. La cellule autoréactive ne reçoit pas suffisamment de signaux de survie, elle est éliminée. Il serait possible qu'une révision du BCR intervienne pour la sauver.
 - ii) Les concentrations de BAFF intraspléniques sont excédentaires (conditions pathologiques) : il existe par exemple une lymphopénie périphérique : la cellule autoréactive peut alors survivre et poursuivre sa maturation. Elle est potentiellement dangereuse.
 - iii) Les concentrations de BAFF extraspléniques sont excédentaires (conditions pathologiques) : il est décrit que certains processus inflammatoires chroniques conduisent à une expression ectopique de ce facteur de survie (Guerrier *et al.* 2012): la cellule autoréactive est là encore préservée et elle peut être, là encore, potentiellement dangereuse.

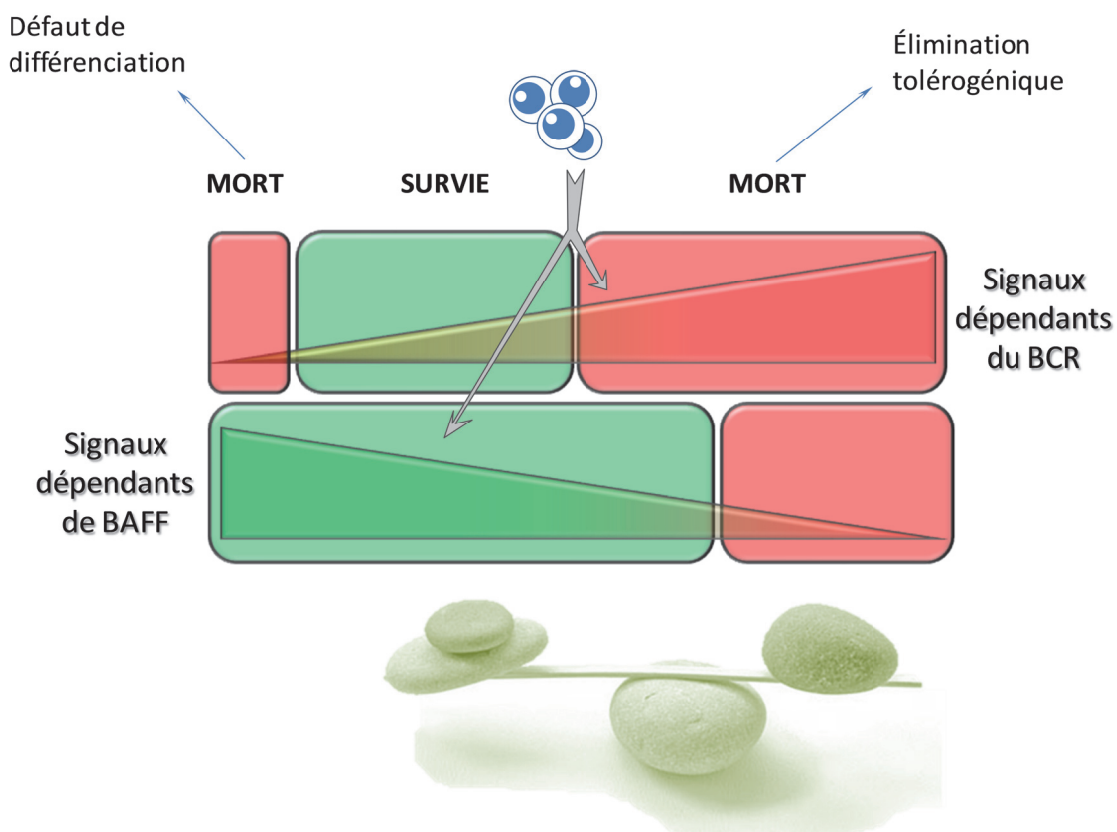


Figure 7 : Équilibre des signaux délivrés aux lymphocytes B immatures au stade transitionnel T2. Contrairement à ce qui se passe dans la moelle osseuse, les signaux par le BCR sont promoteurs de mort cellulaire. Un LB peu autoréactif a donc des chances de survivre. Des signaux extrinsèques délivrés par l'interaction de BAFF et de son récepteur aux LB contrebalancent les signaux de mort délivrés par le BCR.

3-2) LB T2 : une cellule « carrefour ».

On vient de voir qu'une étape importante de la vie des LB se déroulait dans la rate, par le jeu de signaux délivrés *via* le BCR (et d'autres molécules membranaires sur lesquelles nous reviendrons), mais aussi par l'intermédiaire de l'engagement du récepteur de BAFF. Cette étape conduirait à une sélection clonale avec déletion d'une grande partie, mais non de la totalité, des lymphocytes B autoréactifs tout en préservant les lymphocytes non autoréactifs, utiles à la défense de l'organisme. Une autre étape importante de la différenciation des lymphocytes B transitionnels dits « T2 », se déroule dans la rate (peut-être de façon concomitante avec la précédente) : la différenciation en deux sous populations distinctes² : les

² À la lecture de la littérature, il n'est pas clair si les MZB et LB Fo dérivent tous deux du LB transitionnel T2 ou T3, précurseurs qui expriment la molécule IgD à leur membrane. Comme une des caractéristiques phénotypiques des MZB est l'absence d'IgD de membrane, 2 pistes de différenciation me semblent pouvoir être proposées : soit le MZB dérive d'un précurseur avant qu'il n'exprime l'IgD de membrane, soit

lymphocytes de la zone marginale (MZB ; IgD^{lo}) et les lymphocytes folliculaires (Fo ; IgD^{bright}). Là encore, il semble que la tonicité du signal délivré par le BCR pèse sur la voie de différenciation qui sera sélectionnée. Il a pu être évoqué qu'un signal faible transmis par le BCR d'un LB immature l'engagerait vers la voie de différenciation des MZB, alors qu'un signal intermédiaire l'engagerait vers la voie de différenciation des LB Fo (Cariappa *et al.* 2002; Casola 2007).

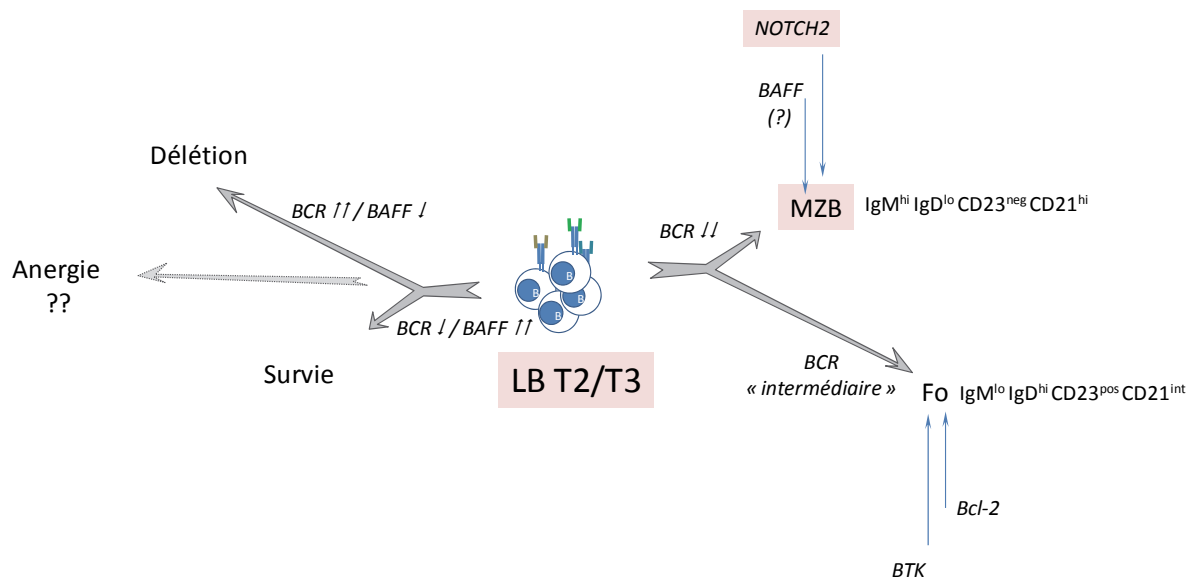


Figure 8 : le LB T2 est une cellule « carrefour ».

C'est à ce stade en fonction des signaux perçus via le BCR et BAFF, la sélection clonale s'opère. C'est aussi à ce stade que l'orientation MZB ou LB folliculaire se mettrait en place.

3-2-1) Lymphocytes de la zone marginale de la rate (MZB)

- Les cellules MZB (population cellulaire connue depuis un peu plus de 30 ans) seraient sélectionnées positivement malgré leur faible capacité d'auto-reconnaissance (Pillai *et al.* 2005; Pillai et Cariappa 2009). Leur paratope présente un CDR3 « court », comparativement aux cellules autoréactives qui présenteraient des CDR3 longs (H. Wardemann *et al.* 2003). D'autres signaux semblent donc nécessaires pour les sauver de la mort par défaut de différenciation, parmi lesquels : BAFF, la signalisation *via* les TLR, mais aussi (et surtout) le facteur NOTCH-2 et la voie de NF- κ B-1 (Pillai *et al.* 2009). Selon JC Weill toutefois, la différenciation des MZB ne serait pas liée à une filiation ontogénique mais essentiellement par sa localisation anatomique : la zone marginale de la rate (Weill, Weller, et Reynaud 2009). Ainsi, les distinctions phénotypiques de même que les propriétés entre MZB et LB Fo seraient-elles plus floues (figure

il dérive d'un précurseur plus tardif (IgD⁺) mais il perdra cette molécule avec sa différenciation. Cette hypothèse mérite d'être privilégiée, puisque les phénotypes ne semblent pas fixés (dans un premier temps, tout au moins) et que les LB Fo (« de type II ») sont susceptibles de se différencier en MZB (Weill *et al.* 2009).

9). Au moins chez la souris, les MZB auraient une capacité d'auto-renouvellement, dispensant cette population d'un ensemencement régulier par les précurseurs issus de la moelle osseuse (Weill *et al.* 2009). Au vu des caractéristiques de faible auto-reconnaissance des MZB on pourrait imaginer une faible (ou l'absence de) relation de ces cellules avec les maladies auto-immunes. Même si les mécanismes en restent obscurs, dans les thyroïdites, comme dans les glandes salivaires inflammatoires de la maladie de Sjögren (Guerrier *et al.* 2012), il apparaît toutefois que les MZB infiltrent les tissus malades. Leurs fonctions n'y sont néanmoins pas clairement définies. Nous reprenons ici certaines de leurs caractéristiques :

i) Leur localisation particulière au sein de la rate, directement connectée sur la circulation sanguine, leur confèrerait un rôle important dans la surveillance immunitaire vis-à-vis de pathogènes à diffusion hématogène, constituant une première ligne de défense pour l'organisme. Les MZB ont été considérés comme des acteurs de l'immunité naturelle (ou « intermédiaire »), faisant le lien entre immunités innée et adaptative. Avec les LB B1, les MZB seraient à l'origine de la production d'anticorps naturels, principalement dirigés (en ce qui concerne les MZB) contre des épitopes polysaccharidiques, exprimés à la surface de bactéries encapsulées, notamment *Streptococcus pneumoniae*.

ii) Si la différenciation des MZB est classiquement considérée comme T indépendante, ces cellules peuvent néanmoins interagir avec les cellules T par leurs fonctions de présentation de l'antigène : ils seraient responsables d'une réponse extrafolliculaire vis-à-vis des antigènes protéiques qui se déroule dans la pulpe rouge ou à l'interface avec la zone T dépendante de la rate. Certaines des caractéristiques phénotypiques des MZB les distinguant des LB Fo ont été rappelées dans la figure 8. Parmi les récepteurs membranaires, le CD21 fortement exprimé permet l'interaction avec les pathogènes qui ont activé le complément. Avec l'expression des TLR, le CD21 renforcerait la différenciation rapide des MZB en plasmablastes, *via* notamment l'expression de la molécule Blimp-1 (Pillai *et al.* 2005).

iii) Chez les rongeurs, la population MZB est faiblement représentée alors qu'elle constituerait une portion importante des cellules chez l'homme, chez lequel elles exprimeraient le marqueur CD27 (mémoire ?) (H. Wardemann *et al.* 2007). Ces cellules auraient une demi-vie longue, et ne se développeraient qu'après l'âge de 2 ans chez l'homme (3 à 4 semaines chez les rongeurs), âge à partir duquel la zone marginale de la rate s'organiserait. Les populations de MZB chez la souris et l'homme se distinguent également par le fait que chez l'homme, les MZB ont la capacité de circuler et que leur BCR présente des mutations somatiques.

Si le tropisme des MZB est effectivement la rate, il semble que ces cellules puissent faire des « allers-retours » entre rate et follicules des ganglions, afin d'engager des échanges dans ces organes lymphoïdes secondaires. Cette circulation semble sous la dépendance de S1P1 et S1P3 (récepteurs inhibés par le fingolimod) (Cyster et Schwab 2012).

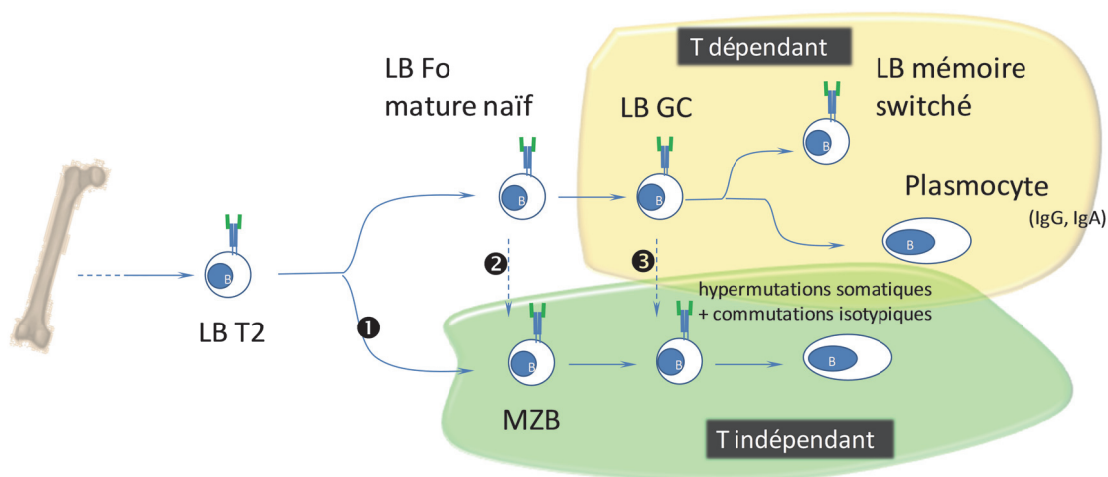


Figure 9 : Différentes voies de production des lymphocytes MZB.

Le LB immature peut suivre 2 voies de différenciation : MZB ou LB Fo. Le MZB peut dériver du LB Fo naïf. Le MZB peut se différencier à partir de LB du centre germinatif

3-2-2) Lymphocytes B folliculaires (LB Fo)

Au sein de la rate le LB transitionnel peut aussi se différencier en LB Fo. Selon S. Pillai, l'engagement de la cellule T2 immature vers cette seconde voie de différenciation (LB Fo) pourrait dépendre d'une transmission plus importante de signaux *via* le(s) BCR(s) donc potentiellement de la reconnaissance d'antigènes du soi avec une affinité supérieure à celle des MZB (Pillai *et al.* 2009). Toutefois d'autres éléments pourraient y contribuer et notamment la co-expression de l'IgD de membrane. Les propriétés physico-chimiques de l'IgD, avec notamment sa structure charnière sans pont disulfure, faciliteraient la liaison avec des épitopes d'accessibilité difficile au sein des antigènes (Pillai *et al.* 2005). La co-agrégation des IgM et des IgD par l'intermédiaire de la reconnaissance avec leurs épitopes respectifs renforcerait donc la quantité totale de signaux transmis *via* le BCR (au sens général) et serait utile à l'engagement vers la différenciation du LB Fo. Ce phénomène pourrait donc également sélectionner des récepteurs de plus faible affinité pour les antigènes du soi.

Parallèlement à l'acquisition d'un niveau moyen d'expression de la molécule CD21, le LB Fo quitterait la rate pour ensemercer les structures lymphoïdes secondaires en suivant un gradient de concentration de

CXCL13. Ces cellules « matures » mais naïves, occuperont essentiellement deux niches : le sang et les zones B des différents organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques, les plaques de Peyer, la rate. Tant que ces lymphocytes Fo n'auront pas rencontré d'antigènes pour lesquels la reconnaissance *via* le BCR et l'environnement cellulaire et moléculaire, conduisent à l'activation et à poursuite de leur différenciation, ils circuleront entre les organes lymphoïdes secondaires. Sans les signaux de survie délivrés par différents acteurs présents au sein des organes lymphoïdes secondaires, la durée de vie des cellules B naïves serait courte, estimée à deux jours, alors qu'en présence de ces signaux physiologiques, elle se prolongerait sur plus de 6 semaines (Rolink *et al.* 2002).

1) LB Fo et auto-immunité.

On a déjà vu que certaines cellules matures exprimeraient un BCR capable de reconnaître des auto-antigènes exprimés par le noyau ou le cytoplasme des cellules HEp2, considérées comme référentiel d'auto-réactivité (H. Wardemann *et al.* 2003). L'importance de cette fréquence (illustrée dans la figure 10 extraite de l'article (H. Wardemann *et al.* 2007) nécessite la mise en place de mécanismes de tolérance.

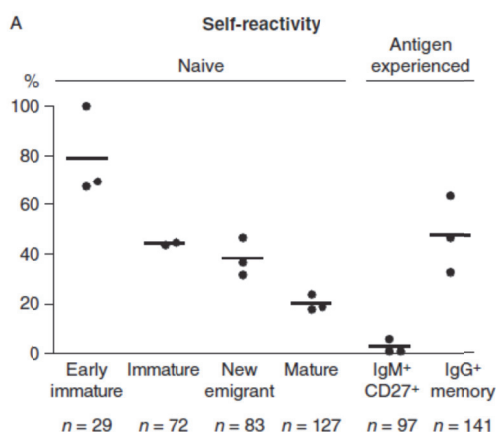


FIGURE 1 The frequency of self-reactive and polyreactive antibodies at different stages during B-cell development and differentiation in healthy humans. Recombinant monoclonal antibodies cloned from single human B cells were tested for (A) self-reactivity by ELISA with human HEp-2 cell line lysates and indirect immunofluorescence on HEp-2 cell slides and for (B) polyreactivity by ELISA with diverse antigens such as DNA, LPS, and insulin (Meffre *et al.*, 2004; Tiller *et al.*, 2007; Tsuiji *et al.*, 2006; Wardemann *et al.*, 2003). The frequencies of self-reactive (A) and polyreactive (B) antibodies expressed by bone marrow-derived early immature and immature B cells and circulating peripheral new bone marrow emigrants, mature naive B cells, IgM⁺ CD27⁺ and IgG⁺ memory B cells in individual donors are summarized (Meffre *et al.*, 2004; Tiller *et al.*, 2007; Tsuiji *et al.*, 2006; Wardemann *et al.*, 2003). Dots represent individual donors and horizontal lines indicate averages. The number of antibodies tested in each B-cell population is indicated below the graphs.

Figure 10 : Figure 1 extraite de l'article de Wardeman *et al.* montrant la distribution des auto-anticorps autoréactifs vis-à-vis de cellules HEp2 (H. Wardemann *et al.* 2007).

i) Facteurs de tolérance indépendants du BCR

Selon la figure reproduite ci-dessus, nous pouvons apprécier qu'au moins 15-20 % des cellules B conserveraient un potentiel d'auto-réactivité.

Celui-ci s'exprimerait désormais chez une cellule mature et capable d'exercer des fonctions qui pourraient se révéler agressives pour l'organisme. Il existe donc des mécanismes qui concourent à limiter physiologiquement l'expression de cette autoréactivité. Selon les travaux de Shlomchik, ces cellules matures circuleraient en état d'anergie (Shlomchik 2008). Cet état de non réponse, réversible, serait le résultat de la conjonction de plusieurs acteurs, notamment de l'action de récepteurs inhibiteurs (PD-1, CD5, CD22, CD24, FcγRIIb, SIGLEC...) dont l'interaction avec leurs ligands, couplée à la reconnaissance de l'antigène du soi par le BCR dans les conditions physiologiques, conduiraient à délivrer des signaux inhibiteurs par l'intermédiaire de séquences ITIM qui recrutent des tyrosine-phosphatases intracellulaires. Ces co-récepteurs élèveraient le seuil nécessaire à l'activation du LB *via* le BCR, de sorte que les signaux passant par le récepteur pour l'antigène ne suffiraient plus à engager l'activation cellulaire (Basten *et al.* 2010). Parmi les nombreuses molécules membranaires exprimant ces propriétés régulatrices, les récepteurs SIGLEC et apparentés (CD22 par exemple) reconnaissent des motifs sialylés exprimés à la surface des antigènes dont certains épitopes peuvent être reconnus par le récepteur spécifique des LB. La reconnaissance des motifs sialylés par les SIGLEC peut être dépendante d'une enzyme, la Sialic Acid Acetyl Esterase (SIAE) qui enlève un dérivé acétyl en position 9-OH de certains dérivés sialylés (Pillai *et al.* 2011). L'action de ces signaux inhibiteurs pourrait être évidemment renforcée par celle des populations de cellules régulatrices telles que les Treg, mais aussi les cellules dendritiques et la façon dont elles exposent les antigènes au système immunitaire (Basten *et al.* 2010). Il apparaît donc que des événements extérieurs à la reconnaissance de l'auto-antigène par le BCR pèsent sur la qualité de réponse du lymphocyte B.

ii) Facteurs de tolérance dépendants du BCR

Le LB semble également capable d'entretenir un état de non réponse par une action directe sur le niveau d'expression du BCR à la membrane. En effet il a été rapporté que le niveau d'expression membranaire du BCR d'une cellule en anergie est inférieur à celui d'une cellule en état de répondre. Cette réduction du niveau d'expression pourrait être liée à une perturbation du trafic intracellulaire du complexe BCR – signalosome. Cette perturbation pourrait mener à la rétention du BCR dans l'endosome précoce, empêchant le routage vers l'endosome tardif, site où le BCR pourrait libérer l'antigène qu'il a capté en surface, afin que celui-ci soit préparé en vue de sa présentation par le CMH_{II} (Clark *et al.* 2011). Un défaut d'exposition dans le CMH_{II} de l'antigène capté par le BCR a pour cette cellule anergique des conséquences importantes, bien sûr liées au défaut

de présentation de l'antigène puisqu'elle ne contribue pas elle-même à entretenir ou amplifier la réponse immunitaire. En retour elle ne reçoit pas non plus d'aide *cognate* ce qui limite encore les fonctions qu'elle pourrait développer : sécrétion d'Ac affins ou synthèse de cytokines par exemple. La perturbation du trafic intracellulaire du BCR conduit aussi à limiter la disponibilité des antigènes captés *via* le BCR pour d'autres médiateurs de la réponse immunitaire comme les TLR. Là encore, ce point sera abordé ultérieurement. Les mécanismes précis conduisant à la perturbation du trafic reste à préciser, mais pourraient faire intervenir les complexes des ubiquitine-ligases aux fonctions essentielles dans l'adressage moléculaire intracellulaire (Clark *et al.* 2011).

2) Conditions physiologiques de différenciation du LB Fo : rencontre d'un *exo-Ag*.

Les signaux d'activation du lymphocyte B Fo sont délivrés par différents acteurs que nous ne décrivons que brièvement car ces événements sortent du cadre de la relation du LB à l'auto-réactivité. La séquence d'événements est toutefois présentée dans la figure 11. Cette activation aboutit à la formation de centroblastes à vie courte, mais aussi LB mémoire et plasmocytes à vie longue. Parmi les cellules B qui ont bénéficié (généralement au contact d'exo-antigènes) de cette séquence d'événements activateurs dépendants de la collaboration avec les acteurs de l'immunité innée, et adaptative notamment les lymphocytes T, certaines peuvent être (ou redevenir ?) auto-réactives. Les résultats rapportés par Tiller *et al.* laissent penser que l'action de l'*Activation-Induced-cytidine-Deaminase* (AID) peut générer des paratopes auto-réactifs par les phénomènes d'hypermutations somatiques induits au cours de la « réaction centre germinatif » (voir la figure 10, plus haut) (Tiller *et al.* 2007; H. Wardemann *et al.* 2007). Ce mécanisme « restaurerait » donc une auto-réactivité de forte affinité. Les mécanismes de compétition pour l'accès à l'aide *cognate* délivrée par les LT_{FH} aide probablement à l'élimination d'une grande part de ces cellules. En effet, les cellules B du centre germinatif présentent un haut niveau d'expression de molécules pro-apoptotiques comme celles de la famille BIM et une réduction de Bcl-2 (anti-apoptotique) conduisant à réduire leur espérance de vie si elles ne reçoivent pas de signaux délivrés par les cellules T_{FH} (Vinuesa *et al.* 2009). Certaines semblent néanmoins capables de survivre et de produire des auto-anticorps détectables en périphérie. Dans quel état d'activation circulent-elles ; quelles sont leurs fonctions ? S'il semble que ce soit un phénomène naturel, contribuent-elles aux processus pathologiques des maladies auto-immunes ?

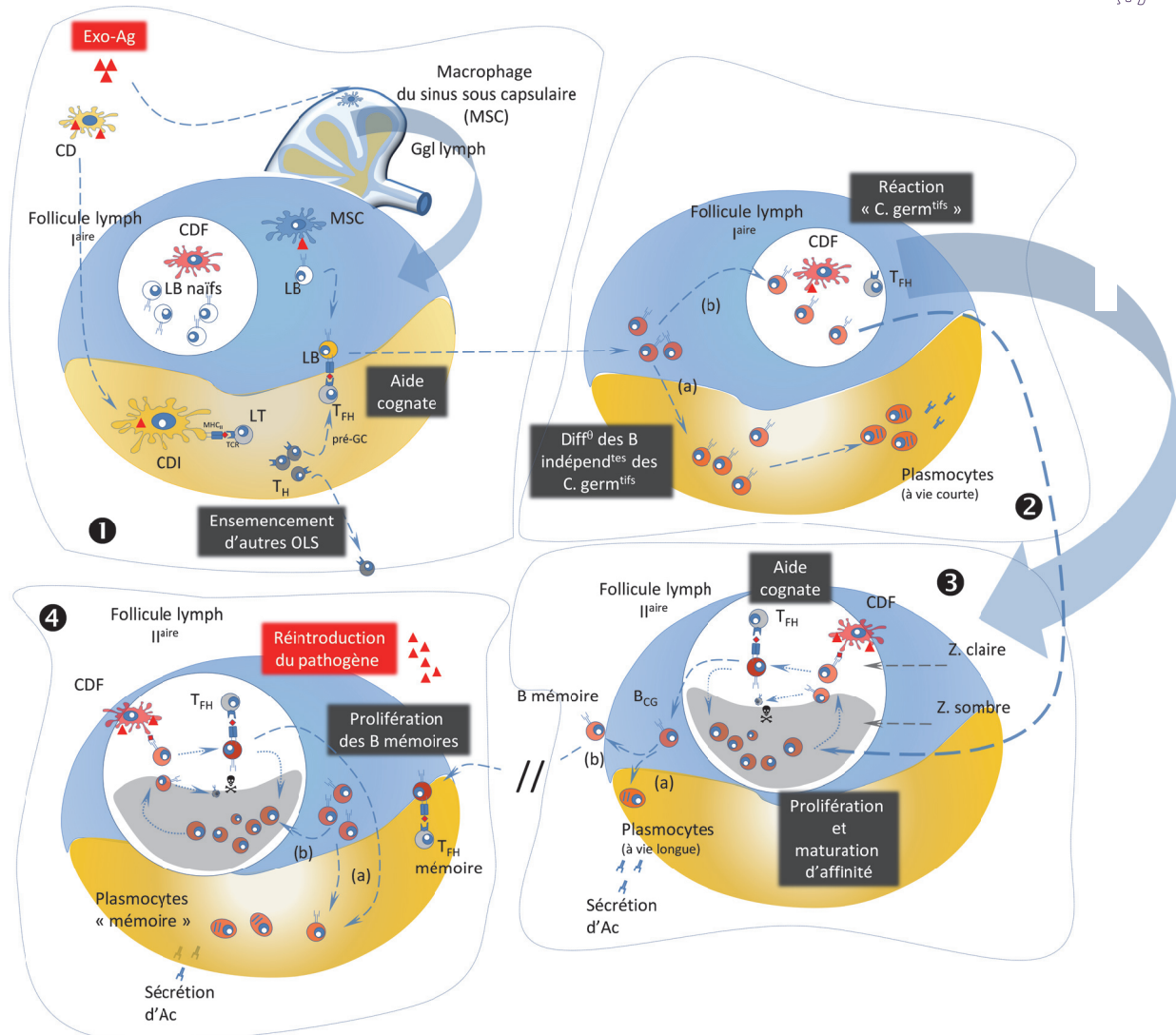


Figure 11 : Étapes d'activation du LB Fo par un exo-Ag au sein de l'organe lymphoïde secondaire. Place des différents acteurs.

1. Activation des LB naïfs

- Sur le lieu de pénétration, le xéno-antigène est pris en charge par la cellule dendritique (cellule de Langerhans) qui migre vers la zone médullaire du ganglion lymphatique locorégional.
- Parallèlement, l'antigène peut passer dans la circulation générale et au moment de son passage dans le ganglion, être « trappé » par les macrophages présents dans les sinus sous capsulaires au sein de la région corticale des ganglions lymphatiques. Ces macrophages présentent ces antigènes aux LB Fo naïfs présents dans le ganglion.
- Dans la zone corticale profonde (T-dépendante) du ganglion, l'interaction de la cellule dendritique interdigitée avec les lymphocytes T CD4 spécifiques d'antigène conduit à leur différenciation en lymphocytes « helper » (T_H). Certains T_H quittent le ganglion pour ensemençer d'autres organes lymphoïdes secondaires. D'autres se différencient en LT Folliculaire Helper (T_{FH}), population singulièrement impliquée dans l'interaction avec les LB Fo et conduisant à leur maturation. Certains des T_{FH} quittent eux-mêmes le ganglion pour gagner les régions para folliculaires d'autres organes lymphoïdes secondaires. D'autres restent sur place pour engager un dialogue avec les LB Fo. Ils prennent le nom de T_{FH} « pré-centre germinatif ». On les distingue particulièrement par leur capacité de production de l'IL-21, mais pas uniquement (King et al. 2008).



- Dans la zone corticale, on l'a vu, les macrophages des sinus sous capsulaires présentent l'Ag aux LB naïfs. Les LB capables de reconnaître cet antigène s'activent et se chargent de peptides antigéniques qu'ils exposeront désormais à leur membrane par l'intermédiaire de la molécule CMH_{II}. Ils migrent dans la zone corticale profonde du ganglion au contact des T_{FH} pour engager une collaboration « cognate ». De ce contact entre LB et LT_{FH} différentes voies de différenciation peuvent être suivies.
 - En région extrafolliculaire, deux phénomènes peuvent être observés à la suite de l'interaction entre le LB activé par l'antigène et le LT_{FH} pré-GC : 1) la commutation de classe des immunoglobulines produites par le LB. 2) la différenciation de LB en cellules dites « non-centre germinatif » (« non GC- B cells »). Ces LB « non – GC » peuvent se différencier en plasmablastes puis en plasmocytes et sécréter des Ac spécifiques d'antigène après avoir quitté le ganglion (il n'y a pas eu de phénomène de maturation du paratope, les BCR restent donc en configuration germinale).
- 2. Réaction « centre germinatif »**
- Certains des LB entrés en contact avec les T_{FH} pré-GC migrent vers le follicule lymphoïde primaire pour y former le « centre germinatif ». On a retenu qu'ils ont déjà subi une commutation de classe. Certaines études suggèrent que l'affinité du BCR (avant les hypermutations somatiques) pourrait contribuer à cette orientation : les LB exprimant d'emblée un BCR de forte affinité se différencieraient en plasmocytes à vie courte dans la région extrafolliculaire. En revanche, les LB exprimant un BCR de plus faible affinité peupleraient le follicule lymphoïde primaire pour y bénéficier d'un processus de révision paratopique (Phan et al. 2006). Se mettrait alors en place la « réaction du centre germinatif », avec la formation du follicule lymphoïde secondaire.
- 3. Formation des follicules lymphoïdes secondaires**
- Au sein de ce follicule lymphoïde, les LB Fo (alors appelés centroblastes) entrent dans un cycle intense de prolifération et forment la zone sombre du follicule. En son sein, se déroule également le phénomène d'hypermutations somatiques mais aussi de commutations isotypiques (un « second tour »). Les centroblastes n'expriment plus d'immunoglobulines de membrane, et ce de façon transitoire.
 - Certains LB (les « centrocytes ») sortent de la phase de prolifération cellulaire et gagnent la zone claire du follicule où ils testent leur BCR au contact des cellules folliculaires dendritiques. Les cellules qui ont perdu la capacité de reconnaître l'antigène entrent en apoptose. Celles dont la capacité de reconnaissance est préservée entrent en compétition entre elles pour bénéficier de contacts avec le LT_{FH} spécifique de cet antigène³.
 - Pour engager un contact avec le LT_{FH}, le centrocyte doit exposer un peptide spécifique dans le CMH_{II} afin de mettre en place une collaboration « cognate ». Trois issues lui sont alors offertes :
 - a) Il peut retourner dans la zone sombre du follicule lymphoïde secondaire et bénéficier d'un second cycle de prolifération, hypermutations somatiques...
 - b) Il peut devenir une cellule B mémoire, non sécrétrice d'Ac après avoir quitté le centre germinatif.
 - c) Il peut se transformer en plasmocyte « post-centre germinatif » (post-GC) et produire des Ac de haute affinité. Il essaime alors différents organes lymphoïdes secondaires et même la moelle osseuse, où il peut résider de façon prolongée.
- 4. Mise en place de la réponse lymphocytaire B à la réintroduction de l'antigène**
- Si un nouveau contact est ultérieurement engagé avec le même Ag : les cellules B mémoire présentent l'antigène au LT_{FH} mémoire. Ce contact conduit à l'expansion clonale rapide des cellules B, avec une transformation rapide en plasmocytes et l'induction d'une réaction « centre germinatif ».

(Largement inspiré de (M. McHeyzer-Williams et al. 2012).

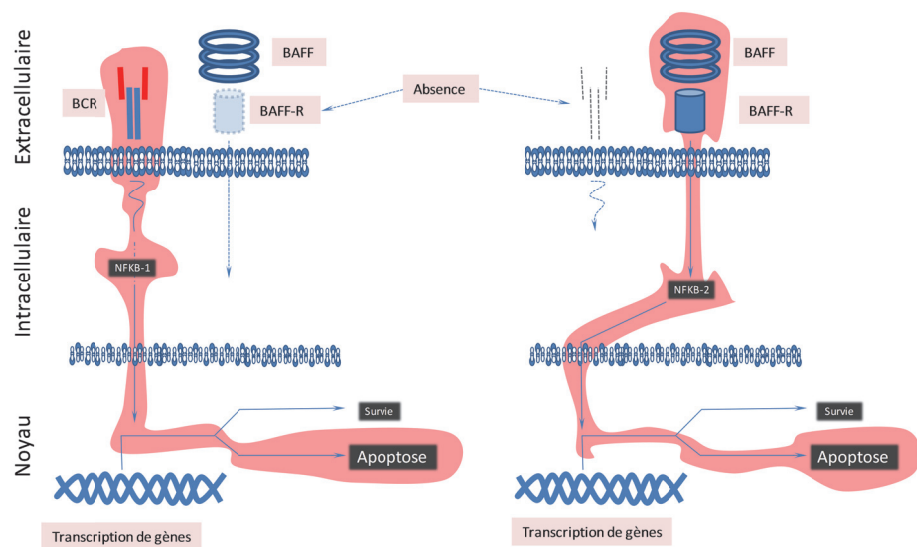
CD : cellule dendritique / « I » : interdigitée / « F » : folliculaire. T_{FH} : LT folliculaire helper.

³ Il faut comprendre ici que le LT_{FH} pré-GC a lui-même subi un processus de maturation lui offrant deux voies de différenciation : le LT_{FH} au sens propre qui migre dans la zone claire du follicule lymphoïde secondaire et le LT_{FH} mémoire qui lui migre dans la zone corticale profonde des différents organes lymphoïdes secondaires.

4) Facteurs de survie des cellules B et homéostasie

4-1) Cellules matures

Une des caractéristiques remarquables du système immunitaire est sa capacité à maintenir un nombre sensiblement constant de lymphocytes, en dépit de la nature complexe des mécanismes pour y parvenir. Pendant longtemps on a considéré que seuls les signaux passant par le BCR contribuaient à entretenir la population B. La découverte de BAFF a changé la perspective. On a vu que la qualité du signal passant par le BCR et les molécules $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ associées, contribuait à la survie, la diversité et la différenciation des LB. Des modèles de souris dont on perturbe sélectivement l'expression des BCR de faible affinité ont montré que des signaux de faible intensité passant par le BCR sont nécessaires aussi pour maintenir la survie des cellules matures en périphérie, en association avec la production de BAFF par les cellules stromales, les macrophages, et les cellules dendritiques des organes lymphoïdes secondaires (F. Mackay *et al.* 2010).



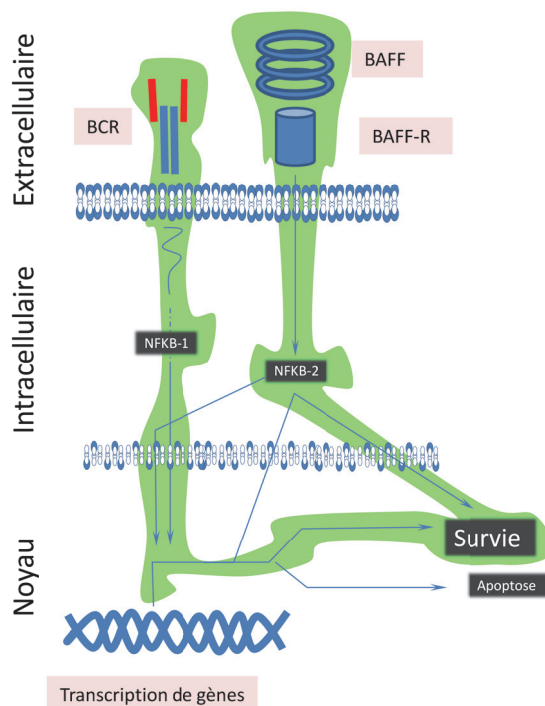


Figure 12 : Comme pour le LB T2, la complémentarité des signaux délivrés par le BCR et BAFF est nécessaire à la survie des LB matures. *Inspiré de (F. Mackay et al. 2010).*

Des expériences conduisant à inhiber sélectivement les signaux passant par le BCR ou BAFF-R ont montré que les deux voies apportaient des signaux synergiques indispensables à la survie cellulaire. Si seule une voie est engagée, elle conduit à la mort des cellules. Les mécanismes sous-jacents à la survie passent par l'augmentation des signaux de survie (Bcl-2-dépendants), mais aussi par l'inhibition de signaux pro-apoptotiques FOXO-dépendants (F. Mackay *et al.* 2010) (figure 11).

4-2) Cellules mémoire

Concernant les LB mémoire (CD27⁺) et leur dépendance aux facteurs de survie, les données sont plus contradictoires. Successivement, les signaux passant par le BCR puis par BAFF-R ont été jugés indispensables à la survie de ces cellules. Des modèles expérimentaux complexes suggèrent toutefois qu'il n'en serait rien et actuellement, on considère que ces cellules peuvent survivre de façon indépendante de signaux extérieurs du fait d'une surexpression naturelle de facteurs de survie tels que Bcl-2 (Good *et al.* 2009).

4-3) Plasmocytes

Pour les plasmocytes, on sait qu'ils expriment CXCR4 conduisant à la domiciliation dans la moelle osseuse *via* la production de CXCL12 (SDF-1). Il semble que la production locale de SDF-1, tout comme l'IL-16, et

l'interaction du CD44 et de son ligand conduiraient à prévenir l'apoptose de ces cellules. De même si l'expression de Blimp-1 est requise pour conduire à la différenciation des plasmocytes, ce facteur de transcription semble assurer leur survie, puisque sa délétion conduit à la perte des plasmocytes. Il a été rapporté que l'expression du CD35 et du CD21 (et leur engagement régulier) contribue au maintien de l'expression du facteur Blimp-1 et donc indirectement à la survie cellulaire. BAFF et APRIL semblent également participer à la survie de ce contingent cellulaire, dans une certaine mesure. On rappellera néanmoins que l'expression de BAFF-R diminue au stade de maturation plasmocytaire de sorte que son rôle semble peu important, expliquant en partie pourquoi les traitements par Ac bloquant BAFF ont peu d'impact sur les fonctions de ces cellules. En revanche l'atacicept, bloquant à la fois APRIL et BAFF semble avoir un impact plus significatif sur les fonctions de ces cellules, suggérant qu'elles sont plus sensibles à APRIL.

I B] Immunité innée et homéostasie des lymphocytes B

Jusqu'à présent nous avons suivi la différenciation des lymphocytes B en privilégiant la description des acteurs moléculaires propres aux LB : BCR, facteurs de croissance (BAFF), cytokines (IL-21), chimiokines (SDF-1), coopération *cognate* (LT_{FH})... Les interactions avec ces acteurs, pour essentielles qu'elles soient, ne résument toutefois pas la pluralité des échanges que le LB peut engager avec son environnement. Il suffit pour s'en convaincre d'apprécier la richesse des récepteurs qui décorent la membrane des LB (figure 13).

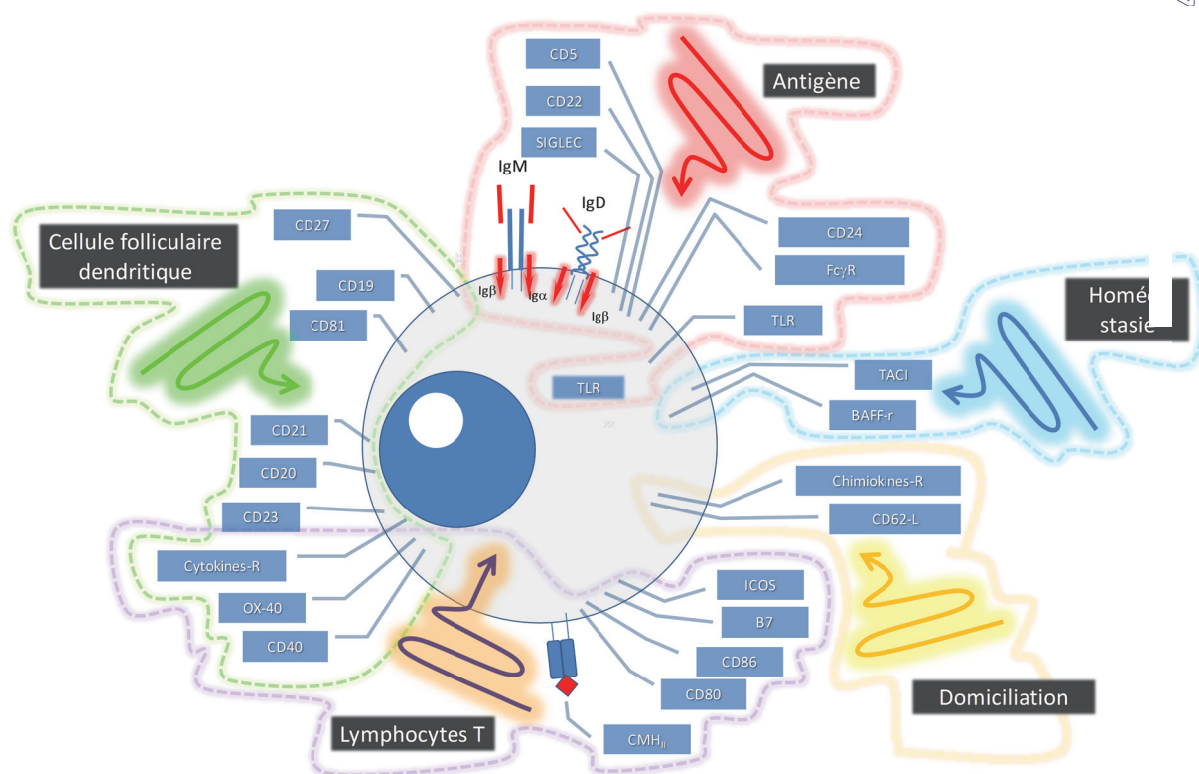


Figure 13 : Ensemble des récepteurs exprimés par le LB mature et capacités d'interaction avec différents partenaires de la réponse immunitaire. Activation dépendante de l'Ag (BCR) et indépendante du BCR.

1) Système du complément et autoréactivité

1-1) Récepteurs du complément et dualité fonctionnelle

Parmi les échanges que le LB peut engager, ceux entretenus avec le système du complément sont singulièrement duels. Pendant longtemps on n'a considéré que la relation étroite entre les Ac produits par les lymphocytes B et leur capacité à activer la voie classique du complément. L'identification de récepteurs (de « type 2 ») pour les protéines du complément (C3, C4 et dérivés iC3b, C3d...) à la surface des cellules de l'immunité a également permis de comprendre comment le système du complément pesait sur la réponse adaptative, notamment celle des LB. Il est enfin décrit des récepteurs de type 1 comme le CR1 (CD35), le *Decay Accelerating Factor* (DAF, CD55), le *Membrane Cofactor Protein* (CD46), dont les fonctions sont au contraire d'inhiber l'action du complément afin d'en assurer le contrôle et de protéger les cellules de l'hôte de toute activation inappropriée ou prolongée. Certains de ces récepteurs inhibiteurs pourraient

également agir en amont du processus inflammatoire et pèseraient sur « l'éducation » du système immunitaire adaptatif, c'est-à-dire induisant la tolérance des lymphocytes.

1-2) Récepteurs du complément et autoréactivité B

Des souris dont on a invalidé les gènes codant pour les équivalents des molécules DAF⁴ ou du CD59 chez l'homme, présentent des lésions inflammatoires de dermatites dorsales sévères, mais également un processus de prolifération lymphocytaire et des Ac anti-chromatine dont la fréquence de détection et le titre sont augmentés par rapport aux animaux témoins (Song 2006). On ignore si les mécanismes de contrôles de l'autoréactivité passent par la régulation de l'activation du complément (« en aval ») ou par un processus d'induction de tolérance centrale (« en amont »). Il semble toutefois que ces protéines DAF et CD59, deux protéines liées par ponts GPI, soient capables de s'associer aux radeaux lipidiques et par ce biais, capables de réguler certains processus d'activation des lymphocytes (Song 2006). De façon similaire, il a été décrit que les souris dont on a invalidé le gène codant le CD21 (CR2) présentent des taux anormalement élevés d'auto-anticorps anti-nucléaires. Le CD21 est une molécule dont l'expression semble précoce dans l'ontogénie des B puisqu'elle est décrite (à un faible niveau) à la membrane des cellules pré-B, dans la moelle osseuse. Son expression est renforcée dès le stade de lymphocyte transitionnel T2, puis MZB et LB Fo. On sait que CD21 s'associe physiquement à de nombreuses molécules dont les CD19 et CD81 pour s'associer avec le BCR au sein d'un radeau lipidique et renforcer la signalisation de ce complexe. On vu plus haut, l'importance de la signalisation « BCR » (c'est-à-dire la « quantité » de signal transduit) pour les événements de sélection aux étapes de maturation « post T1 » des lymphocytes B. Un défaut d'expression du CR2 pourrait donc contribuer à biaiser le répertoire auto-immun par un mécanisme de réduction du « signalosome » associé au BCR (Isaák *et al.* 2006).

1-3) Système du complément et autoréactivité B

On connaît depuis longtemps le lien qui existe entre déficits en protéines de la phase fluide de la voie classique (C1_{qrs}, C4 et C2) et le risque de développer une connectivite de type lupus érythémateux systémique. Selon MJ Lewis et M Botto, trois hypothèses peuvent être formulées pour en

⁴ On décrit chez les rongeurs deux protéines proches de DAF chez l'homme : une protéine totalement homologue (DAF), avec notamment le lien GPI, et une autre présentant une portion transmembranaire (Crry). Elles sont toutes deux issues du même gène dont le transcrit mature selon un épissage alternatif ().

expliquer les mécanismes (Lewis et Botto 2006). On peut les résumer comme suit :

1) *Défaut de clairance des Ag conduisant à leur dépôt dans les tissus.*

Les Ag normalement transportés à la surface des globules rouges (grâce aux récepteurs pour le complément) se détachent par défaut de forces de rétention *et al.*ors qu'ils devraient être détruits dans le foie ou la rate, ils se déposent dans les tissus. Ils y déclenchent des lésions inflammatoires par activation du complément.

2) *Défaut de clairance des cellules en apoptose.*

On verra plus bas dans quelle mesure les effecteurs du système immunitaire (dont le système du complément) participent à la clairance des cellules en apoptose. Pour le moment, nous retiendrons qu'un défaut d'élimination de ces cellules contribue à générer une inflammation locale et une rupture de tolérance du système immunitaire.

3) *Défaut d'induction de tolérance centrale (au sein de la moelle osseuse).*

Les auteurs ne détaillent pas cette hypothèse mais parallèlement aux aspects développés plus haut dans le cadre de l'anomalie d'expression du CD21, il est possible que le défaut d'expression des protéines du complément ou de leurs récepteurs conduise à un défaut de « trappage » des auto-antigènes dans les organes lymphoïdes, conduisant à un défaut d'éducation du système immunitaire par défaut d'auto-antigènes présentés.

En conclusion, dans le cadre de la relation entre les lymphocytes B, système du complément et auto-immunité pathologique, on peut donc décrire trois types de perturbations : un défaut intrinsèque d'induction de tolérance centrale ; une anomalie d'exposition d'antigènes au système immunitaire (« rupture d'ignorance ») ; une amplification de l'inflammation par défaut de contrôle du système du complément.

2) Récepteurs Toll like (TLR) et autoréactivité.

2-1) TLR et lymphocytes B

Les travaux de ces dernières années ont souligné combien la qualité de la réponse immunitaire adaptative était dépendante d'effecteurs et de médiateurs de l'immunité innée. On vient de voir les relations duelles entre LB et système du complément. On en décrit de comparables avec le système des récepteurs de l'immunité innée ou *Pattern Recognition*

Receptors (PRR). Les PRR sont des molécules invariantes présentes chez toutes les espèces vivantes et capables de transduire des signaux de danger pour un organisme quand ils sont mis en contact avec leurs ligands, motifs conservés, partagés par différents pathogènes (PAMP). On distingue différents type de PRR : les *Toll like receptors* (TLR) ; les Récepteurs de type Lectine C (CLR) ; les récepteurs des *Retinoïc-Acid-Inductible-Gene-I-Like* (RLR) et *Nucleotide Binding Oligomerization Domain like Receptors* (NLR ou *NOD Like Receptors*). Ces PRR contribuent à déclencher une première barrière de défense et participent à la mise en place de la réponse inflammatoire. Parmi les nombreux récepteurs de l'immunité innée exprimés par une cellule, la relation entre LB et TLR est particulièrement documentée. L'expression des TLR par les LB et leurs interactions avec leurs ligands ont en effet des conséquences primordiales pour l'activation et l'orientation fonctionnelle de ces cellules. Il est d'ailleurs considéré qu'après la stimulation *via* le BCR et le ligand du CD40, l'interaction de TLR9 avec ses ligands délivre un signal essentiel à l'acquisition de l'ensemble du panel de propriétés des LB, tant pour l'amplification que pour le contrôle de la réponse immunitaire (Mauri et Bosma 2012). En revanche, la participation des TLR au développement ontogénique des LB n'est pas clairement définie. Selon JC Weill, les TLR ne sont pas exprimés (ou à un très faible niveau) sur les cellules immatures puisque seules les cellules CD27+ exprimeraient les TLR2, 6, 7, 8, 9 et 10 après stimulation *via* le BCR (Weill *et al.* 2009). Pour d'autres auteurs, l'expression précoce des TLR à la membrane des LB immatures contribuerait à délivrer des signaux de survie et de prolifération (Rolink *et al.* 2002). Guerrier *et al.* (Guerrier *et al.* 2012) comme Capolunghi *et al.* (Capolunghi *et al.* 2008) par exemple, rapportent que l'interaction de TLR9 avec un ligand (qu'il soit exogène, endogène ou synthétique) facilite la différenciation du lymphocyte B immature T2 en MZB (ou MZB like). Isnardi *et al.* rapportent enfin que des patients présentant une anomalie des voies de transduction MyD88 ou IRAK-4 présentent des anomalies de production d'Ac auto-immuns en relation avec un trouble de la genèse centrale du répertoire B (Isnardi *et al.* 2008).

2-2) Ligands des TLR

Pendant longtemps on a considéré que les TLR interagissaient exclusivement avec les PAMP. Il a toutefois été montré qu'ils pouvaient engager des signaux d'activation cellulaire à la suite d'interactions avec de nombreux ligands endogènes qui peuvent être considérés comme des motifs associés aux dommages cellulaires (DAMP). Le tableau 3 reprend les différents TLR, leur ligands, leurs sites d'expression et précise s'ils sont exprimés par les LB, chez l'homme.

| TLR | Ligands | | Sites d'expression | LB |
|-------|-----------------------------------|---|--------------------|-------|
| | Exogènes | Endogènes | | |
| TLR1 | - Triacyl-lipo-peptides | | Membrane | + |
| TLR2 | - Triacyl-et diacyl lipo-peptides | - HSP70 - fibronectine - Hyaluronate - Héparane sulfates - LDL - HMGB1 - α A Cristalline | Membrane | \pm |
| TLR3 | - ARN double brin | - ARN | Intracellulaire | \pm |
| TLR4 | - LPS | - HSP (60,70) | Membrane | -* |
| TLR5 | - Flagelline | - | Membrane | \pm |
| TLR6 | - diacyl lipo-peptides | - | Membrane | ++ |
| TLR7 | - ARN simple brin | - ARN | Intracellulaire | ++ |
| TLR8 | - ARN simple brin | - ARN | Intracellulaire | \pm |
| TLR9 | - ADN | - ADN | Intracellulaire | ++ |
| TLR10 | ? | ? | Membrane | ++ |

Tableau 3 : Présentation des différents TLR chez l'homme, leur cibles exo et endogènes ; leur expression extracellulaire ou intracellulaire ; leur expression à la surface du LB. D'après (Marshak-Rothstein 2006)

* Fonction de l'état d'activation cellulaire pour l'homme

2-2-1) Conséquences de l'engagement des TLR

L'interaction des TLR avec leurs ligands déclenche des signaux d'activation cellulaire qui, en fonction de la cellule sollicitée, peuvent initier, amplifier et diversifier la réponse immunitaire. Il a été rapporté que cette signalisation peut favoriser les processus d'hypermuation somatique et de commutation isotypique (Herlands *et al.* 2008). Ces signaux d'activation impliquent généralement l'interaction de la molécule adaptatrice MyD88, puis IRAK-4 et rejoignent la signalisation NF- κ B. Dans le cadre de ligands endogènes, c'est-à-dire de molécules du soi, un rapprochement avec la physiopathologie des maladies auto-immunes (MAI) est envisageable. De nombreuses études ont donc été engagées pour apprécier dans quelle mesure ces acteurs de l'immunité innée pouvaient être impliqués dans les mécanismes d'initiation ou de progression des lésions de MAI (Marshak-Rothstein 2006).

2-2-2) TLR et physiopathologie des MAI

Plusieurs arguments plaident pour une participation active des TLR dans les MAI. Ainsi on peut retenir (Marshak-Rothstein 2006) :

- (1) L'expression des TLR (membranaire, ou endosomale) intéresse des cellules impliquées dans les MAI (cellules dendritiques et LB, par exemple).
- (2) La reconnaissance par les TLR de ligands exogènes connus comme associés au déclenchement ou exacerbation des poussées de MAI (exemple des virus tels que l'EBV).
- (3) La sollicitation des TLR induit un profil d'activation cellulaire associée aux MAI (profil Th17, interféron de type I par exemple).
- (4) Il existe une boucle d'amplification d'expression des TLR au niveau des LB (TLR7 notamment) après la production d'interféron α par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Crampton *et al.* 2010).
- (5) Les TLR reconnaissent des ligands endogènes associés à la souffrance ou l'apoptose cellulaire.
- (6) On décrit une co-localisation des ligands reconnus par les récepteurs de l'immunité adaptative (Ac anti-antigènes nucléaires solubles ou ADN double brin, par exemple) et les TLR (7, 8, 9 respectivement).
- (7) Indirectement, certains médicaments contrôlant les poussées de MAI comme les anti-paludéens de synthèse, agissent par blocage de l'acidification des endo-lysosomes, et consécutivement, par blocage de l'activation des TLR7 et 9.

2-2-3) Apport des modèles animaux

Des modèles expérimentaux de souris chez lesquelles les gènes codant TLR7, 8 et 9 ou MyD88 (molécule adaptatrice commune aux différents TLR) ont été inactivés, montrent que l'absence de TLR réduit la quantité d'auto-anticorps détectable dans le sérum, ou modifie le profil d'auto-réactivité, avec disparition des Ac anti-ADN double brin chez les souris KO pour TLR9, par exemple (Christensen *et al.* 2006). De façon intéressante, les souris KO pour TLR8 présentent une exacerbation des manifestations auto-immunes chez les lignées de souris sensibles. Il semblerait donc que la présence de TLR8 atténue les effets pro-inflammatoires de TLR7 au contact de ligands endogènes (Demaria *et al.* 2010).

Comme pour les effecteurs du système du complément, il apparaît que les TLR sont des éléments d'activation mais aussi de régulation cellulaire qui peuvent peser sur le développement des LB et l'expression de leurs propriétés autoréactives. Ils illustrent comment les différents mécanismes pèsent à la fois sur les propriétés intrinsèques du système immunitaire, en agissant sur l'ontogénie des cellules immunitaires, leur apportant un « formatage » particulier qui sélectionnera le panel de réponses que le système immunitaire peut offrir dans un environnement particulier.

I-C] Synthèse

Au terme de cette présentation rappelant le rôle de l'autoréactivité et de l'immunité innée au cours de l'ontogénie et de l'homéostasie des LB, il apparaît donc que la constitution du répertoire immunitaire est jalonnée de nombreux niveaux de contrôles (« checkpoints ») qui interviennent tout au long de la vie de ces cellules. Malgré ces contrôles, la capacité d'autoreconnaissance n'est pas annihilée. Aux stades précoces, les premiers contrôles contribuent à façonner le répertoire pré-immun alors qu'au stade de cellules matures, les derniers mécanismes de contrôle, s'ils modifient peu le répertoire, contribuent à prévenir une auto-immunité pathologique en modulant la réactivité des cellules (figure 14). De grands progrès ont été faits dans la connaissance des processus qui, isolément et par leur association, construisent la réponse des lymphocytes B et surtout son contrôle. **Nous allons maintenant nous intéresser au répertoire des Ac circulants, reflet probable d'une grande partie de la production globale de la réactivité des LB dans l'organisme (répertoires naturel et adaptatif).**

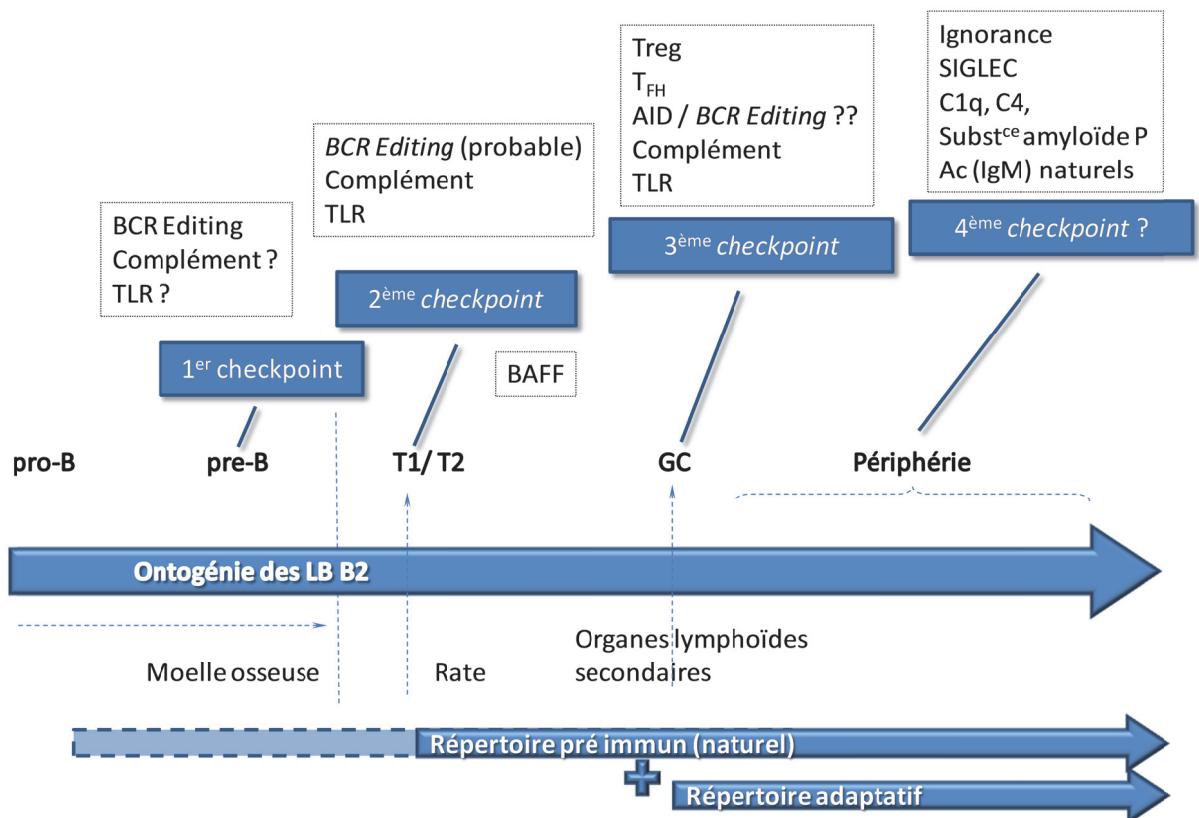


Figure 14 : Maturation des LB B2 et constitution du répertoire. Siège des différents niveaux de contrôles et mécanismes impliqués.

II] Le répertoire des anticorps ; la place de l'autoréactivité

Après avoir décrit les événements rencontrés par le LB qui conditionnent son devenir et contribuent à façonner son répertoire, nous allons aborder l'étude des Ac circulants. Nous développerons ensuite les facteurs génétiques et environnementaux qui pèsent sur l'émergence d'un répertoire autoréactif pathologique. Outre l'intérêt de l'analyse du répertoire des Ac circulants pour mieux appréhender le comportement du système immunitaire face à différentes situations d'agression ou d'induction de tolérance, on peut aussi s'interroger sur l'implication du répertoire dans l'homéostasie des cellules B aux fonctions multiples (figure 15). Concernant la polarisation fonctionnelle des LB, si on implique de nombreux facteurs non dépendants de signaux BCR (rôle de la coopération T, rôle de l'immunité innée, rôle de facteurs homéostatiques, de chimiokines, de cytokines), le rôle de signaux BCR ne doit pas être négligé.

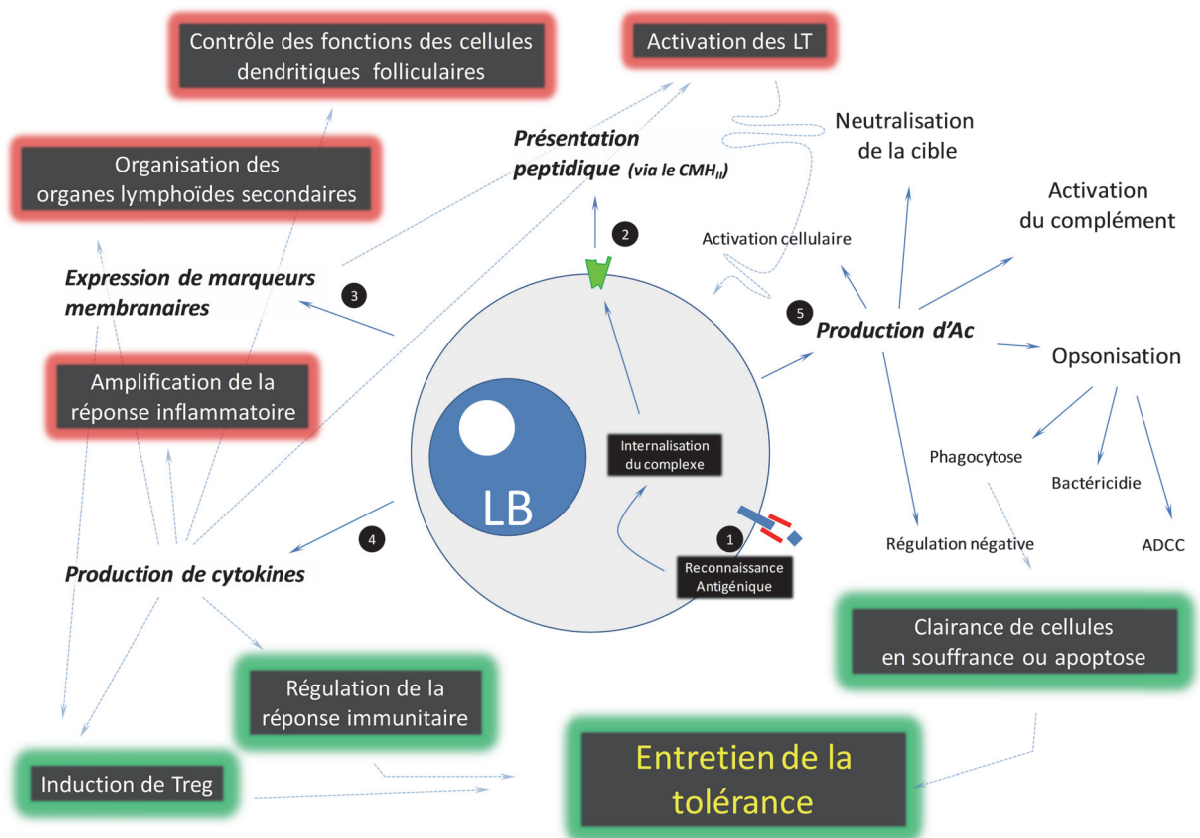


Figure 15 : Multiplicité des fonctions des LB : quel est le rôle de la reconnaissance antigénique dans le contrôle de ces fonctions ?

II A] Le répertoire des Ac et autoréactivité physiologique

Quotidiennement 15 à 20 millions de lymphocytes B sont produits. Nous avons vu que seule une fraction de ces cellules pourra suivre toutes les étapes de différenciation et nous rappellerons ici la durée de vie de ces cellules, en fonction de leur stade de maturation : LB T0-T1 (« sans avenir » de différenciation) : deux à trois jours ; MZB : vie longue (capable d'auto-renouvellement ?) ; LB Fo, cellule mature et naïve : vie longue (1-3 mois, dans les conditions physiologiques) ; plasmablastes : 2-3 semaines ; cellules mémoire et plasmocytes : plusieurs années probablement. Si seules certaines cellules sont capables de sécréter des Ac lors de sollicitations antigéniques, on sait que le répertoire des Ac circulants est très large car il témoigne de l'accumulation de nombreuses spécificités (place des Ac naturels et de la réponse des B mémoire ?). La constitution de ce répertoire, son maintien et son rôle dans l'homéostasie du système immunitaire sont au cœur des questions que pose notre projet de travail. En toute hypothèse, l'ensemble des spécificités d'Ac qui compose le « répertoire » de reconnaissance des lymphocytes B est formé d'une part du répertoire dit « adaptatif » (ou « immun ») et d'un répertoire dit « naturel » (encore appelé « pré-immun »). De nombreuses caractéristiques les distinguent et leur analyse peut permettre de cerner certaines propriétés fonctionnelles des cellules qui les produisent.

1) Répertoire adaptatif et autoréactivité

Le répertoire adaptatif des Ac est composé de spécificités acquises traduisant la capacité des lymphocytes B à s'adapter à l'environnement auquel il a été confronté. Ce répertoire peut être assimilé à la somme de spécificités Ac traduisant l'accumulation des expériences immunitaires de l'individu (héritage antigénique et mémoire immunologique). Ces Ac présentent des spécificités de reconnaissance singulières ciblant tel ou tel épitope d'agent pathogène, mais aussi toute autre molécule (auto-antigène) susceptible d'activer une réponse immunitaire adaptative (Tiller *et al.* 2007; H. Wardemann *et al.* 2007). On rappellera qu'ils sont surtout produits par des LB qui ont été activés et qui ont bénéficié une aide « cognate », ou polyclonale, ayant conduit aux phénomènes d'hypermutations somatiques et de commutations isotypiques (figure 11).

2) Répertoires naturels des anticorps : ses caractéristiques

La notion de répertoire naturel est évoquée depuis les toutes premières descriptions des propriétés lytiques du sérum décrites par les chercheurs de l'Institut Pasteur de Paris au début du XX^{ème} siècle. On le qualifiait de « naturel » ou « pré-immun » car on considérait ces Ac comme produits en dehors de toute stimulation antigénique externe à l'organisme. Cette notion est toutefois floue car elle ne précise pas leur origine et notamment l'importance des auto-antigènes ni celle de la flore intestinale pour sa constitution. À titre d'exemple : la production d'Ac (dits « naturels ») dirigés contre un antigène de groupe sanguin non exprimé par un individu, serait sous la dépendance de la colonisation bactérienne du tube digestif. En effet, les Ac dirigés contre les Ag de groupes ABO ne sont détectables qu'après plusieurs mois de vie. La question est de savoir si la présence de la flore intestinale facilite l'émergence de spécificités qui seraient apparues sans elle, ou si elle participe activement à la constitution du répertoire qui serait « amputé » en son absence.

Landsteiner rapportait que si les Ac naturels anti-antigènes de groupe sanguin étaient largement distribués au sein de l'espèce humaine, leurs titres étaient variables d'un individu à l'autre (Avrameas et Ternynck 1995). Les données de la littérature ne semblent toutefois pas s'accorder sur les concentrations d'Ac naturels circulants. Des titres estimés à un quart de la concentration des immunoglobulines circulantes ont été rapportés (Avrameas *et al.* 1995; A. Coutinho *et al.* 1995). Quelle(s) population(s) cellulaires est (sont) à l'origine de la génération du répertoire d'Ac naturels ? On ne retrouve que très peu de données dans la littérature, les recherches n'ayant été menées qu'à partir de populations globales de cellules extraites d'organes lymphoïdes et de clones cellulaires immortalisés par EBV⁵. Les résultats ne semblent donc pas représentatifs des conditions physiologiques. Toutefois, il a été rapporté qu'en fonction de l'origine de l'organe lymphoïde (primaire, secondaire), la quasi totalité des clones transformés pourraient produire des auto-anticorps autoréactifs, et que plus de la moitié seraient polyréactifs. Outre les LB B1 (Montecino-Rodriguez *et al.* 2006; Sauerborn et H. Schellekens 2009), il a été évoqué que les lymphocytes MZB pouvaient être à l'origine de la production d'Ac naturels dirigés contre les xéno-antigènes (Pillai *et al.* 2005). On a vu que des LB qui ont subi des hypermutations somatiques sont susceptibles de produire des auto-anticorps circulants (Tiller *et al.* 2007) sans qu'il y ait de manifestations pathologiques chez les individus qui les hébergent. Ces Ac ne répondent toutefois pas à la stricte définition des Ac naturels puisqu'ils sont codés par

⁵ Ces cellules « manipulées » sont-elles vraiment le reflet de celles qui produisent les Ac naturels *in vivo* ? Probablement pas.

des gènes qui ne sont plus en configuration germinale. Existe-t-il d'autres populations à l'origine de la production des Ac naturels ? La question reste aujourd'hui ouverte.

Si initialement les Ac naturels étaient considérés uniquement d'isotype IgM, les classes IgA et IgG ont ensuite été décrites (Avrameas *et al.* 1995). Selon certains travaux, l'IgM constitue le caractère le plus représentatif des Ac naturels ayant des propriétés de polyréactivité et de faible affinité. En revanche, les Ac naturel de classe IgG seraient de plus forte affinité avec un gain de spécificité pour l'Ag-cible (Adib *et al.* 1990). De façon intéressante, les répertoires respectifs des Ac naturels de classe IgM et IgG pourraient n'être que partiellement chevauchants, c'est-à-dire que des Ac naturels d'isotypes différents partageraient la reconnaissance de certains épitopes, alors que d'autres épitopes seraient reconnus par des Ac d'isotypes différents (Nobrega *et al.* 1993). On peut l'expliquer au moins partiellement par le fait qu'une collaboration pourrait être engagée (IgG), ou non (IgM), avec les lymphocytes T en fonction de la nature des antigènes thymo-dépendants (IgG) ou indépendants (IgM). Les mécanismes d'activation polyclonale (*via* les TLR, par exemple) pourraient aussi conduire à la commutation isotypique.

2-1) Propriétés des Ac naturels : des caractéristiques encore mal définies.

À la lecture de la littérature (revue in (Avrameas *et al.* 1995)), le répertoire d'Ac naturels est très hétérogène et son origine reste indéfinie. La frontière avec le répertoire adaptatif est parfois imprécise. Deux propriétés essentielles semblent qualifier les Ac naturels : la polyréactivité et la faible affinité des Ac. Un **même** Ac naturel serait ainsi capable de réagir, à la fois, avec certains antigènes du soi et avec des exo-antigènes. Cette polyréactivité pourrait être liée au fait que les gènes codant les immunoglobulines sont en configuration germinale (absence d'hypermutations somatiques). Selon les résultats des travaux de Tarique Khan (Khan et Salunke 2012), le phénomène d'hypermutations somatiques stabilise la structure du paratope, lui conférant une spécificité plus restreinte et dans le même temps une affinité plus importante (Khan *et al.* 2012). L'équipe de M.D. Kazatchkine évoquait déjà ce phénomène en 2003 (Oppezzo et Dighiero 2003). Au contraire, les Ac en « configuration germinale », présenteraient une certaine « laxité » conformationnelle du fragment Fab, leur conférant des capacités de polyréactivité. Dans l'exemple cité dans l'article de Khan, l'Ac non muté a la capacité de se fixer à quatre épitopes différents, par l'intermédiaire de six topologies paratopiques différentes (Khan *et al.* 2012). Ces propriétés ont particulièrement été appréhendées lors de l'évaluation des fonctions des immunoglobulines polyvalentes utilisées en thérapeutique (IgIV) (Djoumerska-Alexieva *et al.* 2010; Vani *et al.* 2008). *In vivo*, il a été observé que le pH dans l'environnement immédiat des immunoglobulines (exemple

d'un contexte inflammatoire) peut influencer les propriétés de reconnaissance de celles-ci (Dimitrov *et al.* 2008). Parmi les Ac naturels, deux grandes populations ont été individualisées :

2-1-1) Les Ac naturels produits après contact antigénique.

Contrairement à la définition classique, il existerait une population d'Ac naturels ayant des spécificités « acquises » (Avrameas *et al.* 1995). Elle constituerait la population majoritaire d'Ac naturels. La production de certains Ac naturels pourrait dépendre de la collaboration avec les lymphocytes T. Malgré cette collaboration, les LB ne bénéficieraient pas de processus de maturation et à la différence des cellules adaptatives ne présenteraient pas d'hypermutations somatiques. Ils ne persisteraient que par l'intermédiaire de stimulations antigéniques répétées, probablement par l'intermédiaire d'un réseau de réactivités croisées, parfois sans un rapport direct avec l'antigène cible qu'ils reconnaissent. Il semble donc que la quantité de signaux délivrée à ces cellules soit primordiale pour la synthèse de ces Ac, mais n'induit pas de différenciation plasmocytaire.

2-1-2) Ceux produits indépendamment de toute stimulation antigénique

La deuxième population d'Ac naturels serait constituée d'Ac dont la production serait indépendante de toute stimulation antigénique. Ils exprimeraient de larges capacités de reconnaissance (polyspécificité), et notamment d'auto-réactivité. Les cellules à l'origine de production de cette population pourrait être activée par un effet « *bystander* », bénéficiant de facteurs de croissance en dehors de stimulation antigénique spécifique. Elle serait minoritaire et circulerait à faible concentration (Avrameas *et al.* 1995).

2-2) Cible des Ac naturels

2-2-1) Une multiplicité de cibles mal caractérisées :

Les premières cibles décrites pour les Ac naturels ont été les antigènes de groupe sanguin. Ces Ag ne constituent toutefois pas les seules cibles puisqu'il a été décrit des Ac naturels anti-spermatozoïdes, anti-lymphocytes voire même vis-à-vis de différents tissus (foie, estomac, thyroïde...) (Avrameas *et al.* 1995) sans caractéristique précise de la cible épitopique. On les retrouve chez de nombreuses espèces et ce dès la naissance et en dehors de toute stimulation exogène (conditions « germ free »). La production des Ac « anti-tissus » serait influencée par les agressions des « tissus-cibles » puisque les titres augmentent après une lésion tissulaire. De même il a été décrit des Ac naturels anti-tumeur, capables de lyser des cellules tumorales au moins *in vitro* (Chow *et al.* 1989). On décrit aussi, chez

les sujets sains, des Ac naturels reconnaissant des cibles antigéniques classiquement associées aux processus pathologiques : des Ac anti-ADN double brin, anti-nucléosomes, anti-Fc des immunoglobulines (facteurs rhumatoïdes). Ces résultats nous interrogent sur la frontière entre auto-immunité physiologique et pathologique. Au total, les Ac naturels peuvent donc reconnaître de très nombreux auto-antigènes du soi : antigènes ubiquitaires ; Ag intracellulaires ou membranaires ; antigènes circulants ; protéines, carbohydrates, lipides, acides nucléiques ; Ag présents chez l'homme ou chez d'autres espèces animales (Ac « hétérophiles »). Ainsi, certains Ac naturels polyspécifiques sont capables de reconnaître des structures antigéniques aussi différentes que de l'ADN simple ou double brin, des antigènes protéiques du cytosquelette ou des phospholipides (A. Coutinho *et al.* 1995). Outre les antigènes du « soi », les Ac naturels seraient capables de reconnaître une large population d'antigènes issus d'agents pathogènes, qu'ils soient d'origine bactérienne ou virale : ils constitueraient une première ligne de défense.

2-2-2) Des épitopes publics ou privés ; exposés ou masqués :

L'équipe de S. Avrameas et M.D Kazatchkine rapporte que si les Ac naturels sont dirigés contre des composants antigéniques du soi (autorisant à les appeler auto-anticorps), ils ne seraient pas strictement spécifiques de l'individu qui les produit puisqu'ils reconnaîtraient plutôt des déterminants antigéniques « publics », présents chez tous les individus d'une même espèce, et parfois mêmes communs à des espèces différentes (Ac anti-ADN et anti-récepteur de l'acétylcholine, par exemple) (Oppezzo *et al.* 2003). En revanche, il semblerait impossible d'identifier chez un individu, des Ac naturels dirigés contre des épitopes « privés ». Ceux-ci auraient été éliminés ou seraient soumis à un contrôle très strict (exemple du réseau idiotype anti-idiotype que nous évoquerons plus loin). En revanche le répertoire dirigé contre des épitopes publiques (antigènes « li », déterminants monomorphiques du système Rhésus, etc.) ne serait pas neutralisé et constituerait même un élément majoritaire du répertoire B naturel physiologique. La raison de ce phénomène pourrait être liée à l'exposition de ces différents antigènes privés et publics. Au travers des données de la littérature, les hypothèses suivantes illustrées dans la figure 16, peuvent être proposées :

- i) Des antigènes particulièrement exposés (« épitopes privés »), directement accessibles pour le BCR et non masqués par des motifs qui interagissent avec des récepteurs inhibiteurs (tels les SIGLEC), ou des réseaux (exemple de l'idiotype) engagent un processus de délétion clonale ou de révision paratopique des LB (absence d'autoréactivité pathologique potentielle).

- ii) Des épitopes masqués ne seront pas aptes à induire un processus de sélection positive (« ignorance »; absence d'autoréactivité pathologique potentielle).
- iii) Des cellules faiblement autoréactives peuvent interagir aussi avec des xéno-antigènes sélectionnant ainsi des clones producteurs d'Ac naturels utiles à la préservation de l'intégrité de l'organisme dans sa défense et dans l'homéostasie (auto-immunité protectrice utile).
- iv) Des cellules faiblement autoréactives capables d'interagir avec des antigènes du soi (épitopes publics ?) constituant des déchets pour l'organisme (Plotz 2003). Ceux-ci doivent être éliminés avant que leur accumulation ne constitue une situation dangereuse (auto-immunité protectrice « dangereuse »).

Les cellules faiblement autoréactives représentent une population utile pour occuper la niche des cellules circulantes (notion d'homéostasie lymphocytaire).

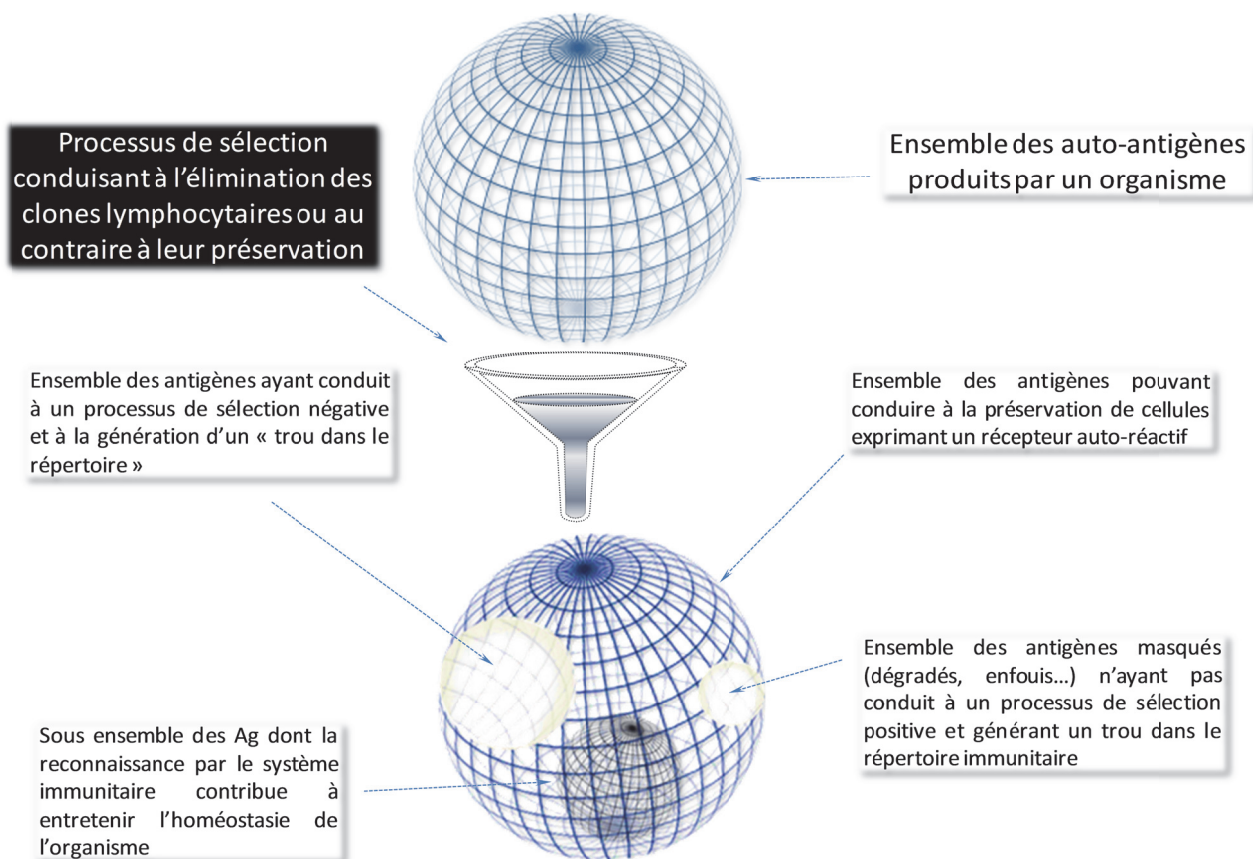


Figure 16 : Schéma représentatif de l'ensemble des auto-antigènes susceptibles d'être reconnus par les Ac naturels (inspiré de (Plotz 2003)).

2-3-1) Le concept d'immunculus : une reconnaissance d'un « soi » dynamique

Certains Ac naturels autoréactifs seraient produits très précocement au cours la vie. Malgré l'apparition de nouvelles réponses liées à la colonisation par la flore bactérienne et aux nouvelles « expériences antigéniques » du système immunitaire, ces premiers Ac persisteraient tout au long de l'existence et confèreraient une relative stabilité à une fraction du répertoire. Ces Ac constitueraient pour certains le « répertoire primordial ». Cette somme des réactivités naturelles autoréactives et polyréactives traduirait la « vision singulière de l'organisme » par le système immunitaire. En effet, nous l'avons vu, le système immunitaire a une autoreconnaissance sélective. La « vision » de l'ensemble des auto-antigènes, résultat de toute la production d'Ac naturels serait donc biaisée : partielle, ou « déformée ». Globalement elle constituerait un « immunculus » (I. R. Cohen et D. B. Young 1991), au même titre qu'on a décrit un « homonculus », pour le système nerveux central (figure 17 A). Pour l'immunculus (ensemble des récepteurs constituant le répertoire), la représentation que le système immunitaire aurait des Ag de l'organisme dépendrait du nombre (de la richesse) des épitopes exposés par les différents tissus (« soi exposé »). Selon Poletaev *et al.*, cet immunculus constituerait une image « métabolique » de l'organisme (Poletaev et Osipenko 2003) avec de possibles variations dynamiques. L'immunculus serait susceptible d'évoluer en fonction des nouveaux antigènes (auto-antigènes, mais pas uniquement) exposés au système immunitaire tout au long de la vie d'un individu. Les capacités de variations seraient toutefois restreintes. En effet, cette équipe suggère que le système immunitaire se servirait de cette vision du « monde des antigènes » comme d'un modèle (ou « patron ») de l'état d'homéostasie de l'organisme, reflet de son état de base « idéal ». L'immunculus servirait ainsi de « gyroscope métabolique » (selon les termes de l'article) permettant, en cas de déviation prolongée par rapport à cet état de base, d'induire des mécanismes compensateurs ou réparateurs visant à restaurer l'homéostasie (Poletaev *et al.* 2008). À la « connaissance » de l'organisme qu'apporterait l'immunculus (« gnōthi seautón ») (Avrameas 1991), le répertoire naturel dirigé contre les xéno-antigènes (composé d'ailleurs pour partie des mêmes Ac, polyréactifs), fournirait à l'organisme une véritable image « holographique » de l'ensemble de son état métabolique. Cette image serait opérationnelle en **tout lieu et en tout instant**, puisque le répertoire des Ac sériques est effectivement identique quels que soient le lieu et le moment (du nyctémère) où on les recueille et les étudie (figure 17 B).

2-3-2) Fonctions de l'immunculus : de nouvelles hypothèses.



Les Ac naturels réagissent avec des Ag du soi ou des xéno-antigènes. Ils favorisent leur opsonisation, la fixation et l'activation des protéines du système du complément ainsi que la phagocytose par les macrophages, et finalement leur élimination par la rate et le foie. Très tôt, Grabar *et al.* ont indiqué que ces Ac naturels pouvaient participer au transport et à l'élimination physiologique de déchets de l'organisme et de xéno-antigènes, limitant ainsi leur toxicité (Grabar 1975). Ils y contribuent ainsi au maintien de l'homéostasie selon deux mécanismes : élimination avant que ces déchets/agents agresseurs ne soient toxiques, mais aussi avant que la réponse inflammatoire qui devrait être mise en place pour les éliminer ne produise elle-même des dégâts tissulaires. Il est évoqué que l'un des mécanismes d'action des immunoglobulines polyvalentes intraveineuses passe par cette capacité (Berneman *et al.* 1993; Grönwall *et al.* 2012). Le tableau 4 rappelle quelques unes des fonctions qui ont été associées aux Ac naturels (Avrameas *et al.* 1995).

| Fonctions biologiques | |
|---|---|
| Clairance | Élimination de cellules en apoptose |
| | Élimination de déchets cellulaires |
| | Élimination de cellules stressées ou tumorales |
| | Opsonisation d'agents infectieux |
| Mise en place de la réponse immunitaire | Présentation antigénique |
| | Interaction via les fragments Fc et leurs récepteurs exprimés par la cellule présentatrice d'Ag |
| | Par l'intermédiaire du réseau idiotypique |
| Immunorégulation | Par action sur le réseau des cytokines (transport ?) |
| | Par interaction avec les cellules T et B (Fc récepteurs...) |
| | Prévention de MAI (?) |
| Activité catalytique | « Abzyme ? » |

Tableau 4 : fonctions associées aux Ac naturels (d'après (Avrameas *et al.* 1995))

Poletaev *et al.* suggèrent également que le système immunitaire ne fait pas de distinction « soi » ou « non-soi » (Poletaev *et al.* 2008). Nous avons vu dans l'introduction combien cette notion de discrimination entre « soi toléré » et « non-soi » rejeté est aujourd'hui contestable. Plus spécifiquement, ces auteurs s'interrogent sur ce qui distinguerait, pour un BCR ou un TCR, un épitope du soi d'un épitope étranger, à l'échelle atomique et des échanges électrostatiques. Ces auteurs proposent que les cellules de l'immunité ne réagiraient qu'à « **ce qui change** » (sur deux plans : **quantitatif et temporel**). Elles seraient donc sensibles à l'émergence d'un épitope dont la concentration augmenterait « subitement ». C'est ce phénomène (« ce qui change rapidement ») qui conduirait à la mise en place d'une réponse de la part des Ac naturels pour tenter de restaurer l'état initial. À l'échelle d'un

unique lymphocyte, la vision « du problème » (par le biais de l'épitope qui émerge) serait extrêmement restreinte, mais la « connectivité » du système immunitaire (le « dialogue » entre les cellules) permettrait d'envisager une vision plus globale à l'échelle antigénique pour aboutir à une réponse coordonnée, « intégrative ». A cette connectivité cellulaire peut être associée une connectivité moléculaire représentée notamment par le réseau idiotypique. Pour appuyer l'assertion de l'absence de distinction « soi – non soi », les auteurs rappellent que sur la vingtaine d'AA susceptibles de se combiner pour former un épitope, seuls certains d'entre eux semblent cruciaux pour l'interaction avec le paratope. Plus encore à l'échelle des échanges de liaisons électroniques, il existe de nombreuses communautés structurales (redondances « stéréochimiques ») entre les AA, de sorte que « *l'univers du possible* » des épitopes ne serait pas infini, et que seuls « quelques » milliers d'épitopes pourraient exister en termes de reconnaissance paratopique. Combinés de façon aléatoire, ces épitopes génèreraient toute la diversité des protéines que l'on connaît (Plotz 2003), mais la vision de l'ensemble des antigènes par le système immunitaire resterait elle, limitée au nombre des épitopes (« mimotopes ») qu'ils sont capables de reconnaître avec plus ou moins d'affinité. Ce phénomène de restriction présenterait un avantage pour notre système de défense : à produire des récepteurs qui reconnaissent des motifs partagés entre soi et non-soi, le système immunitaire peut aussi les utiliser à des fins d'élimination de motifs étrangers, quitte à faire évoluer ces récepteurs dans un second temps pour les rendre plus efficaces par le biais de mutations somatiques (« répertoire éduqué »). Cette vision d'un nombre limité d'épitopes reconnus par le système immunitaire fait écho à l'analyse d'HP Plotz que nous avons déjà évoquée plus haut (Plotz 2003).

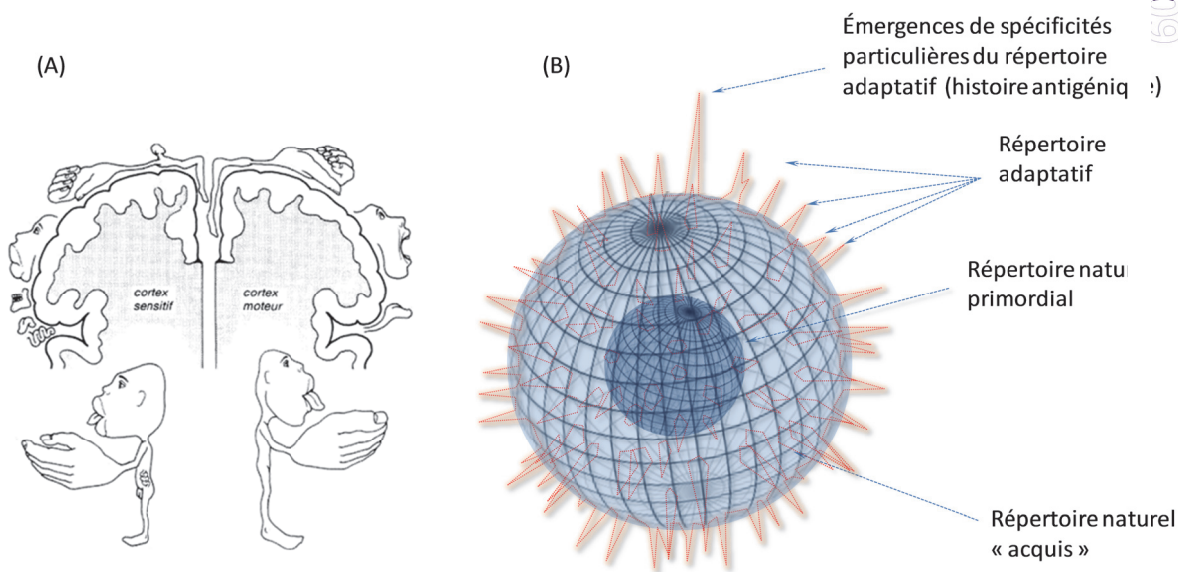


Figure 17 : Représentation schématique des homonculus et immunoculus

(A) Représentation de l'homonculus, projection des terminaisons nerveuses sur les aires motrices ou sensitives du cerveau. Apprécier la distorsion de la représentation du corps en fonction de la richesse de l'innervation de l'organe ou du membre (d'après Godefroid, J.- 1988, extrait de <http://www.afblum.be/bioafb/hominisa/hominisa.htm>)

(B) Vision schématique des répertoires naturels (primordial (« naïf ») et acquis (« éduqué »)) et adaptatif.

Noter que le répertoire adaptatif correspond à la somme des expériences immunitaires ayant conduit à l'émergence de réactivités d'Ac immuns spécifiques d'antigènes. La base de production des Ac adaptatifs repose-t-elle sur le socle des cellules produisant les Ac du répertoire naturel ?

Le répertoire naturel primordial est constitué d'Ac présents à la naissance. On le considère stable tout au long de la vie. Le répertoire naturel acquis se construirait après la naissance. La forme sphérique donnée à ces deux répertoires tente de traduire la dimension de régulation générée et entretenue par l'intermédiaire du réseau idiotypique. Inspiré de la lecture de (Poletaev et al. 2003; Poletaev et al. 2008).

2-4) Le réseau idiotypique

On ne peut évoquer le répertoire d'Ac naturels sans évoquer le réseau idiotypique (António Coutinho 2003). Son existence et ses fonctions ont été largement débattues et même contestées. Nous rappellerons ici brièvement son origine, son mode de fonctionnement et quelques unes de ses fonctions.

2-4-1) Les idiotypes

Les paratopes sont constitués d'une architecture (*framework*) et de Régions Déterminant la Complémentarité (CDR). Ce sont celles-ci qui constituent surtout les idiotopes. Chaque Ac exprime donc une singularité idiotypique (somme des idiotopes α et β) liée à sa capacité à reconnaître un épitope particulier. Cet idiotype est produit par la recombinaison des gènes $V(D)J$ à laquelle s'ajoutent les phénomènes de diversité N, de combinaison

des chaînes légères et lourdes et évidemment, les hypermutations somatiques. On comprend toutefois qu'il existe différents degrés de singularité entre les différents Ac produits par un organisme. Certains idiotopes se ressemblent (idiotopes « partagés ») alors même qu'ils sont exprimés par différents Ac. Même chez des individus différents, on considère que des Ac (alors qu'il existe des variations alléliques au sein de chaque sous groupe d'homologie des gènes V) peuvent partager des idiotypes : appelés « idiotypes publics ». Ils seraient principalement portés par les Ac naturels produits par des gènes en configuration germinale. En revanche, il peut exister des idiotopes privés, uniquement exprimés par certains Ac, particulièrement ceux du répertoire adaptatif : les hypermutations somatiques apportent en effet des particularités de spécificités qui sont propres à chaque individu et à son histoire antigénique.

2-4-2) Le réseau idio-anti-idio

Les idiotopes sont des « épitopes » exprimés par des protéines (les immunoglobulines), dont la concentration peut considérablement varier sur des temps brefs. Par ailleurs, l'immunculus, particulièrement sensible aux variations rapides de concentrations d'un Ag (Poletaev *et al.* 2008), par le biais des Ac naturels va rétablir une situation d'équilibre transitoirement perturbée. Cette régulation passera par une réaction en cascade d'Ac anti-idiotopes (première, deuxième génération...), restaurant le maillage du réseau et son équilibre (« connectivity »). Cette hypothèse s'inscrit dans une vision « internaliste » autorégulée du système immunitaire dont nous avons évoqué les limites dans l'introduction.

II B] Répertoire des Ac et autoréactivité pathologique.

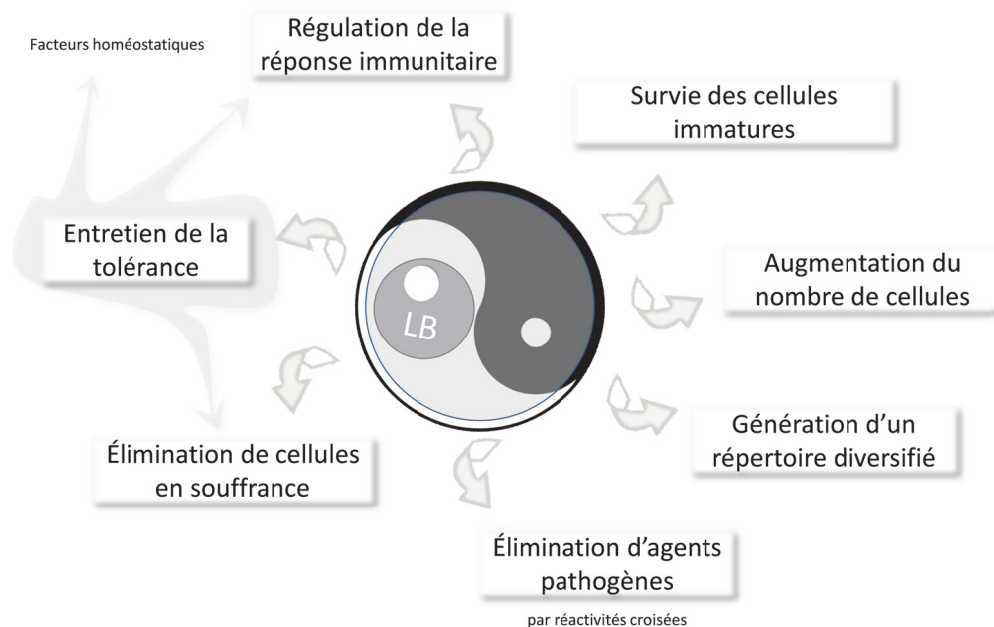
Contrairement à ce qui a pu être évoqué par le passé, on a vu que la reconnaissance des antigènes du soi, était utile à la construction d'un système immunitaire efficace. L'autoreconnaissance permet notamment aux LB de proliférer et de diversifier le répertoire de reconnaissance antigénique par le biais du *BCR editing*. L'autoreconnaissance apparaît aussi utile à l'homéostasie du système immunitaire et pour le maintien de l'intégrité de l'organisme. La production naturelle d'Ac, constitue, nous l'avons vu, une première ligne de défense vis-à-vis de nombreuses sources d'agressions qu'elles soient endogènes ou environnementales (figure 18 A). Néanmoins, toute perturbation des mécanismes de contrôle de cette autoréactivité physiologique peut générer un déséquilibre favorable à l'émergence d'une autoréactivité pathologique.

1) Autoréactivité pathologique : facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux.

L'émergence d'une autoréactivité pathologique est le résultat de la conjonction de processus complexes qui impliquent des facteurs génétiques et environnementaux. Parmi les facteurs de l'hôte à l'origine d'une réponse immune inappropriée, on peut distinguer ceux qui concernent directement le système immunitaire mais aussi des éléments qui sont liés au « soi » (le statut du tissu ou de la cellule). Concernant les agents qualifiés « d'environnementaux », on peut également distinguer les facteurs endogènes : rôle de l'imprégnation hormonale ou plus récemment évoquée, la biodisponibilité de la vitamine D (Hewison 2010; Hewison 2012); et des événements proprement exogènes, qu'ils soient d'origine infectieuse ou toxique. Une susceptibilité individuelle et un environnement « favorable » seront donc intriqués dans l'induction ou la progression d'événements auto-immuns pathogènes. Nous proposons de décrire certains processus qui pourraient expliquer l'apparition d'Ac auto-immuns associés à une maladie auto-immune (figure 18 B).

(A)

Auto-immunité physiologique



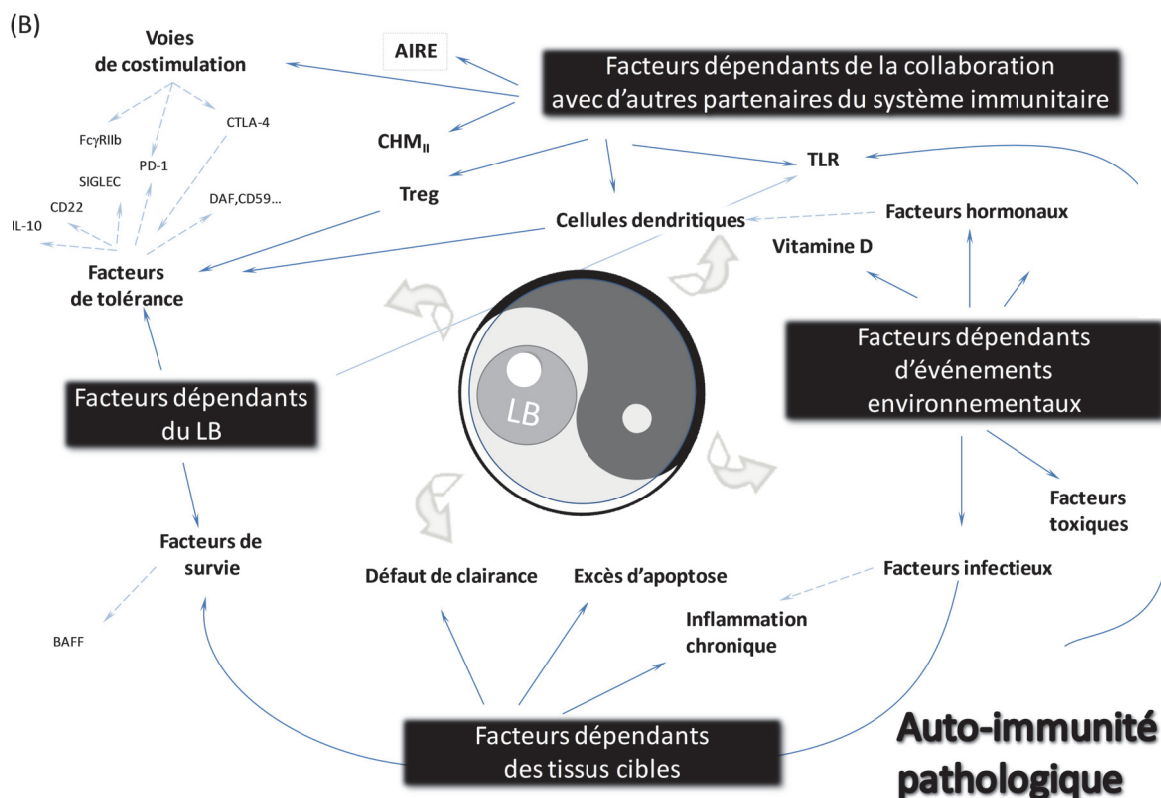


Figure 18 : Autoréactivités physiologique et pathologique.

(A) Fonctions potentielles de l'autoréactivité physiologique. (B) Facteurs d'émergence d'une autoréactivité pathologique.

1-1) Auto-immunité et contrôle de la réponse auto-immune.

Un criblage pangénomique réalisées sur des cohortes très larges d'individus (Maier et Hafler 2009) a apporté la démonstration qu'il est possible de trouver de nombreux gènes associés au codage de facteurs d'amplification ou de régulation de la réponse immune. À des fins d'illustrations, nous avons extrait quelques données du tableau présenté par l'équipe de Bana Jabri dans la revue publiée à propos de la maladie cœliaque (Abadie *et al.* 2011) (tableau 5). Ce tableau présente l'avantage d'illustrer le fait que certains dysfonctionnements du système immunitaire ne prédisposent pas à une seule MAI, mais constituent un socle commun à des pathologies aussi différentes que sont le lupus, le diabète de type I, la rectocolite hémorragique, la maladie de Crohn.

| Gènes candidats | Odds ratio (intervalles de confiance) |
|--|--|
| HLA | 6-7* |
| Voies de costimulation CTLA4/CD80 CD28 ICOS/ICOSLG CD247 CIITA PNTIP22 | 1-1,3 |
| Cytokines / Chimiokines / Récepteurs IL12A IL21 CCR3/5/2 CCR4 IL18R IL1R | 1-1,3 |
| Immunité innée TLR7/8 | 1-1,3 |

Tableau 5 : Exemples de facteurs de contrôle de la réponse immunitaire, pour lesquels il a été montré un polymorphisme associé à des facteurs de susceptibilité de maladies auto-immunes telles que la maladie cœliaque, le lupus, le diabète, la PR... (Abadie *et al.* 2011).

* Odds ratio donné à titre d'exemple pour les allèles HLA-DQB1*02 et DQB1*08 associés à la maladie cœliaque.

Ce tableau montre que si la présence d'allèles HLA « à risque » confère un *odds ratio* proche de 7 pour la maladie cœliaque, les facteurs de risque associés à d'autres gènes de susceptibilité contrôlant la réponse immunitaire est souvent proche de 1,5. Individuellement, ces gènes confèreraient donc un risque faible. Leur action combinée chez un même individu et dans un environnement particulier, pourrait contribuer, par synergie, à perturber la régulation de la réponse immunitaire. La figure 19, également inspirée de l'article de B. Jabri (Abadie *et al.* 2011), montre l'impact de ces polymorphismes sur la mise en place de la réponse immunitaire dans la maladie cœliaque. On appréciera qu'ils touchent tous les partenaires, et toutes les phases, de la réponse immunitaire, de l'ontogénie à la réponse effectrices.

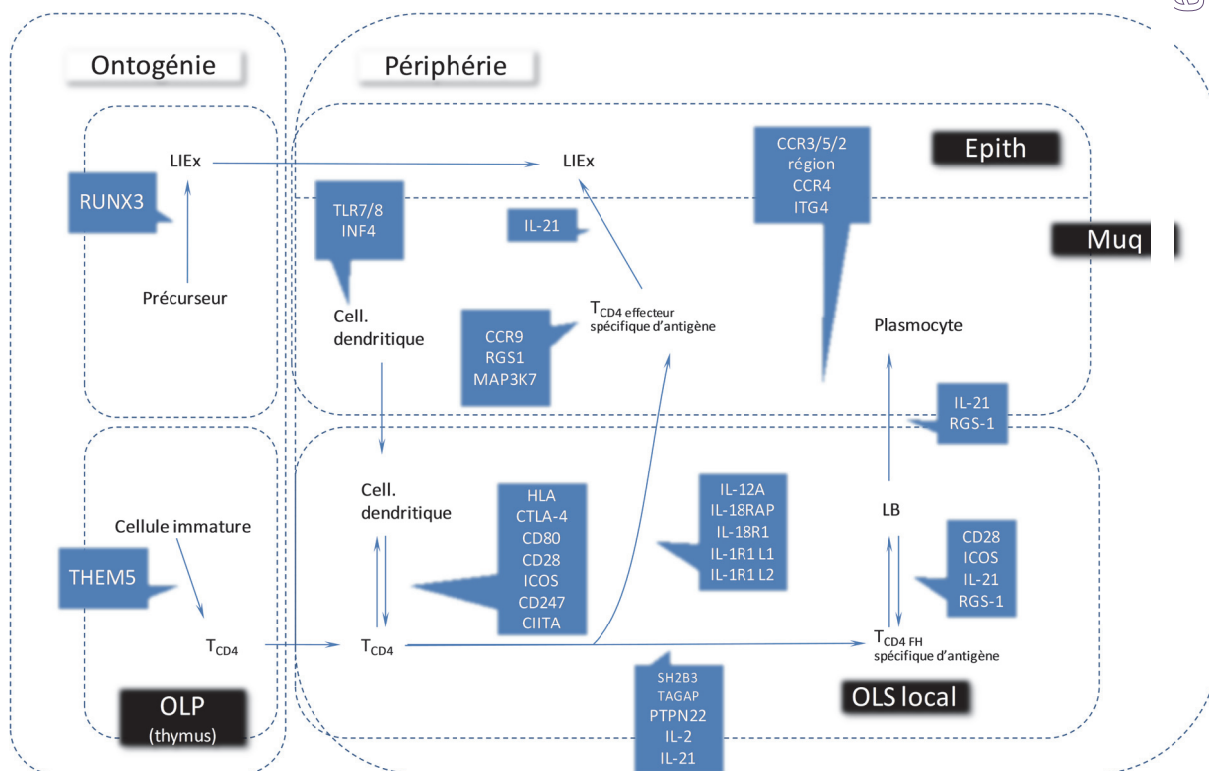


Figure 19 : Impact des gènes dans le contrôle de la réponse immunitaire, gènes dont le polymorphisme a été associé au risque de développer des maladies auto-immunes (inspiré de (Abadie et al. 2011)). OLP : organe lymphoïde primaire ; OLS : organe lymphoïde secondaire ; Muq : muqueuse ; Epith : épithélium. LIEx : lymphocytes intra épithéliaux.

Outre les facteurs génétiques, les événements environnementaux peuvent peser tant sur la qualité de fonctionnement du système immunitaire (exemple : relation Epstein Barr Virus et facteurs de survie des LB) (Ascherio et Munger 2010), mais aussi sur la qualité du tissu, cible du processus pathologique (génération par exemple, d'une infection chronique à bas bruit, avec une composante de dégénérescence cellulaire et d'inflammation chronique). Enfin la composante temporelle, difficile à appréhender ne doit pas être négligée. Elle peut avoir un impact tant sur l'ontogénie du système immunitaire (un événement extérieur particulier peut peser sur la qualité de la réponse engagée plusieurs années plus tard), que sur la composante tissulaire, cible de l'autoréactivité. Le tableau 6 résume quelques uns de ces éléments.

| Situation | Somme des événements conduisant à : | | | MAI O/N | Facteur limitant (L) / Déclenchant (D) Forme clinique |
|---|--|-----------------------------|------------------------------|------------|--|
| | une réponse immunitaire « amplifiée » | la tolérance immunitaire | une souffrance tissulaire | | |
| 1 | ☞☞☞ | ☞☞☞☞☞ | ☠☠☠ | N | Situation physiologique |
| 2 | ☞☞☞☞☞ | ☞☞☞☞☞ | ☠☠☠ | N | Environnemental (L) |
| 3 | ☞☞☞ | ☞☞☞ | ☠☠☠ | N | Environnemental (L) |
| 4 | ☞☞☞☞☞ | ☞☞☞☞☞ | ☠☠☠☠☠☠ | O | Facteur d'amplification + Environnemental (D) |
| 5 | ☞☞☞ | ☞☞☞ | ☠☠☠☠☠☠ | O | Facteur de tolérance + Environnemental (D) |
| 6 | ☞☞☞☞☞ | ☞☞☞☞☞ | ☠☠☠ | N | Rémission (par rapport à la situation 4) |
| 7 | ☞☞☞☞☞ | ☞☞☞☞☞ | ☠☠☠☠☠☠☠ | O | Poussée (par rapport à la situation 6) |
| 8 | ☞☞☞☞☞☞☞ | ☞☞☞ | ☠☠☠☠☠☠☠ | O | Forme plus agressive (par rapport à la situation 4) |
| 9 | ☞☞☞☞☞ | ☞☞☞☞☞ | ☠☠☠☠☠☠ | O | Forme bénigne (par rapport à la situation 4) |
| 10 | ☞☞☞☞☞ | ☞☞☞☞☞ | ☠☠☠☠☠☠ | N | Forme histologique pure (pas de signe clinique) |
| 11 | ☞☞☞☞☞☞☞* | ☞☞☞☞☞ | ☠☠☠☠☠☠ | O | Autre atteinte tissulaire (Ex: Dermate herpétiforme / maladie coeliaque) |
| Poids respectifs du patrimoine génétique / Environnement | | | | | |
| ++/+ | | ++/+ | + /+++ | | |

Tableau 6 : Facteurs prédisposant à l'émergence d'une maladie auto-immune.

Ils peuvent être liés à une susceptibilité individuelle à générer une réponse immunitaire plus agressive, ou au contraire liés à un défaut de la régulation immunitaire. À cette susceptibilité individuelle de forte connotation génétique (pas exclusivement), s'ajoute la composante de souffrance tissulaire qui peut être majoritairement sous dépendance environnementale.

Chaque symbole peut être considéré comme un facteur de prédisposition

(☞ : « amplification » de la réponse immunitaire) ou de protection (☞ « tolérance »).

(☠) symbolise un facteur d'agression tissulaire. Pour faciliter la lecture, les facteurs qui s'ajoutent sont présentés avec une police de taille augmentée et en gras. Une couleur différente peut traduire la participation d'un facteur environnemental autre que celui qui a engagé le processus initial.

Pour illustration, quelques variables sont ajustées pour expliquer les phases de rémission, de poussées, des formes cliniques plus ou moins sévères...

« Facteurs limitants » : Éléments dont l'absence expliquerait pourquoi il n'y a pas de manifestation auto-immune pathologique.

* (I) symbolise d'autres composantes génétiques, facteurs de susceptibilité par amplification de la réponse immunitaire. Inspiré de (Abadie et al. 2011).

1-2) Facteurs de susceptibilité spécifiques des LB.

Si un dysfonctionnement intrinsèque du système immunitaire constitue un facteur de prédisposition pour le développement de maladies auto-immunes, ce dysfonctionnement peut être le résultat de l'association de multiples anomalies qui, isolément, n'auraient aucun effet pathologique. Certaines de ces anomalies peuvent, nous l'avons vu, concerner plus

spécifiquement le LB dans ses différentes étapes de différenciation ou de survie, que nous avons déjà développées. Nous évoquerons plus précisément celles rencontrées dans les modèles animaux de maladies auto-immunes et en pathologie humaine (tableau 7) (Basten *et al.* 2010). On notera que les gènes impliqués codent généralement

- i) des facteurs régulant la qualité (quantité) du signal transmis par le BCR : qu'ils soient dépendants de molécules intracellulaires associées à la transmission du signal (Iyn, BLK...), ou à des co-récepteurs modulant ce signal (PD-1, CTLA-4, CR2, FcγRII...).
- ii) des facteurs influençant la capacité du LB à survivre (facteurs pro- ou anti-apoptotiques) mais aussi BAFF.

| Anomalies | Souris | Possible équivalent chez l'homme / MAI associée(s) | Réf. |
|---|---|--|--|
| Tolérance centrale | | | |
| | Ly108 (SLE-1) Perturbation du flux Ca ⁺⁺ (NZW) | PTPN22 : SLE, PR, Basedow, Myasthénie, | |
| Résistance à l'apoptose | ↗ expression de facteurs anti-apoptotique comme Bcl-2 (NOD, NZB) | Canale Smith / ALPS | (Kumar <i>et al.</i> 2006) |
| | Invalidation du ligand de Fas (MLR) | BLK BANK (SLE) | |
| Anomalie de la SLC | ↗ populations B autoréactives en périphérie | | (R. A. Keenan <i>et al.</i> 2008) |
| | ↗ expression de RAG avec Perturbation du <i>BCR editing</i> (persistance de cellules autoréactives) (NZB, MLR lpr, NOD) | SLE Diabète de type I | (Panigrahi <i>et al.</i> 2008) (Eisenberg 2012) |
| Anomalie du <i>BCR editing</i> | ↗ vitesse de maturation des cellules de la moelle osseuse. Inversement ↗ <i>BCR editing</i> (rôle de l'IL-6 sur le maintien de l'activité de RAG) | SLE PR | (Dörner <i>et al.</i> 1998) (Hillion <i>et al.</i> 2007) (E Meffre <i>et al.</i> 2000) |
| Anomalie paratopique | | | (Bridges <i>et al.</i> 1993) |
| Inclusion allélique | Maintien de l'expression de l'ARNm (sans qu'il y ait expression protéique) d'une chaîne légère non fonctionnelle : diminution du niveau d'expression du BCR (conduit à une résistance à l'apoptose) On peut aussi avoir une dilution du BCR auto-réactif à la surface (avec les mêmes conséquences sur la transduction de signaux) | | (Gerdes et Wabl 2004) |
| Résistance à l'anergie | (NZB, MLR lpr, NOD) Relation avec BAFF ? | | |
| Anomalie du contrôle homéostatique | | | |
| Anomalie de la production de BAFF | | Sjögren, SLE, PR | (F. Mackay <i>et al.</i> 1999) (Tangye <i>et al.</i> 2006) |

| Tolérance centrale ou périphérique | | | |
|---|---|----------------------------------|--|
| Anomalie du système du complément | | DAF, CD59, CR2, C1qrs, C4, C2 : | (Song 2006; Lewis <i>et al.</i> 2006) |
| Anomalie des TLR | | TLR7, 8, 9 | (Marshak-Rothstein 2006; Christensen <i>et al.</i> 2006; Demaria <i>et al.</i> 2010) |
| FcγRIIb | ↘ expression de FcγRIIb conduit à une ↗ de différenciation des LB autoréactifs en cellules matures de type plasmocytes NZB, NOD, MRL | LES, Good Pasture, PTAI | (Tsuchiya et Kyogoku 2005) |
| PD-1 | | PDCD-1 (SLE) | (Kristjansdottir <i>et al.</i> 2010) |
| CD40 | | ↗ expression à la surface des LB | (Peters <i>et al.</i> 2009) |
| Anomalie de la constitution des centres germinatifs | ↗ de la propension à former des centres germinatifs (MLR / NZB) | | (Zaheen et A. Martin 2011) |

Tableau 7 : Anomalies de l'ontogénie et de l'homéostasie des LB pouvant conduire à une autoréactivité pathologique.

2) Souffrance cellulaire et autoréactivité

Nous avons déjà évoqué le rôle du système immunitaire pour l'élimination des cellules en apoptose ou en souffrance, notamment par le biais des Ac naturels. Nous allons illustrer ici la multiplicité des facteurs impliqués dans ce contrôle (systèmes de régulation, mécanismes effecteurs de la réponse immunitaire).

Le contrôle de l'apoptose cellulaire est un phénomène essentiel pour la préservation de l'homéostasie générale d'un organisme pluricellulaire. Plusieurs voies coexistent pour mener la cellule vers la mort physiologique. Nous n'évoquerons pas ici les mécanismes moléculaires de ce processus mais insisterons sur le devenir des cellules apoptotiques. Nous verrons qu'il existe aussi un véritable dialogue (appelé « efferocytose⁶ ») entre d'une part la cellule en apoptose et d'autre part le voisinage cellulaire sollicité pour la faire disparaître sans trace (Erwig et Henson 2007). Différents exemples permettront de juger de l'importance de ces événements : il est considéré que 10^{11} polynucléaires neutrophiles sont quotidiennement éliminés par apoptose, probablement dans le foie, la rate et la moelle osseuse (Erwig et Henson 2008). Au sein des épithéliums, plus d'un million de cellules mourraient chaque seconde, dans le cadre du renouvellement tissulaire physiologique (Griffith et Ferguson 2011). Durant la vie fœtale, la croissance, le retour à l'état physiologique après la grossesse et le vieillissement sont des situations qui amplifient encore le contingent de

⁶ « Conduire à la tombe » ou « amener en terre »

cellules en apoptose à éliminer. C'est dire l'importance et la nécessaire efficacité des mécanismes sollicités.



2-1) Mécanismes physiologiques : Signaux émis par la cellule en apoptose

2-1-1) « Don't eat me signals »

Une cellule qui n'est pas engagée sur la voie de l'apoptose doit se protéger des capacités de phagocytose exprimées par les cellules voisines : comme les cellules épithéliales, mésenchymateuses (Walsh *et al.* 1999) ou les macrophages tissulaires. Les cellules vivantes expriment des récepteurs membranaires (CD31, le CD200, le CD47) qualifiés de récepteurs « **don't eat me signals** ». Le CD47, notamment, se lie à la Signal Regulatory Protein (SIRP α) qui est un puissant immunorégulateur (Ravichandran et Lorenz 2007).

2-1-2) « Find me signals »

Une cellule qui amorce le programme d'apoptose régule négativement l'expression de ces marqueurs membranaires et libère des signaux (« **find me signals** ») tels que la lysophosphatidylcholine, le sphingosine 1-phosphate (S1P), un fragment soluble de la fractalkine (CX3CL1), ou encore des nucléotides ATP et UDP. Ces signaux favoriseraient l'afflux de cellules phagocytaires à proximité de la cellule en apoptose (Ravichandran 2011).

2-1-3) « Eat me signals »

La cellule en apoptose exprime à sa membrane de nouvelles molécules de surface : notamment par le biais de l'asymétrie des phospholipides de membrane : phosphatidylsérine, annexine V, calréticuline (normalement sur la face interne de la membrane cellulaire). Elle adsorbe aussi des facteurs solubles circulants, constituant autant de « **eat me signals** ». Parmi les facteurs adsorbés, on retrouve de nombreux effecteurs de l'immunité innée : la Mannose Binding lectin, le C3b, le C1q (et d'autres membres de la famille des collectines, SP-A et D), la CRP (et d'autres molécules de la famille des pentraxines) et enfin des IgM. Ces effecteurs solubles peuvent se fixer à la membrane de la cellule en apoptose par le biais des molécules nouvellement exprimées (phosphatidylsérine, annexine V, calréticuline) qui créent des structures d'échanges proches de celles qu'on retrouve sur les lipoprotéines (LDL) oxydées. On définit ces partenaires solubles comme des « opsonines », elles facilitent le processus de phagocytose. Il en existe d'autres qui ne sont pas des effecteurs du système immunitaire et qu'on appelle encore des « molécules-pont » (« *bridge molecules* ») telles que la thrombospondine 1

(TSP-1), le *milk-fat-globule-EGF factor 8* (MFG-E8), le *growth arrest-specific 6* (Gas-6), mais aussi la β 2-glycoprotéine I et la protéine S capables de se fixer à la phosphatidylsérine (Erwig et al. 2008). Ces événements sont précoces dans la chronologie de l'apoptose cellulaire et il est important d'insister sur cette dimension de contrôle temporel des événements, car ce « timing » constitue un témoin de qualité du bon déroulement du processus.

2-2) Réponse de la cellule phagocytaire

2-2-1) Tolérance

Dans les conditions physiologiques, les signaux émis par la cellule en apoptose sont considérés comme des SAMP (*Self Associated Molecular Patterns*). Ils vont avoir une influence critique sur les conséquences de l'apoptose cellulaire. Les phagocytes expriment en effet des récepteurs susceptibles de reconnaître ces cellules en apoptose. Le CD14 par exemple, capable d'interagir avec des ligands exogènes (LPS *via* le TLR-4), mais aussi avec les cellules en apoptose, cette fois sans engager de processus inflammatoire. On décrit également les CD36 (*scavenger receptor*), CD68 (*macrosialin*), et Lox1 (*lectin like LDL oxidised particle receptor*) qui exercent ces mêmes fonctions de reconnaissance de cellules en apoptose à la surface des phagocytes. Si l'ensemble des signaux est délivré selon une bonne séquence temporo-spatiale, ils génèrent un contexte qualifié par certains de « **keep calm** » (ou « *keep-out* ») pour la cellule phagocytaire. Celle-ci répondra en effet de façon adaptée avec notamment la synthèse privilégiée de cytokines anti-inflammatoires comme le TGF β (ou même, par l'absence de production de cytokines, qu'elles soient anti-ou pro inflammatoires) (Birge et Ucker 2008; Griffith *et al.* 2011).

2-2-2) Activation du système immunitaire et réponse inflammatoire

Durant cette phase d'apoptose, l'objectif principal est de limiter la libération de composants intracellulaires qui pourraient traduire la souffrance cellulaire (nécrose) et générer des signaux d'alerte : ce sont par exemple les protéines du choc thermique (HSP70) ou l'amphotérine (protéine de famille des *High Mobility Globulin Box-1* (HMGB-1)) deux protéines capables de se lier aux récepteurs TLR, mais aussi NOD et RAGE. Ces composants (HMGB-1, HSP, nucléoline...) sont appelés *Damage Associated Motif Patterns* (DAMP). Ils génèrent pour la cellule qui interagit avec eux (macrophage ou la cellule dendritique) des signaux d'activation avec une forte composante de stimulation de l'inflammasome (*via* NF- κ B) à l'origine de la réponse inflammatoire locale. Celle-ci conduit à la libération secondaire de radicaux libres, de métalloprotéases, de cytokines pro-inflammatoires et autres dérivés toxiques pour l'environnement cellulaire

conduisant à une nécrose tissulaire étendue (appelée « dégénérescence secondaire ») avec secondairement le risque de développer une fibrose tissulaire.

2-2-3) De la réponse immunitaire agressive utile, à la pathologie

Si la signalisation membranaire traduisant la mort cellulaire disparaît rapidement, la source de stimulation de la réponse inflammatoire se tarit et les processus de réparation et de cicatrisation peuvent alors s'engager. Plusieurs évocations imagées ont été retenues pour illustrer ces processus ; Si la détersion est utile, le processus s'apparente alors à la « politique de terre brûlée », nécessaire pour limiter la diffusion centrifuge de l'agent agresseur causal. Michal Schwartz prend l'image d'un feu de forêt (« agent agresseur ») qu'on circonscrit par l'établissement d'un pare-feu (« destruction du tissu sain liée réponse de l'hôte »), où les arbres ont été coupés pour éviter l'extension de l'incendie (Nevo *et al.* 2003). Si l'événement « agresseur originel » n'est pas maîtrisé, deux types de phénomène pourraient être observés :

1) Absence de pare feu : les cellules agressées meurent par dégénérescence avec extension centrifuge de l'agent causal.

2) Mise en place d'un pare feu « surdimensionné » mais inefficace Elle conduit elle même au développement de lésions tissulaires (la dégénérescence secondaire), pouvant masquer le processus lésionnel initial. Certains évoquent ce processus comme un élément essentiel dans la traduction d'une autoréactivité pathologique (Nevo *et al.* 2003).

Selon les données récentes, cette présentation résumée de la clairance des cellules en apoptose ne reflète pas toute la complexité des mécanismes mis en jeu. De nombreux éléments pèsent effectivement sur l'orientation de la réponse immunitaire mise en place pour gérer l'élimination de ces cellules. Avec une réponse duelle : la tolérance ou le rejet par la mise en place d'une réponse inflammatoire. TS Griffith et TA Ferguson donnent un aperçu de cette complexité au travers de 6 questions : « qui », « quoi », « quand », « où », « pourquoi » et « comment » ? (Griffith *et al.* 2011). Les réponses à ces questions permettraient d'envisager de nombreuses situations conduisant à orienter la réponse immunitaire vers la tolérance ou inversement le rejet immunitaire. Elles sont résumées dans la figure 20 et nous n'en présenterons que quelques unes pour illustrer ces différentes voies d'évolution.

a) *Origine des cellules*

Il apparaît que les cellules lymphoïdes en apoptose sont plus immunogènes que les cellules d'origine mésenchymateuse, notamment

les cellules lymphoïdes activées et particulièrement quand elles expriment le CD154, ligand du CD40.

b) Cause de la mort cellulaire

Les cellules infectées en apoptose sont (évidemment) plus immunogènes que les cellules non infectées : les mécanismes en jeu sollicitent notamment d'autant plus les PRR.

c) Cellules phagocytaires sollicitées

La phagocytose des cellules en apoptose réalisée par les cellules dendritiques est accompagnée d'un environnement plus immunogène que celui observé quand les macrophages sont sollicités. Ainsi des cellules en apoptose injectées par voie sous cutanée induisent une situation de rejet, alors que par voie systémique elles sont tolérogènes.

La multiplicité des effecteurs ne traduit donc pas une simple redondance visant à assurer la bonne élimination des cellules mourantes, mais bien la mise en jeu de processus complexes, adaptés à des situations bien précises. Ces événements pourraient constituer autant de points de fragilité face à l'extrême diversité de pressions environnementales pour le déclenchement d'un processus pathologique.

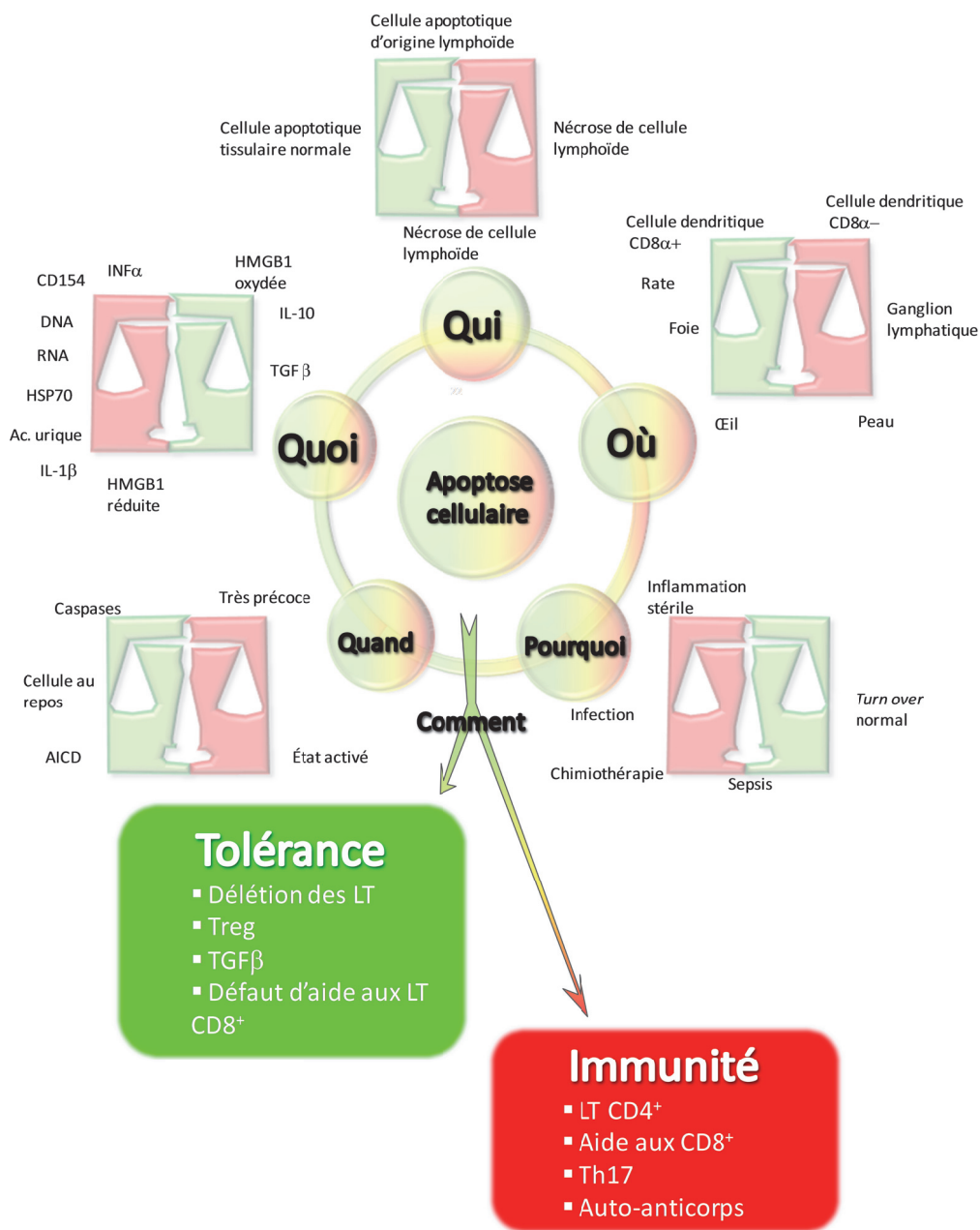


Figure 20 : Six questions pour illustrer les éléments du contrôle de la réponse immunitaire (« tolérance » ou « réponse inflammatoire ») dans la gestion de l'élimination des cellules en apoptose.

Les éléments intervenant pour la tolérance se situent du côté « vert » de la balance. Les éléments pesant vers la réponse inflammatoire se situent du côté « rouge ».

Certains éléments (le sepsis par exemple), se situent entre les deux. (d'après (Griffith et al. 2011).

III] Conclusion

Au vu de l'ensemble des données aujourd'hui acquises, l'implication de l'autoreconnaissance de l'organisme par le système immunitaire apparaît comme un événement critique pour son fonctionnement. Il concerne à la fois la réponse innée et la réponse adaptative (construction du répertoire, régulation et homéostasie lymphocytaire, phase effectrice). Ainsi, une autoréactivité naturelle impliquant des récepteurs faiblement autoréactifs et polyréactifs participe à des mécanismes de première défense (élimination des déchets endogènes et de pathogènes). Elle participe aussi au maintien d'un état d'équilibre entre un « *soi exposé* » et un « *soi reconnu* ». Toute altération de l'un aura des conséquences sur l'autre et nécessitera la mise en place de processus correctifs. L'exemple du remailage du réseau idiotype anti-idiotype des Ac naturels après l'induction d'une réponse immune en est une illustration classique. Cette hypothèse d'autorégulation paraît trop restrictive et ne satisfait pas à toutes les contraintes de contrôle imposées au système immunitaire que nous avons développées dans les chapitres précédents. Un équilibre doit en effet s'instaurer entre ce « *soi exposé* » susceptible d'être modifié en permanence (événements endogènes et exogènes), et le « *soi reconnu* » susceptible d'être altéré en de nombreuses occasions (répertoire autoréactif modifié à la suite d'*epitope spreading*, d'une aide T, ou de signaux TLR inappropriés...). Ces éléments soulignent combien un répertoire primordial peut s'appauvrir ou s'enrichir de nouvelles spécificités au cours de la vie de l'individu. La question que nous nous sommes posés, était de savoir si nous étions en mesure d'appréhender cette nouvelle empreinte par des techniques d'accès facile.

L'autoréactivité peut constituer, au travers des récepteurs exprimés, une représentation interne (« *miroir* ») de l'ensemble des antigènes exposés dans l'organisme. Il s'agit d'un phénomène dynamique. En condition physiologique, la surexpression d'un antigène induit l'émergence d'un Ac spécifique et conduit à la mise en place de système de contrôle afin de restaurer un nouvel état d'équilibre. **Pour appréhender ces événements intriqués et complexes, des données préalables constituent des jalons précieux.** Un répertoire immunitaire présente des communautés de reconnaissance chez des individus ayant un même statut clinique (Mouthon *et al.* 1995). En effet, si chaque individu présente des singularités de réactivités d'Ac, propres à son patrimoine génétique et à son histoire antigénique (« *fingerprint* »), certaines spécificités sont liées à la reconnaissance d'un « *soi exposé public* », constitué de motifs ne faisant pas l'objet d'un polymorphisme intra- voire inter-espèce (Oppezco *et al.*

2003). Outre l'homogénéité de réponse, ce « *soi public* » pourrait aussi contribuer à entretenir la stabilité du répertoire. Ces données ont été rapportées notamment pour des sujets sains (Mouthon *et al.* 1995). Ce « *soi public* physiologique » pourrait-il être substitué à un « *soi public* pathologique » dans différentes situations de dérégulation du système immunitaire ? Cette hypothèse pourrait expliquer les résultats obtenus dans les déficits immunitaires (Lacroix-Desmazes *et al.* 1999) et différentes maladies auto-immunes (Sharshar *et al.* 1998; Stahl *et al.* 2000a).

IV] Objectif : Recherche de nouveaux biomarqueurs dans les maladies auto-immunes.

En pratique médicale, nous avons encore d'importantes attentes. La prise en charge optimale d'un malade repose en effet sur l'établissement rapide du diagnostic et du pronostic, pour proposer un traitement adapté dont il faudra apprécier le rapport « bénéfice – risque ». Pour chacune de ces étapes, nous souhaiterions pouvoir disposer de marqueurs pertinents. Dans le cadre des maladies auto-immunes, le panel de marqueurs biologiques disponibles reste encore aujourd'hui très limité. La prise en charge thérapeutique est souvent retardée. On peut citer en exemple, la polyarthrite rhumatoïde (PR), pathologie pour laquelle, nous disposons d'outils biologiques performants. Néanmoins, il reste à optimiser et à valider de nouveaux marqueurs précoces pour une prise en charge plus rapide, alors que la stratégie et les alternatives thérapeutiques se sont clarifiées par le biais de la publication de « *guidelines* » (Aletaha *et al.* 2010).

De manière générale, les marqueurs biologiques utilisés pour le diagnostic de maladies auto-immunes font appel à l'identification « à l'unité » de spécificités singulières d'auto-anticorps qui se distinguent nettement chez le malade de ce qui est observé chez le sujet sain, soit par la cible qu'elles reconnaissent et/ou leur titre, et/ou leur affinité, voire leur isotype. Si des combinaisons d'auto-anticorps sont utilisées en routine, leur emploi reste souvent limité. Dans d'autres pathologies comme la sclérose en plaques, on ne dispose d'aucun marqueur auto-immun validé en pratique courante. On peut donc estimer qu'il existe un manque important et un réel intérêt à développer de nouvelles stratégies d'identification de spécificités d'Ac. Outre l'attente en termes de précocité diagnostique et de prise en charge thérapeutique, l'identification de nouveaux biomarqueurs peut contribuer à une meilleure compréhension du processus physiopathologique sous-jacent, et à l'établissement de nouvelles pistes de traitement. Dans le cadre d'une meilleure compréhension

physiopathologique, on peut encore citer l'exemple de la PR avec l'identification de la réactivité spécifique vis-à-vis de motifs épitopiques citrullinés, mais aussi celui la maladie coéliquue, avec la mise en évidence des Ac anti-transglutaminase tissulaire et du rôle de la désamination de la gliadine dans la genèse et l'entretien du processus lésionnel. Basant notre réflexion sur ce qui était connu des fonctions de l'auto-réactivité dans le maintien de l'homéostasie générale de l'organisme, nous avons développé, avec toute l'équipe l'Institut d'immunologie du CHRU de Lille et l'équipe d'accueil EA2686, un axe de recherche visant à identifier de nouveaux marqueurs de maladies auto-immunes.

Bénéficiant d'une étroite collaboration avec de nombreux services cliniques du CHRU de Lille, dans le domaine du diagnostic biologique des maladies auto-immunes (Service de Neurologie D, dirigé par le Professeur Patrick Vermersch ; Service de Rhumatologie, Professeur René Marc Flipo ; Service de Médecine Interne, Professeur Pierre Yves Hatron, Eric Hachulla, David Launay) et dans l'optique d'identifier de nouveaux biomarqueurs spécifiques de ces pathologies, deux axes de recherche ont été développés, de façon initialement parallèle :

Le premier axe visait à apprécier l'impact de la citrullination sur la génération d'épitopes cibles de réactivité discriminantes dans les pathologies auto-immunes telles que la PR et la SEP.

Le deuxième axe beaucoup plus large, s'est intéressé à juger les performances d'une évaluation globale des réactivités d'Ac sériques qui pouvaient être révélées par immuno-empreinte à partir d'un extrait protéique issus de tissus humains sains ou atteints de différentes pathologies. L'objectif de cette démarche vise à s'émanciper de l'utilisation (nécessairement) limitée de cibles identifiées, et à lui substituer un substrat issu d'un extrait tissulaire complet, le plus proche possible des conditions du vivant.

MÉTHODES

Le détail méthodologique est développé dans chacune des publications présentées. Nous n'aborderons ici que des données générales de l'immuno-empainte monodimensionnelle et de l'immunoprotéomique bidimensionnelle, mises à jour. Elles permettent de comprendre globalement l'approche qui a été développée tout au long de l'étude.

A] Immuno-empainte monodimensionnelle

I] Aspect technique

Séparation électrophorétique : Les gels d'électrophorèse sont réalisés en gradient d'acrylamide 5-10-20 %. Les substrats protéiques (cellulaire ou tissulaire) sont lysés en solution de *Laemmli* et réduits par 10 % de DTT. Ils sont ensuite chauffés à 100°C pendant 10 minutes. Un milligramme d'extrait protéique est déposé par gel. La migration des protéines s'effectue pendant 12h à 90 volts dans un tampon associant 0,25 M de Tris, 1,92 M de Glycine et 1 % de SDS. Les protéines sont ensuite transférées du gel sur une membrane de nitrocellulose ou de PVDF en milieu semi-sec à 0,8 mA/cm² pendant 2 heures. La qualité du transfert protéique est contrôlée par une coloration réversible au rouge Ponceau. En vue de l'immunomarquage, les sites de fixation aspécifiques de la membrane sont saturés dans du TNT (Tris-HCL pH 8 15 mM, NaCl 0,3 M, Tween 20 0,05 %) contenant 5 % de lait délipidé. La membrane est découpée en bandelettes sur lesquelles seront incubés les sérums de patients (dilués au 1/100e) pendant une nuit à 4°C. Chacune des bandelettes est ensuite incubée avec l'anticorps secondaire anti-IgG humaines couplé à la peroxydase, dilué au 1/10000e en TNT contenant 5 % de lait délipidé, pendant 1 heure à température ambiante. La révélation est réalisée à l'aide d'une trousse commerciale de chimiluminescence (GE Healthcare) sur des films radiographiques (GE Healthcare).

II] Analyse des images d'immuno-empainte

1) Repérage des bandes de réactivités

Les films d'immuno-empainte sont numérisés avec le logiciel Quantity One (BioRad, Hercules, CA). L'analyse des profils est exclusivement qualitative : les bandes de réactivité sont relevées comme « présentes » ou « absentes » sans prise en compte de leur intensité. La détection et l'alignement des bandes de réactivité sont réalisés par le logiciel Diversity Database 2.2 (Biorad). Des sérums de références dont les spécificités ont été identifiées par d'autres méthodes sont utilisés comme témoins internes pour faciliter l'alignement des bandes de réactivité.

2) Analyse statistique

Les données de l'analyse sont exprimées en mode binaire (bande de réactivité présente = 1 ; bande absente = 0). Les profils de réactivité sérique des différents groupes sont analysés par 3 outils statistiques.

2-1) Analyse en composantes principales (ACP) permet de vérifier, sans *a priori*, si la combinaison des différentes réactivités sériques des patients permet de les grouper selon leurs pathologies. Les coefficients attribués aux patients en fonction de leurs profils permettent de visualiser leur distribution sur un graphe selon des coordonnées générées par l'ACP. Ces mêmes coefficients utilisés avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis permettent d'évaluer si ces réactivités se projettent de manière significativement différente, donnant une idée de la pertinence de l'approche.

2-2) Le test du khi-2 (ou Fisher Exact si $n \leq 10$) permet de comparer la fréquence de reconnaissance d'une bande de réactivité au sein de différentes populations de patients et de sujets sains. Les résultats de cette approche sont utilisés pour l'analyse linéaire discriminante.

2-3) Analyse linéaire discriminante : Appliquée à l'analyse des réactivités observées chez les patients, l'analyse linéaire discriminante (ALD) peut conduire à l'identification de réactivités Ac discriminantes caractérisant certains des groupes étudiés. C'est une démarche pas à pas qui génère des coefficients (« *Lambda de Wilks* ») qu'elle attribue aux bandes de réactivité jugées discriminantes. Ces coefficients ont un « poids » plus ou moins important en fonction de la discrimination qu'ils apportent. Ne sont retenus que les coefficients Lambda de Wilks compris entre 0,1 et 0,9. Pour nous assurer de la pertinence des données générées par l'ALD, seules les bandes de réactivité présentant une fréquence de distribution à tendance significative ($p \leq 0.2$ (test du khi-2 ou Fisher exact si effectifs inférieurs à 10)) sont retenues pour la LDA. Pour un individu donné, la présence ou l'absence des bandes de réactivité identifiées comme discriminantes permet de calculer des coordonnées graphiques selon un axe (si deux populations d'individus sont comparées) ou n-1 axes (pour n populations étudiées, exemple deux axes pour trois populations étudiées). Pour illustrer les résultats de nos études, prenons un exemple: soient trois groupes d'individus : « malades 1 » ; « malades 2 » et « sujets sains » pour lesquels la LDA identifierait deux groupes de réactivités discriminantes : selon le premier axe : réactivités A1, B1 et C1... auxquelles elle affecte les coefficients a1, b1 et c1... Selon le 2^{ème} axe, les réactivités A2, B2, C2... et les coefficients a2, b2 et C2... Pour la représentation graphique objectivant l'éventuelle discrimination des groupes d'individus, il est possible de

calculer des coordonnées pour chaque sujet selon qu'il présente ou non ces réactivités discriminantes : Coordonnées (X,Y) :

$$X = \text{présence de la réactivité A1 (oui = 1 / non = 0)} \times a1 + B1 (1/0) \times b1 + C1 (1/0) \times c1...$$

$$Y = A2 (0/1) \times a2 + B2 (0/1) \times b2 + C2 (0/1) \times c2...$$

Par exemple, les individus du groupe « malade 1 » pourraient ne présenter que les réactivités A1 et A2, leurs coordonnées seraient donc (A1a1 ; A2a2) ; les individus du groupe malade 2, ne présenter que les réactivités B1 et B2 (coordonnées B1b1 ; B2b2) et les sujets sains les réactivités C1 et C2 (coordonnées C1c1 ; C2c2). En pratique, une courbe ROC permet de juger des performances en termes de sensibilité et spécificité de la discrimination proposée par l'ALD. Pour illustrer ces performances, nous allons illustrer les données présentées dans le tableau 8 (à partir de chiffres fictifs).

| Réactivité | Fréquence observée chez (%) | | |
|--------------|-----------------------------|----------|----------|
| | Sujets sains | Malade 1 | Malade 2 |
| Réactivité 1 | 60 | 5 | 2 |
| Réactivité 2 | 1 | 35 | 75 |
| Réactivité 3 | 1 | 25 | 35 |
| Réactivité 4 | 35 | 70 | 5 |

Tableau 8 : Tableau de données fictives pour illustrer les performances de la LDA.

Dans cet exemple, intéressons-nous d'abord aux trois premières réactivités. La réactivité 1 est principalement observée chez les sujets sains, alors que les réactivités 2 et 3 sont principalement retrouvées chez les sujets malades (groupes 1 et 2). Si un individu (sans préjuger de son statut « sain » ou « malade »), présente la réactivité 1 et non la 2 ou 3, la LDA le classe dans la catégorie « sains ». Inversement s'il ne présente pas la réactivité 1 mais la 2 ou 3 (ou les deux), la LDA le classe dans la catégorie « malades ». Si un malade présente la réactivité 1, une analyse basée sur cette seule information proposerait un mauvais classement de catégorie (celle des « sujets sains »). Si cet individu présente, outre la réactivité 1, les réactivités 2 et/ou 3, la LDA peut le reclasser correctement. Pour la réactivité 4, les données présentées laissent suggérer qu'il n'y a pas de différence de distribution entre les sujets sains et malades du groupe 1. Si toutefois on a analysé au préalable la réactivité des sérums vis-à-vis des réactivités 1, 2 et 3, l'analyse de la fréquence de distribution de la réactivité 4 prend une autre dimension. Si l'individu présente une réactivité 1 mais pas 2 ou 3, la LDA ne considèrera pas la réactivité 4. À l'inverse, si l'individu ne présente pas de réactivité 1 mais une réactivité 2 et/ou 3, alors la LDA analyse la distribution de la réactivité 4 entre les groupes malades 1 et 2. On voit alors que la réactivité 4 est plus fréquemment observée dans le groupe malade 1. La LDA associe cette réactivité à ce groupe (etc.).

B] Immunoprotéomique bidimensionnelle



1) *Extraction protéique*

Les culots cellulaires et tissulaires sont repris dans un tampon de lyse UTC 4 % (8 M Urée, 2 M Thiourée, 4 % CHAPS, 40 mg de DTT dans 5 mL, ½ comprimé d'anti-protéases complète Roche®). Après dissolution, les échantillons sont centrifugés à 14 000 rpm, 10 min à 4°C. Le surnageant est récupéré et soumis à un kit de purification 2D-Clean Up (GE Healthcare®), utilisé selon les instructions du fabricant. Les culots protéiques sont ensuite repris dans du tampon UTC 4 %. La concentration protéique de l'échantillon est déterminée par technique de Bradford (Quick start Bradford dye reagent- Bio-Rad®).

2) *Iso-électrofocalisation*

- Réhydratation des strips.

Des strips, de gradient de pH 3-11 non linéaire induit par des immobilines (immobilines Dry Strip, GE), sont réhydratées pendant une nuit par adsorption passive de 500 µg de l'échantillon protéique repris dans une solution de réhydratation (3,5 mL UTC 2 %, 42 µL de DeStreak, 42 µL d'IPGphor 3-11 NL, traces de bleu de bromophénol).

- Isoélectrofocalisation (IEF).

L'isoélectrofocalisation (40 000 Vh pendant 18 h) est réalisée sur l'Ettan IPGphor3 (GE Healthcare®), les protéines sont ainsi séparées suivant leur point isoélectrique).

3) *Electrophorèse bidimensionnelle*

Après rééquilibration des strips dans deux tampons différents, elles sont immobilisées à la surface de gels de polyacrylamide en gradient 8-18 % par une solution d'agarose. La séparation des protéines selon leur masse moléculaire est réalisée à 3W par gel pendant 18 heures. Un gel est conservé en vue d'une coloration au bleu de Coomassie colloïdal, les autres sont transférés en milieu semi-sec sur une membrane de nitrocellulose ou de PVDF en vue de l'immunomarquage réalisé comme précédemment (immuno-empreintes mono-dimensionnelle).

4) *Caractérisation moléculaire*

La superposition du gel coloré et des membranes d'immuno-empreinte bidimensionnelles permet de cerner les protéines (spots) cibles potentielles des réactivités discriminantes. Au sein du gel coloré au bleu de Coomassie, les spots protéiques sont excisés par un robot (Proteineer workflow™, Bruker Daltonik GmbH) muni d'une aiguille de 2 mm puis placés dans une plaque 96

puits. La préparation de l'échantillon et la digestion protéique sont effectuées conformément aux instructions du fabricant (kit de digestion tryptique, DP 384, Bruker Daltonik GmbH). La spectrométrie de masse par MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization time of flight) puis l'analyse de spectre par le logiciel Flexanalysis 2.4 software (Bruker Daltonik GmbH) permettent d'obtenir l'empreinte peptique massique des protéines « spotées ». L'identification du spectre s'effectue en interrogeant la base de données Mascot (Matrix Science Ltd.) grâce au logiciel ProteinScape 1.3 (Bruker Daltonik GmbH). Chaque identification est fournie avec un score Mascot correspondant à $-10 \cdot \log(P)$ où P est la probabilité que l'événement observé soit lié au hasard. Ces scores sont disponibles pour la spectrométrie de masse (MS) et la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). L'ensemble de cette étape est réalisée au sein du Laboratoire de physiopathologie de la barrière hémato-encéphalique, E.A. 2465, IMPRT-IFR 114, Université d'Artois, LENS, France par le Dr Sophie DUBAN DEWEER (Ingénieur). Roméo CECCELI (responsable).

C] Recherche de similitudes de séquence :

Cette approche fait appel à l'analyse de séquences peptidiques générée à partir de la base de données NCBI/BLAST : http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROGRAM_DEF=blastn&BLAST_PROGRAM_DEF=megaBlast&SHOW_DEFAULTS=on&SHOW_DEFAULTS=on&BLAST_SPEC=OGP_9606_9558.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I] Identification de nouveaux biomarqueurs d'auto-immunité : une première approche conventionnelle.

1) La désamination enzymatique : processus physiologique

La citrullination (déimination ou encore désamination) est un processus enzymatique transformant un résidu acide (arginine) en résidu neutre (citrulline). Ce processus est physiologique et intervient pour de nombreuses fonctions cellulaires. Par exemple, au niveau cutané, la citrullination participe au processus de « cornification » des kératinocytes par le biais de la protéolyse et la génération de nouvelles liaisons intermoléculaires. Pour le système nerveux central, la citrullination est associée à la maturation de la myéline mais aussi à l'organisation des couches de myéline pour faciliter la transmission de l'influx nerveux. Au niveau cellulaire lui-même, la citrullination participe au contrôle d'événements transcriptionnels (effets sur les histones), mais aussi au catabolisme des protéines (transformation des AAs en urée). Ce ne sont pas les mêmes enzymes qui catalysent la citrullination intra protéique et la transformation d'AAs libres en citrulline puis en urée. Le processus de citrullination des protéines est contrôlé par l'activité de peptidyl-arginine-deiminases (PAD) dont le fonctionnement requiert de hautes concentrations de calcium intracellulaire. Ces conditions de concentrations calciques sont observées au cours de l'activation et la différenciation cellulaire mais aussi lors de l'apoptose et de la nécrose des cellules (Quirke *et al.* 2011). On décrit cinq isoformes de PAD (Chavanas *et al.* 2004), dont l'isoforme PAD-4, principalement exprimées dans les cellules inflammatoires telles que les macrophages ou les polynucléaires neutrophiles (Chang *et al.* 2005). L'activité PAD est également retrouvée chez un pathogène *Porphyromonas gingivalis*, responsable de périodontites chez l'homme. Un lien potentiel entre la PR et ce pathogène est actuellement exploré (Detert *et al.* 2010; Berthelot et Le Goff 2010; de Smit *et al.* 2011; Routsias *et al.* 2011; Farquharson *et al.* 2012).

2) Citrullination et polyarthrite rhumatoïde

Dès 1964, était rapportée la présence d'Ac dirigés contre des structures intracellulaires périmoléculaires des cellules de la muqueuse jugale. Ils ont été dénommés Ac anti-facteurs périmoléculaires (FPN). Vingt ans plus tard étaient également décrites des spécificités d'Ac dirigées contre des structures tissulaires de l'œsophage de rat au niveau de la couche kératohyaline de l'épiderme pluristratifié de cet organe. Ces Ac ont été appelés Ac anti-kératine (AKA). La découverte de ces deux spécificités a conduit à la mise au point de tests diagnostiques (dont certains commercialisés, les AKA), basés

sur l'immunofluorescence indirecte, avec des performances globalement médiocres, notamment en termes de sensibilité (~30-50 %). Ces tests présentaient toutefois une spécificité bien supérieure (> 90 %) à celle des dosages des facteurs rhumatoïdes (FR), de sorte que la prescription de cette sérologie est pendant longtemps restée complémentaire de celle des FR. C'est au milieu des années 1990 que la cible de ces Ac (FPN et AKA) était précisée avec l'identification des Ac anti-filagrine (Girbal *et al.* 1993). En 1998, l'équipe de W. van Venrooij rapportait l'importance de la citrullination de certains motifs épitopiques de la filagrine dans l'interaction spécifique des Ac présents chez les malades souffrant de PR (Schellekens *et al.* 1998). À partir des années 2000, à la demande du Professeur René Marc Flipo du service de Rhumatologie du CHRU de Lille, nous avons mis en place un test immuno-enzymatique évaluant la réponse Ac vis-à-vis d'épitopes citrullinés et non citrullinés dans les sérums des patients souffrant de PR mais également d'autres connectivites (Sjögren, LES...). Cette approche nous a permis de positionner les performances des différents tests disponibles dans le cadre de la sérologie rhumatoïde et d'encourager les prescripteurs à abandonner les tests utilisant les approches d'IFI (Ac anti-kératine ou anti-facteur périnucléaires). **Cf. Article 1.**

3) Citrullination et sclérose en plaques

La modification structurale d'un antigène peut perturber les mécanismes de reconnaissance par le système immunitaire, permettant à cette molécule d'acquérir ou de perdre un statut d'immuno-dominance. Dans les maladies auto-immunes, plusieurs équipes ont rapporté que des modifications post-traductionnelles d'antigènes jusqu'alors tolérés, pouvaient conduire à un processus pathogène. Ces observations ont été documentées dans la PR (Schellekens *et al.* 1998) mais aussi dans la maladie cœliaque (Dieterich *et al.* 1997). D'autres substrats moléculaires que ceux décrits dans la PR peuvent subir le processus de citrullination physiologique, et notamment la protéine basique majeure (MBP) de la myéline, décrite comme principale cible des processus auto-immuns dans la SEP. La MBP citrullinée (MBP-C8) est un composé naturel qui participe à la myélinogenèse (D. D. Wood et Moscarello 1989). Elle constitue toutefois un produit immature qui prédomine dans les lésions inflammatoires de la SEP (Boggs *et al.* 1999). Cet isomère semble capable d'induire des lésions d'encéphalomyélite auto-immune chez l'animal (Cao *et al.* 1999). Dans une forme clinique de la SEP (Marburg), particulièrement évolutive, la MBP-C8 constitue l'isomère prédominant de cette protéine au sein de la myéline, avec 18 des 19 résidus arginyl, citrullinés (Wood *et al.* 1996). Enfin, il a été montré une réactivité lymphocytaire T vis-à-vis de certains épitopes de la MBP-C8, chez l'Homme (Tranquill *et al.* 2000). Nous avons proposé d'analyser la réponse humorale dirigée contre des peptides de la MBP, avant et après citrullination, dans le

sérum et le LCR de patients atteints de SEP et d'autres pathologies démyélinisantes. Le choix des peptides a été guidé par : l'antigénicité potentielle des épitopes, leur caractère encéphalitogène chez l'animal, la citrullination physiologique de ces épitopes *in vivo*. Nous avons montré que la citrullination de certains épitopes de la MBP conduisait à une modification significative de la réactivité des anticorps du LCR et du sérum dans les populations de patients étudiées. **Cf. article 2.**



EXTENDED REPORT

Evaluation of anti-citrullinated filaggrin antibodies as hallmarks for the diagnosis of rheumatic diseases

S Dubucquoi, E Solau-Gervais, D Lefranc, L Marguerie, J Sibilia, J Goetz, V Dutoit, A-L Fauchais, E Hadulla, R-M Flipo, L Prin

Ann Rheum Dis 2004;63:415-419. doi: 10.1136/ard.2003.008623

Background: Anti-filaggrin antibodies (AFA) are among the most specific antibodies for rheumatoid arthritis, so procedures for their detection should be included in early biological diagnoses. AFA can be detected by indirect immunofluorescence (anti-keratin antibodies, AKA) or by new enzyme immunoassays (EIA). Their comparative performance needs to be established.

Objective: To compare these technical procedures to optimise the serological diagnosis of rheumatoid arthritis.

Methods: Results obtained using AKA and EIA were compared in 271 sera from 140 patients with rheumatoid arthritis at various stages, 98 patients with other autoimmune diseases, and 33 healthy subjects. EIA were successively undertaken with citrullinated linear filaggrin peptide (home made EIA) or cyclic citrullinated peptide (CCP2, commercial kits). Rheumatoid factor (RF) was assessed by EIA in all patients.

Results: Anti-CCP2 kits showed the best sensitivity and specificity (65% and 96%, respectively). Among the 140 patients with rheumatoid arthritis, those with very recent disease (less than six months' duration, n=21) were studied as a separate group. In this group, the sensitivity of anti-CCP2 kits decreased to ~50%. Nevertheless this assay remained the most accurate when compared with AKA or home made EIA using linear filaggrin peptides. The combination of anti-CCP2 and RF only slightly increased the sensitivity of the diagnosis of very early rheumatoid arthritis.

Conclusions: Kits using citrullinated cyclic peptides (CCP2) were more suitable than either AKA or EIA using linear filaggrin peptides for the diagnosis of early rheumatoid disease.

See end of article for authors' affiliations

Correspondence to:
Dr Sylvain Dubucquoi,
Laboratoire d'immunologie,
Faculté de Médecine,
CHU de Lille, 1 Place de
Vardou, 59037 Lille
Cedex, France;
s-dubucquoi@chu-lille.fr

Accepted 22 July 2003

Recent papers have highlighted the early treatment of rheumatoid arthritis with disease modifying antirheumatic drugs (DMARD) in. Several independent studies have shown that even a brief delay in starting DMARD treatment can have a significant impact on disease activity years later.^{1,2} However, these findings have shifted the medical problem from "how to treat" to "how to make an early diagnosis of rheumatoid arthritis".

The diagnosis of rheumatoid arthritis is currently based on American College of Rheumatology (ACR) criteria.³ However, these criteria were established in a population of patients selected on the basis of their disease status, with a view to classifying different forms of the disease rather than different ways of diagnosing it. New criteria are emerging for the detection of very early rheumatoid arthritis (less than six months in duration). A recent study has demonstrated the value of biological markers by using diagnostic models of erosive arthritis.² Markers such as rheumatoid factor (RF) and anti-cyclic citrullinated (filaggrin) peptide antibodies (anti-CCP antibodies) were selected from among five other criteria. Persistence of disease associated with erosive arthritis was particularly associated with the presence of anti-CCP antibodies.²

Anti-filaggrin antibodies are a subset of a large panel of antibodies, previously called anti-perinuclear factor (APF) when detected in buccal mucosal cells, or anti-keratin antibodies (AKA) when detected in epithelial cells of the stratum corneum of rat oesophagus. AKA and APF have been shown to recognise both a 37-40 kDa protein and three profilaggrin related proteins extracted from human epidermis or rat oesophagus.⁴ In humans, this protein has been identified as a neutral/acidic isoform of filaggrin that may

be involved in the aggregation of cytokeratin intermediate filaments. Recent data have shown that citrullination of epitopes was essential to detect antibodies related to rheumatoid arthritis.^{5,7} Moreover, antibodies to citrullinated peptides appear to be highly specific hallmarks of the disease.^{1,4} In addition, they are associated with the more active and severe forms of rheumatoid arthritis.⁶ The immune response to citrullinated epitopes is believed to be involved in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. Very recent data have shown that the citrullination of peptides could enhance the stability of the HLA-DRB1*0401 MHC class II peptide complex, and therefore could enhance the presentation of citrullinated epitopes to the immune system.^{10,11}

For the detection of these specific antibodies, various technical procedures have been used. Immunofluorescence methods,⁸ western blotting,¹² and enzyme immunoassays^{9,7} have been used with varying degrees of sensitivity and specificity. A new generation of commercial enzyme immunoassay (EIA) kits (CCP2) using a cyclic peptide that is not derived from filaggrin is now available for rheumatoid arthritis diagnosis.

Our aim in this study was to establish the relative performance of several anti-citrullinated peptide antibody detection methods in order to optimise the diagnosis of rheumatoid arthritis. We evaluated 271 sera to compare both the sensitivity and specificity of AKA, anti-linear citrullinated linear filaggrin peptide antibodies,⁹ and anti-CCP2 antibodies.

Abbreviations: AFA, anti-filaggrin antibodies; AKA, anti-keratin antibodies; CCP, cyclic citrullinated peptide; EIA, enzyme immunoassay; RF, rheumatoid factor





Journal of Neuroimmunology 117 (2001) 149–155

Journal of
Neuroimmunology

www.elsevier.com/locate/jneuroin

IgG reactivity against citrullinated myelin basic protein in multiple sclerosis

J. de Seze^{a,b,*}, S. Dubucquoi^a, D. Lefranc^a, F. Virecoulon^a, I. Nuez^a, V. Dutoit^a,
P. Vermersch^b, L. Prin^a

^a Department of Immunology, CHRU of Lille, Lille, France^b Department of Neurology, CHRU of Lille, Lille, France

Received 8 December 2000; received in revised form 8 March 2001; accepted 21 March 2001

Abstract

An increased level of citrullinated myelin basic protein (MBP-C8) has been reported in the brains of multiple sclerosis (MS) patients. However, the involvement of the immune response to post-translational modified MBP in the pathophysiology of MS remains speculative. The aim of this study was to compare the levels of immunoglobulin G antibodies to several MBP epitopes, before and after citrullination, in the cerebrospinal fluid (CSF) and sera of MS patients using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). We analyzed antibody reactivity against various MBP-peptides in the CSF and sera of 60 MS patients, and 30 patients with other neurological diseases (OND) as controls. The peptides tested were: MBP_{75–98} (peptide 1), native (peptide 2) and citrullinated (peptide 3) MBP_{108–126} (ARG₁₂₂ → Cit₁₂₂), and native (peptide 4) and citrullinated (peptide 5) MBP_{151–170} (ARG_{159, 170} → Cit_{159, 170}). All selected peptides could support an immune reactivity in CSF and sera of MS and OND patients. A higher reactivity against peptide 4 was found in the CSF of MS patients compared with OND patients ($P < 0.0001$), but not against citrullinated peptides (peptides 3 and 5). However, we observed that the citrullination state of peptide 2 modified the patterns of immune reactivity more markedly in MS patients ($P < 0.0001$) than in OND patients ($P < 0.02$). Although some MBP epitopes could be a potential target in MS, our data did not demonstrate any difference of antibody response to MBP peptides in their citrullinated forms. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Multiple sclerosis; CSF; Myelin basic protein; Citrullination; Autoantibody reactivity

1. Introduction

In multiple sclerosis (MS), inflammatory lesions could be linked mainly to an aggressive immune reaction to several myelin antigens (Reindl et al., 1999). The strong encephalitogenic property of myelin basic protein (MBP), together with the *in vivo* and *in vitro* reactivity of specific CD4⁺ T cells, makes MBP a likely candidate as a potential target antigen in pathogenic processes. It has recently been reported that, among the specific T cells, the emergence of particularly naive CD45RA T cell subsets, differing with respect to epitope specificity and functional antigen avidity, could explain the pathological process in demyelinating diseases (Muraro et al., 2000). Nevertheless, the presence of myelin reactive T cells is also detected in

healthy individuals (Jingwu et al., 1992). Likewise, circulating autoantibodies against MBP peptides, such as MBP_{75–106}, have been detected in normal serum (natural autoantibodies) (Jankovic and Djordjijevic, 1991). Antibodies with specificity for self antigens are controlled by idiotypic interactions in serum. Slight modifications of target self antigens could expose neo-epitopes to the immune system, change the network regulation of autoreactivity, and might support specific immune reactivity associated with pathologic conditions (Hurez et al., 1997; Tuohy et al., 1999).

MBP accounts for approximately 35% of central nervous system myelin proteins and different isoforms have been described (Roth et al., 1987). Furthermore, various charge isomers, resulting from post-translational modifications, such as phosphorylation, deamidation and citrullination, have been described (Deibler et al., 1975; Chou et al., 1976; Wood and Moscarello, 1989). It has also been reported that the chronic inflammatory process itself could

* Corresponding author. Clinique Neurologique, Hôpital R. Salengro, CHRU de Lille, 59037 Lille Cedex, France.
E-mail address: j-desoza@chru-lille.fr (J. de Seze).

4) Synthèse de ces travaux et discussion des articles 1 et 2



Dans les deux études que nous avons menées, nous avons pu confirmer l'impact de modifications post traductionnelles sur le statut d'immunoréactivité de certains auto-antigènes. Dans le cadre des connectivites et pour l'épitope 306-324 de la filagrine (« cfc6 »), il apparaît que des patients souffrant de PR, mais aussi certains patients souffrant de lupus ou de syndrome de Sjögren, présentent une réactivité IgG plus importante que celle observée chez 99 % des sujets sains, c'est-à-dire par rapport au seuil défini pour la méthode. Toutefois, c'est uniquement dans le cadre de la PR que la citrullination de cet épitope lui confère un statut de cible de réactivité discriminante pour 50 à 70 % des patients. Chez les patients souffrant de lupus ou de Sjögren et présentant une réactivité anticorps vis-à-vis de cet épitope « cfc6 », la citrullination ne modifie en rien la réactivité des sérums, c'est-à-dire qu'elle ne s'accompagne d'aucun gain ou perte de réactivité. La réactivité Ac observée chez ces patients semble donc indépendante de l'état de citrullination de cet épitope. On peut supposer que chez les patients lupiques ou souffrant d'un syndrome de Sjögren, la reconnaissance « fine » de l'épitope par les Ac se fait à distance de celui (ou ceux) comprenant le(s) motif(s) arginine ou citrulline. L'acquisition d'une réactivité Ac dirigée contre l'épitope cfc6 n'est donc un phénomène spécifiquement lié à la citrullination que dans la PR. Dans l'approche développée au laboratoire, c'est l'estimation du différentiel de réactivité (réactivité vis-à-vis de l'épitope citrulliné dont on « soustrait » la réactivité vis-à-vis de l'épitope non citrulliné) qui permet de distinguer la cohorte de patients souffrant de PR par rapport à celle des autres connectivites. Cette approche n'est pas simple à mettre en œuvre et a été rapidement supplantée par l'utilisation plus aisée des tests commercialisés dits de deuxième génération (Ac anti-CCP2) proposant d'évaluer la réactivité vis-à-vis d'un seul épitope citrulliné et dont la conformation cyclique expose spécifiquement le site d'interaction épitopique aux Ac spécifiques présents chez les patients souffrant de PR.

Dans les pathologies inflammatoires démyélinisantes, comme la SEP, la citrullination de la MBP a été associée au processus de régénération de la myéline. L'isomère C8 de la MBP constitue la forme la plus citrullinée de cette protéine. Il a été rapporté différentes réactivités immunitaires dirigées contre cette protéine, dont une particulière ciblant le motif 151-170, citrulliné, de la MBP (Tranquill *et al.* 2000). Contrairement aux travaux publiés dans la littérature, nous rapportons dans le travail que nous avons mené (article 2), que la réactivité des Ac vis-à-vis du motif 151-170 de la MBP semble indépendante de son état de citrullination (comme ce que nous observons chez les patients lupiques vis-à-vis de l'épitope cfc6 de la

filagrine). En revanche, nous avons constaté que la citrullination pouvait aussi conduire à masquer des épitopes immunodominants au cours de certains processus pathologiques, puisque nous avons observé que des patients souffrant de SEP présentaient une réactivité significativement plus importante vis-à-vis de l'épitope 108-126 de la MBP quand il était exposé sous sa forme **non citrullinée** par rapport à la situation où il était citrulliné. Les sérums de patients souffrant de SEP présentaient dans cette étude moins de réactivité « IgG » (à la fois dans le sérum et dans le LCS) vis-à-vis de cet épitope citrulliné que les sujets souffrant d'autres pathologies neurologiques inflammatoires, suggérant que dans la SEP, cet épitope pourrait ne plus être suffisamment exposé pour entretenir l'immunculus spécifique de cette molécule MBP.

De façon générale, ces travaux nous ont amené à 2 conclusions. Il est certes possible d'analyser le retentissement spécifique de modifications post traductionnelles de certains épitopes sur le répertoire de patients souffrant de MAI, mais cette approche n'est pas facilement transposable d'une maladie à l'autre. Notamment dans la SEP, le processus de citrullination ne produit pas d'épitopes spécifiquement reconnus par les patients par rapport aux autres pathologies inflammatoires démyélinisantes. Plus encore, même pour la PR alors que le processus de citrullination génère des épitopes spécifiquement reconnus par les patients, la sensibilité de la démarche ne dépasse pas 70 % alors que la maladie est installée, et au mieux 50 % lors la première année d'évolution de la maladie (Dubucquoi *et al.* 2004; Avouac *et al.* 2006).

II] Identification de nouveaux biomarqueurs de l'auto-immunité : une nouvelle approche sans *a priori*.

1) L'analyse sans « *a priori* » du répertoire autoréactif permet-elle de révéler la signature d'un processus pathologique ?

Dans la SEP, les protéines impliquées dans la constitution de la myéline ou les produits générés par la réaction gliale qui siège dans le tissu nerveux sont décrits comme les principales cibles d'une réponse immunitaire inappropriée. Que les études se rapportent au répertoire T ou au répertoire B, aucune n'a permis de distinguer clairement une réponse immunitaire spécifique de la SEP par rapport à celle observée chez des patients souffrant d'autres pathologies inflammatoires démyélinisantes voire de la réponse physiologique observée chez le sujet sain (Brokstad *et al.* 1994; Reindl *et al.*

1999). L'analyse sans *a priori* du répertoire T est d'interprétation délicate (Tuohy *et al.* 1997; Tuohy *et al.* 1999). Nous avons fait le choix d'analyser le répertoire des lymphocytes B autoréactifs avec l'analyse des Ac sériques dans les pathologies auto-immunes avec atteinte du système nerveux central. Des travaux ont rapporté, dès la fin des années 1990, des variations séquentielles des réactivités lymphocytaires T qui ciblaient la molécule protéine lipo-protéique (PLP) de la myéline au cours de l'EAE et chez un groupe d'individus souffrant de SEP (Tuohy *et al.* 1997). Ils ont montré des modifications de ce répertoire sur une durée relativement courte mais ne retrouvaient pas de schéma commun d'évolution des profils de réactivités chez les différents individus (ou animaux) du groupe malade (Tuohy *et al.* 1997; Tuohy *et al.* 1999). Toutes les spécificités des récepteurs T variaient d'un individu à l'autre. Si ces résultats étaient interprétés comme liés au phénomène d'extension épitopique (*epitope spreading*), ils montraient qu'à l'échelle de la seule molécule PLP, et sur une durée relativement restreinte, ce phénomène restait sous la dépendance de la singularité de réponse immunitaire propre à l'individu, et ne suivait pas un schéma bien défini, commun à différents individus qui pourtant souffraient de la même pathologie. Des travaux ont toutefois montré qu'il est possible de décrire un profil homogène de reconnaissance immunitaire composé d'anticorps naturels dirigés contre différents auto-antigènes, dans le sérum de sujets sains (Lacroix-Desmazes *et al.* 1995; Mouthon *et al.* 1995). D'autres études ont également montré qu'il est possible de distinguer des sujets atteints de différentes maladies auto-immunes par la révélation de profils de réactivité qui se distinguent de ceux observés chez les sujets sains (Sharshar *et al.* 1998; Stahl *et al.* 2000b). Ces travaux suggèrent que l'immunculus composé de l'ensemble des réactivités Ac qu'héberge un individu est susceptible de se modifier de façon durable (et mesurable) en fonction des conditions pathologiques auxquelles l'individu est exposé et surtout en fonction des modifications d'expression antigénique générées par cet état pathologique.

2) Analyse globale des profils de réactivités sériques chez des patients souffrant de pathologies neurologiques centrales à composante auto-immune : Sclérose en plaques, neurolupus, neuro-Sjögren.

Nous avons analysé les réactivités des Ac sériques dans trois situations pathologiques chroniques associées à des manifestations neurologiques centrales de type inflammatoire : la sclérose en plaques (SEP), le neurolupus (NL), le syndrome de Sjögren avec atteinte centrale (neuro-Sjögren, NGS). Dans le cadre de la SEP, des patients souffrant des trois formes évolutives (rémittente, secondairement progressive, progressive primaire) ont pu être étudiés. Dans le cadre du neurolupus, les profils de réactivité des IgG sériques ont été comparés à ceux obtenus chez les patients souffrant de

lupus sans atteinte neurologique centrale. Pour appréhender le retentissement sur le répertoire des Ac de l'individu, il semblait nécessaire d'utiliser une démarche d'analyse plus large que celle ciblant des réactivités particulières (« à l'unité »). Nous avons proposé, d'utiliser une approche d'immuno-empreinte à partir de tissu cérébral sain mais aussi de tissus nerveux issus de sujets souffrant de SEP, pour comparer les profils de réactivités des différents groupes de sujets. **Cf. articles 3 (SEP) et 5 (NL).**

Distortion of the Self-Reactive IgG Antibody Repertoire in Multiple Sclerosis as a New Diagnostic Tool¹

Didier Lefranc,^{2*} Lionel Almeras,^{*} Sylvain Dubucquoi,^{*} Jérôme de Seze,^{*,†} Patrick Vermersch,[†] and Lionel Prin^{*}

To date, none of the myelin-associated Ag targets definitively discriminates between the immune response observed in multiple sclerosis (MS) patients and healthy subjects. However, it has been shown recently that analysis of global immune Ab profiles such as natural autoantibody reactivities can help to distinguish between normal individuals and patients suffering from various immune diseases. The aim of our study was to compare the global IgG immune response against brain self-Ags in sera from 82 MS patients and 27 healthy subjects. The analysis of the immune profiles was performed by Western blotting, and data were subjected to linear discriminant analysis. Particular patterns of IgG reactivity were found in healthy subjects, Sjögren patients, and MS patients. Moreover, this approach separated the three clinical forms of MS with a high concordance rate with the clinical data (κ value, 77.8%). Our study suggests, for the first time, that serum IgG Ab repertoires are able to distinguish MS patients. In addition, our data suggest that patterns of IgG reactivity could model the pathological processes underlying the various forms of MS. Further characterization of such discriminant Ags could provide useful information regarding their potent role in pathogenesis or regulatory processes in MS. *The Journal of Immunology*, 2004, 172: 660–678.

Multiple sclerosis (MS)² is an inflammatory demyelinating disease of the white matter of the CNS. An autoimmune process, infiltrated by macrophages and mononuclear cells, is postulated to be the underlying mechanism of MS lesions. Due to its similarities with experimental autoimmune encephalomyelitis, MS is thought to be mediated mainly by T cells. However, some recent studies have also suggested that B cell activation, Ab response, and humoral factors are potent effector mechanisms involved in the full development of demyelinating disease (1, 2). However, the molecular targets and the mechanisms involved in myelin damage have yet to be clearly defined (3).

Different self-proteins have been investigated as potent targets for T or B cells. The most extensively studied putative self-Ags are components of normal CNS myelin (myelin basic protein (MBP), proteolipid lipoprotein, myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), etc.), posttranslationally modified forms of these myelin proteins (4, 5), or component originating from glial cells (6, 7). Immune recognition of intracellular proteins by autoantibodies (2′3′-cyclic nucleotide 3′-phosphohydrolase) has also been described (8). Nevertheless, whether or not there is an alteration of the immune recognition of self-proteins in MS compared with normal subjects requires further investigations.

To date, no specific biological diagnostic marker of MS has been identified. Specific autoantibodies detected in sera from patients are usually investigated by techniques using purified self-Ags and/or relevant peptides from preselected targets. Such a restrictive view may be overcome by using a large panel of Ags derived from target tissue extracts. In the present study, we compared by Western blot the IgG repertoires of healthy subjects and MS patients against a broad range of self-Ags derived from brain homogenates from one MS patient and from three healthy subjects. Our data demonstrate that serum IgG immune profiles can discriminate between healthy subjects and MS patients and can also differentiate the three clinical forms of MS. This approach has led to the identification of new potential antigenic candidates, such as α -enolase. The pathogenic or regulatory role of these discriminant Ags remains to be defined. Such newly identified antigenic targets, serving as markers of disease activity, could be useful diagnostic tools.

Materials and Methods

Patients

IgG Ab response to brain tissues was studied with sera from 128 subjects. Eighty-two patients were diagnosed with clinically definite MS according to the criteria of Poser et al. (9). All patients were followed up in the Department of Neurology (Centre Hospitalier Régional Universitaire, Lille, France) and were relapse free. The sera were analyzed before immunomodulating or immunosuppressive treatment. Sera from 27 healthy subjects were tested as normal controls. Nineteen patients having Sjögren syndrome (SS) with neurological disorders were included as a second control group. Table I summarizes the epidemiological parameters of patients and controls. All subjects gave their written informed consent, and the study was approved by the local ethics committee.

IgG purification

Serum samples were treated by affinity chromatography on protein G-Sepharose column (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). IgG was purified according to the manufacturer's recommendation. Shortly after the binding of the IgG on the matrix, the IgG was eluted using glycine buffer (pH 2.8). The IgG-depleted serum was kept for IgM evaluation. Affinity-purified IgG was then neutralized by adding neutralizing buffer directly to the fraction at column end. To evaluate the appearance of

¹Laboratoire d'Immunologie Équipe d'Accueil 2086, Faculté de Médecine, and ²Service de Neurologie D, Hôpital Roger Salengro, Lille, France

Received for publication June 24, 2003. Accepted for publication October 22, 2003.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

³This project was supported by Biogen. L.A. is the recipient of a grant from the conseil régional and Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille.

⁴Address correspondence and reprint requests to Dr. Didier Lefranc, Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine, Pôle Recherche, 1, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France. E-mail address: d-lefranc@chru-lille.fr

⁵Abbreviations used in this paper: MS, multiple sclerosis; MBP, myelin basic protein; MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein; SS, Sjögren syndrome; IEP, immobilized pH gradient; IEF, isoelectric focusing; 2-DE, two-dimensional electrophoresis; pI, isoelectric point; MALDI-TOP, matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight; LDA, linear discriminant analysis.

New antigenic candidates in multiple sclerosis: Identification by serological proteome analysis

Lionel Almeras^{1*}, Didier Lefranc¹, Hervé Drobecq², Jérôme de Seze³, Sylvain Dubucquoi¹, Patrick Vermersch³ and Lionel Prin¹

¹Department of Immunology, CHR de Lille, Lille, France

²Biological Institute of Lille, Lille, France

³Neurology D, CHR de Lille, Lille, France

Myelin antigen targets that are clearly associated with pathogenic events in multiple sclerosis (M.S.) patients remain to be defined. We recently demonstrated that the analysis of global IgG antibody response against human brain antigens using one-dimensional (1-D) immunoblotting, allowed us to discriminate M.S. patients from controls (both healthy subjects and patients with Sjögren's syndrome). Additionally, this approach also differentiated the three clinical forms of M.S. Indeed, 42 brain antigenic bands (26 from healthy brain and 16 from the M.S. brain) showed the discriminant IgG immune responses. The aim of our study was to characterize the 26 discriminant antigenic bands detected in healthy brain. Protein identification was successively performed by 1-D and two-dimensional (2-D) immunoblottings using sera from 18 M.S. patients, followed by mass spectrometry (MS) analysis and a database search. One hundred and two antigenic spots were then detected on 2-D immunoblots, with M.S. sera against healthy brains. Sixty-four spots were successfully matched with 2-D Coomassie brilliant blue stained gels, which were further selected for MS analysis and annotated leading to the identification of 14 of the 26 discriminant antigens. Thus, serological proteome analysis may provide a useful tool for the identification of potentially new M.S.-associated antigens, whose relevance to physiopathological events remains to be defined.

| | |
|----------|----------|
| Received | 2/9/03 |
| Revised | 13/12/03 |
| Accepted | 24/12/03 |

Keywords: Antigens / Immunoblotting / Multiple sclerosis / Two-dimensional gel electrophoresis

1 Introduction

Multiple sclerosis (M.S.) is a chronic inflammatory disease that leads to selective demyelination and varying degrees of axonal loss in the central nervous system (CNS). During the past two decades, M.S. has largely been considered as a T-cell-mediated disease [1]. Thus, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model of M.S., can be passively transferred by myelin-reactive T-cells [2]. However, it is now recognized that antibody-dependent immune mechanisms are also involved in the

formation of M.S. lesions [3–6]. Numerous studies have reported the recognition of CNS myelin autoantigens (myelin basic protein (MBP), proteolipid lipoprotein, myelin oligodendrocyte glycoprotein) [7–9] by autoantibodies present in sera collected from M.S. patients, and healthy subjects [10, 11]. Until now, information concerning the involvement of specific antigens in pathogenic processes in M.S. has been scarce. Additionally, the molecular mechanisms involved in myelin damage remain unclear [12, 13]. Thus, the identification of specific antigenic targets in M.S. is a crucial step towards understanding the pathological mechanism and developing useful diagnostic and therapeutic tools.

In a previous study [14], we compared, by 1-D immunoblottings, IgG antibody repertoires from control subjects (healthy subjects and patients with Sjögren's syndrome) and M.S. patients against a broad range of human brain homogenates (healthy and M.S. brains). Linear discrimi-

Correspondence: Dr. Lionel Prin, Department of Immunology, Research Center-Medicine school, F-59045 Lille Cedex, France
E-mail: immunologie@univ-lille2.fr
Fax: +33-(0)3-20-62-68-93

Abbreviations: CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GFAP, glial fibrillary acidic protein; MBP, myelin basic protein; M.S., multiple sclerosis; PP, primary progressive; RR, relapsing-relapsing; SERPA, serological proteome analysis; SP, secondary progressive

* Current address: NICN FRE 2533 CNRS, Medicine University La Timone, 13385 Marseille, France

Characterization of Discriminant Human Brain Antigenic Targets in Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus Using an Immunoproteomic Approach

Didier Lefranc,¹ David Launay,² Sylvain Dubucquoi,¹ Jérôme de Seze,³ Patricia Dussart,¹ Marie Vermersch,¹ Eric Hachulla,⁴ Pierre-Yves Hatron,⁴ Patrick Vermersch,³ Luc Mouthon,⁵ and Lionel Prin¹

Objective. To characterize discriminant human brain antigenic targets in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus (NPSLE), using a standardized immunoproteomic approach.

Methods. Self-IgG reactivity against normal and injured human brain tissues was studied by Western blotting of sera from 169 subjects, 16 patients with NPSLE, 12 patients with SLE without neuropsychiatric manifestations (non-NPSLE), 32 patients with Sjögren's syndrome with or without central nervous involvement, 82 patients with multiple sclerosis, and 27 healthy subjects. A proteomic approach was then applied to characterize discriminant antigens identified after comparisons of all patterns.

Results. The serum self-IgG reactivity patterns against human brain tissue differed significantly between patients with NPSLE and the control groups. Four normal brain antigenic bands were specifically or preferentially recognized by sera from NPSLE patients (p240, p90, p77, and p24). Protein band p240 was characterized as microtubule-associated protein 2B (MAP-2B), p77 as Hsp70–71, and p24 as triosephosphate isomerase. Protein band p90 was not characterized. In contrast, 1 other protein band (p56, characterized as septin 7) was never recognized by sera from NPSLE patients but was recognized by a majority of sera from non-NPSLE patients.

Conclusion. Our findings show that the immunoproteomic approach is a reliable method for assessing serum self-IgG reactivities against human brain tissue in NPSLE. Our characterization of some of the identified discriminant antigens, such as MAP-2B, triosephosphate isomerase, and septin 7, suggests that the stability of neuronal microtubules might be involved in the pathophysiology of NPSLE.

Supported in part by grants from the Association Française du Gougerot-Sjögren et des Syndromes Secs and from G4-Interrégion Nord-Ouest, France.

¹Didier Lefranc, MD, PhD, Sylvain Dubucquoi, MD, PhD, Patricia Dussart, Marie Vermersch, Lionel Prin, MD, PhD: Laboratoire d'Immunologie EA 2686, IMPRT-IFR 114, Université Lille 2, Lille, France; ²David Launay, MD: Laboratoire d'Immunologie EA 2686, IMPRT-IFR 114, Hôpital Claude-Huriez, Université Lille 2, and Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, Lille, France; ³Jérôme de Seze, MD, PhD, Patrick Vermersch, MD, PhD: Laboratoire d'Immunologie EA 2686, IMPRT-IFR 114, Hôpital Roger Salengro, Université Lille 2, and Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, Lille, France; ⁴Eric Hachulla, MD, PhD, Pierre-Yves Hatron, MD: Hôpital Claude-Huriez, Université Lille 2, and Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, Lille, France; ⁵Luc Mouthon, MD, PhD, Université Paris Descartes, UPRES-EA 4058, and Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France.

Drs. Lefranc and Launay contributed equally to this work. Dr. Mouthon has received consulting fees, speaking fees, and/or honoraria (less than \$10,000 each) from Actelion, Pfizer, and LFB.

Address correspondence and reprint requests to Didier Lefranc, MD, PhD, Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine-Pôle Recherche, 1 Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France. E-mail: didier-lefranc@wanadoo.fr.

Submitted for publication November 6, 2006; accepted in revised form June 1, 2007.

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune disease characterized by multisystemic manifestations. Central nervous system (CNS) involvement has been reported to occur in 6–95% of SLE patients, depending on the criteria applied (1,2), but the exact prevalence is probably between 6% and 12% (3). The features of neuropsychiatric SLE (NPSLE) are extremely diverse and include neurologic and psychiatric syndromes (4). The diagnosis of NPSLE is difficult and remains a challenge because the drugs used for the management of SLE, infections, or other non-SLE-related pathologic conditions may be responsible for the neuropsychiatric manifestations and have to be excluded

3) Synthèse des résultats obtenus et discussion des articles 3,4 et 5

L'analyse que nous avons menée montre qu'il est possible d'observer des profils de réactivité des Ac sériques différents selon l'origine du tissu, même chez les sujets sains. Ainsi les extraits protéiques de tissus cérébraux sont la cible d'une réactivité des IgG sériques plus riche que celle observée sur le muscle par exemple. Par ailleurs, nous avons observé que les profils de réactivité des Ac étaient différents selon que le substrat testé était le tissu cérébral lésé ou le tissu sain. Comme cette observation a également été faite chez les sujets sains, ces résultats suggèrent que des réactivités du répertoire autoréactif physiologique peuvent être dirigées à la fois contre des antigènes du tissu cérébral sain mais aussi contre du tissu cérébral altéré (rôle des modifications post traductionnelles, des processus lésionnels ?). Nous avons également observé que les profils de réactivité des sujets sains (comme ceux des malades) étaient plus riches sur le tissu sain. Le répertoire des antigènes exprimés au sein des tissus lésés serait donc plus restreint. Toutes ces premières observations ont fait l'objet de discussions dans les articles publiés, en préalable aux interprétations plus détaillées concernant les modifications des profils. En effet, notre travail a particulièrement illustré le fait qu'il existe des différences interindividuelles de profil de réactivités Ac chez les individus, quel que soit le groupe étudié. Il a surtout montré qu'il existe des similitudes de réactivités au sein des groupes d'individus malades ou non, et même selon les pathologies (« SEP /NGS / NL »). Analysées individuellement, certaines réactivités se distribuent de façon significativement différente. On note toutefois qu'il s'agit le plus souvent d'une expression en « *plus ou moins fréquemment observée* » et non en « *tout ou rien* ». La valeur prédictive diagnostique de ces premières analyses reste très modeste. L'association de l'analyse linéaire discriminante (LDA) au recensement des différentes réactivités a apporté des données utiles d'interprétations complémentaires. Cette analyse statistique a montré que c'est la combinaison des réactivités qui permet de caractériser au mieux un groupe d'individus par le biais des différentes spécificités d'Ac qu'ils expriment. Ainsi, un groupe présentant une pathologie particulière ne se distingue pas des autres par une réactivité originale qui ne réagirait qu'avec un unique antigène mais bien par un **ensemble de réactivités**, c'est-à-dire une modification plus globale de l'immunculus. Cet immunculus regrouperait des spécificités propres à l'individu (réactivités « privées »), des réactivités partagées par les sujets sains (« réactivités publiques physiologiques ») mais aussi des réactivités publiques partagées par des individus souffrant de la même maladie (« réactivités publiques pathologiques »). Ce sont ces

« réactivités publiques » que la LDA met en valeur. Dans la comparaison SEP-NGS et sujets sains, 162 bandes de réactivité ont été repérées par immunopreinte monodimensionnelle sur l'extrait protéique issu d'un cerveau sain, et 79 sur le cerveau issu d'un sujet souffrant de SEP. À partir de 16 réactivités particulières (9 sur le tissu sain et 7 sur le tissu pathologique), identifiées par la LDA, les performances diagnostiques de cette approche ont pu être évaluées à plus de 95 % de sensibilité et près de 89 % de spécificité quand il s'agissait de distinguer les profils de réactivités de patients souffrant de SEP et ceux de sujets sains. Elles atteignent 100 % de sensibilité et de spécificité quand il s'agissait de distinguer les patients souffrant de neurosjögren (NGS) des sujets sains ou souffrant de SEP. La LDA présente également l'avantage de classer les réactivités. Elle a ainsi montré qu'il était possible d'identifier des réactivités associées au statut « malade » des individus (qu'ils souffrent de SEP **ou** de NGS) par rapport aux sujets sains. Les sujets sains ne présentaient pas ces réactivités, mais d'autres qui leur sont propres (réactivités publiques physiologiques). Ces dernières ne sont plus observées (ou moins fréquemment) chez les sujets atteints de neuropathies inflammatoires. Les sujets souffrant de neuropathies expriment un groupe de réactivités qui suggèrent une relation entre réactivités Ac et agression tissulaire. Outre la classification « sain » ou « malade », la LDA montre donc une classification en fonction de la pathologie : distinguant « SEP » et « NGS ». Cette démarche « pas à pas » décrite dans le paragraphe consacré à la méthodologie suggère l'interdépendance des réactivités entre elles. Ainsi, cette démarche appliquée aux patients souffrant de différentes formes cliniques de SEP, a permis d'observer, pour la première fois, des marqueurs sériques caractéristiques de ces formes cliniques. La LDA, par les profils qu'elle a identifiés à partir de 29 réactivités singulières, permet d'associer des combinaisons discriminantes de réactivités associées à 89 % des sujets souffrant de forme rémittente, 86 % des formes secondairement progressives, et 90 % des formes progressives primaires de la maladie.

On notera enfin que si l'analyse a porté sur des groupes « homogènes » de patients qui présentaient des formes cliniques particulières de la SEP, ces patients étaient analysés à des âges différents de la maladie (début de la maladie plus ou moins distant du prélèvement effectué pour l'analyse). Malgré cette relative hétérogénéité liée à l'histoire de la maladie, il semble donc possible d'identifier une signature spécifique des formes cliniques, traduisant une relative stabilité des profils associés au statut pathologique.

Dans le NL (article 5), la même démarche « pas à pas » illustre que les patients souffrant d'une atteinte cérébrale ne présentent pas le même profil de réactivités d'IgG sériques que des patients qui n'en souffrent pas. Avec des performances qui atteignent une sensibilité proche de 97 % et spécificité de près de 95 % alors que cette entité clinique, rare, et parfois discutée, reste de diagnostic délicat. Ces résultats sont donc superposables à ceux

obtenus pour la SEP puisqu'ils montrent que l'analyse du répertoire permettrait de distinguer les formes cliniques d'un processus pathologique. Cette étude montre également qu'il peut exister un sous groupe (ou « tronçon commun ») de réactivités partagées entre des patients souffrant de deux pathologies distinctes, mais touchant toutes deux un organe précis, le système nerveux central, en l'occurrence. L'analyse présentée dans l'article (article 5) ne dit pas si les spécificités « partagées » des Ac sériques observées chez les patients NL et NGS s'étendent également aux patients souffrant de SEP.

La méthode d'analyse sans *a priori* par immuno-empreinte monodimensionnelle (IEMD) des profils de réactivité a permis de cerner certains antigènes du système nerveux central, comme cibles d'un profil de réponse anticorps spécifique de pathologies. Ces résultats offrent des perspectives intéressantes en termes de prise en charge des patients. Toutefois l'absence de caractérisation des cibles antigéniques vis-à-vis desquelles les réactivités spécifiques étaient observées, ne permet pas de développer des outils diagnostiques. Il s'agit d'un facteur limitant la compréhension physiopathologique. Une approche protéomique a donc été envisagée pour la caractérisation des cibles de réactivités discriminantes avec le développement de techniques d'électrophorèse bidimensionnelle et de prélèvement des spots d'intérêts pour l'analyse en spectrométrie de masse (**article 4**). Des collaborations ont été engagées dans un premier temps avec le Dr Gilbert BRIAND (Laboratoire de Spectroscopie de Masse, P.P.F. de l'Université de Lille 2) puis secondairement avec la plateforme de spectrométrie de masse du Laboratoire de physiopathologie de la barrière hémato-encéphalique, E.A. 2465, IMPRT-IFR 114, Université d'Artois, LENS, France (Roméo CECCELI). Dans l'article présenté (cf. article 4), l'analyse par immunoprotéomique bidimensionnelle (IPBD) a été réalisée à partir de 26 réactivités discriminantes identifiées chez les individus de trois groupes : sains, souffrant de SEP, et de NGS mais également des individus présentant les trois formes cliniques de SEP (rémittente, secondairement progressive et progressive primaire). A partir d'un extrait de cerveau de sujet sain, l'électrophorèse bidimensionnelle a révélé plus de 800 « spots » protéiques. Parmi ces spots, la réalisation conjointe de techniques d'immuno-empreinte 2D a permis de repérer par superposition avec le gel de migration protéique, 21 protéines considérées comme cibles des réactivités discriminantes observées lors de l'approche monodimensionnelle. L'analyse par spectrométrie de masse en MALDI-TOF des protéines a permis de générer des spectres de séquences peptidiques. Leur comparaison aux bases de données Swissprot, propose des identifications pour les antigènes candidats. Parmi les antigènes putatifs on peut citer : l'alpha émolase, des enzymes de

glycosylation, des protéines du cytosquelette, des protéines du choc thermique. Il s'agit majoritairement de protéines ubiquitaires.

Cette approche d'identification de nouvelles cibles de réactivités était originale pour notre équipe. Dans un premier temps, nous avons été confortés par nos résultats en constatant que d'autres équipes utilisant (ou non) la même méthodologie d'identification, repéraient les mêmes cibles de réactivités, notamment l'alpha-énolase. A titre d'exemple, la réactivité anti-alpha-énolase a été retrouvée dans la PR (Saulot *et al.* 2002; A. Kinloch *et al.* 2005), la sclérodermie (Terrier *et al.* 2008; Terrier *et al.* 2010), les maladies inflammatoires du tube digestif (Vermeulen *et al.* 2008; Vermeulen *et al.* 2011), d'autres connectivites (Pratesi *et al.* 2000), l'encéphalopathie associée à la thyroïdite de Hashimoto (Yoneda *et al.* 2007), et les hépatites auto-immunes (Ballot *et al.* 2003).

Une analyse comparée des résultats obtenus par les approches d'immuno-empreinte mono- et bidimensionnelle ont toutefois révélées certaines discordances. Cette observation suggère que les conditions d'extraction et de migration protéique associées à l'IPBD ne permettent pas, en fonction de la masse moléculaire et du point iso-électrique (pI) de repérer toutes les protéines présentes dans un extrait protéique tissulaire. Ainsi, les protéines de masse moléculaire supérieure à 130 ou inférieure à 20 kDa ne se retrouvent pas dans le gel de séparation bidimensionnelle. Il en est de même pour les protéines de pI supérieur à 9, ou inférieur à 4. Parallèlement, il est apparu que les protéines faiblement représentées au sein du tissu pouvaient ne pas atteindre le seuil nécessaire à leur détection après coloration au bleu de Coomassie colloïdal (BCC) pour l'identification par MALDI-TOF. Dans ce travail (article 4), des approches visant à améliorer les performances d'identification ont été proposées. Nous serons amenés à les évoquer ultérieurement quand nous discuterons des limites qui se sont révélées à l'usage de cette méthode.

Dans le cadre du NL (article 5), un des objectifs secondaires de notre travail, a été d'évaluer la pertinence physiopathologique des antigènes cibles de réactivités discriminantes. Les protéines *Microtubule-Associated Protein 2B* (MAP-2B), *Heat shock protein* (Hsp) 70–71, *Septin 7*, et triosephosphate isomérase ont été identifiées comme les cibles des réactivités distinguant NL et lupus sans atteinte neurologique. Sur ces 4 cibles potentielles, deux étaient communes avec celles rapportés comme distinguant la SEP et les autres pathologies ou les formes cliniques de SEP (Almeras *et al.* 2004). La MAP-2 dont l'expression est restreinte aux neurones a été rapportée dans d'autres travaux, comme cible associée aux NL (Williams *et al.* 2004). La triosephosphate isomérase a également été rapportée comme cible associée au NL (Sasajima *et al.* 2006). Sans mettre en doute les résultats des différents travaux, l'identification répétée des mêmes cibles de réactivités discriminantes comme l'alpha-énolase, la triosephosphate-isomérase, les *Heat-Shock-Proteins*, les protéines du cytosquelette, quelle que soient les pathologies auxquelles les équipes s'intéressent, nous amènent à nous

interroger sur la pertinence des antigènes identifiés par cette méthode couplant une approche d'immunoprotéomique et la spectrométrie de masse, comme cibles de réactivités traduisant un processus pathologique spécifique. Pour illustrer cette réflexion, nous rapportons quelques unes des cibles identifiées dans différentes pathologies auto-immunes (tableau 9). Elle nous amènera à discuter dans le chapitre suivant de la valeur et des limites de cette méthode de recherche et d'identification de nouveaux biomarqueurs.

| Maladie (substrat) | Identification | Référence |
|---|---|---|
| SEP (extrait de cerveau humain) | <ul style="list-style-type: none"> - Aconitate hydratase, mitochondrial - Actin, cytoplasmic 1 et 2 - Alpha enolase - Aspartate aminotransferase. Mitochondrial - CDC10 cell division cycle 10 homolog - Creatine kinase β chain - Dihydropyrimidinase related protein-2 - Fructose-bisphosphate aldolase A - Fructose-bisphosphate aldolase C - Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP) - Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase - Heat Shock Protein (60 kDa) mitochondrial - Malate dehydrogenase. Cytoplasmic - Neurofilament triplet L protein - Phosphatidylethanolamine-binding protein - Phosphoglycerate mutase 1 - Pyruvate kinase. M1 isozyme - Triosephosphate isomerase | (Almeras <i>et al.</i> 2004) (article 4) |
| EAE (extrait de cerveau souris) | <ul style="list-style-type: none"> - Aconitase hydratase 2 mitochondrial - Filament protein, alpha - Internexin neuronal intermediate - Malate dehydrogenase 1 - Phosphoglycerate mutase 1 - Pyruvate dehydrogenase brain specific | (Zephir <i>et al.</i> 2006; El Behi <i>et al.</i> 2007) (article 7) |
| Neuro lupus (extrait de cerveau humain) | <ul style="list-style-type: none"> - MAP-2B - Hsp70-71 - Triosephosphate isomerase - Septin 7 | (Lefranc <i>et al.</i> 2007) (article 5) |
| Neuro lupus (lignée SKNSH) | <ul style="list-style-type: none"> - Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M (hnRNP M) - Multifunctional protein ADE2 (Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase) - Phosphoglycerate kinase 1 - Triosephosphate isomerase | Notre laboratoire (Launay <i>et al.</i> article en préparation) |
| DEVIC (extrait de cerveau humain) | <ul style="list-style-type: none"> - Aconitate hydratase - Dihydropyrimidinase related protein 2 OS - Neurofilament (haut, intermédiaire, bas) - Phosphatidylethanolamine-binding protein - Triosephosphate isomerase | Notre laboratoire (Zéphir <i>et al.</i> article en préparation) |
| Polyarthrite Rhumatoïde (fibroblaste) Protéine recombinante | <ul style="list-style-type: none"> - Annexin 11 - BIP - Lamin A/C - Alpha enolase | Notre laboratoire (Dubucquoi <i>et al.</i> article en préparation) (Saulot <i>et al.</i> 2002) |

| | | | |
|---------------------------------------|---------|---|----------------------------------|
| APECED | | <ul style="list-style-type: none"> - Aldose reductase - Heat Shock cognate 71kDa Protein - Pancreatic regenerating protein 1 alpha - Pancreatic triacylglycerol lipase - Pancreatic α-amylase - Peroxiredoxin-2 | Notre laboratoire (article 9) |
| Artérite cellulaire | giganto | <ul style="list-style-type: none"> - Actin cytoplasmic 1 - Actin cytoplasmic 2 - ANKRD26-like family C member 1A - Annexin A2 - Coatomer subunit - Far upstream elementbinding protein 2 - Fumarate hydratase mitochondrial precursor - Lamin A/C - Mitochondrial import receptor subunit TOMM40 homolog - Nucleophosmin - Protease regulatory subunit 8 - Protein disulphide-isomerase A3 - Putative heat shock protein HSP90, subunit $\alpha 2$ - T-complex protein 1, subunit β - UDP-glucose 6-dehydrogenase B - Vinculin | (Régent <i>et al.</i> 2011) |
| Hypertension artérielle pulmonaire | | <ul style="list-style-type: none"> - AGAT2 - BRDT - Calumenin - DAP kinase - G6PD - Glutaminase - HSP27 - HSP70 - Kelch-like ECH - P61-YES - PHF15 - PI3-kinase - Tropomyosin - Vimentin | (Terrier <i>et al.</i> 2008) |
| Sujets sains | | <ul style="list-style-type: none"> - Actin - Alpha Enolase - Glyceraldehyde-3-phosphate-deshydrogenase - Prolyl-4-hydroxylase β subunit - Vimentin - α Tubulin chain 3 | (Servettaz <i>et al.</i> 2008) |

Tableau 9 : Antigènes cibles de réactivités décrites comme spécifiques de pathologies dans différentes maladies et même chez le sujet sain. S'en dégage la notion de « déjà vu » (Petrak *et al.* 2008; Rabilloud et Lelong 2011). En gras, les antigènes fréquemment cités comme cibles de réactivités discriminantes.

III] Quel est le sens des modifications du répertoire des auto-anticorps observées.

Parallèlement à l'identification des cibles de réactivités discriminantes, notre approche méthodologique a soulevé quatre questions dans la problématique des pathologies auto-immunes qui nous intéresse :

- 1) Comment évoluent les profils de réactivité sous traitement ?
- 2) Peut-on transposer dans les modèles animaux, les observations faites chez l'homme ?
- 3) Quelle est la valeur prédictive des modifications de profils de réactivités observées ?
- 4) Quelle sont les parts respectives des répertoires naturel et adaptif qui se modifient au cours des pathologies auto-immunes ?

1) Impact des thérapeutiques sur ces profils de réactivité.

Si les profils de réactivités semblent relativement stables chez des patients présentant la même forme clinique de la maladie, les traitements pourraient toutefois les faire évoluer. Cette observation pourrait ouvrir la perspective d'évaluer l'efficacité des traitements. Dans le cadre de la SEP, notre laboratoire a mené une analyse séquentielle de la réactivité des Ac sériques vis-à-vis d'Ag extraits de cerveau, avant et un an après l'introduction d'un traitement immunomodulateur par l'interféron bêta. L'analyse a été menée à partir d'une cohorte de 56 patients souffrant de forme rémittente de SEP et de 32 sujets sains. **(Cf. article 6).**

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Immunology Letters 97 (2005) 55–62



Evolution of self-reactive IgG antibody repertoires in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis

Almeras Lionel^{a,1}, J. de Scze^{a,b}, Lefranc Didier^a, Fily-Nalewajk Sandrine^a,
Dubucquoi Sylvain^a, Vermersch Patrick^b, Prin Lionel^{a,*}

^a Laboratoire d'immunologie EA2686, Faculté de Médecine, 1, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

^b Service de Neurologie D, Hôpital Roger Salengro, 59037 Lille Cedex, France

Received 9 June 2004; received in revised form 6 September 2004; accepted 23 September 2004

Available online 20 October 2004

Abstract

We have previously demonstrated a distortion of self-reactive IgG antibody repertoires in patients with multiple sclerosis (MS) compared to controls, by immunoblotting assays, using human brain homogenates. The analysis of the immune profiles against human brain antigens allowed us to distinguish MS patients, and to associate a particular pattern of reactivity for each clinical form of MS. The aim of the present study was to evaluate the evolution of such patterns in patients with relapsing-remitting MS (RRMS). In a first step, we confirmed, by western blotting using human brain as source of antigens, the existence of specific repertoires of IgG reactivity in whole serum collected from healthy subjects ($n = 32$) and from untreated patients with RRMS ($n = 50$). In a second step, the evaluation of patterns was performed at baseline and 1 year later in untreated RRMS patients ($n = 15$), and in RRMS patients treated with IFN- β ($n = 41$). In both groups, little change in IgG reactivity in whole serum was found. However, a higher degree of stability was noted in treated versus untreated patients ($P < 0.01$). Our results have showed a specific and relatively stable pattern of reactivity for each RRMS individual tested against brain antigens even after a 1-year treatment prevailing in treated patients, suggesting that IFN- β could stabilize IgG antibody repertoires.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Autoantibody; Multiple sclerosis; Interferon-beta

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a restricted inflammatory disease of the central nervous system (CNS) which is believed to result from an autoimmune response against myelin. Although T cells appear to be of major importance in the development of MS [1], the most marked deviations in the immune system of MS patients have been demonstrated using humoral approaches. Detection of oligoclonal immunoglobulin-G (IgG) banding on cerebrospinal fluid (CSF) electrophore-

sis is a hallmark of MS. This intrathecal antibody synthesis is used as a diagnosis indicator of the disease [2]. Moreover, the presence of Ig and complement deposits in MS plaques [3] and a possible effect of intravenous immunoglobulin (IVIg) treatment, also suggest the involvement of humoral mechanisms in the disease process [4–6]. Different myelin proteins have been investigated as potential targets of the immune response. Nevertheless, antigens inducing initiation or perpetuation of MS remain unknown [7,8].

Treatment of the relapsing-remitting form of MS (RRMS) with interferon (IFN)- β reduces relapse frequency and delays the progression of the disease. Additionally, brain magnetic resonance imaging (MRI) studies show a reduction in the development of new lesions [9–12]. However, while the mechanisms underlying the beneficial effects of IFN- β remain to be defined, they are related to the wide-range bio-

* Corresponding author. Tel.: +33 3 20 02 09 77; fax: +33 3 20 02 08 93.

E-mail addresses: lionel.almers@medecine.univ-mrs.fr (A. Lionel), l-prin@chru-lille.fr (P. Lionel).

¹ Present address: NHCN UMR 6184 CNRS, Médecine University La Timone, 13385 Marseille, France.

2) Synthèse des résultats et discussion de l'article 6.

Ce travail a corroboré les résultats de la première enquête (**article 3** ; (Lefranc *et al.* 2004)), puisqu'à partir des sérums de deux nouvelles cohortes : patients souffrant (exclusivement) de la forme rémittente de SEP et de sujets sains, il montre qu'il est possible de définir des profils de réactivité discriminants vis-à-vis de substrats composés d'extraits protéiques de cerveau (sain et lésé). L'ensemble de l'analyse des réactivités a comptabilisé 133 réactivités dont 81 sur l'extrait de cerveau de sujet sain, et 52 sur l'extrait issu du cerveau de sujet souffrant de SEP. À partir de ces réactivités, la LDA révèle 13 réactivités discriminantes : 9 sur le cerveau sain ; 4 sur le cerveau altéré par le processus pathologique. Huit de ces 13 réactivités discriminantes sont communes avec celles de la première enquête (Lefranc *et al.* 2004). Dans ce travail, les profils de réactivité des sujets sains se distinguent de ceux des sujets souffrant de SEP par la présence de six spécificités dirigées contre des antigènes extraits du cerveau sain. A l'inverse, et toujours sur le cerveau sain, les patients souffrant de SEP, se distinguent des sujets sains par la présence de trois réactivités spécifiques. Pour l'analyse des réactivités sur le cerveau lésé, les malades présentent trois réactivités discriminantes, les sujets sains, une seule. Ces données illustrent encore que ces deux groupes d'individus se distinguent par un sous ensemble de réactivités qui peut être estimé à moins de 10 % de l'ensemble du répertoire qui a été analysé par cette approche. C'est relativement peu, mais ce profil restreint permet quand même d'apporter des performances en termes de diagnostic de plus de 96 % de sensibilité et 100 % de spécificité.

L'objectif premier de cette étude était d'apprécier si le répertoire auto-immun des patients souffrant de SEP variait de façon mesurable dans la durée alors que les patients étaient, ou non, traités par l'interféron bêta, traitement capable de réduire la fréquence et l'intensité des poussées de SEP de 30 % environ. Pour cette analyse, la distribution de toutes les réactivités (« discriminantes » ou non) a été comparée chez chaque individu, le jour de l'inclusion dans le protocole et 1 an plus tard, alors que le traitement était, ou non, suivi. L'interprétation qui a été faite des résultats est que les profils de réactivité restaient globalement stables que les patients soient traités ou non. Cette stabilité a été rapportée au caractère faiblement évolutif de la maladie chez les patients étudiés. Elle pourrait être également rapportée au fait que la durée d'analyse est courte, ou encore que le traitement par l'interféron bêta a peu d'impact sur l'évolution des profils. Une lecture critique réalisée à distance de cet article, et notamment de sa figure 4 que nous reproduisons ci-dessous, nous amène à rediscuter ce résultat de profil jugé stable entre les deux collectes de prélèvements à un an d'intervalle (figure 21).

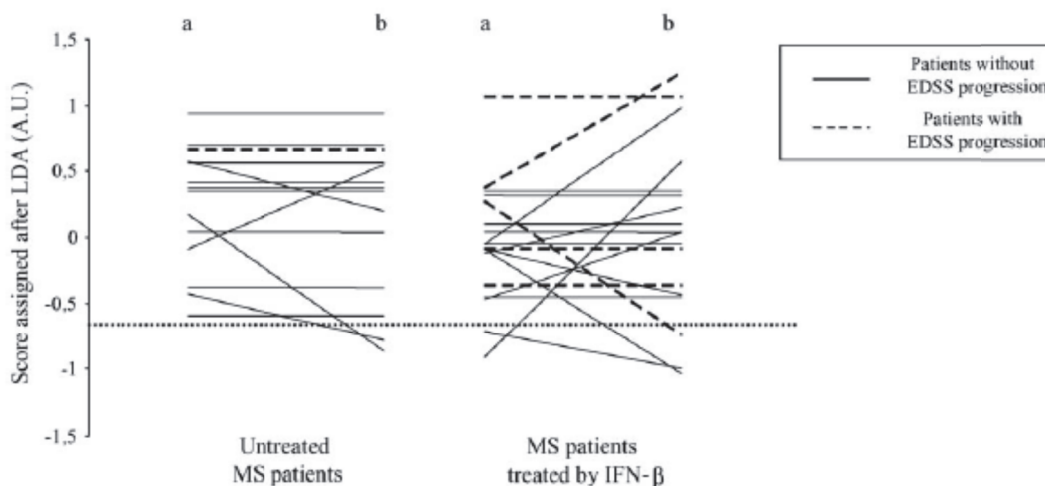


Figure 21 : Figure 4 extraite de l'article d'Almeras *et al.* (Almeras *et al.* 2005) illustrant l'évolution des profils de réactivité des patients souffrant d'une forme rémittente de SEP sur un an de suivi. Pour la définition du seuil utilisé dans cette figure, voir la figure 3 de l'article (Almeras *et al.* 2005) (Article 6).

Sur cette figure, on peut apprécier qu'au moins 15 sujets présentent des variations de profil après un an de suivi: le « score » défini par la LDA varie de façon mesurable pour au moins 4/15 individus dans le groupe « sans traitement », et 10/41 dans le groupe « traité ». Ainsi près de 27 % des patients présentent des variations de profils alors que l'analyse a été restreinte aux 13 spécificités jugées « discriminantes ». Il semble que pour certains patients (6/15), même si leur score d'évaluation clinique EDSS (*Expanded Disability Status Scale*) n'évolue pas, le profil de réactivité les « inscrit » plus nettement dans le « profil SEP ».

Les différentes études qui ont été menées par le laboratoire montrent des résultats jugés intéressants quant aux capacités d'analyse et d'interprétation de profils de réactivité étendues à un large panel d'antigènes extrait d'un tissu, cible d'un processus pathologique. Elles en soulignent aussi les limites liées essentiellement à la collecte de sérums chez les patients qui présentent, même au sein d'un groupe bien défini, des hétérogénéités : 1) âge de début de la maladie par rapport au prélèvement, 2) score de gravité de la maladie, 3) influence éventuelle des traitements... L'ensemble de ces « contraintes » nous ont rapidement amenés à envisager de transposer cette approche dans le modèle expérimental de la SEP, l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE).

3) Analyse des profils de réactivité des IgG sériques dans le modèle d'EAE

Notre laboratoire a pris contact avec les équipes des Dr Elisabeth Trifilieff (Institut de physique biologique (UPRES-A ULP-CNRS), Faculté de Médecine, F-67085 Strasbourg, France) et Jérôme Steibel (Laboratoire de Chimie Organique des Substances Naturelles, Unité Mixte de Recherche 7509, CNRS, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France) afin de transposer le modèle animal d'EAE induite par la PLP au sein de notre équipe. Nous avons dès lors proposé un protocole d'étude qui permettait d'évaluer de façon séquentielle le profil de réactivité sérique d'animaux exposés ou non aux conditions d'EAE afin d'en apprécier l'évolution éventuelle (**article 7**).



Journal of Neuroimmunology 179 (2006) 53–64

Journal of
Neuroimmunology

www.elsevier.com/locate/jneuroim

Diversified serum IgG response involving non-myelin CNS proteins during experimental autoimmune encephalomyelitis

Helene Zephir^{a,b,*}, Lionel Almeras^{a,1}, Mohamed El Behi^a, Patricia Dussart^a,
Jerome de Seze^b, Jerome Steibel^c, Elizabeth Trifileff^d, Sylvain Dubucquoi^a,
Jean-Paul Dessaint^a, Patrick Vermersch^b, Lionel Prin^a, Didier Lefranc^a

^a Laboratoire d'immunologie EA2686, Faculté de Médecine, 1, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

^b Service de Neurologie D, Hôpital Roger Salengro, 59037 Lille Cedex, France

^c Institut de physique biologique (UPRES-A ULP-CNRS), Faculté de Médecine, F-67085 Strasbourg, France

^d Laboratoire de Chimie Organique des Substances Naturelles, Unité Mixte de Recherche 7509, CNRS, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France

Received 9 February 2006; received in revised form 17 May 2006; accepted 19 June 2006

Abstract

We sequentially analyzed the serum IgG response against normal mouse brain during experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice injected with CFA, *Bordetella pertussis* toxin (BPT) and proteolipid protein 139–151 peptide, compared with mice that received CFA and BPT or were uninjected. Dynamic changes were observed from day 0 to day 28 in the 3 groups. Six highly discriminant antigenic bands ($\kappa=0.974$) were identified. Three non-myelin proteins were characterized (mitochondrial aconitase hydratase 2, phosphoglycerate mutase 1, brain specific pyruvate dehydrogenase). The IgG response against two of them was less frequent in EAE whereas it was associated with multiple sclerosis in our previous work.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: EAE; Autoimmunity; Neuroimmunology; Multiple sclerosis

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS), which is thought to be caused by autoaggressive immune responses against various myelin proteins, including myelin basic protein (MBP), proteolipid protein (PLP)

and myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG). Myelin protein reactive T-cell responses appear to participate actively in the progression of pathogenic events (Rajan et al., 1996; Hellings et al., 2002; Bischof et al., 2004; Croxford et al., 2005; McMahon et al., 2005). However, such specific T-cells are found at similar frequencies in healthy subjects and MS patients (Lovett-Racke et al., 1998; Viglietta et al., 2004). Thus, other immunological mechanisms must be involved in the initiation and progression of the disease (Lassmann and Ransohoff, 2004). Autoantibodies also seem to play a role, sometimes with harmful and sometimes with beneficial properties (Lyons et al., 1999; Archelos et al., 2000; Ziemssen and Ziemssen, 2005). In MS, the elevated levels of intrathecally synthesized IgG in the cerebrospinal fluid (CSF) are an important feature for the diagnosis even if their precise role is unknown. In addition, accumulation of B and plasma cells in the CSF (Colombo et al., 2000) and IgG

Abbreviations: BPT, *Bordetella pertussis* toxin; H, healthy; LDA, linear discriminant analysis; MBP, myelin basic protein; MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein; MS, multiple sclerosis; MW, molecular weight; PLP, proteolipid protein of the myelin; 2-D, two dimensional.

* Corresponding author. Laboratoire d'immunologie EA2686, Faculté de Médecine, 1, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France. Tel.: +33 3 20 62 69 77; fax: +33 3 20 62 68 93.

E-mail address: H-ZEPHIR@chm-lille.fr (H. Zephir).

¹ These authors contributed equally.

0165-5728/\$ - see front matter © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jneuroim.2006.06.016

4) Synthèse des résultats et discussion de l'article 7

Les travaux menés chez l'animal montrent qu'il est possible d'induire expérimentalement des modifications du répertoire auto-immun. Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes liées au contrôle de nombreux paramètres par le biais de l'utilisation de modèles animaux : la susceptibilité génétique, certains facteurs environnementaux, le facteur « temps » avec possibilité d'analyses séquentielles, l'introduction de molécules thérapeutiques, avec l'évaluation de leurs effets. La sensibilité de l'analyse séquentielle permet de mettre en évidence des modifications dynamiques du répertoire des Ac sériques avec la présence ou non de manifestations cliniques. Dans ce modèle expérimental, les modifications du répertoire des auto-anticorps les plus significatives apparaissent dans le modèle EAE où un événement pro-inflammatoire majeur a été induit. Si ces modifications apparaissent rapidement dès J7, elles ne sont toutefois pas homogènes. En revanche, à J28, alors que les manifestations cliniques sont apparues depuis plus de deux semaines, il devient possible de distinguer des profils singuliers distinguant les 3 groupes étudiés : souris saines, souris chez lesquelles seuls l'adjuvant de Freund et la toxine pertussique ont été injectés, et le groupe EAE. De façon notable, à J28, la LDA distingue le groupe EAE par la disparition de réactivités par rapport aux 2 autres groupes, et non par l'acquisition de néo-réactivités. Sur six réactivités discriminantes retenues par la LDA pour distinguer ces trois groupes étudiés, cinq caractérisent des groupes sans EAE. La disparition de ces spécificités d'Ac pourrait être associée à l'interaction avec leurs cibles exposées dans un contexte lésionnel et inflammatoire. « Piégées » dans le tissu, elles ne seraient plus détectables dans le sérum. De façon intéressante, il a également été noté que la majorité des profils de réactivité des souris qui succombent précocement après l'induction de l'EAE (à J14) se projettent en regard de ceux du groupe EAE (obtenu cette fois à J28 pour les souris survivantes). Ces données laissent envisager que des formes particulièrement évolutives acquièrent plus rapidement le profil spécifique du processus pathogène.

De façon complémentaire à ce travail, notre équipe a conduit une autre étude de modifications de profils de réactivité d'IgG sériques dans le modèle EAE, en évaluant les effets d'un traitement anti-inflammatoire (El Behi *et al.* 2007). Les résultats montrent, là encore, des modifications de profils de réactivités spécifiques du groupe étudié. Dans ce travail, l'intensité de l'EAE a pu être modulée par des traitements réduisant la composante inflammatoire associée à l'induction de la maladie. L'objectif de ce travail était de comparer les réactivités observées chez trois groupes de souris : un de souris « EAE » non traitées et deux autres groupes de souris EAE recevant soit la pyrilmamine, un antagoniste du récepteur de type 1 de l'histamine, soit le CV6209, un antagoniste du récepteur du Platelet Activating Factor (PAF). Ces molécules

sont connues pour atténuer les manifestations cliniques de l'EAE (retard d'apparition des signes cliniques, atténuation des poussées) (Pedotti *et al.* 2003). Trois réactivités discriminantes ont permis de distinguer les 3 groupes de souris étudiées à J28 : une réactivité associée au groupe EAE ne recevant pas de traitement et 2 autres, chez les souris dont l'intensité de l'EAE avait été réduite par le traitement anti-inflammatoire. Les profils de réactivité observés n'étaient toutefois pas superposables à ceux rapportés dans le premier travail (Zephir *et al.* 2006). Ces premiers résultats nous montrent l'intérêt potentiel de l'analyse de profils de réactivité pour apprécier différents modes évolutifs d'un processus pathologique. Ces résultats nous ont encouragés à envisager ce type d'étude chez l'homme.

5) Valeur prédictive des modifications de profils de réactivités.

Le diagnostic de la SEP repose actuellement sur des arguments cliniques et des données d'imagerie médicale qui traduisent une diffusion temporo-spatiale d'un processus démyélinisant inflammatoire. La notion de diffusion des lésions est essentielle au diagnostic mais constitue un élément de retard estimé au moins à 2 ans. Malgré la complexité des mécanismes en jeu dans un processus tel que l'EAE, les résultats obtenus dans ce modèle, laissent présager que les modifications de profils sont des phénomènes précoces, sensibles et mesurables puisque des variations mineures de l'évolution de la maladie se traduisent de façon détectable sur les profils de réactivité des IgG sériques. Nous avons alors formulé l'hypothèse que des modifications de profils de réactivité pouvaient précéder les manifestations cliniques de la SEP, ce qui permettrait d'envisager une prise en charge thérapeutique avant l'installation définitive de la maladie, et peut-être avant que les lésions ne soient irréversibles (risque moindre de handicap ?). Nous avons donc engagé l'étude chez un groupe de patients n'ayant présenté qu'un épisode clinique isolé (évocateur de SEP), et constituant un groupe appelé « CIS » (*Clinically Isolated Syndrome*). (cf. **article 8**)

Serum IgG repertoire in clinically isolated syndrome predicts multiple sclerosis

H Zéphir^{1,2}, D Lefranc², S Dubucquoi², J de Seze³, L Boron², L Prin² and P Vermersch^{1,2}

Objective We previously showed that serum IgG repertoires distinguished multiple sclerosis (MS) patients from healthy subjects and from patients with other inflammatory neurological diseases (OIND). We questioned whether the serum IgG repertoire of patients presenting a clinically isolated syndrome (CIS) could predict MS.

Methods The global IgG immune responses against brain antigens in sera from 50 CIS patients were evaluated by immunoblotting. The IgG reactivities were compared with those from MS sera ($n = 82$), healthy sera ($n = 27$), and sera from OIND ($n = 42$). A linear discriminant analysis (LDA) defined a score for each individual.

Results About 78% of scores obtained from CIS patients were located in the "MS area." During the follow-up (3.5 ± 1.3 years), 28 patients fulfilled the McDonald criteria for MS, 15 patients remained CIS, and 7 patients developed OIND. Among the patients with an LDA score in the "MS area," 61.5% converted to MS.

Discussion Our results suggest that a pathological distortion of the self-reactive IgG repertoire occurs early so that immunomodulating treatment should be started as early as possible; they also highlight the early involvement of B cells in the physiopathological process in MS. *Multiple Sclerosis* 2009; 00: 1–8. <http://msj.sagepub.com>

Key words: B cells; biomarker; CIS; IgG; immunology; multiple sclerosis

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an evolving chronic demyelinating and inflammatory disease of the central nervous system (CNS) in young adults. It is conventionally regarded as an immune-mediated inflammatory disorder, without any specific biological marker that could help make an early diagnosis. A clinically isolated syndrome (CIS) is a monophasic clinical event involving the CNS which may or may not lead to MS.

Conversion to clinically definite MS (CDMS) remains unpredictable, but it is significantly linked to the presence of lesions detectable on magnetic resonance imaging (MRI) and to the characterization of oligoclonal bands in cerebrospinal fluid (CSF) analysis.

Previous longitudinal studies of patients with acute CIS revealed that the number of brain lesions on T2-weighted MRI scans, both at the time of the CIS

and subsequently, were predictive of the occurrence of CDMS and of the degree of neurological disability [1–3]. Recently, it was suggested that the presence of oligoclonal IgG bands in CSF is highly specific and apparently more sensitive than MRI criteria for early prediction of conversion to CDMS [4]. Since the finding of elevated immunoglobulins, mainly involving the IgG1 and IgG3 isotypes, in the CSF of more than 90% of MS patients [5,6], detection of oligoclonal Ig has been an important diagnostic marker in MS [7–9], whereas the antigen specificities of oligoclonal Ig bands have yet to be defined in MS. Till date, routine demonstrative biological testing has been limited to the detection of IgG oligoclonal bands in CSF, which is found in nearly 90% of patients [10].

The role of an antigen-driven immune response in the initiation and the development of MS is still unclear. Many studies have tried to identify auto-antibodies directed against various myelin and

¹Pôle Neurologique, Hôpital Roger Salengro, CHRU de Lille, Lille, France

²Laboratoire d'immunologie, EA 2686, Université de Lille II, Lille, France

³Service de Neurologie, Hôpitaux universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

Correspondence to: Dr Hélène Zéphir, Clinique Neurologique, Hôpital Roger Salengro, CHRU de Lille, 59037 Lille cedex, France. Email: h-zephir@chru-lille.fr

Received 1 January 2009; accepted 1 January 2009

6) Synthèse des résultats et discussion de l'article 8

Pour cette étude, le travail a été mené après la collecte des sérums de 50 patients souffrant de CIS, et les profils de réactivité des IgG sériques de ce groupe a été analysé sur le même substrat que celui de l'étude menée par Lefranc *et al.* (Lefranc *et al.* 2004). Les profils ont donc été comparés à ceux obtenus chez les groupes de patients souffrant de SEP (3 formes cliniques RRMS : forme rémittente ; SPMS : forme secondairement progressive et PPMS : forme progressive primaire) mais aussi d'autres atteintes neurologiques à composante auto-immune (NL et NGS appelés « OIND » dans l'article) et les sujets sains.

Alors que ces patients ne sont pas encore classés comme atteints de SEP selon les critères cliniques de diagnostic de Mc Donald (McDonald *et al.* 2001) et les critères de Barkoff en ce qui concerne les données de l'imagerie (Barkhof *et al.* 1997), leurs profils de réactivité se projettent en regard de ceux observés pour les patients dont le diagnostic de SEP est établi. Ces résultats illustrent donc que les modifications des profils de réactivité permettent de poser le diagnostic d'un processus pathologique plusieurs années (ici en moyenne 3 ans et demi) avant les critères usuellement utilisés en pratique médicale. De façon intéressante, les profils de réactivité des patients CIS se projettent majoritairement (90 % des cas) en regard de ceux des patients présentant des formes les plus inflammatoires de la SEP, c'est-à-dire les formes RRMS et SPMS. Ils se distinguent donc nettement des profils des patients présentant une forme progressive primaire de SEP (PPMS). La forme rémittente de SEP constitue l'évolution « naturelle » des patients CIS. Cette proximité de distribution des profils entre CIS et RRMS semble encore un élément confortant la pertinence de cette méthode d'analyse. La similitude des profils de réactivité entre CIS et RRMS suggère que le processus lésionnel des patients n'ayant présenté qu'un seul épisode clinique, est déjà bien inscrit dans les processus physiopathologiques. Si la réversibilité des lésions du système nerveux central au stade de CIS reste hypothétique, on peut néanmoins formuler l'hypothèse que le processus d'extension de la maladie peut être freiné grâce à une prise en charge thérapeutique plus précoce. Cette interrogation nous encourage à proposer des explorations complémentaires qui seront discutées dans les perspectives du dernier chapitre.

7) Quelle sont les parts respectives des répertoires naturel et adaptif qui se modifient au cours des pathologies auto-immunes ?

Dans notre laboratoire, nous avons jusqu'à présent analysé les modifications du répertoire dépendantes de l'isotype IgG. Cette restriction pourrait négliger la part prise par l'autoréactivité naturelle. Si on décrit des IgG appartenant au répertoire naturel des Ac (Avrameas *et al.* 1995; Tiller *et al.* 2007), l'isotype IgM serait plus représentatif de ce répertoire, qui

impliquerait d'avantage des réponses immunes T indépendantes. Pour mieux appréhender l'implication des réponses T dépendante ou T indépendante dans la mise en forme du répertoire des Ac sérique autoréactif, nous avons étudié un modèle exemplaire de pathologie auto-immune T dépendante le syndrome APECED. (cf. **article 9, soumis**).

Article 9

7) Synthèse des résultats et discussion de l'article 9

La poly-endocrinopathie autoimmune de type 1 (APS 1) ou syndrome APECED (*Autoimmune Poly-Endocrinopathy Exodermal Dystrophy*) présente différentes manifestations cliniques auto-immunes ayant surtout un retentissement endocrinien (hypoparathyroïdie, insuffisances surrénaliennes, pancréatique, hépatique, gonadique, thyroïdienne...) associées à une infection fréquente, la candidose cutanéomuqueuse. Sa physiopathologie est attribuée au dysfonctionnement d'un gène unique, *AIRE*, impliqué dans les processus de présentation d'auto-antigènes ectopiques (anomalie de sélection clonale des lymphocytes T autoréactifs). Nous avons étudié les réactivités sériques IgG et IgM de 14 patients souffrant d'APECED, et comparé ces profils de réactivité à ceux observés soit chez des patients souffrant d'autres pathologies auto-immunes à composante endocrinienne (thyroïdopathies, diabète, insuffisance surrénale...) soit chez des sujets sains. Les réactivités des IgG et IgM ont été analysées sur des extraits protéiques de surrénale et de pancréas. Ces organes présentaient des profils de réactivités les plus riches comparés à ceux observés avec le foie, la thyroïde, les parathyroïdes ou les ovaires. Si des différences significatives de fréquence de réactivité ont pu être relevées chez les patients souffrant d'APECED par rapport aux autres groupes, la LDA n'a pas apporté ici d'éléments complémentaires d'information. Ceci suggère l'absence de combinaison de réactivités propres à chacun des groupes étudiés, sur les organes testés. Les antigènes identifiés comme cibles de réactivité discriminantes sont une nouvelle fois majoritairement des protéines ubiquitaires. Toutefois, des protéines spécifiques d'organe comme la lipase ou l'amylase ont aussi été caractérisées. Ces identifications, après analyse sans *a priori*, corroborent des études antérieures utilisant des cibles spécifiques (Perheentupa 2006). Dans le groupe APECED, certaines reconnaissances antigéniques étaient associées exclusivement soit à l'isotype IgG, soit à l'isotype IgM. C'est cette réactivité discriminante spécifique pour l'IgM qui nous a permis d'évoquer des perturbations T indépendantes du répertoire autoréactif (répertoire naturel ?) dans une pathologie où les anomalies majeures semblaient exclusivement T dépendantes. Ces résultats inattendus sont discutés dans l'article soumis et dans le dernier chapitre.

DISCUSSION GÉNÉRALE
PERSPECTIVES

Dans le chapitre précédent nous avons déjà envisagé des points de discussion dont certains étaient complémentaires de ceux évoqués dans les publications. Nous souhaitons ici aborder une problématique plus générale sur la valeur et surtout sur les limites de l'approche immunoprotéomique conventionnelle. Deux questions essentielles apparaissent à l'issue de ces premiers travaux :

- Comment optimiser les conditions de ciblage des antigènes d'intérêt afin de disposer pour le futur de sondes diagnostiques performantes ? Nous développerons les perspectives de nouvelles approches méthodologiques que nous décrirons avec leurs premiers résultats. Nous verrons ainsi, étape par étape, les différents écueils rencontrés et les alternatives proposées.
- Comment intégrer les notions de plasticité du répertoire autoréactif et situer la place du répertoire naturel et/ ou adaptatif pour mieux appréhender la signification des profils singuliers d'autoréactivité dans un contexte pathologique.

Comment optimiser les conditions de ciblage des antigènes d'intérêt afin de disposer de sondes diagnostiques performantes ? Dans un premier temps, nous allons donc discuter des valeurs et des limites de l'analyse par immunoprotéomique conventionnelle pour le ciblage d'Ag d'intérêt.

Les études qui ont été menées par le laboratoire pour la caractérisation de réactivités des Ac spécifiquement associées aux maladies auto-immunes (de Seze *et al.* 2001; Dubucquoi *et al.* 2004; de Seze *et al.* 2003; de Seze *et al.* 2004) ont mis en exergue certaines limites. Les méthodes conventionnelles de diagnostic biologique s'attachent en effet à caractériser le plus souvent une réactivité unique, ou quelques réactivités restreintes jugées spécifiques d'une population de malades. Ces approches qui font appel aux techniques d'immunofluorescence, d'immunodosages à réactifs marqués, d'immunoprécipitation, ou d'immuno-empreinte ont fait effectivement la preuve de leur intérêt puisqu'elles ont permis de définir un grand nombre de réactivités aujourd'hui exploitées en clinique (auto-immunité, allergie). À titre d'exemple, dans le domaine des neuropathies, une cible spécifique d'Ac a été récemment identifiée par immunofluorescence indirecte (anti-NMO-IgG) au cours de la myélite optique ou syndrome de Devic (Lennon *et al.* 2004). La « rentabilité » (sensibilité, spécificité, valeurs prédictives) de telles approches est toutefois faible puisque leurs performances diagnostiques sont souvent modestes. Les méthodes aujourd'hui disponibles de diagnostic biologique des maladies auto-immunes dont les rapports de vraisemblance positif et négatif sont jugés optimaux (supérieur à 10 et inférieur à 0,1 respectivement) sont rares en pratique quotidienne. De nouvelles approches méthodologiques pourraient utilement être employées à la mise

en évidence de nouvelles spécificités d'Ac précieuses pour le diagnostic et le pronostic (L. H. Beck *et al.* 2009). Dès le début des années 2000, nous avons mis au point une approche d'évaluation de la réactivité sans *a priori* des Ac sériques vis-à-vis de différents substrats tissulaires combinant l'emploi d'extraits protéiques de tissus sains et lésés. Nous avons adapté et standardisé une technique d'immuno-empreinte et un traitement statistique des données préalablement décrits (Mouthon *et al.* 1995; Nobrega *et al.* 1993; Lacroix-Desmazes *et al.* 1999). Cette approche repose sur le postulat qu'un répertoire de peptides du « soi exprimé » dans un tissu va marquer de son empreinte le répertoire immunologique et l'homéostasie du système immunitaire. Il existe donc une étroite interdépendance entre ces deux répertoires et toute altération de l'un pèsera sur l'autre. Les modifications du répertoire des Ac peuvent être détectées par les approches techniques conventionnelles, à condition que celles-ci offrent une évaluation qui ne soit pas trop restrictive. L'immuno-empreinte permet ce type d'analyse « élargie » des réactivités des anticorps sériques présentes chez un individu. Le nom *d'empreinte* que nous retenons pour décrire les profils de réactivités nous paraît approprié. Il s'agit ici d'une analyse intégrative qui prend en compte à la fois les modalités d'expression du « soi » dans un tissu (répertoire de peptides du « soi présenté ») et l'aptitude du système immunitaire à le reconnaître (répertoire immunitaire ou « soi reconnu »). Il s'agit d'une empreinte singulière qui se traduit par une extrême **hétérogénéité interindividuelle** des profils de réactivité. La variabilité du répertoire de peptides du « soi » exprimé est en partie liée au polymorphisme d'expression des gènes. À titre d'exemple représentatif, le « soi présenté » est dépendant du polymorphisme du CMH. De son côté, la variabilité du répertoire immunitaire est en partie liée aux modalités singulières de la construction du répertoire des Ac naturels (rôle important de l'autoréactivité, de la polyréactivité, incidence de l'environnement) et des Ac adaptatifs (rôle moindre, mais non négligeable de l'autoréactivité contrôlée, importance de l'héritage antigénique). Ces variabilités sont autant d'éléments qui expliquent cette extrême hétérogénéité interindividuelle. Malgré celle-ci, des **communautés de réactivités** sont observées chez le sujet sain. Certains auteurs ont mis l'accent sur le ciblage privilégié d'antigènes ubiquitaires constitutifs de structures subcellulaires (exemple des protéines du cytosquelette) et d'antigènes intracellulaires (exemple des protéines chaperonnes telles qu'HSP ou des enzymes impliquées dans les processus de modifications post traductionnelles) (Servettaz *et al.* 2008). Des études complémentaires sont nécessaires pour mieux définir ces cibles communes de réactivité qui présentent certaines analogies avec les caractères d'une spécificité isotypique et qui semblent jouer un rôle déterminant dans la sélection et l'entretien du répertoire autoréactif. On peut formuler l'hypothèse que

l'intégrité de l'organisme est préservée si un équilibre s'instaure entre le répertoire de peptides du « soi exprimé » et le répertoire immunitaire (Stahl *et al.* 2000b). En pathologie, nous observons également, au sein d'une hétérogénéité interindividuelle, des réactivités partagées par un groupe d'individus, qui constituent, nous l'avons vu, de véritables biomarqueurs de maladie. L'une des hypothèses que nous avons formulée, est que la nouvelle empreinte propre à un processus pathologique pourrait témoigner de dérèglements des deux répertoires (peptidique et immunitaire) liés à des événements exogènes ou endogènes mettant en action des systèmes d'alerte et de danger que partagent les individus au sein d'une même espèce (implication de l'immunité innée et de ces récepteurs invariants ?). Malgré les atouts de cette étude d'un répertoire élargi, que nous avons développés précédemment, nous allons insister ici plus particulièrement sur certaines de ces limites.

L'analyse des profils de réactivité, combinant l'immuno-empreinte monodimensionnelle (IEMD) et le traitement statistique par analyse linéaire discriminante (LDA), mise en œuvre au laboratoire, offre, nous l'avons vu, une approche performante de discrimination de processus pathologiques permettant même de distinguer leurs formes cliniques (Lefranc *et al.* 2004; Lefranc *et al.* 2007). Dans la SEP, les modifications qu'elle objective peuvent même être prédictives de l'évolution clinique ultérieure avec une anticipation moyenne de 3 ans sur les méthodes diagnostiques usuelles (Zéphir *et al.* 2009). Enfin, même si la transposition des résultats de l'animal à l'homme reste actuellement spéculative, les premières données recueillies laissent envisager qu'elles pourraient aider à distinguer les individus qui répondent ou non favorablement aux traitements des pathologies dysimmunitaires (El Behi *et al.* 2007). Dans cette approche, deux éléments méthodologiques se distinguent de celles développées antérieurement (Stahl *et al.* 2000b). En effet, nous n'avons pas introduit d'appréciation quantitative des profils de réactivités. Notre évaluation s'est restreinte à l'appréciation de la **présence** ou de l'**absence** de bandes de réactivités dirigées contre tel ou tel Ag, révélées par western blot. Ce choix peut enlever une dimension importante de discrimination entre différents groupes d'individus. Notre analyse s'est aussi restreinte, dans un premier temps, à l'étude du profil de réponse des Ac de **classe IgG sans étape préalable de purification de cet isotype**. L'évaluation du profil de réactivités des IgG apparaît être un meilleur reflet d'un processus pathologique T dépendant, fréquent dans les MAI, notamment dans la SEP. Selon notre expérience, la purification des IgG sur colonne d'affinité passe par une étape d'élution en conditions stringentes (pH acide) qui pourraient modifier la structure du paratope et altérer ainsi la spécificité de reconnaissance des Ac (Khan *et al.* 2012). Néanmoins ces conditions de stringence seraient rencontrées *in vivo* (Dimitrov *et al.* 2008). Ces

conditions particulières de purification des IgG pourraient aussi avoir d'utiles débouchés thérapeutiques (Djoumerska-Alexieva *et al.* 2010). Pour l'étude du répertoire des Ac sériques, cette purification limiterait le possible masquage de paratopes par d'autres immunoglobulines sériques notamment les IgM (Hurez *et al.* 1997). Plus récemment, nous avons élargi notre étude avec l'évaluation parallèle du répertoire des auto-anticorps de classe IgG et de classe IgM. Cette étude réalisée dans un modèle d'étude exemplaire que nous avons précédemment décrit (syndrome APECED), nous a instruits sur la possible T-indépendance des modifications du répertoire autoréactif. Ces éléments seront développés ultérieurement.

Nous souhaitons aborder ici les raisons et les contraintes des différents choix méthodologiques retenus dans notre protocole. Le **choix du substrat** et la « qualité » du tissu-cible testé constituent un premier élément à prendre en compte. Dans le cadre des neuropathies, une première analyse effectuée sur différents tissus-cibles a mis l'accent sur la richesse particulière des réactivités observées avec des extraits protéiques du tissu cérébral. Nous avons même observé des variations en fonction des différentes aires testées. L'intérêt porté sur l'aire 10 de Brodmann, est lié à la plus grande reproductibilité des tests quel que soit l'âge du donneur. Un travail mené au laboratoire à partir de membranes synoviales de patients souffrant de PR, a montré qu'en fonction du siège de la synovectomie, la richesse des profils de réactivités pouvait varier (Dubucquoi *et al.* article en préparation). Dans une autre analyse, l'étude comparée de profils de réactivités des Ac sériques chez des patients souffrant de différentes pathologies associées à l'émergence d'une éosinophilie sanguine (syndromes d'hyperéosinophilie essentielle (SHE) de formes myéloïde ou lymphoïde ou secondaires à des pathologies dysimmunitaires comme la pemphigoïde bulleuse ou le syndrome de Churg et Strauss) montre qu'il est possible de distinguer les profils de réactivité des sujets appartenant aux différents groupes à condition de travailler sur un extrait protéique issu d'éosinophiles de patients et non d'une lignée cellulaire qui ne présente qu'une similitude lointaine avec les éosinophiles circulants (Jean Emmanuel Kahn, Virginie Dutoit-Lefèvre, communication personnelle). Il est donc probable qu'on ne puisse pas transposer systématiquement l'analyse des profils de réactivités à n'importe quel substrat, ou mélange de protéines recombinantes, qui ne présenteraient pas de pertinence avec la maladie étudiée. Ces notions justifient donc un nécessaire effort de standardisation préalable si celle-ci est possible (facteurs limitants : sources cellulaires ou tissulaires). D'autres facteurs limitants dans l'interprétation des profils sont à considérer : l'étude que nous avons menée s'est effectivement restreinte au repérage d'épitopes linéaires et non conformationnels ; au degré d'expression des épitopes « pertinents » au sein des tissus testés, à la solubilisation des protéines antigéniques. Une autre raison a limité la

diffusion de notre approche à l'étude d'un plus large panel de pathologies : le **repérage exhaustif** de l'ensemble des réactivités observées à partir des différents profils sériques obtenus pour les patients. Rappelons que généralement, pour un individu, le profil se compose en moyenne de 5 à plus de 30 réactivités différentes, et une étude cumulative réalisée pour l'ensemble des individus, montre qu'il est possible de révéler plus de 150 bandes de réactivités différentes (Lefranc et al. 2004). Même si ce travail de repérage est aidé par l'utilisation de différents logiciels (*Diversity Database 2.2* (BioRad) puis *Phoretix 1D* (TotalLab)), cette étape reste extrêmement fastidieuse et longue. Elle est néanmoins indispensable à la démarche statistique. Nous développons dès à présent de nouvelles pistes pour faciliter les analyses d'images (différence signal/ bruit) et le traitement des données. Enfin, une limite majeure à cette approche reste **la difficulté d'identification** des Ag, cibles des réactivités discriminantes. L'optimisation de cette étape d'identification apporterait une avancée importante tant en termes de mise au point de tests diagnostiques qu'en termes de compréhension physiopathologique des pathologies étudiées. Elle nous a semblé un préalable indispensable au développement et à la valorisation de l'approche. C'est dans cette perspective que les techniques d'immunoprotéomique bidimensionnelle ont été mises au point, avec leurs avantages et aussi avec leurs limites que nous souhaitons aborder largement, afin de préciser, en perspectives, les différentes alternatives proposées.

L'électrophorèse bidimensionnelle permet de séparer les protéines d'un extrait tissulaire selon leur point isoélectrique et selon leur masse moléculaire. Couplée au western blot, elle constitue une approche d'immunoprotéomique bidimensionnelle « conventionnelle » (« IPBDC ») et offre une possibilité accrue de repérer les antigènes cibles de réactivités spécifiques. On considère que plus de 1 000 protéines (comprenant leurs isoformes) peuvent être distinguées par cette approche. L'IPBDC est largement utilisée pour l'identification de cible de réactivités jugées spécifiques notamment en cancérologie ou en infectiologie (Brichory *et al.* 2001; Sun *et al.* 2012). Dès 2004 cette approche a été mise en place au laboratoire et a conduit à l'identification de nouvelles cibles de réactivités considérées comme spécifiquement associées à des maladies à composantes auto-immunes comme la SEP (Almeras *et al.* 2005). Depuis cette date de nombreux travaux ont été menés dans d'autres domaines pathologiques comme la PR (Kinloch *et al.* 2005), la sclérodémie (Bussone et al. 2011; Régent et al. 2011; Dib et al. 2012). De manière générale, toutes les cibles antigéniques identifiées appartiennent à la catégorie des antigènes intracellulaires ubiquitaires, déjà évoqués. À partir de 2007, ces résultats nous ont amenés à nous interroger sur la pertinence des cibles que toutes les équipes identifiaient, comme la nôtre, quels que soient les

domaines de pathologie auxquels elles s'intéressaient. En raison de ces données, un regard critique sur la méthodologie de l'IPBDC s'imposait et nous obligeait à trouver de nouvelles alternatives. Avant de les décrire, nous souhaitons revenir sur les points critiques qui limitent l'emploi de l'IPBDC conventionnelle pour l'identification précise des cibles de réactivités discriminantes.

Pour la réalisation de l'IPBDC, une des premières étapes vise à obtenir un gel d'électrophorèse bidimensionnelle qui permettra de repérer les antigènes cibles de réactivités discriminantes préalablement définies par l'approche en 1D. Les protéines sont repérées après coloration par le bleu de Coomassie colloïdal (BCC). Les réactivités immunitaires du sérum étudié ne sont repérées que lors de la seconde étape, sur une membrane de PVDF, après transfert des protéines d'un second gel dans lequel on a fait migrer le même extrait protéique. Ce sont donc des gels différents qui servent à la coloration et au transfert. Le repérage des spots de réactivités des IgG sériques de la membrane et la coïncidence avec les protéines du gel se fait par superposition de la membrane et du gel. Cette démarche est suivie du prélèvement de la protéine d'intérêt en vue de l'analyse par spectrométrie de masse. Même si l'étape de superposition du gel et de la membrane est aidée d'un logiciel (*PDQuest* (BioRad)), il s'agit d'une approche « opérateur dépendant », donc subjective et sujette à un certain nombre de biais. Ainsi, nous avons particulièrement repéré trois biais qui peuvent affecter le ciblage des protéines d'intérêt pour l'analyse en spectrométrie de masse. Le premier biais est lié à l'étape de coloration des protéines, le deuxième à l'expression « aberrante » de certaines protéines du substrat, le troisième aux distorsions des gels.

Le premier biais est lié à la coloration par le BCC des protéines qui est particulièrement moins sensible que le repérage des antigènes par les Ac sériques (ou commerciaux) au sein la membrane de PVDF. Il arrive donc qu'un signal soit observé sur la membrane de l'immuno-empreinte alors qu'il est impossible de repérer une protéine correspondante dans le gel coloré par le BCC. La raison tient au fait que la concentration de la protéine en question dans le gel peut être insuffisante pour conduire à son repérage par la coloration. Nous avons pu constater que l'opérateur peut négliger les réactivités discriminantes qui ne conduisent pas au repérage de protéines colorées sous jacentes.

Le second biais est lié à l'expression préférentielle de certaines protéines. Un travail intéressant publié en 2008 rapporte le « hit parade » des protéines majoritairement surexprimées par les cellules stressées au cours d'un quelconque événement (ischémique, métabolique, inflammatoire, auto-immun, infectieux...) (Petra \acute{c} et al. 2008). Les auteurs se sont proposés d'identifier par méta-analyse les protéines dont

l'expression était appréciée par les outils de protéomique et qui étaient rapportées comme faisant l'objet d'une expression différentielle. Cette analyse, selon les propos de l'article, laisse une impression de « déjà vu ». Ils rapportent ainsi un « top 15 » des protéines les plus identifiées parmi lesquelles : les protéines du cytosquelette, les protéines anti-oxydantes (HSP, protéine disulfide isomérase, Gluthation S- transférase), les HnRNP (*Heterogeneous ribonucleoprotein particle subunits*) et l'alpha-énolase. Il s'agit majoritairement de protéines solubles présentes à haute concentration dans les cellules. Certaines d'entre elles seraient des capteurs qualifiés « d'universels », parce qu'elles subiraient des modifications d'expression qui pourraient traduire les altérations du métabolisme cellulaire. Dans le cadre de l'hypothèse déjà formulée selon laquelle le système immunitaire réagirait aux modifications de concentrations d'un antigène, avec un retentissement sur le répertoire des Ac exprimés, cet article offre une perspective nouvelle quant à l'identification des protéines repérées par tous, comme cibles de réactivités discriminantes entre différents groupes d'individus. Ces réactivités pourraient finalement ne traduire que le fait que le système immunitaire ne réagit qu'aux modifications de concentrations des protéines qui reflètent le stress cellulaire (quelle que soit son origine). Ces réactivités seraient bien discriminantes, mais leur relevance physiopathologique, modeste. Une publication récente corrobore ces données (Rabilloud *et al.* 2011).

Un troisième biais est lié aux distorsions de gels. Les conditions de réalisation technique des gels de séparation protéique et de l'immuno-empreinte conduisent à des déformations des gels et des membranes après transfert des protéines. Nous rappelons que les gels produits pour la coloration au BCC et ceux qui serviront aux immuno-empreintes sont indépendants, même s'ils sont produits avec un soin maximum de standardisation. Malgré les précautions, il apparaît qu'il persiste une source de biais dans le cadre de la mise en place de l'IPBDC. En effet, les gels et les membranes sont l'objet de déformations répétées (cycles de dilatation et de contractions inhérentes aux différentes étapes) et surtout générées de façon indépendante, de sorte que la superposition des signaux de réactivité Ac avec celle des protéines jugées comme leurs cibles antigéniques putatives devient délicate. Nous avons pu objectiver que cette étape peut être à l'origine d'erreurs d'estimation majeure de la protéine à prélever dans le gel coloré, en vue de son identification par spectrométrie de masse. Ce décalage a pu être estimé à plus de 5 millimètres pour certaines protéines, avec les conséquences qu'on imagine sur la pertinence des protéines prélevées et pourtant jugées comme cibles des réactivités discriminantes.

L'identification des biais de prélèvements opérateur-dépendant liés aux choix des protéines à « spotter » et ceux liés aux distorsions des gels

d'électrophorèse ont conduit à l'impérative nécessité de développer de nouvelles approches. Instruits de l'expérience acquise grâce à la technique développée au laboratoire de la 2D DIGE (Two Dimensional Difference Gel Electrophoresis) (Kahn *et al.* 2011), nous nous sommes proposés d'adapter la révélation des signaux de l'immunoprotéomique bidimensionnelle par l'utilisation de traceurs fluorescents. Nous allons développer les performances de cette nouvelle approche en décrivant étape par étape les différents écueils rencontrés.

La 2D DIGE est une méthode permettant de comparer l'expression protéique différentielle entre deux substrats, après séparation par électrophorèse bidimensionnelle des protéines. Ces différents substrats sont marqués par des fluorochromes différents présentant des longueurs d'onde d'excitation et d'émission distinctes. Ainsi, deux extraits protéiques, marqués par des fluorochromes différents, peuvent être mélangés et séparément identifiés au sein d'un même gel. L'acquisition des images aux longueurs d'ondes spécifiques des fluorochromes sur un scanner à fluorescence (*Typhoon, GE Healthcare*), permet la révélation des cartes protéomiques de chacun des substrats. Cette méthodologie permet la superposition de cartes protéomiques en s'affranchissant des déformations de gels inhérentes à la réalisation de gels 2D classiques. La 2D-DIGE est, par ailleurs, une méthode quantitative qui définit les sous- ou surexpressions protéiques au sein d'une entité étudiée. Pour cela, les cartes protéomiques des différentes conditions testées, sont toujours superposées à une carte de référence (carte protéomique globale contenant toutes les entités protéiques comparées), elle-même marquée par un troisième fluorophore. Cette carte de référence est présente sur chacun des gels et permet de définir des ratios d'expression de chaque protéine sur chaque gel puis une normalisation de ces ratios entre les différents gels, pour enfin déterminer, par une analyse statistique, les protéines sous ou surexprimées dans une condition donnée. L'analyse des gels 2D-DIGE est réalisée par un logiciel d'analyse d'image dédié (*Progenesis SameSpots, Non Linear Dynamics*). Le détail méthodologique de cette approche peut être trouvé dans l'article publié par notre équipe (Kahn *et al.* 2011). Après avoir développé cette méthode au laboratoire, nous nous sommes proposés de l'adapter pour l'immunoprotéomique bidimensionnelle que l'on nommera IPBDF pour « immunoprotéomique bidimensionnelle en fluorescence ». Le principe méthodologique est globalement le même que celui de la 2D-DIGE (V Dutoit-Lefèvre *et al.*, article en préparation) et le résultat résumé dans la figure 23 (annexe 1). Son intérêt essentiel repose sur la garantie de superposition exacte qu'elle apporte entre les cibles de réactivité et les protéines présentes dans le gel.

Pour évaluer les performances de cette méthode hautement résolutive, il était nécessaire, dans une ultime étape, de la valider, en identifiant des

antigènes à partir de sondes spécifiques (Ac commerciaux ou auto-anticorps sériques déjà caractérisés dans le cadre de pathologies auto-immunes). Dans cette perspective, nous avons utilisé des Ac anti-SS-A / Ro 52 testés les cellules HEp2 en IPBDF. De façon surprenante, aucune des cibles repérées par l'Ac et identifiées par spectrométrie de masse ne correspond à l'antigène SS-A/Ro 52 (cf. figure 24, annexe 2). Devant ce résultat inattendu, nous avons dû discuter de chacun des éléments susceptibles d'expliquer une telle discordance.

Un premier écueil, lié à la sensibilité de l'approche MALDI-TOF-TOF, a été évoqué à la suite d'un défaut de ciblage d'un Ag par un Ac polyclonal monospécifique. La collaboration engagée avec Philippe Chafey (Plateforme de Protéomique de l'institut Cochin) et Cédric Broussard (Plateforme de Protéomique de l'Université Paris-Descartes (3P5)) a montré l'avantage à utiliser une méthode plus sensible de spectrométrie de masse telle que la méthode « ORBITRAP » en vue de l'identification potentielle de cibles antigéniques pertinentes associées aux prélèvements du gel coloré par le BCC. Il apparaît en effet que malgré le pouvoir de séparation de l'électrophorèse bidimensionnelle, plusieurs protéines peuvent co-migrer dans une même région du gel parce qu'elles présentent des points isoélectriques et des masses moléculaires proches, en tout cas non différenciées par les méthodes utilisées au laboratoire. Lors du « spotage », plusieurs protéines peuvent donc être prélevées dans le même temps. Or le MALDI TOF-TOF n'identifie que la (ou les « deux ou trois ») protéine(s) majoritaire(s) de ce spot, là où la méthode ORBITRAP peut en identifier jusqu'à vingt. Ces résultats indiquent que l'absence d'identification d'une cible pertinente peut être liée au manque de sensibilité de la méthode de spectrométrie de masse. Celle-ci peut même conduire à des résultats erronés.

Un deuxième écueil est lié à la spécificité de la réactivité des Ac (la question des réactivités croisées). Malgré l'utilisation de méthodes sensibles de spectrométrie de masse (ORBITRAP) utilisées pour la caractérisation des antigènes cibles nous n'avons pas pu détecter dans le gel coloré au BCC, l'antigène SS-A/Ro 52. En revanche, l'IPBDF a révélé plusieurs spots de réactivités (figure 24 ; annexe 2). On relève jusqu'à 6 spots ciblés par le sérum commercial et plus de 20 spots avec le sérum d'une patiente qui présente des Ac anti-SS-A (52 et 60), anti-SS-B, et mitochondries de type M2 (identifiés par les méthodes conventionnelles du laboratoire). Après identification des protéines cibles de la réactivité sérique de la patiente, l'utilisation de logiciels de comparaison de séquences peptidiques tels que Basic Local Alignment Search Tools (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), s'est révélée très instructive (figure 25 ; annexe 3). Ils montrent que 6 auto-antigènes, ciblés par les sondes « spécifiques » prélevés dans le gel au niveau de la zone de poids

moléculaire et de pl attendus, présentent des similitudes de séquences avec l'antigène SS-A/Ro 52. Soixante dix pourcents des épitopes sont similaires entre ces six protéines et l'antigène SS-A/Ro 52. Si on étend l'analyse à 10 protéines présentant des similitudes de séquence, c'est 90 % de l'antigène SS-A/Ro 52 kDa qui présente des similitudes avec ces 10 auto-antigènes. Nous pensons que ces similitudes de séquences sont autant d'épitopes partagés (ou « signature peptidique ») qui peuvent être à l'origine de réactions croisées : des Ac anti-SS-A/Ro 52 kDa peuvent réagir avec l'alpha-énolase (par exemple), et inversement. Des similitudes de séquences peuvent aussi être observées entre auto- et exo-antigènes : la butyrophiline fréquemment rencontrée dans l'environnement (protéine transmembranaire de la membrane des globules gras du lait des mammifères) présente une séquence de plus de 200 AAs ayant une forte homologie de séquence avec SS-A/Ro 52 kDa. Ces données de réactivités croisées ont déjà été rapportées dans la littérature (Kijanka *et al.* 2009) et illustrent, la très faible spécificité des Ac anti-SS-A/Ro 52 / TRIM-21.

Une démarche comparable a été menée dans le cadre d'un Master 2 (année 2012), au sein de notre laboratoire, en vue d'identifier de nouvelles spécificités d'auto-anticorps associées à la sclérodémie. Nous avons testé la capacité de l'IPBDF à révéler les cibles attendues des spécificités anti-topo-isomérase 1 et anti-centromères A et B. Les résultats sont superposables à ceux observés avec les Ac a- SS-A/Ro 52 , c'est-à-dire que malgré les améliorations apportées à la fois par l'IPBDF et l'ORBITRAP pour l'identification par spectrométrie de masse des cibles antigéniques, nous n'avons pas pu identifier les cibles attendues dans le gel. En revanche, nous avons pu constater qu'au moins trois des protéines caractérisées par spectrométrie de masse présentaient des similitudes de séquence avec la topo-isomérase de type 1 (Scl-70, séquence 685-765), cible originale des Ac (commerciaux) utilisés dans ce travail. Ainsi des techniques résolutive plus performantes mettent l'accent sur la possibilité d'interprétations erronées (les cibles des Ac d'intérêt révélées par les approches mono et bidimensionnelle peuvent ne pas être superposables).

Un troisième écueil lié aux conditions d'extraction protéique. Les conditions de préparation des extractions protéiques nécessaires à la réalisation des immuno-empreintes monodimensionnelles et bidimensionnelles ne sont pas les mêmes. En effet, la séparation des protéines pour le western blot 1D se fait uniquement sur des différences de masses moléculaires et conduit à utiliser un tampon d'extraction qui sature les protéines de charges négatives par l'intermédiaire du sodium-dodécyl sulfate (SDS). Ce tampon (« Laemmli ») présente l'intérêt de solubiliser de nombreuses protéines qui deviennent dès lors accessibles à l'analyse par western blot. En revanche, le tampon utilisé pour l'analyse bidimensionnelle ne peut pas intégrer de solution chargeant négativement

les protéines, puisque le principe de cette démarche est de les séparer selon leur point isoélectrique (et secondairement, selon leur masse moléculaire). L'utilisation du tampon *Laemmli* est donc proscrite en 2D, et il est remplacé par un tampon composé d'un détergent non-ionique : le « *CHAPS* ». Les performances de solubilisation de ce tampon sont moindres, de sorte que la richesse de l'extrait protéique qui est soumis aux conditions de migration 2D s'en trouve réduite, grevant d'autant le potentiel d'identification des protéines d'intérêt.

Ainsi les approches mono et bidimensionnelles ont chacune des avantages et des inconvénients. Notre protocole d'identification de nouveaux biomarqueurs vise à révéler des profils de réactivités par immuno-empreinte monodimensionnelle (IEMD en tampon « *Laemmli* »). Si l'IEMD cerne des profils de réactivités discriminantes intéressants, leurs cibles sont identifiées par l'IPBDF (tampon « *CHAPS* ») couplée à l'ORBITRAP. Comme nous l'avons vu, ces deux approches ne garantissent pas que la cible attendue soit bien dans le gel 2D et que la ou les cible(s) révélée(s) ne soi(en)t pas le résultat de réactivités croisées. Pour pallier cette difficulté, un arbre décisionnel est proposé pour guider le choix de la technique la plus adaptée à l'identification de l'antigène-cible (figure 26 ; annexe 4). Dans cet arbre décisionnel est intégrée l'analyse de « sous-protéomes » après enrichissement des extraits protéiques par fractionnement subcellulaire ou extraction protéique par des détergents non conventionnels (N octyl glucoside, digitonine). Selon la compatibilité entre les fractions protéiques recueillies et la possibilité de les analyser en immunoprotéomique bidimensionnelle, l'analyse de la réactivité sérique des sous-protéomes est envisagée par IPBDF, nanoLC-MS/MS directement à partir de l'immuno-empreinte monodimensionnelle, ou des techniques 2D alternatives.

Cette nouvelle démarche montre qu'il est envisageable d'identifier les protéines, cibles potentielles de réactivités discriminantes, dès l'approche d'immuno-empreinte monodimensionnelle par l'approche nanoLC-MS/MS. Quelle serait alors la place de l'approche 2D ? L'identification de cibles d'intérêt par nanoLC-MS/MS à partir d'une bande 1D pourrait effectivement être attrayante. Elle conduirait cependant à révéler par la technologie de spectrométrie de masse très sensible qu'est l'ORBITRAP, l'ensemble des protéines présentes dans ce mélange complexe que représente une bande 1D (de l'ordre de 80 protéines différentes !). C'est pour cette raison que l'approche d'IPBDF ne serait pas abandonnée dans notre protocole. Elle présente en effet l'avantage majeur, par sa grande capacité résolutive, de définir *in fine* un nombre limité de candidats potentiels (inférieur à 10).

En conclusion, si les alternatives méthodologiques proposées n'offrent pas la garantie totale d'identification d'un antigène cible d'intérêt, elles

constituent néanmoins une première étape nécessaire pour la sélection d'antigènes candidats et instructive pour la compréhension des événements physiopathologiques. Les résultats qu'elle propose restent toutefois à valider par la mise en place de méthodes qui s'assureront de la pertinence des antigènes révélés. Celles-ci peuvent faire appel aux démarches conventionnelles d'immunodosages (ELISA, immunodot, western blot...) réalisées à partir de larges cohortes de patients et de témoins mais aussi aux méthodes innovantes utilisant les puces à protéines, ou les approches de multiplexage sur billes. Ces dernières permettront de mieux intégrer la notion importante qui a été mise en valeur par ce travail et qui souligne que c'est une combinaison de réactivités qui révèle de façon plus performante les perturbations de l'homéostasie du système immunitaire associées aux maladies auto-immunes.

Comment intégrer les notions de plasticité du répertoire autoréactif et situer la place du répertoire naturel et/ ou adaptatif pour mieux appréhender la signification des profils singuliers d'autoréactivité dans un contexte pathologique ?

Dans le cadre de la démarche que nous avons jusqu'à maintenant mise en œuvre, nous avons d'abord considéré la **valeur opérationnelle** des modifications du répertoire des Ac sériques. Nous avons ainsi confirmé son intérêt avec l'identification de nouveaux biomarqueurs de maladie et de formes cliniques. Se pose toutefois la question de la **signification** de ces modifications du répertoire. La caractérisation moléculaire des cibles antigéniques discriminantes, qui doit être nous l'avons vu, optimisée, n'a pas apporté d'éléments de réponse. En revanche, l'analyse séquentielle des profils dans les modèles expérimentaux et en pathologie humaine (avant et après traitement, étude au stade CIS de la SEP) s'est avérée très instructive. Dans un contexte expérimental, induisant une réponse inflammatoire majeure, facilitant l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique et/ou sa traversée par des cellules immunocompétentes, nous avons observé des répercussions précoces sur le répertoire autoréactif (Zephir *et al.* 2006). En pathologie humaine, nous avons observé une stabilité relative du répertoire, associée à un phénotype clinique inchangé après traitement (Almeras *et al.* 2005). L'interprétation de ces premiers résultats est néanmoins limitée par le court délai d'analyse. En revanche, une altération précoce du répertoire est confirmée au cours du CIS. Ce profil prédictif de SEP doit être conforté sur une plus large cohorte de patients. Par ailleurs, son étude peut être complétée par deux autres approches instructives. Il existe des circonstances de consultation, où des patients ne souffrant d'aucun symptôme clinique présentent des lésions inflammatoires évocatrices de démyélinisation en IRM encéphalique. Une analyse séquentielle du répertoire autoréactif est en cours de développement dans

ce contexte dénommé « *Radiologic Isolated Syndrome* » ou (« RIS »). D'autre part, il existe des formes cliniques de SEP (RRMS) ayant des profils évolutifs plus agressifs selon les individus. Là encore l'analyse séquentielle peut être instructive, d'autant que dans les modèles expérimentaux, nous avons noté l'addition ou la soustraction de réactivités, en lien avec des événements protecteurs ou agressifs dans l'EAE (El Behi *et al.* 2007). Si nos résultats plaident pour une plasticité du répertoire, nous ne pouvons définir précisément le lien entre cette dynamique et l'émergence de processus lésionnels. Le changement de réactivités serait-il la cause ou la conséquence des événements pathogènes ? Pour progresser dans cette réflexion, nous avons analysé l'évolution du répertoire autoréactif chez des enfants vivant en zone d'endémie parasitaire. Les résultats acquis montrent combien, cet environnement particulier conditionne la mise en forme du répertoire auto-immun, et combien cette empreinte pèse sur le risque ultérieur de développement d'un neuropaludisme (Dassé *et al.* 2011). Enfin, pour mieux appréhender la signification des changements du répertoire B autoréactif, une étude dynamique de l'homéostasie lymphocytaire B a été engagée au laboratoire dans les modèles expérimentaux (Lee-Chang, Lefranc, *et al.* 2011) et dans la SEP (Lee-Chang, Top, *et al.* 2011; Lee-Chang, Zéphir, *et al.* 2011). Une altération de la distribution des populations lymphocytaires B met en exergue une diminution significative affectant les cellules B régulatrices (B transitionnelles T2 dans la SEP). En complément de ces premiers résultats des études sur les relations phénotypes-fonctions des sous populations des lymphocytes B dans différentes maladies auto-immunes ont été proposées. Outre les modifications dynamiques du répertoire, nous nous interrogeons sur la place prise par les Ac naturels dans la mise en forme de l'empreinte. Les données de la littérature plaident pour l'hypothèse d'une implication partagée de la réponse immune innée et de la réponse immune adaptative dans la mise en forme du répertoire autoréactif des Ac circulants évaluée selon notre protocole. Dans le modèle exemplaire d'une altération de l'autoréactivité T dépendante tel que l'APECED, nous avons mis en évidence des modifications significatives du répertoire des Ac de classe IgM, dont la production est surtout T indépendante. D'autres isotypes, notamment les IgA, aussi impliqués dans les réponses innées, seront évalués. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives sur le rôle potentiel de signaux de l'immunité innée (rôle des TLR ?) dans l'altération du répertoire B autoréactif. En complément des études phénotype-fonction des B précédemment évoquées, nous nous proposons d'apprécier les effets de l'engagement de ces récepteurs de l'immunité innée sur la réponse (auto ?)Ac de chacune de ces sous-populations. Ce projet bénéficie du soutien de notre Université (Appel d'offre Université de Lille 2, année 2012).

CONCLUSION

La méthode qui a été mise en œuvre dans notre laboratoire, ouvre des perspectives intéressantes. Elle a permis l'identification de nouveaux biomarqueurs diagnostiques et pronostiques de maladies auto-immunes que nous espérons valoriser en pratique quotidienne. Elle souligne, néanmoins, la difficulté d'interprétation d'une empreinte qui traduit l'intrication de nombreux événements individuels. En effet l'analyse des perturbations du répertoire des Ac sériques montre qu'il est possible de révéler des anomalies de distribution des réactivités immunitaires partagées par un groupe homogène d'individus porteur d'un même phénotype pathologique (signature ?). Toutefois, l'approche menée en vue de l'identification des cibles de ce dysfonctionnement n'a pas permis de révéler les antigènes-candidats dont la participation immédiate aux processus physiopathologiques semble évidente. Ce résultat pose la question de leur pertinence physiopathologique. Les cibles jusqu'à maintenant identifiées sont-elles de réels acteurs de la pathogenèse des processus auto-immuns ou des témoins indirects d'une dérégulation beaucoup plus complexe ? La caractérisation précise des cibles antigéniques, qui a conduit à d'importants investissements méthodologiques au laboratoire, peut offrir des pistes de réflexions fécondes pour l'avenir.

ANNEXES

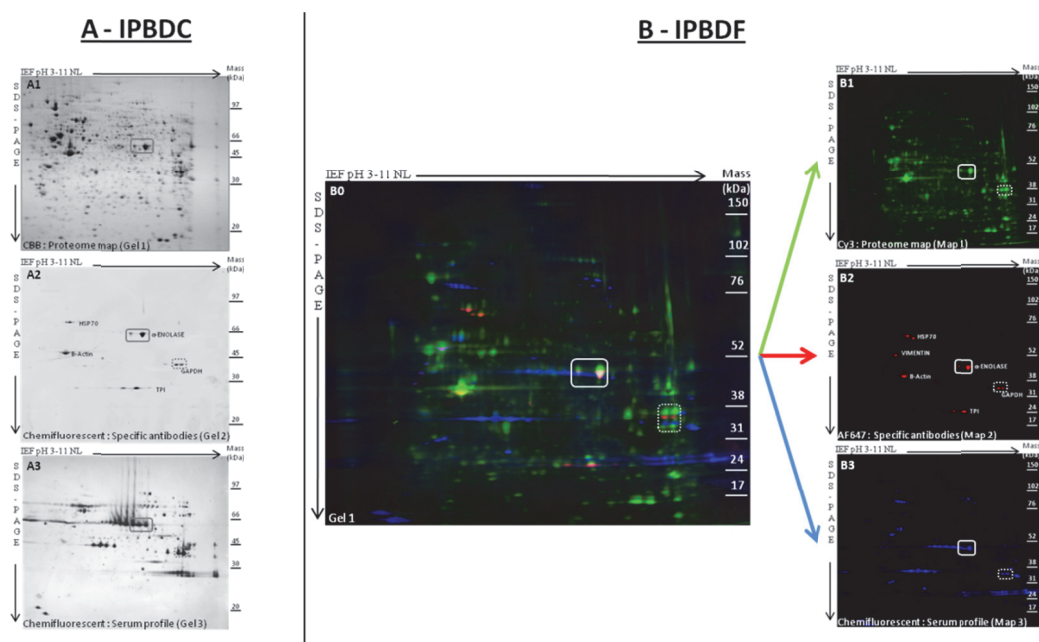


Figure 23 : Principes méthodologiques de l'IPBDF

A] Selon l'approche d'immunoprotéomique bidimensionnelle conventionnelle (ou en chimiluminescence, « IPBDC »), deux gels sont nécessaires : un (A1) pour la coloration au bleu de Coomassie colloïdal (BCC), un autre permettant la génération des membranes de PDVF qui permettront (A2) le repérage des protéines par des Ac commerciaux facilitant le repérage des déformations, et (A3) l'analyse des profils de réactivité du sérum d'intérêt.

B] Avec l'utilisation de marqueurs fluorescents dans le cadre de l'IPBDF, un seul gel est désormais réalisé : les protéines cibles des réactivités sont marquées par le fluorophore vert. Elles sont transférées sur une membrane pour les immuno-empreintes réalisées en présence simultanée des Ac commerciaux (et utilisés pour le repérage dans le gel) et le(s) sérum(s) d'intérêt. Les Ac secondaires permettant de révéler les Ac commerciaux et les IgG sériques du patient sont incubés ensemble avec un Ac anti-espèce (pour révéler les Ac commerciaux, et couplé à 1 fluorophore rouge (AF647)) et un Ac anti-IgG humaines couplée à la peroxydase, révéler par une trousse commerciale (ECL plus) fluorescence bleu.

Si une distorsion survient dans le gel, elle concerne toutes les « couches » (le gel et les 3 cartes qui peuvent être générées). La superposition des différentes couches entre-elles, est grandement facilitée par l'utilisation des 3 canaux de fluorescence et permet un repérage exact de la protéine cible de la réactivité jugée intéressante.

Annexe 2.

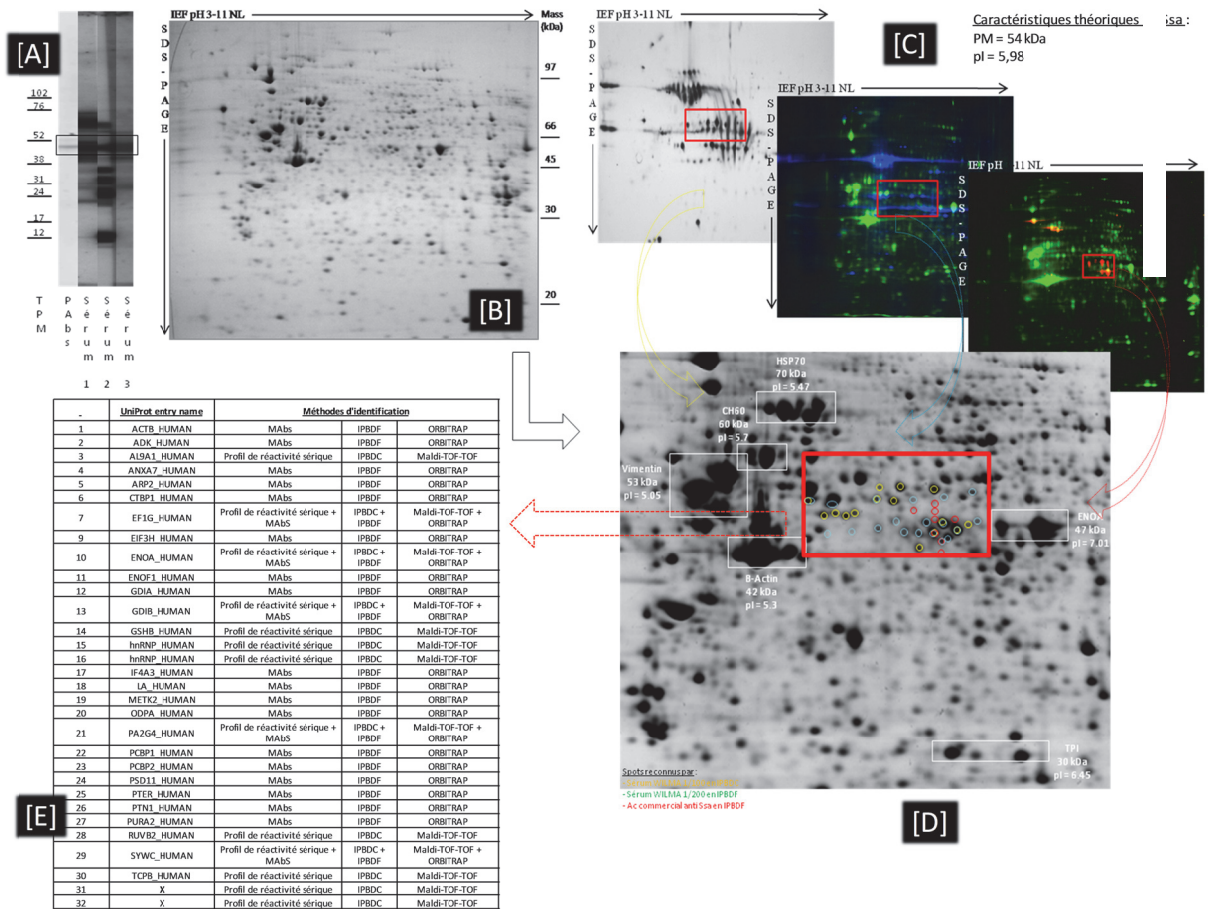


Figure 24 : Démarche IPBDF visant à repérer la cible antigénique des Ac anti-SS-A/Ro 52.

[A] Immuno-empreinte monodimensionnelle visant à repérer la bande de réactivité anti-SS-A/Ro 52 avec un immun sérum commercial (« pABs »), et 3 sérums de patients (1,2,3).

[B] Gels de séparation 2D et **[C]** membranes d'immuno-empreinte bidimensionnelles avec les mêmes sérums (canal rouge pour le sérum commercial, canal bleu pour un sérum de patient).

[D] Prélèvement des spots dans la région de pI et de poids moléculaire susceptible de contenir la cible attendue (l'antigène SS-A/Ro 52).

[E] Identification des spots prélevés par spectrométrie de masse MALDI-TOF-TOF et/ou ORBITRAP. Aucun prélèvement n'a conduit à identifier la cible attendue alors que les prélèvements ont été guidés par IPBDF.

Annexe 3.

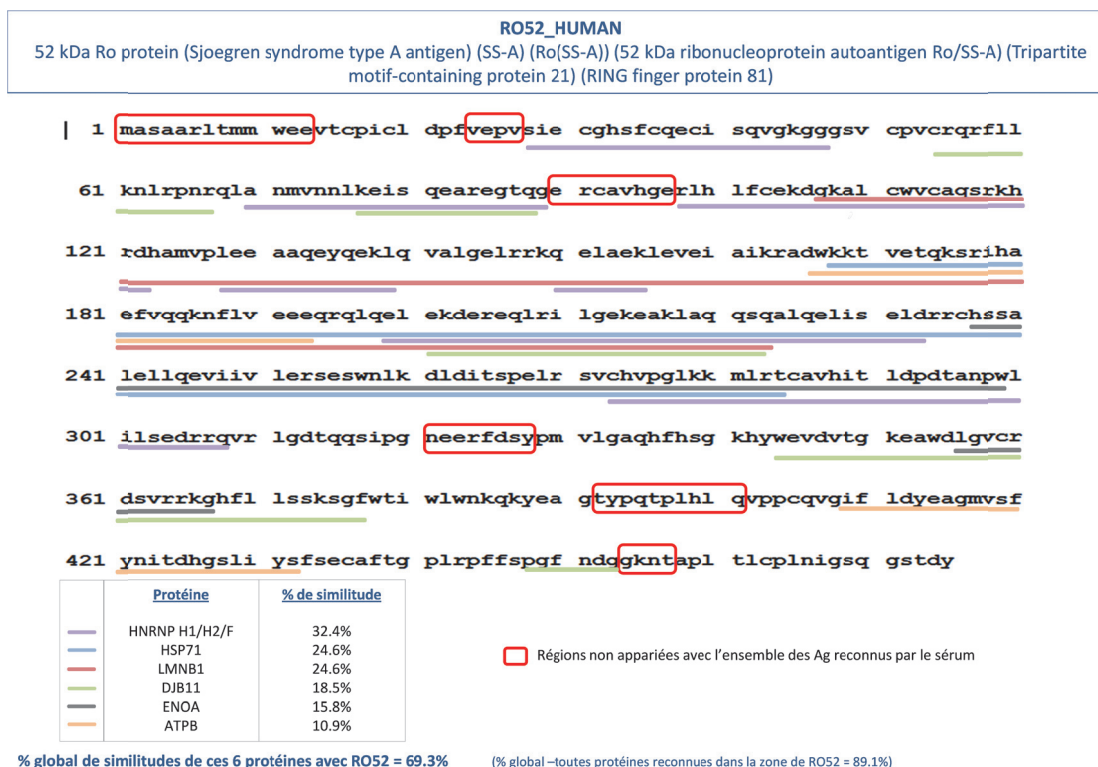


Figure 25 : Antigène SS-A/Ro 52, cible de réactivités croisées.

Séquence peptidique de l'antigène SS-A/Ro 52, présentant des similitudes de séquences avec différents auto-antigènes exprimés au sein des cellules HEp2 (tableau en bas à gauche de la figure). Les séquences partagées sont soulignées de traits de différentes couleurs en fonction des Ag qui présentent ces similitudes de séquence. Parmi ces Ag on retrouve l'alpha-énolase et l'HSP71 (par exemple). Si on analyse et compare toutes les séquences des protéines qui peuvent être la cible de la réactivité d'un sérum de malade comprenant des Ac anti-SS-A/Ro 52, c'est 90 % de la séquence antigénique de l'Ag SS-A/Ro 52 qui présente des épitopes partagés, sources potentielles de réactivités croisées. Les séquences encadrées d'un trait rouge sont les seules qui ne présentent pas (selon notre analyse) de similitudes épitopiques.

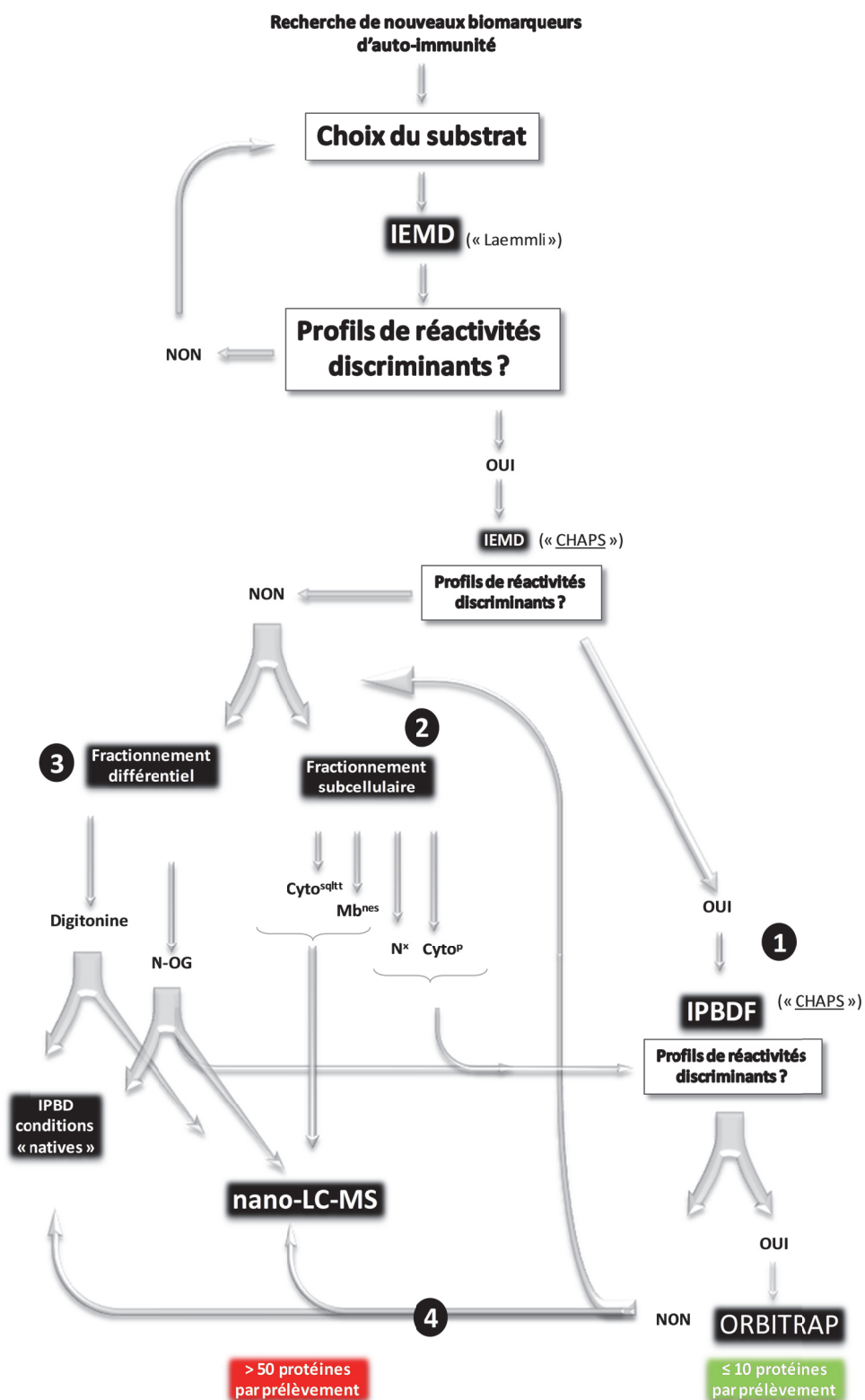


Figure 26 : Différentes alternatives d'immunoprotéomique pour l'identification des antigènes-cibles de réactivités discriminantes.

L'IPBDF est privilégiée du fait de sa grande capacité résolutive. Si la démarche pas à pas conduit à constater la perte du différentiel de réactivités entre les groupes des alternatives sont proposées. Elles font appel à l'analyse du sous-protéome et caractérisation des antigènes cibles par la technique de nano-LC-MS, ou par le biais de l'IPBD en condition native.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Abadie, V., Sollid, L.M., Barreiro, L.B., Jabri, B., **2011**. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annual review of immunology*, **29**, p.493-525.

Adib, M., Ragimbeau, J., Avrameas, S., Ternynck, T., **1990**. IgG autoantibody activity in normal mouse serum is controlled by IgM. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **145**(11), p.3807-3813.

Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A.J., Funovits, J., Felson, D.T., Bingham, C.O., *et al.*, **2010**. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis and rheumatism*, **62**(9), p.2569-2581.

Allman, D., Pillai, S., **2008**. Peripheral B cell subsets. *Current opinion in immunology*, **20**(2), p.149-157.

Almeras, L., Lefranc, D., Drobecq, H., de Seze, J., Dubucquoi, S., Vermersch, P., *et al.*, **2004**. New antigenic candidates in multiple sclerosis: identification by serological proteome analysis. *Proteomics*, **4**(7), p.2184-2194.

Almeras, L., de Seze, J., Lefranc, D., Fily-Nalewajk, S., Dubucquoi, S., Vermersch, P., *et al.*, **2005**. Evolution of self-reactive IgG antibody repertoires in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Immunology Letters*, **97**(1), p.55-62.

Ascherio, A., Munger, K.L., **2010**. Epstein-barr virus infection and multiple sclerosis: a review. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, **5**(3), p.271-277.

Avouac, J., Gossec, L., Dougados, M., **2006**. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Annals of the rheumatic diseases*, **65**(7), p.845-851.

Avrameas, S., **1991**. Natural autoantibodies: from « horror autotoxicus » to « gnothi seauton ». *Immunology today*, **12**(5), p.154-159.

Avrameas, S., Ternynck, T., **1995**. Natural autoantibodies: the other side of the immune system. *Research in immunology*, **146**(4-5), p.235-248.

Ballot, E., Bruneel, A., Labas, V., Johanet, C., **2003**. Identification of rat targets of anti-soluble liver antigen autoantibodies by serologic proteome analysis. *Clinical chemistry*, **49**(4), p.634-643.

Barkhof, F., Filippi, M., Miller, D.H., Scheltens, P., Campi, A., Polman, C.H., *et al.*, **1997**. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain: a journal of neurology*, **120**(Pt 11), p.2059-2069.

Basten, A., Silveira, P.A., **2010**. B-cell tolerance: mechanisms and implications. *Current opinion in immunology*, **22**(5), p.566-574.

Beck, L.H., Jr, Bonegio, R.G.B., Lambeau, G., Beck, D.M., Powell, D.W., Cummins, T.D., *et al.*, **2009**. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *The New England journal of medicine*, **361**(1), p.11-21.

Bemark, M., Holmqvist, J., Abrahamsson, J., Mellgren, K., **2012**. Translational Mini-Review Series on B cell subsets in disease. Reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation- revelation of B cell developmental pathways and lineage phenotypes. *Clinical and experimental immunology*, **167**(1), p.15-25.

Berneman, A., Guilbert, B., Eschrich, S., Avrameas, S., **1993**. IgG auto- and polyreactivities of normal human sera. *Molecular immunology*, **30**(16), p.1499-1510.

- Berthelot, J.-M., Le Goff, B., **2010**. Rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Joint, bone, spine: revue du rhumatisme*, **77**(6), p.537-541.
- Birge, R.B., Ucker, D.S., **2008**. Innate apoptotic immunity: the calming touch of death. *Cell death and differentiation*, **15**(7), p.1096-1102.
- von Boehmer, H., Melchers, F., **2010**. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nature immunology*, **11**(1), p.14-20.
- Boggs, J.M., Rangaraj, G., Koshy, K.M., Ackerley, C., Wood, D.D., Moscarello, M.A., **1999**. Highly deiminated isoform of myelin basic protein from multiple sclerosis brain causes fragmentation of lipid vesicles. *Journal of neuroscience research*, **57**(4), p.529-535.
- Brichory, F., Beer, D., Le Naour, F., Giordano, T., Hanash, S., **2001**. Proteomics-based identification of protein gene product 9.5 as a tumor antigen that induces a humoral immune response in lung cancer. *Cancer research*, **61**(21), p.7908-7912.
- Bridges, S.L., Jr, Lee, S.K., Koopman, W.J., Schroeder, H.W., Jr, **1993**. Analysis of immunoglobulin gamma heavy chain expression in synovial tissue of a patient with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, **36**(5), p.631-641.
- Brokstad, K.A., Page, M., Nyland, H., Haaheim, L.R., **1994**. Autoantibodies to myelin basic protein are not present in the serum and CSF of MS patients. *Acta neurologica Scandinavica*, **89**(6), p.407-411.
- Burnet, F.M., Fenner, F., **1941**. *The production of antibodies* 2nd ed., Melbourne: MacMillan.
- Burnet, F.M., **1970**. Immunological surveillance. In *Immunological Surveillance*. Oxford. Sydney: Oxford.
- Burnet, F.M., Fenner, F., **1948**. Genetics and Immunology. *Heredity*, **2**, p.289-324.
- Bussonne, G., Dib, H., Tamby, M.C., Broussard, C., Federici, C., Woimant, G., *et al.*, **2011**. Identification of new autoantibody specificities directed at proteins involved in the transforming growth factor β pathway in patients with systemic sclerosis. *Arthritis research & therapy*, **13**(3), p.R74.
- Cao, L., Goodin, R., Wood, D., Moscarello, M.A., Whitaker, J.N., **1999**. Rapid release and unusual stability of immunodominant peptide 45-89 from citrullinated myelin basic protein. *Biochemistry*, **38**(19), p.6157-6163.
- Capolunghi, F., Cascioli, S., Giorda, E., Rosado, M.M., Plebani, A., Auriti, C., *et al.*, **2008**. CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **180**(2), p.800-808.
- Cariappa, A., Pillai, S., **2002**. Antigen-dependent B-cell development. *Current opinion in immunology*, **14**(2), p.241-249.
- Casola, S., **2007**. Control of peripheral B-cell development. *Current opinion in immunology*, **19**(2), p.143-149.
- Chang, X., Yamada, R., Suzuki, A., Kochi, Y., Sawada, T., Yamamoto, K., **2005**. Citrullination of fibronectin in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Rheumatology (Oxford, England)*, **44**(11), p.1374-1382.
- Chavanas, S., Méchin, M.-C., Takahara, H., Kawada, A., Nachat, R., Serre, G., *et al.*, **2004**. Comparative analysis of the mouse and human peptidylarginine deiminase gene clusters reveals highly conserved non-coding segments and a new human gene, PADI6. *Gene*, **330**, p.19-27.

- Chow, D.A., Bennet, R.D., **1989**. Low natural antibody and low in vivo tumor resistance, in xid-bearing B-cell deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **142**(10), p.3702-3706.
- Christensen, S.R., Shupe, J., Nickerson, K., Kashgarian, M., Flavell, R.A., Shlomchik, M.J., **2006**. Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity*, **25**(3), p.417-428.
- Chung, J.B., Silverman, M., Monroe, J.G., **2003**. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends in immunology*, **24**(6), p.343-349.
- Clark, M.R., Tanaka, A., Powers, S.E., Veselits, M., **2011**. Receptors, subcellular compartments and the regulation of peripheral B cell responses: the illuminating state of anergy. *Molecular immunology*, **48**(11), p.1281-1286.
- Cohen, I.R., Young, D.B., **1991**. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunology today*, **12**(4), p.105-110.
- Coutinho, A., Kazatchkine, M.D., Avrameas, S., **1995**. Natural autoantibodies. *Current opinion in immunology*, **7**(6), p.812-818.
- Coutinho, A., **2003**. Will the idiotypic network help to solve natural tolerance? *Trends in Immunology*, **24**(2), p.53-54.
- Crampton, S.P., Voynova, E., Bolland, S., **2010**. Innate pathways to B-cell activation and tolerance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1183**, p.58-68.
- Cyster, J.G., Schwab, S.R., **2012**. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annual review of immunology*, **30**, p.69-94.
- Dassé, R., Lefranc, D., Dubucquoi, S., Dussart, P., Dutoit-Lefevre, V., Sendid, B., *et al.*, **2011**. Changes Related to Age in Natural and Acquired Systemic Self-IgG Responses in Malaria. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, **2011**, p.462767.
- Demaria, O., Pagni, P.P., Traub, S., de Gassart, A., Branzk, N., Murphy, A.J., *et al.*, **2010**. TLR8 deficiency leads to autoimmunity in mice. *The Journal of clinical investigation*, **120**(10), p.3651-3662.
- Detert, J., Pischon, N., Burmester, G.R., Buttgerit, F., **2010**. The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Arthritis research & therapy*, **12**(5), p.218.
- Dib, H., Chafey, P., Clary, G., Federici, C., Le Gall, M., Dwyer, J., *et al.*, **2012**. Proteomes of umbilical vein and microvascular endothelial cells reflect distinct biological properties and influence immune recognition. *Proteomics*, **12**(15-16), p.2547-2555.
- Dieterich, W., Ehnis, T., Bauer, M., Donner, P., Volta, U., Riecken, E.O., *et al.*, **1997**. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature medicine*, **3**(7), p.797-801.
- Dimitrov, J.D., Vassilev, T.L., Andre, S., Kaveri, Srinivas V, Lacroix-Desmazes, S., **2008**. Functional variability of antibodies upon oxidative processes. *Autoimmunity reviews*, **7**(7), p.574-578.
- Djoumerska-Alexieva, I.K., Dimitrov, J., Voynova, E.N., Lacroix-Desmazes, S., Kaveri, Srinivas V., Vassilev, T.L., **2010**. Exposure of IgG to an acidic environment results in molecular modifications and in enhanced protective activity in sepsis. *The FEBS journal*, **277**(14), p.3039-3050.
- Dörner, T., Foster, S.J., Farner, N.L., Lipsky, P.E., **1998**. Immunoglobulin kappa chain receptor editing in systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical investigation*, **102**(4), p.688-694.

- Dubucquoi, S., Solau-Gervais, E., Lefranc, D., Marguerie, L., Sibilia, J., Goetz, J., *et al.*, **2004**. Evaluation of anti-citrullinated filaggrin antibodies as hallmarks for the diagnosis of rheumatic diseases. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **63**(4), p.415-419.
- Eisenberg, R.A., **2012**. Secondary receptor editing in the generation of autoimmunity. *Autoimmunity reviews*, **11**(11), p.787-789.
- El Behi, M., Zéphir, H., Lefranc, D., Dutoit, V., Dussart, P., Devos, P., *et al.*, **2007**. Changes in self-reactive IgG antibody repertoire after treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis with anti-allergic drugs. *Journal of Neuroimmunology*, **182**(1-2), p.80-88.
- Erwig, L.P., Henson, P.M., **2008**. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death and Differentiation*, **15**(2), p.243-250.
- Erwig, L.P., Henson, P.M., **2007**. Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis. *The American Journal of Pathology*, **171**(1), p.2-8.
- Farquharson, D., Butcher, J.P., Culshaw, S., **2012**. Periodontitis, Porphyromonas, and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Mucosal immunology*, **5**(2), p.112-120.
- Gerdes, T., Wabl, M., **2004**. Autoreactivity and allelic inclusion in a B cell nuclear transfer mouse. *Nature immunology*, **5**(12), p.1282-1287.
- Girbal, E., Sebbag, M., Gomès-Daudrix, V., Simon, M., Vincent, C., Serre, G., **1993**. Characterisation of the rat oesophagus epithelium antigens defined by the so-called « antikeratin antibodies », specific for rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, **52**(10), p.749-757.
- Good, K.L., Avery, D.T., Tangye, S.G., **2009**. Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **182**(2), p.890-901.
- Grabar, P., **1975**. Hypothesis. Auto-antibodies and immunological theories: an analytical review. *Clinical immunology and immunopathology*, **4**(4), p.453-466.
- Griffith, T.S., Ferguson, T.A., **2011**. Cell death in the maintenance and abrogation of tolerance: the five Ws of dying cells. *Immunity*, **35**(4), p.456-466.
- Grönwall, C., Vas, J., Silverman, G.J., **2012**. Protective Roles of Natural IgM Antibodies. *Frontiers in immunology*, **3**, p.66.
- Guerrier, T., Le Pottier, L., Devauchelle, V., Pers, J.-O., Jamin, C., Youinou, P., **2012**. Role of Toll-like receptors in primary Sjögren's syndrome with a special emphasis on B-cell maturation within exocrine tissues. *Journal of autoimmunity*, **39**(1-2), p.69-76.
- Halverson, R., Torres, R.M., Pelanda, R., **2004**. Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nature immunology*, **5**(6), p.645-650.
- Hardy, R.R., Hayakawa, K., **2001**. B cell development pathways. *Annual review of immunology*, **19**, p.595-621.
- Hendriks, R.W., Middendorp, S., **2004**. The pre-BCR checkpoint as a cell-autonomous proliferation switch. *Trends in immunology*, **25**(5), p.249-256.
- Herlands, R.A., Christensen, S.R., Sweet, R.A., Hershberg, U., Shlomchik, M.J., **2008**. T cell-independent and toll-like receptor-dependent antigen-driven activation of autoreactive B cells. *Immunity*, **29**(2), p.249-260.

- Herzog, S., Jumaa, H., **2012**. Self-recognition and clonal selection: autoreactivity drives the generation of B cells. *Current opinion in immunology*, **24**(2), p.166-172.
- Hewison, M., **2012**. Vitamin D and immune function: autocrine, paracrine or endocrine? *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum*, **243**, p.92-102.
- Hewison, M., **2010**. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, **39**(2), p.365-379, table of contents.
- Hillion, S., Garaud, S., Devauchelle, V., Bordron, A., Berthou, C., Youinou, P., *et al.*, **2007**. Interleukin-6 is responsible for aberrant B-cell receptor-mediated regulation of RAG expression in systemic lupus erythematosus. *Immunology*, **122**(3), p.371-380.
- Hurez, V., Kazatchkine, M.D., Vassilev, T., Ramanathan, S., Pashov, A., Basuyaux, B., *et al.*, **1997**. Pooled normal human polyspecific IgM contains neutralizing anti-idiotypes to IgG autoantibodies of autoimmune patients and protects from experimental autoimmune disease. *Blood*, **90**(10), p.4004-4013.
- Isaák, A., Prechl, J., Gergely, J., Erdei, A., **2006**. The role of CR2 in autoimmunity. *Autoimmunity*, **39**(5), p.357-366.
- Isnardi, I., Ng, Y.-S., Srdanovic, I., Motaghedi, R., Rudchenko, S., von Bernuth, H., *et al.*, **2008**. IRAK-4- and MyD88-dependent pathways are essential for the removal of developing autoreactive B cells in humans. *Immunity*, **29**(5), p.746-757.
- Kahn, J.E., Dutoit-Lefevre, V., Duban-Deweer, S., Chafey, P., Pottiez, G., Lefranc, D., *et al.*, **2011**. Comparative proteomic analysis of blood eosinophils reveals redox signaling modifications in patients with FIP1L1-PDGFR α -associated chronic eosinophilic leukemia. *Journal of Proteome Research*, **10**(4), p.1468-1480.
- Keenan, R.A., De Riva, A., Corleis, B., Hepburn, L., Licence, S., Winkler, T.H., *et al.*, **2008**. Censoring of autoreactive B cell development by the pre-B cell receptor. *Science (New York, N.Y.)*, **321**(5889), p.696-699.
- Khan, T., Salunke, D.M., **2012**. Structural elucidation of the mechanistic basis of degeneracy in the primary humoral response. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **188**(4), p.1819-1827.
- Kijanka, G., Ipcho, S., Baars, S., Chen, H., Hadley, K., Beveridge, A., *et al.*, **2009**. Rapid characterization of binding specificity and cross-reactivity of antibodies using recombinant human protein arrays. *Journal of immunological methods*, **340**(2), p.132-137.
- King, C., Tangye, S.G., Mackay, C.R., **2008**. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annual review of immunology*, **26**, p.741-766.
- Kinloch, A., Tatzer, V., Wait, R., Peston, D., Lundberg, K., Donatien, P., *et al.*, **2005**. Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*, **7**(6), p.R1421-1429.
- Köhler, F., Hug, E., Eschbach, C., Meixlsperger, S., Hobeika, E., Kofer, J., *et al.*, **2008**. Autoreactive B cell receptors mimic autonomous pre-B cell receptor signaling and induce proliferation of early B cells. *Immunity*, **29**(6), p.912-921.
- Kristjansdottir, H., Steinsson, K., Gunnarsson, I., Gröndal, G., Erlendsson, K., Alarcón-Riquelme, M.E., **2010**. Lower expression levels of the programmed death 1 receptor on CD4+CD25+ T cells and correlation with the PD-1.3A genotype in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*, **62**(6), p.1702-1711.

- Kumar, K.R., Li, L., Yan, M., Bhaskarabhatla, M., Mobley, A.B., Nguyen, C., *et al.*, **2006**. Regulation of B cell tolerance by the lupus susceptibility gene Ly108. *Science (New York, N.Y.)*, **312**(5780), p.1665-1669.
- Kurosaki, T., Shinohara, H., Baba, Y., **2010**. B cell signaling and fate decision. *Annual review of immunology*, **28**, p.21-55.
- Lacroix-Desmazes, S., Mouthon, L., Coutinho, A., Kazatchkine, M.D., **1995**. Analysis of the natural human IgG antibody repertoire: life-long stability of reactivities towards self antigens contrasts with age-dependent diversification of reactivities against bacterial antigens. *European Journal of Immunology*, **25**(9), p.2598-2604.
- Lacroix-Desmazes, S., Resnick, I., Stahl, D., Mouthon, L., Espanol, T., Levy, J., *et al.*, **1999**. Defective self-reactive antibody repertoire of serum IgM in patients with hyper-IgM syndrome. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **162**(9), p.5601-5608.
- Laouar, Y., Viret, C., **1999**. Développement intrathymique des lymphocytes T : rôle des peptides du soi dans le processus de sélection positive. *Médecine /Sciences*, **15**(12), p.1401-110.
- Lee-Chang, C., Lefranc, D., Salleron, J., Faveeuw, C., Allet, C., Vermersch, P., *et al.*, **2011**. Susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with altered B-cell subsets distribution and decreased serum BAFF levels. *Immunology Letters*, **135**(1-2), p.108-117.
- Lee-Chang, C., Top, I., Zéphir, H., Dubucquoi, S., Trauet, J., Dussart, P., *et al.*, **2011**. Primed status of transitional B cells associated with their presence in the cerebrospinal fluid in early phases of multiple sclerosis. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, **139**(1), p.12-20.
- Lee-Chang, C., Zéphir, H., Top, I., Dubucquoi, S., Trauet, J., Prin, L., *et al.*, **2011**. B-cell subsets up-regulate $\alpha 4$ integrin and accumulate in the cerebrospinal fluid in clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis onset. *Neuroscience Letters*, **487**(3), p.273-277.
- Lefranc, D., Almeras, L., Dubucquoi, S., de Seze, J., Vermersch, P., Prin, L., **2004**. Distortion of the self-reactive IgG antibody repertoire in multiple sclerosis as a new diagnostic tool. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **172**(1), p.669-678.
- Lefranc, D., Launay, D., Dubucquoi, S., de Seze, J., Dussart, P., Vermersch, M., *et al.*, **2007**. Characterization of discriminant human brain antigenic targets in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus using an immunoproteomic approach. *Arthritis and Rheumatism*, **56**(10), p.3420-3432.
- Lennon, V.A., Wingerchuk, D.M., Kryzer, T.J., Pittock, S.J., Lucchinetti, C.F., Fujihara, K., *et al.*, **2004**. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet*, **364**(9451), p.2106-2112.
- Lewis, M.J., Botto, M., **2006**. Complement deficiencies in humans and animals: links to autoimmunity. *Autoimmunity*, **39**(5), p.367-378.
- Loder, F., Mutschler, B., Ray, R.J., Paige, C.J., Sideras, P., Torres, R., *et al.*, **1999**. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *The Journal of experimental medicine*, **190**(1), p.75-89.
- Luning Prak, E.T., Monestier, M., Eisenberg, R.A., **2011**. B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1217**, p.96-121.
- Mackay, F., Figgett, W.A., Saulep, D., Lepage, M., Hibbs, M., **2010**. B-cell stage and context-dependent requirements for survival signals from BAFF and the B-cell receptor. *Immunological reviews*, **237**(1), p.205-225.

- Mackay, F., Woodcock, S.A., Lawton, P., Ambrose, C., Baetscher, M., Schneider, P., *et al.*, **1999**. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *The Journal of experimental medicine*, **190**(11), p.1697-1710.
- Maier, L.M., Hafler, D.A., **2009**. Autoimmunity risk alleles in costimulation pathways. *Immunological reviews*, **229**(1), p.322-336.
- Marshak-Rothstein, A., **2006**. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nature reviews. Immunology*, **6**(11), p.823-835.
- Mårtensson, I.-L., Keenan, R.-A., Licence, S., **2007**. The pre-B-cell receptor. *Current opinion in immunology*, **19**(2), p.137-142.
- Mauri, C., Bosma, A., **2012**. Immune regulatory function of B cells. *Annual review of immunology*, **30**, p.221-241.
- McDonald, W.I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.P., Lublin, F.D., *et al.*, **2001**. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of neurology*, **50**(1), p.121-127.
- McHeyzer-Williams, M., Okitsu, S., Wang, N., McHeyzer-Williams, L., **2012**. Molecular programming of B cell memory. *Nature reviews. Immunology*, **12**(1), p.24-34.
- Meffre, E., Davis, E., Schiff, C., Cunningham-Rundles, C., Ivashkiv, L.B., Staudt, L.M., *et al.*, **2000**. Circulating human B cells that express surrogate light chains and edited receptors. *Nature immunology*, **1**(3), p.207-213.
- Montecino-Rodriguez, E., Dorshkind, K., **2006**. New perspectives in B-1 B cell development and function. *Trends in immunology*, **27**(9), p.428-433.
- Moulin, AM, **1990**. La métaphore du soi et le tabou de l'auto immunité. In *Soi et non-soi*. Paris: Paris, Ed du Seuil, p. 55-68.
- Mouthon, L., Haury, M., Lacroix-Desmazes, S., Barreau, C., Coutinho, A., Kazatchkine, M.D., **1995**. Analysis of the normal human IgG antibody repertoire. Evidence that IgG autoantibodies of healthy adults recognize a limited and conserved set of protein antigens in homologous tissues. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **154**(11), p.5769-5778.
- Mouthon, L., Nobrega, A., Nicolas, N., Kaveri, S.V., Barreau, C., Coutinho, A., *et al.*, **1995**. Invariance and restriction toward a limited set of self-antigens characterize neonatal IgM antibody repertoires and prevail in autoreactive repertoires of healthy adults. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**(9), p.3839-3843.
- Nemazee, D., **2006**. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nature reviews. Immunology*, **6**(10), p.728-740.
- Nemazee, D., **1998**. Theoretical limits to massive receptor editing in immature B cells. *Current topics in microbiology and immunology*, **229**, p.163-171.
- Nevo, U., Kipnis, J., Golding, I., Shaked, I., Neumann, A., Akselrod, S., *et al.*, **2003**. Autoimmunity as a special case of immunity: removing threats from within. *Trends in molecular medicine*, **9**(3), p.88-93.
- Nobrega, A., Haury, M., Grandien, A., Malanchère, E., Sundblad, A., Coutinho, A., **1993**. Global analysis of antibody repertoires. II. Evidence for specificity, self-selection and the immunological « homunculus » of antibodies in normal serum. *European journal of immunology*, **23**(11), p.2851-2859.

- Oppezzo, P., Dighiero, G., **2003**. [Autoantibodies, tolerance and autoimmunity]. *Pathologie-biologie*, **51**(5), p.297-304.
- Panigrahi, A.K., Goodman, N.G., Eisenberg, R.A., Rickels, M.R., Naji, A., Luning Prak, E.T., **2008**. RS rearrangement frequency as a marker of receptor editing in lupus and type 1 diabetes. *The Journal of experimental medicine*, **205**(13), p.2985-2994.
- Pedotti, R., DeVoss, J.J., Youssef, S., Mitchell, D., Wedemeyer, J., Madanat, R., *et al.*, **2003**. Multiple elements of the allergic arm of the immune response modulate autoimmune demyelination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**(4), p.1867-1872.
- Perheentupa, J., **2006**. Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **91**(8), p.2843-2850.
- Peters, A.L., Stunz, L.L., Bishop, G.A., **2009**. CD40 and autoimmunity: the dark side of a great activator. *Seminars in Immunology*, **21**(5), p.293-300.
- Petrak, J., Ivanek, R., Toman, O., Cmejla, R., Cmejlova, J., Vyoral, D., *et al.*, **2008**. Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics*, **8**(9), p.1744-1749.
- Phan, T.G., Paus, D., Chan, T.D., Turner, M.L., Nutt, S.L., Basten, A., *et al.*, **2006**. High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment. *The Journal of experimental medicine*, **203**(11), p.2419-2424.
- Pillai, S., Cariappa, A., **2009**. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nature reviews. Immunology*, **9**(11), p.767-777.
- Pillai, S., Cariappa, A., Moran, S.T., **2005**. Marginal zone B cells. *Annual review of immunology*, **23**, p.161-196.
- Pillai, S., Mattoo, H., Cariappa, A., **2011**. B cells and autoimmunity. *Current opinion in immunology*, **23**(6), p.721-731.
- Plotz, P.H., **2003**. The autoantibody repertoire: searching for order. *Nature Reviews. Immunology*, **3**(1), p.73-78.
- Poletaev, A., Osipenko, L., **2003**. General network of natural autoantibodies as immunological homunculus (Immunculus). *Autoimmunity Reviews*, **2**(5), p.264-271.
- Poletaev, A., Stepanyuk, V., Gershwin, M.E., **2008**. Integrating immunity: the immunculus and self-reactivity. *Journal of autoimmunity*, **30**(1-2), p.68-73.
- Pradeu, T., **2005**. Les incertitudes du soi et la question du bon modèle théorique en immunologie. *Médecine /Sciences*, **21**, p.872-875.
- Pradeu, T., Carosella, E.D., **2004**. Analyse critique du modèle immunologique du soi et du non-soi et de ses fondements métaphysiques implicites. *C. R. Biologies*, (**327**), p.481-492.
- Pradeu, T., Carosella, E.D., **2006**. The Self Model and the Conception of Biological Identity in Immunology. *Biology and Philosophy*, **21**(2), p.235-236.
- Pratesi, F., Moscato, S., Sabbatini, A., Chimenti, D., Bombardieri, S., Migliorini, P., **2000**. Autoantibodies specific for alpha-enolase in systemic autoimmune disorders. *The Journal of rheumatology*, **27**(1), p.109-115.
- Quirke, A.-M., Fisher, B.A.C., Kinloch, A.J., Venables, P.J., **2011**. Citrullination of autoantigens: upstream of TNF α in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *FEBS letters*, **585**(23), p.3681-3688.

Rabilloud, T., Lelong, C., **2011**. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *Journal of proteomics*, **74**(10), p.1829-1841.

Ravichandran, K.S., **2011**. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity*, **35**(4), p.445-455.

Ravichandran, K.S., Lorenz, U., **2007**. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nature reviews. Immunology*, **7**(12), p.964-974.

Régent, A., Dib, Hanadi, Ly, K.H., Agard, C., Tamby, Mathieu C., Tamas, Nicolas, *et al.*, **2011**. Identification of target antigens of anti-endothelial cell and anti-vascular smooth muscle cell antibodies in patients with giant cell arteritis: a proteomic approach. *Arthritis research & therapy*, **13**(3), p.R107.

Reindl, M., Linington, C., Brehm, U., Egg, R., Dilitz, E., Deisenhammer, F., *et al.*, **1999**. Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study. *Brain: a journal of neurology*, **122** (Pt 11), p.2047-2056.

Rolink, A.G., Melchers, F., **2002**. BAFFed B cells survive and thrive: roles of BAFF in B-cell development. *Current opinion in immunology*, **14**(2), p.266-275.

Routsias, J.G., Goules, J.D., Goules, A., Charalampakis, G., Pikazis, D., **2011**. Autopathogenic correlation of periodontitis and rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*, **50**(7), p.1189-1193.

Sasajima, T., Watanabe, H., Sato, S., Sato, Y., Ohira, H., **2006**. Anti-triosephosphate isomerase antibodies in cerebrospinal fluid are associated with neuropsychiatric lupus. *Journal of neuroimmunology*, **181**(1-2), p.150-156.

Sauerborn, M., Schellekens, H., **2009**. B-1 cells and naturally occurring antibodies: influencing the immunogenicity of recombinant human therapeutic proteins? *Current Opinion in Biotechnology*, **20**(6), p.715-721.

Saulot, V., Vittecoq, O., Charlionet, R., Fardellone, P., Lange, C., Marvin, L., *et al.*, **2002**. Presence of autoantibodies to the glycolytic enzyme alpha-enolase in sera from patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, **46**(5), p.1196-1201.

Schellekens, G.A., de Jong, B.A., van den Hoogen, F.H., van de Putte, L.B., van Venrooij, W.J., **1998**. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *The Journal of clinical investigation*, **101**(1), p.273-281.

Servettaz, A., Guilpain, P., Camoin, L., Mayeux, P., Broussard, C., Tamby, M.C., *et al.*, **2008**. Identification of target antigens of antiendothelial cell antibodies in healthy individuals: A proteomic approach. *Proteomics*, **8**(5), p.1000-1008.

de Seze, J., Dubucquoi, S., Fauchais, A.-L., Hachulla, E., Matthias, T., Lefranc, D., *et al.*, **2004**. Autoantibodies against alpha-fodrin in Sjögren's syndrome with neurological manifestations. *The Journal of Rheumatology*, **31**(3), p.500-503.

de Seze, J., Dubucquoi, S., Fauchais, A.L., Matthias, T., Devos, D., Castelnovo, G., *et al.*, **2003**. Alpha-fodrin autoantibodies in the differential diagnosis of MS and Sjögren syndrome. *Neurology*, **61**(2), p.268-269.

de Seze, J., Dubucquoi, S., Lefranc, D., Virecoulon, F., Nuez, I., Dutoit, V., *et al.*, **2001**. IgG reactivity against citrullinated myelin basic protein in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, **117**(1-2), p.149-155.

- Sharshar, T., Lacroix-Desmazes, S., Mouthon, L., Kaveri, S., Gajdos, P., Kazatchkine, M.D., **1998**. Selective impairment of serum antibody repertoires toward muscle and thymus antigens in patients with seronegative and seropositive myasthenia gravis. *European journal of immunology*, **28**(8), p.2344-2354.
- Shlomchik, M.J., **2008**. Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation. *Immunity*, **28**(1), p.18-28.
- de Smit, M.J., Brouwer, E., Vissink, A., van Winkelhoff, A.J., **2011**. Rheumatoid arthritis and periodontitis; a possible link via citrullination. *Anaerobe*, **17**(4), p.196-200.
- Song, W.-C., **2006**. Complement regulatory proteins and autoimmunity. *Autoimmunity*, **39**(5), p.403-410.
- Stahl, D., Lacroix-Desmazes, S., Heudes, D., Mouthon, L., Kaveri, S.V., Kazatchkine, M.D., **2000**. Altered control of self-reactive IgG by autologous IgM in patients with warm autoimmune hemolytic anemia. *Blood*, **95**(1), p.328-335. (a)
- Stahl, D., Lacroix-Desmazes, S., Mouthon, L., Kaveri, S.V., Kazatchkine, M.D., **2000**. Analysis of human self-reactive antibody repertoires by quantitative immunoblotting. *Journal of immunological methods*, **240**(1-2), p.1-14. (b)
- Sun, X.-M., Ji, Y.-S., Elashram, S.A., Lu, Z.-M., Liu, X.-Y., Suo, X., *et al.*, **2012**. Identification of antigenic proteins of *Toxoplasma gondii* RH strain recognized by human immunoglobulin G using immunoproteomics. *Journal of proteomics*, in press.
- Tangye, S.G., Bryant, V.L., Cuss, A.K., Good, K.L., **2006**. BAFF, APRIL and human B cell disorders. *Seminars in immunology*, **18**(5), p.305-317.
- Tauber, A.I., **1994**. The immune self: theory or metaphor? *Immunology today*, **15**(3), p.134-136.
- Terrier, B., Tamby, M.C., Camoin, L., Guilpain, P., Bérezné, A., Tamas, N., *et al.*, **2010**. Antifibroblast antibodies from systemic sclerosis patients bind to {alpha}-enolase and are associated with interstitial lung disease. *Annals of the rheumatic diseases*, **69**(2), p.428-433.
- Terrier, B., Tamby, M.C., Camoin, L., Guilpain, P., Broussard, C., Bussone, G., *et al.*, **2008**. Identification of target antigens of antifibroblast antibodies in pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*, **177**(10), p.1128-1134.
- Tiller, T., Tsuiji, M., Yurasov, Sergey, Velinzon, K., Nussenzweig, M.C., Wardemann, Hedda, **2007**. Autoreactivity in human IgG+ memory B cells. *Immunity*, **26**(2), p.205-213.
- Tranquill, L.R., Cao, L., Ling, N.C., Kalbacher, H., Martin, R.M., Whitaker, J.N., **2000**. Enhanced T cell responsiveness to citrulline-containing myelin basic protein in multiple sclerosis patients. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, **6**(4), p.220-225.
- Tsuchiya, N., Kyogoku, C., **2005**. Role of Fc gamma receptor IIb polymorphism in the genetic background of systemic lupus erythematosus: insights from Asia. *Autoimmunity*, **38**(5), p.347-352.
- Tuohy, V.K., Yu, M., Weinstock-Guttman, B., Kinkel, R.P., **1997**. Diversity and plasticity of self recognition during the development of multiple sclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*, **99**(7), p.1682-1690.
- Tuohy, V.K., Yu, M., Yin, L., Kawczak, J.A., Kinkel, R.P., **1999**. Spontaneous regression of primary autoreactivity during chronic progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine*, **189**(7), p.1033-1042.

- Ubelhart, R., Bach, M.P., Eschbach, C., Wossning, T., Reth, M., Jumaa, H., **2010**. N-linked glycosylation selectively regulates autonomous precursor BCR function. *Nature immunology*, **11**(8), p.759-765.
- Vani, J., Elluru, S., Negi, V.-S., Lacroix-Desmazes, Sébastien, Kazatchkine, M.D., Bayary, J., *et al.*, **2008**. Role of natural antibodies in immune homeostasis: IVIg perspective. *Autoimmunity reviews*, **7**(6), p.440-444.
- Vermeulen, N., Arijis, I., Joossens, S., Vermeire, S., Clerens, S., Van den Bergh, K., *et al.*, **2008**. Anti-alpha-enolase antibodies in patients with inflammatory Bowel disease. *Clinical chemistry*, **54**(3), p.534-541.
- Vermeulen, N., Vermeire, S., Arijis, I., Michiels, G., Ballet, V., Derua, R., *et al.*, **2011**. Seroreactivity against glycolytic enzymes in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, **17**(2), p.557-564.
- Vettermann, C., Jäck, H.-M., **2010**. The pre-B cell receptor: turning autoreactivity into self-defense. *Trends in immunology*, **31**(5), p.176-183.
- Vinuesa, C.G., Sanz, I., Cook, M.C., **2009**. Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nature reviews. Immunology*, **9**(12), p.845-857.
- Walsh, G.M., Sexton, D.W., Blaylock, M.G., Convery, C.M., **1999**. Resting and cytokine-stimulated human small airway epithelial cells recognize and engulf apoptotic eosinophils. *Blood*, **94**(8), p.2827-2835.
- Wardemann, H., Nussenzweig, M.C., **2007**. B-cell self-tolerance in humans. *Advances in immunology*, **95**, p.83-110.
- Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E., Nussenzweig, M.C., **2003**. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science (New York, N.Y.)*, **301**(5638), p.1374-1377.
- Weill, J.-C., Reynaud, C.-A., **2005**. Do developing B cells need antigen? *The Journal of experimental medicine*, **201**(1), p.7-9.
- Weill, J.-C., Weller, S., Reynaud, C.-A., **2009**. Human marginal zone B cells. *Annual review of immunology*, **27**, p.267-285.
- Williams, R.C., Jr, Sugiura, K., Tan, E.M., **2004**. Antibodies to microtubule-associated protein 2 in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*, **50**(4), p.1239-1247.
- Wood, D.D., Bilbao, J.M., O'Connors, P., Moscarello, M.A., **1996**. Acute multiple sclerosis (Marburg type) is associated with developmentally immature myelin basic protein. *Annals of neurology*, **40**(1), p.18-24.
- Wood, D.D., Moscarello, M.A., **1989**. The isolation, characterization, and lipid-aggregating properties of a citrulline containing myelin basic protein. *The Journal of biological chemistry*, **264**(9), p.5121-5127.
- Yoneda, M., Fujii, A., Ito, A., Yokoyama, H., Nakagawa, H., Kuriyama, M., **2007**. High prevalence of serum autoantibodies against the amino terminal of alpha-enolase in Hashimoto's encephalopathy. *Journal of neuroimmunology*, **185**(1-2), p.195-200.
- Zaheen, A., Martin, A., **2011**. Activation-induced cytidine deaminase and aberrant germinal center selection in the development of humoral autoimmunities. *The American journal of pathology*, **178**(2), p.462-471.

Zephir, H., Almeras, L., El Behi, M., Dussart, P., de Seze, J., Steibel, J., *et al.*, **2006**. Diversified serum IgG response involving non-myelin CNS proteins during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, **179**(1-2), p.53-64.

Zephir, H., Lefranc, D., Dubucquoi, S., de Seze, J., Boron, L., Prin, L., *et al.*, **2009**. Serum IgG repertoire in clinically isolated syndrome predicts multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, **15**(5), p.593-600.

Approche immunoprotéomique : Valeurs et limites pour l'identification de réactivités discriminantes d'anticorps auto-immuns

Sylvain Dubucquoi, institut d'Immunologie, CHRU de Lille
EA 2686, homéostasie lymphocytaire, Faculté de Médecine, Université Lille Nord de France

Résumé :

Dans le cadre du diagnostic biologique des maladies auto-immunes, les auto-anticorps sont généralement recherchés par des méthodes qui utilisent des antigènes (ou peptides) présélectionnés. De telles techniques ont des limites qui pourraient être contournées par de nouvelles approches. Dans le premier temps de ce travail, nous rapportons l'intérêt d'évaluer les réactivités d'auto-anticorps vis-à-vis de cibles modifiées par des processus post traductionnels, comme la citrullination dans le cadre diagnostique de la polyarthrite rhumatoïde. Cette approche ne peut toutefois pas être transposée à toutes les pathologies auto-immunes, et notamment la sclérose en plaques. Dans un deuxième temps, notre démarche s'est élargie à l'analyse globale de la réactivité des immunoglobulines G sériques dirigée contre différents extraits d'antigènes tissulaires, notamment issus du cerveau. Malgré la grande hétérogénéité des réponses interindividuelles, il a été possible d'observer des profils de réactivités distinguant les sujets sains de patients souffrant de différentes pathologies à composantes auto-immunes. Cette signature sérologique permet également de distinguer les profils auto-immuns associés à différentes maladies et même de distinguer leurs formes cliniques. Dans le modèle expérimental développé au laboratoire, nous avons observé que des modifications de ces profils apparaissent de façon précoce et peuvent être liées à une évolution péjorative ou favorable de la maladie auto-immune. Ces résultats ont été confirmés dans la sclérose en plaques, où l'étude menée chez des patients ne présentant qu'un syndrome clinique isolé, a montré que les profils de réactivité sérique des IgG sont déjà marqués de l'empreinte de la maladie qui se révélera cliniquement en moyenne trois ans plus tard. De façon intéressante, d'autres travaux ont montré que le répertoire des IgM pouvait également être perturbé au cours d'un processus auto-immun dont la pathogénie repose sur un dysfonctionnement des lymphocytes T (syndrome APECED). Ces résultats suggèrent que des mécanismes T dépendants mais aussi T indépendants pèsent sur la constitution et l'entretien du répertoire auto-immun pathologique.

Pour identifier les cibles des réactivités discriminantes révélées par cette première approche, nous avons développé une technique de caractérisation moléculaire faisant appel à la technique immunoprotéomique. Alors que les pathologies humaines et les modèles animaux étudiés sont principalement des pathologies spécifiques d'organe, les antigènes tissulaires qui ont été identifiés comme cibles des réactivités spécifiquement associées à ces pathologies sont des antigènes ubiquitaires, et non des antigènes spécifiques d'organe. Ces résultats posent la question de l'implication réelle de ces cibles dans la physiopathologie des maladies auto-immunes. Ils illustrent également l'impérative nécessité de connaître les limites des résultats apportés par les méthodes d'immunoprotéomique.

La caractérisation de la signature sérologique d'un processus pathologique, au travers de l'analyse des perturbations globales des réactivités sériques qui lui sont associées, offre des perspectives intéressantes tant en termes de prise en charge du patient qu'en termes de compréhension physiopathologique des maladies auto-immunes. Elle pourrait aboutir à d'utiles débouchés thérapeutiques. Ces attentes justifient pleinement l'investissement qui a été mis en place par notre laboratoire dans le cadre de sa validation méthodologique.

Abstract :

In autoimmune diseases, specific autoantibodies detected in patients' sera are usually investigated by techniques using purified self-antigens and/or relevant peptides from preselected targets. Such a restrictive view may be overcome by using new biological techniques to improve the diagnostic procedure. In a first step, we evaluated the impact of slight changes in target self-antigens related to post-translational modifications, such as citrullination. In view of the weak results obtained, we further focused on some properties of the humoral response. We studied the global self-reactive IgG antibody patterns against a large panel of antigens derived from different target tissue extracts, especially brain antigens. Despite inter-individual differences, some reactivities allowed us to discriminate between the immune profiles of healthy individuals and those of patients. The self-reactive footprints can also differentiate distinct autoimmune diseases and their clinical forms. When we induced experimental autoimmune diseases, dynamic changes occurred at the early phases with significant patterns related to pathogenic or protective events. A pathological distortion of the self-reactive antibody repertoire was also found in clinically isolated syndromes predictive of multiple sclerosis. Despite the predominant organ-specific symptoms in the clinical and experimental situations studied, discriminant self-IgG reactivities mostly involved ubiquitous antigens rather than organ specific targets. Interestingly, discriminant IgM reactivities targeting both tissue-specific and ubiquitous antigens were also specifically observed in a T-dependent autoimmune disease (autoimmune polyendocrinopathy syndrome), suggesting that T-cell-dependent but also T-cell-independent mechanisms might be involved in pathological changes in the self-reactive repertoire. Although these footprints have allowed the identification of useful new biomarkers, their pathophysiological relevance remains to be defined. The molecular characterization of specific antigenic targets in autoimmune disease is a critical step towards understanding the pathological mechanisms and developing useful diagnostic and therapeutic tools. In this perspective, we emphasize the need for accurate methodological approaches. Our analysis of self-reactive footprints highlights the potent role of complementary events related to putative dysfunction in the innate/natural immune response in autoimmune diseases.

Adresse personnelle : 200 le Coin du Loup, 59270 Saint Jans Cappel
Téléphone : 07 77 38 48 54
sylvain.dubucquoi@chru-lille.fr ou sdubucquoi@gmail.com



Lille 2
Université du Droit
et de la Santé



Ecole Doctorale BIOLOGIE SANTE de Lille