



**Caractérisation de la présence d'anticorps anti-mitochondriaux
associés au lupus érythémateux disséminé**

Mémoire

Yann Becker

Maîtrise en Microbiologie - Immunologie

Maître ès Sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Yann Becker, 2017

Caractérisation de la présence d'anticorps anti-mitochondriaux associés au lupus érythémateux disséminé

Mémoire

Yann Becker

Sous la direction de :

Clémence Belleannée, directrice de recherche

Éric Boilard, co-directeur de recherche

Résumé (français) :

Les mitochondries sont des organelles intracellulaires impliquées dans de nombreuses voies biologiques. Suite à la mort ou l'activation de certains types cellulaires, elles peuvent être relarguées dans le milieu extracellulaire où, elles sont reconnues comme des signaux de danger (DAMPs), générant une réponse pro-inflammatoire par le système immunitaire inné. Les interactions entre les mitochondries et l'immunité adaptative sont encore méconnues. Neuf classes d'anticorps anti-mitochondriaux (AMA M1 à M9) ont été décrits différentes pathologies telles que la syphilis, la cirrhose biliaire primitive (CBP), le lupus érythémateux disséminé (LED) ou le syndrome des anti-phospholipides (APS), sans que leur association avec l'expression clinique de ces maladies n'ait jamais été étudiée. Dans la présente étude, nous avons développé des méthodes de détection des AMA et anti-ADN mitochondrial (AMtDNA) puis étudié des corrélations entre la présence de ces anticorps et les caractéristiques de la maladie exprimées par des patients lupiques. Nous avons mis en évidence une association protectrice des AMA envers les événements thrombotiques ainsi qu'une corrélation entre les niveaux d'AMtDNA et une élévation de l'index d'activité de la maladie (SLEDAI) en lien avec un accroissement des anticorps ciblant l'ADN double-brins (DsDNA).

Abstract (english) :

Mitochondria are intracellular organelles that are involved in a vast number of biological pathways. They may be released in the extracellular milieu upon cell death or the activation of several types of cells where they will be recognized as danger signals (DAMPs), eliciting a pro-inflammatory response by the innate immune system. To this day, interplays between mitochondria and the adaptive branch of the immunity are poorly defined. Nine classes of anti-mitochondrial antibodies (AMA M1 to M9) were reported in diseases such as syphilis, primary biliary cirrhosis (PBS), systemic lupus erythematosus (SLE) or the anti-phospholipid syndrome (APS) but their association to the clinical manifestations of these diseases have never been studied. In the present study, we developed methods for the detection of AMA and anti-mitochondrial DNA antibodies (AMtDNA) then studied correlations between the presence of these antibodies and clinical features expressed by lupus patients. We found a protective association of AMA towards thrombotic events and that AMtDNA levels correlates with an increase of the SLE disease activity index (SLEDAI) linked to an increase of the antibodies targeting double-stranded DNA (DsDNA).

Table des matières

Résumé (français) :	III
Abstract (english) :	IV
Table des matières	VI
Liste des figures	XI
Liste des tableaux	XIII
Liste des abréviations	XV
Remerciements	XXII
Avant-propos	XXV
Chapitre 1 : Introduction	1
1.1. La mitochondrie	1
1.1.1. Généralités	1
1.1.1.1. Morphologie et structure	1
1.1.1.2. Génome	2
1.1.1.3. Origine évolutive	3
1.1.1.4. Synthèse et import de protéines	3
1.1.1.5. Fusion et fission	4
1.1.2. Rôles dans l'homéostasie	5
1.1.2.1. Le métabolisme énergétique	5
1.1.2.2. La stéroïdogénèse	6
1.1.2.3. La régulation du calcium intracellulaire	7
1.1.2.4. Le contrôle de l'apoptose	7
1.1.2.5. La thermogénèse	8
1.2. Les interactions entre la mitochondrie et le système immunitaire	9
1.2.1. Avec l'immunité innée : Les DAMPs	9
1.2.1.1. L'ADN mitochondrial	9

1.2.1.2. Les peptides N-formylés	11
1.2.1.3. L'ATP	11
1.2.1.4. La cardiolipine	11
1.2.1.5. Le cytochrome C	12
1.2.1.6. Les espèces réactives de l'oxygène	13
1.2.2. Avec le système immunitaire adaptatif.....	13
1.2.2.1. Présentation des antigènes au système immunitaire	13
1.2.2.2. La mitophagie, une voie de l'autophagie spécifique à la mitochondrie	14
1.2.2.3. La présentation de la cardiolipine par le CD1d	15
1.2.2.4. Historique et description des anticorps anti-mitochondriaux.....	16
1.3. Les maladies auto-immunes à anticorps anti-mitochondriaux.....	23
1.3.1. La cirrhose biliaire primitive	23
1.3.1.1. Épidémiologie et facteurs de risques.....	23
1.3.1.2. Physiopathologie	23
1.3.1.3. Aspects cliniques : diagnostic et traitements	24
1.3.2. Le lupus érythémateux disséminé.....	25
1.3.2.1. Épidémiologie et facteurs de risques.....	25
1.3.2.2. Physiopathologie	25
1.3.2.3. Aspects cliniques : diagnostic et traitements	26
1.3.2.4. Le modèle murin inductible de LED.....	27

1.3.3. Le syndrome des anti-phospholipides.....	28
1.3.3.1. Épidémiologie et facteurs de risques.....	28
1.3.3.2. Physiopathologie	29
1.3.3.3. Aspects cliniques : diagnostic et traitements	30
1.4. Les méthodes de détection des auto-anticorps.....	30
1.4.1. Par immunofluorescence	30
1.4.2. Par méthode immuno-enzymatique	31
1.4.3. Autres méthodes – détection des anti-ADN double-brins.	32
1.4.3.1. Le test radioimmunologique de Farr	32
1.4.3.2. Le <i>Crithidia luciliae</i> immunofluorescence test (CLIFT)	33
Chapitre 2 : Problématique, hypothèse de recherche et objectifs.....	34
2.1. Problématique	34
2.2. Hypothèse.....	35
2.3. Objectifs.....	35
Chapitre 3 : Matériel et méthodes.....	37
3.1. Cohortes	37
3.2. Animaux de laboratoire	37
3.3. Matériel et préparation des tampons.....	38
3.4. Méthodes	40
3.4.1. Culture cellulaire	40
3.4.2. Préparation des mitochondries	40
3.4.3. Isolation de l'ADN mitochondrial.	42
3.4.4. Dosage des protéines	43
3.4.5. Immunobuvardages	43
3.4.6. Pureté de l'ADN mitochondrial.....	45

3.4.7. Morphologie des mitochondries	46
3.4.8. Respiration mitochondriale	46
3.4.9. Oxydation des mitochondries.....	47
3.4.10. Quantification de l'oxydation	48
3.4.11. Tests ELISA.....	50
3.4.11.1. Protocoles standards.....	50
3.4.11.2. Étapes d'optimisation.....	52
3.4.12. Analyses et biostatistiques.....	53
Chapitre 4 : Résultats.....	55
4.1. Qualité des mitochondries isolées.....	55
4.2. Développement de nouveaux outils de détection d'anticorps anti-mitochondriaux	62
4.3. Détection d'anticorps ciblant des antigènes mitochondriaux et corrélations cliniques.....	73
Chapitre 5 : Discussion.....	79
Chapitre 6 : Perspectives.....	87
Chapitre 7 : Annexes.....	90
Chapitre 8 : Bibliographie.....	95

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique d'une mitochondrie	2
Figure 2 : Chaîne de phosphorylation oxydative	6
Figure 3 : DAMPs mitochondriaux.....	10
Figure 4 : Protocole d'isolation des mitochondries	55
Figure 5 : Qualité échantillons de mitochondries.....	57
Figure 6 : Aspect des mitochondries purifiées	58
Figure 7 : Fonctionnalité des mitochondries isolées	60
Figure 8 : Évaluation de la présence d'ADN nucléaire dans les préparations d'ADN mitochondriaux.....	61
Figure 10 : Détection d'anticorps ciblant des antigènes mitochondriaux	64
Figure 11 : Détection des AMA dans différentes pathologies	65
Figure 12 : Adaptation du protocole pour ELISA de détection des AMA et spécificité d'espèce	67
Figure 13 : Mise au point du protocole d'oxydation des mitochondries.....	70
Figure 14 : Influence de l'oxydation des épitopes sur la fixation des anticorps sériques	72
Figure 15 : Détection des anticorps anti-mitochondriaux dans les séra des patients issus de la cohorte de Québec.....	74
Figure 16 : Anticorps ciblant des antigènes mitochondriaux présents chez les patients de la cohorte MRAS de Québec	75
Figure 17 : Publications concernant la mitochondrie depuis un siècle	79

Liste des tableaux

Tableau 1: Liste descriptive des anticorps anti-mitochondriaux.....	22
Tableau 2: Associations entre trois différents types d'anticorps ciblant les mitochondries chez les patients des cohortes de Toronto et de Québec.	77
Tableau 3: Corrélations entre la présence d'anticorps dirigés contre les mitochondries et les paramètres cliniques des patients inclus dans les cohortes de Toronto et de Québec.	78
Tableau supplémentaire 1 : Variables démographiques et cliniques pour les patients lupiques des cohortes de Toronto et de Québec.....	90
Tableau supplémentaire 2 : Caractéristiques cliniques des patients selon les critères de l'ACR.....	91
Tableau supplémentaire 3 : Variables sérologiques	92
Tableau supplémentaire 4 : Variables de prédiction	93
Tableau supplémentaire 5 : SLEDAI – scores alloués en fonction des paramètres cliniques exprimés par le patient.	94

Liste des abréviations

- 2,4 DNP** : 2,4-dinitrophénylhydrazine
- β₂GPI** : β₂ glycoprotéine I
- ACL** : (*Anti-cardiolipin antibody*) Anticorps anti-cardiolipine
- ACR** : *American College of Rheumatology*
- ADN** : (*Deoxyribonucleic acid*) Acide désoxyribonucléique
- AMA** : (*Anti-mitochondrial antibody*) Anticorps anti-mitochondrial
- ANA** : (*Anti-nuclear antibodies*) Anticorps anti-nucléaires
- ANOVA** : (*Analysis of variances*) Test statistique d'analyse de la variance
- AP** : (*Alkaline phosphatase*) Phosphatase alcaline
- APL** : (*Anti-phospholipid antibodies*) Anticorps anti-phospholipides
- ARN** : (*Ribonucleic acid*) Acide ribonucléique
- AMtDNA** : Anticorps anti-ADN mitochondrial
- ANA** : (*Anti-nuclear antibody*) Anticorps anti-nucléaire
- APS** : (*Anti-phospholipid syndrome*) Syndrome des anti-phospholipides
- ATP** : Adénosine tri-phosphate
- Atg** : *Autophagy-related genes*

- BCA :** (*Bicinchoninic acid assay*) Dosage protéique à l'acide bicinchoninic
- BSA :** (*Bovine serum albumine*) Sérum albumine bovine
- CBP :** (*Primary Biliary Cirrhosis*) Cirrhose biliaire primitive
- CD :** Cluster de différenciation
- CL :** Cardiolipine
- CHUL :** Centre Hospitalier de l'Université Laval
- CHUQ :** Centre Hospitalier Universitaire de Québec
- CMH :** Complexe majeur d'histocompatibilité
- CoQ :** Coenzyme Q
- CpG :** Cytosine-phosphate-Guanine
- Cyt C :** Cytochrome C
- DAMP :** (*Damage-Associated Molecular Pattern*) Motif moléculaire associé aux dommages
- DO :** Densités optiques
- DRP1 :** *Dynamin-related protein 1*
- DsDNA :** (*Double-stranded DNA*) ADN double-brin
- EDTA :** Acide éthylène-diamine-tétraacétique acide édétique
- EGTA :** *Ethylene-bis(oxyethylenitrilo)tetraacetic acid, Glycol ether diamine tetraacetic acid*
- ELISA :** (*enzyme-linked immunoassay*) Dosage immuno-enzymatique sur support solide

FADH :	<i>Flavine-adenine dinucleotid</i>
FBS :	<i>(Fœtal bovine serum)</i> Sérum de veau foetal
FPR :	<i>(Formyl-peptide receptor)</i> Récepteur aux peptides N-formylés
GTP :	Guanosine tri-phosphate
HRP :	<i>(Horseradish peroxidase)</i> Peroxidase du raifort
IC :	Intervalle de confiance
IF :	Immunofluorescence
IFN :	Interféron
Ig :	Immunoglobuline
IL :	Interleukine
IMM :	<i>(Inner mitochondrial membrane)</i> Membrane mitochondriale interne
IQR :	<i>(Interquartile range)</i> Écarts interquartiles
KCl :	Chlorure de potassium
KH₂PO₄ :	Phosphate de potassium monobasique
LA :	<i>(Lupus anticoagulant)</i> Anticoagulant lupique
LB :	<i>(Laemmli buffer)</i> Tampon de charge pour immunobuvardage
LC3 :	<i>Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i>
LED :	<i>(Systemic lupus erythematosus)</i> Lupus érythémateux disséminé
Ly :	Lymphocytes
Mfn :	Mitofusines

MtDNA : (*Mitochondrial DNA*) ADN mitochondrial

NaCl : Chlorure de sodium

Na₂HPO₄ : Phosphate disodique

NADH : *Nicotinamide adenine dinucleotide*

NADPH : *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

nDNA: (*Nuclear DNA*) ADN nucléaire

NLRP3: *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*

NET : *Neutrophil extracellular trap*

NF-κB : *Nuclear factor-κB*

O₂ : Dioxygène

O₂^{•-} : Ions superoxydes

OMM : (*Outer mitochondrial membrane*) Membrane mitochondriale externe

OCR : (*Oxygen consumption rate*) Taux de consommation de l'oxygène

OR : (*Odd ratio*) Rapport de cotes

PAMP: *Pathogen-Associated Molecular Pattern*

pDC : (*Plamacytoid dendritic cells*) Cellules dendritiques plasmacytoïdes

PDC-E2 : *Pyruvate deshydrogenase complex-E2*

pH : Potentiel hydrogène

PBS : (*Phosphate buffered saline*) Tampon phosphate salin

PI3K : Phosphatidylinositol 3-OH kinase

- PINK1 :** *PTEN-induced putative kinase 1*
- PL :** Phospholipides
- ROS :** (*Reactive oxygen species*) Espèces réactives de l'oxygène
- qPCR :** (*Quantitative polymerase chain reaction*) Réaction en chaîne de polymérisation quantitative
- SAM :** *Sorting and assembly machinery*
- SD:** (*Standard deviation*) Déviation standard
- SDS :** (*Sodium dodecyl sulfate*) Dodécylsulfate de sodium
- SIRS :** (*Systemic inflammatory response syndrome*) Syndrome de réponse inflammatoire systémique
- SLEDAI :** (*SLE disease activity index*) Index d'activité du LED
- SLICC :** (*Systemic lupus international collaborating clinics*) Index de dommages du LED
- SMP :** (*Sub-mitochondrial particles*) Particules sub-mitochondriales
- TBARS :** (*Thiobarbituric acid reactive substances*) Substances réactives à l'acide thiobarbiturique
- TBHP :** (*Tert-butylhydroperoxyde*) Hydroperoxyde de tert-butyle
- TBS :** (*Tris buffered saline*) Tampon tris salin
- TCA :** (*Trichloroacetic acid*) Acide trichloroacétique
- TEM :** (*Transmission electron microscopy*) Microscopie électronique à transmission
- TFC:** Test de fixation du complément

TLR : *Toll-like receptor*

TIM : *Transporter of inner membrane*

TMB : 3,3',5,5'-tétraméthyl-4,4'-biphényldiamine

TOM : *Transporter of outer membrane*

TP : Température pièce

Tris : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

TOM : *Transporter of outer membrane*

VDAC : *Voltage-dependent anion channels*

Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent aux Dr. Clémence Belleannée et Dr. Éric Boilard pour m'avoir accueilli dans leurs équipes respectives. Leur encadrement, leurs conseils et leurs retours ont été précieux tout au long de ma maîtrise ; ils m'ont permis de m'améliorer et de mener ce projet jusqu'au mémoire présentement entre vos mains.

J'aimerais aussi exprimer ma gratitude envers le Dr. Emmanuelle Roller-Labelle pour sa gentillesse en toutes circonstances et son aide précieuse dans la mise au point des différents protocoles sur lesquels nous avons travaillé de concert. Merci au Dr. Isabelle Allaëys pour ses nombreux conseils ô combien utiles, au Dr. Nathalie Cloutier pour ses lumières quant à la réalisation de figures de qualité ainsi qu'au Dr. Anne Zufferey-Bakos pour son soutien, ses précieux conseils en statistiques, pour son écoute et ses conseils.

Un grand merci, également, à nos collaborateurs, les Dr. Paul Fortin, Dr. Éric Wagner, Dr. Joyce Rauch, Dr. Mélanie Dieudé, Renée-Claude Loignon et Anne-Sophie Julien pour leur implication à tous les niveaux du projet, les discussions enrichissantes et leurs conseils avisés. Sans oublier les Dr. Caroline Gilbert, Dr. Martin Pelletier et Dr. Marie-Ève Janelle qui ont eu l'amabilité de nous donner accès aux technologies qui enrichissent ce mémoire. Merci aussi aux patients, vous avez – littéralement – donné de vous-même pour la Science !

Bien sûr, ce projet n'en serait pas là sans le soutien indispensable de mes collègues, passés et présents ; Tania Lévesque, Dr. Matthieu Rousseau, Dr. Anne-Claire Duchez, Nicolas Tessandier, Imène Melki et aussi à toi, Abde. Sans oublier, surtout, mes collègues et amis du centre de recherche ; Pépito, Marine, Juju, Stephan et Anthony. Par vos conseils, votre aide et, tout simplement votre présence, vous avez contribués à rendre le quotidien plus doux, vous m'avez aidé à affronter les difficultés. J'ai appris et gagné bien plus à vos côtés que ce que

je pourrais lister dans ce chapitre.

Je remercie le Pr. Paul Fonteneau et le Dr. Frédéric Gros de l'Université de Strasbourg, vous qui m'avez donné le goût de l'immunologie !

Mes pensées se tournent aussi vers mes proches ; d'ici et d'ailleurs. À toi, Camille qui partage ma vie, à ma famille ; mum, pinpin, Daniel, Jean-Pierre, Florence, Hélène, Luce (et tous les autres !). Vous êtes ma force, les racines qui me soutiennent face aux difficultés ! À toi, Arthur – mon frère d'une autre mère ; j'attends avec impatience notre prochaine « gayess' » à la terrasse des « douze apôtres ». À vous, Flo, Mathieu, Martin, Tugba, Félix, Vy, et tous ceux que j'omet dans cette liste, loin d'être exhaustive ! À vous, Amaury, Nathalie, Steve et Quentin. Enfin, à tous ceux que j'oublie et ceux que je n'ai pas encore rencontrés.

À toi, papa. Tu n'es plus là mais je suis sûr que tu aurais été fier de moi.

Will: *Every man is an island. And I stand by that. But clearly, some men are part of island chains. Below the surface of the ocean they're actually connected [...]*

Marcus: *I don't know what Will was so upset about. [...] You need more than that. You need backup. The way I saw it, Will and I both had backup now.*

Tiré du film « About a boy » réalisé par Chris et Paul Weitz (2002) et adapté du roman éponyme écrit par Nick Horny (1998)

Avant-propos

Le Dr. Éric Boilard a conçu et dirigé le projet de recherche. Il a participé à l'analyse des données. Le Dr. Clémence Belleannée a co-dirigé le projet de recherche. Le Dr. Paul Fortin nous a permis d'avoir accès aux banques d'échantillons des cohortes de Toronto et de Québec, il a participé à l'analyse des données et son interprétation. Le Dr. Éric Wagner a mis à notre disposition les aliquots de séra de patients souffrant de cirrhose biliaire primitive

Les Dr. Isabelle Allaëys, Nathalie Cloutier et Emmanuelle Rollet-Labelle ont participé à la mise au point des différentes expériences présentées dans ce rapport ainsi qu'à la réalisation des figures. Dr. Anne Zufferey-Bakos a aidé à l'analyse des données obtenues, à leurs analyses statistiques et à la rédaction de passages de ce mémoire. Mlles. Tania Lévesque, technicienne de laboratoire et Geneviève Marcoux, étudiante au doctorat dans l'équipe du Dr. Boilard ont participées à l'étude en immunisant les souris du modèle inductible de LED ainsi qu'en recueillant les échantillons de sérum utilisés au cours de nos expériences de détection des anticorps ciblant des antigènes mitochondriaux. Mlle. Imène Melki a traité les échantillons de mitochondrie et les clichés ont été acquis à l'aide du microscope électronique à transmission de l'équipe du Dr. Marie-Ève Janelle. Le Dr. Paul Fortin ainsi que Mlles. Renée-Claude Loignon et Anne-Sophie Julien ont réalisé les études biostatistiques de corrélations entre la présence des différents anticorps mesurés au cours de notre étude et les paramètres cliniques des patients.

Les Dr. Joyce Rauch et Mélanie Dieudé ont collaboré à l'analyse des données.

Le Dr. Martin Pelletier nous a mis à disposition l'analyseur de flux Seahorse XF[®]96 pour la mesure de l'activité respiratoires des échantillons de mitochondries. Le lecteur de plaques SpectraMax 190 utilisé pour mesurer les densités optiques au cours de nos différents protocoles est la propriété du Dr. Caroline Gilbert.

Chapitre 1 : Introduction

1.1. La mitochondrie

1.1.1. Généralités

1.1.1.1. Morphologie et structure

La mitochondrie est une organelle intra-cytoplasmique d'environ 1 μm , de formes très variables – allant de rondes à allongées, et constituée d'une double membrane¹. La membrane en périphérie de la mitochondrie est appelée « membrane externe » (*outer mitochondrial membrane*, OMM) et délimite la mitochondrie du cytoplasme. Elle permet la diffusion libre de molécules de petite taille, les molécules d'une taille supérieure à 5 kDa transitant par des systèmes de pores tels que le *transporter of outer membrane* (TOM), le *sorting and assembly machinery* (SAM) ou encore le *voltage dependent anion channel* (VDAC)². La seconde membrane, interne (*inner mitochondrial membrane*, IMM), forme des replis nommés « crêtes mitochondriales »³, elle est imperméable mais comporte des protéines de la famille des *transporter of inner membrane* (TIM) afin de permettre le transit de protéines vers la matrice mitochondriale ainsi que des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique. Ensemble, ces deux membranes délimitent deux espaces ; l'espace inter-membranaire et la matrice interne de la mitochondrie (Figure 1). Leur nombre est estimé entre 4 et 2000 mitochondries par cellules⁴⁻⁶.

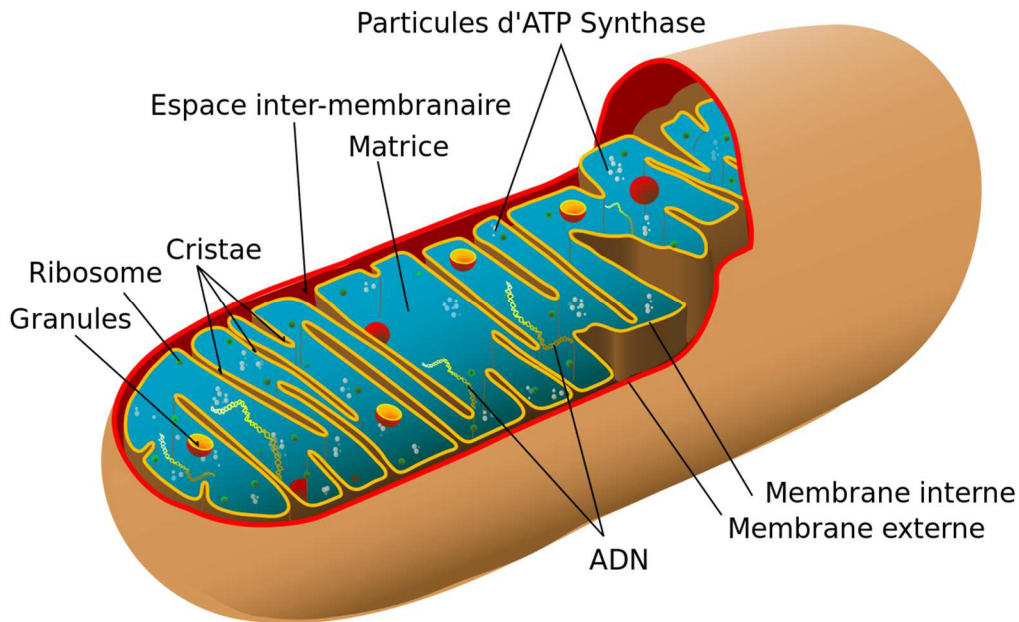


Figure 1 : Représentation schématique d'une mitochondrie. Les mitochondries sont délimitées par une double membrane lipidique. En périphérie, la membrane externe permet la diffusion de petites molécules. À l'intérieur, la membrane interne est sélectivement perméable et forme des replis, appelés crêtes mitochondriales ou cristae. Les deux membranes forment entre elles l'espace inter-membranaire et la membrane interne délimite la matrice mitochondriale. Image libre de droit créée par Mariana Ruiz Villarreal et traduite par Ethan Gray.

1.1.1.2. Génome

L'organisation de l'ADN mitochondrial (*Mitochondrial DNA*, MtDNA) est très conservée parmi les mammifères⁷. Chez l'humain, c'est une molécule circulaire d'acide désoxyribonucléique (ADN) double-brins de 16 569 paires de bases^{8,9} codant 37 gènes : 2 acides ribonucléiques (ARN) ribosomiaux et 22 ARNs de transferts ainsi que 13 protéines, toutes impliquées dans les mécanismes de phosphorylation oxydative¹⁰. De plus, le MtDNA possède des motifs en îlots

Cytosine-phosphate-Guanine (CpG) hypométhylés¹¹. La transmission du MtDNA est assurée par le gamète maternelle¹². Le MtDNA paternel apporté par le spermatozoïde est présent à un nombre de copies moindre ; il sera soit dilué¹³, soit dégradé après la fécondation¹⁴.

1.1.1.3. Origine évolutive

La communauté scientifique considère que l'origine de la mitochondrie provient de l'endosymbiose d'une α -protéobactérie. Parmi les différents génomes séquencés à l'heure actuelle, la bactérie ayant le génome le plus proche de la mitochondrie est celui de *Rickettsia prowazekii*¹⁵, elle aussi membre de l'embranchement des α -protéobactéries et agent pathogène responsable du typhus exanthématique¹⁶. Ainsi, la mitochondrie possède un certain nombre de caractéristiques bactériennes telles que la présence dans le MtDNA d'ilots CpG hypométhylés¹¹, l'initiation de la synthèse de protéines par un N-formylmethionyl-tRNA¹⁷ aboutissant à la production de peptides N-formylés ou encore la présence de cardiolipine dans la membrane mitochondriale interne¹⁸.

1.1.1.4. Synthèse et import de protéines

Le génome mitochondrial étant relativement restreint, la plupart des protéines mitochondriales sont codées par l'ADN nucléaire (nDNA). Leur synthèse se fait par la transcription d'ARN messagers (ARNm) issus du noyau puis par leur traduction en polypeptides. Ce mécanisme est effectué par les polysomes libres dans le cytoplasme ou bien liés à la membrane mitochondriale externe¹⁹ et nécessite le recrutement de facteurs adaptateurs tels que la protéine Puf3²⁰ ou l'interaction de la chaîne polypeptidique en cours d'élongation avec une translocase de la famille des TOM²¹. Les protéines traduites par les polysomes cytoplasmiques seront

prises en charge par des chaperonnes afin de permettre leur reconnaissance par un des différents complexes TOM²² et d'être acheminées vers les différents compartiments mitochondriaux à l'aide d'une machinerie de transporteurs composée de différents complexes des familles TOM, TIM et SAM². Enfin, la synthèse de protéines codées par le génome mitochondrial est assurée par les ribosomes mitochondriaux qui co-localisent préférentiellement avec les crêtes²³ afin de faciliter l'insertion de protéines co-traduites.

1.1.1.5. Fusion et fission

La morphologie du réseau mitochondrial est extrêmement dynamique et varie énormément d'un type cellulaire à un autre au fil de fusions et de fissions²⁴, mécanismes hautement régulés²⁵ permettant à la cellule de contrôler la qualité de ses mitochondries.

Au cours de la fusion, deux mitochondries entrent en contact²⁶ et chacune de leurs membranes externes et internes fusionneront avec leur homologue à l'aide de protéines de la famille des grandes GTPases. Les membranes externes des deux mitochondries s'uniront via les mitofusines Mfn 1 et Mfn 2²⁷ et les membranes internes, grâce à une protéine associée à la dynamine, OPA 1²⁸⁻³⁰. La fusion est un mécanisme permettant de brasser les protéines et le MtDNA au sein de la population mitochondriale d'une cellule, permettant ainsi de maintenir la fonctionnalité de cette population tout en évitant la perte de matériel génétique et, en aval, une atteinte des mécanismes de phosphorylation oxydative³¹.

La fission est un mécanisme au cours duquel des GTPases de la famille des *Dynamamin-like proteins* telles que DRP 1 forment une structure spiralée autour de la mitochondrie^{32,33} qui se resserre en hydrolysant le GTP, séparant ainsi une mitochondrie-mère en deux mitochondries-filles. La fission est un mécanisme important dans l'apoptose³⁴ ainsi que pour la survie des cellules en conditions de stress^{35,36}.

1.1.2. Rôles dans l'homéostasie

1.1.2.1. Le métabolisme énergétique

La fonction physiologique la plus connue de la mitochondrie est la génération d'énergie. Elle utilise le NADH et le FADH₂ issus de différentes voies métaboliques telles que la glycolyse³⁷, la β -oxydation³⁸ des acides gras ou encore le cycle de l'acide citrique (aussi appelé « cycle de Krebs »)³⁹. La phosphorylation oxydative permet la synthèse d'une forme d'énergie utilisable par la cellule ; l'adénosine triphosphate (ATP) par transfert de l'énergie libre (ΔG°) contenue dans les cofacteurs de la chaîne de transport d'électrons vers le dioxygène (O₂) issu de la respiration. Le premier complexe de la chaîne de phosphorylation oxydative est le complexe I ; NADH-Ubiquinone oxidoreductase oxyde deux molécules de NADH en transférant les électrons à l'ubiquinone (aussi appelée coenzyme Q, CoQ)⁴⁰. Le complexe II ; succinate-coenzyme Q reductase oxydera le succinate en fumarate tout en transférant des électrons au CoQ. Le CoQ étant une molécule lipophile, elle pourra donc être mobile au sein de la IMM et pourra se relocaliser jusqu'au complexe III ; ubiquinone-cytochrome C oxidoreductase pour que les électrons du CoQ soient transférés au cytochrome C (CytC), un autre type d'accepteur mobile d'électrons⁴¹. Le complexe IV ; cytochrome C oxidase transférera les électrons de 4 molécules de CytC à 8 protons⁴². Au cours des réactions d'oxydo-réduction catalysées par les complexes I, III et IV, des protons seront transférés de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, formant ainsi un gradient de protons ou potentiel de membrane. Celui-ci sera utilisé par le dernier complexe (V) ; F₁F₀ ATP synthase ; la force protomotrice du gradient fera pivoter la sous-unité γ du complexe F₁ permettant la synthèse réversible d'ATP⁴³ (Figure 2). Toutefois, ces mécanismes permettront aussi la formation d'un sous-produit de la phosphorylation oxydative, les ions superoxydes (O₂⁻), de la famille des espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS) et formés au cours de la

réaction entre un électron ayant diffusé au travers de la chaîne et l' O_2 ⁴⁴.

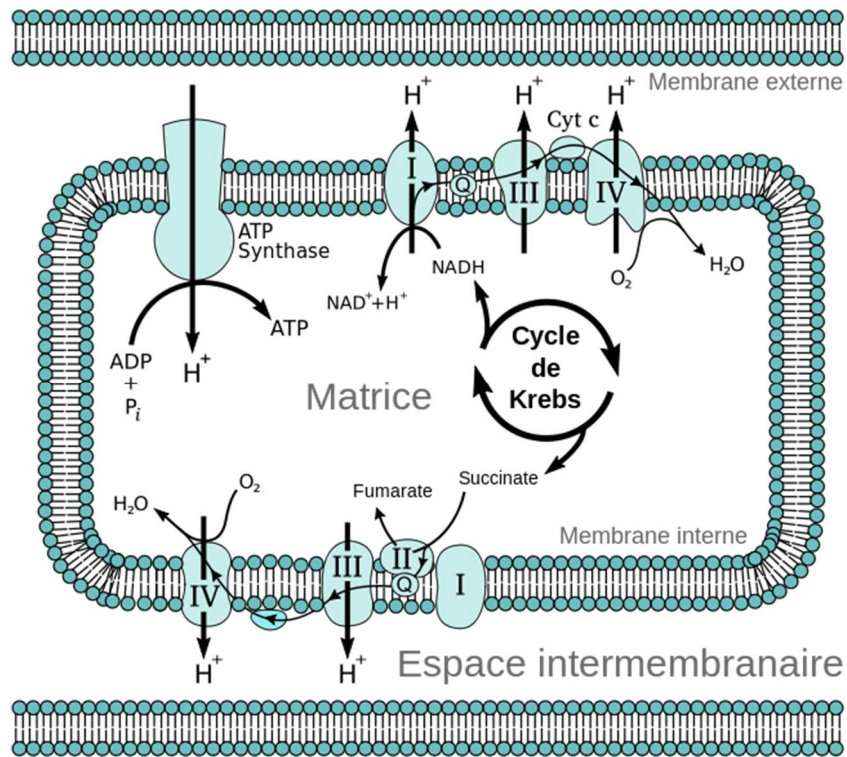


Figure 2 : Chaîne de phosphorylation oxydative. Les molécules nécessaires au fonctionnement du métabolisme énergétique sont acheminées à la mitochondrie. Le NADH et le succinate transféreront des électrons au CoQ à l'aide, respectivement des complexes I et II. Les électrons seront ensuite transférés par le complexe III depuis le CoQ en direction du CytC. Le complexe IV transfèrera les électrons du CytC à des protons, formant des molécules d'eau. Le fonctionnement des complexes I, III et IV occasionnera le passage de protons vers l'espace intermembranaire, formant ainsi un gradient. Le retour de ces protons en direction de la matrice mitochondriale se fera au travers du complexe V, exerçant une force qui permettra la formation d'ATP. Illustration libre de droits. **Légende :** Q ou CoQ : coenzyme Q

1.1.2.2. La stéroïdogénèse

Les mitochondries sont capables de transformer le cholestérol, à l'aide d'une machinerie enzymatique complexe, en différents types d'hormones stéroïdes. Le cholestérol nécessaire à ces voies métaboliques est synthétisé dans le réticulum endoplasmique (RE) ou bien capté dans la circulation par capture des

lipoprotéines en circulation⁴⁵ puis acheminé à la mitochondrie et transformé au travers de la voie endosomale^{46,47}. Enfin, le cholestérol sera transféré de la membrane externe à la membrane interne de la mitochondrie par la *steroidogenic acute regulatory protein* (StAR)⁴⁸. Il y sera ensuite converti par le cytochrome P450_{scc} (*side-chain cleavage*) en prégnénolone, précurseur commun des hormones stéroïdes qui pourra à son tour, être converti par les protéines de la famille du cytochrome P450 en autres types d'hormones stéroïdes⁴⁹.

1.1.2.3. La régulation du calcium intracellulaire

En sa qualité de second messenger⁵⁰, le calcium est un ion extrêmement important pour le fonctionnement de la cellule, ainsi, sa concentration cytosolique doit être finement régulée. La majeure partie de son stockage est assurée par le réticulum endoplasmique à l'aide de calcium ATPases et de protéines de séquestration (e.g. : la calréticuline)⁵¹. Toutefois, la mitochondrie participe aussi à cette régulation, d'une part par la proximité entre les deux organelles et la synthèse par la mitochondrie de l'ATP nécessaire au fonctionnement des pompes calciques, mais aussi à l'aide d'un transporteur calcique dépendant du potentiel membranaire de la mitochondrie, le *mitochondrial calcium uniporter* (MCU)⁵²⁻⁵⁴.

1.1.2.4. Le contrôle de l'apoptose

La mitochondrie est aussi impliquée dans la régulation de l'apoptose par la voie dite intrinsèque. Les membres pro-apoptotiques de la famille *B cell lymphoma-2* (Bcl-2)⁵⁵ provoqueront un changement de potentiel membranaire ainsi que la libération de CytC par la mitochondrie au travers du pore de transition de perméabilité⁵⁶. Le CytC permettra l'assemblage de *l'apoptotic protease activating factor-1* (APAF-1), permettant l'activation de la caspase 9 qui, à son tour, initiera l'apoptose^{57,58}.

1.1.2.5. La thermogénèse

Ce dernier rôle est spécifique des mitochondries localisées dans le tissu adipeux brun, présent chez les nouveau-nés ainsi que les animaux évolutivement adaptés aux climats froids ou hibernant⁵⁹. Ces mitochondries sont caractérisées par un potentiel de membrane réduit et une IMM davantage perméable aux protons⁶⁰. Ce mécanisme est dû à la présence d'une protéine spécifique, la *uncoupling protein-1* (UcP1). UcP1, en augmentant la perméabilité de l'IMM aux protons, permettra la génération de chaleur lorsque les protons retourneront vers la matrice mitochondriale⁶¹.

1.2. Les interactions entre la mitochondrie et le système immunitaire

La libération de sous-produits mitochondriaux ou de mitochondries entières (*freeMitos*) dans le milieu extracellulaire a été mise en évidence au cours de certains évènements tels que les dommages aux cellules, l'activation de certains types cellulaires tels que les plaquettes⁶², les mastocytes⁶³, les neutrophiles^{64,65} et les éosinophiles⁶⁶, ou encore certaines pathologies⁶⁷. Ces *freeMitos* exprimant des molécules d'origine bactérienne, elles pourront être reconnues par le système immunitaire inné ou bien stimuler l'immunité adaptative en étant phagocytées par les cellules présentatrices d'antigènes et leurs antigènes, apprêtés et présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II).

1.2.1. Avec l'immunité innée : Les DAMPs

Lors de la libération de mitochondries dans le milieu extracellulaire, certains motifs moléculaires exprimés par la mitochondrie pourront être reconnus par le système immunitaire inné de par leur origine bactérienne⁶⁸. Ces molécules sont appelées « motifs moléculaires associés aux dommages » (*Damage-Associated Molecular Patterns*, DAMPs)⁶⁹ (Figure 3).

1.2.1.1. L'ADN mitochondrial

A l'instar de l'ADN procaryotique, le MtDNA comporte des motifs en îlots CpG hypométhylés¹¹ ayant la capacité, en se liant au TLR9 exprimé par les cellules

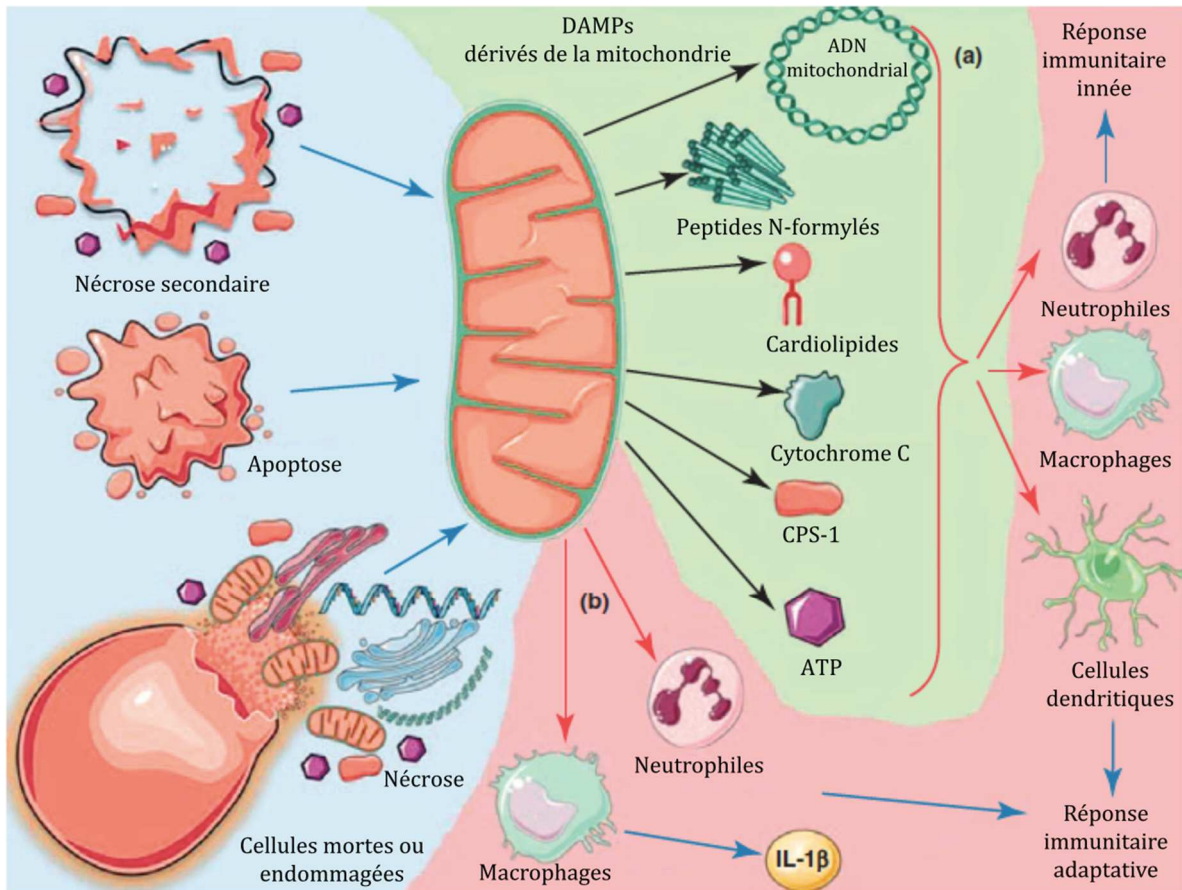


Figure 3 : DAMPs mitochondriaux. Les mitochondries, organelles intracellulaires peuvent être extrudées des cellules lors de différents évènements telles que les processus de mort cellulaire (apoptose ou nécrose) ainsi que lors de l'activation de nombreux types cellulaires (fond bleu). De par leur origine bactérienne, elles exprimeront différentes molécules telles que de l'ADN mitochondrial à motifs CpG hypométhylés, de la cardiolipine, du Cytochrome C ou de l'ATP extracellulaire (fond vert) ayant la capacité d'induire une réponse pro-inflammatoire (fond rouge). Illustration traduite de Krysko *et al*⁷⁰. **Légende :** ATP : adénosine tri-phosphate. CPS-1 : Carbamoyl Phosphate Synthetase I. DAMPs : motifs moléculaires associés au danger. IL-1 β : interleukine-1 β .

dendritiques plasmacytoïdes et les neutrophiles, de stimuler la production d'interféron (IFN) de type I⁷¹⁻⁷⁴. La présence de MtDNA extracellulaire est associée à certaines pathologies telles que le lupus érythémateux disséminé^{64,65}, la polyarthrite rhumatoïde⁷⁵, certains cancers⁷⁶, les traumatismes et brûlures sévères⁷⁷, les intoxications hépatiques à l'acétaminophène⁷⁸ ou encore le sepsis⁷⁹.

1.2.1.2. Les peptides N-formylés

L'ensemble des 13 polypeptides codés dans le génome mitochondrial correspond à des sous-unités enzymatiques de la chaîne de phosphorylation oxydative qui seront localisées dans la membrane interne de la mitochondrie. Ces protéines exprimeront toutes un motif N-formylé sur leur premier acide-aminé, or l'initiation de la traduction par un peptide formylé est une caractéristique qui souligne davantage l'origine bactérienne de la mitochondrie⁸. Les effets de la liaison des peptides N-formylés à leur récepteur, le FPR, exprimé à la surface des monocytes et des neutrophiles sont une induction de la production de ROS par la NADPH oxidase^{80,81} et un fort effet chemotaxique qui attirera ces cellules vers le site d'inflammation⁸².

1.2.1.3. L'ATP

Le métabolisme énergétique étant la fonction primordiale de la mitochondrie, elle est la source principale de production d'ATP intracellulaire. Lorsque celui-ci est libéré dans le milieu extracellulaire, il pourra se lier aux récepteurs des familles P2X et P2Y^{83,84}. La liaison de l'ATP extracellulaire sur ses récepteurs provoquera l'efflux de potassium, la polymérisation de l'inflammasome NLRP3 (*NOD-like receptor family, pyrin domain containing*), le clivage de la procaspase-1 et de l'IL1 β ⁸⁵. Il en résultera la formation d'un microenvironnement riche en IL6, IL8 et MCP1⁸⁶ (*Monocyte chemoattractant protein-1*) et propice au recrutement de neutrophiles⁸⁷.

1.2.1.4. La cardioline

La cardiolipine est un des phospholipides majeurs des parois bactériennes. Chez l'humain, elle est exclusivement localisée dans la mitochondrie et constitue environ 20% de leurs lipides membranaires^{88,89}. La cardiolipine est un phospholipide anionique constitué de deux phosphatidylglycérols situés en position sn-1 et sn-3 sur une molécule de glycérol⁹⁰. Le rôle physiologique de la cardiolipine est d'ancrer le cytochrome C au sein de la membrane interne de la mitochondrie⁹¹ et d'assurer l'organisation spatiale et fonctionnelle des éléments de la chaîne de phosphorylation oxydative. Les dysfonctions mitochondriales peuvent perturber la répartition des molécules de cardiolipine et mener à son expression dans la membrane externe, voir leur libération dans le milieu extracellulaire. La richesse de la cardiolipine en motifs non-saturés permettra son oxydation rapide⁹². La présence d'anticorps anti-cardiolipine (*anti-cardiolipin antibodies*, ACL) a été décrite dans différentes pathologies, telles que la syphilis secondaire, le syndrome des anti-phospholipides et le lupus érythémateux disséminé⁹³. Des anticorps naturels dirigés contre les cardiolipines oxydées localisées à la surface de corps apoptotiques ont été observés dans la polyarthrite rhumatoïde et leur taux sérique corrèle avec les risques cardio-vasculaires chez les patients arthritiques⁹⁴.

1.2.1.5. Le cytochrome C

Le cytochrome C est une protéine mitochondriale impliquée dans la chaîne de transport d'électrons au cours de la phosphorylation oxydative. Lors de l'initiation de l'apoptose par la voie mitochondriale, le cytochrome C est libéré dans le cytoplasme puis interagira avec le complexe APAF1 pour former l'apoptosome qui activera la caspase 9⁵⁷. Il est impliqué dans diverses pathologies telles que le lupus érythémateux disséminé⁹⁵, la polyarthrite rhumatoïde⁹⁶ ou encore, leur titre sérique peut être utilisé comme marqueur de pronostic pour la survie des patients atteints de Syndrome de réponse inflammatoire systémique (*Systemic inflammatory response syndrome*, SIRS)⁹⁷. Aussi, des anticorps dirigés contre le cytochrome C peuvent être détectés dans différentes connectivites dont le lupus⁹⁸.

1.2.1.6. Les espèces réactives de l'oxygène

Le terme « espèce réactive de l'oxygène » ou « ROS » décrit un sous-produit instable formé au cours d'une réaction chimique durant laquelle le dioxygène n'est pas totalement réduit. La source majeure de ROS endogène est la mitochondrie par la fuite d'électrons au travers de la chaîne de phosphorylation oxydative aboutissant à la formation d'O₂⁻. Les cellules assurent un contrôle de l'homéostasie des réactions *redox* par la clairance des ROS par la superoxyde dismutase, la catalase ou par oxydation du glutathion⁹⁹. Selon leur concentration, les ROS pourront avoir différents effets physiologiques tels que : signalisation cellulaire¹⁰⁰, différenciation^{101,102}, sénescence¹⁰³, prolifération¹⁰⁴, croissance¹⁰⁵, mort cellulaire programmée¹⁰⁶ et défense contre les pathogènes^{107,108}. Toutefois une concentration intracellulaire en ROS trop importante ou bien qui perdure peut être à l'origine de plusieurs phénomènes physiopathologiques tels qu'une dérégulation de l'apoptose, ou la modification des biomolécules pouvant aboutir à différentes pathologies telles que l'athérosclérose, les cancers, le diabète méllitus¹⁰⁹, les maladies neurodégénératives, le lupus ou la polyarthrite¹¹⁰.

1.2.2. Avec le système immunitaire adaptatif

1.2.2.1. Présentation des antigènes au système immunitaire

La présentation des antigènes est un procédé complexe au cours duquel une cellule expose des molécules à sa surface. Ceci permet aux cellules du système immunitaire de pouvoir évaluer l'état physiopathologique d'une cellule selon les antigènes qu'elle présente. Il existe deux voies distinctes de présentation des antigènes ; la voie du CMH-I qui assure la présentation, par la majorité des cellules

nucléés, des peptides endogènes et des antigènes issus de pathogènes intracellulaires et la voie du CMH-II, par les cellules présentatrices d'antigènes, de peptides exogènes¹¹¹. Toutefois, les mécanismes permettant la présentation des antigènes mitochondriaux au système immunitaire sont encore méconnus malgré la description de la présence d'anticorps dirigés contre la mitochondrie dans des pathologies telles que la cirrhose biliaire primitive (CBP).

1.2.2.2. La mitophagie, une voie de l'autophagie spécifique à la mitochondrie

L'autophagie est un processus non spécifique dédié à la dégradation d'éléments intra-cytoplasmiques endommagés ou obsolètes. Au cours de ce processus, un ensemble protéique complexe dont les composants majeurs sont la protéine Atg9, des protéines de la famille des PI3K et le système protéique *ubiquitin-like* s'assemble à proximité du réticulum endoplasmique et permet la formation d'une expansion membranaire, le phagophore¹¹². La structure ainsi formée se refermera en une structure vacuolaire à double membrane appelée l'autophagosome à l'aide de l'interaction de protéines situées aux marges de la structure telles qu'Atg9, Atg2, Atg13 et Atg8/LC3¹¹³. La maturation de l'autophagosome se fera ensuite par la déstabilisation des interactions des protéines de la famille Atg suite à la dégradation du PI3P localisé dans les membranes de l'autophagosome¹¹⁴ qui sera ensuite acheminé par le cytosquelette à proximité du système endo-lysosomal¹¹⁵. Ces deux systèmes fusionneront ensuite, à l'aide des protéines des familles SNARE, Rab-GTPases et d'attache à la membrane afin de permettre la dégradation du cargo du phagolysosome. Ainsi, l'autophagie permettra la présentation d'antigènes endogènes à la fois sur le CMH-II¹¹⁶, mais aussi sur le CMH-I^{117,118}.

La mitophagie est une voie de dégradation des mitochondries endommagées qui emprunte les mécanismes généraux de l'autophagie tout en leur conférant une

spécificité pour la mitochondrie à l'aide de récepteurs spécifiques et d'adaptateurs permettant le recrutement et la rétention de mitochondries à proximité du phagophore¹¹⁹. Ainsi l'externalisation de cardiolipines au sein de la membrane externe de la mitochondrie permettra la promotion de la mitophagie en se liant à LC3¹²⁰. La sérine-thréonine kinase *PTEN-induced putative kinase 1* (PINK1) pourra aussi être séquestrée à la surface des mitochondries endommagées, permettant le recrutement de la Parkin et la promotion de son activité ubiquitine ligase E3 et l'ancrage des mitochondries dans le phagophore¹²¹⁻¹²³.

Toutefois, une publication récente de Matheoud D *et al.*¹²⁴ propose que la présentation des antigènes mitochondriaux dans le cadre de la maladie de Parkinson n'est pas assurée par la mitophagie et la protéine PINK1, mais plutôt par la fusion de vésicules dérivées des mitochondries (*mitochondrial-derived vesicles*, MDV) avec l'endosome tardif à l'aide d'un mécanisme régulé par les protéines Rab7, Rab9 et Snx9.

1.2.2.3. La présentation de la cardiolipine par le CD1d

Parmi les différentes voies biologiques permettant la présentation des antigènes au système immunitaire, le CD1d permet la présentation de lipides et de glycolipides aux lymphocytes T (LT)¹²⁵. Le CD1d est une molécule du type *MHC-I like* qui appartient à une famille de cinq isotypes conservés dans l'évolution parmi les mammifères ; CD1a ; CD1b, CD1c, CD1d¹²⁶ et, bien que le mécanisme par lequel il s'associe avec les lipides soit méconnu, la structure de la molécule possède un profond repli tapissé de résidus hydrophobes qui semblent propices à nicher une chaîne carbonée d'acide gras¹²⁷. Ainsi, la cardiolipine pourra être associée au CD1d¹²⁸, ce qui permettra l'expansion de populations de LT $\gamma\delta$ restreintes au CD1d dans le foie et la rate, qui secrèteront de l'IFN- γ et du RANTES¹²⁹.

1.2.2.4. Historique et description des anticorps anti-mitochondriaux

Un ensemble d'anticorps dirigés contre la mitochondrie sont déjà décrits dans la littérature pour leurs associations cliniques avec différentes pathologies. Ainsi, il existe à l'heure actuelle 9 classes d'anticorps anti-mitochondriaux nommés AMA M1 à M9 (*anti-mitochondrial antibodies*) (Tableau 1). Ces anticorps sont dirigés contre des antigènes localisés dans la membrane interne (*i.e.* : M1, M2 et M7), dans l'espace inter-membranaire (*i.e.* :M4) ou dans la membrane externe (*i.e.* : M3, M5, M6, M8 et M9) de la mitochondrie. Leur caractérisation a, pour la plupart, été faite au cours de la seconde moitié des années 1980 selon des méthodes très standardisées de détection d'anticorps sériques dans différents cadres pathologiques. Toutefois, trente ans après leur identification, beaucoup de ces anticorps restent méconnus et les tests de dépistage en clinique n'ont que peu évolué.

AMA-M1 : cette première classe d'AMA a été décrite lors l'étude de faux positifs biologiques observés aux tests sérologiques de dépistage de la syphilis chez des patients ne présentant pas de signes cliniques de la maladie¹³⁰ ainsi que chez des patients lupiques¹³¹. L'isolation de la cardiolipine au début des années 1940 permit d'identifier ce phospholipide comme étant un des antigènes majeurs du test de Wasserman dont le réactif principal est un extrait de foie de nouveau-né décédé de syphilis congénitale ^{132,133}. Un test radioimmunologique fut ensuite développé¹³⁴ pour la détection d'anticorps anti-cardiolipine chez des patients lupiques ou présentant des évènements thrombotiques associés à un faux positif pour le test de détection de la syphilis. La présence d'ACL corrèle fortement avec les niveaux d'anticoagulant lupique, les évènements thrombotiques et thrombopéniques mais pas avec la présence d'anticorps anti-ADN (les anticorps anti-ADN de faible affinité

étants connu comme pouvant avoir des réactions croisées avec la structure de la cardiolipine¹³⁵⁻¹³⁷). Ce test a rapidement été adapté en test « froid » par dosage immuno-enzymatique sur support solide (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA)¹³⁸. Ainsi la cible des AMA-M1 a été identifiée comme étant la cardiolipine. La présence de ces anticorps est associée, en clinique, avec un diagnostic de syphilis secondaire, de syndrome des anti-phospholipides ou de lupus érythémateux disséminé.

AMA-M2 : Ces anticorps, ont été découverts par observation en immunofluorescence (IF) de la fixation d'anticorps sur des particules sub-mitochondriales (*Sub-mitochondrial particles*, SMP) préparées à partir de cœur de bœuf, de foie de rat ou de tissus adipeux brun. Initialement identifiés comme ciblant une sous-unité du complexe ATPase-F₁¹³⁹, des études subséquentes ont précisé la nature de la cible des AMA-M2. Un traitement à la trypsine ou au mercure des SMP abolit la fixation des anticorps en immunofluorescence, confirmant la nature lipoprotéique de la cible antigénique¹⁴⁰⁻¹⁴², le fractionnement des SMP a permis l'isolation de fractions contenant l'antigène M2 mais dépourvues du complexe ATPase-F₁^{139,143}, ainsi que l'identification par immunobuvardage de la présence de bandes reconnues par les AMA-M2^{144,145}. Ainsi, ces bandes correspondent à des sites d'homologie parmi différents membres de la famille du complexe *2-oxo acid deshydrogenase* dont la sous-unité E2 de la 2-oxoglutarate déshydrogénase, l' α -cétoglutarate déshydrogénase ainsi que la *dihydrolipoamide déshydrogenase-binding protein* et, majoritairement, la sous-unité E2 de la pyruvate déshydrogénase (PDC-E2)^{146,147}. L'ensemble de ces protéines est localisé dans la membrane mitochondriale interne et participe aux réactions de catabolisme alimentant la phosphorylation oxydative. Le dépistage des AMA-M2 par test ELISA est utilisé en routine comme marqueurs cliniques fiables associés à la cirrhose biliaire primitive.

AMA-M3 : Ces auto-anticorps ont été identifiés chez des patients ayant développé un lupus induit par les médicaments (*pseudo-lupus erythematosus*, PLE) suite à un traitement par la drogue Venocuran[®], indiquée dans le traitement des dysfonctions veineuses, et contenait plusieurs molécules dont la phénylbutazone (antipyrétique, anti-inflammatoire et analgésique), de l'extrait de marronnier d'inde (*Aesculus hippocastanum*), et du miroton ; un mélange de glycosides de différentes plantes dont le laurier rose (*Nerium oleander*), l'adonis de printemps (*Adonis vernalis*), le muguet (*Convallaria majalis*) et la scille maritime (*Urginea maritima*)¹⁴⁸. Le PLE induit par le Venocuran[®] est un syndrome proche du véritable lupus érythémateux disséminé et caractérisé par de la fièvre, des douleurs musculaires et articulaires, une pleurésie, des infiltrats pulmonaires, une endocardite, une myocardite ainsi que le développement, chez 90% des patients traités au long terme, d'anticorps anti-mitochondriaux sans anticorps anti-nucléaires¹⁴⁹. Le PLE induit par le Venocuran[®] est une maladie réversible après retrait du traitement ; certains patients pouvant conserver un faible titre d'AMA-M3 pendant plusieurs années. De plus, les patients ayant déjà développé un PLE et des AMA-M3 suite à un traitement au Vénocuran[®] peuvent présenter une ré-augmentation de leurs titre sérique en AMA-M3 suite à la prise d'autres médicaments contenant de la phénylbutazone¹⁵⁰. Une sensibilisation similaire n'ayant pas été observée suite à la prise des glycosides, la phénylbutazone a été considérée comme étant l'élément causal des effets secondaires du Vénocuran[®].

La caractérisation de la cible moléculaire des AMA-M3 s'est faite par différentes techniques. Premièrement, Le traitement de SMP à la trypsine n'abolit pas la reconnaissance antigénique, indiquant que l'antigène n'est pas de nature protéique. De même, l'extraction au chloroforme des SMP donne une fraction réactive aux séra de patients souffrant de PLE mais dépourvue d'activité ATPasique, indiquant que l'antigène ciblé par les AMA-M3 n'est pas localisé aux mêmes sites que ceux reconnus par les AMA-M2 dans le cadre de la CBP. Ensuite, le fractionnement de lysats mitochondriaux contre un gradient de sucrose a permis l'obtention d'une fraction possédant une activité antigénique M3-spécifique mais dépourvue d'antigènes reconnus par les anticorps

anti-mitochondriaux des sera de patients souffrant de CBP primitive. Enfin, des marqueurs enzymatiques associés avec des protéines de la membrane mitochondriale externe, telle que la NADH-Cytochrome C réductase insensible à la roténone se retrouvent dans cette fraction, indiquant que la cible des AMA-M3 est localisée dans la membrane mitochondriale externe¹⁵¹.

Les cas d'observation cliniques de PLE induit par le Venocuran® ayant disparu suite au retrait de la molécule du marché dans la fin des années 1970 pour ses effets secondaires, l'intérêt de la communauté scientifique pour les AMA-M3 s'est vite tari, ainsi la littérature à leur sujet est, à ce jour, assez succincte.

AMA-M4 : appelés à l'origine « *mixed-form antigens* », les anti-M4 sont des anticorps fixant le complément et observés chez les patients souffrant de manifestations sévères de CBP associée à une hépatite auto-immune (HAI)¹⁵²; appelées « forme mixte »^{153,154}. A l'origine, les anti-M2 et anti-M4 étaient indissociables¹⁴⁰ puis, par filtration d'un fractionnat de mitochondries sur gel de sepharose 6B, l'équipe du Dr. Peter Alfred Berg a mis en évidence la présence d'un antigène sensible à la trypsine (i.e. : M4) en l'absence de l'antigène M2 puis mesuré par test ELISA que les sera de patients souffrant de la forme mixte de la CBP-HAI possédaient des anticorps dirigés contre la sulfite oxidase, une protéine de l'espace inter-membranaire de la mitochondrie¹⁵⁵. Enfin, l'absorption des séra de ces patients sur colonne de sepharose 4B couplée avec la sulfite oxydase abolissait l'activité de fixation du complément des AMA-M4 sans modifier celle des AMA-M2. Ainsi, le dépistage des AMA-M4 dans les sera de patients atteints de CBP à valeur de pronostic quant à l'évolution de la maladie.

AMA-M5 : nommés ainsi par Labro *et al.* en référence aux anticorps AMA-M1 à M4 déjà décrits¹⁵⁶. En immunofluorescence, ils produisent un marquage cytoplasmique non spécifique d'organe sur des coupes de tissus issus de

différents mammifères et cette fluorescence peut être inhibée par absorption des anti-M5 sur des mitochondries entières. De plus, ces anticorps sont caractérisés par leur aptitude à fixer le complément et leur faible taux sérique. Étant très peu caractérisés dans la littérature, leur association avec la membrane externe¹⁵⁶ ou interne¹⁵⁷ de la mitochondrie est sujette à controverse. Pensés à l'origine comme étant, à l'instar des AMA-M1, dirigés contre la cardiolipine^{158,159}, les AMA-M5 ont ensuite été décrits comme étant effectivement associés avec les anticorps anti-phospholipides. Toutefois, les AMA-M5, les ACL, les anti- β_2 glycoprotein I (anti- β_2 GPI) et l'anticoagulant lupique (*lupus anticoagulant*, LA) constituent des populations d'anticorps distinctes¹⁶⁰. Les anti-M5 sont associés en clinique avec différentes pathologies auto-immunes telles que le lupus érythémateux disséminé (LED), le syndrome de Sjögren mais aussi le syndrome des anti-phospholipides¹⁶¹ (*anti-phospholipid syndrome*, APS) et causent divers symptômes vasculaires tels que des avortements récurrents, de l'anémie hémolytique et des thrombopénies¹⁶². Leur cible antigénique est, à ce jour, inconnue.

AMA-M6 : la première observation de ces anticorps anti-mitochondriaux s'est faite dans le sang de patients ayant développé une hépatite secondaire à un traitement par une molécule de la classe des inhibiteurs irréversibles de la monoamine oxydase, l'iproniazide (Marsilid®)¹⁶³, retirée du marché dans la majorité des pays à cause de ses effets secondaires^{164,165}. Ces anticorps ont la propriété de fixer le complément et de marquer en immunofluorescence les cellules des tubules proximaux du rein, les hépatocytes ainsi que les cellules de Langerhans du pancréas endocrine¹⁶⁶. Les AMA-M6 reconnaissent la monoamine oxydase B¹⁶⁷, une protéine localisée sur la membrane externe de la mitochondrie¹⁶⁸.

AMA-M7 : cette classe d'auto-anticorps est exclusivement décrite dans le sérum de patients souffrant de maladies cardiaques comme les cardiomyopathies idiopathiques, congestives ou hypertrophiques ou des myocardites aiguës¹⁶⁹. Ces

anticorps ne sont pas détectables en immunofluorescence, ni par test de fixation du complément (TFC) mais ont été mis en évidence par test ELISA direct en utilisant des SMP préparées à partir d'échantillons de cœur (bœuf), de reins (porc), et de pancréas, mais pas sur des échantillons de foie (rat). De même, les tests d'absorption avec des mitochondries abolissent totalement la fixation des anti-M7. Les AMA-M7 ont pu être co-purifiés en association avec la membrane mitochondriale interne. Leurs cibles ont ensuite été identifiées comme étant la sarcosine deshydrogénase¹⁷⁰ ainsi que des enzymes associées au flavine-adénine dinucléotide (FAD) de façon covalente¹⁷¹⁻¹⁷³.

AMA-M8 : uniquement détectés chez des patients souffrant de CBP positifs pour les AMA-M2. Les anti-M8 fixent le complément, et sont détectables par test ELISA mais pas par immunofluorescence¹⁷⁴. La cible antigénique de ces anticorps n'est pas connue, les seules informations disponibles dans la littérature quant à leur nature sont qu'ils sont sensibles à un traitement à la trypsine et localisés dans la membrane externe de la mitochondrie. Les AMA-M8 sont utilisés en clinique comme marqueurs d'activités de la maladie chez les patients atteints de CBP.

AMA-M9 : également associés à la CPB¹⁷⁵, ces anticorps ont été caractérisés suivant des protocoles similaires aux autres classes d'AMA. Ils peuvent être détectés dans les séras de patients par test ELISA en utilisant des SMP traités à la trypsine¹⁷⁶. Ainsi, les anti-M9 ont été identifiés comme ciblant des antigènes de la membrane mitochondriale externe. Deux déterminants antigéniques de 98 et 59 kDa ont été découverts par immunobuvardage¹⁷⁷ puis la cible antigénique des AMA-M9 a été caractérisée comme étant la glycogène phosphorylase à l'aide de l'éluion de séras de patients contre une colonne de 5'-AMP sépharose où l'enzyme avait au préalable été immobilisée¹⁷⁸. La détection des AMA-M9, en clinique, indique que le patient présente une forme précoce et parfois asymptomatique de CBP¹⁷⁶.

Tableau 1: Liste descriptive des anticorps anti-mitochondriaux

Classe d'AMA:	Antigène(s) ciblés :	Localisation :	Pathologie associée(s) :	Méthode(s) de détection :
Anti-M1	Cardiolipine	IMM	APS, LED, Syphilis	IF, ELISA, TFC
Anti-M2	Complexe 2-oxo acid deshydrogenase	IMM	CBP	IF, ELISA, TFC
Anti-M3	<i>Inconnu(s)</i>	OMM	PLE induit par le vénocuran	IF, ELISA, TFC
Anti-M4	Sulfite oxydase	OMM	CBP	ELISA, TFC
Anti-M5	<i>Inconnu(s)</i>	OMM?	APS, LED	IF, ELISA, TFC
Anti-M6	Monoamine oxydase B	OMM	Hépatites induites par l'iproniazide	IF, ELISA, TFC
Anti-M7	Sarcosine deshydrogénase	IMM	Cardiomyopathies	ELISA
Anti-M8	<i>Inconnu(s)</i>	OMM	CBP	ELISA, TFC
Anti-M9	Glycogène phosphorylase	OMM	CBP	ELISA

Légende : AMA : anticorps anti-mitochondriaux, APS : syndrome des anti-phospholipides, CBP : cirrhose biliaire primitive, ELISA : méthode immuno-enzymatique, IF : immunofluorescence, IMM : membrane mitochondriale interne, LED : lupus érythémateux disséminé, OMM : membrane mitochondriale externe, PLE : pseudolupus, TFC : test de fixation du complément

1.3. Les maladies auto-immunes à anticorps anti-mitochondriaux

1.3.1. La cirrhose biliaire primitive

1.3.1.1. Épidémiologie et facteurs de risques

La cirrhose biliaire primitive est une maladie affectant entre 40 et 400 personnes par million d'habitants en Europe et 22,39 malades par millions d'habitants au Canada¹⁷⁹. La maladie est caractérisée par un fort biais de genre en défaveur des femmes avec un ratio de dix femmes malades pour un homme ¹⁸⁰. Le fort taux de concordance familiale entre les jumeaux monozygotes¹⁸¹ atteints de CPB ainsi que parmi les parents aux premiers degrés suggèrerait une influence de l'hérédité¹⁸². Des facteurs environnementaux sembleraient aussi impliqués dans le développement de la maladie. Des mécanismes de mimétismes moléculaires avec des bactéries dont *Escherichia coli* ou *Novosphingobium aromaticivorans*^{183,184} peuvent mener au développement d'anticorps pouvant reconnaître des antigènes du soi tels que le complexe pyruvate deshydrogénase. L'exposition à des agents chimiques halogénés miméotropes semble aussi impliquée¹⁸⁵.

1.3.1.2. Physiopathologie

La maladie est spécifiquement caractérisée par la présence d'auto-anticorps sériques de type AMA-M2 dirigés contre les complexes de la famille du complexe 2-oxo acid deshydrogénase¹⁴⁶. D'autres antigènes mitochondriaux peuvent être ciblés dans le cadre de la CBP, telles que la *sulfite oxidase* (M4) ou la *glycogen phosphorylase* (M9). Les patients souffrent d'une destruction progressive des

canaux biliaires en lien avec une infiltration de lymphocytes autoréactifs (i.e. CD8⁺, CD4⁺, natural killer et LyB) par le biais du système porte. Ces cellules ciblent les antigènes mitochondriaux, et majoritairement, le complexe E2 de la pyruvate déshydrogénase (PDC-E2)^{186,187}. Bien que les mitochondries soient présentes dans l'ensemble des cellules nucléées, la réponse auto-immune observée dans la CBP est spécifiquement dirigée contre l'épithélium des voies biliaires, ce qui semblerait dû à une modification de PDC-E2 observée spécifiquement au cours de l'apoptose des cellules des voies biliaires¹⁸⁸.

1.3.1.3. Aspects cliniques : diagnostic et traitements

L'association américaine pour l'étude des maladies hépatiques (*American Association for the Study of Liver Diseases, AASLD*) recommande trois critères cliniques nécessaires afin de poser un diagnostic de CBP : la présence d'AMA dans le sérum, l'élévation des enzymes hépatiques – en particulier de la phosphatase alcaline (*alkaline phosphatase, AP*) et cholangite destructrice non suppurative¹⁸⁹⁻¹⁹¹. Les AMA ont historiquement été détectés par immunofluorescence, une technique longue et dont les résultats sont très variables selon l'expérimentateur. À l'heure actuelle, cette technique a été largement remplacée par des tests ELISA directs utilisant des protéines recombinantes pour les antigènes M2, M4 et M9 (respectivement : PDC-E2, sulfite oxidase et glycogen phosphorylase)^{190,191}. Le seul traitement ayant reçu l'approbation de la Food and Drug Association (FDA) est l'acide ursodésoxycholique qui agit en protégeant les cholangiocytes contre la cytotoxicité des acides biliaires, en stimulant la sécrétion de bile et en protégeant les hépatocytes contre l'induction de l'apoptose par la voie mitochondriale¹⁹². D'autres types de traitements existent, allant de l'utilisation de corticostéroïdes jusqu'à la transplantation hépatique¹⁹³.

1.3.2. Le lupus érythémateux disséminé

1.3.2.1. Épidémiologie et facteurs de risques

L'incidence mondiale du lupus érythémateux disséminé est estimée entre 12 et 104 malades pour 100 000 individus^{194,195}. À l'instar de beaucoup de maladies auto-immunes (e.g. la polyarthrite rhumatoïde, le syndrome de Sjögren, la CBP) le LED présente un fort biais de genre en défaveur des femmes avec un ratio de dix femmes malades pour un homme^{196,197}. Les facteurs de risques génétiques pour le développement de la maladie sont nombreux, touchant différents mécanismes tels que le système HLA, la régulation des leucocytes ou encore la réparation de l'ADN. Ainsi, on peut citer en exemple les haplotypes HLA-DRB1*03:01 et HLA-DRB1*15:01¹⁹⁸, les déficiences en éléments précoces de la voie classique du complément (i.e. :C1q, C2 et C4)¹⁹⁹, certains variants des récepteurs à la fraction cristallisable des IgG (i.e. FcγRI, RII et RIII)²⁰⁰ ou des polymorphismes de gènes impliqués dans la signalisation cellulaires tels que PTPN22²⁰¹ sont associés avec des risques accrus de LED. Certaines expositions environnementales sont aussi décrites comme pouvant être à l'origine de la maladie, telles que l'exposition aux rayonnements ultra-violet, le tabagisme²⁰², les expositions professionnelles à certains agents chimiques²⁰³, la mononucléose par mimétisme moléculaire entre le virus Epstein-Barr et certains antigènes observés dans la maladie²⁰⁴, la prise de contraceptifs oraux ou de traitements hormonaux contre la ménopause²⁰⁵.

1.3.2.2. Physiopathologie

Le LED est une maladie auto-immune inflammatoire systémique caractérisée par des anomalies vasculaires, une dérégulation du système immunitaire et la présence de nombreux auto-anticorps de différents isotypes, monomériques ou organisés en complexes immuns²⁰⁶. Ces désordres peuvent virtuellement affecter tous les organes ; la manifestation clinique la plus couramment décrite étant la

néphrite lupique. Parmi les auto-anticorps lupiques, les anti ADN-double brins (*anti-double stranded DNA*, ds-DNA) et les anticorps anti-Smith (Sm) sont spécifiquement détectés chez les patients lupiques alors que d'autres tels que les ACL ou les AMA-M5 peuvent être associés à d'autres pathologies (e.g. le syndrome des anti-phospholipides)^{160,207}. Sur le plan cellulaire, la maladie est caractérisée par l'activation et la mobilisation des cellules immunitaires. Les neutrophiles migrent aux sites d'inflammation pour relarguer un filet d'ADN contenant du matériel génétique d'origine nucléaire et mitochondriale, nommé *neutrophil extracellular trap* (NET)^{64,65,87}. La présence de *B-cell activating Factor* (BAFF), d'IFN- α , d'interleukine-4 (IL-4), d'IL-6 et l'engagement du TLR9 aboutira à la formation de centre germinatifs²⁰⁸ où des LyB auto-réactifs pourront proliférer par défaut de sélection négative. Les LT seront aiguillés vers une différenciation de type T auxiliaire (*T helper*) et une réponse à l'IL-2 amoindrie qui permettra une production d'anticorps accrue par les LyB. L'implication d'autres types cellulaires telles que les cellules dendritiques²⁰⁹, les mastocytes⁶³, les cellules endothéliales²¹⁰ et les plaquettes^{62,211,212} est aussi décrite dans la maladie. L'ensemble de ces évènements aboutissant à l'apparition progressive d'auto-anticorps durant le développement de la maladie (*epitope spread*).

1.3.2.3. Aspects cliniques : diagnostic et traitements

Le LED étant une maladie dont les symptômes sont extrêmement variables d'un individu à l'autre, il est très difficile pour les équipes médicales de poser un diagnostic. Il est ainsi fréquent que les malades ne soient pris en charge que tard au cours du développement de la maladie. L'*American College of Rheumatology* (ACR) a, pour ce faire, édité des recommandations^{213,214} : un patient sera considéré comme souffrant du LED s'il présente – simultanément ou dans le temps – quatre critères cliniques parmi les onze listés. Les traitements offerts dans le LED sont très variés. Les anti-malariques tels que l'hydroxychloroquine sont des

médicaments de première ligne thérapeutique qui permettent d'inhiber la formation du phagosome et ainsi inhiber la synthèse d'IFN- α et la présentation d'antigènes²¹⁵. Les corticostéroïdes permettent une forte inhibition des systèmes immunitaires innés et adaptatifs²¹⁶, mais d'autres immunomodulateurs tels que le cyclophosphamide ou l'azathioprine peuvent aussi être administrés. Des IgG peuvent aussi être injectés par voie intraveineuse (*Intravenous Immunoglobulin G*, IVIG)²¹⁷. De nouvelles thérapies sont aussi en cours d'essais cliniques, ciblant les LyB (e.g. : rituximab)²¹⁸ ou bien les cytokines telles que l'IFN- α (MEDI-545)²¹⁹ ou l'IL-6 (tocilizumab)²²⁰ sont actuellement à l'étude. Un anticorps monoclonal humain ciblant la forme soluble de BAFF (belimumab/benlysta[®]) a été le premier élément de thérapie ciblée ayant montré, en 2011, son efficacité dans un essai clinique randomisé puis à être approuvé par la *US Food and Drug Administration* (FDA) comme traitement du lupus à destination des patients adultes²²¹. Ce traitement permet une diminution des autoanticorps lupiques ainsi qu'une normalisation des niveaux du complément, mais présente un coût élevé ainsi qu'une déplétion des LyB²²². Son intérêt clinique est encore limité mais constitue une piste d'intérêt en recherche pour la compréhension de la pathogénèse de la maladie vis-à-vis de l'association de BAFF en hétérodimère avec la protéine *a proliferation-inducing ligand* (APRIL)²²³. Ainsi, l'émergence de nouveaux traitements contribue à la fois en, clinique à l'amélioration de la prise en charge de la maladie et de la qualité de vie des patients, mais aussi en recherche avec la découverte de nouveaux mécanismes physiopathologiques pouvant être impliqués dans d'autres cadres que le LED.

1.3.2.4. Le modèle murin inductible de LED

Parmi les nombreux modèles murins de LED disponible dans la littérature²²⁴, nous avons choisi d'utiliser un modèle murin inductible de LED décrit par l'équipe de notre collaboratrice, le Dr. Joyce Rauch (Université McGill)²⁰⁷ afin de développer nos tests ELISA. Ce modèle, présenté en détails dans la section III.2, est

caractérisé par la rupture de la tolérance de l'animal envers différents antigènes associés aux vésicules apoptotiques, suite à l'injection couplée de β_2 GPI humaine et de lipopolysaccharides (LPS). Le LPS permet l'induction d'une réponse T-spécifique au long-terme, caractérisée par la production séquentielle (i.e. *epitope spread*) de plusieurs auto-anticorps lupiques (i.e. anti- β_2 GPI et ACL en premiers puis anti-Ro/SS-A, -La/SS-B et anti-dsDNA; et enfin, les anti-nRNP and anti-Sm). Le développement d'une séquence similaire d'auto-anticorps a été observé chez l'humain au cours du stade pré-clinique de la maladie. Ce modèle présente différents avantages pour notre équipe. Les souris expriment les premiers auto-anticorps lupiques dès deux semaines après le premier cycle d'injection, que certains de ces anticorps sont détectés à des titres extrêmement élevés (e.g. les IgG anti- β_2 GPI sont détectables à une dilution supérieure au 1:1000, deux semaines après la première injection). Des dommages aux reins proches de ceux observés dans la glomérulonéphrite lupique ont aussi été observés lorsque les auteurs ont poursuivi le protocole durant 3.5 mois. Ce modèle représente ainsi un outil efficace et rapide permettant d'obtenir des échantillons de souris récapitulant la période pré-clinique du LED humain. Le principal défaut de ce modèle est le coût très élevé de la β_2 GPI humaine.

1.3.3. Le syndrome des anti-phospholipides

1.3.3.1. Épidémiologie et facteurs de risques

La prévalence du syndrome des anti-phospholipides (*antiphospholipid syndrome*, APS) est assez variable selon les sources disponibles dans la littérature. Selon l'anticorps et l'isotype étudié, la fréquence des individus sains présentant des anticorps anti-phospholipides (APL) est évaluée entre 1 et 5%, 12 à 50% chez les personnes âgées et entre 11 et 86% chez les patients lupiques²²⁵ ainsi qu'un biais de genre de en défaveur des femmes (3,5:1)²²⁶. Les facteurs de risques pour le développement de la maladie sont : la présence de certains allèles de l'HLA²²⁷,

une exposition à certains agents pathogènes²²⁸, des antécédents d'évènements thrombotiques²²⁹, la présence d'anticoagulant lupique (*lupus anticoagulant*, LA)²³⁰, un fort titre sérique en ACL-IgG²³¹ et l'âge²²⁵.

1.3.3.2. Physiopathologie

L'APS est une maladie auto-immune systémique caractérisée par un ensemble de troubles vasculaires dus à des thrombi ou des embols tout au long du système cardiovasculaire donc des microangiopathies, de l'ischémie, et des avortements spontanés. Ces désordres sont liés à la présence d'APL, un groupe d'anticorps hétérogène dirigés contre différents phospholipides dont les ACL, à des anticorps anti- β_2 GPI et au LA²³². Toutefois, ces anticorps ne constituent qu'une première étape (*first hit*) ne permettant la thrombose qu'en présence d'un élément déclencheur (*second hit*) tel que l'inflammation ou un trauma²³³. Les plaquettes des patients souffrant d'APS seront activées par la fixation de complexes anti- β_2 GPI/ β_2 GPI dimérique, aboutissant à la production de 11-dehydro-thromboxane B2 par le biais d'une voie biologique dépendante de la p38 mitogen activated protein kinase (MAPK)²³⁴. Les cellules endothéliales et les monocytes sont aussi activés au cours de l'APS, mais le mécanisme est encore méconnu. Les APL provoqueraient – via une voie dépendante de p38 MAPK²³⁵ et du facteur nucléaire κ B (*nuclear factor κ B*, NF- κ B)²³⁶ – une surexpression des IL-6, IL-8 et du facteur tissulaire (*tissue factor*, TF)²³⁷ ainsi que l'expression de molécules d'adhésion telles que la *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1), l'*intercellular cell adhesion molecule 1* (ICAM-1) et la Sélectine-E²³⁸. Les APL pourront aussi perturber les voies de l'hémostase, notamment en perturbant l'assemblage et la fonction de la protéine C activée (*Activated protein C*, APC) qui ne pourra plus inactiver les facteurs de coagulations V et VIII²³⁹. Ainsi la somme de ces mécanismes sera à l'origine du phénotype pro-thrombotique observé chez les patients.

1.3.3.3. Aspects cliniques : diagnostic et traitements

Une grille de classification pour l'APS a été rédigée au cours d'un atelier en marge du huitième symposium international sur les anticorps anti-phospholipides²⁴⁰. Pour être diagnostiqué comme souffrant d'APS, un patient devra remplir au moins un critère clinique et un critère biologique. Les malades seront ainsi classifiés comme souffrant d'APS primaire (i.e. : sans association avec une autre maladie auto-immune) ou secondaire (i.e. : APS associé avec une autre maladie)²⁴¹. De l'aspirine²³⁷ ou de l'hydroxychloroquine²⁴² peuvent être recommandés aux patients à risques, en tant que traitements prophylactiques. La médication la plus courante, dans le cadre d'un APS avéré est l'administration d'anticoagulants (e.g : héparine, warfarine), mais elle comporte un risque important d'hémorragies subséquentes pour le patient. D'autres médicaments sont envisageables tels que les glucocorticoïdes²⁴³ qui permettent une inhibition de la voie NF-κB, la plasmaphérèse²⁴⁴, l'injection d'IVIg²⁴⁵ et les immunomodulateurs tels que le cyclophosphamide²⁴⁶.

1.4. Les méthodes de détection des auto-anticorps.

1.4.1. Par immunofluorescence

L'IF indirecte est une technique au cours de laquelle une coupe histologique est marquée à l'aide d'anticorps présents dans un échantillon biologique. Une seconde étape de marquage à l'aide d'un anticorps secondaire, marqué à l'aide d'un fluorochrome et dirigé contre les anticorps primaires, permettra une amplification du signal lors de son observation à l'aide d'un microscope à fluorescence²⁴⁷. À l'heure actuelle, les anti-M2 et anti-M5 sont les seuls AMA diagnostiqués en

routine par IF. Les AMA-M2 forment un marquage filamentogranulaire périnucléaire qui s'atténue en direction de la périphérie du cytoplasme. Ils sont détectés par la technique de référence ; l'IF sur triple substrat (i.e. : foie, estomac et rein de rat) avec une forte fluorescence observée sur des coupes de tubules rénaux proximaux ainsi que ces cellules pariétales de l'estomac²⁴⁸. Un titre supérieur à 1:100 constituera une indication de CBP qui devra être confirmée par un test ELISA ²⁴⁹. À l'inverse, les AMA-M5 sont caractérisés par un fort marquage des tubules rénaux proximaux de rat, par la décroissance de cette fluorescence dans les tubules distaux ainsi que par l'absence de marquage sur coupe de cellules pariétales gastriques humaines²⁵⁰. Cette technique est efficace lorsque l'indication clinique pointe vers la recherche d'un sous-type d'AMA spécifique mais repose sur l'expérience de l'observateur.

1.4.2. Par méthode immuno-enzymatique

La méthode immuno-enzymatique directe (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) est une technique de détection de la présence d'anticorps dans un échantillon biologique. Les antigènes sont immobilisés à la surface d'une plaque de polystyrène (*coating*). Une étape de blocage permettra ensuite de prévenir la fixation non spécifique d'anticorps sur les antigènes. Les séra à analyser seront ensuite incubés et le marquage amplifié à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à une enzyme chromogène puis révélé à l'aide du substrat idoine. L'absorbance sera ensuite mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque^{251,252}. Les données d'absorbance obtenues seront comparées à des séra standards afin de déterminer si un échantillon est positif ou non. En clinique, les ELISA dirigés contre les AMA viennent souvent en complément d'autres types de diagnostics. Les plus courants étant les tests permettant la détection des AMA-M1²⁵³ et -M2²⁵⁴ car leurs cibles antigéniques ont été identifiées avec précision et qu'ils permettent de poser un diagnostic clinique fiable. Les avantages majeurs de l'ELISA sont son coût

modéré, ses fortes sensibilité et spécificité, le fait que cette technique peut être confiée à un technicien peu expérimenté et la possibilité d'automatiser cette procédure²⁵⁵.

1.4.3. Autres méthodes – détection des anti-ADN double-brins.

Ces tests permettent la détection d'anticorps anti-ADN double brins (*double stranded DNA*, DsDNA), mais ne discriminent pas les anticorps ciblant le MtDNA de ceux dirigés contre le nDNA²⁵⁶. Il est toutefois intéressant de présenter ces techniques car le contenu du présent mémoire présente le développement d'un test ELISA direct permettant la détection d'anticorps anti-MtDNA (*anti-mitochondrial DNA antibodies*, AMtDNA).

1.4.3.1. Le test radioimmunologique de Farr

Le test de Farr consiste à l'incubation de sérum de patient avec de l'ADN génomique, radiomarké aux carbones 12 et 14 (C¹² et C¹⁴), puis à la précipitation du mélange à l'aide de sulfate d'ammonium [(NH₄)₂SO₄]²⁵⁷. Cette étape permettra de dissocier les complexes anti-DsDNA/DsDNA de faible avidité et donc de précipiter les anticorps de forte avidité qui se sont fixés à l'ADN radiomarké, l'ADN libre restant dans le surnageant^{258,259}. Les anticorps anti-DsDNA fixés seront alors détectés en mesurant la radioactivité de l'ADN associé à l'aide d'un détecteur à scintillation. L'intérêt de la détection d'anticorps de forte affinité réside dans leur plus forte association avec le LED ainsi que dans leur valeur prédictive chez des patients remplissant moins que quatre des critères de diagnostic établis par l'ACR²⁶⁰. Les laboratoires cliniques tendent à tourner le dos à cette technique à cause de sa longueur et des risques inhérents à l'utilisation de matériel

radioactif²⁶¹.

1.4.3.2. Le *Crithidia luciliae* immunofluorescence test (CLIFT)

Ce test provient de l'observation de motifs de fluorescence spécifiques en IF, mais que les méthodes courantes à l'époque ne permettaient pas de distinguer efficacement la fluorescence liée à la présence d'anticorps anti-DsDNA de celle liée aux autres types d'anticorps anti-nucléaires (*anti-nuclear antibodies*, ANA)^{262,263}. Ainsi, Aarden et al. ont mis au point une technique d'IF utilisant *Crithidia luciliae*, un parasite protozoaire flagellé de la mouche. L'intérêt de cet organisme réside dans l'aisance avec laquelle il peut être cultivé, sa non-pathogénicité pour l'homme et la présence dans son cytoplasme d'une mitochondrie géante où le MtDNA est dépourvu d'histones²⁶⁴ et est concentré en un réseau appelé le kinétoplasme. Cette technique est toujours utilisée en laboratoire d'analyses médicales pour sa simplicité^{265,266}. Elle constitue toujours un bon choix, spécifique et sensible²⁶⁷, pour le diagnostic de la présence d'anti-DsDNA dans le cadre du LED²⁶⁸. Des méthodes d'automatisation du CLIFT sont en cours de développement²⁶⁹.

Chapitre 2 : Problématique, hypothèse de recherche et objectifs.

2.1. Problématique

Les mitochondries sont au centre des mécanismes de production énergétique et de signalisation de la cellule. Des milliards d'années se sont écoulées depuis l'endosymbiose de l' α -protéobactérie ayant donné naissance à l'organelle. Toutefois, la mitochondrie a conservé certaines caractéristiques procaryotiques tels que l'ADN à motifs CpG hypométhylés, les peptides N-formylés ainsi que la composition en lipides de ses membranes. Bien qu'intracellulaire, la libération dans la circulation de mitochondries, de sous-produits mitochondriaux ou la synthèse excessive de ROS, subséquemment à différents événements (e.g. : traumas, activation cellulaire), sont décrits dans un contexte aigu, comme exerçant une influence pro-inflammatoire sur le système immunitaire inné.

Ainsi, la présence de mitochondries extracellulaires, entières et fonctionnellement actives, est quasiment indétectable chez les sujets sains alors qu'elles sont aisément identifiables dans le sang des patients lupiques, même en période de rémission. Les ROS mitochondriaux permettent la libération d'un filet d'acides nucléiques, contenant du MtDNA oxydé, par les neutrophiles des patients lupiques au cours de la NETose. La présence d'anticorps anti-mitochondriaux (i.e. : Anti-M2, -M4, -M8 et -M9) est connue dans le cadre de la CBP et la détection des AMA-M2 en constitue un critère de diagnostic clinique. Enfin, le syndrome des anti-phospholipides est caractérisé par la présence, en circulation, d'anticorps anti-cardiolipine (Anti-M1), d'AMA-M5 et d'anti-*heat shock protein 60* (anti-Hsp60).

Malgré cet ensemble d'éléments, l'impact de la présence chronique de freeMitos

en circulation et leurs interactions avec l'immunité adaptative aboutissant à la présence d'AMA restent, à ce jour, obscurs. De même, l'impact de l'oxydation de molécules endogènes par les ROS mitochondriaux et l'influence de ce type de modifications sur la production d'auto-anticorps dans le contexte de l'auto-immunité est encore méconnue.

2.2. Hypothèse

Notre hypothèse est que les mitochondries extracellulaires ainsi que leurs sous-produits sont à l'origine de la génération d'auto-anticorps observés dans le cadre de certaines maladies auto-immunes telles que le LED, l'APS ou la CBP. Nous pensons aussi que l'oxydation d'épitopes endogènes par les ROS mitochondriaux peut mener à leur reconnaissance par le système immunitaire adaptatif, aboutissant à la production d'auto-anticorps. Dès lors, les mitochondries pourraient être utilisées afin de développer de nouvelles méthodes de détection des AMA et que leur présence corrèle avec certains paramètres cliniques du LED, permettant ainsi la création d'un nouveau type de test diagnostique, pronostic ou permettant la stratification des patients lupiques.

2.3. Objectifs

Le but de cette étude vise au développement d'une nouvelle gamme de tests ELISA directs permettant la détection spécifique d'anticorps ciblant des antigènes mitochondriaux variés et non-redondants et utilisables avec différents liquides biologiques. Pour ce faire, nous avons établi une démarche expérimentale en trois étapes :

- Optimisation de protocoles visant à l'isolation de mitochondries intègres et de MtDNA.

- Création et mise au point de tests ELISA directs visant à la détection de plusieurs cibles d'origine mitochondriale, telles que les mitochondries entières natives ou oxydées et le MtDNA à l'aide d'un modèle murin inductible de LED ainsi qu'avec des échantillons de séra de patients souffrant de différentes pathologies (LED, APS, CBP)
- La détection d'anticorps ciblant les mitochondries au sein de deux cohortes, l'une établie à Toronto et comprenant des patients souffrant de LED et d'APS et la seconde – réalisée à Québec, constituée exclusivement de patients lupiques. Puis une analyse biostatistique des résultats afin de déterminer les corrélations entre les niveaux d'anticorps mesurés et les paramètres cliniques caractérisant les malades.

Chapitre 3 : Matériel et méthodes.

3.1. Cohortes

Les échantillons biologiques humains proviennent de deux cohortes différentes, obtenues en collaboration avec le Dr. Paul R. Fortin, rhumatologue au CHU de Québec (CHUQ, Québec, Qc, Canada).

La première est une cohorte prospective financée par la Société de L'arthrite (subvention n. 225638) et établie à la clinique du lupus de l'université de Toronto (*university of Toronto lupus clinic*, UTLC. Toronto, Ontario, Canada). Les patients lupiques inclus dans cette cohorte ont été suivis en clinique, des échantillons de plasma, de sérum ainsi que des informations démographiques et cliniques ont été collectés (Tableaux supplémentaires 1-3).

La seconde cohorte des maladies rhumatismales auto-immunes systémiques (MRAS) est établie au CHU de Québec et a reçu l'approbation du comité d'éthique de la recherche (CER) du CHU de Québec-Université Laval. Cette cohorte, en cours de recrutement comprendra à terme 120 patients. Au moment où les expériences présentées ont été réalisées, 66 patients avaient été recrutés. La banque comprend des échantillons de plasma et de sérum et la base de données regroupe les informations relatives aux données démographiques et cliniques des patients suivis (Tableaux supplémentaires 1-3).

Les séra de patients souffrant de CBP ont été obtenus du Dr. Éric Wagner (Centre de Recherche du CHU de Québec, Québec, Qc, Canada).

3.2. Animaux de laboratoire

Notre projet a été approuvé par le comité éthique institutionnel du centre hospitalier de l'université Laval (CHUL). Les recommandations du conseil

Canadien de protection des animaux (CCPA) ont été respectées durant les protocoles approuvés par le Comité de protection des animaux de l'Université Laval (CPAUL). Pour notre étude, nous avons utilisé un modèle murin inductible de LED caractérisé dans la littérature²⁰⁷. Brièvement, des souris C57BL/6J âgées de 6 à 8 semaines ont reçu une injection intraveineuse (iv) d'une solution stérile de 200 µg/mL de β_2 GPI (Crystal Chem, Downers Grove, IL, Etats-Unis) dilué dans du tampon phosphate salin (*Phosphate buffered saline*, PBS. Wisent, Montréal, Qc, Canada. Cat. L2630). Cette injection a été suivie, après 24 heures, d'une seconde injection iv de lipopolysaccharide (LPS. Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, États-Unis. Cat. L2630). Ces deux injections ont été répétées tous les quinze jours. Des prélèvements de sang sans anticoagulant ont été effectués par ponction mandibulaire 48 heures avant chaque injection de β_2 GPI. Les échantillons de sang ont été incubés à température ambiante (température pièce, TP) jusqu'à coagulation, puis les séra ont été prélevés après centrifugation à 10 000 g, à TP, pendant 10 minutes. Les séra ont été conservés à -80°C. Ce modèle murin a été comparé à des souris de mêmes âges et fonds génétiques, mais n'ayant reçu que des injections de PBS. Les foies utilisés pour les protocoles d'isolation des mitochondries ont été prélevés sur des souris C57BL/6J. L'ensemble de ces animaux a été élevé en animalerie de grade *specific pathogen free* (SPF) *elite plus* (Animalerie du Bloc R, CHUL, Québec, Qc, Canada)

3.3. Matériel et préparation des tampons

Le chapitre ci-dessous décrit la composition des différents tampons utilisés au cours du projet. L'ensemble de ces solutions a été préparé en diluant leurs constituants dans de l'eau déionisée. Les tampons phosphate salin, d'isolation et de purification des mitochondries ont été préparés stérilement et filtrés contre un filtre à membrane de polyethersulfone avec un maillage de 0,22 µm (Corning, New York, Etats-Unis. Cat. 431160). Les solutions concentrées seront diluées à une concentration de 1X pour les expériences au cours desquelles ils ont été

utilisés.

Tampon phosphate salin (PBS) : Une préparation de PBS maison a été utilisée pour l'ensemble des expériences du projet, à l'exception des injections aux souris pour lesquelles un équivalent commercial et stérile a été utilisé. Il contient 137 mM de chlorure de sodium (NaCl. VWR, Radnor, PA, Etats-Unis. Cat. CASX0429-5), 3 mM de chlorure de potassium (KCl. VWR. Cat. CAPX1405-1), 19 mM de phosphate disodique (Na₂HPO₄. VWR. Cat. CASX0720-1), et 2 mM de Phosphate de potassium monobasique (KH₂PO₄. VWR. Cat. CAPX1565-1) qui ont été dissouts dans de l'eau deionisée puis le potentiel hydrogène (pH) a été ajusté à 7,4.

Tampon Tris salin (*Tris buffered saline*, TBS) : 50 mM de Tris et 150 mM NaCl ont été dissouts dans de l'eau déionisée, puis le pH a été ajusté à 7,5. Pour les expériences d'immunobuvardage, du TBS-Tween a été préparé en ajoutant 1% de Tween20 (Fischer scientific, Hampton, NH, Etats-Unis. Cat. BP337-100).

Tampon d'isolation des mitochondries : 10 mM Tris, 1 mM d'EGTA (VWR. Cat. CA99501-812), 200 mM sucrose (VWR. Cat. 8510), pH 7,4.

Tampon de purification des mitochondries : 10 mM Tris, 1 mM EGTA, 30% percoll (GE healthcare, Little Chalfont, Royaume-Uni. Cat. 17-0891-01), pH 7,4.

Tampon de charge pour immunobuvardage (*Laemmli buffer*, LB) : Ce tampon a été préparé à une concentration de 5X avec les composants suivants : 10% dodécylsulfate de sodium (*Sodium dodecylsulfate*. SDS. Invitrogen, Carlsbad, CA, Etats-Unis. Cat. 15525-017), 50% glycérol (Fischer Scientific. Cat. BP229-4), 25% β-mercaptoéthanol (Fischer Scientific. Cat. BP176100), 0,01% de bleu de bromophénol (Fischer Scientific. Cat. BP114-25) et 1,5M Tris-HCL, pH 6,8.

Tampon pour tests métaboliques (Mitochondrial assay solution, MAS) : 70 mM sucrose, 220 mM mannitol, 10 mM KH_2PO_4 , 5 mM MgCl_2 , 2 mM HEPES, 1 mM EGTA, 0,2% (m/v) de BSA sans acide gras, pH 7,2.

3.4. Méthodes

3.4.1. Culture cellulaire

Des cellules d'hépatocarcinome humain de la lignée HepG2 (American Type Culture Collection. ATCC. Manassas, VA, États-Unis) ont été cultivées à 37°C et 5% de CO_2 dans un milieu de culture *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM. Wisent. Cat. 320-026-CL) supplémenté avec 10% de sérum foetal de bœuf (*foetal bovine serum*, FBS. Wisent. Cat. 080-150), des acides aminés non essentiels (Wisent. Cat. 321-011-EL), de la pénicilline et de la streptomycine (Wisent. Cat. 450-201-EL).

3.4.2. Préparation des mitochondries

Un protocole d'isolation des mitochondries a été mis au point afin de pouvoir isoler un matériau d'une qualité satisfaisante pour permettre à la fois de pouvoir en isoler du MtDNA ou bien pour l'utiliser en tant qu'antigène de couverture pour un protocole d'ELISA direct. Ce protocole vise à mettre en évidence la présence d'AMA dans des échantillons biologiques par ELISA direct. La majeure partie des expériences du projet a été réalisée à l'aide de mitochondries obtenues à partir de foie de souris. Toutefois, dans certains cas, des mitochondries isolées à partir de cellules HepG2 ont aussi été utilisées.

Mitochondries murines : Le protocole d'isolation des mitochondries par centrifugation différentielle a été adapté à partir d'une publication de Frezza C. *et al*²⁷⁰. Un foie de souris fraîchement prélevé a été tranché en morceaux puis broyé dans 5 mL de tampon d'isolation des mitochondries. La suspension a ensuite subi deux cycles de centrifugations à 700 g, 4°C pendant 10 minutes (Microfuge 18, Beckman Coulter, Brea, CA, États-Unis) où les culots, contenant les cellules intactes et les noyaux ont été jetés. Le surnageant a ensuite été transféré dans un nouveau tube pour subir deux cycles de centrifugations à 7 000 g, 4°C pendant 10 minutes et les surnageants contenant des membranes plasmiques et des contaminants cytoplasmiques ont été jetés. Les culots ont été resuspendus dans 5 mL de tampon d'isolation des mitochondries. Enfin, Les mitochondries ont été culottées à 10 000 g et resuspendues dans 500 µL de tampon d'isolation. Les mitochondries, à cette étape pourraient être utilisées, toutefois, Wieckowski R. *et al*²⁷¹. qualifient ce type de préparation de « mitochondries grossières » (*crude mitochondria*) car des membranes telles que du RE peuvent persister au terme de ces traitements.

Ainsi, afin de limiter la présence de contaminants, nous avons choisi d'ajouter une étape d'ultracentrifugation permettant de séparer les membranes des mitochondries²⁷¹. Brièvement, la préparation de mitochondries obtenue précédemment a été déposée sur 3,4 mL de tampon de purification des mitochondries puis l'ensemble a été ultracentrifugé à 100 000 g, 4°C pendant 30 minutes. L'anneau contenant les mitochondries a été rincé dans 6 volumes de PBS et centrifugé à 12 000 g, 4°C pendant 10 minutes. Les mitochondries ainsi purifiées pourront être resuspendues dans un tampon adéquat pour une expérience subséquente (i.e. : ELISA, oxydation, microscopie, fonctionnalité) ou bien les culots secs pourront être stockés à -20°C afin d'être utilisés pour les expériences de purification d'ADN et d'immunobuvardage.

Mitochondries humaines : Une approche similaire a été utilisée dans le but d'extraire des mitochondries à partir d'une lignée HepG2, à la différence près que les cellules ont été lysées par dix passages dans une seringue avec une aiguille de

calibre 25G^{5/8} suivis de dix passages supplémentaires au travers d'une aiguille de calibre 27G^{1/2}.

3.4.3. Isolation de l'ADN mitochondrial.

Le MtDNA a été isolé à partir de mitochondries murines. Toutes les étapes de centrifugation de ce protocole se font à une vitesse de 12 000 g et température ambiante (température pièce, TP) pendant 10 minutes (Sigma 1-16. Sigma Zentrifugen, Osterode am Harz, Allemagne), ainsi toutes les mentions de centrifugation subséquentes se feront selon ces paramètres, de même, chaque étape nécessite une agitation vigoureuse au vortex. Pour les expériences de vérification de la qualité des préparations de MtDNA, ce protocole a été répété sur des lysats de foies totaux afin d'en extraire de l'ADN total des cellules hépatiques.

Les échantillons ont été resuspendus dans 1 mL de tampon de lyse spécifique (50 mM NaCl, 5 mM Tris-HCl, 16 mM EDTA, 2% SDS, pH 7,8), puis les protéines et les ARN ont été dégradés par traitement à la protéinase K (QIAGEN, Hilden, Allemagne. Cat. 19131). Enfin, les lysats ont été incubés 15 minutes à 100°C puis déprotéinisés par traitement au phénol acide (1:1, volume/volume. Ambion/Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, Etats-Unis Cat. AM9730) puis centrifugés. La phase aqueuse (supérieure) a ensuite subi deux cycles supplémentaires de déprotéinisation par traitement au chloroforme-isoamyl alcool (Fisher scientific. Cat. C6064). Enfin, la phase aqueuse (supérieure) a été traitée avec un volume (volume/volume) de diéthyléther (Fisher scientific. Cat. E138-4) afin d'assurer une extraction optimale des contaminants. Après centrifugation, l'ADN contenu dans la phase aqueuse (inférieure) a été précipité à -20°C pendant une nuit, à l'aide de 3 volumes d'éthanol 70% (volume/volume) et d'un volume d'acétate de sodium (volume/volume). L'ADN précipité a été culotté et a subi trois cycles de lavage à l'éthanol 70%. La pelote d'ADN a été séchée à l'aide d'un flux de diazote (N₂) puis

resuspendue dans 100 μL d'eau déionisée. Enfin, l'échantillon a été dosé par spectrophotométrie (Nanodrop 1000, Thermo Fisher scientific). Les aliquots ont été conservés à -20°C .

3.4.4. Dosage des protéines

Le dosage des protéines mitochondriales s'est fait par un test à l'acide bicinchoninique (*Bicinchoninic acid assay*, BCA). Cette méthode exploite la propriété du BCA à changer de couleur pour devenir pourpre en présence d'ions cuivre (I) $[\text{Cu(I)} \text{ ou } \text{Cu}^+]$ issus de la réduction d'ions cuivre (II) $[\text{Cu(II)} \text{ ou } \text{Cu}^{2+}]$ par les protéines en milieu alcalin. Cette mesure a été réalisée en plaques 96 puits (Corning. Cat. 3690) à l'aide du *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher scientific. Cat :23227). Brièvement, un volume de la solution B (sulfate de cuivre) est ajouté à cinquante volumes de solution A (BCA) afin d'obtenir le réactif de dosage, puis 100 μL de la solution ont été déposés par puit. 25 μL d'échantillons ou de standards ont ensuite été ajoutés dans chaque puit. Enfin, la plaque a été incubée 30 minutes à 37°C sous agitation douce et l'absorbance a ensuite été mesurée à 562 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques SpectraMax 190 (Molecular devices, Sunnyvale, CA, Etats-Unis). Les concentrations des échantillons ont ensuite pu être déterminées en reportant leurs densités optiques (DO) sur une gamme étalon d'albumine sérique bovine (*Bovine Serum Albumine*, BSA) dont la concentration s'étend de 2 000 à 25 $\mu\text{g/mL}$.

3.4.5. Immunobuvardages

La présence éventuelle de protéines contaminant les préparations de mitochondries murines ou humaines a été évaluée par la méthode d'immunobuvardage, dite du *western blot*. Pour cette expérience, les

mitochondries ont été comparées au matériel de départ à partir duquel elles ont été isolées, à savoir le foie de souris pour les mitochondries murines et les cellules HepG2 pour leurs équivalents humains.

Préparation des échantillons : Avant ces expériences, les échantillons ont été lysés (120 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1,25 mM EDTA, 0,5% Triton, 0,5% NP-40) et centrifugés à 12 000 g, 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu a été transféré dans un nouveau tube afin de culotter les mitochondries non lysées ainsi que des agrégats protéiques et membranaires puis dosé par la méthode du BCA. Enfin, les lysats ont été dilués à une concentration de 1 µg/µL dans du LB 1X puis incubés à 100°C pendant 5 minutes. Les échantillons ont été conservés à -20°C.

Migration sur gel de polyacrylamide (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE*) : Un gel à 12% de polyacrylamide (BioRad, Hercules, CA, Etats-Unis. Cat. 1610148) a été polymérisé puis inséré dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon de migration (25 mM Tris-base, 190 mM glycine, 0,1% SDS, pH 8,3). Les échantillons, les contrôles ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire ont ensuite été déposés à hauteur de 25 µg de protéines par puits. La migration s'est faite sur glace, à 150 V (voltage constant) jusqu'à migration complète des échantillons au travers du gel, soit environ 1h30.

Transfert : Une membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF. BioRad. Cat. 162-0177) activée au méthanol a été placée avec le gel de polyacrylamide dans une cuve contenant du tampon de transfert (25 mM Tris-base, 190 mM glycine, 20% méthanol, pH 8,3). Le transfert des protéines a été effectué à 60 mA (courant constant) pendant une nuit, à 4°C. La qualité du transfert a pu être vérifiée par coloration de la membrane au rouge Ponceau.

Marquages : Les membranes ont été bloquées dans une solution de TBS-Tween-5% de lait (Lait écrémé en poudre, Carnation). Les anticorps primaires

anti-actine (1:5000. Sigma-Aldrich. Cat. A5441), anti-tubuline (1:5000. Abcam, Cambridge, Royaume-Uni. Cat. Ab7291) anti-*proliferating cell nuclear antigen* (PCNA, 1:200. Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA, Etats-Unis. Cat. Sc-56), anti-VDAC (1:1000. Cell signaling technology, Danvers, MA, États-Unis. Cat. 4661S), anti-Tom22 (1:200. Abcam. Cat. Ab57523) et anti-cytochrome C (1:1000. BD biosciences, Franklin Lakes, NJ, Etats-Unis. Cat. 556433) ont été dilués en superbloc (BioRad. Cat. 37580) et incubés avec les membranes à 4°C pour la nuit. Les membranes ont ensuite subi trois cycles de rinçage de 20 minutes dans du TBS-Tween. Suite à cela, les membranes ont été marquées pendant 1h à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase du raifort (*horseradish peroxydase*, HRP. Jackson immunoresearch, West Grove, PA, Etats-Unis. Cat. 111-035-144 et 715-035-151) dilué au 1:10 000 en superbloc. Après un nouveau cycle de trois lavages, les membranes ont été révélées à l'aide d'un substrat chimioluminescent (Perkin Elmer, Waltham, MA, Etats-Unis. Cat. NEL105001EA) dont le signal a été enregistré à l'aide d'un scanner de membrane C-DiGit (LI-COR biotechnology, Lincoln, NE, Etats-Unis).

3.4.6. Pureté de l'ADN mitochondrial

La présence éventuelle d'ADN nucléaire contaminant les préparations de MtDNA a été évaluée par la technique de la réaction en chaîne par polymérase quantitative (*quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) à l'aide de deux couples d'amorces, spécifiques aux mitochondries (5'-GGAACAACCCTAGTCGAATGAA-3' / 5'-GCTAGGGCCGCGATAATAAA-3') ou à l'ADN nucléaire (5'-CCTGCTGCTTATCGTGGCTG-3' / 5'-GCCAGGAGAATGAGGTGGTC-3') murins sélectionnés dans la littérature^{62,272}. Brièvement, 200 ng de MtDNA ou d'ADN total ont été amplifiés dans une machine de qPCR Rotor-Gene Q (QIAGEN) à l'aide d'un *master-mix* commercial (BioRad. Cat. 1725270), et d'un couple d'amorces (Integrated DNA technologies, Coralville, IA, États-Unis). Les conditions expérimentales suivantes ont été paramétrées : 50°C-2 minutes, 95°C-10 minutes,

40 cycles (95°C-15 secondes et 60°C-60 secondes). Les expériences ont été répétées en triplicata et les ratios calculés à l'aide de la méthode des ΔC_t , en plaçant la moyenne pour l'ADN total à une valeur arbitraire de 1.

3.4.7. Morphologie des mitochondries

Des mitochondries fraîchement isolées ont été fixées dans une solution à 3,5% d'acroléine pendant 15 minutes à TP. Les mitochondries fixées ont ensuite été rincées deux fois avec du PBS puis incluses dans un gel à 4% d'agarose. Les blocs ont ensuite été coupés à une épaisseur de 50 μm à l'aide d'un vibratome. Les sections contenant des mitochondries ont été post-fixées au tetroxyde d'osmium et incluses en résine. Enfin, des sections ultrafines de 70 nm d'épaisseur ont été déposées sur des grilles pour microscopie électronique (*electron microscopy*, EM) et analysées à l'aide d'un microscope électronique à transmission Tecnai G2 Spirit BioTWIN (FEI, Hillsboro, OR, Etats-Unis). Pour la détermination de la taille des mitochondries, cinq clichés ont été sélectionnés et, pour chaque image, cinq mitochondries ont été mesurées à l'aide du logiciel ImageJ.

3.4.8. Respiration mitochondriale

La fonctionnalité des mitochondries purifiées a été vérifiée à l'aide d'un analyseur de flux Seahorse XF[®]96 (Agilent technologies, Santa Clara, CA, Etats-Unis). Cette technologie permet de mesurer en temps réel le taux de consommation de l'oxygène (*oxygen consumption rate*, OCR) et le taux d'acidification extracellulaire (*extracellular acidification rate*, ECAR) qui sont des indicateurs de l'activité métabolique d'un échantillon. Un échantillon sera déposé dans une plaque spécifique à la machine puis, une seconde plaque de détection s'abaissera afin de former une micro-chambre étanche pouvant contenir ~2-7 μL de milieu. Ainsi, la plaque de détection est munie de capteurs permettant de mesurer les variations de

l'oxygène dissout ainsi que du pH au sein de cette espace. Entre chaque mesure, la plaque de détection se lève afin de rompre l'étanchéité de la chambre et permettre l'homogénéisation du tampon par brassage mécanique, ce qui aura pour effet de restaurer les valeurs de détection à leurs seuils basaux. De plus, la cartouche de détection est aussi munie de quatre buses d'injection permettant le traitement des échantillons à analyser avec autant de drogues.

Brièvement²⁷³, les réactifs ont été préparés aux concentrations stock suivantes : 0,5 M succinate (eau déionisée, pH 7,4), 2 mM roténone, 40 mM antimycine A (éthanol 95%). 50 µL de ces réactifs ont ensuite été placés dans les ports correspondants des ports d'injection et cette dernière a été placée dans l'appareil à des fins de calibration. 20 µg de mitochondries ont été déposés par puits puis centrifugés 20 minutes à 2000 g et TP. Après avoir vidé, les puits couverts par des mitochondries ont été remplis avec 450 µL de tampon MAS et incubés à 37°C pendant 10 minutes. Les plaques contenant les mitochondries et la machinerie de détection ont été assemblées puis placées dans la machine. Le taux de consommation de l'oxygène (OCR) a ensuite été mesuré au cours du temps. Trois réactifs ont été injectés dans la micro-chambre au cours de l'expérience : roténone (t=15 minutes, 2 µM final), succinate (t=35 minutes, 10 mM final) et antimycine A (t=50 minutes, 4 µM final).

3.4.9. Oxydation des mitochondries

Ce protocole a été développé afin de pouvoir évaluer si la fixation des anticorps détectés dans les échantillons de séra pouvait être influencée en fonction du statut d'oxydation des antigènes mitochondriaux. Pour ce faire, nous avons choisi de travailler avec l'hydroperoxyde de tert-butyle (tert-butylhydroperoxyde, TBHP. Sigma Aldrich. Cat. 458139) pour ses capacités oxydantes ainsi que pour sa stabilité au cours du temps et lors de sa dilution dans un solvant aqueux.

Différentes conditions ont été testées lors du développement du protocole afin de déterminer les conditions expérimentales optimales. Ainsi, pour la détermination de la concentration en TBHP du tampon d'oxydation, une gamme de dilution allant de 10 à 500 μM de PBS-TBHP a été utilisée afin d'oxyder un équivalent de 1,5 mg/mL de protéines mitochondriales à 37°C pendant une heure. L'optimisation de l'oxydation des mitochondries s'est poursuivie par l'oxydation d'une gamme de dilution des mitochondries allant de 0,5 à 2 mg/mL pendant une heure à 37°C en tampon PBS-500 μM TBHP. Enfin, une cinétique a été établie en oxydant des mitochondries diluées à 1,5 mg/mL dans du tampon PBS-500 μM TBHP pendant une période allant de 10 minutes à 2 heures.

Ces étapes de mise au point ont permis d'établir les conditions expérimentales pour les expériences de quantification de l'oxydation des mitochondries ainsi que les ELISA de détection des AMA dirigés contre les mitochondries oxydées. Brièvement, des mitochondries ont été diluées à une concentration d'1,5 mg/mL dans un tampon PBS-500 μM TBHP et incubées à 37°C pendant 1h30 sous légère agitation. Les mitochondries ont ensuite été rincées deux fois au PBS glacial à l'aide de centrifugations à 12 000 g, 4°C pendant 10 minutes. Enfin, les mitochondries ont été culottées afin d'être resuspendues dans un tampon adéquat pour une expérience subséquente.

3.4.10. Quantification de l'oxydation

Nous avons évalué l'efficacité de notre protocole d'oxydation des mitochondries à l'aide de deux techniques permettant la détection de l'oxydation de deux types différents de molécules. Le premier est un test de quantification des espèces réactives à l'acide thiobarbiturique (*thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS) et le second, un test carbonyle.

TBARS Assay : Ce test permet la mesure des TBARS générés lors de

l'oxydation des lipides. Ces espèces, dont le malonedialdéhyde (MDA), réagissent avec l'acide thiobarbiturique en formant une molécule rouge et détectable à 532 nm. Ce test a été réalisé grâce au TBARS Parameter™ Kit (R&D systems, Minneapolis, MN, États-Unis. Cat. KGE013) en suivant les recommandations stipulées dans la notice. Brièvement, les échantillons de mitochondries oxydées ont été lysés puis dosés. Ils ont ensuite été dilués à une concentration de 2 mg/mL dans de l'eau déionisée. Les protéines ont ensuite été précipitées par traitement à l'acide trichloroacétique (trichloroacetic acid, TCA) puis culottées par centrifugation à 12 000 g, TP, 4 minutes. 75 µL d'échantillons ou de standards ont été déposés en duplicats sur une plaque 96 puits et 37,5 µL d'acide thiobarbiturique ont été ajoutés dans chaque puits et enfin, les plaques ont été incubées 3 heures à 50°C et les DO mesurées à 532 nm avec un lecteur de plaques SpectraMax. La quantification des TBARS a été réalisée à l'aide d'une gamme de MDA fournie dans le kit et dont les concentrations s'étendent de 0,26 à 16,7 mM de TBARS.

Carbonyle Assay : L'oxydation des protéines occasionne la formation de groupements carbonyles stables. Ils sont caractérisés par la formation d'une double liaison entre un atome de carbone et un atome d'oxygène pouvant être dérivée à l'aide de 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH) en 2,4-dinitrophénylhydrazone, composé jaune pouvant être détecté à 375 nm. Ainsi, l'oxydation des protéines a été mesurée avec le kit *Protein Carbonyl Content Assay Kit* (Sigma Aldrich. Cat. MAK094) en suivant les recommandations du fournisseur. Les échantillons de mitochondries ont été lysés, dosés puis resuspendus à une concentration de 20 mg/mL. Les acides nucléiques ont été précipités en incubant les échantillons avec 12 µL de streptozocine 10% à TP pendant 15 minutes, centrifugés à 13 000 g à TP pendant 5 minutes puis les surnageants ont été transférés dans de nouveaux tubes. Les échantillons ont ensuite été colorés pendant 10 minutes à TP à l'aide d'une solution de DNPH et les protéines ont été précipitées avec 60 µL de TCA 100% sur glace, pendant 5 minutes. Les échantillons ont ensuite subi deux cycles de lavage à l'acétone (Fisher scientific. Cat. A18-4) et deux cycles de centrifugation à 13 000 g pendant 2 minutes. Enfin, les protéines ont été

resolubilisées dans 200 μ L de solution de guanidine 6M. Les échantillons obtenus ont été dosés par la méthode du BCA et 100 μ L ont été déposés dans une plaque 96 puits afin de mesurer leur absorbance à 375 nm. Les concentrations en carbonyle ont été déterminées selon la méthode de calcul recommandée par le fournisseur.

3.4.11. Tests ELISA

Des plaques 96 puits ont été couvertes de différentes façons, en fonction de l'antigène de couverture. Entre chaque étape, les plaques ont été lavées trois fois au PBS (100 μ L par puits). Les échantillons ont été testés en duplicat. Dans les cas où une expérience nécessitait la répartition des échantillons sur plusieurs plaques, six échantillons de référence ont été déposés à l'identique sur chaque plaque et les plaques révélées jusqu'à ce que les valeurs de densité optique soient identiques pour ces échantillons d'une plaque à l'autre. Pour les expériences de détection des AMA, un anticorps monoclonal de souris anti-Tom22 du même isotype a été utilisé dilué au 1:100 en tant que contrôle positif. Le contrôle positif utilisé dans la détection des AMtDNA est un anticorps monoclonal de souris anti-ADN du même isotype, dilué au 1:100 (Abcam. Cat. Ab27156). Dans tous les cas, un anticorps monoclonal de souris du même isotype et non spécifique ; ciblant le Fc γ RIIa (IV.3, don du Dr. Paul H. Naccache) a été utilisé, dilué cent fois.

3.4.11.1. Protocoles standards

Couverture :

- **Détection des anticorps anti-mitochondriaux** : Les mitochondries ont été resuspendues à une concentration de 0,5 μ g/mL dans du tampon carbonate/bicarbonate 50 mM pH 9,6. 25 μ L de la suspension ont ensuite

été déposés (i.e. : 12,5 µg/puit). Les plaques ont été couvertes pendant une nuit à 4°C. Cette étape est identique pour tous les types de mitochondries utilisés dans notre étude (i.e. : humaines ou murines, natives ou oxydées).

- **Détection des anticorps anti-ADN mitochondrial** : Un prétraitement des plaques est nécessaire à la bonne fixation des acides nucléiques. Pour ce faire, les puits ont été traités avec 100 µL d'une solution à 1% de protamine sulfate (Sigma Aldrich. Cat. P3369) pendant 1h à TP. Après cette étape, les puits ont été couverts à 4°C pendant la nuit, à l'aide de 400 ng de MtDNA.

Blocage : Les sites de fixation non spécifiques ont été bloqués (PBS 10%-FBS 0,5% Gélatine) à 37°C pendant quatre heures, sous agitation douce.

Incubation des séra : Lorsque des mitochondries murines ou du MtDNA ont été utilisés pour couvrir les plaques, 25 µL de sérum, dilué au 1:20 (hormis mention contraire) en tampon primaire (PBS 10%-FBS 0,3% Gélatine) ont été déposés dans chaque puits et incubés à 4°C durant la nuit. Pour les expériences sur mitochondries humaines, les séra ont été dilués au 1:100.

Amplification des marquages : Les IgG fixés sur les mitochondries murines ont été détectés avec un 25 µL d'anticorps secondaire anti-IgG couplé à la phosphatase alcaline (*alkaline phosphatase*, AP. Sigma Aldrich. Cat. A1343 et A5153) dilué au 1:1000 en tampon secondaire (PBS-0,4% BSA). La couverture des plaques avec des mitochondries humaines étant incompatible avec la méthode de détection des IgG par un anticorps couplé à l'AP, ce dernier a été remplacé par un anticorps anti-IgG couplé à la HRP (1:3000).

Développement et détection : Les plaques ont été développées en présence de *p*-nitrophenol phosphate (*p*-Npp. Sigma Aldrich. Cat. P7998) durant ~30 min at 37°C et les densités optiques ont été lues à 405 nm. Les plaques couvertes avec des mitochondries humaines ont nécessité l'utilisation d'un réactif spécifique de la HRP, à savoir le 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB). Ainsi,

50 µL par puits de TMB ont été incubés à TP sous légère agitation pendant 5 minutes, puis la réaction a été stoppée avec 25 µL d'acide sulfurique 2N (H₂SO₄) et les DO, lues à 450 nm.

3.4.11.2. Étapes d'optimisation

Le développement de ces différents tests ELISA a nécessité plusieurs étapes de mise au point, listées ci-dessous :

Optimisation de la couverture : La saturation des puits a été testée à l'aide d'une gamme de dilution des mitochondries dans le tampon carbonate/bicarbonate s'étendant de 0,06 à 1 mg/mL. Un anticorps primaire anti-Tom22 dilué au 1:100 a été utilisé afin de marquer les mitochondries. La mise au point de la couverture par le MtDNA a été réalisée par incubation d'une gamme de dilution de MtDNA allant de 25 à 400 ng et un marquage avec un anticorps anti-ADN (1:100). Les étapes subséquentes de ces expériences sont identiques au protocole standard.

Adaptation du protocole pour l'utilisation de mitochondries humaines : Les interférences entre l'utilisation de mitochondries humaines pour l'étape de couverture des puits et la détection par l'AP ont été étudiées en resuspendant des mitochondries humaines dans en p-NPP à une concentration de 0,5 mg/mL puis en mesurant la cinétique de la coloration du réactif à 37°C.

Une deuxième étape de détermination de la dilution optimale des séra a été nécessaire. Pour ce faire, nous avons modifié le protocole standard comme suit ; les séra ont été incubés à différentes concentrations s'étendant de 1:20 à 1:200 et un anticorps secondaire anti-IgG humain couplé à la HRP et dilué au 1:2000 a été utilisé.

Spécificité d'espèce du test ELISA de détection des anticorps anti-mitochondriaux : Les différences éventuelles de signal mesurées en

fonction de l'espèce des mitochondries utilisées pour couvrir les plaques ont été évaluées comme suit : des séra dilués au 1:100 ont été déposés pendant une nuit à 4°C à la fois dans des puits couverts de mitochondries murines ou de mitochondries humaines. Un anticorps secondaire dirigés contre les IgG humains et couplé à la HRP (1:3000) a été incubé pendant 1h à TP puis la plaque a été révélée à l'aide de 50 µL de TMB pendant 5 minutes puis stoppée avec 25 µL de H₂SO₄ 2N. Les densités optiques ont été lues à 450 nm.

3.4.12. Analyses et biostatistiques

Les résultats sont présentés par la moyenne de leurs mesures ainsi que par leur déviation standard (moyenne ± SD). Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism 7 (GraphPad software, La Jolla, CA, Etats-Unis). Dans tous les cas, la distribution normale des échantillons a été déterminée par un test D'Agostino-Pearson. En cas d'échantillon trop restreint, la distribution a été considérée comme non gaussienne afin d'augmenter la stringence des tests subséquents. Les comparaisons entre deux groupes ont été faites à l'aide d'un test t. Les comparaisons multiples et/ou dans le temps ont été réalisées grâce à la méthode de l'analyse des variances (*analysis of variances*, ANOVA).

Les tests d'association entre les anticorps mesurés et les paramètres cliniques de la maladie chez les patients lupiques ont été effectués par Mlles. Anne-Sophie Julien et Renée-Claude Loignon, biostatisticiennes au CHUQ. Brièvement, les corrélations entre les AMA et les AMtDNA ont été réalisées à l'aide d'un test de corrélation de Spearman et présentées par leur coefficient de corrélation (r). Leurs associations avec les autres types d'anticorps ont été déterminées par le biais d'un test de Wilcoxon et ont été présentés par leur valeur médiane et écarts interquartiles (médiane ± IQR). Enfin, les corrélations entre les événements cliniques et les niveaux d'anticorps mesurés ont été étudiés à l'aide de régressions logistiques univariées ainsi que de régressions logistiques bivariées. Ces dernières

ont été ajustées en fonction de la durée de la maladie, de l'indice de masse corporelle (IMC) et des traitements. Ces modèles sont présentés par leur rapport de cotes (*odd ratio*, OR) et par l'intervalle de confiance à 95% [OR(95% IC)]

La significativité des associations testées sera mesurée par la valeur p et exprimée comme suit : * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$. **** $p < 0,0001$.

Chapitre 4 : Résultats.

4.1. Qualité des mitochondries isolées

La première étape du projet était d'optimiser un protocole d'isolation des mitochondries nécessaire au développement des étapes subséquentes de notre étude. Pour ce faire, nous avons adapté deux méthodes disponibles dans la littérature. Ainsi, un foie de souris ou des cellules HepG2 ont subi une lyse mécanique afin de libérer le contenu cytoplasmique des cellules. Les mitochondries ont ensuite été séparées des contaminants par centrifugation différentielle, suivie d'une étape d'ultracentrifugation afin de séparer les mitochondries des membranes auxquelles elles sont associées (Figure 4).

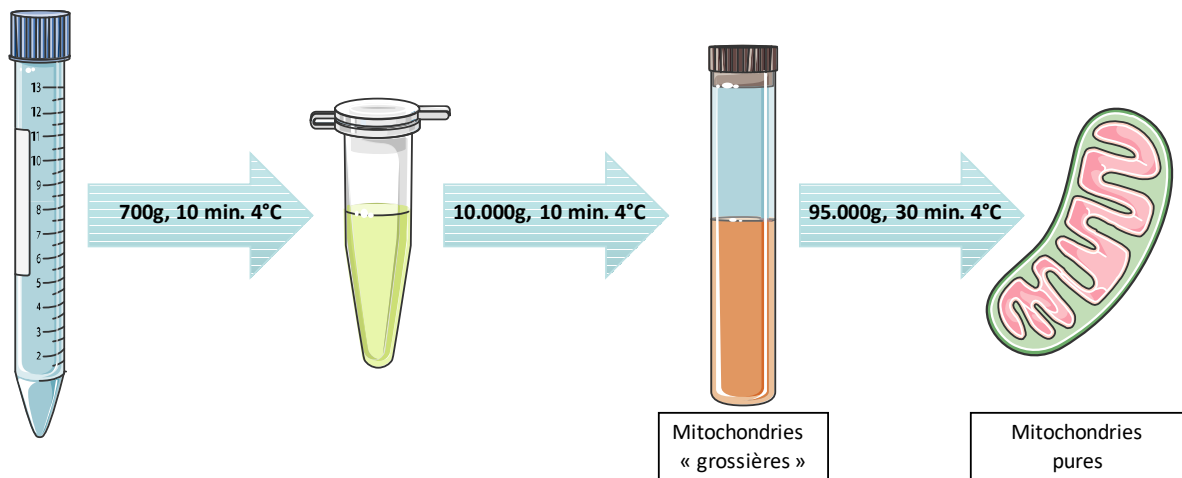


Figure 4 : Protocole d'isolation des mitochondries. Nous avons optimisé un protocole d'isolation de mitochondries afin qu'il soit utilisable à la fois pour isoler des mitochondries à partir de foie de souris ou de cellules d'hépatocarcinome humain en culture. Cette méthode consiste en la lyse mécanique des cellules des matériaux de départ puis en différentes étapes de centrifugation différentielle contre un tampon de sucrose permettant l'enrichissement des mitochondries puis en une étape d'ultracentrifugation permettant de séparer les mitochondries de la majeure partie de leurs contaminants.

Rendements des préparations murines et humaines : Afin de vérifier les quantités de matières obtenues à l'aide de notre méthode, les échantillons de mitochondries ont été lysés puis dosés par la méthode du BCA. Pour les mitochondries murines, la quantité de protéines obtenue au terme de la purification a été rapportée au poids du foie dont elles sont issues. Pour les cellules humaines, le dosage des protéines mitochondriales a été rapporté au nombre de cellules lysées pour les obtenir. Ainsi, le rendement moyen de la préparation de mitochondries murines est de $3,55 \pm 0,18$ μg de protéines mitochondriales par mg de foie et de $4,84 \pm 0,18$ μg de protéines mitochondriales par million de cellules pour la préparation de mitochondries humaines.

Enrichissement et pureté des isolats mitochondriaux : L'efficacité de la méthode a ensuite été vérifiée par immunobuvardage (Figure 5). Nous avons comparé les mitochondries obtenues au matériel de départ dont elles sont issues à l'aide de différents anticorps marquant des protéines représentatives des compartiments cellulaires. Ainsi, nous avons visualisé l'actine et la tubuline comme marqueurs des contaminants cytosoliques, PCNA comme marqueur nucléaire, VDAC et Tom22 comme marqueurs mitochondriaux et le cytochrome C en tant que marqueur de l'intégrité des mitochondries, ce dernier étant relâché par l'organelle lorsqu'il est endommagé. Dans la préparation de mitochondries murines, nous avons observé une perte des marqueurs cytoplasmiques et nucléaires ainsi qu'une augmentation des protéines mitochondriales. Pour la préparation de mitochondries humaines, il y a une diminution nette des marqueurs cytoplasmiques. Toutefois ces derniers ne disparaissent pas totalement, une bande d'actine persiste dans l'échantillon de mitochondries. PCNA n'est plus détectable et un fort enrichissement en marqueurs mitochondriaux a été observé. Dans les deux types de préparation, le cytochrome C persiste dans les échantillons de mitochondries. Ces résultats indiquent que le protocole de

purification sur matériel murin permet d'isoler efficacement des mitochondries d'une qualité adéquate pour des protocoles de tests ELISA directs. L'isolation des mitochondries humaines, quant à elle permet un enrichissement en matériel mitochondrial mais ne permet pas l'obtention d'un échantillon totalement dépourvu de contaminants. Dans les deux cas, les mitochondries isolées semblent avoir conservé leur cytochrome C, ce qui laisse à penser que l'isolation n'occasionne pas de dommages majeurs pour les mitochondries.

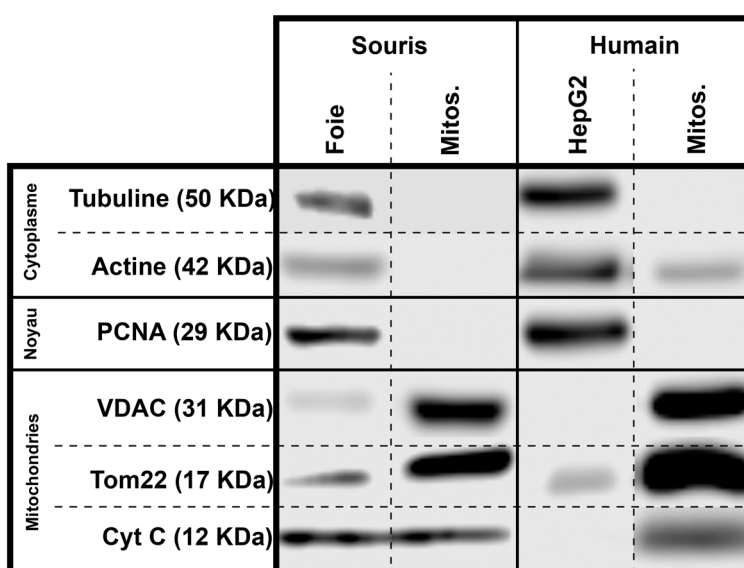


Figure 5 : Qualité des échantillons de mitochondries. Des échantillons de mitochondries purifiées à partir de foie de souris ou de cellules humaines HepG2 ainsi que des échantillons du matériel de départ dont elles sont issues ont été comparés par immunobuvardage afin de déterminer la qualité des échantillons obtenus par le biais de notre protocole de purification. Six marqueurs ont été utilisés : deux marqueurs cytoplasmiques (la tubuline et l'actine), un marqueur nucléaire (PCNA) et trois marqueurs mitochondriaux (Tom22 ; VDAC et le cytochrome C). Les préparations pour les échantillons issus des deux espèces montrent une disparition des marqueurs nucléaires. Les marqueurs cytoplasmiques diminuent dans les deux cas avec une plus forte perte d'actine pour les préparations murines. La totalité des marqueurs mitochondriaux est enrichie. L'ensemble de ces éléments indiquent que notre protocole d'isolation est efficace. 25 µg de protéines par condition, figure représentative de trois expériences distinctes. **Légende :** Cyt C : Cytochrome C, Mitos. : mitochondries isolées, PCNA : *proliferating cell nuclear antigen*.

Morphologie des mitochondries : L'aspect des mitochondries murines purifiées a été observé en microscopie électronique à transmission (Figure 6). Les clichés montrent des mitochondries de formes arrondies, mesurant $0,91 \pm 0,21 \mu\text{m}$ de diamètre, clairement délimitées par une double-membrane, comportant des réseaux de crêtes denses et une matrice d'aspect granuleux. Cette observation est conforme à la description conventionnelle de l'organelle.

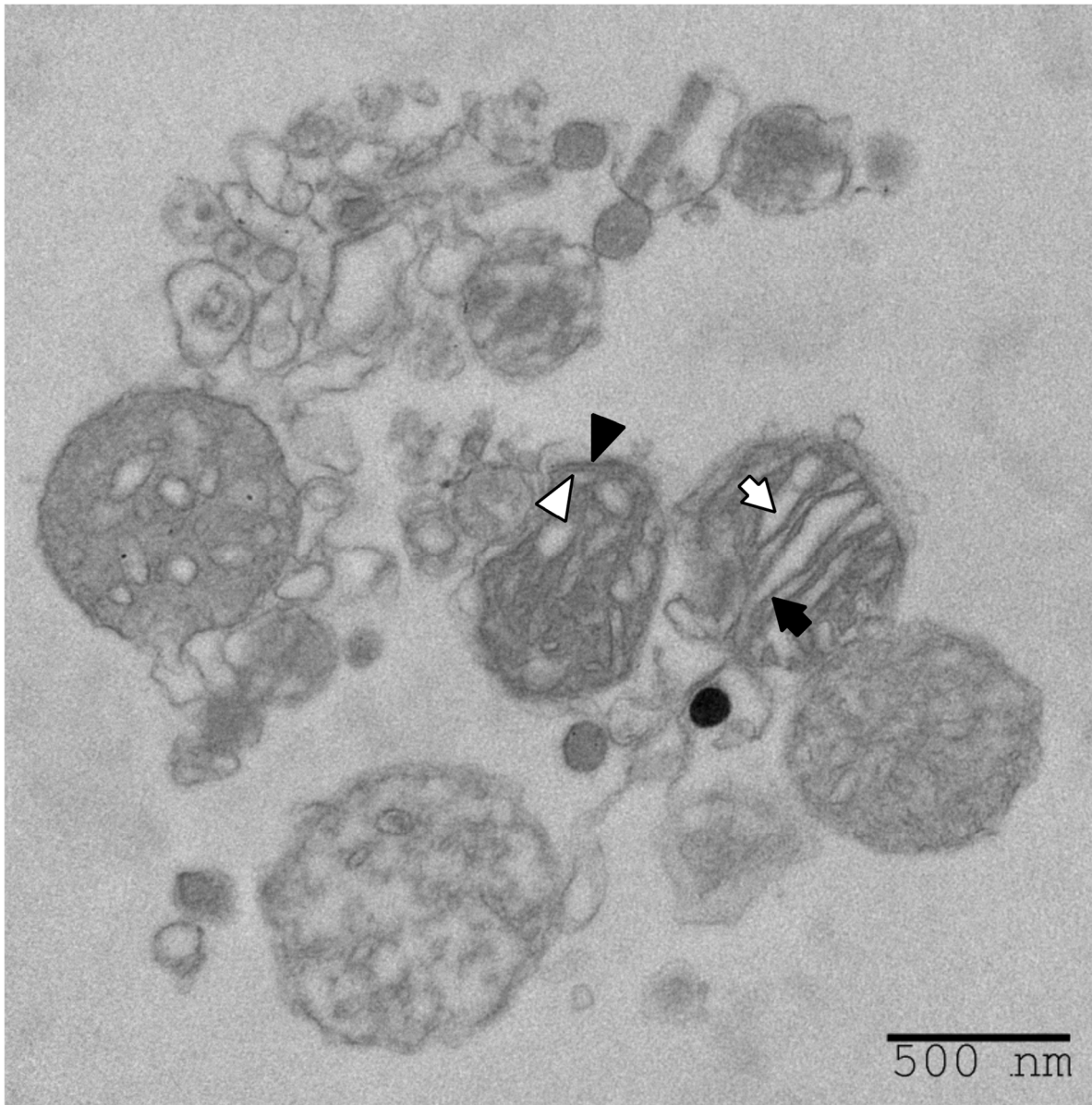


Figure 6 : Aspect des mitochondries purifiées. La morphologie de mitochondries murines

isolées a été visualisée en microscopie électronique à transmission. Les mitochondries isolées présentent une structure ainsi qu'une taille ($0,91 \pm 0,21 \mu\text{m}$) qui correspondent à la description canonique de l'organelle, indiquant que les traitements subis au cours du protocole n'occasionnent pas de dommages structurels aux mitochondries. **Légende** : tête de flèche noire : membrane externe. Tête de flèche blanche : membrane interne. Flèche noire : crête. Flèche blanche : matrice.

Fonctionnalité des mitochondries : La capacité des mitochondries purifiées par notre méthode a été évaluée à l'aide d'un analyseur de flux Seahorse XF^e96 par le biais de la mesure du taux de consommation de l'oxygène dans le temps (OCR) (Figure 7). Une injection de roténone a été effectuée afin d'inhiber le complexe I de la chaîne de phosphorylation oxydative, permettant ainsi de nous assurer que la valeur d'OCR de $21,91 \pm 3,03 \text{ pmol/minutes}$ mesurée ne provient que du métabolisme mitochondrial. Une seconde injection de succinate, substrat nécessaire au fonctionnement du complexe II a provoqué un pic d'OCR jusqu'à une valeur de $686,94 \pm 61,93 \text{ pmol/minutes}$. Enfin, l'inhibition du complexe III par l'antimycine A permet une inhibition de la chaîne de phosphorylation oxydative en aval de ce complexe, ce qui entraînera une chute de la consommation d'O₂. Ce traitement entraîne une diminution de l'OCR à une valeur de $40,03 \pm 8,19 \text{ pmol/minutes}$, confirmant ainsi que le pic de consommation d'O₂ observé est lié aux mécanismes mitochondriaux de phosphorylation oxydative. Ces résultats mettent en évidence que le protocole d'isolation des mitochondries que nous utilisons permet l'obtention de mitochondries fonctionnelles.

Enrichissement de l'ADN mitochondrial isolé : La contamination des échantillons de MtDNA par de l'ADN nucléaire a été vérifiée par PCR quantitative à l'aide d'amorces permettant l'amplification d'un fragment de *ptger2*, gène présent sur le 14^{ème} chromosome murin et codant pour le récepteur à la prostaglandine E2 ainsi qu'un couple d'amorces permettant l'amplification d'un segment d'ADN

mitochondrial (Figure 8). La quantité d'amplicons mesurée dans l'échantillon de départ, a été fixée à une valeur de 1 pour chaque couple d'amorces.

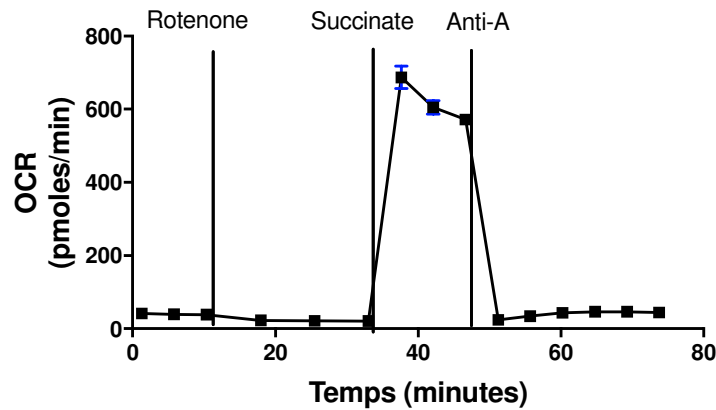


Figure 7 : Fonctionnalité des mitochondries isolées. 20 μg de mitochondries ont été traités à l'aide de 2 μM de roténone afin de stopper leur respiration via inhibition du complexe I de la chaîne de phosphorylation oxydative ($21,91 \pm 3,03$ pmol/minutes). L'injection de 10 mM de succinate permet de rétablir la respiration mitochondriale en stimulant directement le complexe II ($686,94 \pm 61,93$ pmol/minutes). Enfin, la respiration a été coupée ($40,03 \pm 8,19$ pmol/minutes) par un traitement à l'aide de 4 μM d'antimycine A, un inhibiteur du complexe III. Cette donnée souligne que le protocole d'isolation des mitochondries permet l'obtention de mitochondries fonctionnelles sur le plan de la phosphorylation oxydative. Moyennes \pm SD. **Légende** : Anti-A : antimycine A, OCR : taux de consommation de l'oxygène.

Le ratio de la quantité d'ADN amplifiée à l'aide de chaque couple d'amorces a été rapporté à cette valeur par la méthode des ΔCt . Ainsi, on observe dans nos échantillons un enrichissement de $6,74 \pm 3,86$ fois en MtDNA accompagné d'une très faible amplification du matériel nucléaire, avec un *fold change* de $6,12 \cdot 10^{-3} \pm 5,96 \cdot 10^{-3}$ fois. Cela confirme que nos protocoles de purification du MtDNA permettent l'obtention d'échantillons ne contenant que très peu de matériel génétique contaminant d'origine nucléaire.

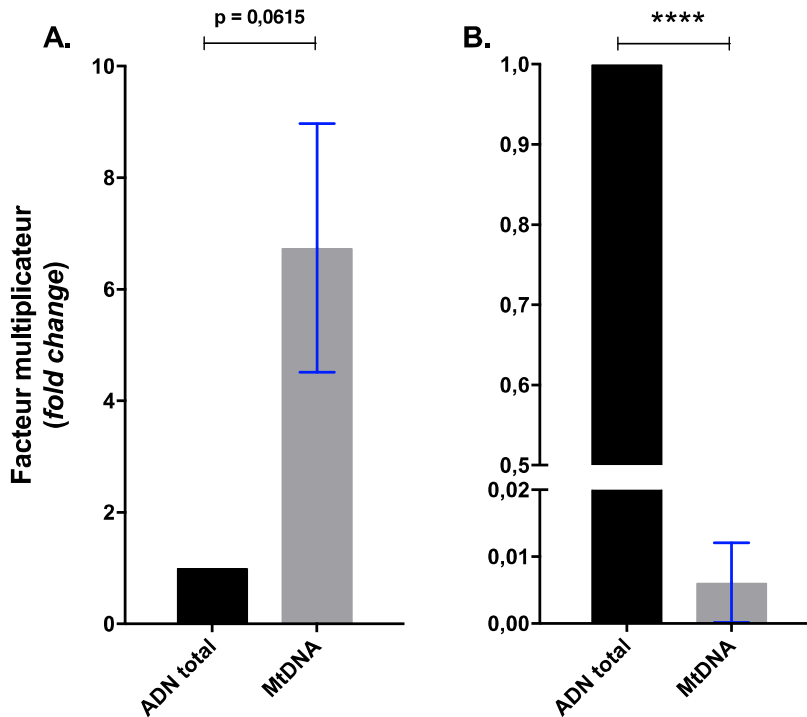


Figure 8 : Évaluation de la présence d'ADN nucléaire dans les préparations d'ADN mitochondriales. Les enrichissements en ADN mitochondrial et la présence éventuelle d'ADN nucléaire contaminant ont été déterminés par PCR quantitative. De l'ADN a été isolé par la méthode de traitement au phénol-chloroforme à partir de mitochondries murines isolées (MtDNA) ou bien de broyats de foie de souris (ADN total) et amplifié (200 ng par réaction) à l'aide d'amorces spécifiques à l'ADN mitochondrial ou à l'ADN nucléaire. (A) Utilisation d'amorces mitochondriales. (B) amorces nucléaires. Ces résultats mettent en évidence que le MtDNA isolé ne contient que très peu d'ADN nucléaire contaminant. N=3. Moyennes \pm SD. ***, $p < 0,0001$. Test t non apparié.

4.2. Développement de nouveaux outils de détection d'anticorps anti-mitochondriaux

Après avoir évalué la qualité de nos préparations d'échantillons de mitochondries et de MtDNA, nous avons développé trois nouveaux tests ELISA directs. Un premier test ELISA a été mis au point en couvrant des plaques à l'aide de mitochondries intactes, permettant la détection des anticorps ciblant l'ensemble des molécules présentes à la surface des mitochondries. Nous avons ensuite développé une technique de détection des anticorps anti-MtDNA afin d'évaluer si le MtDNA fait partie du panel des antigènes mitochondriaux reconnus par les AMA. Enfin, un troisième test, utilisant des mitochondries oxydées *in-vitro* afin de couvrir les plaques, a été créé afin de déterminer si l'oxydation des épitopes mitochondriaux pouvait influencer la fixation des anticorps en présence dans les séra des patients. Pour ce faire, nous comparerons un modèle murin inductible de LED à un groupe contrôle ayant reçu des injections de PBS selon le même agenda. Nous répèterons ces expériences chez l'humain en comparant des donneurs sains à des patients humains de trois maladies auto-immunes différentes, le LED, l'APS et la CBP.

Mise au point de l'étape de couverture des ELISA : La saturation, au terme de l'étape de couverture des plaques ELISA a été optimisée à l'aide de gammes de concentration en antigènes de couverture. Ainsi, pour la couverture par des mitochondries intactes, les valeurs mesurées atteignent un plateau à $1,83 \pm 0,24$ unités de DO à partir d'une concentration de 0,25 mg/mL de mitochondries (Figure 9A). Pour la couverture à l'aide de MtDNA, le plateau atteint une valeur de $0,92 \pm 0,12$ unités de DO pour des concentrations supérieures à 200 ng de MtDNA (Figure 9B). Ces résultats nous ont permis de fixer la quantité d'antigènes de couverture optimale à 0,5 mg/mL pour les mitochondries intactes et à 200 ng pour le MtDNA.

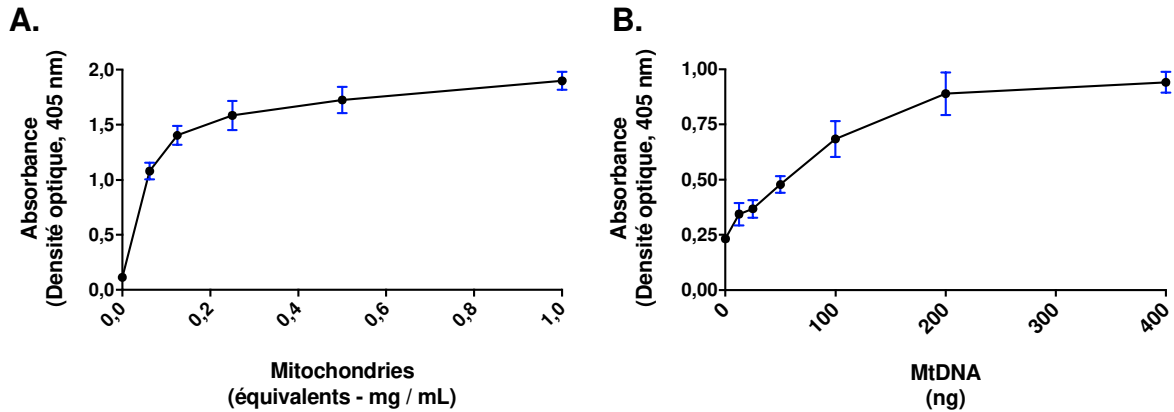


Figure 9 : Optimisation de la couverture des plaques ELISA. (A) Les plaques ont été couvertes à l'aide d'une gamme de dilution de mitochondries (0,06-1 mg/mL par puits) ensuite marquées à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-Tom22 (1:100). (B) Couverture par le MtDNA (25-400 ng par puits) et marquage par un anti-ADN (1:100). La mesure des DO_{405nm} ont permis de choisir 0,5 mg/mL de mitochondries et 400 ng d'ADN comme étant les concentrations d'antigène optimales permettant une couverture totale des puits. N=3, Moyenne ± SD. **Légende** : DO : densité optique.

Détection d'anticorps dirigés contre les mitochondries : Les séra (1:20) issus d'un modèle murin inductible de LED et de souris contrôles ont été comparés pour la présence d'anticorps anti-mitochondriaux et anti-ADN mitochondrial (Figure 10). Les injections de β_2 GPI et de LPS provoquent un accroissement significatif des AMA et des AMtDNA sériques dans le modèle murin (respectivement : **p=0,004 et ***p=0,0071, test t non apparié). Ce résultat met en évidence que les ELISA que nous avons mis au point permettent effectivement la détection d'anticorps ciblant des antigènes mitochondriaux, mais aussi que le modèle murin inductible de LED développe ces anticorps au cours du protocole, ce qui n'avait pas encore été décrit par nos collaborateurs à l'origine de ce modèle.

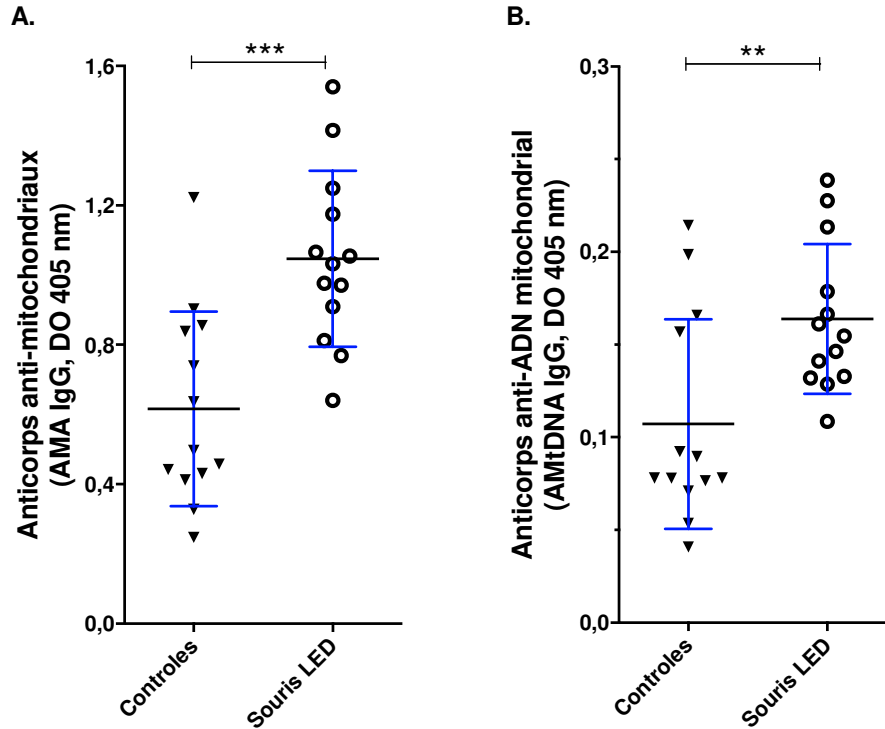


Figure 10 : Détection d'anticorps ciblant des antigènes mitochondriaux. Nos protocoles de tests ELISA ont été appliqués en utilisant des échantillons de séra (1:20) issus d'un modèle murin inductible de LED. Nous avons détecté des quantités (A) d'AMA et (B) d'AMtDNA significativement plus élevées que chez des souris contrôles du même fond génétique ayant reçu des injections de PBS à la même fréquence. N=13. Moyennes \pm SD. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Test t non apparié. Légende : LED : lupus érythémateux disséminé.

Cette expérience a été répétée chez l'humain en comparant les séra humains de donneurs sains à ceux de patients souffrant de LED, d'APS ou de CBP. Pour le test ELISA de détection des anticorps anti-mitochondries (Figure 11A), les séra de patients ont été dilués au 1:50 ou, pour la détection des anti-MtDNA, ils ont été dilués au 1:20. Ainsi, pour les AMA, nous avons observé une différence significative entre les valeurs de DO détectées chez les témoins et les patients souffrant de LED (*, test ANOVA à un facteur), aucune différence n'a été détectée entre les témoins et les patients cirrhotiques. L'absence de détection d'AMA chez les patients souffrant de CBP s'explique par le fait qu'AMA-M2, le principal marqueur de la maladie est un ensemble constitué de différents anticorps dirigés

contre des antigènes de la famille du complexe *2-oxo acid deshydrogenase*, localisé au sein de l'IMM. Ainsi ces anticorps ne sont pas accessibles dans notre test ELISA utilisant des mitochondries intactes comme antigènes de couverture car l'intégrité de l'OMM fait barrière à la diffusion des anticorps et à leur fixation sur les antigènes de l'IMM. Les tests ELISA décrits dans la littérature utilisant des particules submitochondriales (submitochondrial particles, SMP) ayant subi un traitement par sonication afin que des antigènes de l'IMM soient exprimés à la surface des vésicules, le test ELISA que nous avons mis au point n'est pas redondant avec les techniques précédemment décrites.

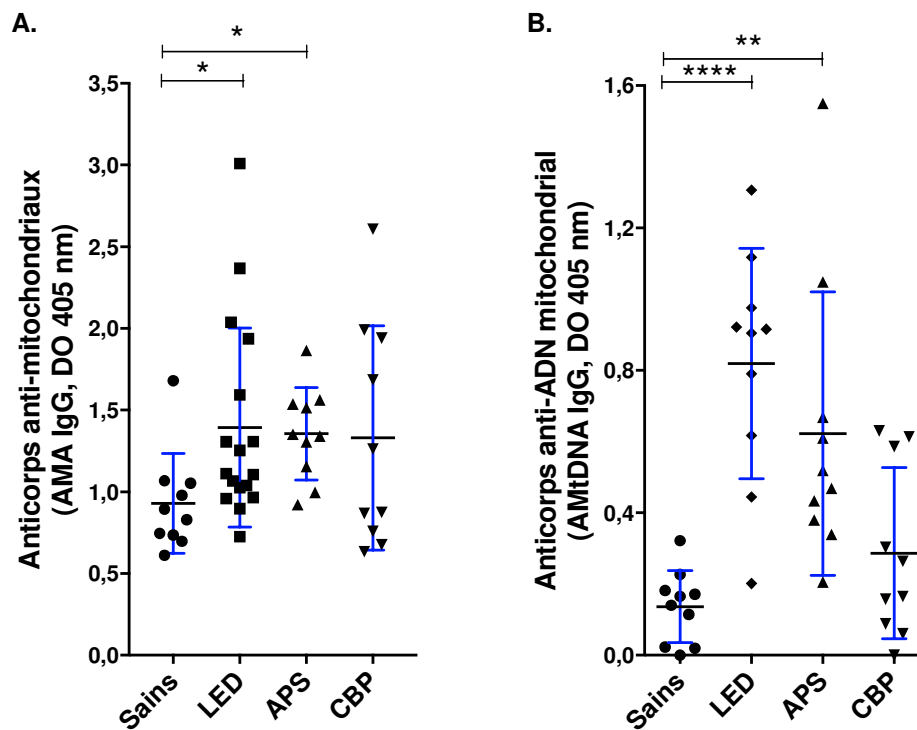


Figure 11 : Détection des AMA dans différentes pathologies. Après avoir validé nos outils sur la souris, nous avons testé des séras de patients souffrant de trois maladies auto-immunes (LED, APS, CBP) afin d'évaluer la présence d'anticorps anti-mitochondriaux dans le cadre de ces différentes pathologies. (A) Les niveaux d'anticorps anti-mitochondriaux sont augmentés dans les séras (1:50) des patients lupiques ou souffrant d'APS. (B) Les séras de ces même patients (1:20) présentent aussi une forte augmentation des anticorps anti-MtDNA. Aucune variation significative n'a été détectée chez les patients atteints de CBP. N=10. Moyennes \pm SD. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ****p<0,0001. Test de Kruskal-Wallis

Il est aussi à noter que les donneurs sains présentent tout de même des IgG anti-mitochondriaux en circulation ($0,93 \pm 0,31$ unités de DO). Une tendance similaire est observée pour les anticorps ciblant l'ADN mitochondrial (Figure 11B) ; une forte augmentation de ces anticorps a été mesurée chez les patients lupiques ($0,82 \pm 0,32$ unités de DO. ****, test ANOVA à un facteur). Une augmentation significative, mais de moindre amplitude a aussi été détectée dans les séra des patients atteints d'APS ($0,62 \pm 0,40$. **, test ANOVA à un facteur). Cette expérience confirme que les ELISA que nous avons développés permettent la détection d'anticorps dans différentes pathologies. De plus, l'utilisation de mitochondries et de MtDNA murins dans ces tests permet la détection d'anticorps, même lorsque les séra testés sont d'origine humaine.

Spécificité d'espèce de l'ELISA de détection des anticorps

anti-mitochondriaux : Nous avons ensuite voulu déterminer si l'espèce dont sont issues les mitochondries utilisées pour couvrir nos plaques pouvait avoir une influence sur les résultats du test ELISA. Un premier test a été réalisé en comparant les niveaux de DO mesurés en fonction de l'espèce dont sont issues les mitochondries de couverture. Ces puits ont été incubés avec un anticorps monoclonal anti-Tom22 pouvant se fixer à la fois sur les mitochondries murines et humaines, un anticorps anti-FcγRIIIa dont l'antigène n'est pas exprimé à la surface des mitochondries ou avec le tampon de dilution des anticorps (Figure 12A). Au terme de l'expérience, nous avons observé que tous les puits couverts par des mitochondries exprimaient des valeurs de DO anormalement homogènes et élevées (tampon : $1,14 \pm 0,02$. Tom22 : $1,23 \pm 0,14$. IV.3 : $1,19 \pm 0,01$ unités de DO). Le protocole ayant été utilisé en routine et ayant fonctionné pour les puits couverts à l'aide de mitochondries murines, nous en avons déduit que les échantillons de mitochondries humaines pourraient contenir un contaminant absent des préparations murines et pouvant interférer avec la coloration du réactif colorimétrique, le p-NPP.

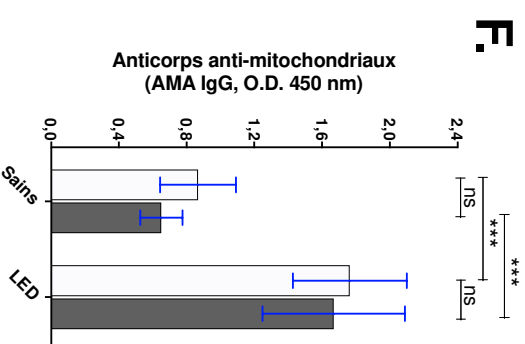
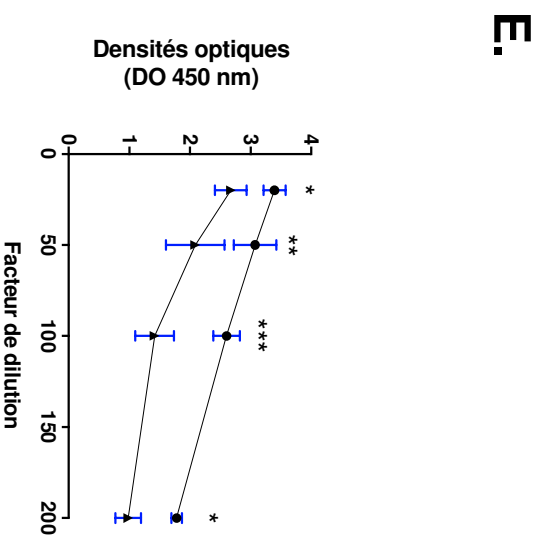
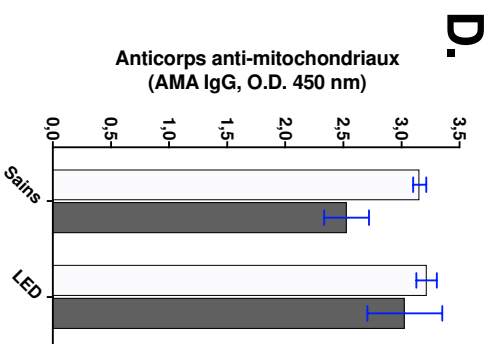
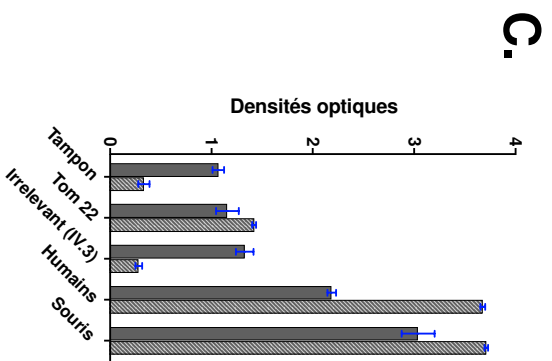
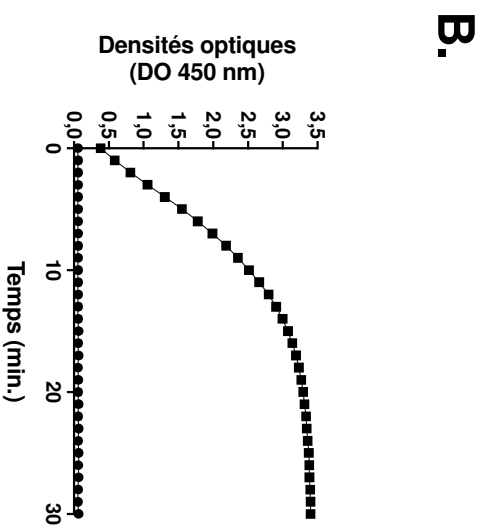
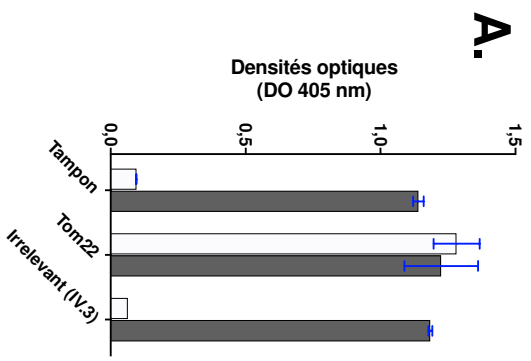


Figure 12 : Adaptation du protocole pour ELISA de détection des AMA et spécificité d'espèce. Nous avons déterminé si l'espèce dont sont issues les mitochondries utilisées pour la couverture des puits peut influencer sur les résultats obtenus. (A) L'utilisation de mitochondries humaines (barres grises) occasionne un fort bruit de fond qui n'avait jamais été détecté avec des mitochondries murines (barres blanches). (B) L'incubation de mitochondries à une concentration de 0,5 mg/mL dans du p-NPP (symboles carrés) aboutit spontanément à la coloration du réactif (contrôles : p-NPP seul, symboles ronds). (C) Cet effet semble lié à la présence de phosphatase alcaline résiduelle après purification des mitochondries ; ces interférences peuvent donc être contournées en remplaçant l'anticorps secondaire marqué à l'AP (1:1000. Barres pleines ; révélation au p-NPP et lecture à 405 nm) par un anticorps couplé à la HRP (1:2000. Barres hachurées, révélation au TMB et lecture à 450 nm). (D) Lors de l'utilisation de séra dilués selon le protocole standard présenté dans la section matériels et méthodes (1:20), les DO mesurées à 450 nm sont trop élevées pour pouvoir mettre en évidence des différences lors de la comparaison entre humains sains et malades (N=5, test ANOVA à deux facteurs). (E) Un test de dilution (1:20-1:200, N=3) nous a permis de déterminer que la dilution optimale des séra pour ce test était de 1:100 (Triangles : donneurs sains. Ronds : LED). (F) Après avoir déterminé ces conditions, nous avons pu observer que l'origine des mitochondries ne produisait pas de différences significatives au sein d'un même groupe de donneurs, tout en permettant d'observer des différences similaires lors de la comparaison des groupes de donneurs (N=5, Test ANOVA à un facteur). Moyennes \pm SD. Ns $p > 0,5$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Nous avons ensuite vérifié cette assertion en mesurant la coloration au fil du temps du p-NPP pur ou bien contenant des mitochondries humaines (Figure 12B). Nous avons observé qu'une réaction avait lieu entre les mitochondries et le p-NPP. Ainsi, nous avons pu déterminer que l'utilisation du couple anticorps secondaire couplé à l'AP/p-NPP est à proscrire lors de l'utilisation de mitochondries humaines. Nous l'avons, par conséquent, remplacé par un anticorps couplé à la HRP, une révélation au TMB et une lecture à 450 nm (Figure 12C), ce qui nous a permis de diminuer de façon drastique le bruit de fond détecté dans les puits correspondants aux conditions contrôles négatifs (i.e. : les conditions tampon et IV.3) et ainsi d'augmenter la plage dynamique des valeurs détectables.

Nous avons ensuite fait face à la nécessité d'inclure une nouvelle étape de développement (Figure 12D) car, bien que le couple HRP/TMB nous permette de

limiter le bruit de fond observé précédemment, nous avons détecté des valeurs de DO proches du seuil maximum de détection de la technique lorsque les séra sont incubés à la dilution recommandée pour le protocole standard murin (1:20). Nous avons donc réalisé une gamme de dilution des séra (Figure 12E) afin de pouvoir déterminer la dilution optimale des séra. Ainsi, nous avons pu déterminer qu'une dilution au 1:100 permettait d'obtenir un écart maximal entre les DO mesurées pour les donneurs sains et les patients LED (***, test ANOVA à deux facteurs et comparaisons multiples).

Enfin, nous avons répété le test ELISA permettant la détection des anticorps dirigés contre les mitochondries en appliquant les conditions expérimentales déterminées précédemment (Figure 12F). Nous n'avons pas pu observer de différences significatives entre les résultats de DO mesurées lorsque les séra sont incubés sur des mitochondries d'origines murines ou humaines. De même, les significativités observés en comparant donneurs sains et lupiques sont similaires, quelle que soit l'espèce dont proviennent les mitochondries (***, test ANOVA à un facteur). Ainsi, cela met en évidence que des mitochondries humaines ou murines peuvent être utilisées pour couvrir les puits de ce test sans influence sur la performance du test.

Oxydation des mitochondries par le TBHP : L'efficacité du protocole d'oxydation des mitochondries à l'aide d'un traitement au TBHP a été vérifiée sous deux angles. Un test TBARS permettant la quantification de l'oxydation des lipides nous a servi de test de référence afin de mettre au point les conditions expérimentales optimales pour l'oxydation des mitochondries (Figure 13A). Ainsi, même à une concentration de 500 μM de TBHP, la concentration en TBARS n'atteint pas de plateau (concentration maximale : $1,96 \pm 0,28 \mu\text{M}$ TBARS), nous avons toutefois choisi de fixer la concentration en TBHP du tampon d'oxydation à 500 μM afin de ne pas nous éloigner des concentrations utilisées dans la

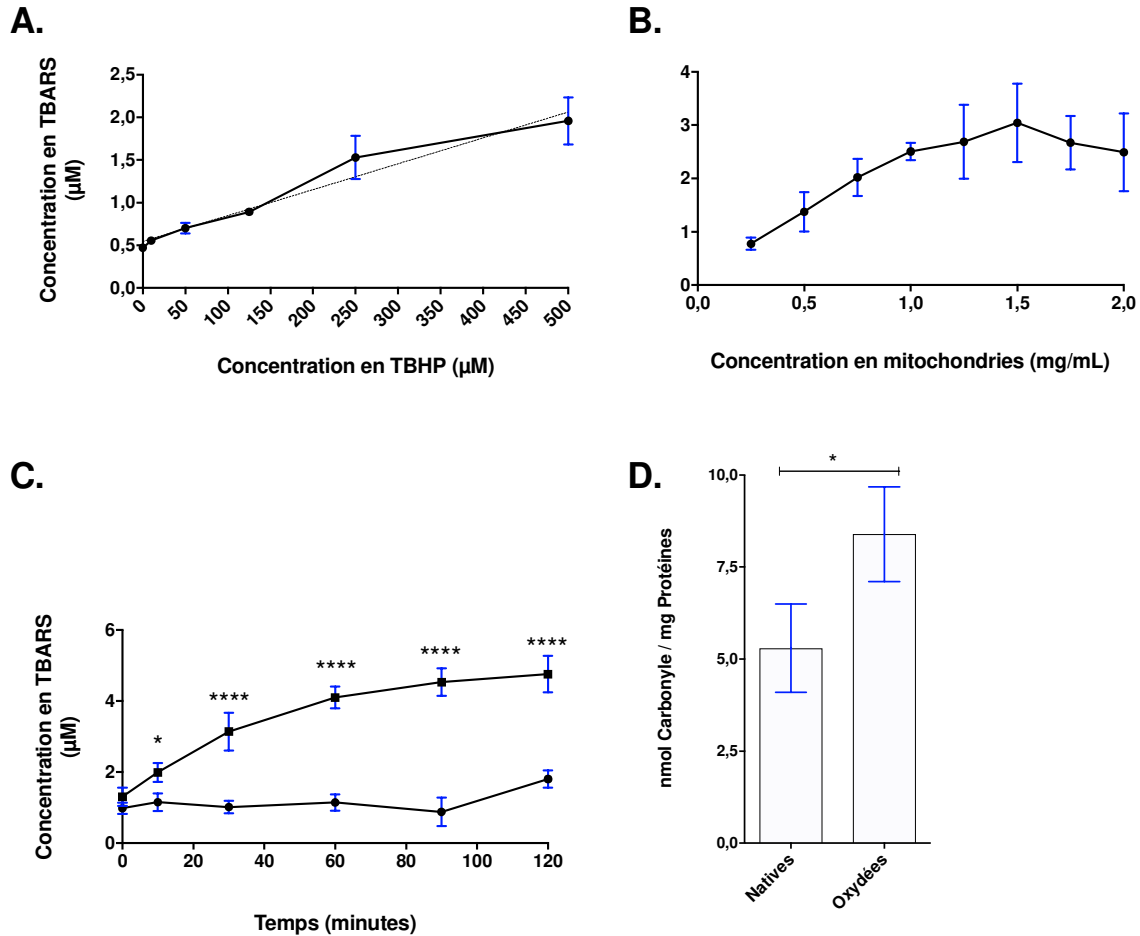


Figure 13 : Mise au point du protocole d'oxydation des mitochondries. L'optimisation du protocole d'oxydation des mitochondries s'est faite à l'aide d'un test TBARS permettant de mesurer l'oxydation des lipides. (A) Une gamme de concentration de TBHP (0-500 μM) nous a permis de déterminer que 500 μM était une concentration de TBHP permettant une bonne oxydation des lipides mitochondriaux. (B) Une seconde gamme de dilution (0,25-2 mg/mL) des mitochondries dans le tampon d'oxydation a été réalisée, indiquant que l'oxydation des lipides était optimale lorsque les mitochondries étaient resuspendues dans le tampon d'oxydation à une concentration de 1,5 mg/mL. (C) Un test de cinétique d'oxydation des mitochondries (0-120 minutes) nous a permis de fixer la durée du traitement oxydant à 1h30 (test ANOVA à deux facteurs). (D) L'effet du traitement sur l'oxydation des mitochondries selon les conditions précédemment déterminées a été déterminé à l'aide d'un test carbonyle afin de mesurer l'oxydation des protéines mitochondriales, confirmant ainsi l'efficacité du protocole (test de Wilcoxon). N=3 pour les tests TBARS et N=6 pour le test carbonyle. Concentrations moyennes \pm SD. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$. **Légende :** TBARS : substances réactives à l'acide thiobarbiturique. TBHP : hydroperoxyde de tert-butyle.

littérature²⁷⁴. Nous avons ensuite testé la concentration optimale de mitochondries à resuspendre dans le tampon d'oxydation (Figure 13B). La concentration en TBARS augmente avec la concentration en mitochondrie et atteint un plateau à 1,25 mg/mL de mitochondries ($2,72 \pm 0,61 \mu\text{M TBARS}$). Une fois ces deux variables fixées, nous avons étudié la cinétique d'oxydation des échantillons de mitochondries (Figure 13C) ; la concentration en TBARS augmente avec le temps jusqu'à $4,76 \pm 0,52 \mu\text{M TBARS}$. Ainsi, nous avons fixé les paramètres expérimentaux qui suivent pour l'oxydation des mitochondries : les mitochondries seront resuspendues à une concentration de 1,5 mg/mL en tampon d'oxydation (PBS-500 $\mu\text{M TBHP}$) pendant 1h30 à 37°C. Enfin, nous avons confirmé l'efficacité de ce traitement sur les protéines mitochondriales à l'aide d'une quantification des motifs carbonyles (Figure 13D). Ainsi, nous avons observé une différence significative (* $p=0,03$ test de Wilcoxon) entre les niveaux de carbonyles dans les échantillons de mitochondries natives ($5,30 \pm 1,20 \text{ nM/mg}$) et les mitochondries oxydées ($8,39 \pm 1,29 \text{ nM/mg}$). Ces résultats confirment que les paramètres que nous avons fixés pour l'oxydation des mitochondries sont efficaces pour oxyder à la fois les lipides et les protéines mitochondriales.

Effet de l'oxydation sur la reconnaissance des antigènes

mitochondriaux : Nous avons testé si l'oxydation des antigènes mitochondriaux pouvait influencer leur reconnaissance par les anticorps anti-mitochondriaux. Pour ce faire, nous avons comparé les signaux mesurés en fonction du statut d'oxydation de l'antigène de couverture des puits à l'aide de séra murins et humains (Figure 14). Bien qu'une augmentation des DOs puisse être observée lorsque des échantillons de séra murins sont comparés en fonction du statut d'oxydation des mitochondries utilisées pour couvrir les puits, cette augmentation se fait avec des facteurs proches (*fold changes*. Souris contrôles : 1,16. Modèle de LED : 1,29) et sans différence significative. Cette observation est répétée lors de l'utilisation de séra humains issus de donneurs sains ou souffrant de LED, d'APS ou de CBP (*fold changes*. Sains : 1,14. LED : 1,12. APS : 1,24.

CBP : 1,22.). Bien qu'une augmentation du signal ait été mesurée lors de l'utilisation de mitochondries oxydées *in vitro* comme antigènes de couverture, ces résultats suggèrent que le protocole de test ELISA direct que nous avons mis au point n'est pas à même de déterminer l'influence de l'oxydation des épitopes mitochondriaux sur leur reconnaissance par les anticorps présents dans les échantillons biologiques des groupes d'intérêt.

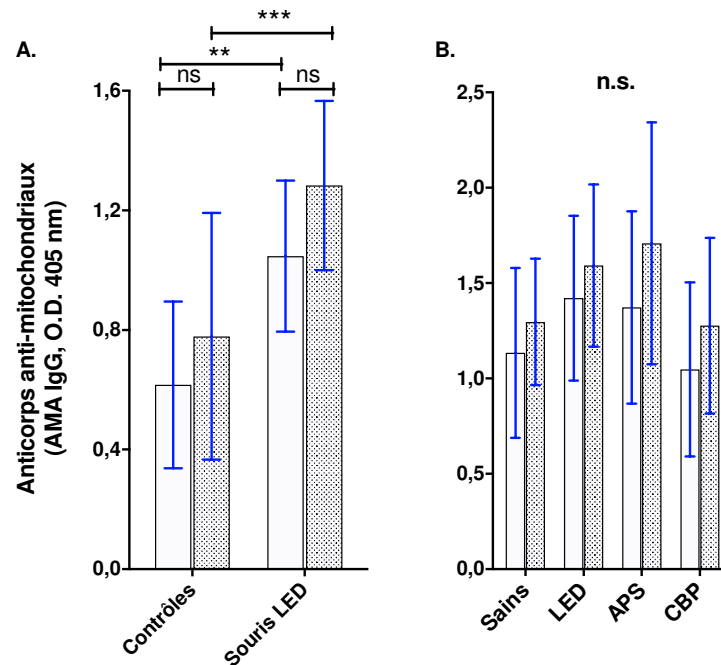


Figure 14 : Influence de l'oxydation des épitopes sur la fixation des anticorps sériques.

Après avoir optimisé notre protocole d'oxydation des mitochondries, nous avons cherché à déterminer si l'oxydation des mitochondries pouvait être à l'origine de néo-antigènes dont certains pourraient être la cible d'anticorps sériques mais non détectés lors de l'utilisation de mitochondries natives comme antigènes de couverture. Ainsi, nous avons comparé les DO obtenues lorsque des séra humains ou murins (1:20) sont déposés, ou bien sur des mitochondries natives (barres pleines) ou bien oxydées (barres à pointillés). (A) L'utilisation de mitochondries oxydées comme antigène de couverture ne permet pas la détection d'un effet significatif de l'oxydation des antigènes sur leur reconnaissance par les anticorps présents dans le sérum. Une élévation de la DO est toutefois mesurée dans les deux groupes. De plus, les différents groupes présentent des accroissements de leurs DO moyennes proches, quel que soit le statut d'oxydation des mitochondries. (B) Cette expérience a été répétée chez l'humain avec des résultats concordants avec ceux observés chez les souris. N=13 pour les souris, N=10 pour les humains. DO moyenne \pm SD. Test ANOVA à un facteur. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3. Détection d'anticorps ciblant des antigènes mitochondriaux et corrélations cliniques.

Le troisième objectif de notre étude concerne l'implication des anticorps ciblant des antigènes mitochondriaux dans l'expression clinique du LED. Pour y répondre, nous avons appliqué deux des techniques développées précédemment, les ELISA de détection des anticorps anti-mitochondriaux et anti-MtDNA à l'aide de deux cohortes de patients afin de pouvoir mettre en évidence la présence de ces anticorps chez des patients lupiques ou souffrant d'APS. Nous avons ensuite établi des corrélations entre les paramètres cliniques des patients et les niveaux de ces anticorps en collaboration avec Mlles. Anne-Sophie Julien et Renée-Claude Loignon, biostatisticiennes au CHUL.

Présence d'anticorps anti-mitochondriaux : Nous avons testé les séra issus de deux cohortes humaines afin de mettre en évidence la présence d'anticorps ciblant les mitochondries entières et natives ainsi que les anticorps anti-MtDNA. Le test de détection des anticorps anti-mitochondriaux (Figure 15A) met en évidence que les patients de la cohorte de Toronto sont caractérisés par un accroissement significatif des anticorps sériques (LED : **, $1,49 \pm 0,46$. APS : *, $1,70 \pm 0,60$ unités de DO. Test ANOVA à un facteur et comparaisons multiples) par rapport aux donneurs sains. Nous avons observé une tendance similaire lors de la détection des anticorps anti-MtDNA (Figure 15B. LED : **, $0,74 \pm 0,23$. APS : ***, $0,88 \pm 0,25$ unités de DO. Test ANOVA à un facteur et comparaisons multiples). Les résultats observés pour les patients souffrant de LED confirment les résultats obtenus précédemment avec le modèle murin inductible pour cette maladie.

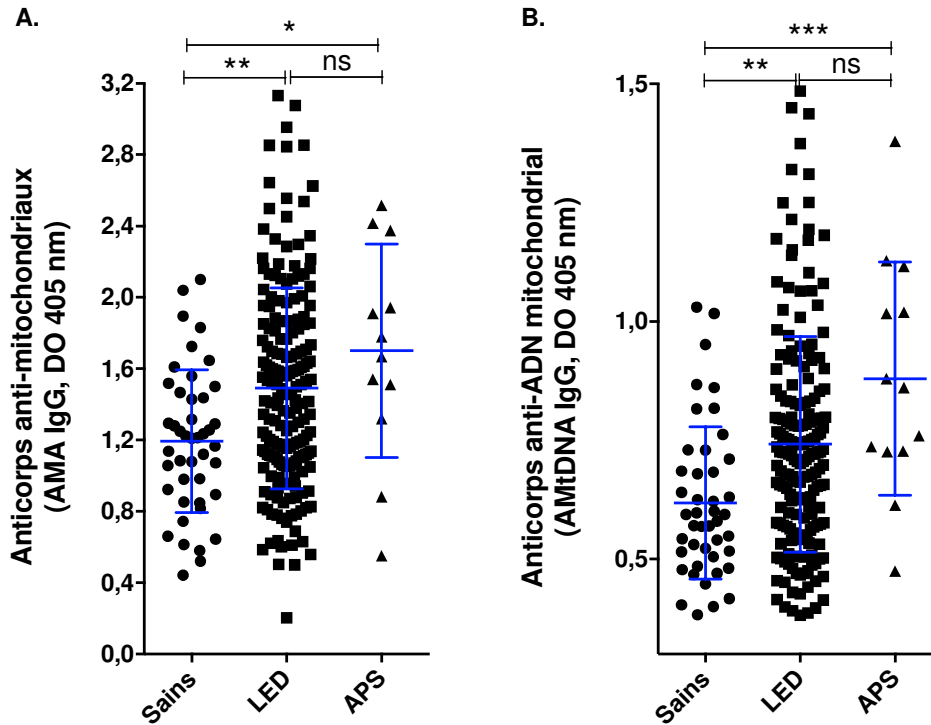


Figure 15 : Détection des anticorps anti-mitochondriaux dans les séras des patients issus de la cohorte de Québec. La présence des différents types d'anticorps pour lesquels nous avons développé des tests ELISA a été évaluée à l'aide de séras de patients (1:20) inclus dans la cohorte de Toronto. (A). Détection des anticorps dirigés contre des mitochondries intègres ; les patients des deux groupes LED et APS expriment une quantité d'AMA accrue dans leur sérum. (B) Anticorps ciblant l'ADN mitochondrial ; un accroissement de la quantité d'AMtDNA a été mesuré chez les patients souffrant d'APS ainsi que, avec une moindre amplitude chez les patients lupiques. Donneurs sains : N=44, LED : N=181, APS : N=12. DO moyenne \pm SD. Test ANOVA à un facteur. Ns : $p > 0,5$; * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Ces tests ont été répétés à l'aide de séras de patients lupiques inclus dans la cohorte de Québec, toutefois, des échantillons issus de donneurs sains n'étaient pas disponibles au moment des tests. Ainsi, les DO mesurées pour les anticorps anti-mitochondriaux avec ces échantillons sont de $1,46 \pm 0,48$ (Figure 16A). Pour les anticorps dirigés contre les anticorps ciblant le MtDNA (Figure 16B), les DO mesurées sont de $0,68 \pm 0,37$. Ces résultats préliminaires nous ont permis de répéter les tests de corrélation entre les niveaux d'anticorps mesurés et les

caractéristiques cliniques exprimées par les patients afin de confirmer les résultats obtenus au sein de la cohorte de Toronto. Ils seront répétés en incluant des patients sains ainsi que des standards internes appropriés ce qui permettra de déterminer les différences relatives aux anticorps anti-mitochondriaux entre donneurs sains et patients à l'instar de ce qui a été réalisé pour la cohorte de Toronto.

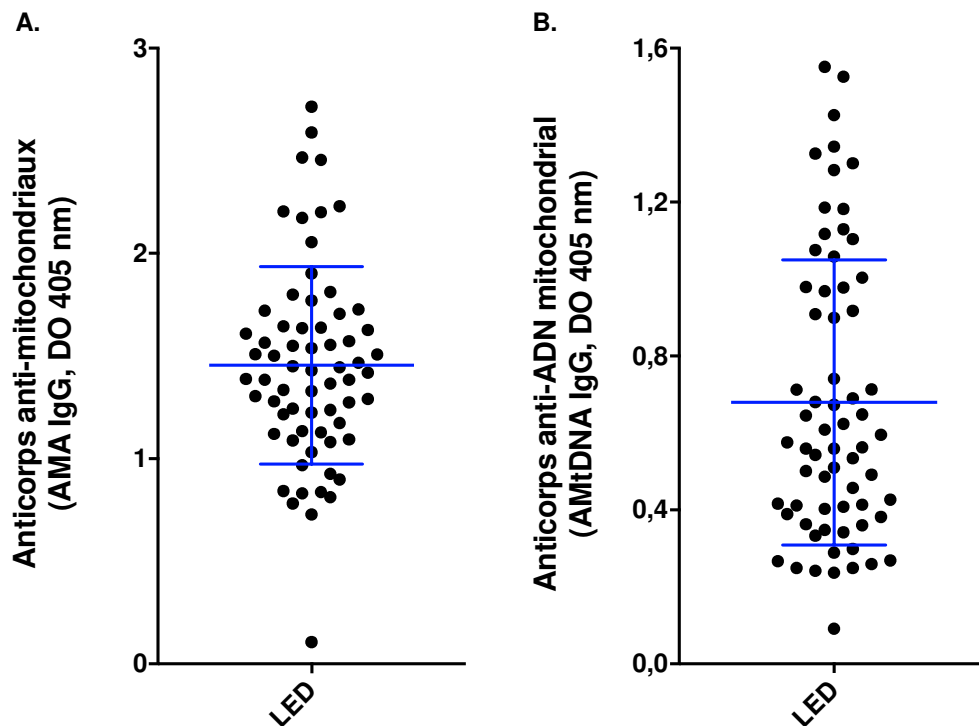


Figure 16 : Anticorps ciblant des antigènes mitochondriaux présents chez les patients de la cohorte MRAS de Québec. Bien que des donneurs sains n'aient pas été disponibles au moment de l'expérience, nous avons répété les tests ELISA de détection (A) des AMA et (B) des AMtDNA à l'aide des séra (1:20) de patients lupiques inclus dans la cohorte MRAS de Québec. Ces résultats préliminaires nous ont permis de déterminer des corrélations cliniques entre les niveaux d'anticorps détectés et les caractéristiques cliniques exprimées par les malades. N=66. DO moyenne \pm SD.

Corrélations entre les anticorps détectés et les manifestations cliniques du lupus :

Des analyses biostatistiques ont été réalisées afin de pouvoir déterminer des associations entre les résultats obtenus par le biais des ELISA que nous avons développés et un ensemble de variables cliniques exprimées par les patients (Tableaux supplémentaire 4). Ainsi, nous avons pu observer des corrélations significatives entre les AMA et la présence d'ACL ainsi qu'entre les AMtDNA et la présence d'anticorps anti-DsDNA (Tableau 2). Sur le plan clinique, nous avons déterminé que les anticorps anti-MtDNA, à l'instar des anti-DsDNA sont associés avec une élévation du score d'activité clinique de la maladie (*systemic lupus erythematosus disease activity index*, SLEDAI) surtout en lien avec le score alloué à la présence d'anti-DsDNA. Toutefois, les AMA semblent avoir un effet protecteur vis-à-vis de la description d'antécédents thrombotiques chez les patients. Le rapport de cotes de cette association (*odd ratio*, OR) indique un fort effet protecteur au sein de la cohorte de Toronto [0,49 (0,24-1,03) $p=0,06$], il est toutefois plus modéré pour la cohorte Québécoise [0,22 (0,03-1,70) $p=0,15$] (Tableau 3).

Tableau 2: Associations entre trois différents types d'anticorps ciblant les mitochondries chez les patients des cohortes de Toronto et de Québec.

A. Toronto	AMtDNA (Unités de DO)	AMA (Unités de DO)
AMA (Unités de DO)	r=0,15 p=0,04	n/a
ACL (+ vs -)	(+) 0,75±0,34 (-) 0,72±0,26 p=0,47	(+) 1,59±0,36 (-) 1,41±0,79 p=0,26
DsDNA accru (+ vs -)	(+) 0,80±0,33 (-) 0,68±0,24 p=<0,0001	(+) 1,49±0,67 (-) 1,41±0,80 p=0,9464

B. Québec	AMtDNA (Unités de DO)	AMA (Unités de DO)
AMA (Unités de DO)	r=0,21 p=0,09	n/a
ACL IgG (+ vs -)	(+) 0,65±0,63 (-) 0,53±0,39 p=0,07	(+) 1,72±0,62 (-) 1,29±0,58 p=0,002
ACL IgM (+ vs -)	(+) 0,61±0,54 (-) 0,53±0,57 p=0,20	(+) 1,90±0,48 (-) 1,37±0,49 p=0,0003
DsDNA accru (+ vs -)	(+) 1,10±0,68 (-) 0,50±0,37 p=0,0006	(+) 1,57±0,81 (-) 1,36±0,52 p=0,0860

Colonnes AMtDNA : les valeurs sont présentées par la valeur du coefficient de Spearman et la valeur p (r et p) pour la première colonne ou par la médiane ± IQR pour les valeurs des patients positifs (+) ou négatifs (-) pour les ACL et les anti-DsDNA ainsi que la valeur p obtenue par le test de Wilcoxon.

Colonnes AMA : médiane ± IQR pour les valeurs des patients positifs (+) ou négatifs (-) pour les ACL et les anti-DsDNA ainsi que la p-valeur obtenue par le test de Wilcoxon.

Tableau 3: Corrélations entre la présence d'anticorps dirigés contre les mitochondries et les paramètres cliniques des patients inclus dans les cohortes de Toronto et de Québec.

A.

Toronto. N = 181				
	Évènements thrombotiques (sauf veineux)	Score SLEDAI ≥ 4	Score SLEDAI ≥ 4, Critère d'élévation des anti-DsDNA exclu	Fixation des anti-DsDNA au dessus du seuil normal (Test de Farr)
AMA (Unités de DO)	181/175 0,49 (0,25-0,98) 0,04 0,49 (0,24-1,03) 0,06 181/175	181/175 0,83 (0,48-1,43) 0,51 0,87 (0,48-1,57) 0,65	181/175 1,06 (0,58-1,93) 0,85 1,14 (0,59-2,18) 0,70	181/175 0,97 (0,56-1,65) 0,90 1,01 (0,58-1,76) 0,96
AMtDNA (Unités de DO)	181/175 2,02 (0,44-9,32) 0,37 1,90 (0,36-10,08) 0,45	181/175 7,02 (1,74-28,33) 0,006 9,74 (2,05-46,32) 0,004	181/175 1,88 (0,43-8,27) 0,41 1,96 (0,36-10,57) 0,44	181/175 34,80 (7,10-170,47) <0,0001 38,77 (7,24-207,76) <0,0001

B.

Québec. N = 66				
	Évènements thrombotiques	Score SLEDAI ≥ 4	Score SLEDAI ≥ 4, Critère d'élévation des anti-DsDNA exclu	Anti-DsDNA (résultat clinique)
AMA (Unités de DO)	66/59 0,44 (0,10-2,02) 0,29 0,22 (0,03-1,70) 0,15	65/59 2,52 (0,83-7,64) 0,10 1,74 (0,50-6,01) 0,38	65/59 1,25 (0,42-3,72) 0,69 0,92 (0,27-3,15) 0,89	61/55 2,54 (0,72-9,02) 0,15 1,91 (0,44-8,39) 0,39
AMtDNA (Unités de DO)	66/59 0,12 (0,01-1,47) 0,10 0,03 (0,01-0,63) 0,02	65/59 4,73 (1,14-19,57) 0,030 6,59 (1,01-42,87) 0,049	65/59 2,20 (0,54-8,94) 0,27 2,10 (0,36-12,14) 0,41	61/55 22,07 (3,53-138,10) 0,0009 44,68 (2,72-733,70) 0,008

Légende :

- Première ligne :** N régression logistique bivariée/ N régression logistique multivariée
 - Deuxième ligne :** *Modèle bivarié* : rapport de cotes (95%IC)
 - Troisième ligne :** *Modèle bivarié* : valeur p
 - Quatrième ligne :** *Modèle multivarié* : rapport de cotes (95%IC)
 - Dernière ligne :** *Modèle multivarié* : valeur p
- Cases vertes : effet protecteur. Cases rouges : effet délétère.

Chapitre 5 : Discussion.

Les mitochondries sont des organelles intracellulaires considérées comme issues de l'endosymbiose d'une α -protéobactérie, proche de *Rickettsia prowazekii*. La description de cette structure remonte à la première moitié du XIX^{ème} siècle. Toutefois, selon les données disponibles, la quantité de publications relative à cette organelle était très faible avant les années 1930 – époque de la découverte du cycle de Krebs (Figure 17). La quantité de publications annuelles est ensuite restée stable jusqu'aux années 1990 à partir desquelles ce nombre s'est drastiquement accru. Cela reflète un intérêt fluctuant de la communauté scientifique pour la mitochondrie, longtemps étudiée uniquement pour son rôle dans le métabolisme énergétique. Ainsi, malgré le regain d'intérêt pour cette organelle, beaucoup d'éléments restent méconnus quant aux mécanismes physiopathologiques qui s'articulent autour de la mitochondrie, en particulier lorsque ceux-ci ne concernent pas spécifiquement le métabolisme énergétique de la cellule.

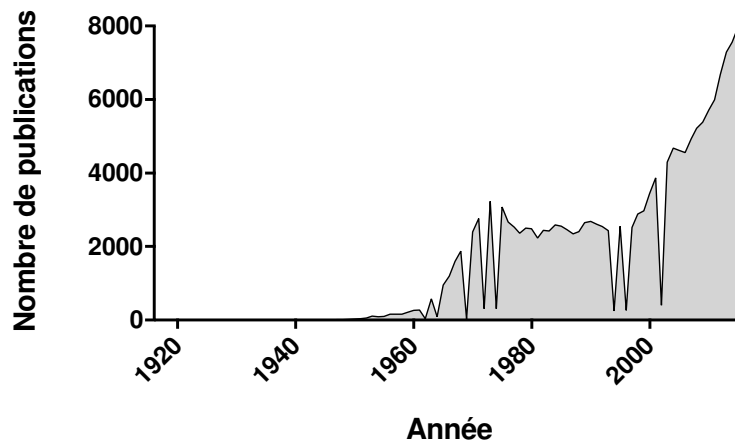


Figure 17 : Publications concernant la mitochondrie depuis un siècle. Comme recensées par l'outil « *results by year* » disponible sur le site internet pubmed.com en indiquant « *mitochondria* » comme critère de recherche.

Ainsi, les interactions entre les mitochondries, lorsque celles-ci sont extrudées des cellules et l'immunité innée est bien décrite ; les mitochondries possèdent des caractéristiques pro-inflammatoires conférées par leur origine procaryotique. Le MtDNA, de par sa structure en ADN double brin à motifs CpG hypométhylés, permet d'induire la production d'IFN- α par les cellules dendritiques plasmacytoïdes lorsqu'il se fixe sur le TLR9²⁷⁵. De même, les peptides formylés issus de la machinerie transcriptionnelle d'origine bactérienne de la mitochondrie ont la capacité d'activer les monocytes par leur liaison aux FPR-1 et -2²⁷⁶, permettant ainsi la sécrétion²⁷⁷ d'IL8 pro-inflammatoire. La cardiolipine est un phospholipide exclusivement exprimé, chez l'homme, au sein de membrane interne de la mitochondrie qui pourra migrer à destination de la membrane externe lorsque la mitochondrie est endommagée, ce qui permet le recrutement et l'activation de l'inflammasome NLRP3²⁷⁸. Ce dernier sera activé par les ROS mitochondriaux, permettant l'activation de la caspase 1, la production d'IL-1 β et d'IL-18 pro-inflammatoires^{278,279}. La concentration extracellulaire en ATP est environ de 10 nM, ce qui est relativement faible par rapport à la concentration cytosolique de la molécule, un million de fois plus élevée, à une concentration de 3-10 mM²⁸⁰. Une augmentation de l'ATP extracellulaire peut être occasionnée par la libération de mitochondries fonctionnelles ou bien par le déversement du contenu cytoplasmique de cellules au cours d'évènements traumatiques ou nécrotiques. Ainsi, l'ATP extracellulaire pourra se fixer sur les récepteurs des familles P2X et P2Y, occasionnant la stimulation de la voie de l'inflammasome NLRP3, la libération de cytokines pro-inflammatoires et la migration des neutrophiles⁸³⁻⁸⁷. Toutefois, malgré l'état de l'art quant aux relations entre mitochondries et immunité innée et nonobstant les connaissances concernant le domaine de l'immunométabolisme²⁸¹, la littérature concernant la mitochondrie et le système immunitaire adaptatif est, à date, des plus succinctes. Ainsi, la littérature fait état que la nécroptose induite par le facteur de nécrose tumorale (*tumor necrosis factor alpha*, TNF) occasionnait la libération de mitochondries intègres dans le milieu extracellulaire par les cellules mourantes. *In vitro*, ces mitochondries pouvant être phagocytées par les

macrophages et les cellules dendritiques, déclenchent la maturation des cellules dendritiques et la sécrétion de TNF par les macrophages²⁸². De même, les mécanismes relatifs à l'apprêtement et à la présentation des antigènes mitochondriaux sont très peu documentés. Il est communément admis que la présentation des mitochondries se fait par le biais de la voie de la mitophagie²⁸³, toutefois, une publication récente fait état que la mitophagie inhiberait la présentation d'antigènes mitochondriaux associés au CMH-I dans le cadre de la maladie de Parkinson et que cette présentation était en fait assurée par l'export de vésicules mitochondriales en direction de l'endosome tardif¹²⁴. La cardiolipine a la capacité à être présentée en association avec le CD1d¹²⁹. Des peptides d'origine mitochondriale ont été décrits en association avec le CMH-I^{284,285}. Le génome mitochondrial code pour des antigènes d'histocompatibilités mineurs, associés avec le CMH-I non classique de type H2-M3²⁸⁶. Ainsi, les altérations du MtDNA, notamment par le biais des ROS, pourraient modifier le répertoire des peptides mitochondriaux exprimés par la cellule et ainsi favoriser une stimulation du système immunitaire adaptatif. Enfin, des anticorps dirigés contre la mitochondrie ont décrits comme associés à différentes maladies (e.g. : LED, l'APS, la CBP, la syphilis secondaire, les cardiomyopathies). Les ACL – ou AMA de type M1 – participent à la pathogénèse de l'APS par leur capacité à activer les cellules endothéliales et à interférer avec la cascade de coagulation²⁸⁷. Dans le cadre de la CBP, les anti-PDC-E2 (i.e. anticorps immunodominants dans les AMA-M2) peuvent apparaître suite à l'exposition à certains pathogènes^{183,184}, ou suite à l'apparition d'un apotope spécifique (i.e. épitope spécifiquement formé au cours de l'apoptose) au sein des cellules épithéliales des voies biliaires²⁸⁸. Ainsi, les antigènes de pathogènes et/ou l'accumulation d'apoptosomes dans les voies biliaires aboutiraient à une rupture de la tolérance chez les individus génétiquement susceptibles, puis à la destruction par le système immunitaire des cellules biliaires²⁸⁹. La pathogénicité des AMA-M4 et –M9 dans la CBP n'est pas connue, ils constituent toutefois des marqueurs cliniques permettant respectivement de poser un pronostic quant à l'évolution de la maladie ou bien de pouvoir détecter une forme précoce et/ou asymptomatique de la CBP. Certains

types d'AMA ne sont à ce jour que décrits comme étant associés à une pathologie, de plus, toutes les cibles antigéniques des AMA n'ont pas encore été découvertes. Pour notre étude, nous avons étudié les associations des anticorps dirigés contre les mitochondries intactes ou le MtDNA avec les paramètres cliniques exprimés par des patients lupiques, ce qui n'avait jamais encore été fait pour les AMA.

Nous avons développé des outils robustes permettant la détection d'anticorps dirigés contre des cibles d'origine mitochondriale. Une méthode de détection des AMA par ELISA direct a déjà été décrite dans la littérature^{290,291}, toutefois la technique décrite utilise des SMP obtenues par sonication d'échantillons de mitochondries afin de couvrir les plaques. L'avantage des SMP est qu'ils permettent la détection d'antigènes localisés dans la membrane mitochondriale interne (e.g. : M2). Notre équipe ayant déjà décrit la libération de mitochondries extracellulaires entières et fonctionnelles⁶² dans différents contextes (Melki *et al*, communication personnelle), nous avons voulu déterminer si les séra de patients souffrant de différents types de pathologies comprenaient des anticorps pouvant se fixer sur des mitochondries entières. De même, notre protocole permet l'utilisation de mitochondries issues de différentes espèces, ce qui se rapproche de l'utilisation en diagnostic clinique par IF de cellules HepG2 (i.e. : humaines) et de coupes à triple substrat (i.e. : estomac, rein et foie de rat) et qui permettrait à une équipe, désireuse d'utiliser nos outils, d'adapter la couverture des puits en fonction des infrastructures à sa disposition (e.g. : proximité d'une animalerie, disponibilité de matériel pour la culture cellulaire). Par ailleurs, notre technique pourrait être utilisée dans la détection d'anticorps dans d'autres types de fluides biologiques (e.g. : plasma, urine, liquides cérébro-spinaux, liquides synoviaux). Toutefois, de telles modifications impliqueraient d'adapter notre protocole en fonction du type d'échantillon biologique utilisé. Par exemple, les milieux riches en protéines, telles que le plasma et les liquides synoviaux pourraient nécessiter d'adapter l'étape de blocage ainsi que la dilution des échantillons afin de limiter les risques de fixations aspécifiques. Certains échantillons trop riches en protéines ou bien trop dilués nécessiteraient probablement de subir une première étape de purification des anticorps (e.g. sur colonne de protéine A) afin d'éliminer d'éventuelles protéines

pouvant causer des interférences dans les résultats obtenus et/ou de concentrer les anticorps présents au sein de l'échantillon. Le récepteur à la fraction cristallisable des IgG, le FcγRIIIa (aussi désigné sous le terme CD32a) étant un récepteur membranaire ayant une forte implication dans la physiopathologie du LED²⁹², notre étude a été dédiée à la détection des IgG présents dans les séra des patients. Toutefois, nos tests permettent de détecter d'autres isotypes ou sous-classes d'anticorps en substituant l'anticorps secondaire anti-IgG couplé par un autre type d'anticorps pertinent pour l'étude car l'ensemble des isotypes et des sous-classes d'anticorps est représenté dans la maladie²⁰⁸. Ainsi, le FcγRIIIa ayant une forte spécificité pour les IgG₃^{293,294}, il pourrait être intéressant d'adapter notre protocole pour la détection de cette sous-classe d'IgG chez l'humain. De même, bien que les souris n'expriment pas de FcγRIIIa, un modèle de souris transgénique pour le CD32a est disponible au laboratoire et permettrait la détection des IgG_{2b}, sous-classe d'anticorps présentant la plus forte spécificité pour ce récepteur chez la souris transgénique²⁹⁵. Des anticorps, dits « naturels »^{296,297} ont été décrits chez des individus en santé ; ces IgM sont considérés comme permettant la clearance d'auto-antigènes afin de limiter le développement d'auto-anticorps de classe IgG. Des quantités non négligeables d'AMA-IgG étant détectable chez les donneurs sains, la détection des IgM à l'aide de notre test ELISA afin permettrait de mettre en évidence l'existence d'anticorps naturels anti-mitochondriaux. La comparaison des taux d'AMA-IgM et -IgG ainsi détectés permettrait d'évaluer l'importance des anticorps naturels anti-mitochondriaux dans le développement du LED. Enfin, la détection des IgA dans différents fluides biologiques en contact avec des muqueuses (e.g. lavages broncho-alvéolaires, urine, frottis vaginaux) permettraient d'évaluer une éventuelle immunisation transmucoale qui sous-entendrait que le microbiote pourrait être à l'origine d'anticorps présentant des réactivités croisées avec les mitochondries de par l'origine bactérienne de l'organelle. Des tests ELISA permettant la détection d'AMtDNA dans le cadre du LED sont déjà présents dans la littérature²⁹⁸, toutefois, ces derniers ne sont que peu décrits et caractérisés. Notre étude apporte ainsi la description clé-en-main des différentes étapes d'isolation de mitochondries et du MtDNA, puis de la procédure à suivre afin de

réaliser un test ELISA de détection des AMtDNA. Un autre apport de notre projet par rapport à la littérature sur les AMtDNA est l'utilisation de deux cohortes de tailles conséquentes et richement caractérisées quant à l'expression clinique du LED chez les patients inclus. Ce qui nous a permis de déterminer la présence des anticorps, leurs associations ainsi que leurs corrélations avec une liste étendue de paramètres cliniques exprimés par les patients. Enfin, les deux tests que nous décrivons, ainsi que les ELISA de détection des anti-cardiolipines constituent un ensemble de méthodes permettant la détection de trois types d'antigènes mitochondriaux différents et non redondants (i.e. : un crible de l'ensemble des AMA par l'utilisation des mitochondries entières, les acides nucléiques par l'ELISA-AMtDNA et un phospholipide par les ELISA-ACL).

Nous avons déterminé à l'aide de ces techniques que le modèle murin inductible de LED développe des AMA et des AMtDNA, ce qui n'avait pas encore été caractérisés par l'équipe à l'origine de ce modèle²⁰⁷. Un phénomène d'*epitope spread* aboutissant au développement de différents types d'anticorps anti-phospholipides, dont des anti-cardiolipines, a été décrit par les auteurs, ce qui constitue, avec notre détection d'AMA et d'AMtDNA, trois évidences distinctes d'une interaction entre le système immunitaire adaptatif et les mitochondries dans ce modèle. Ces observations ont été répétées chez l'humain à l'aide des différents types de pathologies que nous avons étudiées. Toutefois, le fait que nous ne détectons pas d'AMA chez les patients souffrant de CBP est probablement dû au fait que l'épitope immunodominant dans la maladie, PDC-E2¹⁵⁷ (i.e. : un des épitopes reconnus par les AMA-M2) est localisé au sein de la membrane mitochondriale interne. Ces anticorps ont pu être détectés à l'aide de SMP car la sonication altère la structure de la mitochondrie, permettant aux antigènes de la membrane interne et reconnus par les anti-M2 d'être exprimés à la surface des SMP. Toutefois, dans le cadre de notre étude, nous utilisons des mitochondries intactes, il est donc fort probable que la membrane externe empêche les AMA-M2 d'accéder à leurs cibles. Enfin, nous avons constaté que la présence d'AMA corrèle avec un effet protecteur vis-à-vis des événements thrombotiques, que les niveaux d'AMtDNA corrélaient fortement avec ceux des anti-DsDNA et qu'il en

résultait par là qu'une augmentation des AMtDNA était liée à une élévation du score clinique d'activité du LED (SLEDAI) en lien avec les deux points alloués par l'item concernant les anti-DsDNA²⁹⁹ (Tableau supplémentaire 5). Il est intéressant de mentionner que nos découvertes quant aux associations entre AMtDNA, Anti-DsDNA et SLEDAI corroborent les travaux de Wang *et al*²⁹⁸.

L'implication de l'oxydation par les ROS mitochondriaux dans différents mécanismes physiopathologiques du lupus est un domaine de recherche en pleine expansion³⁰⁰. L'engagement de la voie de l'inflammasome NLRP3 dans le LED^{108,278,279} est dû à la présence de ROS mitochondriaux et aboutit à une boucle d'amplification par l'accumulation de mitochondries endommagées et productrices de ROS²⁷⁹. Les ROS sont nécessaires au déclenchement de la NETose par les neutrophiles^{64,65} et à la libération de MtDNA oxydé. Le sérum des patients lupiques présente aussi une élévation des lipides³⁰¹ et protéines^{302,303} oxydés en circulation. Nous avons donc adapté le test ELISA de détection des AMA en couvrant les plaques à l'aide de mitochondries préalablement oxydées afin de déterminer si l'oxydation des antigènes mitochondriaux pouvait influencer leur reconnaissance par les anticorps sériques. Nous n'avons pas détecté d'effet de l'oxydation des épitopes mitochondriaux sur leur reconnaissance par les anticorps sériques, toutefois, la littérature fait état de l'existence dans le sérum de protéines capables de se fixer à des motifs oxydés, aboutissant ainsi à des risques d'interférence liés au fait que ces protéines pourraient masquer des sites antigéniques (i.e. : faux négatifs) ou bien que des auto-anticorps puissent être dirigés contre ces protéines plutôt que contre les motifs oxydés (i.e. : faux positifs)³⁰⁴. Ainsi, notre outil de détection des anticorps dirigés contre des épitopes oxydés pourrait être optimisé par l'utilisation d'anticorps purifiés plutôt que de dilutions de sérum. Il est toutefois à relever qu'un protocole systématique de purification des anticorps serait difficile à mettre en place sur des échantillons de séra humains, l'isolation nécessitant un volume de sérum trop important. Toutefois, cette étude pourrait être envisageable sur des échantillons prélevés sur des modèles murins.

Ces résultats soulignent l'hétérogénéité des différents types d'anticorps anti-mitochondriaux. Les ELISA mentionnés dans la littérature utilisaient des SMP comme antigènes de couverture. Les SMP étant formés par sonication de mitochondries entières, les échantillons obtenus contenaient un mélange de vésicules mitochondriales inversées (i.e. dont l'IMM est exposée à l'extérieur de la particule) et intactes (i.e. dont l'OMM est en contact avec le milieu extérieur à la particule), ce qui ne permettait pas d'apprécier la localisation des différents antigènes détectés. Les résultats que nous avons obtenus à l'aide de mitochondries intactes (i.e. immunoréactivité des patients lupiques, résultats négatifs pour les patients cirrhotiques) ne sont pas redondants avec ceux disponibles dans la littérature, lorsque des SMP sont utilisés comme antigènes de couverture (i.e. détection d'anticorps dans la CBP et parfois dans le LED). Les antigènes immunodominants de la CBP étant localisés au sein de l'IMM, il est tentant de postuler que les résultats que nous avons obtenus au cours de notre étude suggèrent l'existence d'anticorps spécifiques à l'OMM dans le LED. Ainsi, les cibles moléculaires de ces anticorps restent à être identifiées au sein des 1100 à 1900 molécules du protéome mitochondrial³⁰⁵. Notre étude pourra être répétée en utilisant les antigènes ainsi identifiés pour couvrir les puits afin d'obtenir des informations quant à l'implication de peptides et/ou de protéines spécifiques et des anticorps les reconnaissant dans la physiopathologie de la maladie et son expression clinique. Ces résultats permettraient, à terme, de développer de nouveaux tests de détection de biomarqueurs mitochondriaux dans le LED et permettant le diagnostic, la prédiction de l'activité et/ou de la sévérité de la maladie ou encore la stratification des patients – améliorant ainsi la prise en charge et la qualité des soins des patients lupiques.

Chapitre 6 : Perspectives.

Cette dernière partie abordera la direction que nous voulons donner à ce projet dans le futur. Les tests ELISA que nous avons réalisés au cours de la présente étude ont majoritairement été réalisés à l'aide de séra faiblement dilués ; or nous avons observé que les DO mesurées chez les souris des groupes contrôles et les patients sains ne sont pas négligeables. Ainsi, la répétition de nos mesures avec des dilutions supérieures nous permettra d'évaluer si ces valeurs sont élevées à cause d'une trop faible dilution ou bien à cause de la présence intrinsèque d'anticorps anti-mitochondriaux, même chez les souris et humains en santé. Cette étape nous permettra aussi d'évaluer comment évoluent les valeurs pour les souris du modèle inductible de LED ainsi que les patients malades, permettant ainsi une identification encore plus poussée des individus ayant de fortes quantités d'AMA sériques et ainsi un affinement de la caractérisation des associations entre ces anticorps et les caractéristiques cliniques des patients. Toutefois, il est possible que la détection d'anticorps anti-mitochondriaux chez les individus sains persiste malgré la dilution. En effet, la littérature concernant les AMA mentionne l'existence d'anticorps naturels^{296,297} (*natural antibodies*, NIg) dirigés contre les mitochondries. Les NIg ont été identifiés comme membres d'une branche de l'immunité humorale à mi-chemin entre immunité innée et adaptative, multiréactifs³⁰⁶, en général (mais pas exclusivement) de la classe des IgM et permettant notamment la clairance de corps apoptotiques³⁰⁷ et de complexes immuns³⁰⁸. Ainsi, des NIg pourraient être dirigés contre les mitochondries extracellulaires afin de diminuer les risques liés aux DAMPs mitochondriaux, aux ROS, ainsi qu'à l'interaction des mitochondries avec le complément³⁰⁹.

Nous planifions aussi de caractériser les anticorps que nous avons mesurés. Cela se ferait par la détection des isotypes des anticorps que nous avons détectés. Une forte détection d'IgM nous offrirait une indication quant à l'appartenance de ces anticorps à la classe des NIg. La détection des épitopes protéiques ciblés par les AMA sériques à l'aide de techniques telles que l'immunobuvardage à deux

dimensions afin d'identifier des différences de reconnaissance entre les sujets sains et malades, puis à l'identification par des techniques de spectrométrie de masse des protéines présentes au sein des *spots* ainsi déterminés³¹⁰. Ces informations nous permettront d'identifier de nouveaux antigènes mitochondriaux qui pourront enrichir l'ensemble de nos outils de détection par tests ELISA. De plus, la comparaison des séquences des protéines identifiées avec une liste de pathogènes à déterminer permettrait de nous renseigner quant à la possibilité de réactivités croisées des anticorps identifiés. Cette information nous apporterait des renseignements quant à la possibilité d'une implication du microbiote dans le développement d'anticorps polyréactifs ayant la capacité de se fixer sur les mitochondries. Enfin, l'implication du microbiote dans la détection des AMA pourrait être confirmée en détectant l'évolution dans le temps des quantités d'anticorps anti-mitochondriaux à l'aide d'un modèle murin axénique et de contrôles tels que des souris axéniques colonisées par des micro-organismes ainsi que des souris du même fond génétique nées et élevées dans une animalerie non stérile.

Les corrélations biostatistiques effectuées sur les échantillons de la cohorte de Toronto ayant indiquées un effet protecteur des AMA envers les évènements thrombotiques, une association entre les niveaux d'AMtDNA et d'anti-DsDNA ainsi qu'une corrélation entre la présence d'AMtDNA et une élévation du SLEDAI, nous prévoyons de répéter les expériences de détection des AMA et AMtDNA dans la cohorte MRAS de Québec en y incluant les patients sains récemment recrutés. Cela nous permettra de pouvoir comparer les différences de niveaux pour ces deux types d'autoanticorps au sein de cette cohorte, entre malades du lupus et donneurs sains pairés et ainsi de pouvoir confirmer les associations observées dans la cohorte de Toronto. Il est aussi planifié de répéter les tests de détection de ces deux types d'anticorps sur un troisième groupe de patients inclus dans la cohorte prospective SLICC. Cette cohorte comprend 1800 patients suivis dans 33 centres, répartis dans 11 pays. Pour y être inclus, les patients doivent répondre aux critères de classification du lupus édités par l'ACR^{213,214} et leur maladie, diagnostiquée depuis moins de 15 mois. Cette cohorte comporte une description

détaillée des complications neurologiques et cardiovasculaires, de l'activité de la maladie ainsi que des évènements thrombotiques sur une durée pouvant s'étendre jusqu'à 18 ans. Ainsi, les échantillons de patients inclus dans cette cohorte nous permettront d'évaluer l'évolution des anticorps ciblant des antigènes mitochondriaux dans le temps ainsi que de renforcer nos corrélations en permettant d'établir des relations entre les taux d'anticorps mesurés et les manifestations cliniques de la maladie (e.g. : phases d'exacerbation, de rémission, décès). Enfin, la force de l'association entre AMtDNA et anti-DsDNA nous questionne quant à la nature de ces anticorps. La cohorte SLICC nous permettra de déterminer si leurs détections sont concomitantes dans le temps ou bien si elles se font séquentiellement, suite à un effet dit d'*epitope spread*. Enfin, nous mettrons au point un protocole d'ELISA-AMtDNA par compétition avec du nDNA. Des plaques ELISA couvertes avec du MtDNA seraient bloquées puis incubées à l'aide d'une solution contenant à la fois du sérum de patient dilué et du nDNA. Si les AMtDNA sont spécifiques du MtDNA, l'adjonction de nDNA n'aura aucun effet sur les DO mesurées et dans le cas inverse où les AMtDNA reconnaissent les acides desoxyribonucléiques sans distinction quant à leurs origines, le nDNA compétitionnera avec le MtDNA pour la fixation des anticorps, provoquant ainsi une diminution des DO mesurées.

L'ensemble de ces informations nous permettra de contribuer au développement des connaissances relatives aux relations entre les mitochondries et le système immunitaire adaptatif, à une meilleure caractérisation des anticorps anti-mitochondriaux ainsi que de leurs cibles moléculaires et enfin, au développement d'outils diagnostics, pronostics ou de stratification permettant une meilleure prise en charge des malades.

Chapitre 7 : Annexes

Tableau supplémentaire 1 : Variables démographiques et cliniques pour les patients lupiques des cohortes de Toronto et de Québec

Variables démographiques - Toronto n=181 sauf si (n-manquants)	Patients LED Toronto	Patients LED Québec	Variables Québec N = 66 sauf si (n-manquants)
Age			
Écarts, années	20-78	22-77	
Moyenne ± S.D (médian), années	47 ± 15 (49)	49 ± 15 (50)	
Durée de la maladie			
Écarts, années	0-57	0-43	
Médiane ± IQR (moyenne), années	15 ± 17 (18)	6 ± 19 (11)	
Sexe, femme, n (%)	181 (100)	54 (82)	
Statut marital, n (%)	95 (53)	40 (65)	Marrié(e)/ en concubinage (n-4)
Origine ethnique, n (%) (n-1)			(n-9)
Caucasien(ne)	100 (56)	55 (96)	
Asiatique	39 (22)	0 (0)	
Afro-américain(e)	32 (18)	1 (2)	
Autre	9 (5)	1 (2)	
Éducation > 8 ans, n (%)	173 (96)	54 (90)	(n-6)
Emploi, n (%)			
Employé(e)	76 (42)	36 (57)	Travaille > 10 heures (n-3)
Infirmier / En congé maladie	39 (22)	12 (19)	Incapacité de travail (n-4)
Pré-ménopause, n (%)	82 (45)	ND	
Tabagisme, n (%)	14 (8)	14 (22)	(n-3)
Ex-fumeur(se), n (%)	43 (26)	19 (31)	(n-4)
Années depuis l'arrêt, Médiane ± IQR (moyenne)	15 ± 18 (15)	11 ± 24 (16)	(n-8)
Hypertension, n (%)	53 (29)	10 (15)	
TAsyst, Moyenne ± S.D (médiane), mmHg	120 ± 16 (120)	124 ± 12 (124)	(n-21)
TAdiast, Moyenne ± S.D (médiane), mmHg	73 ± 9 (74)	70 ± 12 (71)	(n-21)
Diabète mellitus, n (%)	9 (5)	2 (3)	
IMC, n (%)			(n-6)
< 18,5	8 (4)	3 (5)	
18,5 – 24,9	95 (53)	29 (48)	
25,0 – 29,9	44 (24)	20 (33)	
≥ 30,0	34 (19)	8 (13)	
Tour de taille, (n-1)		ND	
Écarts, cm	56-122		
Moyenne ± S.D (médiane), cm	81 ± 15 (78)		
Rapport taille-hanches (n-1)		ND	
Écarts	0,60-1,12		
Moyenne ± S.D (médiane)	0,83 ± 0,08 (0,83)		
Médication, n (%)			
Anticoagulants/antiplaquettaires (n-1)	42 (23)	9 (14)	
Antimalariques	133 (74)	52 (79)	
Prednisone	83 (46)	17 (26)	
Hypolipémiants	26 (14)	13 (20)	
Traitements contre le diabète	5 (3)	1 (2)	

Légende : IMC : indice de masse corporelle, IQR : écarts interquartiles, LED : loupus érythémateux disséminé, ND : non déterminé(e), SD : déviation standard, TAdiast : tension artérielle diastolique, TAsyst : tension artérielle systolique.

Tableau supplémentaire 2 : Caractéristiques cliniques des patients selon les critères de l'ACR

Caractéristiques cliniques, n (%)	Toronto n=181	Québec (n = 66 hormis si spécifié)	Québec: variables
Rash malaire	133 (74)	16 (25)	(n-1)
Dash discoïde	26 (14)	10 (15)	(n-1)
Photosensibilité	115 (64)	27 (42)	(n-1)
Ulcères oraux	112 (62)	18 (28)	(n-1)
Arthrite (≥ 2 articulations périphériques)	155 (86)	54 (83)	(n-1)
Inflammation tissulaire	69 (38)	14 (22)	(n-1)
Désordres neuro-psychiatriques (attaques ou psychoses)	21 (12)	3 (5)	(n-1)
Désordres rénaux	103 (57)	17 (26)	(n-1)
Filtration glomérulaire (n-15) Écarts, mL/min/1,73m ² Moyenne ± S.D (médiane), mL/min/1,73m ² < 60 mL/min/1,73m ² , n (%)	17-121 84 ± 25 (85) 28 (17)	32-82 62 ± 21 (68) ND	Clairance de la créatinine (n-60)
Désordres hématologiques	159 (88)	47 (72)	(n-1)
Désordres immunologiques	166 (92)	48 (74)	(n-1)
ANA	176 (97)	65 (100)	(n-1)
Score total de l'ACR Écarts Moyenne ± S.D (médiane)	3-11 7 ± 2 (7)	3-8 5 ± 1 (5)	(n-1)

Légende : ACR : *American college of rheumatology*, ANA : anticorps anti-nucléaires, SD : déviation standard.

Tableau supplémentaire 3 : Variables sérologiques

Paramètres sérologiques Toronto (n – manquants)	Toronto (n=181 hormis si spécifié)	Québec (n = 66)	Paramètres Québec (n-manquants)
Cholestérol total (n-2) Écarts, mmol/L Moyenne ± S.D (médiane), mmol/L	2,75-6,52 4,40 ± 0,81 (4,32)	ND	
Cholestérol LDL (n-6) Écarts, mmol/L Moyenne ± S.D (médiane), mmol/L	0,94-3,99 2,36 ± 0,60 (2,36)	ND	
Cholestérol HDL (n-6) Écarts, mmol/L Moyenne ± S.D (médiane), mmol/L	0,78-2,90 1,55 ± 0,43 (1,51)	ND	
Rapport épaisseur de la carotide/ HDL (n-6) Écarts, mmol/L Médiane ± IQR (moyenne) , mmol/L	1,65-6,73 3,00 ± 0,80 (2,86)	ND	
Plaquettes (n-5) Écarts, x10 ⁹ /L Moyenne ±S.D (médiane), x10 ⁹ /L	17-573 243 ± 75 (239)	79-502 216 ± 71 (209)	
Leucocytes (n-5) Écarts, x10 ⁹ /L Moyenne ± S.D (médiane) , x10 ⁹ /L	1,7-12,3 5,6 ± 2,1 (5,2)	2,3-13,7 5,8 ± 2,2 (5,6)	
Anti-DsDNA, test de Farr (n-1) Écarts, U/mL Médiane ± IQR (mean), U/mL < 7, n (%)	1-101 5 ± 10 (16) 105 (58)	À venir	ELISA anti-DsDNA
Anti-DsDNA accrus, n(%)	62 (34)	15 (25)	Anti-DsDNA (n-5)

Légende : DsDNA : anticorps anti-ADN double-brins, ELISA : méthode immuno-enzymatique, HLD : lipoprotéines de hautes densités, IQR : écarts interquartiles, LDL : lipoprotéines de basse densité, ND : non déterminé(e), SD : déviation standard.

Tableau supplémentaire 4 : Variables de prédiction

Variable Toronto (n – manquantd)	Toronto (n=181 hormis si spécifié)	Québec (n = 66)	Variable Québec (n-manquants)
SDI total Écarts Médiane ± IQR (moyenne)	0-10 1 ± 2 (2)	0-9 0 ± 2 (1)	Score SDI total (n-1)
SLEDAI total Écarts Médiane ± IQR (moyenne)	0-20 2 ± 4 (3)	0-18 1 ± 4 (3)	SLEDAI total (n-1)
SLEDAI total sans Anti-DsDNA accrus Écarts Médiane ± IQR (moyenne)	0-18 1 ± 3 (2)	0-16 1 ± 4 (3)	SLEDAI total sans DsDNA accrue (n-1)
Score SLEDAI ≥4, n (%)	61 (34)	24 (37)	(n-1)
Score SLEDAI ≥4, sans Anti-DsDNA accrus, n%	42 (23)	20 (31)	SLEDAI sans DsDNA accrue (n-1)
Score SDI ≥1, n (%)	128 (71)	25 (39)	(n-1)
Evènements thrombotique, oui, n (%)	38 (21)	10 (15) 3 (5) 4 (6)	Evènements thrombotique (3 types), oui Thrombose artérielle, oui Evènements thrombotique (sauf veineux), oui
Épaisseur moyenne de l'intima-média (LML CIMT moyenne) (n-75) Écarts Moyenne ± S.D (médiane)	388-969 614 ± 103	ND	
LML T plaque (n-75) Écarts Médiane ± IQR (moyenne)	0,00-0,91 0,00 ± 0,09 (0,08)	ND	
Fonction endothéliale par échographie (n-107) Écarts, % Médiane ± IQR (moyenne), %	-8,7-34,3 7,6 ± 10,8 (8,3)	ND	
Présence de plaques d'athérosclérose (n-75)	38 (36)	ND	
FMD, n (%)	84 (46)	ND	

Légende : CIMT : épaisseur moyenne de l'intima-média carotidienne, DsDNA : anticorps anti-ADN double-brins, FMD : dilatation médiée par le flux, IQR : écarts interquartiles, ND : non déterminé(e), SD : déviation standard, SDI : index de classification du lupus, SLEDAI : score clinique d'activité du lupus.

Tableau supplémentaire 5 : SLEDAI – scores alloués en fonction des paramètres cliniques exprimés par le patient.

Valeur	Manifestations	Définition
8	Convulsions	Apparition récente. Hormis des causes métaboliques, infectieuses ou médicamenteuses
8	Psychose	Perturbation de l'activité normale en rapport avec une altération sévère de la perception de la réalité. Comprend : hallucinations, incohérence, appauvrissement du contenu de la pensée, raisonnement illogique, comportement bizarre, désorganisé ou catatonique. Exclusion d'une insuffisance rénale ou d'une cause médicamenteuse
8	Atteinte cérébrale	Altération des fonctions mentales avec troubles de l'orientation, de la mémoire ou autre d'apparition brutale et d'évolution fluctuante. Comprend : troubles de la conscience avec réduction des capacités de concentration, incapacité à rester attentif avec en plus 2 au moins des manifestations suivantes : troubles perceptifs, discours incohérent, insomnie ou somnolence diurne, augmentation ou diminution de l'activité psychomotrice.
8	Troubles visuels	Atteinte rétinienne du lupus. Comprend : nodules dysoriques, hémorragies rétiniennes, exsudats séreux ou hémorragies choroïdiennes, névrite optique. Exclusion d'une cause hypertensive, infectieuse ou médicamenteuse.
8	Nerfs crâniens	Neuropathie sensitive ou motrice d'apparition récente touchant un nerf crânien
8	Céphalées	Céphalées sévères et persistantes, pouvant être migraineuses mais résistant aux antalgiques majeurs.
8	AVC	Accident vasculaire cérébral d'apparition récente. Artériosclérose exclue.
8	Vascularite	Ulcérations, gangrène, nodules digitaux douloureux, infarctus péri-unguéaux ou preuve histologique ou artériographie de vascularite.
4	Arthrites	Plus de 2 articulations douloureuses avec des signes inflammatoires locaux (douleur, tuméfaction ou épanchement articulaire).
4	Myosite	Douleur/faiblesse musculaire proximale associées à une élévation des CPK et/ou aldolases ou à des modifications électromyographiques ou à une biopsie montrant des signes de vascularite.
4	Cylindres urinaires	Cylindres de globules rouges
4	Hématurie	> 5 GR / champ en l'absence de lithiase, d'infection ou d'une autre cause.
4	Protéinurie	>0,5 g/24h. Apparition récente ou majoration récente de plus de 0,5g/24h
4	Pyurie	> 5 GB/champ en l'absence d'infection
2	Alopécie	Apparition récente ou récurrence d'une alopécie en plaque ou diffuse.
2	Ulcères muqueux	Apparition récente ou récurrence d'ulcérations orales ou nasales
2	Pleurésie	Douleur thoracique d'origine pleurale avec frottement ou épanchement ou épaississement pleural.
2	Péricardite	Douleur péricardique avec au moins l'une des manifestations suivantes : frottement, épanchement ou confirmation électrographique ou échographique.
2	Complément	Diminution du CH50, du C3 ou du C4 < à la normale inférieure du laboratoire
2	Anti-ADN	Positivité > à 25% par le test de Farr ou taux > à la normale du laboratoire
1	Fièvre	>38° en l'absence de cause infectieuse
1	Thrombopénie	< 100 000 plaquettes/mm ³
1	Leucopénie	< 3 000 GB/mm ³ en l'absence de cause médicamenteuse.

Légende : AVC : accident vasculaire cérébral. CH50 : mesure de l'activité du complément. CPK : créatinine phosphokinase, GB : globule blanc. GR : globule rouge. Adapté de Bombardier C, *et al.* Arthritis Rheum. 2012²⁹⁹.

Chapitre 8 : Bibliographie

- 1 Ernster, L. & Schatz, G. Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol* **91**, 227s-255s (1981).
- 2 Neupert, W. Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem* **66**, 863-917, doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.863 (1997).
- 3 Palade, G. E. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem* **1**, 188-211, doi:10.1177/1.4.188 (1953).
- 4 Robin, E. D. & Wong, R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *Journal of cellular physiology* **136**, 507-513, doi:10.1002/jcp.1041360316 (1988).
- 5 Cole, L. W. The Evolution of Per-cell Organelle Number. *Front Cell Dev Biol* **4**, 85, doi:10.3389/fcell.2016.00085 (2016).
- 6 Bogenhagen, D. F. Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochim Biophys Acta* **1819**, 914-920, doi:10.1016/j.bbagr.2011.11.005 (2012).
- 7 Wolstenholme, D. R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *International review of cytology* **141**, 173-216 (1992).
- 8 Taanman, J. W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta* **1410**, 103-123 (1999).
- 9 Anderson, S. *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457-465 (1981).
- 10 Chomyn, A. *et al.* URF6, last unidentified reading frame of human mtDNA, codes for an NADH dehydrogenase subunit. *Science (New York, N.Y.)* **234**, 614-618 (1986).
- 11 Cardon, L. R., Burge, C., Clayton, D. A. & Karlin, S. Pervasive CpG suppression in animal mitochondrial genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 3799-3803 (1994).
- 12 Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M. & Wallace, D. C. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 6715-6719 (1980).
- 13 Levine, B. & Elazar, Z. Development. Inheriting maternal mtDNA. *Science (New York, N.Y.)* **334**, 1069-1070, doi:10.1126/science.1215480 (2011).
- 14 Al Rawi, S. *et al.* Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science (New York, N.Y.)* **334**, 1144-1147, doi:10.1126/science.1211878 (2011).

- 15 Andersson, S. G. *et al.* The genome sequence of *Rickettsia*
prowazekii and the origin of mitochondria. *Nature* **396**, 133-140,
doi:10.1038/24094 (1998).
- 16 Angelakis, E., Bechah, Y. & Raoult, D. The History of Epidemic
Typhus. *Microbiol Spectr* **4**, doi:10.1128/microbiolspec.PoH-0010-
2015 (2016).
- 17 Galper, J. B. MITOCHONDRIAL PROTEIN SYNTHESIS IN HELA
CELLS. *J Cell Biol* **60**, 755-763 (1974).
- 18 Schlame, M. Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and
mitochondrial membranes. *J Lipid Res* **49**, 1607-1620,
doi:10.1194/jlr.R700018-JLR200 (2008).
- 19 Garcia, M. *et al.* Mitochondria-associated yeast mRNAs and the
biogenesis of molecular complexes. *Molecular biology of the cell* **18**,
362-368, doi:10.1091/mbc.E06-09-0827 (2007).
- 20 Gerber, A. P., Herschlag, D. & Brown, P. O. Extensive association of
functionally and cytotopically related mRNAs with Puf family RNA-
binding proteins in yeast. *PLoS Biol* **2**, E79,
doi:10.1371/journal.pbio.0020079 (2004).
- 21 Gadir, N., Haim-Vilmovsky, L., Kraut-Cohen, J. & Gerst, J. E.
Localization of mRNAs coding for mitochondrial proteins in the yeast
Saccharomyces cerevisiae. *Rna* **17**, 1551-1565,
doi:10.1261/rna.2621111 (2011).
- 22 Young, J. C., Hoogenraad, N. J. & Hartl, F. U. Molecular chaperones
Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import
receptor Tom70. *Cell* **112**, 41-50 (2003).
- 23 Vogel, F., Bornhovd, C., Neupert, W. & Reichert, A. S. Dynamic
subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell*
Biol **175**, 237-247, doi:10.1083/jcb.200605138 (2006).
- 24 Bereiter-Hahn, J. & Voth, M. Dynamics of mitochondria in living cells:
shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria.
Microscopy research and technique **27**, 198-219,
doi:10.1002/jemt.1070270303 (1994).
- 25 Westermann, B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death.
Nat Rev Mol Cell Biol **11**, 872-884, doi:10.1038/nrm3013 (2010).
- 26 Karbowski, M. *et al.* Quantitation of mitochondrial dynamics by
photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion
is blocked during the Bax activation phase of apoptosis. *J Cell Biol*
164, 493-499, doi:10.1083/jcb.200309082 (2004).
- 27 Chen, H. *et al.* Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate
mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J*
Cell Biol **160**, 189-200, doi:10.1083/jcb.200211046 (2003).
- 28 Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C. & Chan, D. C. OPA1
processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA
splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol* **178**, 749-755,
doi:10.1083/jcb.200704110 (2007).
- 29 Meeusen, S. *et al.* Mitochondrial inner-membrane fusion and crista
maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell* **127**,

- 383-395, doi:10.1016/j.cell.2006.09.021 (2006).
- 30 Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B. & Scorrano, L. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 15927-15932, doi:10.1073/pnas.0407043101 (2004).
- 31 Chen, H. & Chan, D. C. Physiological functions of mitochondrial fusion. *Ann N Y Acad Sci* **1201**, 21-25, doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05615.x (2010).
- 32 Mears, J. A. *et al.* Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 20-26, doi:10.1038/nsmb.1949 (2011).
- 33 Ingerman, E. *et al.* Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol* **170**, 1021-1027, doi:10.1083/jcb.200506078 (2005).
- 34 Frank, S. *et al.* The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Developmental cell* **1**, 515-525 (2001).
- 35 Rambold, A. S., Kostelecky, B., Elia, N. & Lippincott-Schwartz, J. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 10190-10195, doi:10.1073/pnas.1107402108 (2011).
- 36 Gomes, L. C., Di Benedetto, G. & Scorrano, L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* **13**, 589-598, doi:10.1038/ncb2220 (2011).
- 37 Akram, M. Mini-review on glycolysis and cancer. *J Cancer Educ* **28**, 454-457, doi:10.1007/s13187-013-0486-9 (2013).
- 38 Houten, S. M. & Wanders, R. J. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *J Inherit Metab Dis* **33**, 469-477, doi:10.1007/s10545-010-9061-2 (2010).
- 39 Akram, M. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. *Cell Biochem Biophys* **68**, 475-478, doi:10.1007/s12013-013-9750-1 (2014).
- 40 Yagi, T. & Matsuno-Yagi, A. The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase in the respiratory chain: the secret unlocked. *Biochemistry* **42**, 2266-2274, doi:10.1021/bi027158b (2003).
- 41 Alcazar-Fabra, M., Navas, P. & Brea-Calvo, G. Coenzyme Q biosynthesis and its role in the respiratory chain structure. *Biochim Biophys Acta* **1857**, 1073-1078, doi:10.1016/j.bbabbio.2016.03.010 (2016).
- 42 Rak, M. *et al.* Mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency. *Clin Sci (Lond)* **130**, 393-407, doi:10.1042/CS20150707 (2016).
- 43 Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. & Kinosita, K., Jr. Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature* **386**, 299-302, doi:10.1038/386299a0 (1997).
- 44 Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* **417**, 1-13, doi:10.1042/BJ20081386 (2009).

- 45 Miller, W. L. & Bose, H. S. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *J Lipid Res* **52**, 2111-2135, doi:10.1194/jlr.R016675 (2011).
- 46 Kwon, H. J. *et al.* Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell* **137**, 1213-1224, doi:10.1016/j.cell.2009.03.049 (2009).
- 47 Alpy, F. & Tomasetto, C. MLN64 and MENTHO, two mediators of endosomal cholesterol transport. *Biochemical Society transactions* **34**, 343-345, doi:10.1042/bst0340343 (2006).
- 48 Stocco, D. M. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annual review of physiology* **63**, 193-213, doi:10.1146/annurev.physiol.63.1.193 (2001).
- 49 Nebert, D. W., Wikvall, K. & Miller, W. L. Human cytochromes P450 in health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **368**, 20120431, doi:10.1098/rstb.2012.0431 (2013).
- 50 Cui, C., Merritt, R., Fu, L. & Pan, Z. Targeting calcium signaling in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B* **7**, 3-17, doi:10.1016/j.apsb.2016.11.001 (2017).
- 51 Koch, G. L. E. The endoplasmic reticulum and calcium storage. *BioEssays* **12**, 527-531, doi:10.1002/bies.950121105 (1990).
- 52 Gunter, T. E. & Sheu, S. S. Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca(2+) transport mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1787**, 1291-1308, doi:10.1016/j.bbabi.2008.12.011 (2009).
- 53 Gunter, T. E., Buntinas, L., Sparagna, G. C. & Gunter, K. K. The Ca²⁺ transport mechanisms of mitochondria and Ca²⁺ uptake from physiological-type Ca²⁺ transients. *Biochim Biophys Acta* **1366**, 5-15 (1998).
- 54 Baughman, J. M. *et al.* Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**, 341-345, doi:10.1038/nature10234 (2011).
- 55 Shimizu, S., Narita, M. & Tsujimoto, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**, 483-487, doi:10.1038/20959 (1999).
- 56 Narita, M. *et al.* Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 14681-14686 (1998).
- 57 Wang, C. & Youle, R. J. The role of mitochondria in apoptosis*. *Annu Rev Genet* **43**, 95-118, doi:10.1146/annurev-genet-102108-134850 (2009).
- 58 Shakeri, R., Kheirollahi, A. & Davoodi, J. Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie* **135**, 111-125, doi:10.1016/j.biochi.2017.02.001 (2017).
- 59 Nicholls, D. G. & Locke, R. M. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiological reviews* **64**, 1-64 (1984).
- 60 Nicholls, D. G. The bioenergetics of brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Letters* **61**, 103-110, doi:10.1016/0014-

- 5793(76)81014-9 (1976).
- 61 Nicholls, D. G., Bernson, V. S. & Heaton, G. M. The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. *Experientia. Supplementum* **32**, 89-93 (1978).
- 62 Boudreau, L. H. *et al.* Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation. *Blood* **124**, 2173-2183, doi:10.1182/blood-2014-05-573543 (2014).
- 63 Zhang, B., Asadi, S., Weng, Z., Sismanopoulos, N. & Theoharides, T. C. Stimulated human mast cells secrete mitochondrial components that have autocrine and paracrine inflammatory actions. *PLoS One* **7**, e49767, doi:10.1371/journal.pone.0049767 (2012).
- 64 Lood, C. *et al.* Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat Med* **22**, 146-153, doi:10.1038/nm.4027 (2016).
- 65 Caielli, S. *et al.* Oxidized mitochondrial nucleoids released by neutrophils drive type I interferon production in human lupus. *J Exp Med* **213**, 697-713, doi:10.1084/jem.20151876 (2016).
- 66 Yousefi, S. *et al.* Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med* **14**, 949-953, doi:10.1038/nm.1855 (2008).
- 67 Hajizadeh, S., DeGroot, J., TeKoppele, J. M., Tarkowski, A. & Collins, L. V. Extracellular mitochondrial DNA and oxidatively damaged DNA in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* **5**, R234-240 (2003).
- 68 Calfee, C. S. & Matthay, M. A. Clinical immunology: Culprits with evolutionary ties. *Nature* **464**, 41-42 (2010).
- 69 West, A. P., Shadel, G. S. & Ghosh, S. Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol* **11**, 389-402, doi:10.1038/nri2975 (2011).
- 70 Krysko, D. V. *et al.* Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol* **32**, 157-164, doi:10.1016/j.it.2011.01.005 (2011).
- 71 Julian, M. W. *et al.* Mitochondrial transcription factor A serves as a danger signal by augmenting plasmacytoid dendritic cell responses to DNA. *J Immunol* **189**, 433-443, doi:10.4049/jimmunol.1101375 (2012).
- 72 Hemmi, H. *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-745, doi:10.1038/35047123 (2000).
- 73 Ronnblom, L. & Eloranta, M. L. The interferon signature in autoimmune diseases. *Curr Opin Rheumatol* **25**, 248-253, doi:10.1097/BOR.0b013e32835c7e32 (2013).
- 74 Banchereau, J. & Pascual, V. Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity* **25**, 383-392, doi:10.1016/j.immuni.2006.08.010 (2006).
- 75 Collins, L. V., Hajizadeh, S., Holme, E., Jonsson, I. M. & Tarkowski,

- A. Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. *J Leukoc Biol* **75**, 995-1000, doi:10.1189/jlb.0703328 (2004).
- 76 Kohler, C. *et al.* Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Mol Cancer* **8**, 105, doi:10.1186/1476-4598-8-105 (2009).
- 77 Simmons, J. D. *et al.* Elevated levels of plasma mitochondrial DNA DAMPs are linked to clinical outcome in severely injured human subjects. *Ann Surg* **258**, 591-596; discussion 596-598, doi:10.1097/SLA.0b013e3182a4ea46 (2013).
- 78 Shi, Q. *et al.* Circulating mitochondrial biomarkers for drug-induced liver injury. *Biomarkers in medicine* **9**, 1215-1223, doi:10.2217/bmm.15.59 (2015).
- 79 Kung, C. T. *et al.* Plasma nuclear and mitochondrial DNA levels as predictors of outcome in severe sepsis patients in the emergency room. *J Transl Med* **10**, 130, doi:10.1186/1479-5876-10-130 (2012).
- 80 Wenceslau, C. F., McCarthy, C. G., Szasz, T., Goulopoulou, S. & Webb, R. C. Mitochondrial N-formyl peptides induce cardiovascular collapse and sepsis-like syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **308**, H768-777, doi:10.1152/ajpheart.00779.2014 (2015).
- 81 Le, Y., Murphy, P. M. & Wang, J. M. Formyl-peptide receptors revisited. *Trends Immunol* **23**, 541-548 (2002).
- 82 Carp, H. Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils. *J Exp Med* **155**, 264-275 (1982).
- 83 Gorini, S., Gatta, L., Pontecorvo, L., Vitiello, L. & la Sala, A. Regulation of innate immunity by extracellular nucleotides. *American journal of blood research* **3**, 14-28 (2013).
- 84 Ferrari, D. *et al.* Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol* **159**, 1451-1458 (1997).
- 85 Mariathasan, S. *et al.* Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* **430**, 213-218, doi:10.1038/nature02664 (2004).
- 86 Seiffert, K., Ding, W., Wagner, J. A. & Granstein, R. D. ATPgammaS enhances the production of inflammatory mediators by a human dermal endothelial cell line via purinergic receptor signaling. *J Invest Dermatol* **126**, 1017-1027, doi:10.1038/sj.jid.5700135 (2006).
- 87 McDonald, B. *et al.* Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science (New York, N.Y.)* **330**, 362-366, doi:10.1126/science.1195491 (2010).
- 88 Hovius, R., Thijssen, J., van der Linden, P., Nicolay, K. & de Kruijff, B. Phospholipid asymmetry of the outer membrane of rat liver mitochondria. Evidence for the presence of cardiolipin on the outside of the outer membrane. *FEBS Lett* **330**, 71-76 (1993).
- 89 Horvath, S. E. & Daum, G. Lipids of mitochondria. *Prog Lipid Res* **52**, 590-614, doi:10.1016/j.plipres.2013.07.002 (2013).
- 90 Schlame, M., Rua, D. & Greenberg, M. L. The biosynthesis and

- functional role of cardiolipin. *Prog Lipid Res* **39**, 257-288 (2000).
- 91 Wenceslau, C. F. *et al.* Mitochondrial damage-associated molecular patterns and vascular function. *Eur Heart J* **35**, 1172-1177, doi:10.1093/eurheartj/ehu047 (2014).
- 92 Tuominen, A. *et al.* A natural antibody to oxidized cardiolipin binds to oxidized low-density lipoprotein, apoptotic cells, and atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 2096-2102, doi:10.1161/01.ATV.0000233333.07991.4a (2006).
- 93 Mackworth-Young, C. G., Loizou, S. & Walport, M. J. Primary antiphospholipid syndrome: features of patients with raised anticardiolipin antibodies and no other disorder. *Annals of the Rheumatic Diseases* **48**, 362-367 (1989).
- 94 Sorice, M. *et al.* Cardiolipin on the surface of apoptotic cells as a possible trigger for antiphospholipids antibodies. *Clinical and experimental immunology* **122**, 277-284 (2000).
- 95 Kruse, K. *et al.* Inefficient clearance of dying cells in patients with SLE: anti-dsDNA autoantibodies, MFG-E8, HMGB-1 and other players. *Apoptosis* **15**, 1098-1113, doi:10.1007/s10495-010-0478-8 (2010).
- 96 Pullerits, R., Bokarewa, M., Jonsson, I. M., Verdrengh, M. & Tarkowski, A. Extracellular cytochrome c, a mitochondrial apoptosis-related protein, induces arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **44**, 32-39, doi:10.1093/rheumatology/keh406 (2005).
- 97 Adachi, N. *et al.* Serum cytochrome c level as a prognostic indicator in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Clin Chim Acta* **342**, 127-136, doi:10.1016/j.cccn.2003.12.011 (2004).
- 98 Mamula, M. J., Jemmerson, R. & Hardin, J. A. The specificity of human anti-cytochrome c autoantibodies that arise in autoimmune disease. *J Immunol* **144**, 1835-1840 (1990).
- 99 Cadenas, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *BioFactors (Oxford, England)* **6**, 391-397 (1997).
- 100 Ray, P. D., Huang, B. W. & Tsuji, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* **24**, 981-990, doi:10.1016/j.cellsig.2012.01.008 (2012).
- 101 Cho, Y. M. *et al.* Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **348**, 1472-1478, doi:10.1016/j.bbrc.2006.08.020 (2006).
- 102 Chen, C. T., Shih, Y. R., Kuo, T. K., Lee, O. K. & Wei, Y. H. Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **26**, 960-968, doi:10.1634/stemcells.2007-0509 (2008).
- 103 Hekimi, S., Lapointe, J. & Wen, Y. Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol* **21**, 569-576, doi:10.1016/j.tcb.2011.06.008 (2011).
- 104 Murrell, G. A., Francis, M. J. & Bromley, L. Modulation of fibroblast

- proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J* **265**, 659-665 (1990).
- 105 Thannickal, V. J. *et al.* Ras-dependent and -independent regulation of reactive oxygen species by mitogenic growth factors and TGF-beta1. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **14**, 1741-1748 (2000).
- 106 Chen, Y., McMillan-Ward, E., Kong, J., Israels, S. J. & Gibson, S. B. Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species. *J Cell Sci* **120**, 4155-4166, doi:10.1242/jcs.011163 (2007).
- 107 West, A. P. *et al.* TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* **472**, 476-480, doi:10.1038/nature09973 (2011).
- 108 Bulua, A. C. *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *J Exp Med* **208**, 519-533, doi:10.1084/jem.20102049 (2011).
- 109 Asmat, U., Abad, K. & Ismail, K. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. *Saudi Pharm J* **24**, 547-553, doi:10.1016/j.jsps.2015.03.013 (2016).
- 110 Alfadda, A. A. & Sallam, R. M. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol* **2012**, 936486, doi:10.1155/2012/936486 (2012).
- 111 Blum, J. S., Wearsch, P. A. & Cresswell, P. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol* **31**, 443-473, doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095910 (2013).
- 112 Xie, Z. & Klionsky, D. J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* **9**, 1102-1109, doi:10.1038/ncb1007-1102 (2007).
- 113 Mizushima, N., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**, 107-132, doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154005 (2011).
- 114 Reggiori, F. & Ungermann, C. Autophagosome Maturation and Fusion. *J Mol Biol* **429**, 486-496, doi:10.1016/j.jmb.2017.01.002 (2017).
- 115 Ganley, I. G. Autophagosome maturation and lysosomal fusion. *Essays Biochem* **55**, 65-78, doi:10.1042/bse0550065 (2013).
- 116 Paludan, C. *et al.* Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science (New York, N. Y.)* **307**, 593-596, doi:10.1126/science.1104904 (2005).
- 117 English, L. *et al.* Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat Immunol* **10**, 480-487, doi:10.1038/ni.1720 (2009).
- 118 Bell, C. *et al.* Quantitative proteomics reveals the induction of mitophagy in tumor necrosis factor-alpha-activated (TNFalpha) macrophages. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **12**, 2394-2407, doi:10.1074/mcp.M112.025775 (2013).
- 119 Johansen, T. & Lamark, T. Selective autophagy mediated by

autophagic adapter proteins. *Autophagy* **7**, 279-296 (2011).

120 Chu, C. T. *et al.* Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial
membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal
cells. *Nat Cell Biol* **15**, 1197-1205, doi:10.1038/ncb2837 (2013).

121 Vives-Bauza, C. *et al.* PINK1-dependent recruitment of Parkin to
mitochondria in mitophagy. *Proceedings of the National Academy of
Sciences of the United States of America* **107**, 378-383,
doi:10.1073/pnas.0911187107 (2010).

122 Narendra, D. P. *et al.* PINK1 is selectively stabilized on impaired
mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* **8**, e1000298,
doi:10.1371/journal.pbio.1000298 (2010).

123 Matsuda, N. *et al.* PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization
recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin
for mitophagy. *J Cell Biol* **189**, 211-221, doi:10.1083/jcb.200910140
(2010).

124 Matheoud, D. *et al.* Parkinson's Disease-Related Proteins PINK1 and
Parkin Repress Mitochondrial Antigen Presentation. *Cell* **166**, 314-
327, doi:10.1016/j.cell.2016.05.039 (2016).

125 Porcelli, S. A. & Modlin, R. L. The CD1 system: antigen-presenting
molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev
Immunol* **17**, 297-329, doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.297 (1999).

126 Park, S. H. & Bendelac, A. CD1-restricted T-cell responses and
microbial infection. *Nature* **406**, 788-792, doi:10.1038/35021233
(2000).

127 Zeng, Z. *et al.* Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with
a large hydrophobic binding groove. *Science (New York, N.Y.)* **277**,
339-345 (1997).

128 Cox, D. *et al.* Determination of cellular lipids bound to human CD1d
molecules. *PLoS One* **4**, e5325, doi:10.1371/journal.pone.0005325
(2009).

129 Dieude, M. *et al.* Cardiolipin binds to CD1d and stimulates CD1d-
restricted gammadelta T cells in the normal murine repertoire. *J
Immunol* **186**, 4771-4781, doi:10.4049/jimmunol.1000921 (2011).

130 Moore, J. & Mohr, C. F. Biologically false positive serologic tests for
syphilis: Type, incidence, and cause. *Journal of the American
Medical Association* **150**, 467-473,
doi:10.1001/jama.1952.03680050033010 (1952).

131 Jessop, S. & Botha, P. False-positive test results for syphilis in
relatives of a patient with systemic lupus erythematosus. *British
Journal of Venereal Diseases* **55**, 292-294 (1979).

132 Wright, D. J. M. *et al.* NEW ANTIBODY IN EARLY SYPHILIS. *The
Lancet* **295**, 740-744, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-
6736\(70\)90972-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(70)90972-4) (1970).

133 Pangborn, M. C. Cardiolipin and its application in a chemically
purified antigen for the serodiagnosis of syphilis. *Proc N Y State
Assoc Public Health Lab* **26**, 26-29 (1946).

134 Harris, E. N. *et al.* ANTICARDIOLIPIN ANTIBODIES: DETECTION

BY RADIOIMMUNOASSAY AND ASSOCIATION WITH
THROMBOSIS IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS. *The
Lancet* **322**, 1211-1214, doi:10.1016/S0140-6736(83)91267-9 (1983).

- 135 Koike, T., Sueishi, M., Funaki, H., Tomioka, H. & Yoshida, S. Anti-phospholipid antibodies and biological false positive serological test for syphilis in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental immunology* **56**, 193-199 (1984).
- 136 Koike, T., Maruyama, N., Funaki, H., Tomioka, H. & Yoshida, S. Specificity of mouse hybridoma antibodies to DNA. II. Phospholipid reactivity and biological false positive serological test for syphilis. *Clinical and experimental immunology* **57**, 345-350 (1984).
- 137 Rauch, J., Tannenbaum, H., Stollar, B. D. & Schwartz, R. S. Monoclonal anti-cardiolipin antibodies bind to DNA. *European journal of immunology* **14**, 529-534, doi:10.1002/eji.1830140609 (1984).
- 138 Loizou, S. *et al.* Measurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results. *Clinical and experimental immunology* **62**, 738-745 (1985).
- 139 Lindenborn-Fotinos, J., Sayers, T. J. & Berg, P. A. Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. VI. Association of the complement fixing antigen with a component of the mitochondrial F1-ATPase complex. *Clinical and experimental immunology* **50**, 267-274 (1982).
- 140 Meek, F., Khoury, E. L., Doniach, D. & Baum, H. Mitochondrial antibodies in chronic liver diseases and connective tissue disorders: further characterization of the autoantigens. *Clinical and experimental immunology* **41**, 43-54 (1980).
- 141 Berg, P. A., Roitt, I. M., Doniach, D. & Horne, R. W. Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. 3. Characterization of the inner-membrane complement fixing antigen. *Clinical and experimental immunology* **4**, 511-525 (1969).
- 142 Berg, P. A., Roitt, I. M., Doniach, D. & Cooper, H. M. Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. IV. Significance of membrane structure for the complement-fixing antigen. *Immunology* **17**, 281-293 (1969).
- 143 Sayers, T., Leoutsakos, A., Berg, P. & Baum, H. Antimitochondrial antibodies (AMA) in primary biliary cirrhosis. I. Separation of the PBC antigen activity from mitochondrial ATPase activity. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **13**, 255-267, doi:10.1007/bf00743204 (1981).
- 144 Lindenborn-Fotinos, J., Baum, H. & Berg, P. A. Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis: species and nonspecies specific determinants of M2 antigen. *Hepatology* **5**, 763-769 (1985).
- 145 Frazer, I. H., Mackay, I. R., Jordan, T. W., Whittingham, S. & Marzuki, S. Reactivity of anti-mitochondrial autoantibodies in primary biliary cirrhosis: definition of two novel mitochondrial polypeptide autoantigens. *J Immunol* **135**, 1739-1745 (1985).

- 146 Gershwin, M. E. *et al.* Primary biliary cirrhosis: an orchestrated
immune response against epithelial cells. *Immunological reviews*
174, 210-225 (2000).
- 147 Yeaman, S. J. *et al.* Primary biliary cirrhosis: identification of two
major M2 mitochondrial autoantigens. *Lancet (London, England)* **1**,
1067-1070 (1988).
- 148 Walli, F., Grob, P. J. & Muller-Schoop, J. [Pseudo-(venocuran-)lupus-
-a minor episode in the history of medicine]. *Schweizerische*
medizinische Wochenschrift **111**, 1398-1405 (1981).
- 149 Grob, P. J., Muller-Schoop, J. W., Hacki, M. A. & Joller-Jemelka, H. I.
Drug-induced pseudolupus. *Lancet (London, England)* **2**, 144-148
(1975).
- 150 Schuff-Werner, P. & Berg, P. A. [Immune reactions in pseudo-lupus-
syndrome. A long-term study (author's transl)]. *Klinische*
Wochenschrift **58**, 935-941 (1980).
- 151 Sayers, T. J., Binder, T. & Berg, P. A. Heterogeneity of anti-
mitochondrial antibodies: characterization and separation of the
antigen associated with the pseudolupus erythematosus syndrome.
Clinical and experimental immunology **37**, 68-75 (1979).
- 152 Kloppel, G. *et al.* Histopathological features in mixed types of chronic
aggressive hepatitis and primary biliary cirrhosis. Correlations of liver
histology with mitochondrial antibodies of different specificity.
Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histology **373**, 143-160
(1977).
- 153 Berg, P. A., Wiedmann, K. H., Sayers, T., Kloppel, G. & Lindner, H.
Serological classification of chronic cholestatic liver disease by the
use of two different types of antimitochondrial antibodies. *Lancet*
(London, England) **2**, 1329-1332 (1980).
- 154 Berg, P. & Klein, R. Autoantibodies in primary biliary cirrhosis.
Springer Seminars in Immunopathology **12**, 85-99,
doi:10.1007/BF00192685 (1990).
- 155 Klein, R. & Berg, P. A. Anti-M4 antibodies in primary biliary cirrhosis
react with sulphite oxidase, an enzyme of the mitochondrial inter-
membrane space. *Clinical and experimental immunology* **84**, 445-448
(1991).
- 156 Labro, M. T., Andrieu, M. C., Weber, M. & Homberg, J. C. A new
pattern of non-organ- and non-species-specific anti-organelle
antibody detected by immunofluorescence: the mitochondrial
antibody number 5. *Clinical and experimental immunology* **31**, 357-
366 (1978).
- 157 Berg, P. A. & Klein, R. Mitochondrial antigen/antibody systems in
primary biliary cirrhosis: revisited. *Liver* **15**, 281-292 (1995).
- 158 Norberg, R., Gardlund, B., Thorstensson, R. & Lidman, K. Further
immunological studies of sera containing anti-mitochondrial
antibodies, type M 5. *Clinical and experimental immunology* **58**, 639-
644 (1984).
- 159 Meyer, O. *et al.* Anti-mitochondrial type 5 antibodies and anti-

- cardiolipin antibodies in systemic lupus erythematosus and auto-immune diseases. *Clinical and experimental immunology* **69**, 485-492 (1987).
- 160 La Rosa, L. *et al.* Anti-mitochondrial M5 type antibody represents one of the serological markers for anti-phospholipid syndrome distinct from anti-cardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies. *Clinical and experimental immunology* **112**, 144-151 (1998).
- 161 Andrejevic, S., Bonaci-Nikolic, B., Sefik-Bukilica, M. & Petrovic, R. Clinical and serological follow-up of 71 patients with anti-mitochondrial type 5 antibodies. *Lupus* **16**, 788-793, doi:10.1177/0961203307081913 (2007).
- 162 Oliver-Minarro, D., Sanchez-Ramon, S., Rodriguez-Mahou, M., Alvarez, S. & Fernandez-Cruz, E. Isolated type 5 antimitochondrial autoantibodies are associated with a history of thrombocytopenia and fetal loss. *Fertil Steril* **87**, 976.e917-978, doi:10.1016/j.fertnstert.2006.07.1535 (2007).
- 163 Danan, G., Homberg, J. C., Bernuau, J., Roche-Sicot, J. & Pessayre, D. [Iproniazid-induced hepatitis. The diagnostic value of a new antimitochondrial antibody anti-M6]. *Gastroenterologie clinique et biologique* **7**, 529-532 (1983).
- 164 Maille, F. *et al.* [Auxiliary hepatic transplantation in iproniazid-induced subfulminant hepatitis. Should iproniazid still be sold in France?]. *Gastroenterologie clinique et biologique* **23**, 1083-1085 (1999).
- 165 Frantz, A. G. Fatal jaundice associated with iproniazid (marsilid) therapy: report of a case. *J Am Med Assoc* **167**, 987-988 (1958).
- 166 Homberg, J. C. *et al.* A new antimitochondria antibody (anti-M6) in iproniazid-induced hepatitis. *Clinical and experimental immunology* **47**, 93-102 (1982).
- 167 Pons, C. *et al.* Human anti-mitochondria autoantibodies appearing in iproniazid-induced immunoallergic hepatitis recognize human liver monoamine oxidase B. *Biochem Biophys Res Commun* **218**, 118-124, doi:10.1006/bbrc.1996.0021 (1996).
- 168 Binda, C. *et al.* Insights into the mode of inhibition of human mitochondrial monoamine oxidase B from high-resolution crystal structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 9750-9755, doi:10.1073/pnas.1633804100 (2003).
- 169 Klein, R., Maisch, B., Kochsiek, K. & Berg, P. A. Demonstration of organ specific antibodies against heart mitochondria (anti-M7) in sera from patients with some forms of heart diseases. *Clinical and experimental immunology* **58**, 283-292 (1984).
- 170 Klein, R. & Berg, P. A. Anti-mitochondrial antibodies (anti-M7) in heart diseases recognize epitopes on bacterial and mammalian sarcosine dehydrogenase. *Clinical and experimental immunology* **82**, 289-293 (1990).
- 171 Stahle, I., Brizzio, C., Barile, M. & Brandsch, R. Anti-mitochondrial flavoprotein autoantibodies of patients with myocarditis and dilated

- cardiomyopathy (anti-M7): interaction with flavin-carrying proteins, effect of vitamin B2 and epitope mapping. *Clinical and experimental immunology* **115**, 404-408 (1999).
- 172 Otto, A. *et al.* Anti-mitochondrial antibodies in patients with dilated cardiomyopathy (anti-M7) are directed against flavoenzymes with covalently bound FAD. *Clinical and experimental immunology* **111**, 541-547 (1998).
- 173 Cicek, G., Schiltz, E., Hess, D., Staiger, J. & Brandsch, R. Analysis of mitochondrial antigens reveals inner membrane succinate dehydrogenase flavoprotein subunit as autoantigen to antibodies in anti-M7 sera. *Clinical and experimental immunology* **128**, 83-87 (2002).
- 174 Weber, P. *et al.* Characterization and clinical relevance of a new complement-fixing antibody--anti-M8--in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **6**, 553-559 (1986).
- 175 Klein, R., Muting, D., Fintelmann, V., Kloppel, G. & Berg, P. A. Anti M9 — A marker antibody for early asymptomatic primary biliary cirrhosis (PBC). *Journal of hepatology* **1**, S264, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8278\(85\)80564-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8278(85)80564-X) (1985).
- 176 Klein, R. & Berg, P. A. Characterization of a new mitochondrial antigen-antibody system (M9/anti-M9) in patients with anti-M2 positive and anti-M2 negative primary biliary cirrhosis. *Clinical and experimental immunology* **74**, 68-74 (1988).
- 177 Klein, R. & Berg, P. A. Characterization of M9 by westernblot and relevance of anti-M9 as a marker antibody for early primary biliary cirrhosis (PBC). *Journal of hepatology* **5**, S36-S36, doi:10.1016/S0168-8278(87)80159-9 (1987).
- 178 Klein, R. & Berg, P. A. Anti-M9 antibodies in sera from patients with primary biliary cirrhosis recognize an epitope of glycogen phosphorylase. *Clinical and experimental immunology* **81**, 65 (1990).
- 179 Witt-Sullivan, H. *et al.* The demography of primary biliary cirrhosis in Ontario, Canada. *Hepatology* **12**, 98-105 (1990).
- 180 Invernizzi, P. *et al.* Frequency of monosomy X in women with primary biliary cirrhosis. *Lancet (London, England)* **363**, 533-535, doi:10.1016/s0140-6736(04)15541-4 (2004).
- 181 Selmi, C. *et al.* Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: genetics, epigenetics, and environment. *Gastroenterology* **127**, 485-492 (2004).
- 182 Invernizzi, P., Selmi, C., Mackay, I. R., Podda, M. & Gershwin, M. E. From bases to basis: linking genetics to causation in primary biliary cirrhosis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* **3**, 401-410 (2005).
- 183 Selmi, C. & Gershwin, M. E. Bacteria and human autoimmunity: the case of primary biliary cirrhosis. *Curr Opin Rheumatol* **16**, 406-410 (2004).
- 184 Selmi, C. *et al.* Patients with primary biliary cirrhosis react against a

- ubiquitous xenobiotic-metabolizing bacterium. *Hepatology* **38**, 1250-1257, doi:10.1053/jhep.2003.50446 (2003).
- 185 Long, S. A. *et al.* Immunoreactivity of organic mimeotopes of the E2 component of pyruvate dehydrogenase: connecting xenobiotics with primary biliary cirrhosis. *J Immunol* **167**, 2956-2963 (2001).
- 186 Matsumura, S. *et al.* Contribution to antimitochondrial antibody production: cleavage of pyruvate dehydrogenase complex-E2 by apoptosis-related proteases. *Hepatology* **35**, 14-22, doi:10.1053/jhep.2002.30280 (2002).
- 187 Kita, H. *et al.* Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. *The Journal of Clinical Investigation* **109**, 1231-1240, doi:10.1172/jci14698 (2002).
- 188 Odin, J. A., Huebert, R. C., Casciola-Rosen, L., LaRusso, N. F. & Rosen, A. Bcl-2-dependent oxidation of pyruvate dehydrogenase-E2, a primary biliary cirrhosis autoantigen, during apoptosis. *The Journal of Clinical Investigation* **108**, 223-232 (2001).
- 189 Lindor, K. D. *et al.* Primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **50**, 291-308, doi:10.1002/hep.22906 (2009).
- 190 Miyakawa, H. *et al.* Detection of antimitochondrial autoantibodies in immunofluorescent AMA-negative patients with primary biliary cirrhosis using recombinant autoantigens. *Hepatology* **34**, 243-248, doi:10.1053/jhep.2001.26514 (2001).
- 191 Flisiak, R., Pelszynska, M., Prokopowicz, D., Rogalska, M. & Grygoruk, U. High concentration of antimitochondrial antibodies predicts progressive primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol* **11**, 5706-5709, doi:10.3748/wjg.v11.i36.5706 (2005).
- 192 Purohit, T. & Cappell, M. S. Primary biliary cirrhosis: Pathophysiology, clinical presentation and therapy. *World J Hepatol* **7**, 926-941, doi:10.4254/wjh.v7.i7.926 (2015).
- 193 Patel, A. & Seetharam, A. Primary Biliary Cholangitis: Disease Pathogenesis and Implications for Established and Novel Therapeutics. *J Clin Exp Hepatol* **6**, 311-318, doi:10.1016/j.jceh.2016.10.001 (2016).
- 194 Liu, Z. & Davidson, A. Taming lupus-a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances. *Nat Med* **18**, 871-882, doi:10.1038/nm.2752 (2012).
- 195 Bernatsky, S. *et al.* A population-based assessment of systemic lupus erythematosus incidence and prevalence--results and implications of using administrative data for epidemiological studies. *Rheumatology (Oxford)* **46**, 1814-1818, doi:10.1093/rheumatology/kem233 (2007).
- 196 Oliver, J. E. & Silman, A. J. Why are women predisposed to autoimmune rheumatic diseases? *Arthritis Research & Therapy* **11**, 252, doi:10.1186/ar2825 (2009).
- 197 Ngo, S. T., Steyn, F. J. & McCombe, P. A. Gender differences in autoimmune disease. *Front Neuroendocrinol* **35**, 347-369,

- doi:10.1016/j.yfrne.2014.04.004 (2014).
- 198 Fernando, M. M. *et al.* Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis. *PLoS Genet* **4**, e1000024, doi:10.1371/journal.pgen.1000024 (2008).
- 199 Agnello, V., De Bracco, M. M. & Kunkel, H. G. Hereditary C2 deficiency with some manifestations of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **108**, 837-840 (1972).
- 200 Brown, E. E., Edberg, J. C. & Kimberly, R. P. Fc receptor genes and the systemic lupus erythematosus diathesis. *Autoimmunity* **40**, 567-581, doi:10.1080/08916930701763710 (2007).
- 201 Kyogoku, C. *et al.* Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *American journal of human genetics* **75**, 504-507, doi:10.1086/423790 (2004).
- 202 Costenbader, K. H. *et al.* Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Arthritis Rheum* **50**, 849-857, doi:10.1002/art.20049 (2004).
- 203 Cooper, G. S. *et al.* Occupational and environmental exposures and risk of systemic lupus erythematosus: silica, sunlight, solvents. *Rheumatology (Oxford)* **49**, 2172-2180, doi:10.1093/rheumatology/keq214 (2010).
- 204 Poole, B. D., Scofield, R. H., Harley, J. B. & James, J. A. Epstein-Barr virus and molecular mimicry in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* **39**, 63-70, doi:10.1080/08916930500484849 (2006).
- 205 Costenbader, K. H., Feskanich, D., Stampfer, M. J. & Karlson, E. W. Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. *Arthritis Rheum* **56**, 1251-1262, doi:10.1002/art.22510 (2007).
- 206 Yaniv, G. *et al.* A volcanic explosion of autoantibodies in systemic lupus erythematosus: a diversity of 180 different antibodies found in SLE patients. *Autoimmun Rev* **14**, 75-79, doi:10.1016/j.autrev.2014.10.003 (2015).
- 207 Levine, J. S. *et al.* Immunization with an apoptotic cell-binding protein recapitulates the nephritis and sequential autoantibody emergence of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **177**, 6504-6516 (2006).
- 208 Dema, B. & Charles, N. Autoantibodies in SLE: Specificities, Isotypes and Receptors. *Antibodies* **5**, 2 (2016).
- 209 Duffau, P. *et al.* Platelet CD154 potentiates interferon-alpha secretion by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Science translational medicine* **2**, 47ra63, doi:10.1126/scitranslmed.3001001 (2010).
- 210 Sun, S. *et al.* Mitochondrial DAMPs increase endothelial permeability through neutrophil dependent and independent pathways. *PLoS One* **8**, e59989, doi:10.1371/journal.pone.0059989 (2013).
- 211 Kapur, R., Zufferey, A., Boilard, E. & Semple, J. W. Nouvelle cuisine: platelets served with inflammation. *J Immunol* **194**, 5579-5587, doi:10.4049/jimmunol.1500259 (2015).
- 212 Boilard, E., Blanco, P. & Nigrovic, P. A. Platelets: active players in the

- pathogenesis of arthritis and SLE. *Nat Rev Rheumatol* **8**, 534-542, doi:10.1038/nrrheum.2012.118 (2012).
- 213 Hochberg, M. C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **40**, 1725, doi:10.1002/1529-0131(199709)40:9<1725::AID-ART29>3.0.CO;2-Y (1997).
- 214 Piette, J. C. Updating the American College of Rheumatology criteria for systemic lupus erythematosus: comment on the letter by Hochberg. *Arthritis Rheum* **41**, 751, doi:10.1002/1529-0131(199804)41:4<751::aid-art31>3.0.co;2-t (1998).
- 215 Mortezaigholi, S. *et al.* Evaluation of TLR9 expression on PBMCs and CpG ODN-TLR9 ligation on IFN-alpha production in SLE patients. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **39**, 11-18, doi:10.1080/08923973.2016.1263859 (2017).
- 216 Auphan, N., DiDonato, J. A., Rosette, C., Helmberg, A. & Karin, M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science (New York, N.Y.)* **270**, 286-290 (1995).
- 217 Zandman-Goddard, G., Blank, M. & Shoenfeld, Y. Intravenous immunoglobulins in systemic lupus erythematosus: from the bench to the bedside. *Lupus* **18**, 884-888, doi:10.1177/0961203309106921 (2009).
- 218 Anolik, J. H. *et al.* Rituximab improves peripheral B cell abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **50**, 3580-3590, doi:10.1002/art.20592 (2004).
- 219 Yao, Y. *et al.* Neutralization of interferon-alpha/beta-inducible genes and downstream effect in a phase I trial of an anti-interferon-alpha monoclonal antibody in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **60**, 1785-1796, doi:10.1002/art.24557 (2009).
- 220 Illei, G. G. *et al.* Tocilizumab in systemic lupus erythematosus: data on safety, preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells from an open-label phase I dosage-escalation study. *Arthritis Rheum* **62**, 542-552, doi:10.1002/art.27221 (2010).
- 221 Stohl, W. Inhibition of B cell activating factor (BAFF) in the management of systemic lupus erythematosus (SLE). *Expert review of clinical immunology* **13**, 623-633, doi:10.1080/1744666x.2017.1291343 (2017).
- 222 Stohl, W. *et al.* Belimumab reduces autoantibodies, normalizes low complement levels, and reduces select B cell populations in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **64**, 2328-2337, doi:10.1002/art.34400 (2012).
- 223 Vincent, F. B., Morand, E. F., Schneider, P. & Mackay, F. The BAFF/APRIL system in SLE pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol* **10**, 365-373, doi:10.1038/nrrheum.2014.33 (2014).
- 224 Perry, D., Sang, A., Yin, Y., Zheng, Y. Y. & Morel, L. Murine models of systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol* **2011**, 271694, doi:10.1155/2011/271694 (2011).

- 225 Petri, M. Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *J Autoimmun* **15**, 145-151, doi:10.1006/jaut.2000.0409 (2000).
- 226 Cervera, R., Boffa, M. C., Khamashta, M. A. & Hughes, G. R. The Euro-Phospholipid project: epidemiology of the antiphospholipid syndrome in Europe. *Lupus* **18**, 889-893, doi:10.1177/0961203309106832 (2009).
- 227 Sebastiani, G. D., Iuliano, A., Cantarini, L. & Galeazzi, M. Genetic aspects of the antiphospholipid syndrome: An update. *Autoimmun Rev* **15**, 433-439, doi:10.1016/j.autrev.2016.01.005 (2016).
- 228 Levy, Y., Almog, O., Gorshtein, A. & Shoenfeld, Y. The environment and antiphospholipid syndrome. *Lupus* **15**, 784-790, doi:doi:10.1177/0961203306071004 (2006).
- 229 Finazzi, G. *et al.* Natural history and risk factors for thrombosis in 360 patients with antiphospholipid antibodies: A four-year prospective study from the Italian registry. *The American Journal of Medicine* **100**, 530-536, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9343\(96\)00060-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9343(96)00060-5) (1996).
- 230 Wahl, D. G. *et al.* Risk for venous thrombosis related to antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus--a meta-analysis. *Lupus* **6**, 467-473, doi:10.1177/096120339700600510 (1997).
- 231 Vaarala, O. *et al.* Anti-Cardiolipin Antibodies and Risk of Myocardial Infarction in a Prospective Cohort of Middle-Aged Men. *Circulation* **91**, 23-27, doi:10.1161/01.cir.91.1.23 (1995).
- 232 Saccone, G. *et al.* Antiphospholipid antibody profile based obstetric outcomes of primary antiphospholipid syndrome: the PREGNANTS study. *Am J Obstet Gynecol*, doi:10.1016/j.ajog.2017.01.026 (2017).
- 233 Raschi, E. *et al.* beta2-glycoprotein I, lipopolysaccharide and endothelial TLR4: three players in the two hit theory for antiphospholipid-mediated thrombosis. *J Autoimmun* **55**, 42-50, doi:10.1016/j.jaut.2014.03.001 (2014).
- 234 Pierangeli, S. S., Vega-Ostertag, M. & Harris, E. N. Intracellular signaling triggered by antiphospholipid antibodies in platelets and endothelial cells: a pathway to targeted therapies. *Thromb Res* **114**, 467-476, doi:10.1016/j.thromres.2004.06.031 (2004).
- 235 Vega-Ostertag, M. E. *et al.* Role of p38 mitogen-activated protein kinase in antiphospholipid antibody-mediated thrombosis and endothelial cell activation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **5**, 1828-1834, doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02680.x (2007).
- 236 Raschi, E. *et al.* Role of the MyD88 transduction signaling pathway in endothelial activation by antiphospholipid antibodies. *Blood* **101**, 3495-3500, doi:10.1182/blood-2002-08-2349 (2003).
- 237 Girardi, G. & Mackman, N. Tissue factor in antiphospholipid antibody-induced pregnancy loss: a pro-inflammatory molecule. *Lupus* **17**, 931-936, doi:10.1177/0961203308094994 (2008).
- 238 Meroni, P. L. *et al.* Endothelial activation by aPL: a potential pathogenetic mechanism for the clinical manifestations of the

- syndrome. *J Autoimmun* **15**, 237-240, doi:10.1006/jaut.2000.0412 (2000).
- 239 Urbanus, R. T. & de Laat, B. Antiphospholipid antibodies and the protein C pathway. *Lupus* **19**, 394-399, doi:10.1177/0961203309360841 (2010).
- 240 Wilson, W. A. *et al.* International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* **42**, 1309-1311, doi:10.1002/1529-0131(199907)42:7<1309::aid-anr1>3.0.co;2-f (1999).
- 241 Miyakis, S. *et al.* International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **4**, 295-306, doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x (2006).
- 242 Espinola, R. G., Pierangeli, S. S., Gharavi, A. E. & Harris, E. N. Hydroxychloroquine reverses platelet activation induced by human IgG antiphospholipid antibodies. *Thrombosis and haemostasis* **87**, 518-522 (2002).
- 243 Artim-Esen, B., Diz-Kucukkaya, R. & Inanc, M. The significance and management of thrombocytopenia in antiphospholipid syndrome. *Current rheumatology reports* **17**, 14, doi:10.1007/s11926-014-0494-8 (2015).
- 244 Kronbichler, A., Brezina, B., Quintana, L. F. & Jayne, D. R. Efficacy of plasma exchange and immunoadsorption in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome: A systematic review. *Autoimmun Rev* **15**, 38-49, doi:10.1016/j.autrev.2015.08.010 (2016).
- 245 Sherer, Y., Levy, Y. & Shoenfeld, Y. Intravenous immunoglobulin therapy of antiphospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford)* **39**, 421-426 (2000).
- 246 Bayraktar, U. D., Erkan, D., Bucciarelli, S., Espinosa, G. & Asherson, R. The clinical spectrum of catastrophic antiphospholipid syndrome in the absence and presence of lupus. *The Journal of Rheumatology* **34**, 346-352 (2007).
- 247 Coons, A. H. & Kaplan, M. H. Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med* **91**, 1-13 (1950).
- 248 Walker, J. G., Doniach, D., Roitt, I. M. & Sherlock, S. SEROLOGICAL TESTS IN DIAGNOSIS OF PRIMARY BILIARY CIRRHOSIS. *Lancet (London, England)* **1**, 827-831 (1965).
- 249 Johanet, C., Chantran, Y. & Ballot, E. Auto-anticorps et pathologies hépatiques. *Revue Francophone des Laboratoires* **2017**, 45-55, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1773-035X\(17\)30078-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1773-035X(17)30078-3) (2017).
- 250 Meroni, P. L. *et al.* Anti-mitochondrial type M5 and anti-cardiolipin antibodies in autoimmune disorders: studies on their association and cross-reactivity. *Clinical and experimental immunology* **67**, 484-491 (1987).
- 251 Engvall, E. & Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay

- (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, 871-874 (1971).
- 252 Engvall, E. The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Chem* **56**, 319-320, doi:10.1373/clinchem.2009.127803 (2010).
- 253 Gardiner, C., Hills, J., Machin, S. & Cohen, H. Diagnosis of antiphospholipid syndrome in routine clinical. *Lupus* **22**, 18-25, doi:10.1177/0961203312460722 (2013).
- 254 Han, E. *et al.* Clinical relevance of combined anti-mitochondrial M2 detection assays for primary biliary cirrhosis. *Clin Chim Acta* **464**, 113-117, doi:10.1016/j.cca.2016.11.021 (2017).
- 255 Neuberger, J. & Bradwell, A. R. Anti-mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. *Journal of hepatology* **37**, 712-716 (2002).
- 256 Burdash, N. M., Teti, G. & Papadopoulos, V. The Crithidia luciliae and Farr assays for the detection of systemic lupus erythematosus. *Annals of clinical and laboratory science* **13**, 49-54 (1983).
- 257 Manthorpe, R., Palit, J. & Bendixen, G. Anti-DNA antibody in serum measured by radioimmunoassay (Farr technique). Description of method and recommended procedure. *Allergy* **33**, 42-49 (1978).
- 258 Smeenk, R. J. *et al.* Anti-dsDNA: choice of assay in relation to clinical value. *Rheumatology international* **11**, 101-107 (1991).
- 259 Nossent, J. C., Huysen, V., Smeenk, R. J. & Swaak, A. J. Low avidity antibodies to dsDNA as a diagnostic tool. *Annals of the Rheumatic Diseases* **48**, 748-752 (1989).
- 260 Swaak, T. & Smeenk, R. Detection of anti-dsDNA as a diagnostic tool: a prospective study in 441 non-systemic lupus erythematosus patients with anti-dsDNA antibody (anti-dsDNA). *Annals of the Rheumatic Diseases* **44**, 245 (1985).
- 261 Derksen, R. H. W. M., Bast, E. J. E. G., Strooisma, T. & Jacobs, J. W. G. A comparison between the Farr radioimmunoassay and a new automated fluorescence immunoassay for the detection of antibodies against double stranded DNA in serum. *Annals of the Rheumatic Diseases* **61**, 1099-1102, doi:10.1136/ard.61.12.1099 (2002).
- 262 Tan, E. M. Relationship of nuclear staining patterns with precipitating antibodies in systemic lupus erythematosus. *The Journal of laboratory and clinical medicine* **70**, 800-812 (1967).
- 263 Casals, S. P., Friou, G. J. & Teague, P. O. SPECIFIC NUCLEAR REACTION PATTERN OF ANTIBODY TO DNA IN LUPUS ERYTHEMATOSUS SERA. *The Journal of laboratory and clinical medicine* **62**, 625-631 (1963).
- 264 Steinert, M. [The absence of histone in the kinetonucleus of trypanosomes. Cytochemical study]. *Experimental cell research* **39**, 69-73 (1965).
- 265 Aarden, L. A., de Groot, E. R. & Feltkamp, T. E. Immunology of DNA. III. Crithidia luciliae, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique. *Ann N Y Acad Sci* **254**, 505-515 (1975).
- 266 Crowe, W. & Kushner, I. An immunofluorescent method using

- Crithidia luciliae to detect antibodies to double-stranded DNA. *Arthritis Rheum* **20**, 811-814 (1977).
- 267 Viriyataveekul, R., Kobkitjaroen, J., Jaiyen, J., Kongkriengdach, S. & Potprasart, S. Evaluation of five commercial assays for the detection of anti-dsDNA antibodies: three *Crithidia luciliae* indirect immunofluorescence test kits and two enzyme immunoassay kits. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet* **97**, 220-224 (2014).
- 268 Sarbu, M. I. *et al.* Differences between clinical and laboratory findings in patients with recent diagnosis of SLE according to the positivity of anti-dsDNA by the *Crithidia luciliae* method. *Lupus* **24**, 1198-1203, doi:10.1177/0961203315573852 (2015).
- 269 Lakos, G. *et al.* Detection of anti-dsDNA antibodies by computer-aided automated immunofluorescence analysis. *J Immunol Methods* **433**, 17-22, doi:10.1016/j.jim.2016.02.019 (2016).
- 270 Frezza, C., Cipolat, S. & Scorrano, L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat Protoc* **2**, 287-295, doi:10.1038/nprot.2006.478 (2007).
- 271 Wieckowski, M. R., Giorgi, C., Lebiedzinska, M., Duszynski, J. & Pinton, P. Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat Protoc* **4**, 1582-1590, doi:10.1038/nprot.2009.151 (2009).
- 272 Alcoser, S. Y. *et al.* Real-time PCR-based assay to quantify the relative amount of human and mouse tissue present in tumor xenografts. *BMC biotechnology* **11**, 124, doi:10.1186/1472-6750-11-124 (2011).
- 273 Rogers, G. W. *et al.* High throughput microplate respiratory measurements using minimal quantities of isolated mitochondria. *PLoS One* **6**, e21746, doi:10.1371/journal.pone.0021746 (2011).
- 274 Kučera, O. *et al.* The Effect of tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Oxidative Stress on Lean and Steatotic Rat Hepatocytes In Vitro. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2014**, 1-12, doi:10.1155/2014/752506 (2014).
- 275 Ries, M. *et al.* Identification of novel oligonucleotides from mitochondrial DNA that spontaneously induce plasmacytoid dendritic cell activation. *J Leukoc Biol* **94**, 123-135, doi:10.1189/jlb.0612278 (2013).
- 276 Li, H. *et al.* Mitochondrial damage-associated molecular patterns from fractures suppress pulmonary immune responses via formyl peptide receptors 1 and 2. *The journal of trauma and acute care surgery* **78**, 272-279; discussion 279-281, doi:10.1097/ta.0000000000000509 (2015).
- 277 Crouser, E. D. *et al.* Monocyte activation by necrotic cells is promoted by mitochondrial proteins and formyl peptide receptors. *Crit Care Med* **37**, 2000-2009, doi:10.1097/CCM.0b013e3181a001ae (2009).
- 278 Iyer, S. S. *et al.* Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity* **39**, 311-323,

- doi:10.1016/j.immuni.2013.08.001 (2013).
- 279 Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P. & Tschopp, J. A role for
mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **469**, 221-
225, doi:10.1038/nature09663 (2011).
- 280 Schwiebert, E. M. & Zsembery, A. Extracellular ATP as a signaling
molecule for epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -
Biomembranes* **1615**, 7-32, doi:10.1016/s0005-2736(03)00210-4
(2003).
- 281 Mills, E. L., Kelly, B. & O'Neill, L. A. J. Mitochondria are the
powerhouses of immunity. *Nat Immunol* **18**, 488-498,
doi:10.1038/ni.3704 (2017).
- 282 Maeda, A. & Fadeel, B. Mitochondria released by cells undergoing
TNF-alpha-induced necroptosis act as danger signals. *Cell Death Dis*
5, e1312, doi:10.1038/cddis.2014.277 (2014).
- 283 Baden, P. & Deleidi, M. Mitochondrial Antigen Presentation: A
Vacuolar Path to Autoimmunity in Parkinson's Disease. *Trends
Immunol* **37**, 719-721, doi:10.1016/j.it.2016.08.016 (2016).
- 284 Bell, C. *et al.* Quantitative Proteomics Reveals the Induction of
Mitophagy in Tumor Necrosis Factor- α -activated (TNF α)
Macrophages. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **12**, 2394-2407,
doi:10.1074/mcp.M112.025775 (2013).
- 285 Gu, Y., Wang, C., Roifman, C. M. & Cohen, A. Role of MHC Class I
in Immune Surveillance of Mitochondrial DNA Integrity. *The Journal
of Immunology* **170**, 3603-3607, doi:10.4049/jimmunol.170.7.3603
(2003).
- 286 Morse, M. C. *et al.* The COI mitochondrial gene encodes a minor
histocompatibility antigen presented by H2-M3. *J Immunol* **156**, 3301-
3307 (1996).
- 287 Levine, J. S., Branch, D. W. & Rauch, J. The antiphospholipid
syndrome. *The New England journal of medicine* **346**, 752-763,
doi:10.1056/NEJMra002974 (2002).
- 288 Yamagiwa, S., Kamimura, H., Takamura, M. & Aoyagi, Y.
Autoantibodies in primary biliary cirrhosis: recent progress in
research on the pathogenetic and clinical significance. *World J
Gastroenterol* **20**, 2606-2612, doi:10.3748/wjg.v20.i10.2606 (2014).
- 289 Bruggraber, S. F. A. *et al.* Autoreactivity to lipoate and a conjugated
form of lipoate in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* **125**,
1705-1713, doi:<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.09.034> (2003).
- 290 Berg, P. A., Doniach, D. & Roitt, I. M. Mitochondrial antibodies in
primary biliary cirrhosis. I. Localization of the antigen to mitochondrial
membranes. *J Exp Med* **126**, 277-290 (1967).
- 291 Mouritsen, S., Hoier-Madsen, M., Demant, E. J. & Permin, H.
Enzyme-linked immunosorbent assay for determination of anti-
mitochondrial antibodies. *Acta pathologica, microbiologica, et
immunologica Scandinavica. Section C, Immunology* **93**, 205-210
(1985).
- 292 Tan, S. Y. Fc γ R1a polymorphism in systemic lupus

- erythematosus. *Kidney & blood pressure research* **23**, 138-142, doi:25967 (2000).
- 293 Jonsson, F., Mancardi, D. A., Albanesi, M. & Bruhns, P. Neutrophils in local and systemic antibody-dependent inflammatory and anaphylactic reactions. *J Leukoc Biol* **94**, 643-656, doi:10.1189/jlb.1212623 (2013).
- 294 Parren, P. W. *et al.* On the interaction of IgG subclasses with the low affinity Fc gamma RIIa (CD32) on human monocytes, neutrophils, and platelets. Analysis of a functional polymorphism to human IgG2. *The Journal of Clinical Investigation* **90**, 1537-1546, doi:10.1172/jci116022 (1992).
- 295 McKenzie, S. E. *et al.* The role of the human Fc receptor Fc gamma RIIA in the immune clearance of platelets: a transgenic mouse model. *J Immunol* **162**, 4311-4318 (1999).
- 296 Czompoly, T. *et al.* Detailed analyses of antibodies recognizing mitochondrial antigens suggest similar or identical mechanism for production of natural antibodies and natural autoantibodies. *Autoimmun Rev* **7**, 463-467, doi:10.1016/j.autrev.2008.03.006 (2008).
- 297 Klein, R. & Berg, P. A. Demonstration of "naturally occurring mitochondrial antibodies" in family members of patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **12**, 335-341 (1990).
- 298 Wang, H., Li, T., Chen, S., Gu, Y. & Ye, S. Neutrophil Extracellular Trap Mitochondrial DNA and Its Autoantibody in Systemic Lupus Erythematosus and a Proof-of-Concept Trial of Metformin. *Arthritis Rheumatol* **67**, 3190-3200, doi:10.1002/art.39296 (2015).
- 299 Bombardier, C., Gladman, D. D., Urowitz, M. B., Caron, D. & Chang, C. H. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* **35**, 630-640 (1992).
- 300 Shah, D., Mahajan, N., Sah, S., Nath, S. K. & Paudyal, B. Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. *Journal of biomedical science* **21**, 23, doi:10.1186/1423-0127-21-23 (2014).
- 301 Tewthanom, K., Janwityanuchit, S., Totemchockchayakarn, K. & Panomvana, D. Correlation of lipid peroxidation and glutathione levels with severity of systemic lupus erythematosus: a pilot study from single center. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques* **11**, 30-34 (2008).
- 302 Morgan, P. E., Sturgess, A. D. & Davies, M. J. Evidence for chronically elevated serum protein oxidation in systemic lupus erythematosus patients. *Free radical research* **43**, 117-127, doi:10.1080/10715760802623896 (2009).
- 303 Morgan, P. E., Sturgess, A. D., Hennessy, A. & Davies, M. J. Serum protein oxidation and apolipoprotein CIII levels in people with systemic lupus erythematosus with and without nephritis. *Free radical research* **41**, 1301-1312, doi:10.1080/10715760701684809 (2007).
- 304 Eggleton, P., Nissim, A., Ryan, B. J., Whiteman, M. & Winyard, P. G.

- Detection and isolation of human serum autoantibodies that recognize oxidatively modified autoantigens. *Free Radic Biol Med* **57**, 79-91, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.006 (2013).
- 305 Palmfeldt, J. & Bross, P. Proteomics of human mitochondria. *Mitochondrion* **33**, 2-14, doi:10.1016/j.mito.2016.07.006 (2017).
- 306 Coutinho, A., Kazatchkine, M. D. & Avrameas, S. Natural autoantibodies. *Current Opinion in Immunology* **7**, 812-818, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0952-7915\(95\)80053-0](http://dx.doi.org/10.1016/0952-7915(95)80053-0) (1995).
- 307 Fu, M. *et al.* Identification of poly-reactive natural IgM antibody that recognizes late apoptotic cells and promotes phagocytosis of the cells. *Apoptosis* **12**, 355-362, doi:10.1007/s10495-006-0581-z (2007).
- 308 Craig, M. L., Bankovich, A. J., McElhenny, J. L. & Taylor, R. P. Clearance of anti-double-stranded DNA antibodies: the natural immune complex clearance mechanism. *Arthritis Rheum* **43**, 2265-2275, doi:10.1002/1529-0131(200010)43:10<2265::aid-anr14>3.0.co;2-j (2000).
- 309 Kagiya, A. *et al.* Molecular basis of complement activation in ischemic myocardium: identification of specific molecules of mitochondrial origin that bind human C1q and fix complement. *Circulation Research* **64**, 607-615, doi:10.1161/01.res.64.3.607 (1989).
- 310 Wareth, G. *et al.* Comprehensive Identification of Immunodominant Proteins of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* Using Antibodies in the Sera from Naturally Infected Hosts. *Int J Mol Sci* **17**, doi:10.3390/ijms17050659 (2016).