



# **Identification des cibles antigéniques d'origine mitochondriale, reconnues par les autoanticorps dans le lupus érythémateux disséminé**

**Thèse**

**Yann Becker**

**Doctorat en médecine moléculaire**  
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© Yann Becker, 2022

**Identification des cibles antigéniques d'origine  
mitochondriale, reconnues par les autoanticorps dans le  
lupus érythémateux disséminé**

**Thèse**

**Yann Becker**

Sous la direction de :

Éric Boilard, directeur de recherche

## Résumé en français

Les mitochondries sont des organelles intracellulaires considérées comme issues de l'endosymbiose entre une  $\alpha$ -protéobactérie et une cellule eucaryote primitive. L'organelle exprime ainsi des motifs moléculaires en lien avec son origine procaryote tels qu'un ADN hypométhylés (i.e., mtDNA) ou des peptides N-formylés. Des mitochondries ou bien des composantes mitochondriales pourront être libérées dans le milieu extracellulaire lors de différents évènements d'activation ou de mort cellulaire. Ces caractéristiques ainsi que certaines biomolécules, spécifiquement localisées dans la mitochondrie (e.g., ATP, cytochrome C) auront la capacité d'être reconnues comme des motifs de dangers et de stimuler une réponse proinflammatoire de la part des cellules du système immunitaire inné. Une réponse humorale constituée d'anticorps anti-mitochondriaux (AMA) est connue dans différents troubles auto-immuns tels que les AMA-M2 dans la cirrhose biliaire primitive (PBC). Le lupus érythémateux disséminé (SLE) est une maladie auto-immune caractérisée par une succession de phases d'exacerbation et de rémission dues au dépôt d'enchevêtrements d'autoanticorps et de leurs antigènes dans les tissus, aboutissant à une grande variété de manifestations cliniques (e.g., manifestations neuropsychiatriques, hématologiques, dermatologiques). Le syndrome des antiphospholipides (APS) est une maladie qui peut être distincte ou associée au SLE et présente des manifestations thromboemboliques et/ou obstétriques. Bien que l'immunogénicité de la cardiolipine (i.e., phospholipide uniquement synthétisée dans la mitochondrie chez l'humain) soit connue dans le cadre du SLE et de l'APS (i.e., anticardiolipines), l'antigénicité des protéines mitochondriales reste encore méconnue. Cette thèse de doctorat fait suite à mes travaux de maîtrise au cours desquels, j'ai développé des ELISAs permettant de mesurer des niveaux des IgGs dirigés contre les mitochondries intactes (i.e., AwMA) et le mtDNA (i.e., AmtDNA)<sup>1</sup>. Mon projet de thèse vise à caractériser l'immunogénicité mitochondriale dans l'auto-immunité.

La cohorte de la *University of Toronto Lupus Clinic* regroupe des échantillons d'échantillons de séra de patients souffrant de SLE ou d'APS (n=175 et n=12, respectivement). Les AwMA, et AmtDNA ont été mesurés au sein de ces échantillons ainsi que d'échantillons

de volontaires sains (n=43) et de donneurs souffrant de PBC (n=12). Les patients souffrant des trois conditions présentaient une augmentation significative des AwMA par rapport aux contrôles sains. Les AmtDNA, uniquement augmentés chez les patients SLE (p=0.0004) ont été associés à des antécédents accrus de néphrite lupique (p=0.01). Ces résultats ont été publiés en mars 2019 dans le journal *Scientific Reports* <sup>2</sup>. Durant ces mesures, j'ai observé que les séra de patients présentaient aussi une immunoréactivité dirigée contre l'ARN mitochondrial (mtRNA). J'ai, par la suite, adapté mes tests pour détecter les AMA dirigés contre le mtRNA (i.e., AmtRNA) et les ai mesurés à l'aide de séra inclus dans la cohorte des maladies rhumatismales auto-immunes systémiques (MRAS. Sains:n=30, SLE:n=87). Les d'AmtRNA sont significativement élevés dans le SLE (IgG:p<0.0001, IgM:p=0.0493). De façon surprenante, les AmtRNA-IgG sont associés avec des historiques réduits de néphrite lupique (p=0.03) et de plaque carotidienne (p=0.04). Ces travaux ont été publiés dans le journal *Frontiers in Immunology* en mai 2019 <sup>3</sup>.

L'ensemble des AMA mesurés présentant des associations biostatistiques avec différents anticorps antiphospholipides. J'ai répliqué mon protocole sur des échantillons de patients souffrant d'APS, inclus dans la cohorte MRAS (n=27). Les AmtRNA (IgG:p=0.0005, IgM:p=0.01) et les AmtDNA-IgM sont augmentés dans l'APS (p=0.009). Seuls les AmtRNA-IgM sont associées avec une diminution des antécédents de thromboses artérielles (p=0.047). Ce projet a fait l'objet d'un article, publié dans *Lupus* en aout 2020 <sup>4</sup>.

Dans une autre étude, acceptée dans le journal *Arthritis & Rheumatology* en janvier 2022 <sup>5</sup>, nous avons identifié, par spectrométrie de masse, 1345 protéines associées aux AwMA dont 431 sont associées avec le protéome mitochondrial. Ces résultats m'ont permis d'identifier deux candidats d'intérêts : C1qBP et Mfn-1. Les anti-C1qBP sont significativement augmentés chez les patients lupiques (p=0.0167) et sont associés avec la positivité pour l'anticoagulant lupique (p=0.049). Les anti-Mfn1 constituent de potentiels candidats pour prédire la maladie (p=0.0052). Ils sont, par ailleurs, associés avec la positivité aux antiphospholipides (p=0.011) et aux anti-ADN double brins (p=0.0005).

Ces résultats soulignent l'immunogénicité de la mitochondrie dans le SLE et l'APS. Les AMA et leurs cibles constituent de nouvelles avenues d'intérêt dans

la mise au point de nouveaux tests cliniques permettant le diagnostic, le pronostic ou la classification de la maladie afin d'améliorer la prise en charge des patients lupiques.

## Abstract in English

Mitochondria are intracellular organelles in control of numerous biological functions (e.g., from energy supply to steroidogenesis and programmed cell death by apoptosis). Evolutionarily, mitochondria are considered as derived from the endosymbiosis between an  $\alpha$ -proteobacterium and a primitive eukaryotic cell. Due to its origin, the organelle displays prokaryotic motifs such as a circular double-stranded hypomethylated DNA (i.e., mtDNA) and N-formylated peptides. Intact or damaged mitochondria, as well as mitochondrial components may be extruded in the extracellular space upon cell activation or death. These features, as well as several biomolecules localized within the mitochondrion (e.g., ATP, cytochrome C) are able to be recognized by the innate immune system as mitochondrial damage-associated molecular patterns, thus eliciting a proinflammatory response. A humoral immune response comprising anti-mitochondrial antibodies (AMA) is also described in various autoimmune conditions, such as AMA-M2 in primary biliary cirrhosis (i.e., PBC). Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by the alternance of flares and phases of remission, due to the deposition of antibody-antigen scaffolds (i.e., immune complexes) within tissues, leading to various clinical manifestations (e.g., neuropsychiatric, hematological or dermatological disorders). The antiphospholipid syndrome (i.e., APS) is an autoimmune disease, with thromboembolic and/or obstetrical manifestations, that can either be found alone or along with SLE. While the immunogenicity of cardiolipin (i.e., a phospholipid uniquely synthesized by mitochondria in humans) is well described in SLE and APS (i.e., anticardiolipins), mitochondrial proteins targeted by autoantibodies are still poorly known. The present doctoral thesis follows my masters' project during which I developed ELISAs allowing for the detection of AMA targeting intact mitochondria (i.e., AwMA) or mtDNA (i.e., AmtDNA)<sup>1</sup>. The present project aims to characterize the mitochondrial immunogenicity in SLE and APS.

The University of Toronto Lupus Clinic cohort comprise sera from patients with SLE or APS (n=175 and n=12 respectively). AwMA and AmtDNA levels were assessed in these samples, as well as in sera from healthy volunteers (n=43) or patients with PBC (n=12). I observed that all patients had increased AwMA, compared to healthy individuals.

AmtDNA were only increased in SLE patients and were associated with increased past reports of lupus nephritis ( $p=0.01$ ). These results were published in March 2019 in *Scientific Reports* <sup>2</sup>. During the acquisition of these data, I observed that patients' sera also presented immunoreactivity against mitochondrial RNA (i.e., mtRNA). I thus adapted my assays to detect autoantibodies against mtRNA (i.e., AmtRNA), and assessed their levels in sera from patients included in the systemic autoimmune rheumatic disease biobank and data repository (i.e., SARD-BDB. Healthy:n=30, SLE:n=87). AmtRNA were significantly elevated in SLE (IgG: $p<0.0001$ , IgM: $p=0.0493$ ). Surprisingly, AmtRNA-IgG were associated with decreased reports of past lupus nephritis ( $p=0.03$ ) and carotid plaque ( $p=0.04$ ). This study was published in *Frontiers in Immunology* in May 2019 <sup>3</sup>.

As each AMA assessed displayed biostatistical associations with antiphospholipids, I replicated these protocols, using sera from patients with APS, included in the SARD-BDB (n=27). AmtRNA (IgG: $p=0.0005$ , IgM: $p=0.01$ ) and AmtDNA-IgM were increased in APS ( $p=0.009$ ). However, only AmtDNA-IgM were associated with reports of arterial thromboses ( $p=0.047$ ). This pilot study was published in *Lupus* in August 2020 <sup>4</sup>.

In a recent study, accepted in *Arthritis & Rheumatology* in January 2022 <sup>5</sup>, we identified by mass spectrometry 1345 proteins associated with AwMA, 431 of which were assigned to the mitochondrial proteome. These results allowed to identify two candidates: C1qBP and Mfn-1. IgGs to C1qBP were increased in ( $p=0.0167$ ) and associated with positivity to the lupus anticoagulant ( $p=0.049$ ) in SLE. IgGs against Mfn-1 are interesting candidates for the prediction of the disease ( $p=0.0052$ ) and are associated with positivity to antiphospholipids ( $p=0.011$ ) and antibodies against double-stranded DNA ( $p = 0.0005$ ).

These results highlight the immunogenicity of the organelle in SLE and APS. Mitochondrial antigens are interesting candidates for the development of novel clinical assays allowing improved prognosis, diagnosis, or disease stratification, ultimately contributing to the improvement of medical care for people with autoimmune conditions.

# Table des matières

|   |                    |
|---|--------------------|
| <b><u>Résumé en français.....</u></b>   | <b><u>ii</u></b>   |
| <b><u>Abstract in English.....</u></b>  | <b><u>v</u></b>    |
| <b><u>Table des matières.....</u></b>   | <b><u>vii</u></b>  |
| <b>Liste des figures, tableaux, illustrations.....</b>  | <b>xviii</b>       |
| Liste des figures et illustrations.....   | xviii              |
| Liste des tableaux .....  | xx                 |
| <b>Liste des abréviations, sigles, acronymes .....</b>  | <b>xxii</b>        |
| Liste des abréviations :.....   | xxii               |
| Liste des sigles : .....  | xxv                |
| Liste des acronymes : .....   | xxxvi              |
| <b><u>Dédicace.....</u></b>   | <b><u>xl</u></b>   |
| <b><u>Épigraphe.....</u></b>  | <b><u>xli</u></b>  |
| <b><u>Remerciements .....</u></b>   | <b><u>xlii</u></b> |
| <b><u>Avant-propos .....</u></b>  | <b><u>xliv</u></b> |
| État de publication, modifications et références, par chapitre .....                                | xliv               |
| Statut d’auteur et co-auteurs, contributions respectives, et informations<br>additionnelles : ..... | xlvi               |
| <b><u>Introduction .....</u></b>  | <b><u>1</u></b>    |
| <b>Rôles métaboliques de la mitochondrie et impact de leurs dysfonctions....</b>                    | <b>1</b>           |
| Généralités sur la mitochondrie. ....   | 1                  |



|  |    |
|--|----|
| La masse mitochondriale – un réseau en remodelage permanent.....   | 4  |
| Voies biologiques assurant la plasticité du réseau mitochondrial. ....   | 4  |
| Dynamique mitochondriale et réponse immunitaire normale.....   | 9  |
| Physiopathologie des dysfonctions de la dynamique mitochondriale .....   | 10 |
| La mitochondrie ; centrale énergétique et usine de production de biomolécules de la cellule.....   | 12 |
| Principales voies métaboliques de la mitochondrie .....  | 12 |
| <i>Le métabolisme des acides gras (FAO):</i> .....   | 12 |
| <i>Le cycle de Krebs, ou cycle de l'acide citrique (TCA):</i> .....  | 13 |
| <i>Métabolisme mitochondrial de l'urée:</i> .....  | 13 |
| <i>La synthèse de la cardiolipine:</i> .....   | 15 |
| <i>Contribution mitochondriale à la biosynthèse de l'hème:</i> .....   | 16 |
| <i>La phosphorylation oxydative (OxPhos):</i> .....  | 18 |
| Métabolisme mitochondrial et réponse immunitaire normale .....   | 19 |
| Dysfonctions du métabolisme mitochondrial .....  | 21 |
| Un centre de contrôle pour la mort cellulaire programmée par apoptose.....   | 23 |
| La mitochondrie, organelle centrale de la voie intrinsèque de l'apoptose.....  | 23 |
| L'apoptose, un mécanisme crucial pour la maturation et le contrôle des populations de cellules immunitaires, la modulation des réponses auto-immunes et la réponse immunitaire cytotoxique. .... | 25 |
| Dérégulations de l'apoptose - diminution dans les cancers ou augmentation dans les maladies neurodégénératives et auto-immunes. ....   | 26 |
| Un site de détection des variations de concentration et de stockage du calcium cytosolique .....   | 28 |
| Détection des microdomaines calciques au contact du réticulum endoplasmique .....  | 28 |
| Messagerie calcique mitochondriale et réponse immunitaire.....   | 28 |

|  |           |
|--|-----------|
| Perturbation du stockage mitochondrial et maintien de l'activité de second messenger du calcium.....                     | 29        |
| Un goulot d'étranglement pour la synthèse d'hormones stéroïdes pro- et anti-inflammatoires. ....                         | 30        |
| La mitochondrie, siège de la synthèse de prégnéolone, de corticoïdes et de la vitamine D. ....                           | 30        |
| Effets des dysfonctions du métabolisme mitochondrial du cholestérol sur la réponse immunitaire.....                      | 31        |
| Mutations de la superfamille du cytochrome P450 mitochondrial – un vaste ensemble de phénotypes. ....                    | 32        |
| Une source de chaleur sans frissons.....   | 36        |
| La thermogénèse mitochondriale, une méthode de régulation de la signalisation par les espèces réactives à l'oxygène..... | 36        |
| Stress oxydatif et inflammation. ....  | 36        |
| Dérégulation de la thermogénèse mitochondriale, neuroinflammation et stress oxydatif. ....                               | 37        |
| Une plateforme de signalisation antimicrobienne.....   | 39        |
| <b>La mitochondrie, une organelle d'origine procaryote qui peut être reconnue par le système immunitaire. ....</b>       | <b>41</b> |
| Les acides nucléiques et les ribonucléoprotéines mitochondriales.....  | 43        |
| La mitochondrie, unique source de peptides N-formylés endogènes .....  | 44        |
| La cardiolipine, un phospholipide spécifiquement mitochondrial.....  | 45        |
| Libération d'ATP dans le milieu extracellulaire.....   | 45        |
| Le cytochrome c extracellulaire .....  | 46        |
| Les espèces réactives à l'oxygène mitochondriales.....   | 47        |

|   |           |
|---|-----------|
| Les antigènes mitochondriaux peuvent être la cible d'une réponse immunitaire humorale. ....   | 48        |
| La présentation des antigènes mitochondriaux, un mécanisme controversé .....  | 48        |
| Les anticorps anti-mitochondriaux, biomarqueurs dans la cirrhose biliaire primitive ....  | 49        |
| Les anticorps anti-mitochondriaux, un répertoire observé dans les maladies infectieuses, auto-immunes, les cardiopathies et les troubles iatrogènes. .... | 50        |
| Les anticorps naturels anti-mitochondriaux, une réponse humorale entre immunité innée et adaptative .....   | 52        |
| Exemples de techniques de laboratoire permettant l'étude de la mitochondrie. ....   | 53        |
| <i>Isolation de l'organelle :</i> .....   | 53        |
| <i>Morphologie :</i> .....  | 53        |
| <i>Génomique :</i> .....  | 54        |
| <i>Masse et dynamique mitochondriale :</i> .....  | 54        |
| <i>Métabolisme énergétique et potentiel de membrane :</i> .....   | 55        |
| <i>Production de biomolécules mitochondriales :</i> .....   | 56        |
| <i>Stress oxydatif :</i> .....  | 56        |
| <i>Apoptose :</i> .....   | 56        |
| <i>Anticorps anti-mitochondriaux :</i> .....  | 57        |
| Le futur de la recherche sur l'implication de la mitochondrie dans les réponses immunitaires normales et physiologiques.....                              | 58        |
| <b>Les maladies auto-immunes à anticorps anti-mitochondriaux.....</b>   | <b>60</b> |
| Données épidémiologiques : .....  | 60        |
| <i>La cholangite (ou cirrhose) biliaire primitive (PBC).....</i>  | <i>60</i> |
| <i>Le lupus érythémateux disséminé (systemic lupus erythematosus, SLE) .....</i>  | <i>61</i> |
| <i>Le syndrome des antiphospholipides (antiphospholipid syndrome, APS).....</i>   | <i>61</i> |
| De l'étiologie à la physiopathologie des maladies auto-immunes à anticorps anti-mitochondriaux.....   | 63        |

|  |           |
|--|-----------|
| <i>Généralités sur l'auto-immunité :</i> .....   | 63        |
| <i>Cytokines :</i> .....   | 64        |
| <i>De nouveaux types de lymphocytes T; les Th<sub>17</sub> et les lymphocytes T et B régulateurs (T<sub>reg</sub> / B<sub>reg</sub>)</i> ..... | 65        |
| <i>Dans la PBC</i> .....   | 66        |
| <i>Le SLE</i> .....  | 67        |
| <i>L'APS</i> .....   | 68        |
| <i>De l'implication des mitochondries dans la physiopathologie du SLE et de l'APS : ...</i>  | 69        |
| <b>Les différents challenges de la prise en charge des maladies auto-immunes; du diagnostic aux traitements. ....</b>                          | <b>72</b> |
| De la difficulté d'établir un diagnostic précoce dans les maladies auto-immunes et de l'importance des nouveaux biomarqueurs : .....           | 72        |
| Critères cliniques actuellement utilisés en clinique et méthodes permettant d'établir un diagnostic ou un pronostic :.....                     | 74        |
| <i>Le diagnostic de la PBC</i> .....   | 74        |
| <i>Les critères de classification du SLE</i> .....   | 74        |
| <i>Le score d'activité du lupus</i> .....  | 77        |
| <i>Les critères de Sapporo et de Sydney permettent le diagnostic de l'APS</i> .....  | 82        |
| <i>Outils diagnostics à disposition des équipes soignantes</i> .....   | 82        |
| Traitements usuels.....  | 84        |
| <i>Les anti-malariques :</i> .....   | 84        |
| <i>Les glucocorticoïdes (GC) :</i> .....   | 84        |
| <i>Immunosuppresseurs et immunomodulateurs :</i> .....   | 85        |
| <i>Les agents biologiques</i> .....  | 86        |
| <i>L'acide ursodésoxycholique</i> .....  | 87        |
| <i>Les traitements de contrôle des thromboses : anti-plaquettes et anticoagulants</i> .....  | 87        |
| <i>Les traitements de gestion des risques cardiovasculaires</i> .....  | 88        |
| <i>Autres traitements :</i> .....  | 88        |
| <b>Démarche expérimentale du projet .....</b>  | <b>89</b> |
| Contexte expérimental : .....  | 89        |

|   |           |
|---|-----------|
| Résultats préliminaires du laboratoire : .....  | 90        |
| Hypothèse de recherche : .....  | 91        |
| Objectifs principaux : .....  | 91        |
| Objectif secondaire : .....   | 91        |
| Démarche expérimentale : .....  | 92        |
| Résultats originellement escomptés .....  | 92        |
| <b><u>Chapitre 1 Détection des autoanticorps anti-mitochondriaux chez des patients atteints de lupus érythémateux disséminé et association avec les manifestations cliniques de la maladie.....</u></b> | <b>93</b> |
| 1.1 Résumé .....  | 93        |
| 1.2 Abstract .....  | 94        |
| <b>Anti-mitochondrial autoantibodies in systemic lupus erythematosus and their association with disease manifestations.....</b>   | <b>95</b> |
| 1.3 Introduction .....  | 96        |
| 1.4 Material and methods .....  | 100       |
| 1.4.1 Study approval: .....   | 100       |
| 1.4.2 Data from clinical laboratories: .....  | 100       |
| 1.4.3 Cell culture: .....   | 100       |
| 1.4.4 Inducible mouse model of SLE: .....   | 100       |
| 1.4.5 Ethics: .....   | 101       |
| 1.4.6 Mitochondria isolation: .....   | 101       |
| 1.4.7 Submitochondrial particles (SMP) preparation: .....   | 102       |
| 1.4.8 Red blood cells microparticles (RBCMP) preparation: .....   | 102       |
| 1.4.9 Western blotting: .....   | 103       |
| 1.4.10 Mitochondrial size measurement by dynamic light scattering (DLS): .....  | 103       |
| 1.4.11 Electron microscopy: .....   | 104       |
| 1.4.12 Assessment of the mitochondrial oxygen consumption: .....  | 104       |

|  |            |
|--|------------|
| 1.4.13 High sensitivity flow cytometry: .....  | 104        |
| 1.4.14 Mitochondrial DNA extraction by alkaline lysis:.....  | 105        |
| 1.4.15 Nuclei isolation from mouse hepatocytes .....   | 105        |
| 1.4.16 Whole-cell and nuclear DNA isolation: .....   | 106        |
| 1.4.17 Mitochondrial DNA and nuclear DNA enrichments by qPCR:.....   | 106        |
| 1.4.18 Mitochondrial DNA digestion by restriction enzymes: .....   | 106        |
| 1.4.19 S1 nuclease treatment of mitochondrial DNA and nuclear DNA: .....   | 107        |
| 1.4.20 Mitochondria oxidation in-vitro:.....   | 107        |
| 1.4.21 Mitochondrial lipid oxidation: .....  | 107        |
| 1.4.22 Mitochondrial protein oxidation: .....  | 107        |
| 1.4.23 Detection of antibodies targeting mitochondrial epitopes by ELISA:.....   | 108        |
| 1.4.24 Competition assay: .....  | 109        |
| 1.4.25 Statistics: .....   | 109        |
| 1.4.26 Software:.....  | 110        |
| 1.5 Results .....  | 111        |
| 1.6 Discussion .....   | 116        |
| 1.7 Additional information.....  | 120        |
| 1.8 Author contribution.....   | 120        |
| 1.9 Competing interests.....   | 120        |
| 1.10 Figures .....   | 121        |
| 1.11 Tables: .....   | 126        |
| 1.12 Supplementary information:.....   | 132        |
| 1.12.1 Supplementary figures: .....  | 132        |
| 1.12.2 Supplementary tables:.....  | 139        |
| <b><u>Chapitre 2 : Les patients atteint de lupus érythémateux disséminé<br/>expriment des autoanticorps circulants autoanticorps dirigés contre<br/>l'ARN mitochondrial.....</u></b> | <b>142</b> |
| 2.1 Résumé .....   | 142        |

|  |                   |
|--|-------------------|
| 2.2 Abstract .....   | 143               |
| <b>Autoantibodies in systemic lupus erythematosus target mitochondrial RNA.....</b>  | <b>144</b>        |
| 2.3 Introduction .....   | 145               |
| 2.4 Material and methods .....   | 148               |
| 2.4.1. <i>Induced model of murine SLE:</i> .....   | 148               |
| 2.4.2. <i>Mitochondria isolation:</i> .....  | 148               |
| 2.4.3. <i>Mitochondrial RNA isolation:</i> .....   | 148               |
| 2.4.4. <i>Enzyme-linked immunoassays for the detection of antibodies targeting mitochondrial antigens:</i> .....                           | 149               |
| 2.4.5. <i>Ethics and study approval:</i> .....   | 150               |
| 2.4.6. <i>Human serum samples:</i> .....   | 150               |
| 2.4.7. <i>Additional serum samples:</i> .....  | 150               |
| 2.4.8. <i>Clinical variables collected in SLE patients:</i> .....  | 151               |
| 2.4.9. <i>Statistical analyses:</i> .....  | 152               |
| 2.5 Results .....  | 154               |
| 2.6 Discussion .....   | 157               |
| 2.7 Acknowledgements: .....  | 161               |
| 2.8 Author contribution: .....   | 161               |
| 2.9 Conflict of Interest: .....  | 161               |
| 2.10 Figures : .....   | 162               |
| 2.11 Tables: .....   | 167               |
| 2.12 Supplementary information:.....   | 176               |
| 2.12.1 Supplementary figure:.....  | 176               |
| <b><u>Chapitre 3 : Étude pilote – détection des anticorps antimitochondriaux dans le cadre du syndrome des antiphospholipides.....</u></b> | <b><u>177</u></b> |

|  |                   |
|--|-------------------|
| 3.1 Résumé .....   | 177               |
| 3.2 Abstract .....   | 178               |
| <b>Anti-Mitochondrial antibodies in the Antiphospholipid Syndrome (AMAPS) pilot study.....</b>   | <b>179</b>        |
| 3.3 Introduction .....   | 180               |
| 3.4 Material and methods .....   | 182               |
| 3.4.1. <i>Population:</i> .....  | 182               |
| 3.4.2. <i>Detection of anti-mitochondrial antibodies by direct ELISA:</i> .....  | 182               |
| 3.4.3. <i>The Systemic Autoimmune Rheumatic Disease biobank and database repository (SARD-BDB), ethics and study approval:</i> .....   | 182               |
| 3.4.4. <i>Clinical variables collected in healthy controls and APS patients:</i> .....   | 182               |
| 3.4.5. <i>Statistical analyses:</i> .....  | 183               |
| 3.5 Results .....  | 184               |
| 3.6 Discussion .....   | 185               |
| 3.7 Acknowledgements: .....  | 188               |
| 3.8 Authorship details: .....  | 188               |
| 3.9 Conflict of Interest: .....  | 188               |
| 3.10 Figures .....   | 189               |
| 3.11. Tables: .....  | 190               |
| <b><u>Chapitre 4 : Identifications des protéines mitochondriales et des facteurs associés aux anticorps anti-mitochondriaux dans le lupus érythémateux disséminé. ....</u></b> | <b><u>193</u></b> |
| 4.1 Résumé .....   | 193               |
| 4.2 Abstract .....   | 194               |



**Identification of mitofusin 1 and complement component 1 Q subcomponent-binding protein as mitochondrial targets in systemic lupus erythematosus.....195**

4.3 Introduction ..... 196

4.4 Material and methods ..... 198

*4.4.1.The CHU de Québec – Université Laval Systemic Autoimmune Rheumatic Disease Biobank and DataBase repository (SARD-BDB). ..... 198*

*4.4.2.Mitochondrial samples:..... 198*

*4.4.3.Sample preparation for mass spectrometry identification of mitochondrial antigens targeted by AMA in SLE:..... 198*

*4.4.4.Identification of mitochondrial antigens recognized by AMA: ..... 199*

*4.4.5.Detection of autoantibodies targeting selected mitochondrial antigens..... 200*

*4.4.6.Statistical analyses: ..... 201*

4.5 Results ..... 202

4.6 Discussion ..... 206

4.7 Acknowledgements: ..... 211

4.8 Authorship details: ..... 211

4.9 Conflict of Interest: ..... 211

4.10 Figures: ..... 212

4.11 Tables: ..... 218

4.12 Supplementary information:..... 220

4.12.1.Supplementary methods..... 220

*4.12.1.1. Human serum samples – healthy donors, and patients with SLE or APS from the CHU de Québec – Université Laval Systemic Autoimmune Rheumatic Disease Biobank and DataBase repository (SARD-BDB). ..... 220*

*4.12.1.2.Sample preparation for the identification of mitochondrial antigens targeted by AMA in SLE using mass spectrometry: ..... 221*

*4.12.1.3.Identification of mitochondrial antigens recognized by AMA: ..... 222*

*4.12.1.4.Detection of autoantibodies targeting selected mitochondrial antigens..... 224*

|  |            |
|--|------------|
| 4.12.1.5. Statistical analyses: .....  | 225        |
| <b><u>Conclusion.....</u></b>  | <b>234</b> |
| Mise en contexte.....  | 234        |
| Inconvénients et avantages des méthodes utilisées :.....   | 235        |
| Résumé des découvertes et discussion.....  | 236        |
| Les mitochondries sont immunogéniques dans le SLE. ....  | 236        |
| Les AmtDNA, ciblent un acide nucléique extra-nucléaire et présentent des associations avec les anti-dsDNA. ....                      | 238        |
| Le mtDNA n'est pas le seul acide nucléique d'origine mitochondriale qui soit antigénique dans le SLE. ....                           | 239        |
| Les AMA mesurés ne sont pas spécifiques au SLE et peuvent être identifiés dans d'autres maladies auto-immunes. ....                  | 241        |
| De nombreuses protéines mitochondriales sont ciblées par les autoanticorps lupiques .....  | 242        |
| Perspectives présentement étudiées : .....   | 246        |
| <b><u>Bibliographie.....</u></b>   | <b>251</b> |
| <b><u>Annexe : Identification par spectrométrie de masse des antigènes mitochondriaux reconnus par les AMA dans le SLE. ....</u></b> | <b>306</b> |

# Liste des figures, tableaux, illustrations

## Liste des figures et illustrations

|  |     |
|--|-----|
| Figure 1. Généralités sur la mitochondrie. ....  | 3   |
| Figure 2. Régulation de la structure du réseau mitochondrial par la dynamique de fusion et de fission. ....  | 7   |
| Figure 3. Dégradation des mitochondries surnuméraires et/ou endommagées par la voie de la mitophagie et présentations des antigènes mitochondriaux (mitAP). .... | 8   |
| Figure 4. Intrication des différentes voies du métabolisme énergétique mitochondrial. ....   | 15  |
| Figure 5. Biosynthèse de la cardiolipine et contribution de la mitochondrie à la production d'hème. ....   | 17  |
| Figure 6. Voie intrinsèque de l'apoptose. ....   | 24  |
| Figure 7. La mitochondrie, Mr. Jekyll contribuant à la réponse immunitaire et Dr. Hyde aux influences proinflammatoires. ....                                    | 40  |
| Figure 8. Libération de mitochondries intactes et de composantes mitochondriales proinflammatoires dans le cadre du SLE. ....                                    | 42  |
| Figure 9. Manifestations cliniques du lupus érythémateux disséminé. ....   | 76  |
| 1.10. Figure 1. Assessment of the mitochondrial preparations. ....   | 121 |
| 1.10. Figure 2. Antibodies targeting mitochondrial antigens are produced in a murine model of SLE. ....  | 123 |
| 1.10. Figure 3. Detection of anti-mitochondrial antibodies in SLE patients and specificity of the assay. ....  | 124 |
| 1.10. Figure 4. Antibodies targeting mitochondrial DNA in SLE. ....  | 125 |
| 1.12.1. Supplementary Figure 1. Isolation of highly purified isolated mitochondria. ....   | 132 |
| 1.12.1. Supplementary Figure 2. Assessment of mitochondrial oxidation. ....  | 133 |
| 1.12.1. Supplementary Figure 3. Detection of autoantibodies targeting submitochondrial particles. ....   | 134 |
| 1.12.1. Supplementary Figure 4. Assessment of the isolated mitochondrial DNA purity. ..  | 135 |
| 1.12.1. Supplementary Figure 5. AmtDNA display cross-reactivities between mitochondrial and nuclear DNA. ....  | 136 |
| 1.12.1. Supplementary Figure 6. Full length images for western blots and agarose gels. ..  | 137 |
| 2.10. Figure 1: Anti-mitochondrial antibodies and related diseases. ....   | 162 |
| 2.10. Figure 2: Circulating anti-mitochondrial RNA autoantibodies are detectable in sera from mice with induced SLE. ....  | 164 |
| 2.10. Figure 3: Antibodies targeting mitochondrial RNA (AmtRNA) are elevated in SLE patients. ....   | 165 |
| 2.10. Figure 4: Detection of AmtRNA in two different diseases with anti-mitochondrial antibodies. ....   | 166 |
| 2.12.1. Supplementary Figure 1. Saturation of ELISA microplates by mitochondrial RNA. ....   | 176 |
| 3.10. Figure 1: Detection of antibodies targeting whole mitochondria, mtDNA and mtRNA in APS patients. ....  | 189 |
| 4.10. Figure 1: Workflow used for the detection of mitochondrial antigens targeted by anti-mitochondrial antibodies in SLE. ....                                 | 213 |
| 4.10. Figure 2: Mitochondrial hits identified and their mitochondrial sub-localization. ....   | 214 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.10.Figure 3: C1qBP and Mfn1 are two surface mitochondrial antigens with increased immunoreactivity in SLE. .... | 215 |
| 4.10.Figure 4: Indirect immunofluorescence (IIF) staining of Hep2 cells. ....                                     | 216 |
| 4.12.2.Supplementary Figure 1: Immunoreactivity of several mitochondrial proteins in SLE. ....                    | 227 |
| Figure 10. Détection des AMA dans les échantillons issus de la cohorte SLICC – données préliminaires. ....        | 247 |

## Liste des tableaux

|   |     |
|---|-----|
| Table 1: Critères de diagnostic différentiel entre l'hépatite auto-immune (AIH), la cirrhose biliaire primitive (PBC) et les syndromes de chevauchement (OS)..... | 75  |
| Table 2: Comparatif des items cliniques et sérologiques entre les critères de classification de l'ACR, du SLICC et de l'EULAR.....                                | 78  |
| Table 3.1: Tableau comparatif des items inclus dans quatre grands index d'activités du lupus (partie 1). .....  | 79  |
| Table 3.2: Tableau comparatif des items inclus dans quatre grands index d'activités du lupus (suite).....   | 80  |
| Table 4: Scores de dommages dans le lupus. ....   | 81  |
| 1.11.Table 1. Various types of anti-mitochondrial antibodies (AMA) implicated in human diseases .....   | 126 |
| 1.11.Table 2. Demographics and clinical characteristics (ACR criteria) for SLE patients included in the study (n=175, unless stated otherwise) .....              | 128 |
| 1.11.Table 3. Intercorrelations of anti-mtDNA, anti-whole mitochondria, anti-dsDNA and anti-cardiolipin antibodies in SLE patients (n=175).....                   | 129 |
| 1.11.Table 4. AmtDNA and AwMA associations with clinical manifestations in SLE patients (n=175) .....   | 130 |
| 1.11.Table 5. Performance of cut-off values for AwMA and AmtDNA (Healthy donors: n=43, SLE: n=175) .....  | 131 |
| 1.12.2.Supplementary Table 1. Additional demographics and clinical variables for SLE patients included in the study (n=175).....                                  | 139 |
| 1.12.2.Supplementary Table 2: Serologic variables for SLE patients.....   | 140 |
| 1.12.2.Supplementary Table 3: Autoantibodies detected in SLE patients .....   | 141 |
| 2.11.Table 1: Sociodemographic characteristics in the SARD-BDB.....   | 167 |
| 2.11.Table 2: Clinical characteristics in the SARD-BDB. ....  | 168 |
| 2.11.Table 3: Outcome variables of the study.....   | 169 |
| 2.11.Table 4: Information about medications taken by SLE patients (n=86) in the SARD-BDB .....  | 170 |
| 2.11.Table 5: Laboratory measurements. ....   | 171 |
| 2.11.Table 6. Correlations of anti-mtRNA levels, with titers of other auto-antibodies in SLE patients .....   | 172 |
| 2.11.Table 7. Association of AmtRNA with clinically relevant SLE autoantibodies .....   | 173 |
| 2.11.Table 8. Association of AmtRNA with clinical manifestations in SLE.....  | 174 |
| 2.11.Table 9. Performance of cut-off values for AmtRNA, AwMA and AmtDNA (OD 405 <sub>nm</sub> ) .....   | 175 |
| 3.11.Table 1: Sociodemographic, clinical and laboratory characteristics of the APS patients included in the SARD-BDB. ....  | 190 |
| 3.11.Table 2. AMA may allow discrimination of APS patients from healthy individuals and are associated with APS classification criteria. ....                     | 191 |
| 4.11.Table 1: Table 1: Associations between anti-C1qBP, anti-Mitofusin 1 and autoantibodies routinely assessed in SLE.....  | 218 |
| 4.11.Table 2: Correlations between anti-C1qBP, anti-Mitofusin 1 and clinical serologies and AMAs in SLE patients.....   | 219 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.12.3. Supplementary Table 1: Sociodemographic and clinical characteristics of the SLE patients included in the SARD-BDB.....  | 228 |
| 4.12.3. Supplementary table 2: SLE disease characteristics expressed by the patients included in the SARD-BDB.....  | 229 |
| 4.12.3. Supplementary table 3: Continuous variables acquired in blood samples acquired from SLE patients drawn at the time of their inclusion in the SARD-BDB. ....                                     | 230 |
| 4.12.3. Supplementary table 4: Mass spectrometry identification of proteins associated with anti-mitochondrial autoantibodies in SLE.....   | 231 |
| 4.12.3. Supplementary table 5: Confocal microscopy observation in indirect immunofluorescence allows the detection of cytoplasmic patterns that are undetected using an epifluorescence microscope..... | 232 |
| 4.12.3. Supplementary table 6: Performance of cut-off values for anti-C1qBP and anti-Mitofusin 1. ....  | 233 |

## Liste des abréviations, sigles, acronymes

Le présent manuscrit étant une thèse par article, l'ensemble des sigles, abréviations et acronymes utilisés au travers du document respecteront la nomenclature anglo-saxonne à des fins d'homogénéité et de lisibilité.

La majorité des protéines et gènes n'ayant pas de traduction spécifique en français, la signification de leur abréviation ne sera décrite qu'en anglais.

### Liste des abréviations :

#### Symboles :

- °C : Unité de température - degré Celsius

#### A

- **Acetyl-CoA** : Acetyl coenzyme A

#### B

- **B<sub>reg</sub>** : Lymphocytes B régulateurs (*regulatory B-cells*)

#### C

- **Casp** : Caspase
- **cf.** : Se conférer à
- **CoA** : Coenzyme A

#### G

- **g** : Unité d'accélération ou unité de masse – grammes
- **Glut1** : *Glucose transporter 1*

#### E

- **e.g.,** : Par exemple (*exempli gratia*)

## I

- **i.e.,** : C'est à dire (*id est*)

## L

- **L** : Unité de volume - litre

## M

- **m** : Unité de distance – mètre
- **M** (ou **mol**) : Unité de concentration – molaire
- **mmHg** : Unité de pression – millimètre de mercure

## N

- **N** : Unité de concentration équivalente – normalité ou taille de l'échantillon
- **Neutrophiles** : Cellules polynucléaires neutrophiles

## O

- **OxPhos** : Phosphorylation oxydative (*oxidative phosphorylation*)

## P

- **P** : p-valeur (*p-value*)
- **Pas** : Unité de viscosité – Pascal par seconde

## R

- **RedOx** : Réaction d'oxydoréduction

## S

- **Succinyl-CoA** : Succinyl-coenzyme A
- **Syndrôme du triple H** : hyperornithinémie-hyperammoniémie-homocitrullinurie

## T

- **T<sub>eff</sub>** : Lymphocytes T effecteurs (*effector T-cells*)



- **T<sub>h</sub>** : Lymphocytes T auxiliaires (*helper T-cells*)
- **T<sub>m</sub>** : Lymphocytes T mémoires (*memory T-cells*)
- **T<sub>reg</sub>** : Lymphocytes T régulateurs (*regulatory T-cells*)

## U

- **U** : Unité d'activité enzymatique

## V

- **V** : Unité de tension - Volt
- **v:v** : Rapport volume pour volume

## W

- **W** : Unité de puissance - Watt
- **w:v** : Rapport masse pour volume

## Liste des sigles :

### Chiffres et nombres :

- **2,4 DNP** : 2,4 Dinitrophenol
- **27-OH** : 27-hydroxycholesterol
- **8OHdG** : 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine

### Symboles :

- **β<sub>2</sub>GPI** : Beta-2 glycoprotéine I

### Lettres :

#### A

- **Ab** : Anticorps (*antibody*)
- **aCL** (ou **ACA**) : Anticorps anticardioline (*anticardiolipin antibodies*)
- **ACR** : Collège américain de Rhumatologie (*American College of Rheumatology*)
- **AD** : Maladie d'Alzheimer (*Alzheimer's disease*)
- **ADN** : Acide désoxyribonucléique (*desoxyribonucleic acid*, voir aussi : DNA)
- **ADP** : d'adénosine diphosphate
- **AICD** : Mort cellulaire induite par l'activation (*activation-induced cell death*)
- **AIF** : *Activation-induced factor*
- **AmtDNA** : Anticorps anti-ADN mitochondrial (*Anti-mitochondrial DNA antibodies*)
- **AmtRNA** : Anticorps anti-ARN mitochondrial (*Anti-mitochondrial RNA antibodies*)
- **AMP** : Adenosine monophosphate
- **ANT** : *Adenine nucleotide translocase*
- **Anti-A** : Antimycine A
- **AP-1** : *NF-κB activator protein 1*
- **APC** : Cellule présentatrice d'antigène (*antigen-presenting cell*)
- **APD-I** : *Autoimmune polyglandular disease types I*
- **AP** : Phosphatase alcaline (*alkaline phosphatase*)

- **aPL** : Anticorps antiphospholipides (*antiphospholipid antibodies*)
- **APS** : Syndrome des (*antiphospholipid syndrome*)
- **AS** : Société de l'arthrite (*arthritis society*)
- **Asc** : Ascorbate
- **ASL** : *Amyotrophic lateral sclerosis*
- **ATCC** : *American type culture collection*
- **ATP** : Adenosine triphosphate
- **AUC** : Aire sous la courbe (*area under curve*)
- **AwMA** : Anticorps anti-mitochondries intègres (*anti-whole mitochondria antibodies*)

## **B**

- **b.p.** : Paires de bases (*base-pair*)
- **BCA** : Méthode de dosage des protéines à l'acide bicinchoninique (*bicinchoninic acid*)
- **BCI** : Intervalle de confiance bootstrap (*bootstrap confidence interval*)
- **BCL2** : *B-cell lymphoma 2*
- **BD** : Becton, Dickinson
- **BMI** : Indice de masse corporelle (*body mass index*)
- **BNIP3** : *BCL2 interacting protein 3*
- **BSA** : Albumine sérique bovine (*bovine serum albumin*)

## **C**

- **C<sub>1q</sub>BP** : Protéine de liaison à la composante du complément (*Complement component 1 Q subcomponent-binding protein*)
- **Ca<sup>2+</sup>** : Calcium
- **Casp** : Caspase
- **CD** : *Cluster* de différenciation
- **CDP-DAG** : cytidine diphosphate diacylglycerol
- **CFT** : Test de fixation du complément (*complement fixation test*)

- **cGAS** : *Cyclic GMP-AMP synthase*
- **CI** : Intervalle de confiance (*confidence interval*)
- **CIHR** : *Canadian institutes of health research* (voir aussi : IRSC)
- **CIMT** : Mesure de l'épaisseur intima-média carotidienne (*carotid intima-media thickness*)
- **CL** : Cardiolipine, forme mature
- **CLS1** : *Cardiolipin synthase*
- **CNS** : Système nerveux central (*central nervous system*)
- **CNTRP** : *Canadian national transplant research program*
- **CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone
- **CpG** : Cytosine-phosphate-guanine
- **CPO** : *Coproporphyrinogen III oxidase*
- **CPS 1** : *Carbamoyl phosphate synthase 1*
- **CR CHUL** : Centre de Recherche du CHUL
- **CsA** : Cyclosporine A
- **CTLA-4** : *Cytotoxic T-lymphocyte protein 4*
- **CypD** : Cyclophiline-D
- **Cyt c** : Cytochrome c

## D

- **DBT** : gène codant pour la *lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase* (aussi abrégée BKCD)
- **DC** : Cellule dendritique (*dendritic cell*)
- **DLAT** : gène codant pour la *dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex* (aussi abrégée DLTA, voir aussi : PDC)
- **DLS** : Diffusion dynamique de la lumière (*dynamic light scattering*)
- **DNA** : Acide désoxyribonucléique (*desoxyribonucleic acid*, voir aussi : ADN)
- **DNA Farr** : Titration des anti-dsDNA par le Test de Farr
- **Drp1** : *Dynammin-related protein 1*

- **DP** : Double-positif (*double positive*)
- **dsDNA** : ADN doubles-brins (*double-stranded DNA*)
- **DSS** : Dextran sulfate sodium

## E

- **EAE** : Encéphalomyélite auto-immune (*autoimmune encephalomyelitis*)
- **ECAR** : Taux d'acidification du milieu (*extracellular acidification rate*)
- **ECI** : Intervalle de confiance exact (*exact confidence interval*)
- **EDTA** : Acide éthylènediaminetétraacétique
- **eGFR** : Débit de filtration glomérulaire estimé (*estimated glomerular filtration test*)
- **EGTA** : Acide egtazique
- **EM** : Microscopie électronique (*electron microscopy*)
- **EMEM** : *Eagle's Minimum Essential Medium*
- **ER** : Réticulum endoplasmique (*endoplasmic reticulum*)
- **ETC** : Chaîne de phosphorylation oxydative (*electron transfer chain*)
- **ETF-QO** : *Flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase*

## F

- **FAD** : Flavine adénine dinucléotide
- **FADH<sub>2</sub>** : Flavine adénine dinucléotide, forme réduite
- **FAO** : Beta-oxydation des acides gras (*fatty acid oxidation*)
- **FBS** (ou **FCS**) : Sérum bovin / de veau fœtal (*fetal bovine / calf serum*)
- **FCCP** : Carbonyl cyanide 4-(trifluorométhoxy)phénylhydrazone
- **Fe<sup>2+</sup>** : Ions métal ferreux
- **FECH** : ferrochelatase
- **FRCPC** : Associé du Collège Royal des médecins du Canada (*fellow of the Royal College of physicians of Canada*)
- **FRSQ** : Fonds de recherche en santé du Québec
- **FPR** : Récepteur aux peptides formylés (*formyl peptide receptor*)
- **FMD** : Dilatation induite par le flux (*flow mediated dilatation*)

- **FSC** : Déflexion (*forward scatter*)

## G

- **GCPR** : Récepteur couplé à une protéine G (*G-coupled protein receptors*)
- **GMP** : Guanosine monophosphate
- **GmbH** : Société à responsabilité limitée allemande (*Gesellschaft mit beschränkter Haftung*)
- **GPIb $\alpha$**  : glycoprotéine Ib $\alpha$
- **GPL** : Unité arbitraire de référence pour les antiphospholipides de la classe des IgGs
- **GRP 94** : *94 kDa glucose-related protein*
- **GTP** : Guanosine triphosphate

## H

- **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène
- **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Acide sulfurique
- **HCl** : Acide chlorhydrique
- **HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>** : Bicarbonate
- **HD** : Maladie de Huntington (*Huntington's disease*)
- **HDL** : Lipoprotéines de haute densité (*high-density lipoproteins*)
- **He-Ne** : Helium-Neon
- **HIV** : Virus de l'immunodéficience humaine (*human immunodeficiency virus*)
- **HLA** : Antigène de leucocytes humains (*human leukocyte antigen*, voir aussi : MHC)
- **HMGB** : *High mobility group box*
- **Hs** : *Homo sapiens*
- **HSP60** : *60 kDa heat-shock protein*

## I

- **Ig** : Immunoglobuline
- **IIF** : Immunofluorescence indirecte
- **IL** : Interleukine

- **IMS** : Espace intermembranaire (inter-membrane space)
- **iNOS** : Inducible nitric oxide synthase
- **IFN** : Interferon
- **IQR** : Écart interquartile (*interquartile range*)
- **IRF3** : *interferon -regulatory factor 3*
- **IRG** : Gène régulé par l'interféron (*Interferon regulated genes*) ou *Immune -responsive gene*
- **IRSC** : Instituts de recherche en santé du Canada (voir aussi : CIHR)
- **i.v.** : Administration par voie intraveineuse

## K

- **KO** : *Knocked-out*
- **KCl** : Chlorure de potassium
- **KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : Dihydrogénophosphate de potassium

## L

- **LA** : Anticoagulant lupique (*lupus anticoagulant*)
- **(Anti-)La/SSb** : (*anti-)La/Sjögren's-syndrome-related antigen B (autoantibodies)*)
- **LC-MS/MS** : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (*liquid chromatography-tandem mass spectrometry*)
- **LDL** : Lipoprotéine de basse densité (*low-density lipoprotein*)
- **LN** : Néphrite lupique (*lupus nephritis*)
- **LPS** : Lipopolysaccharide
- **LC3** : *Microtubule-associated protein 1 A/1B-light chain 3*

## M

- **MCP-1** : *monocyte chemoattractant protein 1*
- **MCU** : *Mitochondrial calcium uniport*
- **MD** : Docteur en médecine (*Medicinae Doctor*)
- **MDV** : *mitochondrial-derived vesicles*

- **Mfn** : Mitofusine (*Mitofusin*)
- **MgCl<sub>2</sub>** : Chlorure de magnésium
- **MHC** : Complexe majeur d'histocompatibilité (*major histocompatibility complex*)
- **mitoMP** : Microparticule contenant une mitochondrie
- **mitoPLD** : Phospholipase D mitochondriale (*Mitochondrial phospholipase D*)
- **MLCL** : Monolysocardiolipine
- **Mm** : *Mus musculus*
- **MM** : Matrice mitochondriale (*mitochondrial matrix*)
- **MP** : Microparticules (*microparticles*)
- **MPH** : Maîtrise en santé publique (*master of public health*)
- **MPL** : Unité arbitraire de référence pour les antiphospholipides de la classe des IgM
- **MRL/lpr** : *Murphy Roths Large / lymphoproliferative*
- **MS** : Sclérose en plaques (*multiple sclerosis*) ou Spectrométrie de masse (*mass spectrometry*)
- **mtAg** : Antigène mitochondrial (*mitochondrial antigen*)
- **mtDNA** : ADN mitochondrial (*mitochondrial DNA*)
- **mtRNA** : ARN mitochondrial (*mitochondrial RNA*)
- **MSK** : Coupes histologiques d'estomac et de reins murins (*mouse stomach/kidney slides*)
- **MTT** : 3 (4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
- **MW** : Poids moléculaire (*molecular weight*)

## N

- **Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** : hydrogénophosphate de sodium
- **NaCl** : Chlorure de sodium
- **NAD** : Nicotinamide adénine dinucléotide
- **NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite
- **NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- **NAGS** : N-acetyl-glutamate synthase
- **NaHCO<sub>3</sub>** : Hydrogénocarbonate de sodium



- **NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : Dihydrogénophosphate de sodium
- **NaOH** : Hydroxyde de sodium
- **nDNA** : ADN nucléaire (*nuclear DNA*)
- **NDP52** : *Nuclear domain 10 protein 52*
- **NF-κB** : *Nuclear factor-kappa B*
- **NFP** : Peptide N-formylé (*N-formylated peptide*)
- **NH<sub>3</sub>** : Amoniac
- **NK**: *Natural killer*
- **NLRP3** : *NOD-like receptor protein 3*
- **NO**: Monoxyde nitrique (*nitric oxide*)
- **NPV**: Valeur prédictive négative (*negative predictive value*)
- **Ns**: Non-significatif (*not significant*)
- **NSF**: *N-ethylmaleimide sensitive factors*

## O

- **OAPS** : Manifestations obstétriques de l'APS (*obstetrical APS*)
- **OCR** : Taux de consommation de l'oxygène (*oxygen consumption rate*)
- **OD** : Densité optique (*optical density*)
- **OGDH** : Gène codant pour la *2-oxoglutarate dehydrogenase*
- **OPA-1** : *Optic atrophy 1*
- **OPTN** : Optineurine
- **OR** : Rapport de cotes (*odd ratio*)
- **OTC** : Ornithine transcarbamylase

## P

- **P450scc** : *Cytochrome P450scc side-chain cleavage*
- **p62** : Sequestrome-1
- **PBC** : Cirrhose (ou cholangite) biliaire primitive (*primary biliary cirrhosis/cholangitis*)

- **PBMC**: Cellule mononucléée du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cell*)
- **PCNA** : *Proliferating cell nuclear antigen*
- **PCR** : Réaction en chaîne de polymérisation (*polymerase chain reaction*)
- **pCL** : Précurseur immature de la cardiolipine (*premature cardiolipin*)
- **PBG** : Porphobilinogène
- **Pbgs** : *Porphobilinogen synthase*
- **PBS** : Tampon phosphate (*phosphate buffer saline*)
- **PD** : Maladie de Parkinson (*Parkinson's disease*)
- **PDC** : Complexe *pyruvate dehydrogenase* (*Pyruvate dehydrogenase complex*, voir aussi DLAT)
- **PDC-E2** : Sous-unité E2 du PDC (*PDC-E2 subunit*)
- **PG** : Phosphatidylglycerol
- **PGC1 $\beta$**  : *PPAR $\gamma$  co-activator 1 $\beta$*
- **PGS1** : Phosphatidylglycerolphosphate synthase
- **PGP** : Phosphatidylglycerolphosphate
- **pH** : Potentiel hydrogène
- **Pi** : Phosphate inorganique
- **PI3K** : Phosphatidylinositol 3'-kinase
- **PLA, PLC** : Respectivement , phospholipase A et -C
- **PLE** : Pseudolupus
- **PMT** : Tube photomultiplicateur (*photomultiplier tube*)
- **p-NPP** : Para-nitrophénylphosphate (*p-nitrophenol phosphate*)
- **p.o.** : Voie d'administration *per os*
- **PPAR $\gamma$**  : *Peroxisome proliferator -activated receptor -gamma*
- **PPO** : *porphyrinogen IX oxidase*
- **PPV** : Valeur prédictive positive (*positive predictive value*)
- **PRR** : *Pathogen recognition receptor*
- **PTPMT1** : *Protein-tyrosine phosphatase mitochondrial 1*
- **PTPN22** : *Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*

- **PVDF** : Polyfluorure de vinylidene

## Q

- **qPCR** : PCR quantitative (*quantitative PCR*)

## R

- **RA** : Polyarthrite rhumatoïde (*rheumatoid arthritis*)
- **RBC** : Érythrocyte / globule rouge (*red blood cell*)
- **RNA** : Acide ribonucléique (*ribonucleic acid*)
- **rRNA**: ARN ribosomique
- **(Anti-)Ro/SSa** : (*anti-Ro/Sjögren's-syndrome-related antigen A (autoantibodies)*)
- **r<sub>s</sub>** : Coefficient de corrélation de Spearman
- **RT** : Température-pièce (*room temperature*)
- **RT-PCR** : PCR avec rétrotranscription (*reverse transcription-PCR*)

## S

- **SARD-BDB** : SARD biobank and data repository (voir aussi : MRAS)
- **SD** : Déviation standard (*standard deviation*)
- **SDI** : Indice de dommage du lupus (*SLICC damage index*)
- **SDS** : Dodécylsulfate de sodium
- **SEM** : microscopie à balayage (*scanning electron microscopy*)
- **SLE** : Lupus érythémateux disséminé (*systemic lupus erythematosus*)
- **SMP** : particule submitochondriale (*submitochondrial particle*)
- **Snx** : *sorting nexin*
- **SS** : Syndrome de Sjögren (*Sjögren's syndrome*)
- **SSC** : Dispersion latérale (*side scatter*)

## T

- **TBARS** : Substances réactives à l'acide thiobarbiturique (*thiobarbituric acid reactive substances*)

- **TBHP**: *tert-butyl hydroperoxide*
- **TBS** : Tampon Tris (*Tris buffered saline*)
- **TC** : Cholesterol total (*total cholesterol*)
- **TCA** : Cycle de l'acide tricarboxylique ; aussi appelé cycle de l'acide citrique ou de Krebs (*tricarboxylic cycle*). Désigne aussi l'acide trichloroacétique (*trichloroacetic acid*)
- **TCR** : Récepteur des lymphocytes T (*T-cell receptor*)
- **TLR** : *Toll-like receptor*
- **TMB** : 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
- **TMPD** : *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine
- **TNF**: *Tumor necrosis factor*
- **tRNA** : ARN de transfert
- **TSHR** : *Thyroid stimulating hormone receptor*
- **TSPO** : *Transporter protein*

## U

- **UCP** : *uncoupling protein*
- **UL** : Université Laval
- **UTLC** : Clinique du Lupus de l'Université de Toronto (*University of Toronto Lupus Clinic*)
- **UV** : Ultra-violet

## V

- **VDAC** : *voltage-dependent anion channel*

## X

- **XTT** : 2,3 bis-(2 methoxy 4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetra-zolium-5-carboxanilide

## Liste des acronymes :

### Chiffres et nombres :

- **5-ALA** : Acide 5 aminolévulinique (*5-aminolevulinic acid*)

### A

- **ACE** : Enzyme de conversion de l'angiotensine (*angiotensin conversion enzyme*)
- **Alas** : *5-aminolevulinic acid synthase*
- **AMA** : Anticorps anti-mitochondrial (*anti-mitochondrial antibody*)
- **AMAPS**: *Anti-mitochondrial antibodies in the antiphospholipid syndrome*
- **ANA** : Anticorps anti-nucléaires (*anti-nuclear antibodies*)
- **ANOVA** : Analyse de la variance (*analysis of variance*)
- **APAF-1** : *Apoptosis protease activating factor 1*
- **APECED** : *Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*
- **apoER2'** : Récepteur 2' à l'apolipoprotéine E (*apolipoprotein E receptor 2*)
- **APRIL** : *a proliferation-inducing ligand*

### B

- **BAFF** : *B cell-activating factor of the TNF family*

### C

- **CHUL** : Centre hospitalier de l'Université Laval
- **CoQ** : Coenzyme q (ou ubiquinone)
- **COX** : *Cytochrome c oxidase*

### D

- **DAMP** : Motifs moléculaires associés au danger (*damage associated molecular patterns*)

### E

- **ELISA** : Méthode de dosage immuno-enzymatique (*enzyme-linked immunoassays*)

- **eNOS**: NOS endothéliale (*endothelial NOS*)

## F

- **FACS** : Cytométrie en flux (*fluorescence-activated cell sorting*)
- **FUN14** : *Function Unknown Now*
- **FUNDC1** : *FUN14 domain-containing protein 1*

## H

- **Hep-2** : Lignée cellulaire humaine de carcinome épithélial (*human epithelial type 2 cells*)
- **Hep-G2** : Lignée cellulaire humaine d'hépatocarcinome (*liver hepatocellular cells*)
- **HEPES** : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
- **HIF-1 $\alpha$**  : *Hypoxia-induced factor 1 alpha*

## I

- **ICAPA** : *International Congress on Antiphospholipid Antibodies*
- **iNOS** : NOS inductible (*inducible NOS*)

## J

- **JC-1** : 5,5',6,6'- tetrachloro-1,1',3,3'tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide
- **JNK** : *c-Jun Kinase* (i.e., prononcé "junk")

## M

- **mAb** : Anticorps monoclonal (*monoclonal antibody*)
- **MAS** : *Mitochondrial assay solution*
- **MAVS** : *Mitochondrial antiviral-signaling protein*
- **MIM** : Membrane mitochondriale interne (*mitochondrial inner membrane*)
- **MOM** : Membrane mitochondriale externe (*mitochondrial outer membrane*)
- **MOPS** : Acide 3-morpholino-1-propanesulfonique
- **mtDAMP** : DAMP mitochondriaux (*mitochondrial DAMP*)
- **MRAS** : Maladies rhumatismales auto-immunes systémiques (voir aussi : SARD)
- **mTOR** : *Mammalian target of rapamycin*

- **mTORC1** : *mTOR – complex 1*
- **mtROS** : ROS mitochondriales (*mitochondrial ROS*)
- **MyD-88** : *Myeloid differentiation primary response 88*

## N

- **NEB** : *New England Biolabs*
- **NFAT** : *Nuclear factor of activated T cells*
- **NETs** : *Neutrophil extracellular traps*
- **NOMA** : Anticorps naturels anti-mitochondriaux (*naturally occurring mitochondrial antibodies*)
- **NOS** : *Nitric oxide synthase*

## P

- **PAPS** : APS primaire (*primary APS*)
- **PINK1** : *PTEN-induced putative kinase 1*
- **PTEN** : *Phosphatase and tensin homolog*

## R

- **REB** : Comité d'éthique (*research ethics board*)
- **ROC** : Fonction d'efficacité du récepteur (*receiver operating characteristic*)
- **ROS** : Espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*)

## S

- **SAPS** : APS secondaire (*secondary APS*)
- **SAS** : *Statistical analysis system*
- **SARD** : Maladie auto-immune (*systemic autoimmune rheumatic disease*)
- **SLEDAI-2K** : Indice d'activité du lupus (*systemic lupus erythematosus disease activity index 2000*)
- **SLICC** : *Systemic lupus erythematosus international collaborating clinics*
- **SNAP** : *NSF attachment protein*
- **SNARE** : *NSF attachment receptor*

- **SNP** : Polymorphismes ponctuels (*single nucleotide polymorphisms* – prononcé « snip »)
- **SORP** : *Special order research product*
- **StAR** : *Steroidogenic acute regulatory protein*
- **STING** : *Stimulator of interferon genes*

## **T**

- **TACI**: *transmembrane activator and calcium modulating cyclophilin ligand interactor*
- **Taf1** : Tafazzine
- **Tam41** : *translocator assembly and maintenance protein 41*
- **TAPS** : Manifestations thromboemboliques de l'APS (*thrombotic APS*)
- **TEM** : Microscopie électronique à transmission (*transmission electron microscopy*)
- **TFAM** : *Mitochondrial transcription factor A*
- **TOMM22** : *translocase of the outer membrane 22*
- **TRAPS** : *TNFR1-associated periodic syndrome*
- **Tris** : trisaminométhane



*À tous ceux qui m'ont permis de me rendre jusqu'ici – la liste est trop longue ;*

*Si tu lis ces lignes, merci. Si tu ne les lis pas... merci quand même !*

*À toi papa, et à vous, tous les proches qui nous ont quittés.*

*La vie c'est du théâtre et des souvenirs,  
Mais nous sommes opiniâtres à ne pas mourir  
À traîner sur les berges, venez voir  
On dirait Jane et Serge sur le pont des Arts*

Alain Souchon *in* Rive Gauche (Au ras des pâquerettes. Virgin France, 1999)

## Remerciements

Pour commencer, je souhaite remercier le Dr. Éric Boilard pour m’ avoir permis de continuer ce beau projet au doctorat après m’ avoir guidé au travers des difficultés de la maîtrise. J’ adresse aussi des remerciements chaleureux au Dr. Paul Fortin qui, au travers de son mentorat et par sa gentillesse a grandement contribué à l’ expertise que j’ ai pu développer sur le lupus et le syndrome des antiphospholipides. Leur encadrement a été un précieux outil qui a permis à ce projet d’ être aussi fructueux !

Un merci tout particulier pour la Dre. Émmanuelle Rollet-Labelle, son soutien, sa patience et sa gentillesse pour avoir écouté toutes mes doléances et pour avoir été d’ une précieuse aide dans le développement de l’ isolation des mitochondries, le développement des ELISA-AwMA et dans la gestion de la cohorte SLICC et des webinaires. Merci aussi à Tania Lévesque pour toute son aide ainsi que nos discussions pendant ces six années. Enfin, j’ aurais une pensée pour le reste de l’ équipe – présente ou passée : Isabelle, Nathalie, Anne, Myriam, Marie, Étienne, Sara, Julie, Hadrien et Joannie. Vous avez tous participé, au travers de nos échanges – personnels ou professionnels – à me faire devenir le scientifique que je suis aujourd’ hui. Merci à nos collaborateurs, notamment Anne-Sophie, le Dr. Guy Poirier et Jean-Philippe pour leur contribution. Merci aussi aux partenaires comme la Société de l’ Arthrite ou le FRQS pour leur soutien à la recherche. Enfin, un grand merci aux patients qui donnent littéralement d’ eux-mêmes pour faire avancer la science !

Une pensée à Pierre Borgeat qui, malgré son absence, m’ a indirectement aidé à rencontrer Camille. Bien sûr, mon quotidien depuis cinq ans serait bien moins doux sans la CroustiMouf, Obi et Guigui qui m’ accompagnent dans les frustrations comme dans les victoires. Une pensée à nos familles – de sang et de cœur ; à toi maman, qui se fait du souci pour moi qui suis « si loin », à Laetitia, Florence, Élise, Isa, Daniel, J-P, aux familles Gourdeau et Fruteau De Laclos, à Arthur-Loup, Hélène, Luce et la famille Kautzmann. J’ ai beaucoup de chance de vous avoir, merci de m’ avoir transmis le goût de l’ excellence tout en étant le phare vers lequel je peux me diriger dans le gros temps.

Les amis aident à rendre le quotidien plus tolérable. À toi, Abde. Pendant ces quatre ans de colloc', tu as été un ami, un confident, un scientifique de talent et une source d'émulation. On a fêté nos victoires et traversé les moments de doutes ensemble. Et toi, Arthur-Loup, mon ami, mon frère. Je regrette que la pandémie m'ait empêché d'être à tes côtés pour certains événements marquants de ta vie, mais je sais que notre lien perdure et me réjouis de vous revoir bientôt, Lucie et toi. Par ailleurs, je suis heureux que vous vous soyez rencontrés. Tous mes vœux de bonheur !

Un grand merci aux amis d'ici : Andréa, Antho, Patate, Aurélie, Juju, Mathieu (B) ainsi qu'aux amis qui sont loin ; Félix, Geneviève, Pépito, Martin, Mathieu (W), Stephan, Vy. Pour notre amitié, notre entraide, nos discussions, nos moments de détente; je vous aime tous! Il y a aussi les rencontres contribuent à changer la façon dont on perçoit le monde. Merci au Dr. Sena Hideaki et aux éditions Kadokawa et à Square, Co., Ltd. pour avoir fait naître mon intérêt pour la mitochondrie. Merci à Étienne Grandmaison et aux communautés des « Douteux » (de Québec ET d'ailleurs) et des « Geeks contre-attaquent » qui m'ont permis de m'acclimater à la culture Québécoise et ont longtemps participé à animer mes semaines. Un merci tout particulier à Tommy Gaudet pour le divertissement de qualité qu'il nous offre au travers de l'organisme « Douteux.org » et pour m'avoir donné l'occasion de participer au « Le Tour d'Y Voir » ainsi qu'aux « Merconspis ». Ses valeurs et celles de l'organisme sont de précieux outils de sensibilisations du grand-public sur des enjeux qui vont de la culture aux sciences; elles ont contribué – bien plus que ce que je n'aurais pu l'imaginer – à être un meilleur scientifique et à façonner mes aptitudes de vulgarisation. Merci aussi à Mathieu (G) pour ses belles valeurs ainsi que pour me donner la parole quasiment à chaque semaine sur sa chaîne. Enfin, une pensée pour les membres du « 2078 », nos discussions ont contribué à améliorer la qualité de mes travaux. Je regrette que nos chemins se soient séparés ainsi...

Une pensée émue pour Mireille, Alexandre, René (C), René (H), Véronique et tous ceux qui nous ont quittés.

Enfin, toi qui lis ces lignes, si ton nom n'apparaît pas dans ces lignes, saches que je ne t'ai pas oublié mais je n'ai pas autant de place sur le papier que dans mon cœur pour tous ceux qui me sont chers.

# Avant-propos

## État de publication, modifications et références, par chapitre

Quatre chapitres sont inclus dans la présente thèse ; ils correspondent à autant de manuscrits que j'ai soumis et/ou pu faire publier durant mon doctorat en tant que premier auteur. Ils ont tous été inclus, sans autres modifications par rapport aux versions soumises aux journaux que des modifications de mise en forme pour correspondre aux recommandations de la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales de l'Université Laval (e.g., ordres et numérotation des sections, homogénéisation des tables, regroupement des bibliographies en une section unique).

### **Chapitre 1 : Détection des autoanticorps anti-mitochondriaux chez des patients atteints de lupus érythémateux disséminé et association avec les manifestations cliniques de la maladie :**

**Yann LC Becker**, Renée-Claude Loignon, Anne-Sophie Julien, Geneviève Marcoux, Isabelle Allaëys, Tania Lévesque, Emmanuelle Rollet-Labelle, Hadrien Benk-Fortin, Nathalie Cloutier, Imène Melki, Lihi Eder, Éric Wagner, Martin Pelletier, Hassan El Hajj, Marie-Ève Tremblay, Clémence Belleannée, Marie-Josée Hébert, Mélanie Dieudé, Joyce Rauch, Paul R. Fortin, et Éric Boilard (2019). "*Anti-mitochondrial autoantibodies in systemic lupus erythematosus and their association with disease manifestations.*" *Sci Rep* 9(1): 4530.

**Réception** : 5 octobre 2017. **Acceptation** : 21 janvier 2019. **Publication** : 14 mars 2019

**PMID**: [30872710](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30872710/), **PMCID**: [PMC6418244](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6418244/), **DOI**: [10.1038/s41598-019-40900-3](https://doi.org/10.1038/s41598-019-40900-3)

### **Chapitre 2 : Les patients atteints de lupus érythémateux disséminé expriment des autoanticorps circulants autoanticorps dirigés contre l'ARN mitochondrial.**

**Yann LC Becker**, Geneviève Marcoux, Isabelle Allaëys, Anne-Sophie Julien,

Renée-Claude Loignon, Hadrien Benk-Fortin, Emmanuelle Rollet-Labelle, Joyce Rauch, Paul R. Fortin et Éric Boilard. (2019). "Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus Target Mitochondrial RNA." *Front Immunol* 10: 1026.

**Réception :** 15 janvier 2019. **Acceptation :** 23 avril 2019. **Publication :** 10 mai 2019

**PMID:** [31134086](#), **PMCID:** [PMC6524553](#), **DOI:** [10.3389/fimmu.2019.01026](#)

**Chapitre 3 : Étude pilote – détection des anticorps anti-mitochondriaux dans le cadre du syndrome des antiphospholipides.** Yann LC Becker, Anne-Sophie Julien, Alexandra Godbout, Éric Boilard, Paul R. Fortin. (2020). "Pilot study of anti-mitochondrial antibodies in antiphospholipid syndrome." *Lupus* 29(12): 1623-1629.

**Réception :** 30 mars 2020. **Acceptation :** 02 juillet 2020. **Publication :** 12 août 2020

**PMID:** [32787553](#), **DOI:** [10.1177/0961203320944481](#)

**Chapitre 4 : Identifications des protéines mitochondriales et des facteurs associés aux anticorps anti-mitochondriaux dans le lupus érythémateux disséminé.** Yann LC Becker, Jean-Philippe Gagné, Anne-Sophie Julien, Tania Lévesque, Isabelle Allaëys, Nadine Gougéard, Vicente Rubio, François-Michel Boisvert, Dominique Jean, Éric Wagner, Guy G. Poirier, Paul R. Fortin et Éric Boilard. (2022). "Identification of mitofusin 1 and complement component Iq subcomponent binding protein as mitochondrial targets in systemic lupus erythematosus". *Arthritis Rheumatol*.

**Réception :** 28 juin 2021. **Acceptation :** 01 février 2022. *Sous presse.*

**PMID:** [35128841](#), **DOI:** [10.1002/art.42082](#)

## **Statut d'auteur et co-auteurs, contributions respectives, et informations additionnelles :**

Les travaux inclus dans la présente thèse ont été encadrés par le Dr. Éric Boilard en sa qualité de directeur de recherche. Le Dr. Paul R. Fortin a aussi participé de façon importante en tant que mentor et au travers de son expertise clinique.

J'ai conçu les expériences des **chapitres 1 à 4** en collaboration avec les Drs. Boilard et Fortin. J'ai mis au point et optimisé les expériences d'isolation et d'oxydation des mitochondries et de leurs acides nucléiques avec l'aide des Dres. Emmanuelle Rollet-Labelle (**Chapitre 1**) et Isabelle Allaëys (**Chapitres 1 et 2**). J'ai réalisé les expériences de contrôle-qualité (i.e., immunobuvardage, électrophorèse sur gel d'agarose, qPCR, DLS, **Chapitre 1**) des échantillons de mitochondries, les expériences de détection des anticorps anti-mitochondriaux (**Chapitres 1 à 4**) ainsi que l'obtention des échantillons étudiés en spectrométrie de masse (**Chapitre 4**). Les modèles animaux ont principalement été manipulés par Mlle. Tania Lévesque et la Dre. Geneviève Marcoux (**Chapitres 1 à 4**). La Dre. Imène Melki a acquis le cliché de microscopie électronique (**Chapitre 1**) et Dre. Isabelle Allaëys, le cliché de microscopie confocale (**Chapitre 4**). Les expériences de cytométrie de flux (**Chapitre 1**) ont été réalisées par les Dres. Nathalie Cloutier et Isabelle Allaëys. Le Dr. Jean-Philippe Gagné a procédé à l'identification des cibles protéiques des anticorps anti-mitochondriaux par spectrométrie de masse (**Chapitre 4**) ainsi qu'à l'analyse des données obtenues. Les données biostatistiques ont été traitées en collaboration avec Mlles. Renée-Claude Loignon (**Chapitre 1**) et Anne-Sophie Julien (**Chapitres 1 à 4**), sous la supervision des Drs. Boilard et Fortin.

Les manuscrits présentés ont été écrits par moi-même ou en collaboration avec la Dre. Marcoux (**Chapitre 2**), sous la supervision des Drs. Boilard et Fortin, puis révisés par l'ensemble des auteurs.

Ont contribué par leurs aides, expertises, la mise à disposition de réactifs ou de matériel :

|                           |                          |                          |                  |
|---------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------|
| Dre. Mélanie Dieudé,      | Dre. Joyce Rauch,        | Dre. Lihi Eder,          | Dr. Éric Wagner, |
| Dr. Martin Pelletier,     | M. Hassan El Hajj,       | Dre. Marie-Ève Tremblay, |                  |
| Dre. Clémence Belleannée, | Dre. Marie-Josée Hébert, | Dre. Caroline Gilbert,   |                  |

M. Hadrien Benk-Fortin, Mme Nadine Gougeard, Dr. Vicente Rubio, Dr. François-Michel Boisvert, Dr. Dominique Jean, Dr. Guy G. Poirier.

L'article inclus dans le **chapitre 3** a été récompensé par une bourse de l'*APS Foundation of America* au cours de l'édition 2019 de l'*International Congress on Antiphospholipid Antibodies* (i.e., ICAPA 2019. Manchester, Royaume-Uni) et a été classé parmi le [Top-10 des avancées de la recherche en 2020 de la Société de l'Arthrite](#). Les résultats de l'étude présentée au **chapitre 4** ont fait l'objet d'un dépôt de demande de brevet – *Methods and kits for diagnosing systemic autoimmune rheumatic diseases*. (N°63/202,080. Eric Boilard, Paul R. Fortin, Yann LC Becker. May 26th 2021).



# Introduction

## Rôles métaboliques de la mitochondrie et impact de leurs dysfonctions

La mitochondrie est une organelle essentielle au bon fonctionnement des cellules eucaryotes. Elle est au centre de plusieurs voies métaboliques dont les potentielles dysfonctions sont impliquées dans les physiopathologies de nombreuses maladies. Cette section présentera les différents rôles de la mitochondrie et leurs implications dans l'établissement d'une réponse immunitaire normale, puis leurs dysfonctions avec une emphase spéciale sur les troubles du système immunitaire et sur l'auto-immunité.

### Généralités sur la mitochondrie.

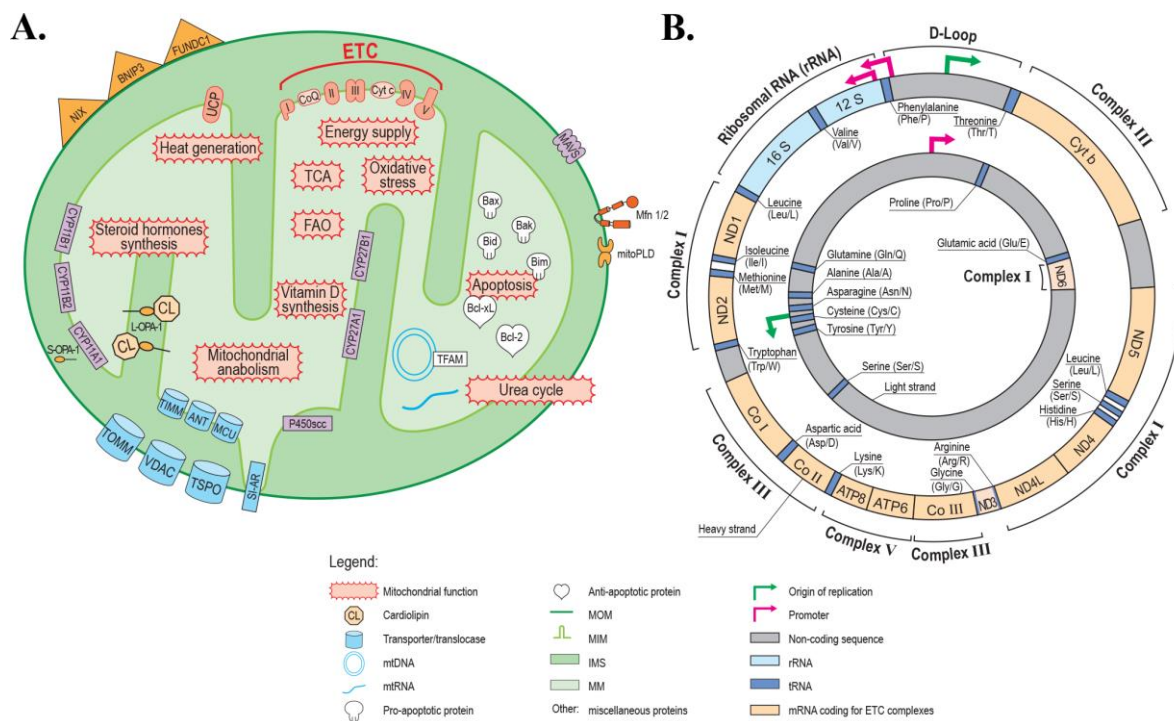
Le terme "mitochondrie" est un mot-valise utilisé pour la première fois durant le XIX<sup>e</sup> siècle par le microbiologiste Allemand Carl Benda. Cette dénomination est constituée de deux mots grecs, issus de l'observation de la morphologie de l'organelle en microscopie optique (**Figure 1A**) – des corpuscules allongés comme un fil (*mitos*) ou arrondis comme des granules (*khondrion*)<sup>6</sup>. Ce terme soulignant la grande diversité morphologique du réseau mitochondrial de la cellule (aussi appelé masse mitochondriale. **Figure 2**), constitué d'un ensemble de corpuscules de tailles et de formes variées, selon les besoins métaboliques de la cellule. Sur le plan structurel, la mitochondrie est délimitée par deux bicouches phospholipidiques ; la membrane mitochondriale externe en périphérie (*mitochondrial outer membrane*, MOM) et, à l'intérieur, par la membrane mitochondriale interne (*mitochondrial inner membrane*, MIM). Ces deux membranes délimitent deux compartiments : l'espace intermembranaire (*intermembrane space*, IMS) et la matrice mitochondriale (*mitochondrial matrix*, MM).

Les deux membranes mitochondriales présentent des caractéristiques physiologiques distinctes. La semi-perméabilité de la MOM est propice à la diffusion libre d'ions et de protéines poids moléculaire (*molecular weight*, MW) inférieur à 5 kiloDaltons (kDa) <sup>7</sup>, permettant ainsi la ségrégation des composantes mitochondriales du reste du cytoplasme. Les protéines de plus haut MW, synthétisées dans le cytoplasme à partir de l'ADN nucléaire (nDNA) seront acheminées dans ou au travers de la MOM à l'aide de protéines chaperonnes et d'un système de transporteurs complexes (*translocase of the outer membrane*, TOMM). La MIM, quant à elle, est étanche et plus riche en protéines que la MOM <sup>8</sup>. La MIM est caractérisée par une surface plus importante et caractérisée par des invaginations nommées crêtes mitochondriales (*cristae*) où sont localisées les protéines impliquées dans le transport des électrons et la phosphorylation oxydative (OxPhos). L'espace intermembranaire comporte principalement des protéines impliquées dans le transport des électrons [e.g., le cytochrome c (Cyt c)]. La matrice mitochondriale concentre les biomolécules impliquées dans diverses voies métaboliques, ainsi que de multiples copies d'un génome extranucléaire (i.e., *mitochondrial DNA*, mtDNA) ainsi que les cofacteurs nécessaires à la réplication et à la transcription de ce génome.

À l'instar de leur morphologie, la taille du réseau mitochondrial d'une cellule est très variable selon ses besoins métaboliques ; de 4, jusqu'à 2,000 organelles par cellules. Les organes les plus riches en mitochondries sont le foie, les reins, le cœur et le cerveau <sup>9</sup>. Le protéome mitochondrial humain est actuellement estimé entre 1,100 et 1,900 protéines <sup>10</sup> dont une vaste majorité est codée par le noyau, puis importée à la mitochondrie. Le mtDNA code cependant 37 gènes dont la transcription (i.e., en ARN mitochondriaux – *mitochondrial RNA*, mtRNA) peut être à l'origine de près de 30 % des ARN messagers (*messenger RNA*, mRNA) totaux des cellules composant des tissus à fortes activités métaboliques <sup>11,12</sup> (**Figure 1B**).

Le consensus actuel concernant l'origine de la mitochondrie est que l'organelle proviendrait d'une endosymbiose entre une  $\alpha$ -protéobactérie et une cellule eucaryote primitive, comme suggéré par la similarité entre le mtDNA et le génome de *Rickettsia prowazekii* – bactérie moderne et pathogène à l'origine du typhus exanthématique <sup>13</sup>.

Les mitochondries permettent la synthèse de biomolécules nécessaires à diverses fonctions cellulaires et sont le siège de différentes réactions métaboliques et/ou servent de plateforme permettant diverses voies biologiques. La cellule est à même de pouvoir adapter la taille et la complexité de sa masse mitochondriale afin de répondre de façon optimale aux besoins métaboliques du tissu <sup>14</sup> (**Figure 2**).



**Figure 1. Généralités sur la mitochondrie.**

(A) Bien que la mitochondrie soit principalement connue pour son rôle dans le métabolisme énergétique (*energy supply*) ainsi que pour leur contribution à l'apoptose (*apoptosis*), toutefois, l'organelle est impliquée dans de nombreuses autres voies métaboliques.

(B) Le génome mitochondrial est constitué d'un ADN double brin circulaire (mtDNA) de 16,569 paires de bases à îlot CpG hypométhylés et codants pour 37 gènes. *Figure modifiée à partir de Becker, Y. L. C., Duvvuri, B., et al. Nat Rev Rheumatol. (2019). En révision (N° de dossier NRR-22-017V1)*

## **La masse mitochondriale – un réseau en remodelage permanent**

Le réseau mitochondrial est constitué d'une multitude de mitochondries individuelles. Des organelles éparses sont capables de se rassembler en un réseau réticulé (i.e., fusion). Ce processus permet d'homogénéiser le contenu de la matrice du réseau mitochondrial ainsi que d'augmenter les tailles des surfaces des membranes mitochondriales. Le mécanisme de complémentation génétique, où du mtDNA endommagé provenant d'une organelle défectueuse sera dilué parmi les copies de la masse mitochondriale – prévenant ainsi l'expression de protéines mitochondriales aberrantes <sup>15</sup>. De même, cette redistribution des protéines matricielles permet de réprimer le déclenchement de la mort cellulaire programmée par apoptose lorsque les nutriments sont peu abondants dans le milieu <sup>16</sup>. Toutefois, l'influence de la fusion sur l'apoptose reste controversée – d'autres études indiquant des interactions entre des protéines pro-apoptotiques avec la machinerie moléculaire permettant la fusion mitochondriale <sup>17</sup>. L'augmentation de la surface de la MIM permettra réguler positivement la phosphorylation oxydative <sup>18</sup>. Sur le plan mécanique, la taille d'un réseau fusionné permet de prévenir sa dégradation en étant trop volumineux pour permettre la formation de l'autophagosome, permettant le recyclage des mitochondries *via* la voie de la mitophagie, une forme d'autophagie spécialisée <sup>19</sup>. La fission de la masse mitochondriale permettra d'exercer un effet opposé à la fusion, permettant la fragmentation du réseau. Les mitochondries-filles ainsi générées pourront être redistribuées au sein du cytoplasme <sup>20,21</sup>. La ségrégation de biomolécules défectueuses au sein d'organelles isolées permettra leur clairance par mitophagie.

### **Voies biologiques assurant la plasticité du réseau mitochondrial.**

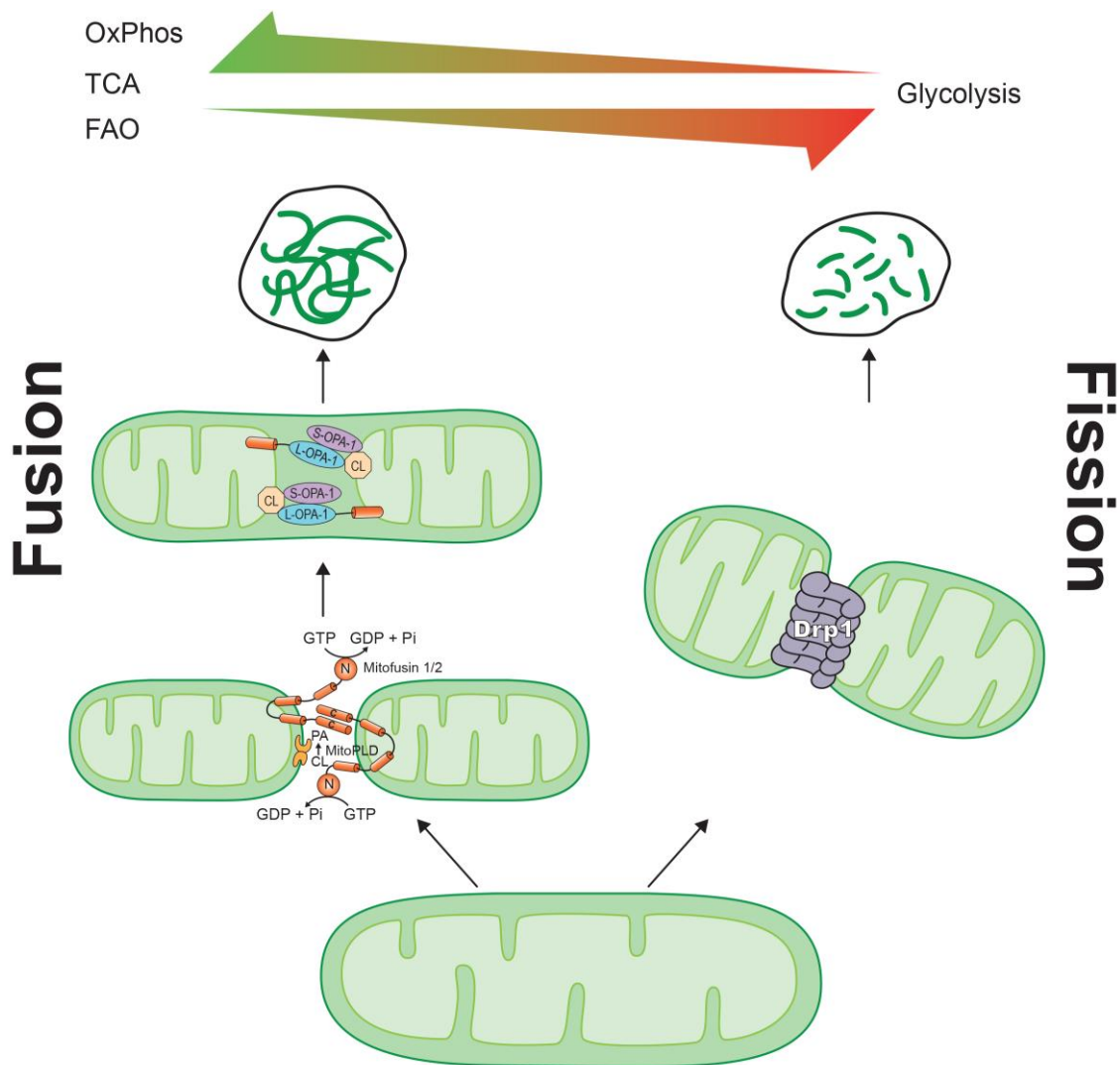
**La fusion, un mécanisme permettant d'augmenter la surface membranaire du réseau mitochondrial :** L'assemblage de plusieurs mitochondries se fait selon la séquence d'évènements suivante : les organelles entrent d'abord en contact, fusionnent leurs MOM puis leurs MIM <sup>22</sup>. Les protéines de la famille des mitofusines (*Mitofusin*, Mfn1 et 2) <sup>23</sup> sont ancrées à la MOM par le domaine transmembranaire situé à leur extrémité C-terminale.

De l'autre côté, l'amarrage de deux mitochondries se fera par la formation d'un dimère médiée par l'activité guanosine triphosphatase (GTPase) des extrémités N-terminales. De par son origine bactérienne, la mitochondrie est caractérisée par la présence d'un phospholipide spécifique, la cardiolipine, au sein de la MIM. La cardiolipine pourra être exportée dans la MOM, au cours de la fusion afin d'exercer un rôle de régulateur négatif de ce mécanisme, toutefois, la phospholipase D mitochondriale (mitochondrial phospholipase D, mitoPLD) pourra hydrolyser la cardiolipine en acide phosphatidique, capable de promouvoir la fusion en facilitant les interactions transmitochondriales ainsi que certaines voies de signalisation spécifiques aux phospholipides <sup>24-26</sup>. La fusion des MIM est assurée par une protéine de la superfamille de la dynamine, *Optic atrophy 1* (OPA-1). Le variant long d'OPA-1 (*long OPA-1*, L-OPA-1) permet la fusion des MIM par reconnaissance de la cardiolipine localisée dans la membrane en *trans*. Cette interaction sera stabilisée par le variant court d'OPA-1 (*short OPA-1*, S-OPA-1. **Figure 2, partie de gauche**) <sup>27,28</sup>. OPA-1 est par ailleurs impliquée dans l'organisation des crêtes mitochondriales <sup>29</sup>.

**La fission, un mécanisme permettant la ségrégation des composants mitochondriaux :**

À l'opposé de la fusion, la fission permettra de fractionner une mitochondrie-mère en plusieurs mitochondries-filles de plus petite taille. Ce mécanisme s'accompagne d'un contrôle du cargo de chacune des sous-structures produites. Ce qui permettra, par exemple, de charger une mitochondrie-fille en biomolécules dysfonctionnelles (e.g., mtDNA muté, protéines oxydées ou mal repliées, phospholipides oxydés) afin de les dégrader par le truchement de la voie de la mitophagie. Les sites de contact avec le réticulum endoplasmique (*endoplasmic reticulum*, ER) ainsi que le cytosquelette d'actine constituent des sites à la surface de la mitochondrie, propice à la fission <sup>30,31</sup> via la polymérisation annulaire de la *dynamin-related protein 1* (Drp1). L'hydrolyse du GTP par la protéine induira un changement conformationnel de Drp1 résultant en la constriction en goulot d'étranglement puis en la formation des mitochondries-filles <sup>32,33</sup> (**Figure 2, partie de droite**).

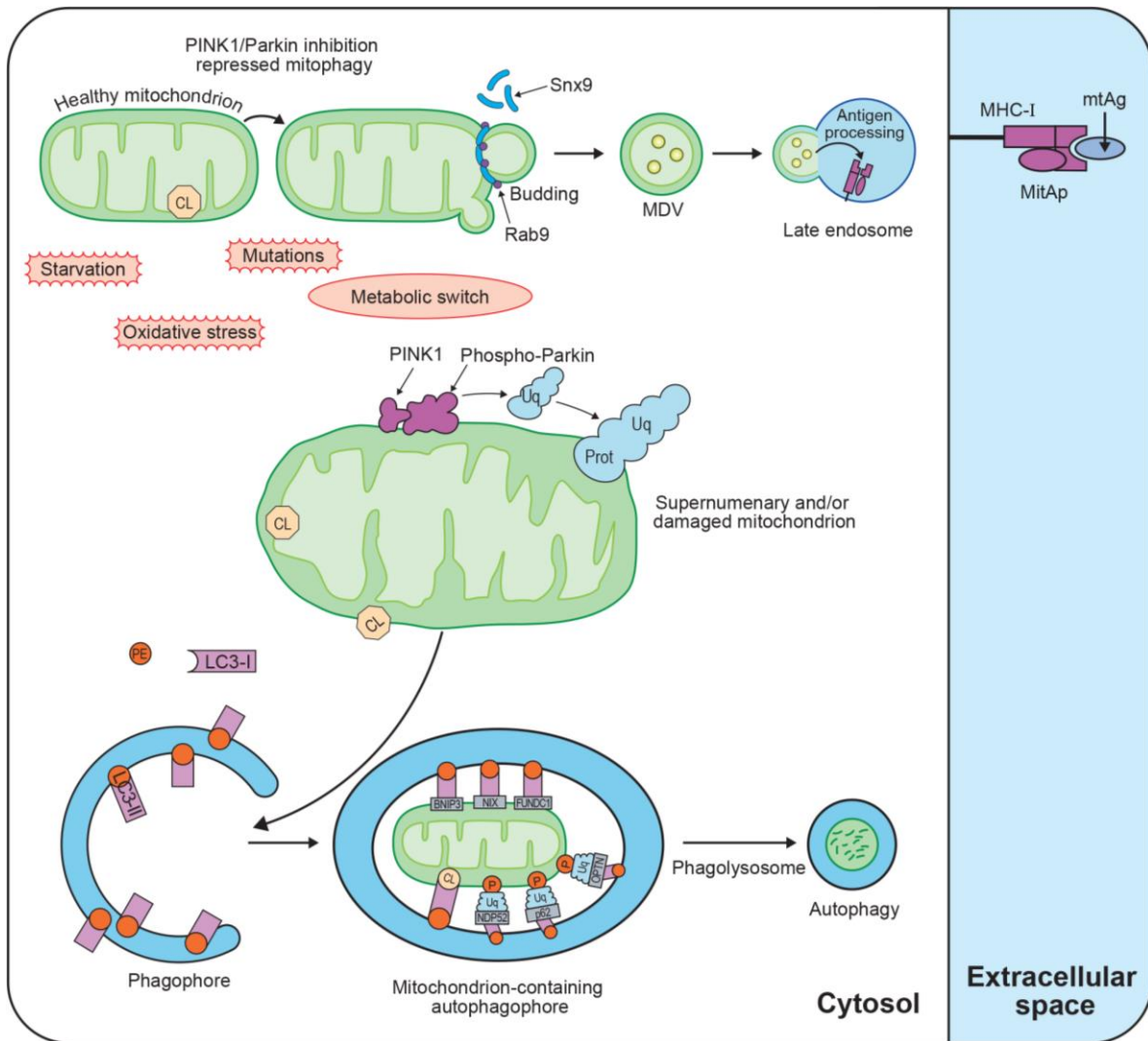
**L'autophagie – une voie non-spécifique de dégradation des éléments intracytoplasmiques :** L'autophagie est un processus au cours duquel un système protéique complexe composé de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) et de membres des familles de protéines *ubiquitin-like* formera une évagination membranaire au niveau de l'ER (i.e., le phagophore). Un second système comprenant la *microtubule-associated protein 1 A/1B-light chain 3* (LC3) ainsi que différents membres de la famille des *autophagy-related gene* (Atg) contribuera à la fusion des marges de l'évagination membranaire en une structure vésiculaire à double membrane (i.e., l'autophagosome), puis à sa maturation<sup>34,35</sup>. L'autophagosome sera ensuite acheminé, pour dégradation, à destination du phagolysosome<sup>36-38</sup>.



## **Figure 2. Régulation de la structure du réseau mitochondrial par la dynamique de fusion et de fission.**

(Gauche) La fusion de deux mitochondries distinctes se fait en deux temps ; tout d'abord par la fusion des membranes externes à l'aide des mitofusines 1 et 2 (Mfn 1/2), puis par la fusion des membranes internes, via la reconnaissance de la cardiolipine (CL) par les variants de la protéine *Optic atrophy 1* (OPA-1). (Droite) La fragmentation du réseau mitochondrial est assurée par l'assemblage de la *dynamin-related protein 1* (Drp1) à la surface de l'organelle, puis la constriction de cette structure en deux mitochondries-filles. *Figure modifiée à partir de Becker, Y. L. C., Duvvuri, B., et al. Nat Rev Rheumatol. (2019) En revision (N° de dossier NRR-22-017V1)*

**La mitophagie – une voie de dégradation spécifique à la mitochondrie :** La mitophagie emprunte les mécanismes généraux de l'autophagie (**Figure 3**); les mitochondries défectueuses et/ou surnuméraires sont séquestrées au niveau de l'autophagosome à l'aide de LC3<sup>39</sup>, qui sera ensuite clivée par Atg4, puis conjugué au phosphatidyl ethanolamine (PE) pour former LC3-II<sup>40</sup>. La serine-thréonine kinase *phosphatase and tensin homolog* (PTEN)-*induced putative kinase 1* (PINK1) est constitutivement importée à la surface de la MOM pour y être digérée. Lorsque la mitochondrie est endommagée, la dégradation de PINK1 n'est plus assurée, menant à son accumulation sur la MOM<sup>41,42</sup> puis entrainera la phosphorylation de la Parkine et l'activation de sa fonction d'ubiquitine-ligase E3. Différentes protéines de la MOM pourront être ubiquitinylées par la Parkine, puis s'assembler avec des protéines telles que la *nuclear domain 10 protein 52* (NDP52), l'optineurine (*optineurin*, OPTN) et le sequestrome-1 (p62), en complexes adaptateurs permettant le pontage des résidus ubiquitinylés avec LC3-II. Les lipides exprimés à la surface des mitochondries endommagées (e.g., la cardiolipine)<sup>43</sup> peuvent aussi se lier à LC3-II. Il existe d'autres adaptateurs pour LC3-II tels que la *NIP3-like protein X* (NIX), la *BCL2 interacting protein 3* (BNIP3) et la *FUN14 domain-containing protein 1* (FUNDC1) qui permettent de moduler la mitophagie indépendamment du couple PINK1/Parkine (*Parkin*) durant le développement embryonnaire et l'adaptation métabolique<sup>44-46</sup>.



**Figure 3. Dégradation des mitochondries surnuméraires et/ou endommagées par la voie de la mitophagie et présentations des antigènes mitochondriaux (mitAP).**

Lorsque les besoins métaboliques de la cellule nécessitent une diminution de la masse mitochondriale ou que le réseau mitochondrial est endommagé, les organelles à dégrader empruntent une forme spécialisée d'autophagie, la mitophagie, à l'aide de protéines adaptatrices. Par ailleurs, l'autophagie exerce une action inhibitrice sur l'émission de vésicules (*mitochondrial-derived vesicles*, MDV) permettant l'expression d'antigènes mitochondriaux (mtAg) associés au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC-I). *Figure modifiée à partir de Becker, Y. L. C., Duvvuri, B., et al. Nat Rev Rheumatol. (2019). En révision (N° de dossier NRR-22-017V1)*



## Dynamique mitochondriale et réponse immunitaire normale

La masse mitochondriale des cellules immunitaires s'adapte selon leur fonction, dépendamment de leurs besoins bioénergétiques, de leur métabolisme, ainsi que de la disponibilité des nutriments dans le milieu <sup>47</sup>. Les macrophages ont la capacité de se polariser en macrophages pro- ou anti-inflammatoires (i.e., désignés respectivement macrophages M1 et M2). Les macrophages de type M2 sont caractérisés par une masse mitochondriale accrue, par rapport à leurs homologues proinflammatoires <sup>48</sup>.

Les cellules polynucléaires neutrophiles activées (abrégées en « neutrophiles ») sont capables de relarguer dans le milieu extracellulaire un filet d'ADN et de protéines aux propriétés antibactériennes (i.e., *neutrophil extracellular traps*, NETs). Ce mécanisme est dépendant d'une voie métabolique impliquant OPA-1, permettant la production de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) – molécule nécessaire à la production d'adénosine triphosphate (ATP) par la voie de la glycolyse <sup>49</sup> [i.e., cette voie étant favorisée par les neutrophiles activés, en leur qualité de cellules résidentes des tissus où la biodisponibilité du dioxygène (O<sub>2</sub>) est réduite]. En plus de son rôle dans la fusion, la protéine Mfn 1 est impliquée dans la régulation de la production d'interféron (IFN). Toutefois son rôle reste encore mécompris avec des études indiquant une régulation positive de par l'association de Mfn 1 avec les protéines antivirales mitochondriales (*mitochondrial antiviral-signaling*, MAVS) <sup>50</sup>, ou négativement en inhibant le stimulateur des gènes de l'interféron (*stimulator of interferon genes*, STING) <sup>51</sup>.

Les cellules dendritiques (*dendritic cells*, DC) présentent un accroissement de leur masse mitochondriale lors de leur différenciation <sup>52</sup> ainsi que lors de l'induction de la tolérance immunitaire <sup>53</sup>. Ce remodelage est induit *via* la voie métabolique du *proliferator-activated receptor-γ* (PPAR $\gamma$ ) *co-activator 1β* (PGC1 $\beta$ ) <sup>48</sup>.

Les lymphocytes T effecteurs (T<sub>eff</sub>) présentent en général une masse mitochondriale accrue, fragmentée avec un faible nombre de crêtes. À l'instar des neutrophiles, cette morphologie oriente le métabolisme énergétique de la cellule vers la voie de la glycolyse aérobie afin de pallier les conditions hypoxiques des tissus<sup>54</sup>. À l'inverse, les cellules T mémoire (T<sub>m</sub>) présentent un réseau mitochondrial hyperfusionné, orientant le métabolisme énergétique

vers la production d'ATP par l'OxPhos<sup>47</sup>. La dynamique mitochondriale peut aussi venir en soutien aux fonctions des cellules immunitaires activées. Ainsi, dans les T<sub>eff</sub> spécifiques d'antigène et les cellules *natural killer* (NK), la fission mitochondriale permet la migration de mitochondries-filles à destination de la synapse immunitaire<sup>20,21</sup>. Enfin, la masse mitochondriale est accrue dans les lymphocytes T activés et durant la commutation de classe des lymphocytes B; toutefois, cette masse diminue lors de la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes<sup>55</sup>.

### **Physiopathologie des dysfonctions de la dynamique mitochondriale**

La plasticité du réseau mitochondrial étant un élément important permettant l'adaptation du métabolisme mitochondrial aux changements de besoins des cellules, la majorité des pertes de fonctions totales touchant des protéines de la dynamique mitochondriale sont embryolétales. Toutefois, les mutations viables des protéines de la dynamique mitochondriale sont associées à de nombreuses conditions, et notamment aux maladies neurodégénératives.

Dans un modèle de souris chimérique exprimant des fibroblastes déficients pour la mitofusine, la morphologie du réseau mitochondrial présente des morphologies spécifiques selon le type de mitofusine muté ; la suppression de Mfn1 aboutissant à un réseau mitochondrial généralement fractionné alors que les cellules déficientes pour Mfn2 sont caractérisées par la présence de mitochondries sphériques<sup>23</sup>. Chez l'humain, les mutations de Mfn2 sont associées à la maladie de Charcot-Marie-Tooth ainsi qu'à des neuropathies sensitivo-motrices héréditaires<sup>56-58</sup>. Les mutations de la protéine OPA-1 sont associées à différentes atrophies optiques<sup>59,60</sup> ainsi qu'à une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS) chez les patients souffrants de sclérose en plaques (*multiple sclerosis*, MS)<sup>61</sup>.

Des travaux de recherches récents ont postulé que la fission mitochondriale médiée par la protéine Drp1 était perturbée lors du sepsis et de la maladie d'Alzheimer (*Alzheimer's disease*, AD)<sup>62,63</sup> et absente dans les modèles murins

*Murphy Roths Large / lymphoproliferative* (MRL/lpr) de lupus érythémateux disséminé (*systemic lupus erythematosus*, SLE) <sup>64</sup>. L'inhibition sélective de Drp1 par P110 s'est avérée efficace pour ralentir l'apparition de symptômes cliniques dans le cadre de la sclérose latérale amyotrophique (*amyotrophic lateral sclerosis*, ALS), de l'AD <sup>63,65</sup> et dans un modèle murin de colite <sup>66</sup>. L'administration de cyclosporine A (*cyclosporin A*, CsA) – usuellement suite à une transplantation ou dans la prise en charge de maladies auto-immunes – promeut la fission de la masse mitochondriale, un effet qui a été associé aux dommages oxydatifs observés dans certaines néphropathies iatrogènes <sup>67</sup>.

Les dysfonctions de la mitophagie induites par le couple PINK1/Parkine ont été associées à la physiopathologie de la maladie de Parkinson (*Parkinson's disease*, PD) <sup>68</sup>. Additionnellement, le système PINK1/Parkin réprime l'apprêtement des antigènes mitochondriaux (*mitochondrial antigens*, mtAg) par le complexe majeur d'histocompatibilité de type I [*major histocompatibility complex, type I* (MHC-I) Note : le MHC est aussi nommé *human leukocyte antigen* (HLA), chez l'humain] <sup>69</sup>. Selon les résultats de cette étude, l'apprêtement des mtAgs par le MHC-I n'est pas dépendant du protéasome, mais assuré par le bourgeonnement de vésicules à la surface de la mitochondrie (*mitochondrial-derived vesicles*, MDV) à l'aide des protéines Rab 9 et *sorting nexin-9* (snx9). Les MDV seront ensuite acheminées à l'endosome tardif avec lequel elles fusionneront, permettant ainsi l'apprêtement des mtAgs <sup>69</sup>.

## **La mitochondrie ; centrale énergétique et usine de production de biomolécules de la cellule**

Les mitochondries sont des organelles intracellulaires capables de fournir à la cellule l'énergie et différentes biomolécules au travers de plusieurs voies métaboliques telles que le cycle de l'acide tricarboxylique (*tricarboxylic cycle*, TCA – aussi appelé cycle de l'acide citrique ou de Krebs), la  $\beta$ -oxydation des acides gras (*fatty acid oxidation*, FAO) ou le segment mitochondrial du cycle de l'urée<sup>70-72</sup> (**Figure 4**). De plus, la mitochondrie contribue aussi à la formation de l'hème et est, chez l'humain, l'unique lieu de la synthèse de la cardiolipine (**Figure 5**). Selon le *leitmotiv* « la mitochondrie est la centrale énergétique de la cellule » (*the mitochondrion is the powerhouse of the cell*), la fonction la plus connue de l'organelle est sa capacité à convertir l'énergie libre issue des nutriments en ATP<sup>73</sup>. Les molécules d'ATP formées par l'OxPhos pourront ensuite être hydrolysées afin de fournir l'énergie nécessaire pour permettre les réactions chimiques endergoniques en aval. La mitochondrie utilise deux couples oxydant-réducteur (redox); NADH/NAD ainsi que la flavine adénine dinucléotide (FADH<sub>2</sub>/FAD), fournis par différentes voies métaboliques (e.g., la glycolyse, la FAO ou le TCA).

### **Principales voies métaboliques de la mitochondrie**

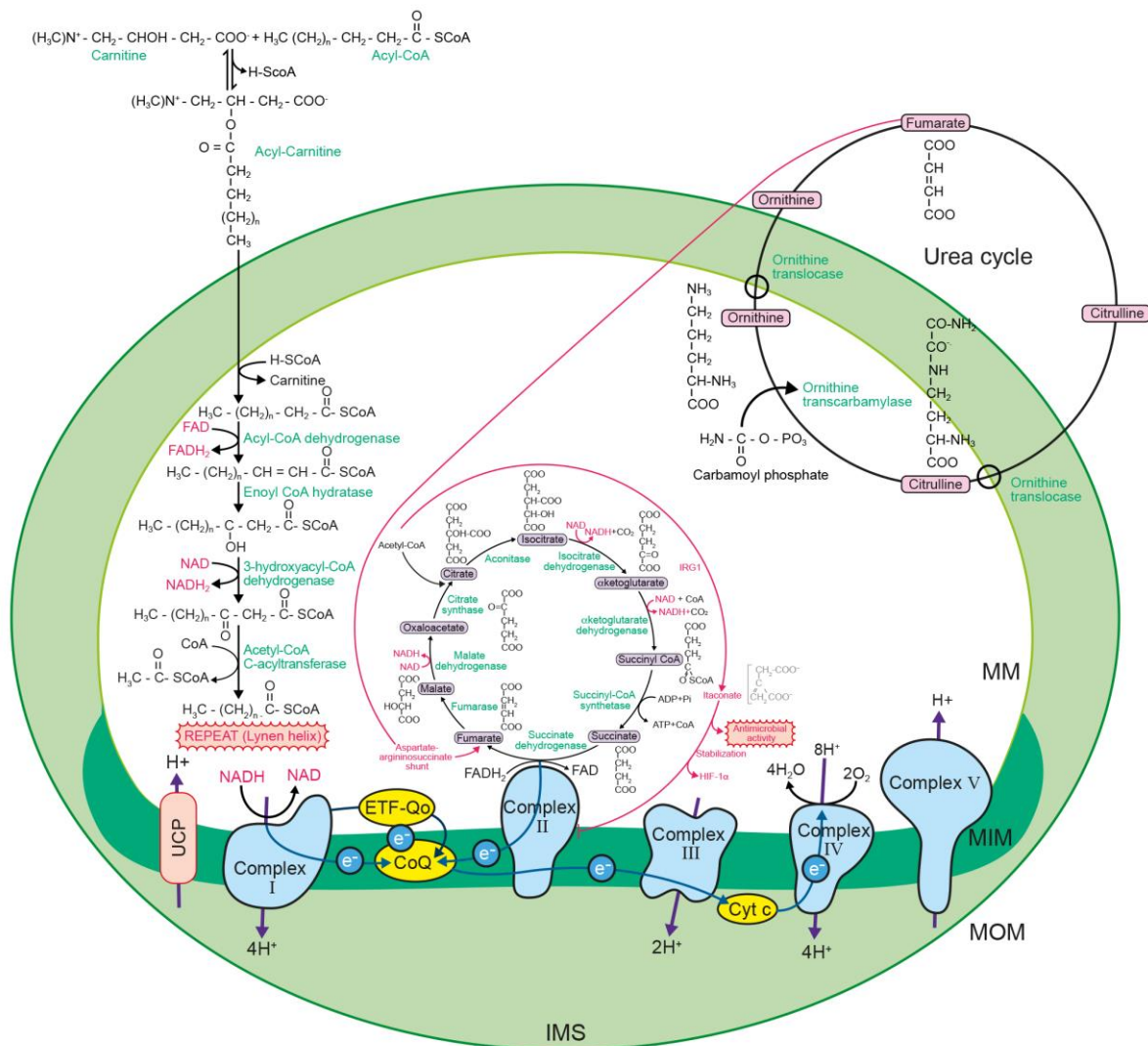
**Le métabolisme des acides gras (FAO):** Le peroxysome et la mitochondrie sont les deux organelles dans lesquels les acides gras sont dégradés. Les acides gras sont conjugués au coenzyme A (i.e., acyl-CoA), transférés à la carnitine (i.e., acyl-carnitine) (**Figure 4, voie de gauche**). De là, l'acyl-carnitine sera acheminé au sein de la mitochondrie et l'acide gras libéré sous sa forme d'acyl-CoA. Une double liaison covalente sera formée entre les carbones  $\alpha$  et  $\beta$  de l'acide gras par l'*acyl-CoA dehydrogenase*, formant à l'occasion une molécule de FADH<sub>2</sub>. L'acide gras sera ensuite hydraté par l'enoyl-CoA hydratase et oxydé par la *3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase*, avec formation d'une molécule de NADH. Enfin, l'incorporation d'un nouveau CoA par l'acétyl-CoA C-acyltransférase permet la thiolysse de l'acide gras en une molécule d'acétyl-CoA et un acide gras plus court de deux

carbones (i.e.,  $C_{n-2}$ )<sup>74</sup>. Le réseau mitochondrial dense des macrophages de type M2 et des  $T_m$ , ainsi que l'augmentation de la transcription d'enzymes impliquées dans le TCA et la FAO favorisent la production d'énergie par ces deux voies<sup>75,76</sup>.

**Le cycle de Krebs, ou cycle de l'acide citrique (TCA):** découvert par Hans Adolf Krebs en 1937<sup>77</sup> (**Figure 4, cycle au centre**). Le pyruvate issu de la voie de la glycolyse est converti en acetyl-coenzyme A (acetyl-CoA) par la *pyruvate dehydrogenase* afin d'alimenter le cycle. L'acetyl-CoA et l'oxaloacetate seront combinés par la *citrate synthase* afin de reformer un acide tricarboxylique qui permettra de régénérer le cycle. Le citrate sera ensuite converti en son isomère, l'isocitrate qui subira ensuite deux décarboxylations oxydatives, formant le succinyl-CoA, deux NADH et deux molécules de dioxyde de carbone ( $CO_2$ ). La *succinyl-CoA synthase* catalysera la phosphorylation du GTP et la formation de succinate qui sera ensuite oxydé en fumarate par la *succinate dehydrogenase* par transfert de protons au FAD (i.e., en  $FADH_2$ ). Le fumarate sera hydraté par la fumarase en malate, puis le cycle se terminera par son oxydation en oxaloacétate par la *malate dehydrogenase*, produisant un NADH<sup>78</sup>. Différentes mutations peuvent atteindre les protéines du TCA, bien que leurs présentations respectives puissent varier, elles comprennent généralement des accumulations de métabolites ainsi que des troubles neurologiques (e.g., retards mentaux, ataxies, encéphalopathies de Leigh)<sup>79</sup>.

**Métabolisme mitochondrial de l'urée:** Le cycle de l'urée est partagé entre le cytosol et la mitochondrie et permet le catabolisme des acides aminés et l'évacuation des déchets azotés via l'excrétion de l'urée<sup>80</sup>. Dans les hépatocytes, la carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS-1) est une enzyme chargée de la condensation d'ammoniac ( $NH_3$ ) et de bicarbonate ( $HCO_3^-$ ) en carbamoyl phosphate, en présence de N-acetylglutamate, issue de la dégradation du glutamate par la N-acetylglutamate synthase (NAGS). L'ornithine transcarbamylase (OTC) permettra une seconde réaction de condensation de l'ornithine et du carbamoyl phosphate en citrulline (**Figure 4, cycle de droite**). Enfin, la citrulline sera exportée vers le cytosol par l'*ornithine translocase*<sup>81</sup>. Les déficits en enzymes impliquées dans le métabolisme mitochondrial de l'urée sont associés avec des accumulations de métabolites, des troubles neurologiques et cognitifs<sup>82,83</sup>. Les dysfonctions de l'*ornithine translocase* seront à l'origine

du syndrome du triple H (i.e., hyperornithinémie-hyperammoniémie-homocitrullinurie) qui présente des coagulopathies en plus des troubles neurologiques usuels <sup>84</sup>. La citrullination est un type de modification post-transcriptionnelle observée notamment au cours de l'apoptose au cours de laquelle une protéine est modifiée par la conversion d'une arginine en citrulline <sup>85</sup>. Des microparticules (*microparticles*, MP) sont présentes en circulation, chez les patients souffrant de maladies auto-immunes <sup>86,87</sup>. Par ailleurs, la présence d'histones citrullinées a été détectée dans les NETs <sup>88</sup>. La citrullination aberrante de protéines pourra être à l'origine de la formation de néoantigènes reconnus par le système immunitaire adaptatif <sup>85</sup>.



#### **Figure 4. Intrication des différentes voies du métabolisme énergétique mitochondrial.**

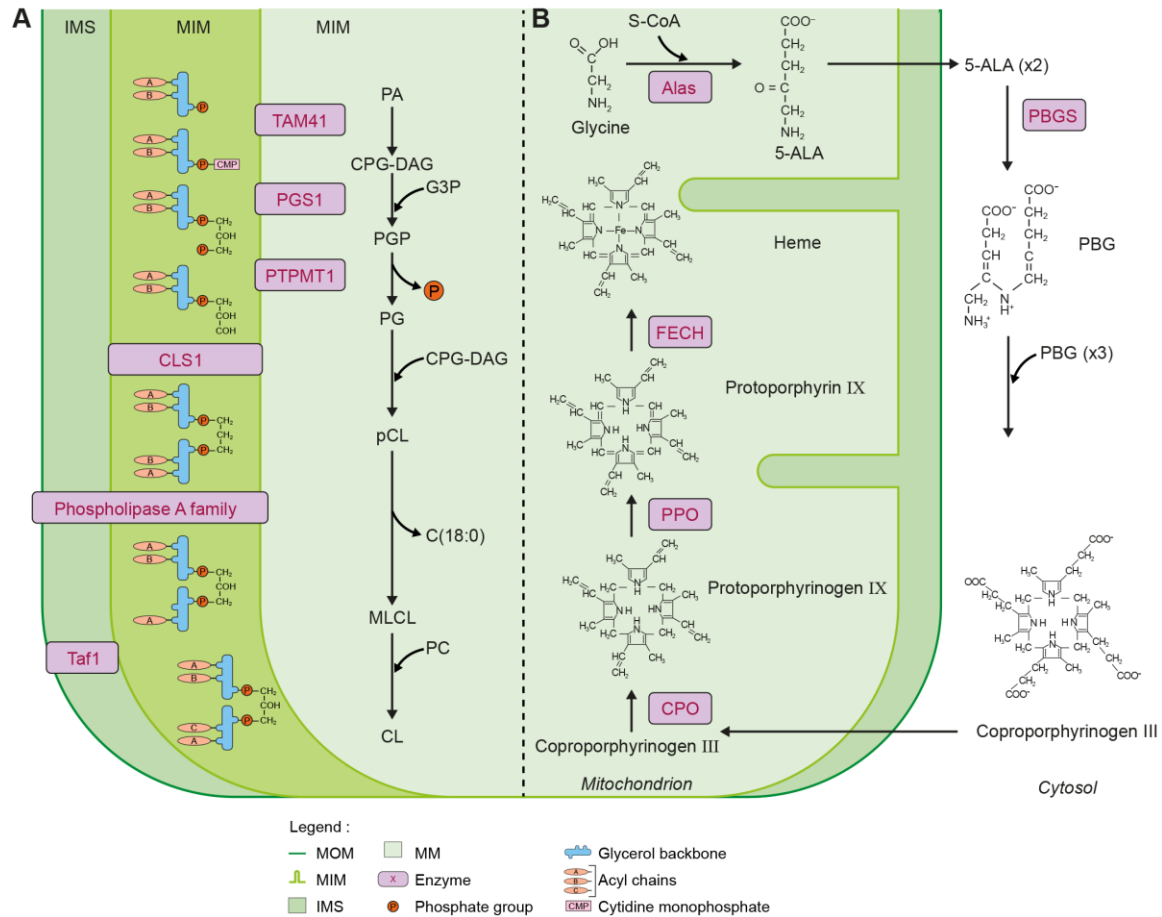
Principalement connue comme « centrale énergétique de la cellule » (*powerhouse of the cell*), la mitochondrie constitue le siège de plusieurs réactions métaboliques concourant à la production d'intermédiaires métaboliques (i.e., NADH, FADH<sub>2</sub>) permettant la synthèse d'une biomolécule, l'adénosine triphosphate (ATP) dont l'hydrolyse libèrera l'apport d'énergie libre aux réactions endergoniques. (Réaction de gauche) La  $\beta$ -oxydation des acides gras (*fatty acid oxidation*, FAO) permet l'import d'acides gras dans la mitochondrie, puis leur dégradation. Pour chaque paire de carbones de la chaîne carbonée de l'acide gras, une molécule de FADH<sub>2</sub> et une molécule de NADH<sub>2</sub> seront générées. (Cycle au centre) Le cycle de Krebs générera une molécule d'ATP, trois de NADH et une de FADH<sub>2</sub>. (Bas) La chaîne de transport des électrons (*electron transport chain*, ETC) utilisera le NADH et FADH<sub>2</sub> pour permettre le transfert de protons à destination de l'espace intermembranaire (IMS), établissant une force protonmotrice qui pourra être régulée par les protéines de découplage (*uncoupling proteins*, UCP). Le retour des protons vers la matrice mitochondriale (MM) au travers de l'ATP synthase (*ETC complex V*) permettra la production d'ATP. (Cycle de droite) La mitochondrie participe au métabolisme des biomolécules azotées (i.e., cycle de l'urée). Ces voies métaboliques, ainsi que l'apport d'énergie par la glycolyse anaérobie sont finement régulés afin de pouvoir répondre aux besoins de la cellule selon la biodisponibilité des nutriments au sein du tissu. *Figure non-publiée, laboratoire du Dr. Éric Boilard.*

**La synthèse de la cardiolipine:** De par l'origine bactérienne de la mitochondrie, la cardiolipine est un des lipides principaux de la membrane interne de l'organelle <sup>89,90</sup>. L'acide phosphatidique, présent dans la MIM, est converti en cytidine diphosphate diacylglycerol (CDP-DAG) par la *translocator assembly and maintenance protein 41* (Tam41), une enzyme de la famille des *CDP-DAG synthases* <sup>91</sup> (**Figure 5 A**). Le phosphatidylglycerolphosphate (PGP) sera ensuite formé à l'aide d'une PGP synthase (PGS1) qui catalyse le transfert d'un groupement phosphatidyl depuis le CDP-DAG, à destination d'une molécule de glycerol-3-phosphate. Une tyrosine phosphatase (*Protein-tyrosine phosphatase mitochondrial 1*, PTPMT1) permet ensuite

la déphosphorylation du PGP en phosphatidylglycerol (PG). Un précurseur de la cardiolipine (*premature cardiolipin*, pCL) sera formé par la *cardiolipin synthase* (CLS1) en associant une molécule de CDP-DAG au PG. Plusieurs phospholipases interviendront séquentiellement pour modifier les chaînes lipidiques de la molécule. Dans un premier temps, des enzymes de la famille de la phospholypase A (PLA) déacétyleront la pCL par perte d'un acide palmitique, formant la monolysocardiolipine (MLCL)<sup>40</sup>. La tafazzine remplacera ensuite la chaîne manquante en transférant la chaîne carbonée insaturée d'une molécule de phosphatidylcholine (PC) , vers le MLCL, formant la cardiolipine mature<sup>92</sup>. Les dysfonctions de CLS1 sont associées aux syndromes métaboliques<sup>93</sup>. Les mutations du gène de la tafazzine, codée par le chromosome X, sont à l'origine du syndrome de Barth<sup>94</sup>.

**Contribution mitochondriale à la biosynthèse de l'hème:** À l'instar du cycle de l'urée, la synthèse de l'hème se fait à cheval entre le cytosol et la mitochondrie (**Figure 5 B**). L'acide 5-aminolévulinique (*5-aminolevulinic acid*, 5-ALA) est formée à partir de succinyl-CoA et de glycine, par la 5-ALA synthase (Alas). Après leur export dans le cytosol, deux molécules de 5-ALA seront couplées par la *porphobilinogen synthase* (Pbgs) en une molécule de la famille des monopyrroles, le porphobilinogène (PBG). Quatre PBG seront ensuite assemblés en coproporphyrinogène III par un ensemble d'enzymes cytosoliques, avant d'être réimportés dans la mitochondrie<sup>95</sup>. La molécule subira ensuite une étape de décarboxylation en protoporphyrinogène IX par la *coproporphyrinogen III oxidase* (CPO), puis sera oxydé en protoporphyrine IX par la *porphyrinogen IX oxidase* (PPO). Enfin, la ferrochelatase (FECH) complètera la formation de l'hème par l'insertion d'ions métal ferreux ( $Fe^{2+}$ )<sup>96</sup>. Les chaînes latérales de l'hème détermineront le type de molécules dans lequel il sera inséré, ainsi l'hème constitue le groupement prosthétique de nombreuses enzymes telles que l'hémoglobine ou les protéines de la famille du cytochrome P450. Les mutations des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'hème sont associées avec différents types de porphyries, dont la porphyrie érythropoïétique<sup>97</sup>.





**Figure 5. Biosynthèse de la cardiolipine et contribution de la mitochondrie à la production d'hème.**

(A) De par son origine bactérienne, la mitochondrie possède la machinerie enzymatique nécessaire à la production de cardiolipine (CL). Chez l'humain, ce phospholipide est normalement localisé au sein de la membrane mitochondriale interne (MIM). La cardiolipine pourra cependant être exportée à la membrane externe (MOM) afin de contribuer à certaines voies de signalisation (e.g., mitophagie, formation de l'inflammasome NLRP3).

(B) La voie de synthèse de l'hème est à cheval entre le cytosol et la mitochondrie. La glycine et le succinyl-CoA pourront se combiner séquentiellement jusqu'à former une molécule complexe de coproporphyrinogen III qui sera modifiée par la machinerie enzymatique mitochondriale jusqu'à former la molécule d'hème, groupement prosthétique de nombreuses enzymes. *Figure non-publiée, laboratoire du Dr. Éric Boilard.*

**La phosphorylation oxydative (OxPhos): (Figure 4, en bas)** Chez l'humain, le premier complexe (i.e., complexe I) de la chaîne de transfert des électrons (*electron transfer chain*, ETC) est la *NADH – Ubiquinone oxidoreductase*. Cette protéine est composée de 45 sous-unités, principalement codées par le nDNA - seulement 7 d'entre elles étant codées par le mtDNA <sup>98,99</sup> (**Figures 1 et 4**). Le complexe I assure le passage de protons de l'IMS vers la MM – créant un gradient de protons <sup>100</sup> – ainsi que le transfert d'électrons depuis le NADH, à destination d'une molécule apolaire, capable de diffuser au sein de la MIM, le coenzyme Q (i.e., CoQ, aussi appelé ubiquinone).

Le second complexe de l'ETC (i.e., complexe II) est la *succinate dehydrogenase* dont les 4 sous-unités sont codées par le nDNA (**Figures 1 et 4**). Ce complexe n'étant pas transmembranaire, il n'est pas capable de transférer des protons, contrairement aux autres complexes de l'ETC <sup>101</sup>. Cette enzyme est aussi impliquée dans l'étape d'oxydation du succinate en fumarate au cours du TCA tout en transférant des électrons au CoQ à l'aide d'un cofacteur lié de façon covalente, le FAD <sup>102</sup>. En plus des électrons transférés par les complexes I et II, le CoQ pourra directement accepter des électrons en provenance de la *flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase* (ETF-QO, aussi impliquée dans la FAO et le catabolisme des acides aminés) ou d'enzymes du métabolisme des radicaux monocarbonés (i.e., *sarcosine dehydrogenase* et *dimethylglycine dehydrogenase*) <sup>103-106</sup>.

Le coenzyme Q pourra transmettre ses électrons au complexe III, ubiquinone-cytochrome c oxidoreductase, composée de 11 sous-unités – dont seule une, le cytochrome b est codée par le mtDNA <sup>107</sup> (**Figures 1 et 4**). L'oxydation du CoQ permettra à deux électrons de traverser la MIM via le transfert de deux protons à une seconde molécule lipophile, le Cyt c <sup>108</sup>.

Le complexe IV; *cytochrome c oxidase* (aussi désigné par l'acronyme COX) est constitué de 4 sous-unités dont les 3 plus grosses (i.e., COX1, -2 et -3) sont codées par le mtDNA (**Figures 1 et 4**). Le complexe pompe 8 protons depuis la MM et ses 4 centres de redox transfèrent les électrons du cyt c à l'O<sub>2</sub>, consommant 4 protons pour former deux molécules d'eau (H<sub>2</sub>O). L'IMS sera donc enrichi d'un total net de 4 protons par réaction <sup>109,110</sup>.

Le dernier complexe de l'ETC (i.e., complexe V) est l'ATP synthase, constituée de 16 sous-unités enzymatiques dont deux (i.e., ATP6 et ATP8) sont codées par le mtDNA (**Figures 1 et 4**). Le complexe V utilise le gradient de protons entretenu par les complexes I, III et IV afin d'effectuer la catalyse réversible de l'ATP à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique (Pi). Cette réaction est rendue possible par l'énergie libre fournie par le flux de protons au travers de la sous-unité  $\gamma$  du complexe F1 de la protéine <sup>111,112</sup>. Outre la production d'énergie par la OxPhos, un sous-produit de cette voie est la formation de ROS mitochondriaux (*mitochondrial ROS*, mtROS) due à la fuite d'électrons au travers de l'ETC <sup>113</sup>. Ces électrons pourront réduire l' O<sub>2</sub> en anions superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), particulièrement réactif, qui pourra par la suite être converti en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) par la *superoxide dismutase* <sup>113</sup>.

### **Métabolisme mitochondrial et réponse immunitaire normale**

Les cellules de l'immunité étant capable de migrer, les différents tissus qu'elles seront menées à traverser seront caractérisés par des variations de la biodisponibilité des nutriments en leur sein (e.g., glucose, acides gras, O<sub>2</sub>). Ainsi, les cellules immunitaires nécessiteront un ajustement fin de leurs différentes voies métaboliques <sup>114</sup>. L'expression du facteur de transcription *hypoxia-induced factor 1 $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ) est induite en conditions hypoxiques et lors d'infections. HIF-1 $\alpha$  est stabilisée par la présence de mtROS <sup>115</sup> et par la production de succinate par la mitochondrie <sup>116</sup>. HIF-1 $\alpha$  augmente la transcription de gènes impliqués dans la glycolyse et l'inflammation [e.g., Interleukine (IL)-1-beta (IL1 $\beta$ ), l'élastase, l'*inducible nitric oxidase* (iNos)] <sup>117,118</sup>. Les neutrophiles étant des cellules résidentes des tissus, ils sont capables d'effectuer une bascule (i.e., *switch*) métabolique entre la glycolyse aérobie et l'oxphos - un mécanisme appelé l'*effet Warburg*. Ainsi, la masse mitochondriale réduite des neutrophiles fait que les neutrophiles reposent principalement sur la glycolyse anaérobie. Lors de la réponse immunitaire, un des principaux mécanismes de défense des neutrophiles, la « bouffée respiratoire » (*respiratory burst*) requiert la production de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) par la *NADPH oxidase*.

Ainsi, l'OxPhos permettra de satisfaire l'accroissement des besoins énergétiques des neutrophiles. Les mtROS ainsi produits permettront la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  <sup>115,116,119</sup>.

La polarisation des monocytes en macrophages pro- ou anti-inflammatoires est aussi modulée par la régulation dynamique du métabolisme mitochondrial <sup>120</sup> (cf. chapitre précédent). Les macrophages de type M1 sont caractérisés par une activité glycolytique intense et produisent des réponses immunitaires médiées par les cytokines et les ROS <sup>121</sup>. Ils présentent un cycle de Krebs brisé en trois étapes ("*broken*" *three-steps TCA*) au cours duquel la séquence d'oxydation du pyruvate est d'abord stoppée par l'absence de l'enzyme *isocitrate dehydrogenase*. Il en résultera une accumulation de citrate et de cis-aconitate dont ce dernier sera décarboxylé en itaconate par la protéine *immune-responsive gene 1* (IRG1). L'itaconate est à la fois une molécule aux propriétés antibactérienne, et un inhibiteur du complexe II; son accumulation est à l'origine de la deuxième étape du TCA <sup>122,123</sup> et permet la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  <sup>118,124</sup>. Enfin, la dernière étape du TCA, appelée dérivation de l'aspartate-arginosuccinate (*aspartate-arginosuccinate shunt*) permet de clore le cycle en lui fournissant du malate tout en alimentant le cycle de l'urée – source d'oxyde nitrique (NO) <sup>125</sup>. L'interleukine 4 (IL4) induite l'engagement des macrophages vers le phénotype M2 en stimulant la protéine *signal transducer and activator of transcription 6* (STAT6) <sup>48</sup>. Cette signalisation induit une augmentation de la masse mitochondriale, de l'OxPhos et de la FAO *via* PGC-1 $\beta$ , contribuant au phénotype anti-inflammatoire caractéristique des macrophages M2.

La maturation des DCs semble aussi régulée par l'immunométabolisme; des expériences d'inhibition de la glycolyse par le 2-deoxyglucose dans des DC stimulées par le lipopolysaccharide (LPS) ont montré une diminution de l'expression des marqueurs d'activations et de la production de cytokines <sup>126</sup>. D'autres travaux ont aussi indiqué que l'engagement de la voie de HIF-1 $\alpha$  et de la *phosphatidylinositol 3'-kinase* (PI3K)/*Akt* permet la diminution de la respiration mitochondriale et la promotion de la glycolyse nécessaire à la maturation des DC <sup>127</sup>.

Tout comme leurs homologues du système immunité inné, les cellules de l'immunité adaptative régulent leur métabolisme selon leurs besoins métaboliques. Le métabolisme

des lymphocytes T naïfs repose sur le TCA et l'OxPhos pour produire de l'ATP. L'activation des lymphocytes T, suite à l'engagement de leur récepteur (*T-cell receptor*, TCR), le *cluster* de différenciation 28 (CD28) emprunte la voie PI3K/Akt/*mammalian target of rapamycin* (mTOR) afin d'induire l'expression du transporteur de glucose Glut1 et ainsi promouvoir la glycolyse <sup>128</sup>. Les voies métaboliques de la glutaminolyse et de la glycolyse constituent des sources de métabolites nécessaires au catabolisme des biomolécules nécessaires à la prolifération des lymphocytes T <sup>129,130</sup>. À l'instar de ce qui est observé pour les macrophages, la promotion de la glycolyse aérobie permet la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes T<sub>eff</sub> proinflammatoires [e.g.: cellules T auxiliaires (*helper-cells*, Th) de type Th<sub>1</sub>, Th<sub>2</sub> et Th<sub>17</sub> et cellules T cytotoxiques CD8<sup>+</sup>) alors que la promotion du métabolisme mitochondrial aiguille les cellules vers un phénotype de lymphocytes T régulateurs (*regulatory T-cells*, T<sub>reg</sub>) <sup>131</sup>. Les métabolites utilisés par l'OxPhos des T<sub>m</sub> proviennent de la FAO et leur permettent d'accroître leur production d'énergie afin de pouvoir produire une réponse cytokinique rapide <sup>54</sup>.

### **Dysfonctions du métabolisme mitochondrial**

L'éventail des phénotypes associés aux mutations des protéines de l'ETC est très large : cardiomyopathies, PD, syndromes de Troyer et de Leigh, et neuropathies optiques <sup>132</sup>.

L'expression d'un complexe I de levure a permis l'amélioration des symptômes rétiens dans un modèle murin de MS <sup>133</sup>. Dans le cadre de la thyroïdite de Hashimoto, les cellules de Hürthle sont caractérisées par l'importance de leur masse mitochondriale et par des déficiences du complexe I – ainsi que, de façon inconsistante, du complexe IV <sup>134</sup>. Une expression accrue des sous-unités à activité oxydantes du complexe I de l'ETC a été rapportée dans un modèle murin de lupus <sup>64</sup>.

Les mutations de la *succinate dehydrogenase* causent une accumulation de succinate, l'inhibition de la *prolyl hydroxylase* et en bout de ligne, une accumulation de HIF-1 $\alpha$  qui favorisent le développement de tumeurs en inhibant l'apoptose et en promouvant la glycolyse et l'angiogenèse <sup>135</sup>.

Les mutations du cyt b provoquent des effets similaires à ceux généralement observés pour les autres complexes de l'ETC. Toutefois, les mutations des gènes nucléaires codant pour le complexe III tels que QP-C et BCS1L sont associés avec des dysfonctions des reins et du foie, des encéphalopathies et un accroissement de la production de ROS <sup>136-138</sup>.

En plus des maladies communes aux mutations des complexes de l'ETC <sup>139,140</sup>, les mutations du complexe IV sont aussi associées aux myosites à corps d'inclusion <sup>141</sup>. Une étude récemment menée sur des cellules mononucléées périphériques (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) de patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (*human immunodeficiency virus*, HIV) ont indiqué que ces cellules présentent une OxPhos diminuée, comparé aux PBMC de patients séronégatifs <sup>142</sup>. Cette diminution est associée à une diminution de l'expression du complexe I. Bien que les niveaux d'expression du complexe IV étaient significativement comparables entre les deux groupes, la diminution concomitante des deux complexes I et IV est associée avec une diminution de la fréquence en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, du ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> et de la production de marqueurs inflammatoires. L'administration de CsA a récemment été associée à une diminution de la production du *mitochondrial transcription factor A* (TFAM) et avec un déficit de la biogenèse des mitochondries dans une lignée cellulaire d'hépatocarcinome (*liver hepatocellular cells*, Hep-G2) <sup>143</sup>.

Plus de 60 mutations des sous-unités de l'ATP synthase codées par le mtDNA ont été reportées, en plus de celles affectant les sous-unités codées par le nDNA <sup>144</sup>. L'accumulation de la sous-unité c du complexe V au sein des lysosomes de neurones a été observée dans le cadre de la maladie de Batten <sup>145</sup>. La diminution de l'expression de l'ATP synthase est associée avec une augmentation du stress oxydatif, potentiellement responsables des dommages rétiens observés dans les uvéites auto-immunes.

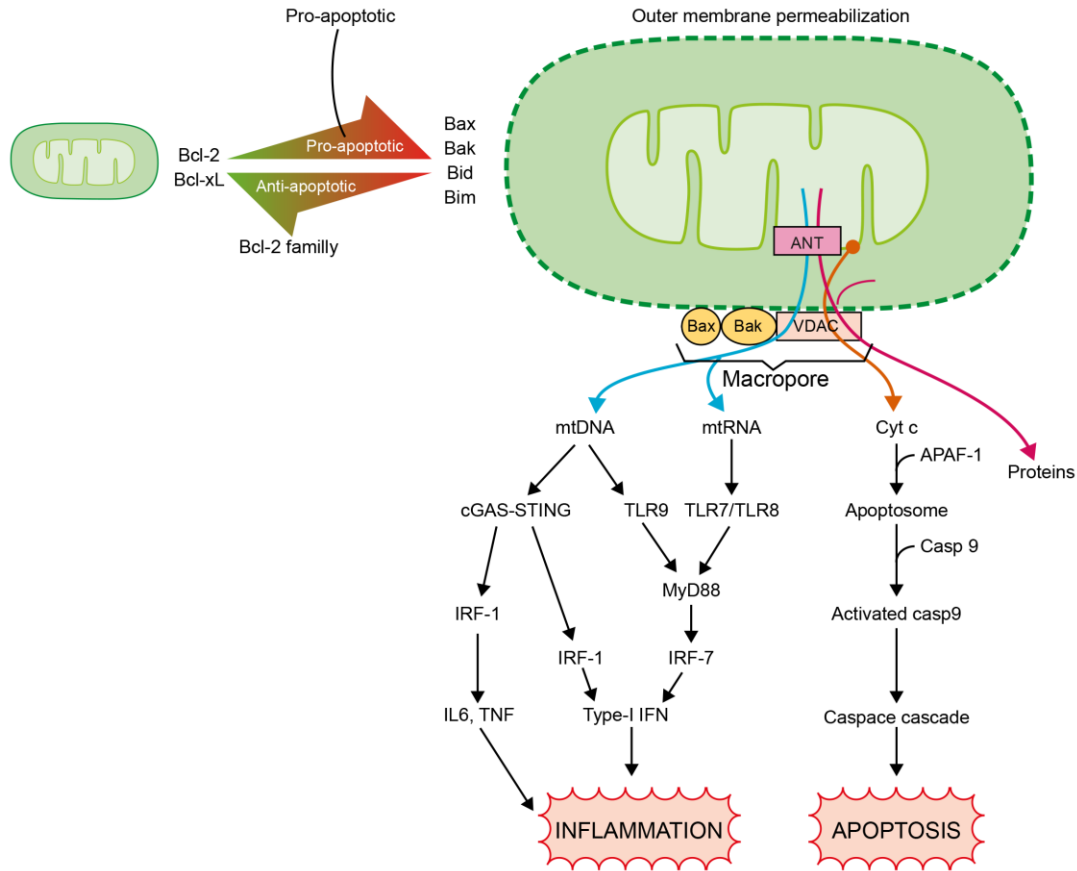
## Un centre de contrôle pour la mort cellulaire programmée par apoptose

Plusieurs types de morts cellulaires existent, les plus connues étant la nécrose et l'apoptose<sup>146</sup>. Contrairement à la nécrose, l'apoptose est une forme de mort cellulaire active (i.e., nécessitant la consommation d'une source d'énergie) et dénuée d'inflammation<sup>147</sup>. Plusieurs voies métaboliques peuvent aboutir à la mort cellulaire programmée, dont la voie intrinsèque de l'apoptose qui se déroule spécifiquement au sein de la mitochondrie. Toutefois, bien que la voie extrinsèque de la mitochondrie ait lieu en dehors de la mitochondrie *via* la voie de signalisation du CD95 (aussi appelé FAS), elle aboutit à l'activation de Bid par la caspase-8 (casp-8) et à la perméabilisation de la MOM<sup>148</sup>. Au cours de l'apoptose, les vésicules apoptotiques arboreront à leur surface un signal « mange-moi » (“*eat-me signal*”) – la phosphatidyl sérine – qui sera reconnu par les cellules environnantes (e.g., macrophages, fibroblastes). Cette reconnaissance mènera à la clairance des corps apoptotiques par endocytose (i.e., efferocytose) afin de ne pas déclencher de phénomènes inflammatoires<sup>149,150</sup>. Il a, par ailleurs, été postulé que la mitochondrie pourrait être impliquée dans certaines formes de nécrose programmée (i.e., nécroptose)<sup>151</sup>.

### La mitochondrie, organelle centrale de la voie intrinsèque de l'apoptose

La survie de la cellule est contrôlée par les protéines de la famille *B cell lymphoma-2* (Bcl-2), exerçant une balance homéostatique entre ses membres ayant des activités pro- (e.g., Bax, Bak, Bid, Bim) ou anti-apoptotiques (e.g., Bcl-2, Bcl-xL)<sup>152</sup>. Lors de l'apoptose précoce, Bax et Bak s'associent à plusieurs protéines dont le *voltage-dependent anion channel* (VDAC), l'*adenine nucleotide translocase* (ANT) et la cyclophiline-D (CypD) afin de former des macropores permettant la perméabilisation de la MOM, la perte du potentiel de membrane et l'efflux de composants internes à la mitochondrie, à destination du cytosol [e.g., cyt c, mtDNA, calcium (Ca<sup>2+</sup>)]<sup>153,154</sup> (**Figure 6**). Le cyt c cytosolique provoque l'assemblage de l'apoptosome à l'aide de

l'ATP and apoptosis protease activating factor 1 (APAF-1)<sup>155</sup>. Ce complexe active ensuite la casp-9, permettant la cascade des caspases (i.e., casp-3, -6 and -7)<sup>156,157</sup>, aboutissant au clivage de l'ADN extranucléosomal.



**Figure 6. Voie intrinsèque de l'apoptose.**

Lorsque la balance homéotique penche en faveur des signaux proapoptotiques, ces derniers permettront l'assemblage de transporteurs mitochondriaux en macropore, occasionnant l'efflux de biomolécules internes à la mitochondrie (e.g., cyt c, mtDNA, mtRNA) à destination du cytosol. La libération de cyt c permettra l'établissement de la cascade des caspases, aboutissant à la mort cellulaire par apoptose. Bien que l'apoptose soit une voie qui ne mobilise pas l'inflammation, les acides nucléiques mitochondriaux pourront déclencher des voies métaboliques proinflammatoires lors de leur libération hors de l'organelle (i.e., dans le cytosol ou dans le milieu extracellulaire). *Figure modifiée à partir de Becker, Y. L. C., Duvvuri, B., et al. Nat Rev Rheumatol. (2019). En révision (N° de dossier NRR-22-017V1).*



**L'apoptose, un mécanisme crucial pour la maturation et le contrôle des populations de cellules immunitaires, la modulation des réponses auto-immunes et la réponse immunitaire cytotoxique.**

La maturation des lymphocytes T est un processus qui dépend fortement de l'implication de la mitochondrie dans l'apoptose. Plusieurs signaux, tels que l'interaction entre l'interleukine 7 (IL7) avec son récepteur (IL7R) sont cruciaux pour la survie des thymocytes double négatifs (*double negatives*, DN. I.e., CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>), car ils mobilisent des voies de signalisation dépendantes des membres de la famille Bcl-2 avec des actions anti-apoptotiques<sup>158,159</sup>. Plus tard au cours de leur maturation, les thymocytes exprimeront une chaîne pré- $\alpha$  de substitution, associée à leurs pré-TCR. L'expression de ce pré-TCR à la surface des thymocytes permet leur progression dans leur maturation à l'aide de signaux de survie provenant de la protéine Bcl-2A1<sup>160</sup>. Les thymocytes double-positifs (*double positives*, DP. I.e., CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) sont maintenues en vie par l'expression de Bcl-xL<sup>161</sup>. Toutefois, l'absence de reconnaissance entre le TCR des lymphocytes T DP et le complexe MHC-peptide exprimé par les cellules présentatrices d'antigène (*antigen-presenting cells*, APC) aboutissent à une « mort par négligence » (“*death by neglect*”) médiée par Bim<sup>162</sup>. L'apoptose induite par Bim est aussi impliquée dans la sélection négative des lymphocytes T DP dont l'affinité du TCR pour le MHC est trop forte<sup>163,164</sup> ainsi que lors de la délétion des lymphocytes B autoréactifs<sup>165</sup>.

Suite à l'expansion clonale des lymphocytes activés, la résolution de l'infection – et donc la disparition des antigènes – provoque une diminution de la population cellulaire par apoptose<sup>166,167</sup>. Seuls les lymphocytes mémoires, de grande longévité, persisteront grâce aux membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2<sup>168</sup>.

La tolérance immunitaire aux antigènes endogènes peut être régulée par un phénomène de mort cellulaire induite par l'activation (*activation-induced cell death*, AICD). La signalisation dépendante de l'interaction entre CD40 et son ligand (i.e., CD40L) induit une cascade de signalisation aboutissant à l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL<sup>169</sup>. L'AICD des lymphocytes T est généralement induite par des signaux extérieurs, véhiculés par la voie de signalisation dépendante des récepteurs

de mort (*death receptors*, e.g., Fas), toutefois, il existe une autre voie mitochondriale indépendante des caspases où la protéine *c-Jun Kinase* (JNK) stimule l'expression de Bim et le relargage de *l'activation-induced factor* (AIF) par la formation de pores mitochondriaux <sup>170</sup>.

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (i.e., aussi désignés lymphocytes T<sub>eff</sub> cytotoxiques) sont capables d'induire l'apoptose de leur cellule-cible sur deux fronts. D'une part, par l'interaction directe entre FAS, exprimé par la cellule-cible et son ligand (FASL), à la surface du lymphocyte T CD8<sup>+</sup>. D'autre part, l'activation des lymphocytes T<sub>eff</sub> cytotoxiques s'accompagne du relargage de granzyme, une sérine protéase capable d'induire l'apoptose via l'activation de Bid et de la cascade des caspases <sup>171</sup>.

### **Dérégulations de l'apoptose - diminution dans les cancers ou augmentation dans les maladies neurodégénératives et auto-immunes.**

Comme l'indique leur nom, les protéines de la famille Bcl-2 ont été découvertes dans le cadre de l'étude de la résistance à l'apoptose des lymphocytes B dans certains cancers du sang (i.e., lymphomes). Ainsi, des inhibiteurs pharmacologiques des membres de la famille Bcl-2 à activité anti-apoptotique sont actuellement en développement pour la prise en charge clinique de ces types de cancers <sup>172</sup>.

À l'opposé, une augmentation des niveaux en casp-3 a été mesurée dans le cadre de l'apoptose des neurones dopaminergiques au cours de la PD. La perte de ces cellules a pu être diminuée, *in vitro*, par la surexpression des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 <sup>173</sup>. La perte de la balance entre Bcl-2 et Bax (i.e., respectivement anti- et proapoptotique) a été identifiée comme l'un des mécanismes physiopathologiques aboutissant aux rétinopathies observées dans le diabète *mellitus* de type 2 <sup>174</sup>, dans les neurones à enchevêtrements neurofibrillaires caractéristiques de l'AD <sup>175</sup> et dans un modèle murin de la maladie de Huntington (*Huntington's disease*, HD) <sup>176</sup>. Les mitochondries isolées à partir de cellules des tissus endommagés par l'ALS sont

caractérisées par une balance en faveur des membres proapoptotiques de la famille Bcl-2 (i.e., une diminution de Bcl-2 et une augmentation de Bax et Bak-1) <sup>177</sup>.

L'altération des macropores a aussi été associée à différentes pathologies. La surexpression et la phosphorylation de VDAC1 ainsi que l'augmentation de l'apoptose qui en résulte ont été rapportées dans un modèle murin d'AD et dans un modèle de polyarthrite rhumatoïde (*rheumatoid arthritis*, RA) <sup>178,179</sup>. À l'inverse, dans le cadre de cancers où l'apoptose est diminuée, VDAC1 forme un complexe avec l'hexokinase qui empêchera la fixation des protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2 et provoquant une augmentation de la glycolyse <sup>180</sup>. Le traitement de différents types de cultures de cellules d'hépatocarcynome humain par le resmniostat, un inhibiteur des *histone deacetylases* (HDAC) induit une augmentation de l'apoptose par la promotion des interactions entre ANT et la CypD <sup>181</sup>. Par ailleurs, la réduction de la fibrose interstitielle suite à la délétion de la CypD souligne l'implication de la protéine dans la physiopathologie d'un modèle murin de dommages chroniques des tubules rénaux <sup>182</sup>. De plus, l'apoptose induite par la CypD peut être altérée lors de l'infection par *Mycobacterium abscessus*, un pathogène intracellulaire, afin de promouvoir la propagation du pathogène <sup>183</sup>. La restauration des fonctions cellulaires et mitochondriales via l'inhibition de CypD par la CsA suggère l'implication de la protéine et de la formation de macropores dans un modèle *in vitro* de maladie inflammatoire osseuse murine <sup>184</sup>.

L'accroissement de l'apoptose ainsi que la diminution de la clairance des corps apoptotiques ont été incriminées dans de nombreux aspects de la physiopathologie du SLE <sup>185,186</sup>, par exemple par la production de vésicules apoptotiques arborant de la cardiolipine à leur surface <sup>187</sup> ou encore par la libération d'autoantigènes intracellulaires dans la circulation au cours de l'apoptose <sup>188</sup>.

## Un site de détection des variations de concentration et de stockage du calcium cytosolique

### Détection des microdomaines calciques au contact du réticulum endoplasmique

L'organelle principale de stockage du calcium intracellulaire est l'ER, toutefois, les mitochondries peuvent aussi participer à la rétention du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique, suite à sa libération par l'ER. Le transporteur VDAC permet au  $\text{Ca}^{2+}$  de traverser la MOM vers l'IMS où un second complexe uniporteur du calcium (*mitochondrial calcium uniport*, MCU) permet d'acheminer le  $\text{Ca}^{2+}$  à destination de la MM<sup>189</sup> (**Figure 1 A**). Le MCU est caractérisé par une faible affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$ , toutefois, le passage du cation est permis par la présence du potentiel de membrane de la mitochondrie, la présence de zones de contact avec l'ER (*mitochondria-associated membranes*, MAM) ainsi que la formation de zones localisées à forte concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  (i.e., microdomaines calciques à plus de 10  $\mu\text{M}$ )<sup>190,191</sup>. À l'inverse, deux antiports calciques (i.e.,  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ ) permettent l'efflux de calcium hors de la mitochondrie en échange, soit d'un proton, soit d'un ion sodium<sup>192,193</sup>.

### Messagerie calcique mitochondriale et réponse immunitaire

En sa qualité de second messager, l'homéostasie du calcium est un élément déterminant pour le bon fonctionnement de nombreuses fonctions cellulaires. Malgré le fait que le stockage du  $\text{Ca}^{2+}$  par l'ER soit principalement étudié, la littérature fait état de certains aspects de la régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  qui sont spécifiquement impliquées dans l'établissement d'une réponse immunitaire normale. La stimulation du MCU est impliquée dans la polarisation des macrophages ainsi que dans la migration des neutrophiles<sup>194</sup>. Aussi, la fragmentation du réseau mitochondrial et la migration des organelles à destination de la synapse immunologique sont nécessaires à l'activation des lymphocytes T ainsi qu'à leur expansion clonale en assurant le maintien de la mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  *in situ*<sup>195,196</sup>.

## **Perturbation du stockage mitochondrial et maintien de l'activité de second messenger du calcium**

Comme mentionné dans la section précédente, les altérations du stockage secondaire du  $\text{Ca}^{2+}$  par la mitochondrie sont bien moins étudiées que les implications physiopathologiques des dysfonctions de l'ER. Les niveaux d'expression du MCU et de ses régulateurs (MICU1 et -2) présentent un intérêt comme biomarqueurs pour le pronostic des cancers du sein (i.e., la surexpression du MCU et la diminution de MICU1 constituant un mauvais pronostic) <sup>197</sup>. Additionnellement, les niveaux de transcription du MCU sont associés avec la progression du cancer <sup>198,199</sup>. Les mutations avec perte de fonction de MICU1 ont été décrites chez des patients atteints de myopathies des muscles squelettiques et de troubles du mouvement et de l'apprentissage <sup>200</sup>. Dans un modèle murin d'AD, la présence de dépôts amyloïdes  $\beta$  déclenche la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol, puis son stockage dans la mitochondrie par le MCU, menant à la mort par apoptose des neurones <sup>201</sup>. La protéine Fus1 est un gène suppresseur de tumeur (*tumor suppressing genes*, TSG) dont la perte réduit le repompage du  $\text{Ca}^{2+}$  par la mitochondrie. Les souris déficientes pour Fus1 développent des phénotypes auto-immuns proches de ceux observés dans le cadre du SLE <sup>202,203</sup>.

## **Un goulot d'étranglement pour la synthèse d'hormones stéroïdes pro- et anti-inflammatoires.**

Les mitochondries sont impliquées dans la signalisation endocrine médiée par les hormones stéroïdes. La biosynthèse des hormones stéroïdes nécessite un apport en cholestérol. Dans la cellule, deux voies de transit du cholestérol existent. La première voie, dite *vésiculaire*, mobilise le cholestérol contenu au sein d'un système membranaire à double bicouche phospholipidique <sup>204</sup>. Pour la seconde voie, non vésiculaire, différentes protéines telles que les synthaxines (*synthaxins*, e.g., synthaxin 5, -17), des facteurs sensibles à la N-ethylmaleimide soluble (*soluble N-ethylmaleimide sensitive factors*, NSF) tels que les protéines d'attachement aux NSF (*NSF attachment proteins*, SNAP. E.g.,  $\alpha$ -SNAP, SNAP-23 et -25) et leurs récepteurs (SNARE) permettent d'acheminer le cholestérol aux gouttelettes lipidiques ainsi qu'aux organelles <sup>205,206</sup>.

### **La mitochondrie, siège de la synthèse de prégnérolone, de corticoïdes et de la vitamine D.**

L'acheminement du cholestérol à la mitochondrie emprunte principalement la voie non vésiculaire de transport du cholestérol. Les complexes protéiques assurant le transport du cholestérol puis l'interaction avec *la steroidogenic acute regulatory protein* (StAR) <sup>207</sup>. La protéine StAR permet ensuite au cholestérol de traverser la barrière aqueuse que constitue l'IMS en formant des sites de contact entre la MOM et la MIM à l'aide d'interactions avec un ensemble complexe de protéines telle que la protéine translocatrice mitochondriale (*transporter protein*, TSPO. Anciennement nommée *peripheral benzodiazepine receptor*, PBR), VDAC1 et ANT <sup>208-211</sup>.

Les mitochondries du foie et du cortex surrénalien expriment sept enzymes de la famille du cytochrome p450, permettant la transformation du cholestérol et de ses intermédiaires métaboliques en différentes biomolécules (**Figure 1 A**). Le cholestérol est

converti en prégnénone par le cytochrome P450 *side-chain cleavage* (P450<sub>sc</sub>, aussi nommée CYP11A1) <sup>212</sup>.

La production de glucocorticoïdes est assurée par la conversion du 11-deoxycortisol en cortisol par le cytochrome P450<sub>c11b</sub> (i.e., CYP11B1).

Le cytochrome P450 <sub>c11AS</sub> (i.e., CYP11B2) permet la synthèse de l'aldostérone, une hormone de la famille des minéralocorticoïdes à partir du deoxycorticostérone <sup>213</sup>.

Enfin, deux protéines mitochondriales de la famille du cytochrome P450 participent à la biosynthèse de la vitamine D, la 25-hydroxylase (i.e., CYP27A1) et la 25-hydroxy-vitamine D 1 $\alpha$ -hydroxylase (i.e., CYP27B1) <sup>212</sup>. À l'inverse, la protéine vitamine D 24-hydroxylase (i.e., CYP24A1) assure la dégradation de la vitamine D lorsque les niveaux homéostatiques de calcium sont atteints. En plus de sa contribution à la production de vitamine D, CYP27A1 permet aussi la synthèse d'acides biliaires.

### **Effets des dysfonctions du métabolisme mitochondrial du cholestérol sur la réponse immunitaire.**

Les dérivés du métabolisme mitochondrial du cholestérol exercent des influences opposées sur la réponse immunitaire avec d'une part une action proinflammatoire des minéralocorticoïdes et, de l'autre, un effet anti-inflammatoire médié par les glucocorticoïdes et la vitamine D. Ainsi, la régulation de l'inflammation nécessite une augmentation des apports en cholestérol, comme observé par l'augmentation de l'expression de la TSPO lors de l'inflammation cardiaque, oculaire et du système nerveux central <sup>214-216</sup>.

L'aldostérone est une hormone de la classe des minéralocorticoïdes principalement impliquée dans la régulation des électrolytes et de la volémie au travers du système rénine-angiotensine-aldostérone <sup>217,218</sup>. En plus de ce mécanisme, l'aldostérone exerce une influence proinflammatoire sur le système immunitaire inné. L'élévation du titre en aldostérone est associée avec une activation de NF-kB et d'iNos <sup>219</sup> ainsi qu'à

la production de ROS par la *NADPH oxidase*. L'aldostérone permet aussi la stimulation de la migration des monocytes à destination des sites d'inflammation par l'augmentation de l'expression de IL1 $\beta$  et de la *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1) <sup>220,221</sup>. L'aldostérone permet aussi d'entretenir l'inflammation en déclenchant la production par les cellules du système immunitaire adaptatif du facteur de nécrose tumorale alpha (*tumor necrosis factor- $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ), de médiateurs lipidiques de la famille des eicosanoïdes et des IL6 et -17 <sup>222,223</sup>.

Les hormones stéroïdes de la famille des glucocorticoïdes sont de puissants immunomodulateurs agissant par inhibition de la production de cytokine proinflammatoires et des voies de signalisation telles que celles impliquant NF- $\kappa$ B, l'*activator protein 1* (AP-1) ou le facteur 3 régulateur de l'interféron (*interferon-regulatory factor 3*, IRF3). Les glucocorticoïdes inhibent l'action des eicosanoïdes <sup>224</sup>, la vasodilatation <sup>225</sup> et favorisent la mort cellulaire programmée par apoptose <sup>226</sup>. Enfin, les glucocorticoïdes diminuent la chimiotaxie, la diapédèse (ou extravasation) des leucocytes ainsi que la résolution de l'inflammation <sup>227</sup>.

La forme active de la vitamine D est la 1 $\alpha$ , 25 dihydroxyvitamine D3, qui intervient principalement dans l'homéostasie du calcium et du phosphore. La vitamine D exerce aussi une action anti-inflammatoire sur le système immunitaire inné en diminuant la sécrétion d'IL6 et de TNF- $\alpha$  par les monocytes et les macrophages <sup>228</sup>. La vitamine D agit aussi sur le système immunitaire adaptatif par l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B dans les lymphocytes <sup>229</sup>, d'une diminution de l'activité du facteur nucléaire des lymphocytes T activés (*nuclear factor of activated T cells*, NFAT) <sup>65,230</sup> et d'une inhibition de la production de cytokines proinflammatoires <sup>231</sup>.

### **Mutations de la superfamille du cytochrome P450 mitochondrial – un vaste ensemble de phénotypes.**

Les mutations des gènes codant pour les enzymes de la famille du cytochrome P450 sont associées à un déficit de la biosynthèse des hormones stéroïdes dans le cortex surrénalien et



les gonades <sup>232</sup> (i.e., hyperplasie congénitale lipoïde classique des surrénales). Une augmentation de l'expression de TSPO a été mesurée dans différents troubles neuropsychiatriques (e.g., MS, PD, AD, HD, ALS, schizophrénie, dépression) <sup>233,234</sup>. Dans le cadre de la RA, la fixation de [<sup>11</sup>C]PBR28 un radioligand de TSPO est augmentée dans les cellules localisées dans les articulations des patients. Cette même fixation est inversement corrélée à l'activité de la maladie lorsqu'elle est mesurée dans les cellules de la matière grise <sup>235,236</sup>. La surexpression de StAR dans les macrophages déclenche une augmentation du transfert des lipides depuis la cellule, à destination de l'apolipoprotéine A1 ainsi qu'une diminution de la production de cytokines proinflammatoires, suggérant l'implication de la protéine dans la dyslipidémie et l'athérosclérose <sup>237,238</sup>. L'expression ectopique de StAR et du cytochrome P450scc, permettant la production locale de prostaglandine E2 a été détectée durant l'endométriose <sup>239</sup>. Des niveaux réduits de transcription de StAR, P450scc et de VDAC ont été mesurés dans le modèle murin de MS par encéphalomyélite auto-immune (*autoimmune encephalomyelitis*, EAE) ainsi que dans des lésions cutanées dans le cadre du psoriasis <sup>240,241</sup>.

La détection des hormones stéroïdes sanguines et de leurs intermédiaires métaboliques par chromatographie en phase liquide associée à la spectrométrie de masse (*liquid chromatography–tandem mass spectrometry*, LC–MS/MS) a identifié le 11-deoxycortisol comme un potentiel biomarqueur dans le diagnostic des corticosurrénales <sup>242</sup>. Les mutations de CYP11B1 ont été associées à l'hyperplasie congénitale des surrénales <sup>243</sup>. Les troubles liés à la production excessive de glucocorticoïdes, tels que la maladie de Cushing sont traitées à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques de CYP11B1 <sup>244</sup>.

Les déficiences congénitales en *corticosterone methyl oxidase* sont liées à des mutations autosomiques rares de l'aldostérone synthase. Cette maladie est caractérisée par une déficience en minéralocorticoïdes, une dérégulation de l'excrétion du sodium, une hyperkaliémie et une élévation de la rénine circulante <sup>245,246</sup>. Plusieurs polymorphismes du gène codant CYP11B2 sont associés aux troubles hypertensifs <sup>247,248</sup>. L'hyperaldostérolisme familial de type I est une maladie issue de l'expression d'une chimère résultant de la fusion des gènes codant pour les protéines CPY11B1 et -B2 associée à

une production forte production d'aldostérone associée à une hypertension, réversibles par l'administration de glucocorticoïdes <sup>249</sup>.

Les mutations de CYP27A1 sont associées à une maladie rare, la xanthomatose cérébrotendineuse. Cette maladie est caractérisée par des troubles neurologiques ainsi qu'une diminution de la production d'acides biliaires ainsi <sup>250</sup>. Chez les patients infectés par le virus de l'hépatite C, l'expression de CYP27A1 est inversement corrélée au stade d'avancement de la fibrose hépatique <sup>251</sup>. Les variations de l'expression de CYP27A1 associées aux cancers, avec par exemple une perte de l'enzyme observée dans certains cancers de la prostate <sup>252</sup>. À l'inverse, l'expression de CYP27A1 permet la réduction de la progression tumorale dans un modèle murin de cancer du sein, en lien avec l'inhibition de la production de 27-hydroxycholesterol (27-OH) par la protéine <sup>253</sup>. Aussi, l'accroissement des niveaux de 27-OH dans différentes pathologies telles que la PD, l'hypercholestérolémie et le stress semble indiquer que CYP27A1 est une protéine d'intérêt dans ces maladies <sup>254,255</sup>.

Les déficits en vitamine D associés aux rachitismes de types 1A, ainsi que certaines maladies auto-immunes (i.e., MS, maladie d'Addison, thyroïdite de Hashimoto, maladie de Graves et diabète de type 1) peuvent être provoqués par différentes mutations de CYP27B1 <sup>256-260</sup>. L'expression de CYP27B1 est induite par la stimulation de la voie NF-κB dans la muqueuse du colon <sup>261</sup>. Des travaux de recherche récents ont associé l'augmentation des niveaux de parathormone circulante observés dans le cadre de la sénescence avec une diminution de la biosynthèse de la vitamine D due à une diminution de l'expression de CYP27B1 et CYP24A1 <sup>262</sup>. De par l'implication de la protéine dans le catabolisme de la vitamine D, les mutations de CYP24A1 sont associées à l'hypercalcémie, l'hypercalciurie et à la lithiase néphrétique caractéristiques de l'hypercalcémie néonatale idiopathique <sup>263-265</sup>. Le SNP rs2248137 a été associé avec une réduction des niveaux de vitamine D, l'asthme, la MS et les cancers de la thyroïde <sup>266-270</sup>. Rs4809959, est associé avec des troubles de la biodisponibilité de la vitamine D pouvant évoluer vers un SLE chez les patients avec un historique familial de lupus. Enfin, rs2762939 est associé aux syndromes coronariens aigus, mais ne provoque pas de changements des niveaux de production de la vitamine D <sup>271</sup>. Les niveaux de transcription de CYP24A1 sont fortement élevés dans les DC tolérogéniques

différenciés à partir de la différenciation par la vitamine D3 de PBMC isolés de patients atteints de MS <sup>272</sup>.

## **Une source de chaleur sans frissons.**

### **La thermogénèse mitochondriale, une méthode de régulation de la signalisation par les espèces réactives à l'oxygène.**

Hors de l'ETC, la mitochondrie est capable de réguler le gradient transmembranaire de protons à l'aide de la famille des protéines de découplage (*uncoupling proteins*, UCP) (**Figures 1 et 4**). Cette famille comporte cinq homologues désignés UCP-1 à UCP-5 (ce dernier étant parfois désigné sous l'appellation *mitochondrial carrier protein-1*, BMCP1). Dans les tissus adipeux bruns et beiges, la protéine UCP-1 permet la fuite de protons à destination de la MM sans passer par le complexe V, occasionnant la dissipation d'énergie libre par thermogénèse sans frissons. L'activité d'UCP-1 est régulée par les concentrations en acides gras et en ATP <sup>273</sup>.

Les activités des protéines UCP-2 et -3 sont régulées à la hausse par la présence de radicaux superoxyde générés par l'OxPhos <sup>274,275</sup>. UCP-2 ne contribue pas à la thermogénèse, mais permet l'antiport d'aspartate, de malate ou d'oxaloacétate à destination de l'IMS en échange de phosphate <sup>276</sup>.

Les protéines UCP-2 et -5 permettent de diminuer la formation de mtROS. UCP-2 et -4 ont été impliquées dans la signalisation mitochondriale médiée par le MCU <sup>277</sup>.

### **Stress oxydatif et inflammation.**

La polarisation des macrophages vers leur phénotype proinflammatoire M1 est dépendante d'une voie de signalisation médiée par la production de mtROS résultant d'une diminution de l'expression de protéine UCP-2 <sup>278</sup>. Ce même mécanisme est impliqué dans la libération d'histamine par les mastocytes <sup>279</sup>. Les souris déficientes pour UCP-2 présentent une résistance accrue à l'infection par les pathogènes *Listeria monocytogenes* et *Toxoplasma gondii*, en lien avec une perte de la régulation dépendante des mtROS de la production de cytokines proinflammatoires. Les souris déficientes pour UCP-2

injectées avec du LPS présentent une augmentation de l'expression des cytokines proinflammatoires IL1 $\beta$ , IL2, IL6, IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  <sup>278-280</sup> ainsi qu'une diminution d'IL4 anti-inflammatoire <sup>281</sup>. UCP-2 semble aussi exercer une action protectrice à l'encontre des dommages oxydatifs observés dans le cadre de l'inflammation dans un modèle induit de colite par le *dextran sulfate sodium* (DSS) <sup>282</sup>. La signalisation dépendant d'UCP-2 semble aussi influencer la réponse immunitaire adaptative, car la suppression de la protéine dans différents modèles murins provoque une augmentation de la migration et de la différenciation des lymphocytes T ainsi que les réponses immunitaires <sup>280,283</sup>.

### **Dérégulation de la thermogénèse mitochondriale, neuroinflammation et stress oxydatif.**

De par leur régulation du gradient de protons, les mutations des protéines de la superfamille des UCP sont généralement associées à des dysfonctions du métabolisme mitochondrial et de la production de mtROS. Dans des adipocytes isolés à partir de lipomes de patients souffrant de lipomatose multiple symétrique, la transcription d'UCP-1 semble dépendante de la présence de noradrénaline <sup>284</sup>. De même, l'expression de la protéine dans les artères d'un modèle murin d'athérosclérose est associée avec une élévation de la pression sanguine et la présence de lésions vasculaires, indiquant le rôle du stress oxydatif dans la physiopathologie de la maladie <sup>285</sup>. Les dysfonction d'UCP-1 ont aussi été incriminées dans d'autres comorbidités cardiovasculaires telles que l'obésité et le diabète *mellitus* de type 2 <sup>286,287</sup>. L'hyperthyroïdisme observé dans le cadre de la maladie de Graves-Basedow est dû à la stimulation du récepteur hormonal stimulateur de la thyroïde (*thyroid stimulating hormone receptor*, TSHR). Bien que l'orbithopathie inflammatoire typique de la maladie n'a pas été récapitulée dans un modèle murin d'immunisation contre le TSHR, les analyses par immunohistochimie ont indiqué une co-localisation des macrophages dans les régions rétrobulbaires, à proximité du tissu adipeux exprimant UCP-1 et le TSHR <sup>288</sup>.

La protéine UCP-2 est considérée comme étant un facteur important permettant la régulation du stress oxydatif dans le cadre des traumatismes cérébro-craniens, des maladies

neurodégénératives et des phénomènes d'ischémie-reperfusion<sup>289</sup>. De plus, les polymorphismes du promoteur d'UCP-2 sont aussi associés aux schizophrénies<sup>290</sup> ainsi qu'à deux maladies inflammatoires caractérisées par la présence de stress oxydatif; l'obésité et le diabète de type 2<sup>291,292</sup>. Toutefois, cette protection contre le stress oxydatif dépendant des mtROS peut s'accompagner d'une hausse de la consommation d'oxygène secondaire au découplage mitochondrial ("*leak respiration*"), de dommages hypoxiques aux reins dans un modèle murin de diabète de type 2<sup>293</sup>, ainsi que dans des cultures cellulaires de myoblastes de rat<sup>294</sup>.

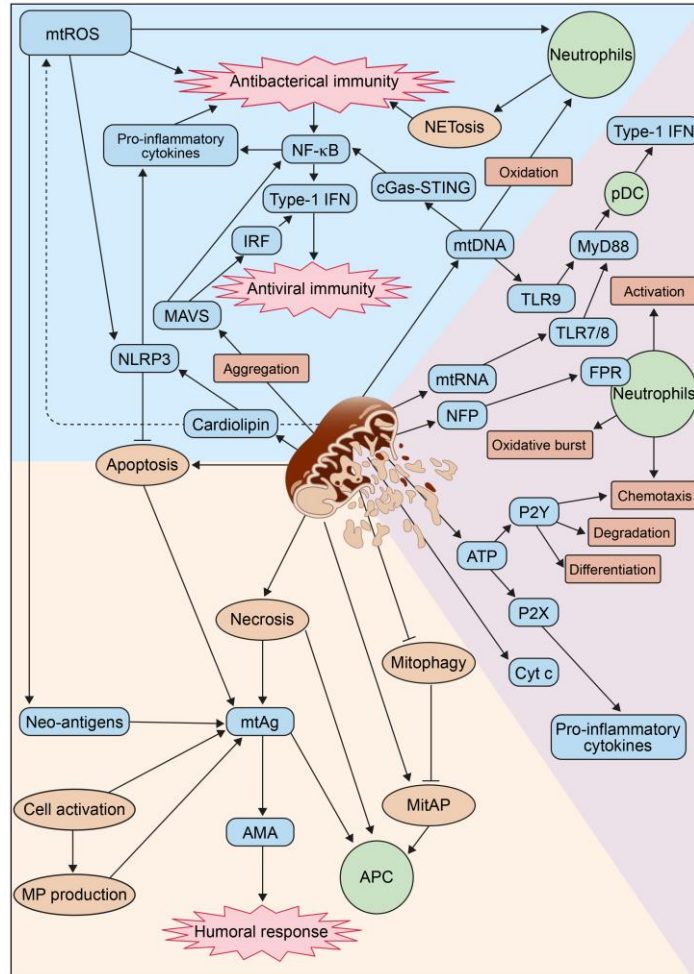
De même, les polymorphismes mononucléotidiques (*single-nucleotide polymorphism*, SNP) du gène codant la protéine UCP-3 ont été associés avec l'obésité<sup>295</sup>. L'expression de la protéine est aussi altérée lors de l'hypoxie<sup>296</sup>. La transcription d'UCP-3 est élevée dans un modèle de rat de syndrome sérotoninergique iatrogène<sup>297</sup>.

Les SNPs du gène codant UCP-4 ont été rapportés comme protecteurs contre la schizophrénie<sup>290</sup>.

## Une plateforme de signalisation antimicrobienne.

Les fonctions mitochondriales permettent aussi de participer à la réponse immunitaire dirigée contre certains pathogènes. Ainsi, la réciprocité de la stimulation des voies métaboliques permettant la formation de mtROS et de ROS cytosoliques par la *NADPH oxidase* est nécessaire à la coordination de la réponse antibactérienne médiée par les neutrophiles. De plus, la contribution des mtROS a été mise en évidence dans la dégranulation des neutrophiles, la NETose<sup>298</sup>, l'inhibition de NF-κB sur la mort cellulaire programmée par apoptose<sup>299</sup>, et la production de cytokines<sup>300</sup> (**Figures 1 et 7**).

Les mitochondries contribuent aussi à la réponse antivirale; l'ARN double brin déclenche la polymérisation de l'inflammasome *nod-like receptor protein 3* (NLRP3), son ancrage aux protéines antivirales mitochondriales (*mitochondrial antiviral-signaling*, MAVS) localisées à la surface de l'organelle<sup>301</sup>, permettant la production d'IFN de type I par la voie NF-κB et d'IL1β par la casp-1<sup>302</sup> (**Figures 1, 6 et 7**).



**Figure 7. La mitochondrie, Mr. Jekyll contribuant à la réponse immunitaire et Dr. Hyde aux influences proinflammatoires.**

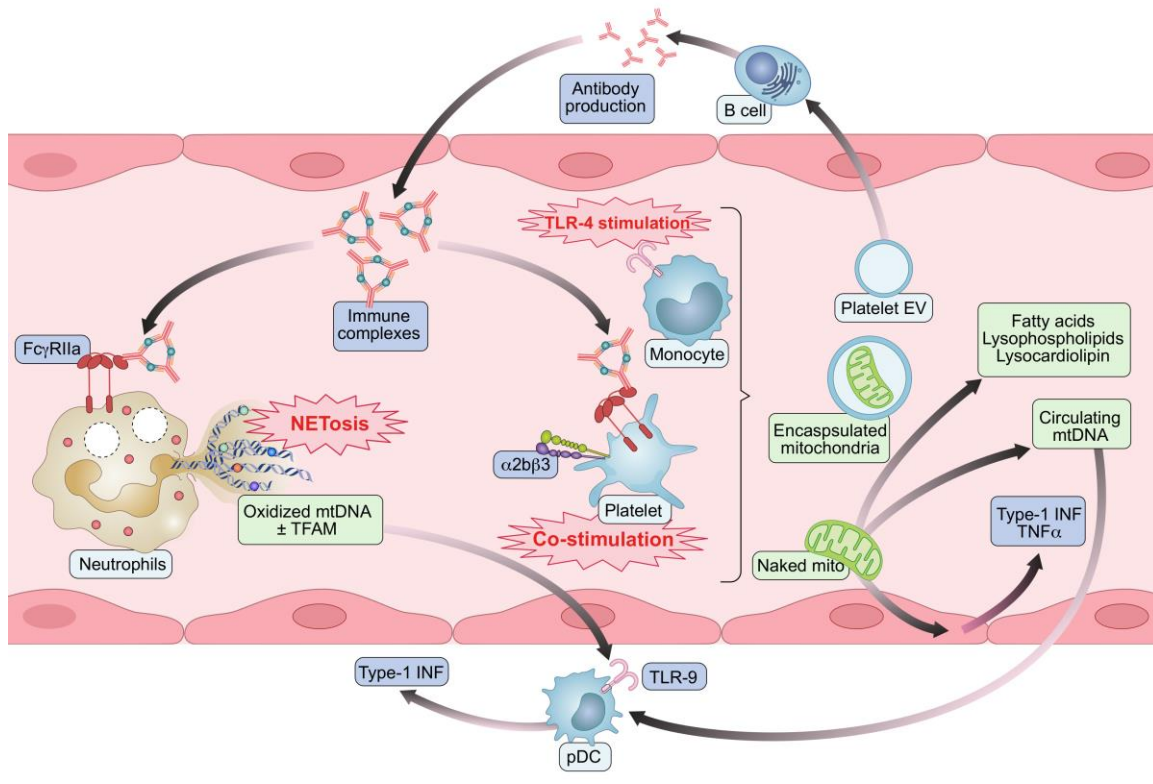
(Fond bleu) Bien que les mitochondries contribuent à des voies métaboliques qui concourent à l'établissement de la réponse immunitaire normale, les mitochondries peuvent aussi être ciblées par le système immunitaire. (Fond rose) Les caractéristiques bactériennes de la mitochondrie peuvent être reconnues comme motifs associés aux dangers (mtDAMPs) par le système immunitaire inné, déclenchant ainsi une réponse proinflammatoire. (Fond orange) Une réponse immunitaire humorale anti-mitochondriale a été identifiée dans différents contextes d'auto-immunité. Les autoanticorps anti-mitochondriaux (*anti-mitochondrial antibodies*, AMA) peuvent reconnaître des épitopes mitochondriaux natifs ainsi que des néoantigènes formés suite à un stress oxydatif. *Figure modifiée à partir de Becker, Y. L. C., Duvvuri, B., et al. Nat Rev Rheumatol. (2019). En révision (N° de dossier NRR-22-017V1).*



## **La mitochondrie, une organelle d'origine procaryote qui peut être reconnue par le système immunitaire.**

La mitochondrie étant une organelle intracellulaire, elle est – en temps normal – hors de portée du système immunitaire. Toutefois, des éléments extracellulaires de nature mitochondriale (i.e., organelles entières intactes et fonctionnelles ou des biomolécules isolées) <sup>303-305</sup> ont été détectés chez les patients hospitalisés en unité de soins intensifs (e.g., traumas, sepsis, brûlures), ainsi que dans les concentrés plaquettaires <sup>303,304</sup>. L'origine de ces composantes mitochondriales provient de la fuite du contenu cytoplasmique des cellules nécrotiques dans les tissus endommagés <sup>306-309</sup> ainsi que de leur extrusion lors de l'activation de différentes lignées cellulaires <sup>298,310-315</sup>. Ainsi, ces éléments mitochondriaux extracellulaires pourront être soit empaquetés au sein d'un système membranaire, soit libres ; en contact direct avec le milieu <sup>305</sup> (**Figure 8**).

L'origine procaryote de la mitochondrie a conféré à l'organelle différentes caractéristiques bactériennes. La présence dans la circulation de ces motifs moléculaires mitochondriaux associés au danger (*mitochondrial damage associated molecular patterns*, mtDAMP) est généralement indicatrice d'une situation nécessitant une réponse immunitaire. Ainsi, la reconnaissance des mtDAMPs par la reconnaissance des mitochondries extracellulaires ou de leurs biomolécules par le système immunitaire innée pourra être à l'origine d'une réponse proinflammatoire (**Figure 7, fond rouge et figure 8**).



**Figure 8. Libération de mitochondries intactes et de composants mitochondriaux proinflammatoires dans le cadre du SLE .**

L'activation de nombreuses lignées cellulaires permet la libération de mitochondries intactes ou de composants mitochondriaux dans le milieu extracellulaire où elles pourront contribuer à la production d'AMA ainsi qu'à la formation de complexes immuns (ICs). La co-stimulation des plaquettes par les ICs et le fibrinogène permet le recrutement de plaquettes dans les reins et la production de plusieurs types de vésicules extracellulaires claires ou contenant une mitochondrie ainsi de mitochondries extracellulaires « nues ». Les mitochondries extracellulaires pourront servir de substrat à la *secreted phospholipase 2-IIa* (i.e., sPLA2-IIa) et contribuer à la libération de mtDNA ainsi qu'à la production d'acides gras et de lysophospholipides (e.g., lysocardiolipine) proinflammatoires. Un mécanisme similaire peut être observé avec les monocytes. Au cours de la NETose, les neutrophiles actives relarguent un filet d'acides nucléiques contenant du mtDNA oxydé qui pourra déclencher la production d'IFN de Type I par les pDCs. *Figure issue de Becker, Y. L. C., Duvvuri, B., et al. Nat Rev Rheumatol. (2019). En révision (N° de dossier NRR-22-017V1).*

## Les acides nucléiques et les ribonucléoprotéines mitochondriales

Le génome mitochondrial, très conservé chez les mammifères, est évolutivement issu de celui d'une  $\alpha$ -protéobactérie. Ainsi la bactérie moderne dont le génome est le plus proche du mtDNA est *Rickettsia prowazekii*<sup>13</sup>, un pathogène responsable du typhus. Le mtDNA humain est constitué de plusieurs milliers de copie d'un ADN doubles-brins circulaire constitué de 16,569 paires de bases (*base-pair*, b.p.) et caractérisé par la présence d'îlots de motifs cytosine-phosphate-guanine (CpG) hypométhylés<sup>316</sup>. Le mtDNA code 37 gènes (i.e.,: 2 rRNA, 22 tRNA, et 13 protéines impliquées dans l'OxPhos)<sup>317-320</sup>. Le mtDNA ectopique peut stimuler deux voies de signalisations proinflammatoires, selon le fait qu'il soit cytosolique ou bien extracellulaire.

La formation de macropores mitochondriales au cours de l'apoptose permet la libération du mtDNA dans le cytosol où il se fixera sur la guanosine monophosphate-adénosine monophosphate synthase (cGAS). La liaison mtDNA-cGAS permettra la formation de GMP-AMP cyclique (cGAMP), un second messager permettant la signalisation *via* STING. La voie de signalisation cGAS-STING stimule l'activation d'IRF3 et de NF- $\kappa$ B, permettant la production d'IFN de type I<sup>321,322</sup>. Il est intéressant de noter que la signalisation par la voie métabolique cGAS-STING est plus forte lorsque le mtDNA est oxydé<sup>298</sup>, à l'image du mtDNA identifié dans les NETs isolés de patients lupiques<sup>298,311</sup>.

La capture des mitochondries et du mtDNA extracellulaires par endocytose aboutira à la présence, dans l'endosome, de mtDNA qui pourra se fixer à un récepteur de reconnaissance des pathogènes (*pathogen recognition receptor*, PRR) – le *Toll-like receptor-9* (TLR-9). Cette reconnaissance aboutira à la stimulation d'une voie de signalisation mobilisant MyD-88 et NF- $\kappa$ B et aboutissant à la production d'IFN de type I. La transcription du mtDNA permet la génération d'ARN polycistroniques qui seront ensuite maturés en mtRNA<sup>11,12</sup>, ligand des TLR-7 et -8<sup>323,324</sup>.

Le facteur de transcription mitochondrial TFAM est un homologue de la famille du *high mobility group box* (HMGB) impliqué dans l'empaquetage du mtDNA en structures (i.e., les nucléoïdes) permettant la régulation de la réplication et de la transcription du mtDNA<sup>325</sup>. La fixation de TFAM sur le mtDNA confère au complexe des structures

tertiaires et ternaires qui renforcent l'activité des voies de signalisation proinflammatoires 311,326-329.

La présence de mtDNA circulant a été décrite dans différents troubles inflammatoires tels que la RA 330,331, les cancers 332,333, les maladies neurodégénératives 334-337 et cardiovasculaires 338, le diabète de type-2 339,340, l'infection par le VIH 341, les hépatopathies 342, les traumatismes 343, les brûlures sévères 344, le sepsis 345, la sénescence 346 et le stress 347,348. Les perturbations de la mitophagie liées aux déficits en PINK1 observées dans les maladies chroniques du poumon ont été associées avec une augmentation des mtROS, et à la libération de mtDNA endommagé dans le milieu extracellulaire, aboutissant à une augmentation de la stimulation du TLR-9 349. Les acides nucléiques mitochondriaux circulants ont été considérés comme des biomarqueurs d'intérêt dans l'établissement d'un pronostic pour les cancers de la prostate 350. Enfin, la double stimulation des TLR-7 et -9 exprimés par les neutrophiles et les DC plasmacitoïdes déclenche la production d'IFN- $\alpha$ , cytokine signature du SLE 351-353, stimulation qui est inhibée par hydroxychloroquine – un antipaludéen communément administré aux patients souffrants de maladies rhumatismales 354,355.

### **La mitochondrie, unique source de peptides N-formylés endogènes**

À l'instar des procaryotes, la synthèse mitochondriale des protéines codées par le mtDNA est initiée à l'aide d'un *N-formylmethionyl-tRNA* 356. Cette spécificité fait que la mitochondrie est le seul compartiment cellulaire capable de produire et de séquestrer des peptides N-formylés (*N-formylated peptides*, NFP). Ces peptides sont spécifiquement reconnus par une famille de récepteurs (*formyl peptide receptors*, FPR) couplés aux protéines G (*G-protein coupled receptors*, GPCR) principalement exprimée à la surface des neutrophiles, mais aussi sur les monocytes, les DC, le foie et le cerveau 357. Chez l'humain, les récepteurs FPR-1 et -2 déclenchent la libération de Ca<sup>2+</sup> dans le cytosol, permettant la migration et l'activation des neutrophiles 358.

## **La cardiolipine, un phospholipide spécifiquement mitochondrial**

La cardiolipine est l'un des principaux phospholipides qui entrent dans la composition des parois bactériennes. Chez l'humain en santé, la cardiolipine est uniquement détectée au sein de la MIM dont elle permet les repliements en crêtes. La cardiolipine étant un phospholipide anionique, elle présente des charges permettant les interactions non covalentes, contribuant à de nombreuses fonctions mitochondriales.

La cardiolipine est impliquée dans la dynamique mitochondriale en régulant la fusion entre les MOM de deux mitochondries par les Mfn; régulation qui sera levée par l'hydrolyse de la cardiolipine en acide phosphatidique par la mitoPLD <sup>26</sup>. Les interactions entre la cardiolipine et OPA-1 contribuent par ailleurs la fusion des MIM <sup>359</sup>, et l'affinité de Drp1 pour la cardiolipine permet la fission mitochondriale <sup>360</sup>. La cardiolipine possède aussi un rôle structural dans l'OxPhos en permettant le regroupement des complexes III et IV de l'ETC en *clusters*, appelés supercomplexes respiratoires <sup>361</sup>. Au cours de l'apoptose précoce, le cyt c subit des changements de conformations dus à la cardiolipine, nécessaires à la signalisation spécifique à cette voie biologique <sup>362</sup>. La migration de cardiolipine à la surface des mitochondries oxydées est aussi impliquée dans l'assemblage et l'activation de l'inflammasome NLRP3 <sup>363</sup> et, en aval, à la production de cytokines proinflammatoires médiée par la casp-1 <sup>364</sup>. L'abondance de liaisons covalentes non saturées au sein de la cardiolipine rend cette molécule sensible à l'oxydation, ainsi, la présence de cardiolipine oxydée est observée à la surface des corps apoptotiques <sup>187</sup>.

## **Libération d'ATP dans le milieu extracellulaire**

En sa qualité de centrale énergétique de la cellule, la mitochondrie transforme les nutriments en une forme stockable d'énergie, l'ATP. Les concentrations physiologiques en ATP varient d'un facteur mille, d'un compartiment à l'autre – de l'ordre du nanomolaire (nM) dans le milieu extracellulaire, jusqu'au micromolaire ( $\mu$ M) au sein du cytosol. La présence d'ATP extracellulaire est due à sa libération passive lors de dommages tissulaires, à sa libération *via* les macropores durant la mort cellulaire programmée par apoptose ou après

activation de certaines lignées cellulaires. L'ATP extracellulaire sera reconnue par les récepteurs purinergiques membranaires des familles P2X et P2Y <sup>365</sup>.

La famille des canaux ioniques sélectifs P2X comporte sept membres dont P2X7 est le plus extensivement étudié dans le cadre des réponses immunitaires <sup>366</sup>. La reconnaissance de l'ATP extracellulaire par P2X7 déclenche la libération de potassium intracellulaire, une augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique, l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la libération de cytokines proinflammatoires (e.g., IL1 $\beta$ , IL6, IL8, MCP1) <sup>306,367,368</sup>. Le blocage expérimental de P2X7 permet une réduction des symptômes de l'EAE, des maladies cardiovasculaires et de l'uvéite auto-immune <sup>369-371</sup>.

Huit différents GPCR sont inclus, chez les mammifères, dans la famille P2Y <sup>372</sup>. La voie de signalisation des récepteurs P2Y mobilisera la protéine Gq qui, à son tour, activera la phospholipase C (PLC) <sup>373</sup>. Cette voie aboutira à la différenciation cellulaire, à la chimiotaxie et à la dégranulation <sup>374-376</sup>. Cette famille de récepteurs a été impliquée dans deux modèles murins d'auto-immunité; l'EAE et le syndrome de Sjögren (*Sjögren's syndrome*, SS) induit par la surexpression de l'IL14 $\alpha$  <sup>377,378</sup>.

## **Le cytochrome c extracellulaire**

Parmi les différents composants mitochondriaux libérés au cours de la mort cellulaire (i.e., autre que l'apoptose), le cyt c a été détecté dans différents troubles inflammatoires <sup>379</sup>. Bien que la voie métabolique exacte impliquée dans la réponse immunitaire innée induite par le cyt c reste à caractériser, des travaux semblent indiquer que le cyt c a la capacité de se fixer à une protéine plasmatique, la *leucine-rich  $\alpha$ 2 glycoprotein*, dont une élévation a été observée durant l'inflammation <sup>380,381</sup>. Dans un modèle murin, l'injection intra-articulaire de cyt c induit une forme d'arthrite dépendante de la voie NF- $\kappa$ B <sup>382</sup>. Le repertoire des autoanticorps circulants, chez les patients lupiques comporte des IgGs reconnaissant le cyt c <sup>383</sup>.

## Les espèces réactives à l'oxygène mitochondriales

Au-delà de leur implication dans les réponses immunitaires normales, les mtROS peuvent perturber l'homéostasie, soit indirectement par l'oxydation des acides nucléiques mitochondriaux – aboutissant à l'expression de protéines aberrantes, et/ou directement – par l'oxydation post-transcriptionnelle des protéines et la peroxydation des lipides du milieu environnant <sup>384-386</sup>. L'ensemble de ces événements peut aboutir à la génération de néoantigènes pouvant stimuler le système immunitaire, selon les notions du « non-soi » et du « soi altéré ».

L'accumulation de succinate au cours de l'ischémie et son oxydation rapide par la *succinate dehydrogenase* (i.e., le complexe II de l'ETC) au cours de la reperfusion a été précédemment identifiée comme étant la source d'une bouffée massive de mtROS <sup>387</sup>. Les dysfonctions oxydatives sont aussi associées à la maladie pulmonaire obstructive chronique, aux maladies neurodégénératives <sup>388,389</sup>, ainsi qu'à plusieurs maladies auto-immunes <sup>298,311,385,390-392</sup>.

## **Les antigènes mitochondriaux peuvent être la cible d'une réponse immunitaire humorale.**

Tandis que les caractéristiques procaryotes de la mitochondrie permettent de stimuler une réponse proinflammatoire de la part du système immunitaire inné, les biomolécules mitochondriales peuvent aussi stimuler le système immunitaire adaptatif et ainsi monter une réponse humorale comportant des anticorps anti-mitochondriaux (*anti-mitochondrial antibodies*, AMA) (**Figure 7, fond orange**).

### **La présentation des antigènes mitochondriaux, un mécanisme controversé**

À l'origine, la mitophagie était décrite comme le mécanisme à l'origine de la production, de l'apprêtement et de la présentation des épitopes mitochondriaux (*mitochondrial antigen presentation*, mitAP) par le MHC-I<sup>393</sup>. Toutefois, l'implication de cette voie est controversée, car des études récentes indiquent que, dans les APC, la mitophagie pourrait en fait réprimer la mitAP. Cette inhibition est exercée *via* la dégradation de Snx9 médiée par le couple PINK-1/Parkine. Les pertes de fonction du système PINK-1/Parkine provoquent le recrutement de Rab 9 et de Snx9 à la surface de la mitochondrie, au bourgeonnement de MDV qui iront fusionner avec l'endosome tardif, permettant la mitAP par le MHC-I<sup>69,349</sup>. H2-M3 est une molécule du MHC de classe Ib, suspectée de pouvoir présenter les mtAg, grâce à son affinité pour les NFP<sup>394</sup>. Additionnellement, des mtAgs présentés par le MHC-II ont été détectés au sein de tumeurs<sup>395</sup>. La délétion de la  $\beta$ 2 microglobuline ou de la totalité du CD1d dans un modèle murin spontané de lupus aboutit à une réduction des autoanticorps dirigés contre la cardiolipine – soulignant l'implication du C1d dans la production de ces autoanticorps. Toutefois, cette délétion a, par ailleurs, causé un accroissement d'autres types d'anticorps ainsi que des dommages aux reins et de la mortalité<sup>396,397</sup>.



## Les anticorps anti-mitochondriaux, biomarqueurs dans la cirrhose biliaire primitive

Les anticorps anti-mitochondriaux sont principalement connus en tant que biomarqueurs ayant une valeur dans le diagnostic clinique et le pronostic de la cirrhose (ou cholangite) biliaire primitive (*primary biliary cirrhosis/cholangitis*, PBC). Toutefois, malgré la littérature extensive concernant les AMA dans la PBC, le mécanisme exact aboutissant à une réponse humorale dirigée contre les antigènes endogènes d'origine mitochondriale est encore méconnu. Les premières descriptions mentionnent concernant les AMA remontent à 1965 et à la description de la présence d'anticorps sériques capables de se fixer aux cellules riches en mitochondries chez des patients atteints de PBC. Cette fixation a été décrite comme pouvant être inhibée par la compétition avec des mitochondries isolées à partir de foie de rat<sup>398</sup>. Depuis, différents autoanticorps anti-mitochondriaux ont été caractérisés et/ou détectés dans le cadre de différentes pathologies. Neuf classes d'anticorps anti-mitochondriaux sont classiquement décrites; numérotées AMA-M1 à -M9, selon leurs caractéristiques spécifiques : cible(s), contexte clinique et/ou pathologique, aspect en immunofluorescence indirecte (*indirect immunofluorescence*, IIF), bandes observées en immunobuvardage et/ou par leur capacité à fixer le complément<sup>1-3,5,399</sup>.

Les anticorps anti-mitochondriaux observés dans la PBC ciblent différents mtAgs, la plupart étant localisés dans la MIM. Quatre AMA sont actuellement décrits dans la maladie : AMA-M2, -M4, -M8 et -M9. Les cibles connues de l'AMA-M2 sont le complexe *2-oxo acid dehydrogenase*, le complexe *2-oxoglutaric acid dehydrogenase* et la sous-unité E2 du PDC (*PDC-E2 subunit*, PDC-E2); ce dernier étant l'épitope immunodominant de l'AMA-M2<sup>400</sup>. La formation de néoantigènes suite à l'oxydation de PDC-E2 lors de l'apoptose des cholangiocytes a été décrite<sup>401</sup>. Les AMA-M2 peuvent être détectés par IIF et par dosage immuno-enzymatique (*enzyme-linked immunoassays*, ELISA). La positivité pour les AMA-M2 est un des trois critères cliniques recherchés dans le diagnostic de la PBC. Les anti-M2 étant le type d'AMA le plus utilisé en clinique, il est fréquent que ces autoanticorps soient, à tort, désignés par métonymie « AMA »<sup>402</sup>. La *sulfite oxidase*, mtAg reconnu par les AMA-M4 est localisé dans l'IMS<sup>403</sup>. Les AMA-M4 ont été découverts, associés aux AMA-M2<sup>404</sup> dans les formes mixtes des maladies cholestatiques

auto-immunes et sont associés au degré de progression de la maladie <sup>405,406</sup>. Les AMA-M8 se fixent sur un mtAg localisé dans la MOM dont la nature n'est pas connue, à l'heure actuelle <sup>407</sup>. Les AMA-M8 sont détectés à l'aide d'un ELISA utilisant des extraits de MOM isolés à partir de reins porcins et confirmés par un test de fixation du complément (*complement fixation test*, CFT) et leur positivité est associée avec les formes progressives de la PBC <sup>399</sup>. Enfin, les AMA-M9, spécifiques de la glycogène phosphorylase, sont associés aux formes asymptomatiques de la PBC lorsqu'ils sont détectés isolément. Lorsqu'ils sont détectés concomitamment aux AMA-M2, les anti-M8 sont prédicteurs d'une forme de PBC de moindre agressivité. La combinaison des AMA exprimés par les patients atteints de PBC permet la prédiction de l'évolution de la maladie, ainsi qu'à la réponse aux traitements (e.g., acide ursodeoxycholique et corticostéroïdes) des patients <sup>406</sup>.

### **Les anticorps anti-mitochondriaux, un répertoire observé dans les maladies infectieuses, auto-immunes, les cardiopathies et les troubles iatrogènes.**

Au début du XXe siècle, les scientifiques allemands August Paul von Wassermann, Albert Neisser et Carl Bruck ont développé la réaction dite « de Wassermann-Neisser-Bruck » – un test sérologique permettant le dépistage de la syphilis. Les premières versions de ce test utilisaient comme source d'antigènes des extraits de foies d'enfants décédés de la syphilis. La cible antigénique reconnue par les anticorps détectés par ce test a par la suite été caractérisée comme étant la cardiolipine – un phospholipide d'origine mitochondriale <sup>90,408</sup>. Les anticardiolipines (*anticardiolipin antibodies*, aCL) constituent une famille hétérogène d'autoanticorps dont certains membres présentent des réactivités croisées avec certaines structures biochimiques retrouvées dans les acides nucléiques ou dans des complexes protéines-phospholipides [e.g., *beta-2 glycoprotein I* ( $\beta_2$ GPI)] <sup>409</sup>. Alors que l'origine de la majorité des aCL est inconnue, les AMA-M1 constituent une sous-classe développée suite à une infection et dépourvue de réactivités croisées <sup>399</sup>. Les aCL polyréactifs sont couramment testés dans le cadre de deux maladies auto-immunes; le syndrome des antiphospholipides (*antiphospholipid syndrome*, APS) et le SLE <sup>410,411</sup>. Dans ces deux maladies, les niveaux des différents isotopes d'aCL (i.e., IgM, IgG et IgA) sont associés avec

des troubles thromboemboliques récurrents ainsi qu'à des complications obstétriques à répétition <sup>412</sup>. Les AMA-M5 sont des autoanticorps capables de fixer le complément et dirigés contre un antigène inconnu. D'abord considérés comme redondants avec les aCL, les AMA-M5 ont par la suite été identifiés comme des anticorps distincts des anticorps antiphospholipides (*antiphospholipid antibodies*, aPL), un groupe comprenant l'anticoagulant lupique (*lupus anticoagulant*, LA), les anti- $\beta_2$ GPI et les aCL] <sup>413,414</sup>. Les associations cliniques des AMA-M5 sont similaires à celles des aCL (i.e., thromboses et avortements) <sup>415</sup>.

D'autres types d'AMA ont été décrits, toutefois, la littérature les concernant est plus succincte. Des anticorps dirigés contre la *sarcosine dehydrogenase* (i.e., AMA-M7) ont été observés chez des patients souffrant de maladies cardiovasculaires <sup>416-419</sup>. Deux autres types d'AMA ont été décrits suite à des complications iatrogènes : les AMA-M3 ont été caractérisés dans le cadre des pseudolupus induits par le vénocuran <sup>420</sup>, et les AMA-M6 spécifiques de la *monoamine oxidase B* (MAO B) mitochondriale chez des patients traités avec de l'Iproniazid, un inhibiteur des MAO (IMAO) <sup>421</sup>. Ces deux types d'autoanticorps ne sont plus détectés chez des patients, à l'heure actuelle, les deux drogues ayant été retirées du marché à cause de leurs effets secondaires.

En plus des anticorps anti-mitochondriaux suivant la nomenclature des AMA, d'autres anticorps dirigés contre des mtAg sont présents dans la littérature. Des anticorps dirigés contre la protéine de choc thermique de 60 kDa mitochondriale (*60 kDa heat-shock protein*, HSP60) sont présents chez les patients atteints de SLE, et associés à des troubles thrombotiques lorsqu'ils sont associés à d'autres aPL <sup>422,423</sup>. Des anticorps dirigés contre la sous-unité O de l'ATP synthase ont été détectés dans le modèle murin d'EAE <sup>424</sup>. Les anticorps dirigés contre la *lactase dehydrogenase C4*, exprimée par les spermatozoïdes, ont été associés à une réduction de la fertilité dans un modèle de femelles de babouins immunisées <sup>425</sup>. Les anticorps dirigés contre CYP11A1 ont été observés dans les maladies polyglandulaires auto-immunes de type I (*autoimmune polyglandular disease type I*, APD-I) et les polyendocrinopathie auto-immunes de type 1 (*autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*, APECED) <sup>426,427</sup>.

## **Les anticorps naturels anti-mitochondriaux, une réponse humorale entre immunité innée et adaptative**

Bien que la réponse humorale soit généralement associée à l'immunité adaptative, il existe un sous-groupe d'anticorps, dits « naturels », ayant été décrits comme produits en l'absence d'immunisation préalable. Ces anticorps ont été décrits comme produits par les lymphocytes B1 (i.e., *B1-cells*) qui présentent de substantielles variations de marqueurs de surface entre les espèces, complexifiant la caractérisation de la contribution de ces cellules au répertoire des anticorps circulants. Chez l'homme, deux phénotypes sont décrits : [CD20<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup>, CD70<sup>-</sup>] et [CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>, CD38<sup>faible/moyen</sup>, CD43<sup>+</sup>] <sup>428,429</sup>, toutefois, la caractérisation de ces cellules chez l'humain reste controversée <sup>430-432</sup>. Selon les modèles, les lymphocytes B1 suivraient la même maturation que les lymphocytes B « classiques » (i.e., lymphocytes B2, *B2-cells*) <sup>433</sup>, seraient fonctionnels de façon constitutive - sans nécessité de stimulation et de maturation <sup>434</sup>, ou que les lymphocytes B1 doivent être activés par un PRR <sup>435</sup>. Les anticorps naturels sont surtout représentés par des IgMs – toutefois, des IgGs (i.e., principalement IgG<sub>3</sub>, mais aussi -1, -2 et -4) et IgAs (i.e., IgA<sub>1</sub> et -2) sont aussi décrits. Le répertoire des anticorps naturel est, par ailleurs bien plus restreint que celui des anticorps « classiques » car leurs segments variable, divers et jonctionnel (i.e., V, D et J) sont exprimées telles que codées (i.e., elles ne présentent peu ou pas de traces du phénomène d'hypermutation somatique) <sup>436,437</sup>. Selon les segments V exprimés, les anticorps naturels pourront exprimer différentes spécificités (e.g., PC, LPS, phospholipides oxydés). Contrairement aux anticorps classiques, les anticorps naturels sont de faible affinité, mais la flexibilité de la poche de fixation de l'antigène leur permet une polyréactivité à la fois contre des allo- et des autoantigènes, leur conférant ainsi une forte avidité <sup>438</sup>. Ainsi, les anticorps naturels sont décrits comme permettant à la fois de protéger l'organisme contre les pathogènes, et de clarifier les sources d'autoantigènes en circulation (e.g., vésicules ou débris extracellulaires) <sup>187,439-441</sup>. Enfin, parmi le répertoire des anticorps naturels, un représentant a été caractérisé comme ayant une réactivité croisée entre des protéines mitochondriales ou bactériennes <sup>442-445</sup>. Les anticorps anti-mitochondriaux naturels sont parfois identifiés sous l'acronyme anglais NOMA (*naturally occurring mitochondrial antibodies*).

## Exemples de techniques de laboratoire permettant l'étude de la mitochondrie.

La mitochondrie étant impliquée dans de nombreuses voies biologiques, elles pourront être étudiées sous plusieurs abords à l'aide d'approches expérimentales appropriées. Cette section n'a pas vocation à être un inventaire exhaustif et pas-à-pas des protocoles d'étude de la mitochondrie, mais plutôt un ensemble de suggestions de pistes pour aiguiller le lecteur sur le choix d'un protocole d'étude.

**Isolation de l'organelle :** Différents types d'isolations de la mitochondrie existent. Ces protocoles utiliseront principalement une méthode d'isolation par centrifugations différentielle. Cette technique repose sur l'utilisation d'un tampon dont la viscosité permettra l'isolation des différentes composantes cellulaires par centrifugation, selon leurs densités respectives, permettant l'isolation de mitochondries, dites « brutes » (*crude mitochondria*)<sup>446,447</sup>. Les zones de contact entre la mitochondrie et l'ER peuvent cependant subsister ; les MAM contaminantes pourront être séparées des mitochondries, dites « pures » à l'aide d'une étape d'ultracentrifugation dans un tampon contenant du Percoll™<sup>448,449</sup>. D'autres protocoles utiliseront un protocole de séparation à l'aide de billes magnétiques couplées à un anticorps monoclonal dirigé contre TOMM22<sup>450-452</sup>. L'enrichissement en organelles est usuellement évalué à l'aide de techniques utilisant un anticorps spécifique d'une protéine mitochondriale telles que TOMM22 ou VDAC1 [e.g., : immunobuvardage (*western blotting*)].

**Morphologie :** Usuellement, l'aspect général des mitochondries est apprécié à l'aide de techniques de microscopie. La microscopie électronique à transmission (*transmission electron microscopy*, TEM) permettra l'acquisition d'une représentation bidimensionnelle de l'organelle permettant d'observer la forme des structures mitochondriales et de mesurer la taille de l'organelle<sup>453,454</sup>. Les techniques de microscopie à

balayage (*scanning electron microscopy*, SEM) permettront d'observer la mitochondrie en trois dimensions au sein de la cellule <sup>455</sup>, ou bien isolément à l'aide de techniques de cryofracture <sup>455,456</sup>. À l'instar de particules de tailles similaires, telles que les MPs, les mitochondries isolées pourront être mesurées par diffusion dynamique de la lumière (*dynamic light scattering*, DLS) <sup>457</sup>.

**Génomique :** Le mtDNA pourra être étudié par l'ensemble des techniques usuelles de génomique. La quantification relative du mtDNA pourra être réalisée à l'aide d'un ratio entre l'amplification d'un segment de mtDNA, divisée par celle d'un segment de nDNA par la technique de la réaction en chaîne de polymérisation quantitative (*quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) <sup>458</sup>. Cette procédure expérimentale permettra également de pouvoir apprécier les dommages subis par le mtDNA, ces derniers ralentissant la progression de l'ADN polymérase par rapport à un échantillon de mtDNA intact <sup>459</sup>. Le génome mitochondrial a précédemment été séquencé, et comparé à celui de *R.prowazekii* <sup>13</sup>. Les techniques utilisant des anticorps, tels que la microscopie, l'immunobuvardage et les ELISAs permettront d'évaluer les dommages oxydatifs subis par le mtDNA à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre la 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine (8OHdG), produite lors de l'oxydation de la 2'-deoxyguanosine <sup>298,460</sup>. De même, les techniques usuelles de transcriptomique [e.g., séquençage, PCR avec rétrotranscription (*reverse transcription-PCR*, RT-PCR, *microarray*)] pourront être employées pour caractériser le mtRNA <sup>12,461,462</sup>.

**Masse et dynamique mitochondriale :** Bien que les techniques de microscopie optique et électronique permettent de quantifier le nombre de mitochondries dans les cellules comportant peu de mitochondries (e.g., neutrophiles, plaquettes) <sup>463</sup>, la quantification exacte du nombre de mitochondries devient plus compliquée dans une cellule riche en organelles (e.g., hépatocytes, cardiomyocytes) et/ou vivante. Dans ce cas, l'étude du volume et/ou de l'état de fragmentation de la masse mitochondriale) en cytométrie en flux (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS). Ces techniques utiliseront un marquage à l'aide

de sondes spécifiques de la mitochondrie telle que le mitotracker, une sonde capable de pénétrer dans la mitochondrie, puis séquestrée sur place par sa liaison covalente avec les groupements thiols, provoquée par des enzymes spécifiques à l'organelle <sup>464</sup>.

**Métabolisme énergétique et potentiel de membrane :** La production d'énergie étant la fonction mitochondriale la plus étudiée, de nombreuses approches ont été développées afin d'étudier l'OxPhos. La réaction d'oxydation de la luciférine par la luciférase nécessitant la consommation d'ATP et aboutissant à l'émission de bioluminescence, l'expression de l'enzyme (e.g., à l'aide d'un plasmide) permettra de mesurer la concentration cytosolique d'ATP à l'aide d'un capteur de luminescence <sup>465,466</sup>. Des méthodes enzymatiques existent aussi et reposent sur des réactions colorimétriques catalysées en présence d'ATP, la mesure de l'oxydation du tetramethylphenylenediamine (TMPD) à 610 nm ou bien de la production de NADPH, à 340 nm <sup>466</sup>. Le 5,5',6,6'- tetrachloro-1,1',3,3'tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) est une sonde fluorescente ayant la capacité de s'agréger lorsque le potentiel de membrane mitochondrial augmente, changeant ses propriétés physiques (i.e., haut potentiel : excitation à 585 et émission à 590 nm. Bas potentiel : excitation à 510 et émission à 527 nm), de ratio des intensités de fluorescence des deux formes de la sonde permettra d'évaluer le potentiel de membrane mitochondrial en FACS ou en microscopie à fluorescence <sup>467,468</sup>. La consommation d'oxygène par la mitochondrie pourra être mesurée à l'aide d'une électrode de Clark <sup>469</sup>. Les analyseurs de flux extracellulaires, tels que les différents modèles de *Seahorse* sont des appareils efficaces dans l'étude du métabolisme cellulaire, car ils permettent à la fois la mesure du taux de consommation de l'oxygène par la mitochondrie (*oxygen consumption rate*, OCR) ainsi que le taux d'acidification du milieu (*extracellular acidification rate*, ECAR) causé par la production de lactate par la glycolyse, tout en permettant d'apprécier leurs variations respectives en temps réel par l'addition de molécules d'intérêt <sup>470-472</sup>.

**Production de biomolécules mitochondriales :** La caractérisation des métabolites mitochondriales pourra être réalisée à l'aide des techniques de spectrométrie de masse (*mass spectrometry*, MS) <sup>10,473</sup>. La détection des métabolites issus du TCA peut se faire par la détection non-invasive de l'incorporation de carbone 13 (<sup>13</sup>C) radioactif par résonance magnétique <sup>474</sup>.

**Stress oxydatif :** Les différentes voies métaboliques contrôlées par la mitochondrie pourront être à l'origine de la formation de mtROS, puis à l'oxydation de biomolécules environnantes. Le mitoSOX™ est une sonde dérivée du dihydroéthidium et possédant un groupement cationique de type triphenylphosphonium qui s'accumule spécifiquement au sein de la mitochondrie <sup>475,476</sup>. L'oxydation de cette sonde, uniquement causée par les superoxydes mitochondriaux formera une molécule fortement fluorescente (i.e., excitation : 510 nm, émission : 580 nm), détectable à l'aide des techniques impliquant la mesure de la fluorescence <sup>298</sup>. Toutefois, des précautions expérimentales doivent être prises avec le mitoSOX™, car la sonde peut perturber les fonctions cellulaires <sup>477</sup>. Différentes approches sont disponibles pour mesurer l'oxydation de différentes biomolécules par les mtROS. L'oxydation des acides nucléiques pourra être mesurée à l'aide d'un ELISA 8OHdG (cf. chapitre ci-dessus) <sup>298,460</sup>. La peroxydation des lipides pourra être évaluée à l'aide de la mesure des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (*Thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS) et la formation des groupements carbonyles subséquente à l'oxydation des protéines, par leur réaction colorimétrique en présence de 2,4 dinitrophénol (2,4 DNP) <sup>478</sup>. L'antioxydant mitoTEMPO, de par la présence du groupement triphenylphosphonium pourra s'accumuler spécifiquement dans la mitochondrie pour prévenir la formation de mtROS et ainsi bloquer les voies de signalisation et les effets physiopathologiques des mtROS <sup>479</sup>.

**Apoptose :** De nombreuses approches sont disponibles pour étudier l'apoptose. Cette section n'abordera que celles impliquant la mitochondrie. La viabilité cellulaire peut être mesurée colorimétriquement (i.e., à 550 nm) par la réduction du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT) en formazan violet par la *succinate dehydrogenase* <sup>480</sup>. Un autre test similaire existe, mesurant à 450 nm la réduction



du 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetra-zolium-5-carboxanilide (XTT) en formazan orange <sup>481</sup>. La fuite de cyt c hors de la mitochondrie pourra être évaluée par immunobuvardage ou ELISA sur la fraction cytosolique d'un échantillon de cellules, ou bien être visualisé par microscopie <sup>482,483</sup>. L'effondrement du potentiel de membrane dû à la formation des macropores peut être mesuré à l'aide des techniques appropriées (cf. ci-dessus).

**Anticorps anti-mitochondriaux :** La production d'AMA est généralement évaluée à l'aide de tests ELISAs directs disponibles commercialement et couverts d'antigènes isolés (i.e., anti-M1/aCL, anti-M2, -M4, -M6 et -M7) ou bien de protocoles maison utilisant des SMP comme source d'antigènes (i.e., AMA-M9) <sup>399</sup>. Par le passé, les AMA ont pu être identifiés par l'aspect du marquage qu'ils produisent en IIF, mais à l'heure actuelle, cette approche se perd au profit des ELISAs. Toutefois, seuls les AMA-M5 sont encore caractérisés par IIF sur coupes histologiques d'estomac et de reins murins (*mouse stomach/kidney slides*, MSK), produisant un marquage des cellules de tubule proximal dans le rein et des cellules pariétales et du collet dans l'estomac <sup>413</sup>.

## **Le futur de la recherche sur l'implication de la mitochondrie dans les réponses immunitaires normales et physiologiques.**

Tandis que la mitochondrie a tout d'abord uniquement été considérée comme la centrale énergétique de la cellule, la découverte de son implication dans la voie intrinsèque de l'apoptose a ouvert la voie à l'étude de l'implication de l'organelle dans de nombreuses voies biologiques.

La découverte récente de la libération active de mitochondrie dans le milieu extracellulaire<sup>303,313,315</sup> a permis la découverte d'une nouvelle voie de communication de cellule à cellule, désignée sous le terme de "transmitophagie". Les cellules dont la masse mitochondriale est défaillante sont capables de relarguer leurs organelles endommagées afin que d'autres cellules puissent les dégrader<sup>484</sup>. D'autres études postulant que la libération de mitochondries extracellulaires intactes et fonctionnelles et leur recapture subséquente permettrait de rétablir les fonctions mitochondriales de la cellule receveuse<sup>485,486</sup>. Cette découverte constitue une nouvelle avenue de thérapies cellulaires par greffes de mitochondries<sup>487</sup>.

La recherche sur le stress oxydatif mitochondrial est fondamentale pour le développement de nouvelles thérapies permettant de prévenir les dommages oxydatifs observés dans la sénescence, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives. La caractérisation des réponses immunitaires anti-mitochondriales pourrait contribuer à une meilleure compréhension des événements en aval de la libération de DAMPs et de (néo)antigènes intracellulaires (e.g., dans les traumatismes, la nécrose ou l'apoptose ainsi que dans des contextes de stress oxydatif chronique et/ou d'évasion tumorale). L'étude du "spectre mitochondrial" pourrait permettre d'affiner la stratification des patients souffrant de maladies auto-immunes selon l'ensemble des mtAg reconnus par les AMA du patient, permettant d'étendre la « médecine personnalisée » dès l'établissement du diagnostic de la maladie. Aussi, la caractérisation des NOMA et des AMA permettrait d'apprécier des différences entre anticorps naturels supposément protecteurs et autoanticorps pathogénique.

Bien que les AMA observés dans la PBC soient relativement bien connus, les couples mtAg/AMA ont peu été étudiés dans le cadre d'autres maladies à autoanticorps. Ainsi, l'utilisation d'échantillons de patients recrutés dans le cadre de cohortes prospectives permettrait d'apprécier les variations des niveaux d'AMA au fil de la maladie. Ces valeurs pourront être associées à l'aide d'outils biostatistiques avec les critères cliniques (e.g., : âge, sexe, origine ethnique, co-morbidités, durée de la maladie, médicaments, caractéristiques hématologiques et sérologiques) ainsi que l'expression clinique de la maladie (e.g., apparition et évolution des symptômes, causes de décès). Ces données permettraient d'évaluer l'intérêt de la mesure des AMA dans une optique de diagnostic et/ou de diagnostic de la maladie ainsi que pour la stratification des patients, permettant en bout de ligne, l'amélioration des stratégies de prise en charge et la qualité des soins pour les patients.

## Les maladies auto-immunes à anticorps anti-mitochondriaux

Des anticorps anti-mitochondriaux (AMA) ciblant divers antigènes peuvent apparaître au cours de différentes pathologies ou suite à l'administrations de certaines drogues. La section ci-dessous présente trois maladies d'intérêts pour mon projet de doctorat.

### Données épidémiologiques :

Les mouvements sociaux-culturels récents tels que le « *Black Lives Matters* » ont profondément modifié la perception des disparités ethniques et sociales au sein de la société. Ainsi, de nombreuses sessions de l'édition 2020 du congrès annuel du Collège américain de Rhumatologie (*American College of Rheumatology, ACR*) ont été dédiées à l'analyse de l'influence des paramètres sociodémographiques sur les facteurs de risques, la qualité de la prise en charge et l'efficacité des traitements dans le cadre des maladies auto-immunes.

**La cholangite (ou cirrhose) biliaire primitive (PBC)** est une maladie qui touche environ 29.3 personnes pour 100,000 individus à travers le monde <sup>488</sup> et de 28.3 à 46.5 Canadiens pour 100,000 habitants selon la province étudiée <sup>489</sup>. L'incidence mondiale de la maladie est estimée entre 1 et 2 cas pour 100,000 personnes-années et de 0.33 à 3.03 au Canada <sup>490,491</sup>. La maladie touche principalement les femmes en période de péri-ménopause, avec un biais de sexe pouvant aller jusqu'à un ratio (M:F) de 1:10 <sup>492</sup>. L'âge, l'appartenance à une ethnie autre que caucasienne ainsi que les facteurs socio-économiques sont aussi associés avec un accroissement des complications et de la mortalité chez les personnes souffrant de PBC <sup>493</sup>. Le tabagisme, la prise de traitements hormonaux, l'hérédité et l'épigénétique, les antécédents infectieux (e.g., infections urinaires) la présence d'autres troubles auto-immuns et les expositions environnementales sont des facteurs de risques accroissant les risques de développer la maladie <sup>444,445,494-496</sup>.

**Le lupus érythémateux disséminé (*systemic lupus erythematosus*, SLE)** présente des données épidémiologiques très variables, selon les pays et les caractéristiques sociodémographiques des patients étudiés. La prévalence de la maladie est estimée entre 3.2 et 517.5 cas pour 100,000 personnes dans le monde dont 31.9 à 51 patients pour chaque 100,000 Canadiens <sup>497</sup>. Aussi, l'incidence de la maladie est entre 0.3 et 31 cas pour 100,000 personnes par année dans le monde <sup>497</sup>, dont 0.9 à 2.8 pour le Canada, en fonction des études <sup>498,499</sup>. À l'image de nombreuses maladies auto-immunes, le SLE présente un biais de sexe (M:F) de 1:9 <sup>500</sup> avec une maladie d'expression tardive et plus agressive chez l'homme alors que la maladie se développe préférentiellement chez la femme en âge de procréer <sup>501,502</sup>. Le lupus présente aussi une forte disparité socio-économique, avec des indicateurs épidémiologiques – voire même une mortalité accrue chez les patients non-caucasiens et latins ainsi que dans les patients à faible niveau d'études ou bien appartenant à une catégorie socioprofessionnelle défavorisée <sup>497,503,504</sup>. Un certain degré de transmission héréditaire est observé dans le lupus <sup>505</sup>. De plus, les mutations affectant des récepteurs [e.g., polymorphismes du récepteur au fragment cristallisable des IgGs (FcγRIIA) ou du HLA] <sup>506,507</sup> et/ou voies de signalisations immunitaires (e.g., : PTPN22, complément) ainsi que <sup>508,509</sup> sont des facteurs de risques de développer la maladie. Le mode de vie – au travers de paramètres tels que l'obésité, la consommation de tabac et d'alcool – influence les chances de développer le SLE <sup>510-513</sup>. Les perturbations endocrines telles que la prise d'hormones, l'endométriase et la combinaison de déficience en vitamine D combinée à certains polymorphismes de CYP24A1 sont associées à la maladie <sup>514,515</sup>. Enfin, les expositions environnementales au virus Epstein-Barr (EBV, i.e., agent causal de la mononucléose) <sup>516</sup>, aux polluants de l'air (e.g., silicose, particules fines) <sup>517,518</sup> et aux agents chimiques (e.g., solvants industriels, pesticides) <sup>517,519</sup> sont des facteurs de risques suspectés dans le développement du lupus (**Figure 8**).

**Le syndrome des antiphospholipides (*antiphospholipid syndrome*, APS)** concerne de 40 à 50 personnes pour 100,000 individus avec 2.1 cas par 100,000 personnes-années <sup>520</sup>, avec un biais de sexe (M:F) estimé entre 1:2 et 1:5 <sup>521</sup>. Toutefois ces valeurs sont variables

selon les critères de positivité [i.e., isotypes et antigènes ciblés par les anticorps antiphospholipides (aPL) et manifestations cliniques associées] et les caractéristiques sociodémographiques de chaque étude. Les facteurs de risque relatifs aux manifestations thromboemboliques de l'APS sont : l'obésité, l'hypertension, la dyslipidémie <sup>522</sup>. Pour les symptômes obstétricaux ; l'âge de la mère au moment de la conception, des antécédents de troubles obstétricaux (e.g., perte fœtale, naissance prématurée) et les anomalies des annexes embryonnaires font partie des facteurs de risques de la maladie <sup>523</sup>. À l'instar du SLE, les polymorphismes des gènes du HLA et codants pour certaines protéines impliquées dans les grandes voies biologiques de l'immunité [e.g., STAT4, IRF5 et le récepteur nucléaire C1D] sont aussi des facteurs de risques dans l'APS <sup>524,525</sup>. Une infection active ou un historique médical de maladie bactérienne (e.g., *Treponema pallidum*, *Mycobacterium leprae*, *M. tuberculosis*, *Helicobacter pylori* <sup>526-529</sup>) ou virale (e.g., cytomegalovirus, hépatites A à D, EBV <sup>530-532</sup>) peuvent être associés – de façon transitoire (i.e., disparaissant après résolution d'une infection active) ou persistante – à la production d'aPL par le patient et/ou l'expression de symptômes cliniques de l'APS. Enfin, l'exposition à certaines molécules, dont des drogues (e.g., antiarythmiques, thérapies hormonales <sup>533-535</sup>)

## De l'étiologie à la physiopathologie des maladies auto-immunes à anticorps anti-mitochondriaux

Cette section n'a pas vocation à être une revue exhaustive des mécanismes de l'auto-immunité, mais plutôt d'un survol des concepts clés communs à cette famille de troubles immuns, puis des mécanismes spécifiques à la PBC, le SLE et l'APS. L'emphase sera mise sur la progression de ces troubles chroniques, depuis un état d'homéostasie, vers la production d'anticorps anti-mitochondriaux et un ensemble de dysfonctions, aboutissant à l'expression clinique de la maladie.

**Généralités sur l'auto-immunité :** l'évènement à l'origine des maladies auto-immunes est la rupture de la tolérance du système immunitaire envers les molécules du « soi ». En temps normal, ceci est prévenu par le mécanisme de sélection négative, sensé prévenir la dissémination de lymphocytes T et B hors de leurs tissus d'origine. Dans le thymus, les lymphocytes T avec un TCR de très faible ou de très forte affinité pour les peptides du soi présentés par le MHC-I entreront en apoptose (cf. chapitre sur l'apoptose et la réponse immunitaire) <sup>536</sup>. Dans la moelle hématopoïétique, un processus de sélection similaire, basé sur la reconnaissance des peptides du soi par le BCR (*B-cell receptor*), permettra la délétion des lymphocytes B autoréactifs <sup>537</sup>. L'hypothèse Toll (*Toll hypothesis*) est un concept qui propose qu'une première source d'autoréactivité serait la capture d'acides nucléiques et/ou de ribonucléoprotéines (RNP) issus de microorganismes et/ou d'apoptosomes par les TLR7, -8 et -9 de lymphocytes B défectueux, leur internalisation par la voie endolysosomiale, puis leur apprêtement sur le MHC-II permettant la présentation des autoantigènes et la stimulation des lymphocytes T, via leur TCR <sup>538</sup>. Additionnellement, des modifications post-traductionnelles (e.g., citrullination, stress oxydatif) pourront altérer les peptides du « soi » en néoantigènes (*altered self*) <sup>539,540</sup>, pour pourront stimuler une réponse immunitaire proinflammatoire ainsi que la production d'autoanticorps qui occasionneront la libération d'autoantigènes supplémentaires (i.e., extension épitopique / *epitope spread*).

**Cytokines** : la base de la réponse immunitaire normale repose sur la coordination des cellules du système immunitaire – tout particulièrement les lymphocytes T auxiliaires - par des facteurs solubles, les cytokines <sup>541</sup>. Classiquement, une balance entre deux types de réponses est décrite. La réponse Th<sub>1</sub> sera coordonnée par la présence dans le milieu, d'IL1, -2, -6 et -12, d'IFN de type II (i.e., IFN- $\gamma$ ) et du TNF- $\alpha$  alors que la réponse Th<sub>2</sub> mobilise les IL4, -5 et -13 <sup>542</sup>. Cette balance Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> peut être déséquilibrée dans le cadre des maladies auto-immunes. De façon contre-intuitive, les modèles de déficiences de la voie de l'IL2 sont associés avec le développement d'une forme d'auto-immunité de type Th<sub>1</sub> <sup>543</sup>, liée à un défaut de l'AICD ainsi qu'à un défaut de l'expression de certains facteurs sur les cellules T<sub>reg</sub> (i.e., CD4 et -25, *cytotoxic T-lymphocyte protein 4* (CTLA-4)] <sup>544-547</sup>. Une surexpression du TNF a été mise en évidence dans différents troubles auto-immuns. Cette voie de signalisation passe par deux récepteurs membranaires, les récepteurs au TNF 1 et 2 (*TNF receptors*, TNFR1, -2), empruntant la voie proinflammatoire du NF- $\kappa$ B, ou permettant l'activation, la prolifération et la migration des cellules immunitaires <sup>548</sup>. La surexpression du TNF ou les mutations des TNFR sont associées à des troubles arthritiques, à la MS et au syndrome du côlon irritable <sup>549</sup>. Toutefois, le TNF pouvant aussi emprunter la voie extrinsèque de l'apoptose, cette cytokine pourra aussi exercer une influence immunosuppressive par induction de lymphopénie <sup>550</sup>. La surexpression des molécules du MHC-I pourra être causée par le TNF- $\alpha$  <sup>551</sup>. Dans de nombreuses maladies auto-immunes, la présence d'IFN de type I (i.e., IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\omega$ , - $\epsilon$  et - $\kappa$ ) a été imputée à la stimulation des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs), via l'internalisation de complexes immuns (i.e., *immune complexes*, ICs) contenant des molécules d'ADN double-brins et/ou les systèmes de détection des acides nucléiques extracellulaires (i.e., TLRs 7-9) <sup>298,311,552</sup>. Il a par ailleurs aussi été suggéré que des altérations de la voie métabolique des IFN de type I [e.g., mutations ou polymorphismes des gènes codant pour les différents IFN et/ou leurs récepteurs, surexpression des gènes régulés par l'IFN (*Interferon regulated genes*, IRG)] peuvent être à l'origine de la signature IFN des maladies auto-immunes <sup>553,554</sup>. Les IFN de type I permettent la différenciation et la maturation des APCs et/ou DCs, des NK et des T<sub>m</sub> ainsi que la production d'IFN- $\gamma$ . L'IFN de type II (i.e., IFN- $\gamma$ ) est une cytokine produite suite à la stimulation de cellules immunitaires par des molécules du MHC et permettant l'organisation d'une réponse de type Th1. *In vitro*, l'IFN- $\gamma$  provoque



une augmentation de l'expression des deux classes de MHC <sup>555,556</sup> pouvant ainsi potentiellement contribuer à l'auto-immunité <sup>557</sup>.

**De nouveaux types de lymphocytes T; les Th<sub>17</sub> et les lymphocytes T et B régulateurs (T<sub>reg</sub> / B<sub>reg</sub>)** ont été caractérisés au cours des deux dernières décennies. Plusieurs cytokines [e.g., IL1, -6, *transforming growth factor beta* (TGF-β)] sont cruciales afin d'induire les voies métaboliques permettant la différenciation des Th<sub>17</sub> à partir de cellules T naïves <sup>558-560</sup>. Les cellules Th<sub>17</sub> produisent des cytokines proinflammatoires dont plusieurs sous-types d'IL17 ainsi que de l'IL21 et 22 permettant, en temps normal, de coordonner une réponse immunitaire dirigée contre les pathogènes extracellulaires <sup>561</sup>. L'implication des cellules Th<sub>17</sub> dans l'auto-immunité a été mise en évidence dans la réduction de la sévérité de l'inflammation dans plusieurs modèles animaux de RA, d'EAE et de syndrome du côlon irritable <sup>562-564</sup>.

Les cellules T régulatrices (T<sub>reg</sub>) sont caractérisées par la présence du facteur de transcription *forkhead box P3* (Foxp3) et l'expression en surface, des marqueurs CD4 et -25 <sup>565</sup>. Ces cellules T<sub>reg</sub> sont capables, *in vitro*, d'abaisser la concentration en IL2 afin de favoriser la production de T<sub>m</sub>, au détriment des T<sub>eff</sub>. Les expriment aussi *l'ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1* (i.e., CD39) et/ou la 5'-nucleotidase (i.e., CD73), permettant de dégrader l'ATP extracellulaire (i.e., proinflammatoire via les récepteurs de la famille P2X, *cf. section précédente à ce sujet*) en AMP et/ou adénosine (i.e., anti-inflammatoires) <sup>566,567</sup>. Enfin, les T<sub>reg</sub> pourront moduler l'activité des DC en capturant des fragments de membranes et les protéines qui y sont enchâssées au niveau de la synapse immunologique (e.g., MHC-II, molécules de co-stimulation) <sup>568-570</sup>. Les mutations atteignant les voies métaboliques employées par les T<sub>reg</sub> pourront contribuer à la dérégulation des mécanismes de contrôle de l'auto-immunité.

À l'instar des lymphocytes T, les cellules B comprennent aussi différents sous-groupes de cellules régulatrices (i.e., B<sub>reg</sub>) <sup>571</sup>. Ces cellules régulent la réponse immunitaire par le biais de leur production d'IL10, IL35 et de TGF-β <sup>572</sup>. Les fonctions des B<sub>regs</sub> ont été mises en évidence au travers de différents modèles expérimentaux. Dans l'arthrite induite par

le collagène, la suppression de la production d'IL10 par les lymphocytes B a mis en évidence que les B<sub>regs</sub> étaient impliquées dans la différenciation des T<sub>regs</sub> ainsi que l'inhibition de la production de T<sub>eff</sub> (i.e., Th<sub>1</sub> et Th<sub>17</sub>)<sup>573</sup>. La production d'IL10 régule l'activité des T<sub>eff</sub> cytotoxiques et la production de TNF- $\alpha$  par les monocytes dans la réponse antitumorale<sup>574,575</sup>. L'IL10 assure aussi un contrôle sur certaines populations de NK<sup>576</sup>.

**Dans la PBC**, les cellules épithéliales biliaires (*biliary epithelial cells*, BEC) contribuent à la digestion par la régulation de la composition des sucs biliaires<sup>577</sup>, puis à leur sécrétion. Les BEC étant à l'interface entre l'organisme et le monde extérieur (i.e., la lumière du conduit biliaire), elles sont pourvues de la machinerie moléculaire permettant la régulation fine de la réponse immunitaire innée locale. Ainsi, les BEC expriment des molécules de la famille des TLR (i.e., TLR2-5, 9) à des fins de surveillance du microbiote. À l'opposé, la kinase associée aux récepteurs de l'interleukine-1 (*Interleukin-1 receptor associated kinase*, IRAK) permet l'inhibition des voies du TLR, établissant une balance qui assure la tolérance immunitaire envers certains motifs moléculaires associés aux pathogènes (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs)<sup>578</sup>. Additionnellement, les BEC sont aussi mobilisées dans la réponse immunitaire adaptative, par leur capacité à exprimer les deux classes du MHC<sup>579,580</sup>, de différentes molécules impliquées dans l'adhésion (e.g., CD44, ICAM-1, LFA-3) ou la régulation des leucocytes (e.g., CD40, FasR)<sup>580,581</sup>. Les BEC sont aussi capables d'assurer la transcytose d'immunoglobulines de classe A (IgA) à l'aide du *polymeric immunoglobulin receptor* (pIgR)<sup>582-584</sup>. Dans la physiopathologie de la PBC, les IgAs ont la capacité d'induire, *in vitro*, l'apoptose médiée par les caspase de cellules exprimant un pIgR humain recombinant<sup>584</sup>. Au cours de la maladie, la réponse immunitaire adaptative est articulée autour d'un micro-environnement proinflammatoire de type Th<sub>17</sub> et de la destruction des BEC par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup><sup>585,586</sup>. Une réponse humorale anti-mitochondriale est observée dans la PBC avec quatre (4) types d'AMA spécifiques à la maladie (*cf. section précédente à ce sujet*). Une rupture de la tolérance, couplée à un déficit de glutathionisation de la protéine PDC-E2 au cours de l'apoptose des BEC sont postulés comme étant à l'origine d'une réponse immunitaire contre

les néoantigènes de l'apoptome hépatique, aboutissant ultimement à la production d'autoanticorps de type AMA-M2 chez les patients <sup>401,587</sup>. L'invasion des canaux biliaires ainsi que leur destruction par les composantes de l'immunité adaptative aboutiront aux manifestations cliniques observées chez les patients.

**Le SLE** est une maladie complexe résultant de l'activation de nombreuses lignées cellulaires ainsi que l'emballement de plusieurs composantes du système immunitaire. La polarisation des macrophages vers le phénotype M2, associé à un déficit de la clairance des épitopes issus de différentes sources (e.g., apoptome, mitochondries extracellulaires, stress oxydatif) contribuent à la présence concomitante d'antigènes et d'un phénotype proinflammatoire nécessaire pour la production d'autoanticorps <sup>305,588-591</sup>. Le relargage de NETs (i.e., contenant de l'ADN nucléaire et mitochondrial ainsi que des ribonucléoprotéines) est aussi une source de stimuli proinflammatoires permettant la production d'IFN de type-I, cytokine signature dans la maladie <sup>298,311</sup>. Additionnellement aux cellules de l'immunité innée, plusieurs facteurs solubles sont aussi impliqués dans la physiopathologie du SLE. Ainsi, les déficits en molécules du complément observés chez les patients impactent leur capacité à clairer les éléments en circulation et diminuent la tolérance immunitaire à l'encontre des antigènes qu'ils présentent <sup>592</sup>. Différentes cytokines de type Th<sub>1</sub>, telles que les IL2, -6, -12, -18 et -23 sont élevées chez les patients lupiques <sup>593</sup>. Les patients lupiques présentent une élévation des titres en TNF- $\alpha$  et en IFN- $\alpha$  <sup>594</sup>. L'altération de la prise en charge, de l'apprêtement et de la présentation des antigènes par les APC ainsi que la production d'IFN de type I par les pDC induira une activation du système immunitaire adaptatif <sup>595-597</sup>. Différentes mutations et dysfonctions des voies de signalisation propres aux lymphocytes T aboutiront d'une part à la diminution des populations de cellules T<sub>reg</sub> et, d'autre part, à la différenciation et l'expansion de lymphocytes T<sub>eff</sub> pathogéniques <sup>598,599</sup>. Plusieurs membres de la superfamille du TNF [i.e., le système *B-cell-activating factor of the TNF family / a proliferation-inducing ligand* (i.e., BAFF / APRIL)] sont en charge de la maturation et de la survie des lymphocytes B ainsi que de la maturation de la réponse humorale impliquées dans la physiopathologie du SLE <sup>600</sup>. L'organisation en IC des autoanticorps lupiques, de leurs cibles ainsi que de facteurs associés

(e.g., le système du complément) pourra permettre la fixation des ICs sur le FcγRIIA, puis leur internalisation <sup>601</sup>. Ainsi, l'ADN ou ARN extracellulaire internalisé au sein des ICs pourra activer leurs PRRs (i.e., contextuellement, via les TLR9 et -7) au sein du compartiment endolysosomal, aboutissant ultimement à la production d'anticorps anti-acides nucléiques (i.e., anti-dsDNA, anti-RNA) en lien à la stimulation de BAFF par une voie métabolique impliquant la *transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor* (i.e., TACI) <sup>602</sup>. L'influence des cellules B<sub>reg</sub>, la rupture de la tolérance et la production de lymphocytes B autoréactifs contribueront à la production du répertoire des autoanticorps lupiques <sup>603-605</sup>. Les différents anticorps typiques au SLE ne semblent pas apparaître simultanément au cours du développement de la maladie, mais plutôt être produits selon une séquence spécifique [i.e., anti-Ro/*Sjögren's-syndrome-related antigen A* (i.e., Anti-Ro/SSA) et anti-La/*Sjögren's-syndrome-related antigen B* (i.e., anti-La/SSB), aPL et ANA, anti-dsDNA, puis anti-ribonucléoprotéines nucléaires et enfin anti-Smith) <sup>606</sup>. L'inflammation chronique ainsi que les dépôts d'ICs dans les tissus contribueront aux dommages aux tissus et, ultimement, à l'expression clinique de la maladie.

**L'APS** est un trouble qui peut être distinct (i.e., APS primaire / *Primary APS*, PAPS) ou secondaire à une autre maladie rhumatismale – le SLE, en général (*Secondary APS*, SAPS). L'APS pourra aussi être qualifié de « catastrophique » (i.e., *catastrophic APS*, CAPS) dans sa forme aigüe, multiviscérale et fulgurante. Le consensus concernant la physiopathologie de l'APS est que la maladie nécessite deux volets biologiques distincts (i.e., *two hit model*). Le premier outrage (i.e., *first hit*) correspondant à la présence d'anticorps dirigés contre des phospholipides (i.e., aPL. E.g., aCL), des protéines ou des complexes protéines/phospholipides (e.g., anti-β<sub>2</sub>GPI, LA) mais n'est pas suffisant pour induire la maladie <sup>607</sup>. Le deuxième outrage (i.e., *second hit*) correspondra à un ensemble d'évènements favorisant un environnement prothrombotique chez les patients. Ce phénotype peut être induit par une somme sensible d'altérations des différents acteurs de l'homéostasie vasculaire. La diminution de la production d'oxyde nitrique (i.e., NO) par les enzymes *nitric oxide synthase* endothéliales et inductibles (i.e., eNOS et iNOS) et son impact sur la fonction endothéliale et la coagulation ont été mises en évidence chez l'humain <sup>608</sup>.

De plus, la morphologie vasculaire peut être altérée chez les patients; la stimulation de l'endothélium par les autoanticorps stimule la voie PI3K-Akt-mTOR a été identifiée comme à l'origine de l'hyperplasie intimale observées dans les vasculopathies associées à l'APS <sup>609</sup>. Les anti- $\beta_2$ GPI ont aussi la capacité de stimuler la libération de médiateurs proinflammatoires par l'endothélium, sous forme de vésicules extracellulaires. Cette production nécessite une signalisation impliquant la voie du TLR7 <sup>610</sup>. Au cours du CAPS, les aPL contribuent à l'accroissement de l'expression de la P-sélectine par l'endothélium ainsi que les plaquettes <sup>611</sup>. En plus de l'activation du Fc $\gamma$ RIIA <sup>612</sup>, les aPL peuvent lier deux récepteurs membranaires; la glycoprotéine Ib $\alpha$  (i.e., GPIb $\alpha$ ) et le récepteur 2' à l'apolipoprotéine E (i.e., *apolipoprotein E receptor 2'*, apoER2'), aboutissant à l'activation plaquettaire <sup>613</sup>.  $\beta_2$ GPI étant un inhibiteur endogène du facteur de von Willebrand (i.e., *von Willebrand factor*, vWF), les anti- $\beta_2$ GPI contribueront ainsi à l'accroissement du risque thrombotique chez les patients atteints d'APS <sup>614</sup>. Additionnellement, les anti- $\beta_2$ GPI mobilisent plusieurs composants du système du complément dans les manifestations thromboemboliques (i.e., C3 et C5) <sup>615,616</sup> et obstétriques (i.e., C3, C4 et C5) <sup>617-619</sup> de la maladie. Les autoanticorps ayant fixé des phospholipides oxydés (e.g., oxCL, ox $\beta_2$ GPI) pourront être internalisés par les macrophages et induire leur différenciation en cellules spumeuses (i.e., *foam cells*) et ainsi contribuer à l'athérosclérose <sup>620</sup>. Les neutrophiles semblent aussi participer à la physiopathologie de l'APS; le C5a produit lors de l'activation de la voie du complément par les aPL induisant la libération de facteur tissulaire (i.e., prothrombotique) par les neutrophiles et contribue aux avortements liés à la maladie <sup>619,621</sup>. Enfin, à l'instar du SLE, la NETose est augmentée chez les sujets atteints d'APS <sup>622-624</sup>, contribuant ainsi au phénotype prothrombotique des patients <sup>625</sup>.

### **De l'implication des mitochondries dans la physiopathologie du SLE et de l'APS :**

Les mitochondries dysfonctionnelles sont impliquées dans la physiopathologie des maladies rhumatismales. Ainsi, des polymorphismes des régions du mtDNA codant pour la boucle D (i.e., *D-loop*) ainsi que les complexes I et V de l'ETC ont identifiés comme facteurs de risques

dans le SLE<sup>626-628</sup>. Aussi, le SNP rs4809959 du gène codant pour CYP24A1, impliqué dans la biosynthèse de la vitamine D, peuvent influencer le risque de transition vers le SLE<sup>629</sup>. Par ailleurs, le mtDNA oxydé libéré au cours de la NETose a été identifié comme étant capable de stimuler la production d'IFN de Type I par les pDC<sup>298,311</sup>. Additionnellement, l'IFN de Type I est capable d'induire des dysfonctions du métabolisme mitochondrial et de la mitophagie, aboutissant à la mobilisation de la voie de signalisation STING, puis à la différenciation des monocytes lupiques en DC proinflammatoires<sup>630</sup>.

Ainsi, la capacité de l'organelle à produire des mtROS, capables d'induire un environnement inflammatoire et/ou de modifier des biomolécules (e.g., cardiolipin, mtDNA) a été associée avec la physiopathologie de la maladie<sup>187,385,631-633</sup>. Dans le SLE, la présence de mtROS a été associée à l'hyperpolarisation ainsi qu'à un défaut d'AICD des lymphocytes T<sup>632,634,635</sup>. Les mtROS peuvent aussi provoquer la prolifération d'un sous-type spécifique de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, les cellules Th<sub>0</sub> qui ont été avancées comme étant potentiellement impliquées dans la physiopathologie de la maladie<sup>636</sup>. Une supplémentation en CoQ<sub>10</sub> (i.e., un transporteur d'électron mitochondrial), permet de limiter les dysfonctions de l'organelles dues au stress oxydatif ainsi que leur impact sur les lymphocytes T dans le cadre de l'APS<sup>637,638</sup>. Aussi, l'implication de la voie mitochondriale de l'apoptose a été mise en évidence par l'induction de la mort cellulaire programmée, suite à l'incubation d'une lignée de lymphocytes T déficients pour la voie extrinsèque de l'apoptose avec du sérum de patients lupiques<sup>639</sup>. Le contrôle exercé par la mitochondrie sur le calcium cytosolique semble aussi impliqué dans le SLE. Ainsi, la protéine mitochondriale Fus1, impliquée dans la mobilisation du calcium permet aussi l'activation de voies de signalisation immunitaires, la polarisation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, ainsi que la maturation des cellules NK<sup>202,203</sup>. Le modèle murin déficient en Fus1 développe des troubles autoimmuns semblables au SLE<sup>202</sup>. Si l'on considère les cellules immunitaires dans le lupus, la présence d'IFN de Type-I provoque un accroissement de la masse mitochondriale associée avec un défaut de la fission et du métabolisme mitochondrial dans les cellules T CD8<sup>+</sup><sup>640</sup>, aboutissant ultimement à une diminution de la viabilité de ces cellules. Aussi, les déficiences en C1q causent des dérégulations du métabolisme ainsi que de la dynamique de la masse mitochondriale des cellules T CD8<sup>+</sup> pouvant contribuer aux mécanismes auto-immuns observés

dans le SLE <sup>641</sup>. L'incubation de séra de patients souffrant d'APS (i.e., avec ou sans manifestations obstétriques) sur des cellules de trophoblaste provoque des dysfonctions des voies mitochondriales de la FAO, soulignant l'implication de l'organelle dans la physiopathologie de la maladie <sup>642</sup>.

La mitochondrie est le seul compartiment endogène, chez l'humain, capable de synthétiser de la cardiolipine. Bien que la ce phospholipide soit normalement localisée dans la MOM, il pourra être acheminé au contact du milieu extracellulaire au cours de l'apoptose et contribuer à la production d'autoanticorps <sup>643</sup>. Les aPL produits par les patients souffrant de SLE et/ou d'APS sont de cibler la cardiolipine (i.e., aCL, anti / AMA-M1) <sup>644</sup> ainsi que les mitochondries placentaires (i.e., anti- $\beta_2$ GPI) <sup>645</sup>, causant des dommages directs et indirects (i.e., *via* des dysfonctions de l'organelle). Dans le modèle murin MRL/lps de SLE, les dysfonctions de la voie mTOR sont associées avec un accroissement du stress oxydatif ainsi qu'une diminution des voies de la fission et de la mitophagie aboutissant à la production d'aPL <sup>64,646</sup>. Ce mécanisme peut être inhibé en traitant les souris à l'aide de rapamycine, un inhibiteur de complexe 1 de mTOR (i.e., *mTOR complex 1*, mTORC1) <sup>64,646</sup>. Bien que les AMA-M2 observés dans la PBC puissent aussi être détectés dans le SLE <sup>647,648</sup>, ces autoanticorps ne sont pas spécifiques de cette condition. Les AMA-M5 ont aussi été observés par immunofluorescence et immunobuvardage dans le SLE et l'APS, mais la seule information disponible quant à la nature de l'antigène mitochondrial qu'ils reconnaissent est qu'ils diffèrent des aCL et des anti- $\beta_2$ GPI <sup>414,649</sup>. Enfin, les anticorps dirigés contre la HSP60 sont produits chez les patients lupiques. <sup>422</sup>. Bien qu'ils puissent mécaniquement induire l'apoptose des cellules endothéliales ainsi que des thromboses <sup>423,650</sup>, les anti-HSP60 ne sont pas associés avec les critères cliniques de la maladie lorsqu'ils sont considérés individuellement. Toutefois, ils contribuent aux thromboses artérielles lorsqu'ils sont associés avec la présence d'aPL <sup>422,650</sup>.

## **Les différents challenges de la prise en charge des maladies auto-immunes; du diagnostic aux traitements.**

Le but de cette section de familiariser le lecteur en sciences fondamentales à quelques notions cliniques non exhaustives qui ne sont pas nécessairement incluses dans une formation classique en recherche. Ces éléments peuvent présenter un intérêt dans la contextualisation des travaux présentés dans cette thèse.

### **De la difficulté d'établir un diagnostic précoce dans les maladies auto-immunes et de l'importance des nouveaux biomarqueurs :**

Les maladies auto-immunes sont des pathologies difficiles à détecter ; dont l'expression peut fortement varier d'un patient à l'autre ainsi que fluctuer au fil du temps. Ainsi, au sein de la famille des connectivites, un même patient peut avoir un tableau clinique indifférencié <sup>651</sup>, souffrir de plusieurs conditions auto-immunes simultanées (e.g., SAPS), exprimer un chevauchement de symptômes de plusieurs maladies distinctes (i.e., *overlap syndromes*) <sup>652</sup> ou bien des manifestations cliniques non-conventionnelles <sup>653</sup>. À ce titre, le SLE a été surnommé « la maladie aux mille visages » <sup>654</sup> (**Figure 9**). Un diagnostic précoce permettra que les patients reçoivent au plus vite, un traitement personnalisé et optimal selon l'expression clinique de leur maladie et ainsi diminuer les dommages subis. Enfin, au-delà des facteurs socio-économiques (cf. section « *données épidémiologiques* ») qui peuvent influencer négativement la précocité du diagnostic – en particulier dans les pays dépourvus de sécurités sociales publiques – la qualité et la précocité de la prise en charge des maladies auto-immunes nécessitent la coopération des équipes de santé ainsi que la pleine intégration des patients dans la démarche de soins (i.e., manifestations de la maladie et ressenti hors des rendez-vous médicaux pour capturer des informations cliniquement pertinentes qui complémenteraient les informations cliniques



que les spécialistes peuvent capturer au moment de la consultation)<sup>655</sup>. Il a été estimé que les patients souffrant de SLE peuvent persister en errance médicale pendant 5 à 10 ans avant de recevoir un diagnostic définitif<sup>656</sup>. Les patients ayant reçu un diagnostic de lupus, estimé comme proche (i.e., moins de 6 mois) de l'initiation de la maladie (i.e., *onset*), développeront moins de phases d'exacerbations et nécessiteront moins d'hospitalisations que les patients diagnostiqués plus tardivement<sup>657</sup>. Pour chaque maladie, plusieurs grilles de critères de diagnostiques [e.g., critères de l'ACR, de l'*European League Against Rheumatism* (EULAR), de Sapporo] peuvent coexister sans toutefois être redondants. À côté de ces recommandations pour le diagnostic, il existe des scores permettant d'évaluer le niveau d'activité de la maladie [(e.g., *systemic lupus erythematosus disease activity index 2000* (SLEDAI-2K)] et son évolution au fil du temps. Enfin, des scores de dommages [e.g., *SLE disease index* (SDI)] permettent d'envisager l'impact des séquelles ainsi que des symptômes persistants sur la qualité de vie du patient. Les informations apportées par ces éléments pourront être assemblées par les cliniciens afin d'affiner la caractérisation des patients souffrant de maladies auto-immunes<sup>658</sup>. À l'heure des études en *-omics* et des données de masse (i.e., *big data*), la caractérisation de nouveaux biomarqueurs a été annoncée comme un des dix plus grands challenges dans la gestion clinique du lupus<sup>659</sup>. Il faut ainsi distinguer plusieurs classes de biomarqueurs afin d'apprécier leurs contributions respectives à la prise en charge des patients. Les marqueurs diagnostics sont préférentiellement caractérisés sur des patients nouvellement diagnostiqués (i.e., donc la maladie est la plus précoce possible et n'ayant pas reçu de traitements) et contribuent à caractériser la présence d'une maladie chez un individu. Les marqueurs de pronostic sont étudiés à l'aide de cohortes longitudinales afin de pouvoir évaluer le risque que présente un patient, de développer une manifestation clinique dans le temps. Les marqueurs de stratification permettent le fractionnement d'un groupe de malades en différents sous-groupes partageant des caractéristiques cliniques communes. Enfin, les marqueurs substitués permettent de remplacer un geste clinique (e.g., pour diminuer l'invasivité de la prise en charge)<sup>660,661</sup>

## **Critères cliniques actuellement utilisés en clinique et méthodes permettant d'établir un diagnostic ou un pronostic :**

**Le diagnostic de la PBC** nécessite l'expertise du clinicien pour établir un diagnostic différentiel. En effet, l'hépatite auto-immune (i.e., *autoimmune hepatitis*, AIH) est une maladie distincte de la PBC et dépourvue de signes cliniques ou sérologiques spécifiques. Ainsi, l'association américaine pour l'étude des maladies hépatiques (i.e., *American Association for the Study of Liver Diseases*, AASLD) propose un score pondéré sur la base de l'anamnèse, la sérologie et l'aspect histologique du foie afin de permettre le diagnostic de l'AIH <sup>662,663</sup>. À l'inverse, la force de certains symptômes de la PBC fait que le diagnostic se fait principalement sur la présence d'AMA-M2 (cf. section précédente sur les anticorps anti-mitochondriaux) ainsi que sur l'élévation de la phosphatase alcaline sérique chez les patients. Certains symptômes additionnels tels que la présence de certains autoanticorps (i.e., ANA, AMA-M4, -M8 et -M9), l'hypercholestérolémie, la présence de xanthomes (i.e., tumeurs jaunes et bénignes dues aux adipocytes de la peau), ou d'un syndrome de Sicca (i.e., sécheresse buccale et/ou oculaire), le prurit (i.e., démangeaisons) ou la fatigue permettront d'affiner le diagnostic <sup>402</sup>. Enfin, une nouvelle grille d'appréciation a été proposée afin d'aider au diagnostic des patients souffrant de syndromes de chevauchement (i.e., *overlap syndrome*, OS) entre l'AIH et la PBC <sup>664,665</sup> (**Table 1**).

**Les critères de classification du SLE** ont été déterminés par trois groupes, dont L'ACR est le pionnier <sup>666-668</sup> ; 11 critères principaux sont décrits et seule la positivité à quatre d'entre eux permet de diagnostiquer un patient (**Table 2**). Les critères cliniques du *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) ont été créés sur la base des critères de l'ACR à partir de manifestations spécifiques au lupus, de manifestations qui ne sont pas propres à la maladie et de la redéfinition de certains critères (e.g., la photosensibilité n'est plus un critère à part entière, mais est incluse dans la définition d'autres items).

**Table 1: Critères de diagnostic différentiel entre l'hépatite auto-immune (AIH), la cirrhose biliaire primitive (PBC) et les syndromes de chevauchement (OS).**

|   | Item  | AIH     | PBC          | OS         | Description / Informations additionnelles   |
|---|---|---------|--------------|------------|---|
| Critères sérologiques                                 | <b>Critères biochimiques :</b>                        |         |              |            |   |
|   | Aspartate aminotransférase (AST)                      | ☐       | ✗            | ✓ (0 à +3) | AIH: élévation des enzymes hépatiques suggérées mais pas obligatoires. L'élévation des anticorps sériques vaut 2 points si elle dépasse 110% de la valeur de consigne   |
|   | Alanine aminotransférase (ALT)                        | ☐       | ✗            | ✓ (0 à +2) |   |
|   | Phosphatase alcaline (ALP)                            | ✗       | ✓            | ✗          | PBC: Les AST et ALT peuvent être augmentées, mais seule l'augmentation de l'ALP est un critère de diagnostic.   |
|   | Anticorps sériques                                    | ✓ (1,2) | ☐            | ✓ (0 à +2) |   |
|   | <b>Critères immunologiques (i.e. autoanticorps) :</b> |         |              |            |   |
|   | Anti-mitochondriaux (AMA)                             | ✗       | ✓            | ✓ (+3)     |   |
|   | Anti-nucléaires (ANA)                                 | ✓ (1,2) | ☐            | ✓ (0 à +3) | AIH: la positivité à un seul anticorps (i.e. ANA ou ASMA, ou LKM1 ou SLA) est suffisante.   |
|   | Anti-muscle lisse (ASMA)                              | ✓ (1,2) | ✗            | ✓ (0 à +3) |   |
|   | Anti-foies/microsomes de type 1 (LKM1)                | ✓ (2)   | ✗            | ✓ (0 à +3) | PBC et OS: Seul les anticorps anti-mitochondriaux de type AMA-M2 sont utilisés au cours du diagnostic   |
| Anti-antigène hépatique soluble (SLA)                 | ✓ (2)   | ✗       | ✓ (2)        |            |   |
| Antinucléaire anti-cytoplasme de neutrophile (p-ANCA) | ✗   | ✗       | ✓ (+2)       |            |   |
| Critères histologiques                                | <b>Hépatique :</b>                                    |         |              |            |   |
|   | Hépatite d'interface                                  |         |              | ✓ (+3)     | AIH: pas de distinctions entre les critères histologiques. Appréciation anatomo-pathologique entre un aspect compatible avec - (1 point) ou typique (2 points) de l'AIH.  |
|   | Infiltrats inflammatoires                             |         |              | ✓ (+1)     |   |
|   | Rosettes  |         |              | ✓ (+1)     | PBC: Idem à l'AIH sans système de score.  |
|   | <b>Vésicule biliaire :</b>                            | ✓ (1,2) | ✓            |            |   |
|   | Granulomes  |         |              | ✓ (+3)     | <b>Définitions: Hépatite d'interface</b> = érosion inflammatoire du parenchyme hépatique au niveau de sa jonction avec le tissu conjonctif du système porte. <b>Rosettes</b> = organisation spécifique des hépatocytes. <b>Lésions canalaire florides</b> = importantes <b>lésions granulomateuses non suppuratives au niveau des canaux biliaires</b> . <b>Prolifération ductulaire</b> = développement de nombreux petits canaux biliaires. |
|   | Lésions canalaire florides                            |         |              | ✓ (+1)     |   |
| Prolifération ductulaire                              |   |         | ✓ (+1)       |            |   |
| Destruction des canaux biliaires                      |   |         | ✓ (+1)       |            |   |
| Autres  | <b>Virus à tropisme hépatique :</b>                   | ✓ (2)   | ✗            | ✓ (+3)     | AIH: point alloué pour l'absence d'infection virale. OS: ajout ou retrait de points selon le statut virologique   |
|   | <b>Traitements à potentiel latrogène :</b>            | ✗       | ✗            | ✓ (-4, +1) | OS: -4 en cas de prise de médicaments, +1 dans le cas contraire   |
|   | <b>Consommation d'alcool :</b>                        | ✗       | ✗            | ✓ (+2)     | OS: +2 pour une consommation quotidienne < 25g, -2 dans le cas contraire  |
|   | <b>Seuil de diagnostic:</b>                           | ≥ 6     | ≥ 2 critères | ≥ 19       | AIH: un score de 6 suggère une AIH probable. Un score ≥ 7 correspond à une certitude quant au diagnostic<br>PBC: pas de score. La positivité à 2 des 3 critères obligatoires (✓) permet de poser un diagnostic<br>OS: un score de 19 ou 20 suggère une AIH probable. Un score ≥ 21 correspond à une certitude quant au diagnostic   |

Les critères présentés peuvent être inclus (✓), exclus (✗) ou bien être facultatifs (☐). La contribution en termes de points de chaque item est mentionnée entre parenthèses.

Elle requiert que le patient présente soit quatre (4) critères, dont nécessairement un critère clinique ainsi qu'un critère sérologique, soit une néphrite lupique détectée par biopsie, associée à la positivité aux anti-dsDNA et/ou aux ANA <sup>669</sup>. Pour caractériser un patient, comme souffrant de SLE selon les critères de l'EULAR, il devra nécessairement présenter une positivité aux ANA, puis avoir un score supérieur ou égal à 10 selon la pondération des différents critères <sup>410</sup>. Il faut cependant garder à l'esprit que ces éléments cliniques sont ceux retenus pour le diagnostic de la maladie. D'autres éléments sont associés avec des manifestations cliniques de la maladie chez des patients déjà diagnostiqués. Leur dépistage chez des patients déjà diagnostiqués permettront de stratifier les patients selon leurs facteurs de risques (e.g., associations entre les déficits en C1q et néphrites lupiques <sup>509</sup>).



**Figure 9. Manifestations cliniques du lupus érythémateux disséminé.**

Le SLE est une maladie qui touche une Canadienne pour chaque 1-2,000 habitant et présente une forte prévalence pour les sujets d'origines Africaine, Latine ou asiatique. Ses nombreuses manifestations peuvent virtuellement affecter tous les organes (e.g., lupus cutané, neurolupus, néphrite lupique, manifestations arthritiques, obstétriques et cardiovasculaires). Aquarelle et encre de chine sur canevas. *Production personnelle, reproduction interdite sans autorisation.*

**Le score d'activité du lupus** est un indicateur qui évolue au cours du temps et permet d'estimer l'agressivité de la maladie à un point dans le temps. Plusieurs grilles et scores composites ont été édités à ce propos, afin de capturer au mieux les spécificités de la maladie pour chaque patient ainsi que de répondre à un objectif (e.g., caractérisation clinique d'un patient, documentation en vue de l'inclusion dans une cohorte de recherche, nécessités administratives et/ou économiques) (**Tables 3.1 et 3.2**)<sup>670,671</sup>. Le *SLE disease activity index – 2000* (i.e., SLEDAI – 2K) permet une évaluation rapide et relativement économique du degré d'activité de la maladie à l'aide d'une échelle de valeurs entières pouvant aller de 0 à 105<sup>672</sup>. Ses principaux défauts résident dans le fait que le SLEDAI – 2K n'apprécie ni l'évolution de la maladie ni la gravité des manifestations. Le score du *British Isles Lupus Assessment Group* (i.e., BILAG) englobe un corpus étendu de variables, pondérées de 0 à 4 selon l'évolution des symptômes par rapport à l'examen précédent (i.e., 0 : manifestation absente, 1 : amélioration, 2 : pas d'évolution, 3 : aggravation, 4 : nouvelle manifestation). Toutefois pour être précis, le BILAG demande un haut niveau de formation ainsi qu'une analyse sérologique détaillée<sup>673,674</sup>. Le score du *Systemic Lupus Activity Measure* (SLAM) est une échelle de 0 à 81 permettant d'envisager, à l'aide de l'examen clinique ainsi que d'évènements rapportés par les patients<sup>675</sup>. Enfin, le score de l'*European Consensus Lupus Activity Measurements* (i.e., ECLAM) permet de rapidement évaluer l'activité de la maladie sur une échelle de 0 à 17.5 au moment de la visite médicale<sup>676,677</sup>.

À l'inverse, un seul indice clinique existe pour **mesurer les dommages subis par les patients lupiques**; le SDI, constitué de 41 critères permettant une échelle de 0 à 46 permettant un pronostic précis, basé sur des manifestations irréversibles et/ou prolongées (i.e., plus de 6 mois)<sup>678,679</sup>. Un score non nul correspondra à une atteinte substantielle de la qualité de vie du patient. Dans certaines circonstances, le *Lupus Damage Index Questionnaire* (i.e., LDIQ) ainsi que le *Brief Index of Lupus Damage* (i.e., BILD) permettront aux patients de pouvoir rapporter eux-mêmes les atteintes occasionnées par la maladie<sup>680,681</sup> (**Table 4**).

**Table 2: Comparatif des items cliniques et sérologiques entre les critères de classification de l'ACR, du SLICC et de l'EULAR.**

|   | Item   | ACR            | SLICC      | EULAR  | Description / Informations additionnelles  |
|---|--|----------------|------------|--|--|
| Critères cliniques  | <b>Fièvre :</b>                              | ✗              | ✗          | ✓ (2)  | Température >38.3°C  |
|   | <b>Manifestations cutanées aigües :</b>      |                |            | ✓ (6)  |  |
|   | Eruption malaire                             | ✓              | ✓          | ✓  |  |
|   | Lupus bulleux                                | ✗              | ✓          | ✗  | Érythèmes maculaire ou papulaires, généralement dans la région malaire et sur les régions exposées à la lumière (e.g. front, mains). Les manifestations malaires peuvent donner des cicatrices, alors que les autres formes ne laissent généralement pas de séquelles. Le diagnostic peut être appuyé par une biopsie cutanée. |
|   | variante avec nécrolyse épidermique toxique  | ✗              | ✓          | ✗  |  |
|   | Eruption macro-papuleuse                     | ✗              | ✓          | ✓  |  |
|   | Eruption photosensible                       | ✗              | ✓          | ✗  |  |
|   | <b>Manifestations cutanées sub-aigües :</b>  | ✗              | ✓          | ✓ (4)  | Lésions annulaires ou psoriasiformes photosensibles, peu de cicatrices. Peut être associé à la présence d'anti-Ro/SSA  |
|   | <b>Manifestations cutanées chroniques :</b>  |                |            | ✓ (4)  |  |
|   | Eruption discoïde                            | ✓              | ✓          | ✓ (4)  | Le lupus discoïde est nommé d'après sa forme caractéristique; il peut être accompagné d'atteintes des follicules pileux. Peut provoquer des cicatrices, des alopecies voire même des carcinomes épidermoïdes.  |
|   | Lupus hypertrophique                         | ✗              | ✓          | ✗  | La panniculite lupique est due à un infiltrat de lymphocytes T de la peau.   |
|   | Panniculite lupique                          | ✗              | ✓          | ✗  | Le lupus tumide à une forte photosensibilité et se manifeste principalement dans la région zygomatique. Plaques lisses à l'aspect œdémateux ou érythémateux.   |
|   | Lupus tumide                                 | ✗              | ✓          | ✗  | Le lupus de type Chilblain est une manifestation en plaques, papules violacées ou érythémateuses des extrémités du corps. Cette manifestation est sensible à la chaleur.   |
|   | De type Chilblain                            | ✗              | ✓          | ✗  |  |
|   | Chevauchement discoïde-lichen plan           | ✗              | ✓          | ✗  |  |
|   | <b>Photosensibilité :</b>                    | ✓              | ✗          | ✗  | Manifestations variables et subséquentes à l'exposition aux UV A et B. (A) Inclus dans les définitions d'autres items cliniques  |
|   | <b>Ulcérations :</b>                         |                |            |  |  |
|   | Ulcères oraux                                | ✓              | ✓          | ✓ (2)  | Généralement indolores, macules, érythème, pétéchies et ulcères. Peut aussi être observées sur d'autres muqueuses. Pas de vasculites.  |
|   | Ulcères nasaux                               | ✗              | ✓          | ✗  |  |
|   | <b>Alopecie non cicatricielle :</b>          | ✗              | ✓          | ✓ (2)  | Chutes de cheveux aux alentours des périodes d'exacerbations et aspect spécifique des cheveux (i.e. fins et cassants)  |
|   | <b>Manifestations arthritiques :</b>         | ✓              | ✓          | ✓ (6)  | Synovite (> 2 articulations), douleurs (> 2 articulations), raideurs matinales (> 30 min.)   |
|   | <b>Sérite :</b>                              |                |            | (5 ou 6)   |  |
|   | Pleurite                                     | ✓              | ✓          | ✓  | Généralement modérées, bilatérales et exsudatives. Peut être douloureuse.  |
|   | Péricardite                                  | ✓              | ✓          | ✓  | Généralement modérées et asymptomatiques.  |
|   | <b>Manifestations rénales :</b>              |                |            |  |  |
|   | Protéinurie                                  | ✓              | ✓          | ✓ (4)  | Ratio protéine/créatinine ou protéines urinaires (i.e. sur 24h) >0,5 g/24h   |
|   | Cylindres                                    | ✓              | ✓          | ✗  | (A) Plusieurs types de cylindres inclus. (S) Cylindres de globules rouges  |
|   | Néphrite                                     | ✗              | ✓          | ✓ (8 ou 10)  | Critères anatomo-pathologiques de <i>International Society of Nephrology/Renal Pathology Society (ISN/RPS)</i>   |
|   | <b>Manifestations neuro-psychiatriques :</b> |                |            |  |  |
|   | Convulsions                                  | ✓              | ✓          | ✓ (5)  |  |
|   | Psychose                                     | ✓              | ✓          | ✓ (3)  |  |
|   | État confusionnel aigu / Délirium            | ✗              | ✓          | ✓ (2)  | s/o  |
| Mononeuropathie multiple                                      | ✗  | ✓              | ✗          |  |  |
| Myélite   | ✗  | ✓              | ✗          |  |  |
| Neuropathie   | ✗  | ✓              | ✗          |  |  |
| <b>Troubles hématologiques :</b>                              |  |                |            |  |  |
| Anémie hémolytique  | ✓  | ✓              | ✓ (4)      | Associés à différentes anomalies détectées par le laboratoire clinique: augmentations de la bilirubine non conjuguée, de la LDH, des réticulocytes, réduction de l'haptoglobuline sérique, anti-globulines. Sphérocytes observés au frottis sanguin. |  |
| Leucopénie  | ✓  | ✓              | ✓ (3)      | Globules blancs < 4.10 <sup>9</sup> /L   |  |
| Lymphopénie   | ✓  | ✓              | ✗          | Lymphocytes < 1.10 <sup>9</sup> /L   |  |
| Thrombopénies   | ✓  | ✓              | ✓ (4)      | Plaquettes < 100.10 <sup>9</sup> /L  |  |
| <b>Voie du complément :</b>                                   | ✗  | ✓              | ✓ (3 ou 4) | (S) Diminution des C3, C4 et CH50 (C1q exclus). (A) Diminution des C3 et/ou C4   |  |
| <b>Anticorps antiphospholipides (aPL) :</b>                   |  |                |            |  |  |
| Anti-β <sub>2</sub> Glycoprotéine I (Anti-β <sub>2</sub> GPI) | ✗  | ✓              | ✓ (2)      | (A) Non requis, peut être apprécié à l'aide de la détection des aCL et du VRDL (S + E) Positivité aux IgM, IgG ou IgA  |  |
| Anticardiolipines (aCL)                                       | ✓  | ✓              | ✓          | IgM, IgG ou IgA > 40 UPL ou au 99ème pourcentage, peuvent venir en complément d'un test VRDL pour la syphilis  |  |
| Anticoagulant lupique (LA)                                    | ✓  | ✓              | ✓          | s/o  |  |
| <b>Autres anticorps :</b>                                     |  |                |            |  |  |
| Anti-nucléaires (ANA)   | ✓  | ✓              | ✗          | (E) Critère d'entrée obligatoire. Positivité à un facteur de dilution ≥ 1:180 en immunofluorescence indirecte  |  |
| Anti-ADN double-brin (anti-dsDNA)                             | ✓  | ✓              | ✓ (6)      | s/o  |  |
| Anti-Smith (anti-Sm)  | ✓  | ✓              | ✓ (6)      | s/o  |  |
| Antiglobulines (i.e. test de Coombs)                          | ✗  | ✓              | ✗          | (S) Détectées en l'absence d'anémie hémolytique. (E) Inclus dans l'item "anémie hémolytique"   |  |
| <b>Seuil de diagnostic :</b>                                  |  | ≥ 4 critères * | ≥ 10       |  |  |

Les critères présentés peuvent être inclus (✓), exclus (✗) ou bien être redondants avec la définition d'autres items pour ce score (□). Pour le score de l'EULAR, la contribution en termes de points de chaque item est mentionnée entre parenthèses. Lorsque plusieurs chiffres sont mentionnés, l'un des deux chiffres est ajouté au total, selon la présentation clinique de la manifestation. **Abréviations :** (A) : Score de l'ACR, (S) : score du SLICC, (E) : score de l'EULAR.

**Table 3.1: Tableau comparatif des items inclus dans quatre grands index d'activités du lupus (partie 1).**

| Manifestations / Item                                | SLEDAI - 2K        | BILAG | SLAM                    | ECLAM                      |
|--|--------------------|-------|-------------------------|----------------------------|
| <b>Manifestations générales/constitutionnelles :</b> |                    |       |                         |                            |
| Fièvre   | ✓ (1)              | ✓     | ✓ (0 à 3)               | ✓ (0,5)                    |
| Fatigue / malaise / léthargie                        | ✗                  | ✓     | ✓ (0 à 2)               |                            |
| Perte de poids                                       | ✗                  | ✓     | ✓ (0 à 3)               | ✗                          |
| Lymphadénopathie                                     | ✗                  | ✓     | ✓ (0 à 2)               | ✗                          |
| Hépatosplénomégalie                                  | ✗                  | ✓     | ✓ (0 à 2)               | ✗                          |
| Anorexie / nausées / vomissements                    | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| <b>Dermatologiques :</b>                             |                    |       |                         |                            |
| Éruptions macropapulaires - sévère/active            |                    | ✓     |                         |                            |
| Éruptions macropapulaires - modérée                  | ✓ (2)              | ✓     |                         |                            |
| Érythème malaire                                     |                    | ✓     | ✓ (0 à 3)               | ✗ <sup>3</sup> (0,5 à 1,5) |
| Lésions discoïdes - généralisées                     | ✗                  | ✓     |                         |                            |
| Lésions discoïdes - localisées                       | ✗                  | ✓     |                         |                            |
| Alopécie - sévère/active                             |                    | ✓     | ✓ (0 à 2)               | ✗                          |
| Alopécie - modérée                                   | ✓ (2)              | ✓     |                         | ✗                          |
| Panniculite - sévère                                 | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Angioedème   | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Ulcérations des muqueuses - étendues                 |                    | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Ulcérations des muqueuses - localisées               | ✓ (2)              | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Nodules sous-cutanés                                 | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Lupus périnio  | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Érythèmes péri-unguéal                               |                    | ✓     | ✗ <sup>2</sup> (0 ou 1) | ✗                          |
| Doigts enflés  | ✗ <sup>1</sup> (8) | ✓*    |                         | ✗                          |
| Sclérodactylie                                       | ✗                  | ✓*    | ✗                       | ✗                          |
| Calcinose  | ✗                  | ✓*    | ✗                       | ✗                          |
| Télangiectasies                                      | ✗                  | ✓*    | ✗                       | ✗                          |
| <b>Neurologiques et ophtalmiques :</b>               |                    |       |                         |                            |
| Céphalées / Migraines                                | ✓ (8)              | ✓     | ✓ (0 à 2)               |                            |
| Convulsions  | ✓ (8)              | ✓     | ✓ (0 à 3)               |                            |
| Accident vasculaire cérébral (AVC)                   | ✓ (8)              | ✓     | ✓ (0 à 3)               | ✓ (2)                      |
| Dépression organique                                 | ✗                  | ✓     |                         |                            |
| Psychose / délire / confusion                        | ✓ (8)              | ✓     | ✓ (0 à 3)               |                            |
| Conscience altérée / atteinte cognitive              |                    | ✓     |                         | ✗                          |
| Syndrome cérébral organique / pseudotumeur cérébrale | ✓ (8)              | ✓     | ✓ (0 à 3)               | ✗                          |
| Papillite  | ✗                  | ✗     |                         | ✗                          |
| Méningite non infectieuse                            | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Mononeuropathie multiple                             | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Chorée   | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Ataxie cérébelleuse                                  | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Atteinte des nerfs crâniens                          | ✓ (8)              | ✗     | ✗                       | ✗                          |
| Corps cytoïdes                                       |                    | ✓     | ✓ (0 à 3)               | ✗                          |
| Atteintes oculaires (e.g. hémorragies, épisclérite)  | ✓ (8)              | ✗     | ✓ (0 à 3)               | ✗                          |
| <b>Musculosquelettiques :</b>                        |                    |       |                         |                            |
| Myosite  | ✓ (4)              | ✓     | ✓ (0 à 3)               | ✓ (2)                      |
| Myalgie  | ✗                  | ✓     |                         | ✗                          |
| Myosite chronique modérée                            | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Polyarthrite   | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Arthrite   | ✓ (4)              | ✓     | ✗                       |                            |
| Douleurs articulaires / Arthralgie                   | ✗                  | ✓     | ✓ (0 à 3)               | ✓ (1)                      |
| Tendinite  | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Douleurs articulaires / Arthralgie                   | ✗                  | ✓     | ✓ (0 à 3)               | ✗                          |
| Contractures des tendons et difformités              | ✗                  | ✓*    | ✗                       | ✗                          |
| Nécrose non infectieuse                              | ✗                  | ✓*    | ✗                       | ✗                          |

**Table 3.2: Tableau comparatif des items inclus dans quatre grands index d'activités du lupus (suite).**

| Manifestations / Item   | SLEDAI - 2K        | BILAG | SLAM                    | ECLAM                      |
|---|--------------------|-------|-------------------------|----------------------------|
| <b>Cardiovasculaires et pulmonaires :</b>                     |                    |       |                         |                            |
| Douleurs (plèvre / péricarde)                                 | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Angor - Modéré / Intermittent                                 | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Arythmie  | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Changements radiographiques - cœur                            | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Péricardite / myocardite                                      | ✓ (2)              | ✓     | ✓ (0 à 3)               | ✓ (1)                      |
| Défaillance cardiaque   | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Changements radiographiques - poumons                         | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Dyspnée   | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Pleurésie ( <i>friction rub</i> )                             | ✓ (2)              | ✓     | ✓ (0 à 3)               | ✓ (1)                      |
| Effusions (plèvre / péricarde)                                | ✗                  | ✓     | ✓ (0 à 3)               | ✗                          |
| Maladie pulmonaire / Pneumonie                                | ✗                  | ✓     | ✓ (0 à 3)               | ✗                          |
| Diminution de la fonction pulmonaire                          | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Maladie pulmonaire / Pneumonie                                | ✗                  | ✓     | ✓ (0 à 3)               | ✗                          |
| <b>Vasculite :</b>  |                    |       |                         |                            |
| Vasculite cutanée majeure (ulcères inclus)                    | ✗ <sup>1</sup> (8) | ✓     | ✗ <sup>2</sup> (0 ou 1) | ✗ <sup>3</sup> (0.5 à 1.5) |
| Vasculite cutanée mineure                                     | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Manifestations abdominales (e.g. vasculite, péritonite)       | ✗                  | ✓     | ✓ (0 à 3)               | ✓ (2)                      |
| Evènements thromboemboliques fréquents (hors AVC)             | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Phénomène de Raynaud  | ✗                  | ✓     | ✓ (0 ou 1)              | ✗                          |
| Livedo réticularis  | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Thrombose veineuse superficielle                              | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Thromboembolismes Premier épisode - hors AVC                  | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| <b>Néphrologiques :</b>                                       |                    |       |                         |                            |
| Pression sanguine systolique                                  | ✗                  | ✓*    | ✗                       | ✗                          |
| Pression sanguine diastolique                                 | ✗                  | ✓*    | ✓ (0 à 3)               | ✗                          |
| Hypertension accélérée  | ✗                  | ✓*    | ✗                       | ✗                          |
| Pyurie  | ✓ (4)              | ✗     | ✗                       | ✗                          |
| Hématurie   | ✓ (4)              | ✗     | ✗                       | ✗                          |
| Protéinurie (évaluée par bandelettes-test urinaires)          | ✗                  | ✓*    | ✗                       | ✗                          |
| Protéinurie sur 24 heures                                     | ✓ (4)              | ✓*    | ✗                       | ✓ (0.5 à 1.5)              |
| Sédiments urinaires   | ✓ (4)              | ✓*    | ✓ (0 à 3)               | ✗                          |
| Créatinine élevée (plasmatique ou sérique)                    | ✗                  | ✓*    | ✗                       | ✗                          |
| Clairance de la créatinine / débit de filtration glomérulaire | ✗                  | ✓*    | ✓ (0 à 3)               | ✗                          |
| Historique de néphrite active (sur 3 mois)                    | ✗                  | ✓*    | ✗                       | ✗                          |
| Syndrome néphrotique  | ✗                  | ✓*    | ✗                       | ✗                          |
| <b>Hématologiques et sérologiques:</b>                        |                    |       |                         |                            |
| Hématocrite   | ✗                  | ✗     | ✓ (0 à 3)               | ✗                          |
| Hémoglobine   | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Temps de sédimentation  | ✗                  | ✗     | ✓ (0 à 3)               | ✓ (1)                      |
| Neutrophiles / neutropénie                                    | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Lymphocytes / lymphopénie                                     | ✗                  | ✓     | ✓ (0 à 3)               | ✗                          |
| Globules blancs / leucopénie                                  | ✓ (1)              | ✓     | ✓ (0 à 3)               | ✗                          |
| Plaquettes / thrombopénie                                     | ✓ (1)              | ✓     | ✓ (0 à 3)               | ✓ (1)                      |
| Anémie hémolytique  | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Antiglobulines (test de Coombs)                               | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Anticoagulant circulant                                       | ✗                  | ✓     | ✗                       | ✗                          |
| Diminution du complément                                      | ✓ (2)              | ✗     | ✗                       | ✓ (1 à 2)                  |
| Anti-ADN double-brins (anti-dsDNA)                            | ✓ (2)              | ✗     | ✗                       | ✗                          |

Les critères présentés peuvent être inclus (✓), exclus (✗) ou bien être groupés (□<sup>x</sup>). Pour le BILAG, certaines variables (\*) peuvent être dichotomiques (i.e., oui/non) ou bien inclure une variable continue complémentaire. Les chiffres entre parenthèses correspondent à la contribution de l'item au calcul du score total.



**Table 4: Scores de dommages dans le lupus.**

| Manifestations / Item                                    | SDI                | BILD | LDIQ |
|--|--------------------|------|------|
| <b>Ophthalmiques :</b>                                   |                    |      |      |
| Cataracte  | 1                  | ✓    | ✓    |
| Atteinte de la rétine / atrophie optique                 | 1                  | ✓    | ✓    |
| <b>Neuropsychiatriques :</b>                             |                    |      |      |
| Conscience altérée / atteinte cognitive                  | 1                  | ✓    | ✓    |
| Convulsions  | 1                  | ✓    | ✓    |
| Accident vasculaire cérébral (AVC)                       | 1 (2 si récursive) | ✓    | ✓    |
| Neuropathies crâniennes / périphériques (sauf: optiques) | 1                  | ✓    | ✗    |
| Myélite transverse                                       | 1                  | ✓    | ✓    |
| <b>Néphrologiques :</b>                                  |                    |      |      |
| Débit de filtration glomérulaire estimé < 50%            | 1                  | ✓    | ✗    |
| Protéinurie ≥ 3.5 g sur 24 heures                        | 1                  | ✓    | ✗    |
| Maladie rénale terminale                                 | 3                  | ✓    | ✓    |
| <b>Pulmonaires :</b>                                     |                    |      |      |
| Hypertension pulmonaire                                  | 1                  | ✓    | ✓    |
| Fibrose pulmonaire                                       | 1                  | ✓    | ✓    |
| Syndrome des poumons rétractés ( <i>shrinking lung</i> ) | 1                  | ✓    | ✗    |
| Fibrose pleurale   | 1                  | ✓    | ✗    |
| <b>Cardiovasculaires :</b>                               |                    |      |      |
| Angor / <i>bypass</i> coronarien                         | 1 (2 si récursive) | ✓    | ✓    |
| Infarctus du myocarde                                    | 1                  | ✓    | ✓    |
| Cardiomyopathie  | 1                  | ✓    | ✗    |
| Valvulopathie  | 1                  | ✓    | ✗    |
| Péricardite / péricardiectomie                           | 1                  | ✓    | ✓    |
| Claudication   | 1                  | ✓    | ✗    |
| Perte tissulaire - mineure                               | 1                  | ✓    | ✓    |
| Perte tissulaire - majeure                               | 1 (2 si multisite) | ✓    | ✓    |
| Thrombose veineuse                                       | 1                  | ✓    | ✓    |
| <b>Gastro-intestinales :</b>                             |                    |      |      |
| Infarctus ou résection chirurgicale                      | 1 (2 si multisite) | ✓    | ✗    |
| Insuffisance mésentérique                                | 1                  | ✗    | ✗    |
| Péritonite chronique                                     | 1                  | ✓    | ✓    |
| Sténose ou chirurgie                                     | 1                  | ✓    | ✓    |
| <b>Musculosquelettiques :</b>                            |                    |      |      |
| Atrophie / faiblesse musculaire                          | 1                  | ✓    | ✗    |
| Arthrite déformante / érosive                            | 1                  | ✓    | ✓    |
| Ostéoporose avec fracture ou tassement vertébral         | 1                  | ✓    | ✓    |
| Nécrose avasculaire                                      | 1 (2 si multisite) | ✓    | ✓    |
| Ostéomyélite   | 1                  | ✓    | ✓    |
| <b>Dermatologiques :</b>                                 |                    |      |      |
| Alopécie - chronique / cicatricielle                     | 1                  | ✓    | ✗    |
| Cicatrices extensives                                    | 1                  | ✓    | ✓    |
| Ulcères cutanés  | 1                  | ✓    | ✓    |
| <b>Reproductives :</b>                                   |                    |      |      |
| défaillance gonadique                                    | 1                  | ✓    | ✓    |
| <b>Diabète :</b>   |                    |      |      |
|  | 1                  | ✓    | ✓    |
| <b>Cancers :</b>   |                    |      |      |
|  | 1 (2 si multisite) | ✓    | ✓    |

Les critères originels du SDI peuvent être inclus (✓) ou exclus (✗) des questionnaires d'autorapport. Pour le SDI, la contribution en termes de points de chaque item est mentionnée entre parenthèses.

**Les critères de Sapporo et de Sydney permettent le diagnostic de l'APS.** Les deux méthodes partagent les mêmes critères cliniques, à savoir un ou plusieurs évènements thromboemboliques (i.e., *thromboembolic APS*, TAPS) et/ou troubles obstétricaux [i.e., *obstetrical APS*, OAPS : mort d'un fœtus sans malformations apparentes à partir de la 10<sup>e</sup> semaine de gestation, naissance prématurée avant la 34<sup>e</sup> semaine de gestation due à une éclampsie ou une prééclampsie et/ou avortements à répétitions ( $\geq 3$ ) de fœtus sans malformations apparentes à partir de la 10<sup>e</sup> semaine de gestation]. Les critères édités à Sydney comportent une mise à jour relative aux items sérologiques; là où les critères de Sapporo incluent la positivité aux aCL (i.e., IgM et/ou IgG) et au LA<sup>682</sup>, ceux de Sydney ajoutent les anti- $\beta_2$ GPI (i.e., IgM et/ou IgG) à la liste des aPL<sup>411</sup>. Les deux méthodes nécessitent que le patient exprime un critère clinique ainsi qu'au moins un aPL de façon persistante sur une année (i.e., au moins deux prélèvements positifs sur cette période)<sup>683</sup>. D'autres symptômes, dits « hors critères » (i.e., *non-criteria*) telles que des manifestations rénales ou neurologiques ont été décrites chez les patients, mais ne sont pas encore incluses dans les grilles de diagnostic de l'APS<sup>684</sup>.

**Outils diagnostics à disposition des équipes soignantes.** Le diagnostic différentiel des maladies auto-immunes repose très fortement sur l'œil clinique du médecin ainsi que sur sa formation séméiologique afin de pouvoir percevoir les manifestations cliniques dépistables à l'auscultation. Les atteintes médiastinales et cardiovasculaires pourront être évaluées à l'aide de différentes techniques de cardiologie (e.g., électrocardiogramme, échographie-doppler, cathétérisme) ou de radiologie [e.g., radiographie, résonance magnétique nucléaire (RMN), tomographie par émission de position (PET)]<sup>523,673,685-687</sup>. Les atteintes aux reins pourront être évaluées à l'aide de la quantification de la protéinurie (e.g., ELISA, bandelettes urinaires), l'estimation du débit de filtration glomérulaire (i.e., *estimated glomerular filtration rate*, eGFR) ainsi que la détection par cytologie des sédiments dans l'urine<sup>688,689</sup>. Les atteintes aux tissus, notamment du foie, au cours des épisodes de néphrite lupique ou de manifestations cutanées seront visualisées sur échantillons de biopsie à l'aide de différentes techniques de microscopie<sup>662,690,691</sup>. Les paramètres de cytologie sanguine (e.g., nombre, volume

et granularité des cellules sanguines, hémocrite) et les facteurs solubles (e.g., anticorps, enzymes hépatiques, lipides sanguins) pourront être caractérisés à l'aide d'une batterie de tests biochimiques de routine (e.g., électrophorèse, ELISAs, immunofluorescence indirecte, spectrophotométrie). Il est intéressant mentionner plusieurs techniques spécifiques qui peuvent se substituer aux tests ELISAs usuels<sup>692</sup>. Le test de Farr permet de détecter les anticorps anti-dsDNA de fortes avidités et de tous isotypes à l'aide d'acides nucléiques humains radiomarqués, alors que les tests ELISA emploient généralement de l'ADN plasmidique d'*Escherichia coli* pour tester un isotype d'anticorps déterminé par les réactifs inclus dans le kit<sup>693,694</sup>. L'immunofluorescence indirecte sur un protiste unicellulaire (i.e. *Crithidia luciliae* immunofluorescence test, CLIFT) permet la détection, à la fois d'anti-dsDNA et d'ANA. La source des antigènes dans ce test est l'unique grosse mitochondrie exprimant de nombreuses copies de mtDNA (i.e., le kinétoplaste) au sein de chaque cellule<sup>695,696</sup>. Des variations du « temps de céphaline élevé » (i.e., *partial thromboplastin time*, PTT), technique au cours de laquelle le plasma de patient est incubé en présence de calcium ainsi que de kaolin ou de céphaline, permettront d'évaluer l'élongation du temps de coagulation dû à la présence de LA<sup>697,698</sup>. Une autre technique implique l'incubation de plasma en présence de venin de vipère de Russell (i.e., *diluted Russell viper venom time*, dRVVT) et à établir un ratio entre le temps de coagulation de l'échantillon divisé par une valeur-contrôle<sup>699</sup>. La société internationale de la thrombose et de l'hémostase (i.e., *International Society of Thrombosis and Hemostasis*, ISTH) recommande que ces tests soient confirmés par l'observation d'un temps de coagulation prolongé en mélangeant à volume égal du plasma testé et du plasma sain ainsi que la correction du temps de coagulation en présence d'un excès de phospholipides<sup>700,701</sup>.

## Traitements usuels

Cette section vise à présenter les drogues communément administrées aux patients souffrant d'une des trois grandes maladies abordées dans la présente thèse. Les aspects cliniques de ces molécules (e.g., dénomination commerciale, formulation, pharmacocinétique, posologie, effets secondaires) ne seront pas ou peu présentés. Cette section se concentrera sur les mécanismes d'action de ces médicaments ainsi que leur utilité dans la gestion des manifestations cliniques de ces maladies.

**Les anti-malariques :** La chloroquine et l'hydroxychloroquine (i.e., abrégées CQ et HCQ) sont deux drogues couramment administrées aux patients lupiques. Elles permettent une diminution du pH des lysosomes aboutissant à une perturbation des fonctions de présentation des antigènes et de production de cytokines des APC<sup>702,703</sup>. En plus de cette action, ces drogues semblent entrer en compétition avec la fixation des acides nucléiques sur leurs TLRs (i.e., TLR3, -7, -8 et -9) bloquant ainsi la production d'IFN de Type I<sup>704</sup>. D'autres actions ont été décrites, comme une influence anti-inflammatoire localisée dans l'épiderme protectrice contre les manifestations cutanées<sup>705</sup>. Ces molécules exercent aussi une influence sur le métabolisme des lipides, permettant d'améliorer les dyslipidémies ainsi que l'athérosclérose<sup>706,707</sup>. L'HCQ semble exercer une influence antithrombotique, *in vitro* dans l'APS, en prévenant la fixation des aPL sur leurs cibles ainsi qu'en entravant leur capacité à activer les plaquettes<sup>708,709</sup>.

**Les glucocorticoïdes (GC) :** ces molécules liposolubles exercent une première action, dite génomique, en traversant la membrane plasmique pour se fixer sur leur récepteur cytosolique (i.e., *cytosolic GC receptor*, cGR) pour entraîner leur translocation vers le noyau et y exercer une influence anti-inflammatoire. Le complexe cGR-GC permettra ainsi d'augmenter la transcription de certaines voies anti-inflammatoires [i.e., transactivation. E.g., IL10, *inhibitor of NF-kB* (ikB)]

et d'intermédiaires métaboliques, tout en inhibant l'action de facteurs de transcriptions (i.e., transrepression), aboutissant à une diminution de AP-1 et de NF- $\kappa$ B<sup>710</sup>. Une deuxième voie (i.e., non génomique) provoquera une diminution de l'activité de la PLA2, de la voir de la *p38 mitogen-activated protein kinase* (i.e., p38 MAPK) et de la production d'ATP<sup>711</sup>. Plusieurs mécanismes d'efflux des GC, de modifications post-transcriptionnelles des cGR, de compétitions avec des cGR dépourvus d'actions anti-inflammatoires ou encore de surexpression de facteurs proinflammatoires pourront occasionner une résistance aux GC chez les patients, nécessitant une augmentation des doses administrées<sup>712</sup>. Malgré leur efficacité, les GC peuvent déclencher de nombreuses réactions adverses ; leur administration nécessitera donc un suivi minutieux<sup>710</sup>. Les CG semblent aussi influencer les fonctions mitochondriales selon une courbe dose-réponse en forme de « U »<sup>713</sup>.

**Immunosuppresseurs et immunomodulateurs :** plusieurs drogues peuvent être administrées afin de pouvoir supprimer la réponse immunitaire chez les patients souffrant de troubles auto-immuns. L'azathioprine est une molécule qui influencera la réponse immunitaire *via* deux effets qu'exercent ses métabolites sur les lymphocytes T : d'une part, ils pourront induire la voie mitochondriale de l'apoptose par une voie dépendent du récepteur de co-stimulation CD28, ainsi que de s'incorporer dans l'ADN pour en empêcher sa réplication<sup>714,715</sup>. La cyclophosphamide, un agent alkylant peut aussi être administré *per os* (PO) ou par voie intraveineuse (i.v.) afin de dépléter les lymphocytes B et T<sup>716</sup>. Le leflumide inhibe une enzyme localisée dans la MIM et responsable de la synthèse de pyrimidines, la *dihydroorotate dehydrogenase* (DHODH), entravant par conséquent l'expansion des lymphocytes<sup>717</sup>. Le méthotrexate (MTX) est un anti-métabolite exerçant différents niveaux d'action. Il inhibe le métabolisme des folates, entravant la synthèse des purines et pyrimidines, la signalisation dépendante de l'adénosine, la méthylation de biomolécules, l'expression de molécules d'adhésions, de prostaglandines et de métalloprotéases. Il permet aussi une augmentation de la production de ROS et influence la balance cytokinique en faveur des facteurs anti-inflammatoires. L'ensemble de ces éléments menant à l'inhibition de la prolifération des T<sub>eff</sub>

ainsi que l'induction leur mort par apoptose<sup>718</sup>. La cyclosporine A (CsA) est une molécule qui inhibe l'activation des lymphocytes T en s'associant aux protéines de la famille des cyclophilines (Cyp) pour inhiber la calcineurine, aboutissant à l'inhibition de facteurs proinflammatoires (AP-1, NF-kB, p38 MAPK) ainsi que de la mobilisation calcique<sup>719</sup>. L'action de la CsA associée à la CypD influence le métabolisme mitochondrial (cf. section précédente sur le métabolisme mitochondrial). Le mycophénolate mofétil ainsi que l'acide mycophénolique inhibent l'*inosine-5'-monophosphate dehydrogenase* (i.e., IMPDH, enzyme responsable de la synthèse de guanosine). Les lymphocytes B et T seront par conséquent incapables de répliquer leurs génomes, il en résultera une déplétion de ces cellules<sup>720,721</sup>.

**Les agents biologiques** représentent un ensemble de molécules, telles que des protéines recombinantes ou des anticorps, dirigées contre une cible spécifique dont plusieurs représentants sont actuellement autorisés ou à l'étude dans le cadre du traitement des maladies abordées dans la présente étude. Le traitement le plus courant étant le Rituximab (i.e., anticorps chimérique monoclonal anti-CD20) permettant de dépléter spécifiquement les lymphocytes B. L'Abatacept est une protéine de fusion entre un IgG et le CTLA-4 permettant la régulation négative des T<sub>eff</sub>. Le Belilumab est un anticorps monoclonal humain dirigé contre le stimulateur soluble des lymphocytes B (i.e., *B-lymphocyte stimulator*, BLYS) permettant de réduire la production d'autoanticorps. L'ustekinumab (i.e., dirigé contre p50, une portion commune aux IL12 et -23) permet, en aval, de contrôler les réponses proinflammatoires de type Th<sub>1</sub>/Th<sub>17</sub><sup>722,723</sup>. Plusieurs agents biologiques permettant d'interférer avec les fonctions du lymphocyte B [i.e., Epratuzumab (anti-CD22), Ianalumab (anti-BAFF), Atacicept (protéine de fusion entre un IgG et des sites de fixation de APRIL et BlyS)] ainsi que des inhibiteurs des Janus-Kinases (i.e., JAKs) sont actuellement à l'essai<sup>724</sup>. Bien que séduisants, l'efficacité des anti-IFN n'a jamais été prouvée dans le SLE<sup>725</sup>. L'inhibition du composant C5 du complément par l'eculizumab a déjà été considérée comme traitement de dernier recours dans le CAPS sur la base de travaux préliminaires chez l'humain et la souris<sup>726</sup>.

**L'acide ursodésoxycholique** (i.e., *ursodeoxycholic acid*, UCDA) est un acide biliaire administré pour le traitement de la cholestase. L'UCDA permet de stimuler la production d'acides biliaires tout en protégeant les cellules environnantes contre les dommages qu'ils peuvent occasionner. Additionnellement, l'UCDA protège les BEC contre l'apoptose <sup>727</sup>.

**Les traitements de contrôle des thromboses : anti-plaquettes et anticoagulants** permettent la gestion des troubles thromboemboliques, principalement associés à l'APS <sup>728</sup>. Parmi les options disponibles se trouve l'aspirine, un inhibiteur irréversible des cyclooxygénases permettant de contrôler la production de thromboxane A<sub>2</sub> plaquettaire. Elle pourra être administrée à faible dose (i.e., 40-160 mg) comme mesure prophylactique <sup>729</sup>. Une seconde drogue anti-plaquette, le Clopidogrel, permet le contrôle de la fonction plaquettaire par l'antagonisme irréversible du récepteur à l'ADP P2Y<sub>12</sub> <sup>730,731</sup>. Les antagonistes de la vitamine K (i.e., *vitamin K antagonists*, VKA. E.g., warfarine) bloquent la maturation de certains facteurs (i.e., II, VII, IX et X) de la coagulation <sup>732,733</sup>. Le risque d'une courte phase procoagulante (i.e., due à l'action des VKA sur les protéines C et S) ainsi que la lourde gestion clinique des effets des AVK ont suscité un intérêt envers de nouvelles molécules agissant sur des cibles plus restreintes ; les anticoagulants oraux directs (i.e., *direct oral anticoagulants*, DOACs). Chez les patients ayant des contre-indications aux AVK ou bien chez qui ces drogues ne procurent pas une anticoagulation efficace, l'EULAR propose l'utilisation des DOACs principaux [i.e., dabigatran (i.e., inhibiteur de la thrombine), rivaroxaban, apixaban, et edoxaban (i.e., inhibiteurs du facteur Xa)]. Toutefois, l'utilisation du rivaroxaban est déconseillée chez les patients triples positifs pour les aPL <sup>728,734</sup>. L'héparine interagit avec de nombreuses biomolécules ; son action anticoagulante est principalement due à la capacité à activer l'antithrombine <sup>735</sup>. L'héparine de bas poids moléculaire (i.e., *low molecular weight heparin*, LMWH) pourra être administrée de façon prophylactique ou pour traiter certaines manifestations <sup>728,736</sup>. Dans certaines circonstances (e.g., CAPS), l'héparine non fractionnée (i.e., *unfractionated heparin*, UFH) pourra être utilisée, plutôt que la LWMH. D'autres anticoagulants inhibiteurs de la cascade

de coagulation (e.g., fondaparinux) pourront être administrés selon la présentation clinique de la maladie (e.g., grossesse, atteintes rénales, thrombopénie induite par l'héparine) <sup>736</sup>.

**Les traitements de gestion des risques cardiovasculaires** incluent les statines (i.e., inhibiteurs de la synthèse du cholestérol) <sup>737</sup>, les antihypertenseurs (e.g., diurétiques, inhibiteurs de l'enzyme de conversion, bloqueurs du récepteur de l'angiotensine,  $\beta$ -bloquants, inhibiteurs calciques) <sup>738</sup> et les traitements contre le diabète permettent de contrôler les comorbidités et facteurs de risques cardiovasculaires dans les maladies auto-immunes et rhumatismales <sup>739,740</sup>.

**Autres traitements :** La vitamine D est une molécule anti-inflammatoire (c.f. section précédente sur la contribution des mitochondries à la biosynthèse de la vitamine D) fréquemment carencée chez les patients souffrant de troubles auto-immuns. Une supplémentation en vitamine D pourra être incluse dans l'arsenal thérapeutique offert aux patients <sup>741</sup>. De par le biais de sexe de l'auto-immunité et l'implication des hormones sexuelles dans le contrôle de la réponse immunitaire ainsi que de critères socio-économiques (e.g., âges des patientes, projets parentaux) et cliniques (e.g., risque de thromboses, ménopause), les patientes en rhumatologie pourront disposer d'un suivi approfondi de leur profil hormonal ainsi que se faire proposer des traitements hormonaux adaptés <sup>742</sup>. L'injection intraveineuse d'un bolus d'anticorps (i.e., *Intravenous immunoglobulins*, IVIG) a été indiquée comme bénéfique dans le cadre de maladies auto-immunes (i.e., accroissement des populations de T<sub>reg</sub>, favorisation d'une balance cytokinique anti-inflammatoire, délétion des lymphocytes B autoréactifs et augmentation de l'affinité des cGR) au travers de différents mécanismes (e.g., interception du complément, interactions inhibitrices avec les FcR, fixation des paratopes sur des cibles variées) <sup>743-745</sup>. Dans une optique similaire, le transfert de plasma est parfois utilisé dans la prise en charge du CAPS <sup>736,746</sup>.



## Démarche expérimentale du projet

**Contexte expérimental :** Le lupus érythémateux disséminé (SLE) est une maladie auto-immune dont l'expression clinique est très variable d'un patient à l'autre ; elle est ainsi surnommée « la maladie aux mille visages », le SLE est une maladie très difficile à diagnostiquer. Plusieurs avenues sont ainsi explorées afin de pallier au manque de biomarqueurs validés pour une utilisation clinique <sup>747</sup>. La mise au point de tests diagnostiques permettrait le dépistage précoce de la maladie chez les patients, et ainsi limiter les atteintes aux organes des patients. De nouveaux tests à valeur pronostique permettraient de prédire l'évolution de la maladie chez les patients et ainsi leur offrir des options thérapeutiques personnalisées selon leurs facteurs de risques. Enfin, les marqueurs de stratification faciliteraient la caractérisation de sous-groupes de patients au sein des maladies auto-immunes, des connectivites et/ou du LED.

La physiopathologie du lupus est caractérisée par l'activation de nombreuses lignées cellulaires, menant à la libération de mitochondries intactes ou de leurs composantes dans la circulation <sup>298,310-315</sup>. Parmi ces types cellulaires, l'activation des plaquettes permet la production de microparticules pouvant contenir des mitochondries, ainsi que des mitochondries « nues », directement au contact du milieu extracellulaire <sup>303,304,313,748</sup>. De même, l'activation des neutrophiles dans la maladie provoque la libération de filets d'acides nucléiques (i.e., NETs) incluant de l'ADN mitochondrial oxydé <sup>298,311</sup>. Additionnellement, les dommages aux tissus permettront la libération des mitochondries depuis le cytosol, vers le milieu extracellulaire <sup>306-309</sup> et l'apoptose contribuera à la production de vésicules exprimant des composantes mitochondriales telles que la cardiolipine <sup>187</sup>.

La mitochondrie est une organelle intracellulaire considérée comme issue de l'endosymbiose entre une  $\alpha$ -protéobactérie et une cellule eucaryote primitive. Elle exprime ainsi des caractéristiques spécifiques aux procaryotes (ADN hypométhylé circulaire à doubles brins, peptides N-formylés, cardiolipine) qui pourront être reconnus en tant que motifs de danger associés aux mitochondries (mtDAMPs) par les cellules du système immunitaire inné, provoquant ainsi une réponse proinflammatoire <sup>749</sup>. De plus, les mitochondries ainsi que leurs composants – endogènes ou oxydés –

constituent une importante source d'autoantigènes ciblés par les anticorps dans différents troubles auto-immuns<sup>399</sup>.

**Résultats préliminaires du laboratoire :** Le Dr. Éric Boilard avait déjà mis en évidence la production de microparticules plaquettaires dans le cadre de la polyarthrite rhumatoïde et leur contribution à l'inflammation articulaire<sup>748</sup>. Par la suite, son équipe de recherche a publié des études indiquant que les microparticules plaquettaires expriment des autoantigènes pouvant contribuer à la formation de complexes immuns<sup>750</sup>. Le laboratoire a aussi montré que l'activation plaquettaire permet la production de plusieurs types de microparticules, incluant des mitochondries nues (i.e., en contact avec la circulation) ou intégrées au sein d'un système membranaire d'origine plaquettaire<sup>313</sup>. Cette avenue de recherche, ainsi que la présence d'anticorps dirigés contre la cardiolipine (i.e., un phospholipide uniquement synthétisé au sein de la mitochondrie, chez l'humain)<sup>90,399,408-412</sup>, incriminant les mitochondries extracellulaires comme potentiellement proinflammatoires et immunogéniques dans le cadre du lupus érythémateux disséminé et du syndrome des antiphospholipides.

L'intérêt envers l'implication des mitochondries extracellulaires entières et/ou de leurs composantes a par ailleurs, été renforcé par la publication par d'autres laboratoires, d'études indiquant la libération de mitochondries par de nombreuses lignées cellulaires<sup>298,306-315</sup>. Deux publications par les Dr. Caielli et Dr. Lood ont, par ailleurs, indiqué que de l'ADN mitochondrial oxydé pouvait être libéré lors de l'activation des neutrophiles et provoquer la production d'interféron-alpha (i.e., cytokine signature du lupus), par les cellules dendritiques plasmacytoïdes<sup>298,311</sup>.

Ces éléments, ainsi que la littérature concernant l'existence d'une réponse immunitaire humorale dirigée contre la mitochondrie<sup>399</sup> permettent de postuler que les mitochondries sont antigéniques dans le lupus et que les anticorps anti-mitochondriaux pourraient contribuer à la physiopathologie de la maladie, notamment au sein des organes riches en mitochondries comme le rein ou le cerveau (i.e., néphrite lupique, neurolupus)<sup>9</sup>.

**Hypothèse de recherche :** Lors de leur libération dans le milieu extracellulaire par différentes lignées cellulaires, les mitochondries, ainsi que leurs composantes constituent une importante source d'antigènes permettant la production de complexes immuns dans le cadre du lupus érythémateux disséminé. Les niveaux de ces anticorps anti-mitochondriaux pourraient être indicateurs du niveau d'activité de la maladie. Ainsi, leur détection permettra d'affiner le diagnostic de la maladie, de prévoir son évolution et/ou de stratifier les patients lupiques selon les manifestations de leur maladie, permettant ainsi une meilleure prise en charge de la maladie.

### **Objectifs principaux :**

- Détecter la présence d'anticorps dirigés contre les mitochondries intègres et/ou leurs acides nucléiques (i.e., ARN et ADN mitochondrial) chez des patients souffrant de lupus érythémateux disséminé.
- Évaluer les associations biostatistiques entre les niveaux en anticorps anti-mitochondriaux mesurés et les paramètres cliniques de la maladie.
- Caractériser le spectre des protéines mitochondriales ciblées par les autoanticorps exprimés par les patients lupiques.
- Identifier de nouveaux candidats-biomarqueurs présentant un intérêt dans l'amélioration du diagnostic, du pronostic et/ou la stratification des patients lupiques.

### **Objectif secondaire :**

- Reproduire la caractérisation des anticorps anti-mitochondriaux dans le syndrome des antiphospholipides, un modèle de maladie auto-immune pouvant être isolée ou associée avec le lupus.

**Démarche expérimentale :** Différents types d'AMA ont été détectés à l'aide de tests ELISAs de type direct à l'aide d'échantillons de séra provenant de plusieurs cohortes, incluant donneurs sains, et patients atteints de SLE ou d'APS. Les associations entre les niveaux des AMA et les paramètres cliniques de ces deux maladies (i.e., paramètres de laboratoire clinique, manifestations cliniques) ont ensuite été calculées à l'aide de l'outil biostatistique.

Les protéines mitochondriales reconnues par les AMA dans le lupus ont ensuite été identifiées par spectrométrie de masse à partir d'IgG de patients mis en présence d'échantillons de mitochondries, comme source d'antigènes. Différentes cibles d'intérêt ont été obtenues (i.e., produite par des laboratoires en collaboration ou achetées auprès d'entreprises spécialisées), puis leurs antigénicités respectives ont été testées par test ELISA direct. Les candidats dont les titres en autoanticorps présentant des différences significatives entre les groupes de donneurs sains ou malades ont été analysés à la recherche d'associations biostatistiques avec les paramètres cliniques du lupus.

**Résultats originellement escomptés :** Au début du projet, nous projetions d'identifier plusieurs cibles d'origine mitochondriales ciblées par des autoanticorps et que ces anticorps seraient indétectables ou faibles chez les donneurs sains. Aussi, nous nous attendions à ce que, chez les patients, les niveaux en anticorps anti-mitochondriaux soient corrélés avec les titres ou associés avec la positivité aux autoanticorps classiquement mesurés en laboratoire clinique (e.g., antiphospholipides, anticardiolipines, anti-ADN double-brins). Aussi, nous envisagions que ces anticorps – en particulier les IgGs – seraient associés positivement avec les manifestations cliniques de la maladie (i.e., pathogéniques).

# **Chapitre 1 Détection des autoanticorps anti-mitochondriaux chez des patients atteints de lupus érythémateux disséminé et association avec les manifestations cliniques de la maladie.**

## **1.1 Résumé**

Les mitochondries sont des organelles en charge du métabolisme énergétique et de la régulation de l'apoptose. Elles expriment aussi des caractéristiques bactériennes (e.g., CL au sein de la MIM, mtDNA à motifs CpG hypométhylés). Malgré la description de l'effet proinflammatoire des mitochondries extracellulaires, leur capacité à déclencher une réponse immunitaire adaptative est encore méconnue. Nous avons développé deux nouveaux tests permettant la détection d'anticorps dirigés contre la MOM ou le mtDNA. Ces deux types d'anticorps sont augmentés dans un modèle murin, ainsi que chez les patients lupiques et sont élevés chez les patients souffrant de l'APS et de la PBC. En régression logistique, seuls les AmtDNA sont associés avec une élévation des anti-dsDNA ainsi qu'avec la LN. Cette étude décrit de nouvelles méthodes optimisées pour la détection des AMA chez l'humain et la souris. Ces résultats soulignent l'immunogénicité de la mitochondrie, en tant qu'importante source d'autoantigènes dans le SLE

## 1.2 Abstract

Mitochondria are organelles that govern energy supply and control cell death. Mitochondria also express bacterial features, such as the presence of inner membrane cardiolipin and a circular genome rich in hypomethylated CpG motifs. While mitochondrial extrusion by damaged organs or activated cells is thought to trigger innate immunity, it is unclear whether extracellular mitochondria also stimulate an adaptive immune response. We describe the development of novel assays to detect autoantibodies specific to two distinct components of the mitochondrion: the mitochondrial outer membrane and mitochondrial DNA. Antibodies to these two mitochondrial constituents were increased in both human and murine systemic lupus erythematosus (SLE), compared to controls, and were present at higher levels than in patients with antiphospholipid syndrome or primary biliary cirrhosis. In both bi- and multi-variate regression models, antibodies to mitochondrial DNA, but not whole mitochondria, were associated with increased anti-dsDNA antibodies and lupus nephritis. This study describes new and optimized methods for the assessment of anti-mitochondrial antibodies, and demonstrates their presence in both human and murine SLE. These findings suggest that different mitochondrial components are immunogenic in SLE, and support the concept that extracellular mitochondria may provide an important source of circulating autoantigens in SLE.

# **Anti-mitochondrial autoantibodies in systemic lupus erythematosus and their association with disease manifestations**

Yann Becker<sup>1</sup>, Renée-Claude Loignon<sup>2</sup>, Anne-Sophie Julien<sup>3</sup>, Geneviève Marcoux<sup>1</sup>, Isabelle Allaëys<sup>1</sup>, Tania Lévesque<sup>1</sup>, Emmanuelle Rollet-Labelle<sup>1</sup>, Hadrien Benk-Fortin<sup>1</sup>, Nathalie Cloutier<sup>1</sup>, Imène Melki<sup>1</sup>, Lihi Eder<sup>4</sup>, Éric Wagner<sup>5</sup>, Martin Pelletier<sup>1,6</sup>, Hassan El Hajj<sup>7</sup>, Marie-Ève Tremblay<sup>7</sup>, Clémence Belleannée<sup>8</sup>, Marie-Josée Hébert<sup>9</sup>, Mélanie Dieudé<sup>9</sup>, Joyce Rauch<sup>10</sup>, Paul R. Fortin<sup>2,6</sup>, and Eric Boilard<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup> Centre de Recherche du CHU de Québec – Université Laval, Département de microbiologie et immunologie, Faculté de Médecine de l'Université Laval, Québec, Qc, Canada.

<sup>2</sup> Division de Rhumatologie, Département de Médecine, CHU de Québec – Université Laval, Québec, Qc, Canada.

<sup>3</sup> Département de mathématiques et statistique, Université Laval, Québec, Qc, Canada.

<sup>4</sup> Women's College Hospital and University of Toronto, Toronto, ON, Canada.

<sup>5</sup> Immunology and Histocompatibility Laboratory, Department of Medical Biology CHU de Québec - Université Laval; Department of Microbiology, Infectious Diseases and Immunology, Université Laval

<sup>6</sup> Axe maladies infectieuses et inflammatoires, Centre de recherche du CHU de Québec – Université Laval, Québec, Qc, Canada.

<sup>7</sup> Axe Neurosciences, Centre de Recherche du CHU de Québec – Université Laval, Québec, Qc, Canada

<sup>8</sup> Axe Reproduction, Santé de la mère et de l'enfant, Centre de recherche du CHU de Québec – Université Laval, Québec, Qc, Canada.

<sup>9</sup> Centre de recherche du CHU de Montréal, Montréal, Québec, Qc, Canada,

<sup>10</sup> Division of Rheumatology, Department of Medicine, Research Institute of the McGill University Health Centre, Montreal, Qc H4A 3J1, Canada.

To whom correspondence should be addressed:

Eric Boilard, PhD and Paul R. Fortin, MD, MPH, FRCPC

## **Conflict of Interest Disclosures**

The authors have no conflict of interest to declare.

### 1.3 Introduction

The roles of mitochondria in bioenergetics and the control of cell proliferation or death are well-documented <sup>751,752</sup>. Furthermore, mitochondria share several similarities with bacteria <sup>753,754</sup>. Like bacteria, mitochondria are formed of an outer and an inner membrane (inner contains cardiolipin) <sup>358,649</sup>, express formylated peptides <sup>306,358</sup>, and contain a circular genome with hypomethylated DNA CpG motifs, referred to as mitochondrial DNA (mtDNA) <sup>755,756</sup>.

Various cellular lineages are capable of extruding their mitochondria. Activated mast cells <sup>314</sup>, T-cells <sup>315</sup>, eosinophils <sup>312</sup>, hepatocytes <sup>307</sup>, neutrophils <sup>298,307,310,311</sup> and platelets <sup>303,313</sup>, in addition to damaged organs or tissues <sup>306-309</sup>, release extracellular mitochondria. Mitochondria and their components (e.g., N-formylated peptides and mtDNA) are recognized as damage-associated molecular patterns (DAMPs), which activate the innate immune system and elicit an inflammatory response <sup>358,757-759</sup>. Moreover, ATP and reactive oxygen species (ROS), produced by mitochondria are triggers of the nuclear oligomerization domain (NOD)-like receptors and contribute to inflammasome activation <sup>757,758,760</sup>. Extracellular mitochondria have been described in various clinical conditions, including trauma <sup>761,762</sup>, burn injury <sup>343</sup>, cancer <sup>333</sup>, rheumatoid arthritis <sup>311,331</sup>, systemic lupus erythematosus (SLE) <sup>298,311</sup> and transfusion adverse reactions <sup>303,313,763,764</sup>. Their proinflammatory potential is generally thought to occur through activation of Toll-like receptors (TLR), formyl peptide receptors, and cytosolic pathogen recognition receptors, all key components of the innate immune system <sup>358,757-760</sup>.

The adaptive immune system can also recognize mitochondria. This concept is important, as the immune response initiated by mitochondrial DAMPs may be different if the adaptive immune system is also implicated <sup>765,766</sup>. Different sets of anti-mitochondrial antibodies (AMA), namely AMA-M1 to -M9, have been characterized <sup>399</sup> (recapitulated in **Table 1**). The AMA-M2, -M4, -M8, and -M9 classes are well-described in primary biliary cirrhosis (PBC) <sup>767-769</sup>, an autoimmune disease characterized by a progressive destruction of the bile ducts due to the infiltration of autoreactive T-cells <sup>770</sup>. These antibodies target distinct mitochondrial proteins notably implicated in oxidative phosphorylation, and their differential induction depends on disease severity or stage. Conversely, AMA-M6 autoantibodies



have been described in iatrogenic hepatitis induced by iproniazid<sup>421</sup>, while the AMA-M7 class of antibodies targets mitochondrial epitopes, identified as sarcosine dehydrogenase and enzymes associated with flavin adenine dinucleotide, in patients with cardiomyopathy and myocarditis<sup>416</sup>.

SLE is an autoimmune disease characterized by the presence of circulating antigen-autoantibody immune complexes and inflammation in multiple organs and tissues. In SLE, neutrophils were shown to release mtDNA through the generation of ROS, a process leading to activation of the DNA sensor stimulator of interferon genes (STING) and type-I IFN production<sup>298,311</sup>. Studies showed that anti-mtDNA antibodies (AmtDNA) are induced in a subset of SLE patients, suggesting that extruded mtDNA could be a relevant source of antigen for the anti-double stranded DNA (anti-dsDNA) antibodies that prevail in SLE<sup>311,771,772</sup>. Clinically, anti-DNA antibodies are screened initially by indirect immunofluorescence using human epithelial type 2 cells (HEp-2) and enzyme immunoassay using double-stranded DNA<sup>773</sup>. Presence of anti-DNA antibodies can also be assessed by indirect immunofluorescence using *Crithidia luciliae*, an hemoflagellate parasite of blow-flies that possesses a uniquely large mitochondrion that contains a high concentration of DNA, the kinetoplast<sup>774-776</sup>. Another method commonly used is Farr radioimmunoassay, which involves the precipitation of antibody-bound radiolabeled DNA and its detection with a scintillation counter<sup>693</sup>.

Antibodies targeting mitochondrial components other than mtDNA are also found in SLE. They include anti-cardiolipin [AMA-M1, also known as anti-cardiolipin antibodies (ACA)], anti-60kDa heat shock protein (anti-HSP60), as well as AMA-M3 and AMA-M5 antibodies. AMA-M1 antibodies recognize cardiolipin and were originally identified in syphilis-infected patients. Anti-cardiolipin antibodies are also found in patients with SLE and antiphospholipid syndrome (APS), resulting in false positive results in earlier syphilis detection assays<sup>399,777</sup>.

Interestingly, cardiolipin is a phospholipid that is found uniquely in the inner mitochondrial membrane in eukaryotic cells. However, damaged mitochondria may externalize their cardiolipin<sup>778</sup>, that may become accessible and induce the development of antibodies to cardiolipin. Clinically, the presence of ACA is associated with a greater risk of thrombotic events and thrombocytopenia<sup>779,780</sup>.

Another mitochondrial antigen, HSP60, is a mitochondrial chaperonin implicated in mitochondrial protein import <sup>781</sup>. Patients with SLE have antibodies against HSP60 <sup>650</sup>, and their presence (when concomitant with anti-phospholipid antibodies) is associated with vascular events <sup>422</sup>.

AMA-M3 were described in patients using a drug called venocuran who developed a drug-induced syndrome (“pseudolupus”) with clinical manifestations of arthralgias, fever, serositis, and lymphopenia. The immunological profile of pseudolupus is characterized by the absence of anti-nuclear antibody (ANA), but the presence of AMA-M3 <sup>782</sup>. The antigenic target of AMA-M3 is different than that of the other AMA classes described in PBC <sup>782</sup>. It is resistant to trypsin and it is extracted by solvent, pointing to its lipid nature. AMA-M3 are no longer encountered clinically since the withdrawal of the drug venocuran.

AMA-M5 comprise another class of anti-mitochondrial antibodies identified in patients with SLE, as well in APS, Sjögren syndrome, recurrent fetal loss, and hemolytic anemia <sup>413</sup>. The precise antigenic target(s) of AMA-M5 is undefined, but lack of competition by cardiolipin-containing liposomes suggests that it is distinct from the target of AMA-M1 <sup>783</sup>. Indirect immunofluorescence on human or rodent tissues is used to identify anti-M5 antibodies <sup>767</sup>. While immunofluorescence and complement fixation test revealed that only 2% of SLE patients were positive for AMA-M5, approximately 40% were positive by **enzyme-linked immunosorbent** assay (ELISA) <sup>784</sup>. However, in the latter approach, mitochondria were only partially purified and were sonicated, thus revealing antigenic epitopes that might not be recognized in tissues <sup>785</sup>.

Emerging evidence supports the liberation of mitochondria by activated cells and their potential contribution to inflammation in SLE <sup>298,311</sup>. Identification of mitochondrial antigens recognized by autoantibodies in SLE may provide information on the roles of extracellular mitochondria in autoimmunity and systemic inflammation. Herein, we developed new methods to detect the presence of two distinct types of circulating AMA: anti-whole mitochondria antibodies (AwMA) and AmtDNA. We then determined their usefulness in a murine model of SLE, as well as in a cohort of SLE patients. We evaluated these AMA in parallel with antibodies to the mitochondrial chaperonin HSP60 (a known mitochondrial target in SLE), and determined the associations

of these autoantibodies with disease characteristics. To our knowledge, this is the first study that examines the association of these AMA with disease manifestations in SLE.

## 1.4 Material and methods

### 1.4.1 Study approval:

Patient population: The human sera tested in this study were obtained from a University Health Network research ethics board (REB) approved study of SLE and APS patients in Toronto as well as from healthy controls and PBC patients recruited from *CHU de Québec – Université Laval* REB approved studies in Quebec City. SLE patients had to meet the 1982 ACR classification criteria for SLE revised in 1997<sup>667,669</sup> and APS patients met the 1999 Sapporo criteria for APS revised in 2006<sup>411,682</sup>. For SLE, consecutive female patients from the University of Toronto Lupus Clinic (UTLC) were approached and provided consent between August 2010 and October 2011 to be part of a study on the role of fatty acids and cardiovascular disease in lupus. They provided one blood specimen and had their anonymized clinical data linked to their biospecimen. Similarly, APS patients seen at the rheumatology clinic in Toronto were approached following a similar procedure. All remaining biospecimen could be used for future studies on biomarkers of lupus as per the original subjects' consent. Healthy control volunteers were recruited as part of a study on markers of inflammation if they had no known illnesses and did not have infectious symptoms at the time of the blood draw. Age and sex were collected at that time. PBC patients met the 2009 PBC classification criteria, revised in 2018<sup>770,786</sup> including the positivity for anti-mitochondrial antibodies.

### 1.4.2 Data from clinical laboratories:

For SLE patients, anti-dsDNA were measured using the Farr assay (laboratory cut-off of 30%) and the anti-cardiolipin (IgG and IgM – laboratory cut-offs of 40 GPL or MPL units) were measured by ELISA in a clinical laboratory.

### 1.4.3 Cell culture:

Hep-G2 human hepatocarcinoma cells (ATCC, Manassas, VA, USA) were cultured at 37°C – 5% CO<sub>2</sub> in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (Wisent) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Wisent), non-essential amino-acids (Wisent) and penicillin/streptomycin (Wisent).

### 1.4.4 Inducible mouse model of SLE:

Recommendations of the Canadian Council on Animal Care were followed in a protocol approved by the Animal Welfare Committee at Université Laval. C57BL/6J were obtained from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) and housed in an Elite-Plus specific-pathogen-free animal facility at CHU de Quebec. SLE autoantibodies were induced in these mice as previously described<sup>787</sup>. In brief, 6–8-week-old male mice received 100 µL i.v. injections of β<sub>2</sub>GPI (20 µg) (Crystal Chem, Downers Grove, IL, USA) followed 24 h later by a 100 µL i.v. injection of lipopolysaccharide (LPS from *E.coli*, O111:B4; 10 µg) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). These injections were repeated after 2 and 4 weeks for a total of three rounds of immunizations and mice were bled 48 h after the third immunization. C57BL/6J mice injected i.v. with PBS under the same schedule were used as controls.

#### *1.4.5 Ethics:*

Throughout the entire study, blood samples were obtained from patients under informed consent. All the methods presented in this study were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations for both human and murine donors.

#### *1.4.6 Mitochondria isolation:*

Mitochondria were isolated from the livers of C57BL/6J mice following a combination of published protocols<sup>447,449</sup>. Mice were sacrificed by cervical dislocation, the liver was swiftly removed, the gallbladder excised, and the liver was rinsed in ice-cold PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 19 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). The liver was then minced and transferred to a pre-cooled glass/Teflon tissue grinder containing 12 mL of ice-cold mitochondrial isolation buffer (10 mM Tris, 1mM EGTA, 200 mM sucrose) per gram of liver then ground until an homogeneous suspension was obtained. Intact cells and nuclei were pelleted twice at 700 g, 4°C, 10 min. Contaminating membranes, proteins and organelles were eliminated by two centrifugations at 7,000 g, 4°C, 10 min followed by a centrifugation at 10,000 g, 4°C, 10 min. The crude mitochondrial suspension was further purified by ultracentrifugation against a Percoll gradient (10 mM Tris, 1 mM EGTA, 30% v:v Percoll) at 95,000 g, 4°C, 30 min. The band containing mitochondria was collected in PBS. A similar approach was used to isolate human mitochondria with the exception that up to 10<sup>7</sup> Hep-G2 cells were lysed by repeated passages through a narrow-gauge needle.

The commercial kit QIAGEN Qproteome (QIAGEN, Hilden, Germany) was also used, following the manufacturer's instructions, to isolate mitochondria from Hep-G2 cells for quality comparison by western blotting with the aforementioned protocol. Isolated mitochondria were dosed by the bicinchoninic acid (BCA) method using BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Freshly isolated mitochondria were used in all experiments with the exception of the submitochondrial particles preparations for which pelleted mitochondria were kept at -80°C until needed.

#### *1.4.7 Submitochondrial particles (SMP) preparation:*

SMP were prepared as described elsewhere<sup>785</sup>. Briefly, frozen mitochondria were thawed at room temperature and diluted to 10 mg of mitochondrial proteins in 10 mM 4-Morpholinepropanesulfonic acid (MOPS). Samples were then sonicated using a Fisher Sonic Dismembrator Model 500 (Thermo Scientific) at 20% maximal output for 20 seconds then kept on a salt-ice water bath for 10 minutes. This cycle was repeated nine times. Samples were then centrifuged at 16,000 g, 4°C, 10 minutes in order to discard unbroken mitochondria and other unwanted debris. Supernatants were collected in a fresh tube and their volumes adjusted to 2mL in 10 mM MOPS. Samples were then ultracentrifuged at 150,000 g, 4°C for 45 minutes. Pelleted SMP were resuspended in SMP buffer (225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 10 mM HEPES, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) and dosed. SMP preparations were kept at -80°C until needed.

#### *1.4.8 Red blood cells microparticles (RBCMP) preparation:*

Red blood cells (RBC) were isolated from the blood of healthy human volunteers by centrifugation at 282 x g for 10 minutes at RT. Platelet-rich plasma and buffy coat were discarded, and the RBC fraction kept. RBC were counted (Cellometer Auto M10, Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA, USA) and adjusted to a concentration of  $5 \times 10^8$  cells/mL in Tyrode's buffer (12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 127 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4).  $10^9$  cells were then diluted in 45 mL double-distilled water and incubated for 5 minutes. The tonicity of the buffer was then balanced by addition of 5 ml of PBS 10X (filtered through a 0.22-µm membrane). Remnant RBC were removed by centrifugation at 1,300 g for 5 minutes at RT and supernatant was centrifuged at 18 000 g for 90 minutes at 18°C.

RBC microparticle pellet was then suspended in 500  $\mu$ l PBS. Protein concentration was measured with BCA assay.

#### *1.4.9 Western blotting:*

After quantification, 25  $\mu$ g of sample per lane were loaded onto a 12% polyacrylamide gel and underwent migration for 1 h 30 min at 100 V (constant voltage). Gels were then transferred overnight onto polyvinylidene difluoride membranes (PVDF, BioRad, Hercules, CA, USA) at 4°C and 60 mA (constant current). Non-specific binding sites were blocked in Tris-buffered saline (TBS)-0.1% Tween20 containing 5% non-fat dry milk for 4 h at room temperature. Proteins of interest were labeled overnight at 4°C with either mouse anti-actin (Clone AC-15, 1:5,000, Sigma-Aldrich), mouse anti-tubulin (Clone DM1A, 0.2  $\mu$ g/mL, Abcam, Cambridge, UK), mouse anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA, Clone PC10, 1  $\mu$ g/mL, Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-VDAC (Clone D73D12, 1:1,000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), mouse anti-TOMM22 (Clone IC9-2, 2  $\mu$ g/mL, Abcam) or mouse anti-cytochrome C antibody (Clone 7H8.2C12, 0.5  $\mu$ g/mL, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), polyclonal rabbit anti-proteasome 20S (0.8  $\mu$ g/mL, Abcam), polyclonal rabbit anti-GRP94 (1:2000, Abcam) diluted in superbloc (BioRad). Following a 1-h incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit antibody (1:10,000 in superbloc) (Jackson Immunoresearch, West Grove, USA), signals were visualized with Western Lightning Chemiluminescence Reagent (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) on a C-DiGit membrane scanner (LI-COR biotechnology, Lincoln, NE, USA). Total proteins isolated from starting materials (*i.e.*, mouse liver or Hep-G2 cells) were used as controls. Full-length blots are presented in **supplementary figure 6 a, b and c**.

#### *1.4.10 Mitochondrial size measurement by dynamic light scattering (DLS):*

The size of the isolated mitochondria was measured by DLS, using a Zetasizer Nano ZS device (Malvern instruments, Malvern, UK) equipped with the standard 4 mW, 633 nm He-Ne laser as a light source, set at a detection angle of 173°. Experiments were replicated three times in 1 cm length disposable UV-Cuvettes (Brand GMBH, Wertheim, Germany) containing 100  $\mu$ L of isolated murine mitochondria diluted in PBS at a concentration of 10  $\mu$ g proteins /  $\mu$ L. The following parameters were taken into account

upon measuring the size of the mitochondrial: refraction index of the solvent: 1.330, viscosity of the sample: 0.8872 mPas, refraction index of the proteins: 1.45, temperature: 25°C.

#### *1.4.11 Electron microscopy:*

Mitochondria ( $10^8$ ) were fixed in 3.5% acrolein for 15 min at room temperature. Fixed samples were rinsed twice in PBS then embedded in 4% agarose. 50  $\mu\text{m}$  sections were cut using a vibratome, post-fixed in 1% osmium tetroxide for 30 minutes and embedded in Durcupan resin. Seventy-nanometer ultrathin sections were visualized at 80 kV using a Tecnai G2 Spirit BioTWIN (FEI, Hillsboro, OR, USA) transmission electron microscope.

#### *1.4.12 Assessment of the mitochondrial oxygen consumption:*

Mitochondria were resuspended in mitochondrial assay solution (MAS: 70 mM sucrose, 220 mM mannitol, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM HEPES, 1mM EGTA and 0.2%(w:v) fatty acid-free BSA, pH 7.4 at 37°C) and supplemented with 10 mM pyruvate, 2mM malate and 4  $\mu\text{M}$  FCCP [carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone], pH 7.4. An equivalent of 10  $\mu\text{g}$  proteins was seeded on XF-96 plates (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Plates were then centrifuged 2000  $g$  for 20 min at 4°C. We visualized the distribution of mitochondria under a bright-field microscope to ensure adherence and homogeneous repartition. Plates were maintained at 37°C without  $\text{CO}_2$  for approximately 40 min. prior to loading. Oxygen consumption rates (OCR) were measured in accordance with manufacturer instructions (Agilent / Seahorse Bioscience). Experiments were replicated in three wells and averaged for each experimental condition. A total of 3 measurements of oxygen consumption for each condition were made approximately every 6 minutes under basal conditions and after sequential addition of rotenone (2  $\mu\text{M}$ ), succinate (10 mM), antimycin A (40  $\mu\text{M}$ ) and TMPD (*N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine)/Ascorbate (100  $\mu\text{M}$ /10 mM). Succinate was used as the electron donor for complex II, rotenone as a complex I inhibitor, antimycin A as a complex III inhibitor and respiration through complex IV was measured using TMPD/ascorbate.

#### *1.4.13 High sensitivity flow cytometry:*

Due to their small size, mitochondria were detected by high sensitivity flow cytometry, using a “small particle option” consisting of a forward scatter (FSC) coupled



to a photomultiplier tube (PMT) mounted on a BD FACS Canto II Special Order Research Product (SORP, BD Biosciences). Mitochondria (0.5  $\mu$ g) were stained with 1  $\mu$ g of anti-TOMM22-Atto 488 (clone IC9-2, Sigma-Aldrich) and 1  $\mu$ M of mitotracker deep red (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 30 minutes at 37°C and diluted with PBS to a final volume of 500  $\mu$ l before flow cytometry analysis. To quantitatively measure the number of mitochondria, we used 3  $\mu$ m diameter polystyrene microsphere (Polysciences, PA, USA). 80,000 microspheres were added to each sample and 500 microspheres were acquired. Silica particles (Kisker Biotech, Steinfurt, Germany) were used to determine 100 - 1000 nm size scale.

#### *1.4.14 Mitochondrial DNA extraction by alkaline lysis:*

Isolated mitochondria were pelleted at 10,000 g, 4°C, 10 min and resuspended in 0.8 mL mtDNA isolation buffer A [50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100  $\mu$ g/mL RNase A (QIAGEN), pH 7.5] for every 3 mg of mitochondrial proteins. Mitochondria were then lysed in one volume (v:v) mtDNA isolation buffer B (extemporaneously-prepared. 0.2 M NaOH, 1% SDS) for 3 min. on ice, under gentle agitation. mtDNA suspensions were neutralized with one volume (v:v) mtDNA isolation buffer C (1.32M potassium acetate, pH 4.8 adjusted with ice-cold acetic acid) for 5 min. on ice, under gentle agitation. Mitochondrial debris were pelleted by centrifugation for 10 minutes at 14,000 g, RT. Supernatants were transferred to fresh tubes. mtDNA was precipitated overnight at -20°C with 0.1 volume (v:v) potassium acetate (stock solution: 3 M sodium acetate, pH adjusted to 5.2 with ice-cold acetic acid) and 0.7 volume (v:v) absolute isopropanol. mtDNA was then pelleted at 14,000 g, washed thrice with 1.5 mL 70% ethanol and resuspended in DNA resuspension buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0). Mitochondrial DNA concentration was determined by spectrophotometry (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific).

#### *1.4.15 Nuclei isolation from mouse hepatocytes*

Nuclei were isolated from mouse livers using published methods <sup>788</sup>. Briefly, during mitochondria isolation protocols, while supernatants were used for performing mitochondria isolations, pellets from the first 700 g centrifugation were resuspended in 10 mL of ice-cold nuclei isolation buffer A (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl, 250 mM

Sucrose. pH 7.4) and ground in a pre-cooled glass/Teflon tissue grinder. The suspension was further disrupted by three passages through a 25 G <sup>5</sup>/<sub>8</sub> gauge needle followed by two passages through a 27 G <sup>1</sup>/<sub>2</sub> gauge needle. The suspension was then filtered against a 40 µM nylon cell strainer (Thermo Fisher Scientific) and centrifuged at 600 g, 4°C, 10 min. Pellets were resuspended in 14 mL buffer A and centrifuged at 600 g, 4°C, 10 min. Pellets were then resuspended in 9 volumes of ice-cold nuclei isolation buffer B (1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris– HCl, 2.0 M sucrose. pH 7.4) and centrifuged at 16,000 g, 4°C, 30 min. Pellets were resuspended in 200 µL PBS and stored at -20°C.

#### *1.4.16 Whole-cell and nuclear DNA isolation:*

DNA from either 25 mg of whole mouse liver or the 200 µL or isolated nuclei were extracted using QIAmp® DNA Mini Kit (QIAGEN), following instructions from the manufacturer. Samples were eluted in DNA resuspension buffer.

#### *1.4.17 Mitochondrial DNA and nuclear DNA enrichments by qPCR:*

Thirty nanograms of mitochondrial DNA, nuclear DNA or the same amount of total DNA extracted from whole mouse liver using the aforementioned protocols, were amplified in a Rotor-Gene Q real time qPCR cyler (QIAGEN) according to standard protocols with SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix (BioRad) in a 10 µL reaction volume. Two distinct primer couples were used: one specific to mitochondrial DNA (5'-GGAACAACCCTAGTCGAATGAA-3' / 5'-GCTAGGGCCGCGATAATAAA-3') and the other to nuclear DNA (5'-CCTGCTGCTTATCGTGGCTG-3' / 5'-GCCAGGAGAATGAGGTGGTC-3'). The experimental conditions were: 50°C - 2 min, 95°C - 10 min and 40 cycles (95°C - 15 seconds, 60°C - 1min). Fold changes were calculated with the 2<sup>-ΔCt</sup> method setting mean value for total liver DNA extracts as 1.

#### *1.4.18 Mitochondrial DNA digestion by restriction enzymes:*

Purified mouse mtDNA was digested by *Hae II* or *Pst I* restriction endonucleases (NEB, Whitby, ON, Canada) according to the manufacturer's protocol. Digested products (1.5 µg) were then resolved on a 0.5% (w:v) agarose gel. Images were acquired on a Chemidoc MP gel documentation system (Bio-Rad). Full-length gel is presented in **supplementary figure 6 d**.

#### *1.4.19 S1 nuclease treatment of mitochondrial DNA and nuclear DNA:*

30 µg of mtDNA and nDNA were diluted in 200 µL of 1X S1-buffer and treated with 50 U S1 nuclease (Thermo Fischer Scientific) for 5 minutes at 37°C. Reaction was stopped by addition of 600 mM EDTA (final concentration) and incubation at 70°C for 10 minutes. Samples were precipitated by addition of 300 mM Sodium Acetate (final concentration) and 2 volumes (v:v) absolute ethanol for 16 hours at -20°C. Samples were pelleted at 14,000 g, RT, 20 min, and washed 1 mL 70% ethanol and resuspended in DNA resuspension buffer. For competition assays, untreated nDNA and mtDNA followed the same treatment without addition of the enzyme. Samples were dosed by qPCR.

#### *1.4.20 Mitochondria oxidation in-vitro:*

Dosed mitochondria were pelleted and resuspended at a concentration of 1.5 mg of mitochondrial proteins/mL in PBS containing 500 µM of the oxidant tertbutyl hydroperoxide (TBHP) (Sigma-Aldrich). Mitochondria were oxidized for 1 h 30 min at 37°C under gentle agitation then rinsed twice with ice-cold PBS. Oxidized mitochondria were subsequently quantified by BCA.

#### *1.4.21 Mitochondrial lipid oxidation:*

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) formation was assessed, using the TBARS Parameter Kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA), following the manufacturer's instructions. Two hundred micrograms of mitochondria were lysed, the proteins were precipitated using trichloroacetic acid (TCA) and pelleted at 12,000 g, room temperature, 4 min. The supernatants were transferred to fresh tubes. Samples (75 µL) were incubated with 37.5 µL of thiobarbituric acid in a 96-well plate for 3 h at 50°C. Absorbances were read at 532 nm on a SpectraMax 190 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and TBARS quantification was performed using a standard curve provided in the kit. Oxidized samples were compared to control mitochondria that were incubated under the same conditions in PBS devoid of TBHP.

#### *1.4.22 Mitochondrial protein oxidation:*

The formation of carbonyl moieties following *in-vitro* mitochondrial oxidation was measured using the Protein Carbonyl Content Assay Kit (Sigma Aldrich) following

the manufacturer's instructions. Oxidized samples were compared to control mitochondria that were incubated under the same conditions in PBS devoid of TBHP.

#### *1.4.23 Detection of antibodies targeting mitochondrial epitopes by ELISA:*

For the detection of anti-whole mitochondrial antibodies (AwMA), murine mitochondria were diluted (500 µg/mL) in 50 mM carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6 and 25 µL per well were loaded onto 96-well half-area clear flat bottom polystyrene high-binding microplates (Corning, New York, USA). Plates were coated for 18 h at 4°C then blocked for 4 h at 37°C with PBS containing 10% FBS and 0.5% gelatin. After three washes with PBS, sera diluted 1:150 (unless otherwise specified) in PBS-10% FBS-0.3% gelatin were incubated overnight at 4°C in duplicate. After three washes with PBS, plates were incubated for 1 h at room temperature with alkaline phosphatase-(AP) conjugated goat anti-mouse or anti-human IgG (Sigma-Aldrich) diluted 1:1,000 in PBS-0.4% bovine serum albumin (BSA). Plates were washed thrice with PBS and developed with *p*-nitrophenol phosphate (*p*-NPP) for ~30 min at 37°C and optical densities (OD) were read at 405 nm on a microplate reader. The same protocol was used for the detection of autoantibodies targeting submitochondrial particles by using 25 µL per well of SMP diluted (50 µg/mL) in 50 mM carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6. A similar approach was used for human mitochondria with the following modification: plates were incubated with a horseradish peroxidase-conjugated anti-human IgG secondary antibody (1:3,000), peroxidase activity was revealed at room temperature for ~5 min with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). The reaction was stopped with 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the ODs read at 450 nm. For the anti-mtDNA ELISA, plates were pre-coated with 1% protamine sulfate in double-distilled water for 1 h at room temperature. Plates were washed three times with PBS and coated overnight at 4°C with 400 ng mtDNA in PBS. All subsequent steps were identical to those used for AwMA-ELISAs. Blank values (mitochondrial antigens and no sera) were subtracted from measured values for each patient. During the development of these assays, the proper coating of the wells was tested by using isotype-matched mouse monoclonal antibodies (mAb). A monoclonal antibody (Clone IV.3, 4 µg/mL) was used as a negative assay control in each instance while different monoclonal antibodies were used, depending on the coating antigens, as positive assay controls: an anti-TOMM22 mAb (Clone IC9-2, 4µg/mL. Abcam)

for intact mitochondria, an anti-DNA mAb (Clone 35I9 DNA, 10 µg/mL. Abcam) or an anti-Cytochrome C mAb (Clone 7H8.2C12, 5 µg/mL. BD Biosciences).

#### *1.4.24 Competition assay:*

AwMA-ELISAs were performed as described in the previous sections with the following modifications: serum samples were pre-incubated in dilution buffer (1:150) spiked with various concentrations (0.25, 1 and 3 mg/mL) of competitors (i.e., mitochondria or red blood cells microparticles) for 3 hrs. at RT and incubated in duplicate overnight at 4°C. Data are presented as the percentage of signal remaining after each competition, compared to the OD (405 nm) measured in absence of competitors.

A similar procedure was used for AmtDNA-ELISA, using increased concentrations (0, 3, 9 and 27 ng/µL) of competing DNA (extracted from nuclei or mitochondria, with or without S1 nuclease treatment).

#### *1.4.25 Statistics:*

Comparisons between groups were made using either Student's t-test, Wilcoxon test, Friedman or Kruskal-Wallis tests, one-way ANOVA, two-way or repeated measures ANOVA depending on the outcome, as well as the number and type of groups. When multiple comparisons were assessed, appropriate post-hoc correction tests were used such as Dunn's, Dunnett's, Sidak's or Bonferroni's. Associations between AwMA, AmtDNA and anti-HSP60 were computed with Spearman correlations. Distribution of these antibodies according to ACA results were compared using Wilcoxon test. Associations between AwMA or AmtDNA and clinical outcomes were studied by bivariate and multivariate linear and logistic regressions. Clinical outcomes studied are average intima media thickness, percent change of the flow mediated dilatation (FMD) of the brachial artery, presence of FMD, presence of plaque in the carotid, thrombotic event ever, white blood cells count, platelet count, increased DNA binding by Farr assay above normal range for testing laboratory, presence of damage according to SLICC Damage Index (SDI > 0), high activity according to SLEDAI-2K activity score (SLEDAI ≥4), presence of lupus nephritis, biopsy class, as well as chronicity and activity index from the biopsy. The latter were adjusted for disease duration, age, body mass index (BMI), low-density lipoproteins (LDL) cholesterol, antimalarial medication and prednisone. Logistic regressions are presented

with odd ratios and their 95% Wald confidence interval. Participants' results were considered positive for AwMA and AmtDNA when their value was above the cut-off value identified after maximizing Youden's Index. A 95% confidence interval was obtained for the cut-off using 10000 bootstrap samples. Performance measures are presented with their 95% exact confidence interval.

#### *1.4.26 Software:*

Western blot images were acquired using Image Studio Digits 5.2 (LI-COR biotechnology). mtDNA migration through agarose gel was imaged using Image Lab 6.0.1 (Bio-Rad). DLS studies were carried using the built-in Zetasizer 7.10 software (Malvern Instruments). EM images were acquired with the Image Capture Software 601.384 (Advanced Microscopy Techniques Corp., Woburn, MA, USA). Flow cytometry was performed using the BD FACSDiva™ 6.1.3 (BD Biosciences). Yields from DNA isolations were quantified using the ND-1000 3.8.1 software (Thermo Fisher Scientific) and qPCR were performed with RotorGene 6.1 (Corbett Research/QIAGEN). Optical densities were measured using SoftMax Pro 5.4.1 (Molecular Devices). Figures were assembled with ImageJ 1.47 (National Institutes of Health, Rockville, MA, USA) and Photoshop CS6 13.0 (Adobe Systems Inc., Mountain View, CA, USA). Statistical analyses were carried with Prism 7 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) and SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

## 1.5 Results

Different methodologies exist for the isolation of mitochondria, and several improvements have been introduced in recent years to enhance their purity and quality. We used a combination of previously published protocols to obtain highly purified mitochondria<sup>447,449</sup>. Mitochondria were isolated from mouse liver or a human hepatocyte cell line (Hep-G2) using a combination of previously published protocols<sup>447,449</sup> (**Figure 1 a**). The Percoll gradient included in the purification protocol eliminated contaminants from the endoplasmic reticulum and the proteasome (**Supplementary Figure 1 a**)<sup>449</sup>. The purity of the mitochondrial preparations was high, based on the extremely low content of cytosolic and nuclear proteins, and the enrichment of three mitochondrial proteins [voltage-dependent anion channel (VDAC), cytochrome C, and translocase of the outer membrane 22 (TOMM22)] (**Figure 1 b**). The isolated mitochondria maintained their cytochrome C (**Figure 1 b**) and respiratory functions, suggesting that integrity was conserved during the isolation process (**Figure 1 c**).

Mitochondria were homogeneous in size, with a main peak detected at 820 nm by dynamic light scattering (**Figure 1 d, left panel**), and retained their canonical morphology when observed in electron microscopy ( $910 \pm 210$  nm) (**Figure 1 d, right panel**). High sensitivity flow cytometry, which permits the identification of submicron particles, was used as a quantitative approach. We estimated that  $6.6 \pm 1.9 \times 10^6$  mitochondria (Mitotracker<sup>+</sup> TOMM22<sup>+</sup>) (or  $4.33 \pm 1.17$   $\mu$ g mitochondrial proteins) could be isolated per mg of mouse liver ( $n = 6$ ), which was sufficient to prepare approximately 400 wells in half-area 96-well microplates using one mouse liver (**Figure 1 e**). The yield obtained with Hep-G2 cells was lower, as  $3.5 \pm 0.18$   $\mu$ g of mitochondrial protein were isolated per  $10^6$  Hep-G2 cells ( $7.0 \times \pm 2.1 \times 10^8$  Hep-G2 cells were harvested for each 175 cm<sup>2</sup> flask at confluence), which can be used to prepare approximately two half-area 96-well microplates.

The quantity of purified mitochondrial protein (12.5  $\mu$ g mitochondrial protein/well) required for coating half-area 96-well microplates ELISA plates was optimized using increasing concentrations of mitochondria (**Supplementary Figure 1 b**). Wells were saturated with phosphate buffered saline (PBS) containing fetal calf serum (FCS) and gelatin,

which proved optimal for blocking nonspecific binding of antibodies in comparison to non-fat dry milk or bovine serum albumin (data not shown). We used an inducible murine model of SLE to determine whether AwMA could be detected in serum<sup>787</sup>. This model is known to produce autoantibodies to nuclear and cellular antigens<sup>787</sup>, but the presence of AwMA has never been explored. We found high serum levels of AwMA in this induced murine lupus model, compared to healthy control mice (**Figure 2 a**).

Reactive oxygen species are generated under inflammatory conditions, and were reported during the release of mitochondria<sup>298,311</sup>. Thus, we assessed whether oxidation of mitochondria could impact mitochondrial recognition by AwMA. Isolated mitochondria were treated with increasing concentrations of the oxidant tert-butyl hydroperoxide (TBHP), and the oxidized protein and lipid contents were confirmed using commercial assays (**Figure 2 b, c and Supplementary Figure 2**). We found that oxidation had no or very little impact on recognition of mitochondria by SLE antibodies (**Figure 2 d**) (Fold increase:  $1.2 \pm 0.2$ ). The data suggest that mitochondria are immunogenic in SLE regardless of the oxidation status of their antigens.

We next used our quantitative AwMA ELISA to screen human sera. We included 175 SLE patients and 43 healthy controls (76% female, mean age  $42 \pm 12$ ) (**Table 2**). We also evaluated sera from APS patients ( $n = 12$ ), given the high levels of anti-cardiolipin antibodies (AMA-M1) in APS, as well as sera from PBC patients ( $n = 12$ ) confirmed positive for AMA by indirect immunofluorescence on mouse stomach/kidney slides (MSK).

Given the higher yield and purity of the mitochondria isolated from mouse liver, and the fact that mice are readily accessible in most research laboratories, we used intact murine mitochondria as coating antigens in our assay for the detection of autoantibodies targeting the outer mitochondrial membrane in humans. We found that AwMA were present in all healthy controls, but at much lower levels than those encountered in a large proportion of the SLE patients. SLE patients were more frequently positive and at higher levels for AwMA than healthy controls. APS and PBC patients also presented a significant increase in AwMA compared to healthy donors but signals detected for these patients were lower than those measured in SLE patients (**Figure 3 a**). As the ELISA is performed on intact



mitochondria, these results suggest that AwMA are induced in SLE, and recognize autoantigens on the outer mitochondrial membrane that are distinct from the epitopes in APS (cardiolipin) and PBC (pyruvate dehydrogenase complex E2-component, PDC-E2), both located in the mitochondrial inner membrane. Consistent with this, we identified PBC patients positive for AMA when submitochondrial particles (*i.e.*, sonicated mitochondria) were used as coating antigens, suggesting that certain antigens relevant to PBC may be exposed in these conditions (**Supplementary Figure 3**). Human and murine mitochondria were also compared in our assay using sera from a subset of SLE patients. Both sources of mitochondria (human Hep-G2 cells and mouse liver) were similarly recognized by human AwMA (**Figure 3 b**), suggesting that antigenic epitopes may be conserved across these species. Hence, mitochondria from murine, bovine and porcine tissues are routinely used to assess AwMA in humans, suggesting that interspecies differences play a negligible role, if any, in mitochondrial antigenicity.

Membrane-bound vesicles in the extracellular milieu, known as extracellular vesicles or microparticles, are proposed contributors to the antigenic load in SLE <sup>789-791</sup>. To determine whether AwMA could also recognize microparticles derived from membranes from cells or particles other than mitochondria, we utilized red blood cell microparticles (RBCMP) as blood-borne microparticles devoid of mitochondria as a competitor in our AwMA-ELISA, and compared it to extracellular mitochondria in solution. Whereas increased concentrations of competing mitochondria decreased AwMA binding by up to  $49.84 \pm 15.01\%$ , RBCMP showed no inhibition of binding of the SLE antibodies in our assay (**Figure 3 c**). While these results suggest that the antibodies detected in the AwMA-ELISA might have a preferred substrate originating in mitochondrial membrane, we cannot exclude the possibility that other membrane bound microparticles or even cells may also be recognized by AwMA, given the probable occurrence of numerous protein and non-protein antigens in mitochondria.

To determine whether mtDNA also represents an antigenic target of SLE autoantibodies, we isolated mtDNA from crude mitochondria preparations, using standard DNA extraction by alkaline lysis. Digestion of the mtDNA by *Hae II*, a restriction enzyme with a single restriction site on the murine mitochondrial genome (**Supplementary Figure 4 a**)

yielded a single fragment of 16,569 base pairs, indicating the isolation of mtDNA with its circular conformation. As expected, digestion by *Pst I* generated two fragments of 12,751 and 3818 base pairs, further confirming the expected size of the isolated mtDNA. Moreover, we confirmed enrichment of mtDNA relative to genomic DNA (**Supplementary Figure 4 b**). Up to  $1.55 \pm 0.35$   $\mu\text{g}$  mtDNA was obtained for each mg of mitochondrial protein used. Plate adhesion of different concentrations of mtDNA was enhanced by using plates pre-treated with protamine sulfate, and binding specificity was increased by blocking the plates with a PBS solution containing FCS and gelatin (**Supplementary Figure 4 c**). Of interest, sera from mice with induced SLE were positive for AmtDNA, compared to control mice (**Figure 4 a**). Moreover, AmtDNA was significantly increased in SLE patients, but not in patients with APS or PBC, relative to healthy controls (**Figure 4 b**).

Little is known about the association of AwMA and AmtDNA with the clinical characteristics of SLE. We assessed whether AwMA and AmtDNA were associated with disease manifestations in 175 SLE patients for whom detailed clinical information was available. AwMA levels correlated with AmtDNA levels in SLE patients ( $r_s = 0.23$ ,  $p = 0.003$ ), but not in healthy controls ( $r_s = 0.15$ ,  $p = 0.33$ ). In contrast, AwMA did not correlate with antibodies against other mitochondrial antigens (*i.e.*, HSP60 and cardiolipin) and was not found to be associated with clinical outcomes (**Tables 3 and 4**). Interestingly, AmtDNA was associated with both increased anti-dsDNA antibodies ( $p = 0.02$ ) and with a history of lupus nephritis ( $p = 0.007$ ), but not with any of the other clinical outcomes (**Table 4**). When the duration of the disease, the age of the patients, their BMI, the use of prednisone and/or antimalarial drugs, and circulating cholesterol LDL were taken into account, the associations of AmtDNA with increased anti-dsDNA antibodies and lupus nephritis remained significant in a multivariate logistic regression ( $p = 0.01$  for both), indicating an association between AmtDNA, and these two clinical parameters. However, AmtDNA did not correlate with anti-dsDNA as measured by Farr assay in the cohort, suggesting that the results measured by our AmtDNA-ELISA and those obtained by Farr assay may not be redundant. Cut-off values were identified for AwMA and AmtDNA (**Figures 3, 4 and Table 5**). Our two ELISAs displayed high specificities (AwMA: 0.88; AmtDNA: 0.74) and allowed us to efficiently discriminate SLE patients

from healthy donors ( $p < 0.001$  for both AmtDNA and AwMA). Using these values, we determined that 110 patients were positive for AmtDNA (62.86 %) and 101 patients (57.71 %) were positive for AwMA.

Thus, although more work is needed to explore the clinical associations of AmtDNA and AwMA in a larger lupus population and over time, different subsets of mitochondrial epitopes (*i.e.*, mtDNA vs. outer membrane antigens) appear to measure different immune responses in SLE patients and may be associated with distinct disease characteristics.

## 1.6 Discussion

Mitochondrial DAMPs are known to stimulate the innate immune response, but it is less clear whether mitochondrial antigens stimulate an antibody response and whether these antibodies impact the inflammatory reaction. Interestingly, in PBC, a paradigm of true organ-specific autoimmunity, evidence points to involvement of both innate and adaptive immunity with a specific antibody response to mitochondrial antigens <sup>792</sup>.

Although the prevalence of AMA in SLE was reported several decades ago <sup>784</sup>, this observation was not pursued. Our study confirms the presence of AwMA (directed against the mitochondrial surface and not redundant with that of PBC) and AmtDNA (directed against mtDNA) in patients with SLE. However, it remains to be established whether AwMA are pathogenic initiators of the auto-immune process or whether they are consequences of an a priori cell activation or injury with subsequent release of mitochondria in the extracellular milieu. These “free mitochondria” could subsequently become antigenic in predisposed individuals and be a marker of cell or tissue injury. They could also be a cause of further immune activation through the formation of circulating or *in situ* immune complexes, constituting a secondary trigger of inflammation. The recognition of mitochondria by antibodies could also implicate Fc receptors and thus modulate a distinct immune response. For example, the intravenous injection of mtDNA into mice failed to induce proteinuria and kidney damage <sup>344</sup>, but the response may differ in a recipient with circulating antibodies to mitochondria.

Epitope modification, such as oxidation, can impact its antigenicity <sup>540</sup>. Notably, there are reports suggesting that the oxidation of mtDNA occurs during its extrusion from cells, and that the oxidized form is pathogenic <sup>298,311</sup>. Our findings using *in vitro* oxidation of the mitochondria suggest that mitochondrial epitopes, regardless of oxidation status, are targeted by autoantibodies in SLE. However, this does not exclude the possibility that oxidized mitochondria may be more antigenic in other pathogenesis, such as APS, or more efficient at promoting responses if recognized by the innate immune system. Moreover, it is not excluded that following oxidation, mitochondrial swelling and potential formation of pores within the mitochondrial membrane might have revealed new antigens detected in our anti-whole mitochondria ELISA using TBHP-treated mitochondria, but this treatment

may also have caused a release of existing antigens that could have been lost in this modified assay, thus explaining the apparent absence of impact of oxidation of the antigenicity of the mitochondria <sup>793</sup>. Future investigations will be needed to determine the relative targeting of native versus oxidized forms of organelle components by immune cells. We could not verify the role of oxidation on the recognition of mtDNA by autoantibodies due to spontaneous oxidation of isolated mtDNA, an observation also made by other groups despite extreme preventive measures taken to maintain the molecules under their reduced form <sup>794</sup>. Thus, it is likely that AmtDNA and anti-dsDNA antibodies routinely measured in clinical testing both evaluate antibodies to oxidized DNA.

We observed that AwMA levels were more elevated in SLE than in PBC. PBC patients, however, were positive for AMA when sonicated mitochondria were utilized in our ELISA. These observations are consistent with the fact that pyruvate dehydrogenase complex E2 (PDC-E2), the immunodominant epitope in PBC, is located in the mitochondrial inner membrane. Our AwMA-ELISA measures antibodies to epitopes on intact mitochondria, in which inner membrane epitopes remain unavailable <sup>406</sup>. This contrasts with the sonicated mitochondria used in previous studies on AMA in SLE <sup>784</sup>, which contained inverted membranous structures and thus revealed antigens located in the mitochondrial inner membrane <sup>785</sup>. Furthermore, we found that AwMA levels correlated with the levels of AmtDNA, but not with other antibodies directed at antigens located within the inner membrane of the organelle (e.g., cardiolipin or HSP60), pointing to the existence of mitochondrial antigens that remain to be identified <sup>795</sup>. Our study provides simple and quantitative assays for assessment of two types of AMA (i.e., AwMA and AmtDNA) likely specific to SLE. Further research is required to identify the mitochondrial antigen(s) and epitope(s) of our AMA assay in SLE.

Our analyses of AmtDNA antibodies in human sera showed an association with anti-dsDNA as well as with lupus nephritis, consistent with the documented associations between anti-dsDNA antibodies detected by Farr assay and lupus nephritis <sup>796</sup>. While dsDNA used in Farr assays is usually isolated from plasmids (*i.e.*, *E. coli*) and thus may share similarities with mtDNA (*e.g.*, hypomethylated CpG motives, circular tertiary structure) <sup>797</sup>, the Farr assay has been described for its specificity in the detection of high avidity antibodies

of all classes (IgG and IgM, for instance). Our data suggest that the Farr assay probably detects AmtDNA. Consistent with this, nuclear DNA (nDNA) efficiently competed in our AmtDNA ELISA assay (**Supplementary Figure 5 a**), further pointing to a certain degree of redundancy between anti-dsDNA and AmtDNA. When nuclear and mtDNA were treated with S1 nuclease, which digests potential single-stranded regions, both could compete in our AmtDNA ELISA assay (**Supplementary Figure 5 b**), which suggests that most of the antigenicity of mtDNA is provided by its double-stranded conformation. There might exist subsets of antibodies that preferentially recognize mtDNA versus genomic DNA, but there is no evidence of their occurrence at this stage. As extracellular mtDNA is reportedly associated with various pathologies, including trauma<sup>761,762</sup>, burn injury<sup>343</sup>, cancer<sup>333</sup> and rheumatoid arthritis<sup>313,331</sup>, it is tempting to postulate that extruded mtDNA, beyond its role as a proinflammatory signal for the innate immune system, represents a significant antigenic load available for the formation of immune complexes.

In this study, we focused our attention on immunoglobulin (Ig) G (IgG), but the assays can be modified easily to quantify specific IgG subclasses (e.g., IgG1, IgG2a, IgG2b) or other isotypes (e.g., IgA and IgM), which may reveal distinct functions of these antibodies in disease. Both AwMA and AmtDNA were detected at low levels in healthy individuals, suggesting that these antibodies are further induced during SLE pathogenesis. These antibodies might be part of a pool of naturally occurring autoantibodies that are thought to contribute to the continual clearance of membrane vesicles in the circulation<sup>443,798</sup>. Protective natural autoantibodies have been described predominantly as IgM, but other isotypes such as IgG or IgA have also been reported<sup>799-801</sup>. It is thus tempting to postulate that antibodies targeting mitochondrial epitopes are present in healthy individuals and might be involved in clearance of extracellular mitochondria. A profound change in the balance of natural IgM and pathogenic IgG against mitochondrial epitopes may in part explain the pathogenesis in SLE.

While these observations require confirmation in an independent cohort of patients, they suggest that, in SLE, the adaptive immune system recognizes mitochondrial organelles. Furthermore, our findings suggest that clinical associations may differ according to antibody recognition of inner (e.g., ACA) versus outer mitochondrial (e.g., AwMA)

membrane components. This leads to the postulation that pathogenicity of these antibodies may depend on whether extracellular mitochondria are intact or not. Evaluation of antibodies to mitochondrial components in SLE may provide novel information on patients, such as their risk for developing nephritis. If these findings are confirmed in a large prospective cohort of SLE patients, AwMA and AmtDNA may prove useful in predicting disease activity and disease severity, and in stratifying SLE patients. The quantification of mitochondrial antibodies may thus open the way to novel directions in autoimmune disease research and may be useful for achieving a better understanding of disease mechanisms.

## **1.7 Additional information**

**Data availability:** The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

**Acknowledgments:** This work was supported in part by an operating grant from The Arthritis Society (# 225638) (to PRF) and by a Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Foundation grant (EB). The authors have no competing interests. EB is recipient of a new investigator award from the CIHR and is a Canadian National Transplant Research Program (CNTRP) researcher. PRF is recipient of a tier 1 Canada Research Chair on Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases. GM is a recipient of awards from the Canadian Blood Services. IM is recipient of a fellowship from the Arthritis Society. CB is recipient of an award from the Fonds de Recherche en Santé du Quebec. JR is the recipient of funding from the Division of Rheumatology and the Department of Medicine (McGill University), and a CIHR Project Grant (PJT-159652). The authors acknowledge Rebecca Subang for technical assistance in preparing human healthy control samples. MET is grateful to the help of Julie-Christine Lévesque and Nathalie Vernoux with TEM experiments. The views expressed herein do not necessarily represent the view of the federal government.

## **1.8 Author contribution**

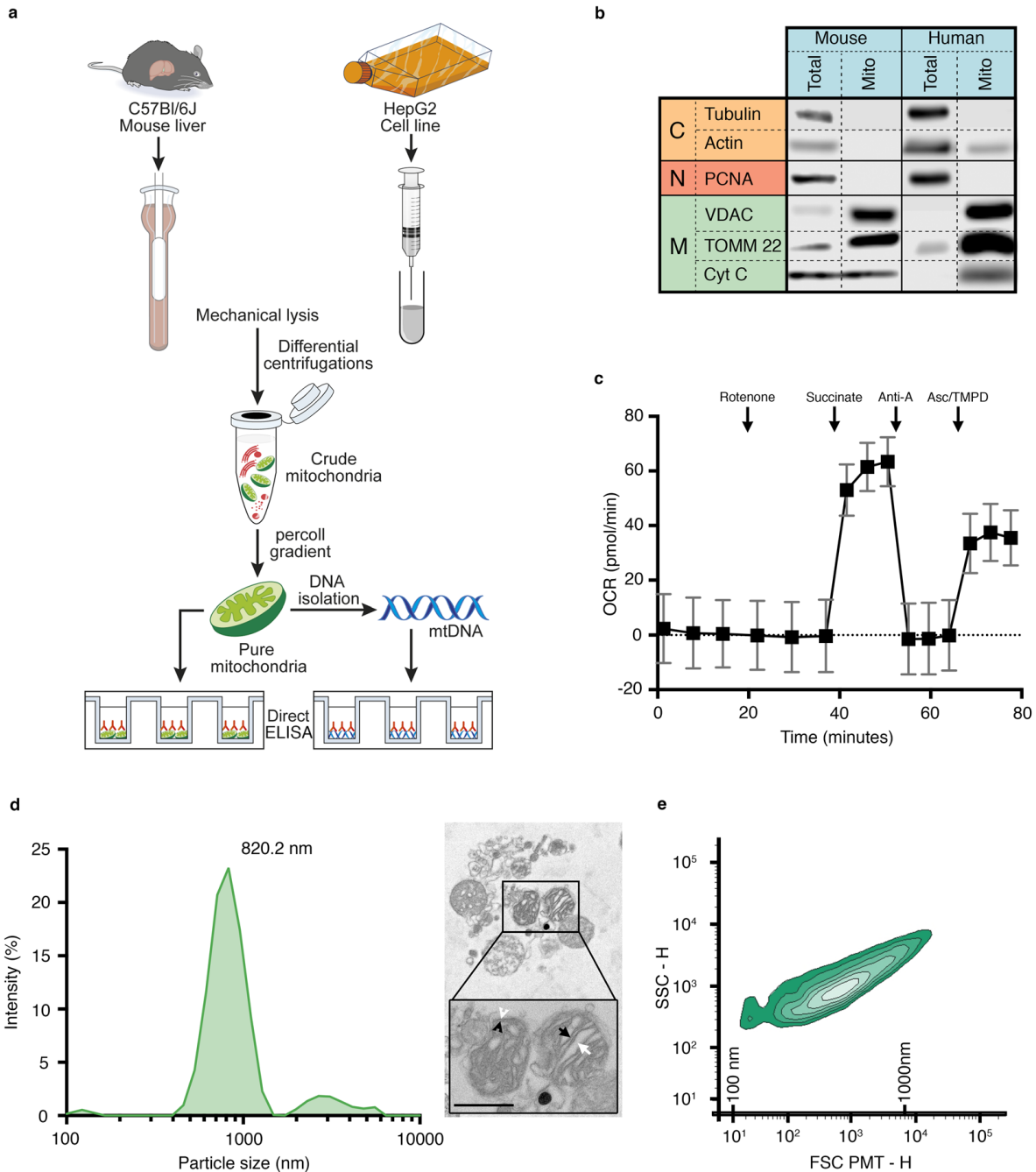
Experiments were conceived and designed by YB, IA, NC, ERL, MD, JR, CB, PF, and EB. Contributed critical reagent, resources and expertise; EW, MP, LE, MJH, MD, HEH, MET. Experiments were performed by YB, IA, GM, HBF, TL, and IM. Data were processed and analyzed by YB, IA, RCL, ASJ, and supervised by RCL, ASJ, PF and EB. The manuscript was written by YB, PF and EB, and critically reviewed by all authors.

## **1.9 Competing interests**

The authors declare no competing interests



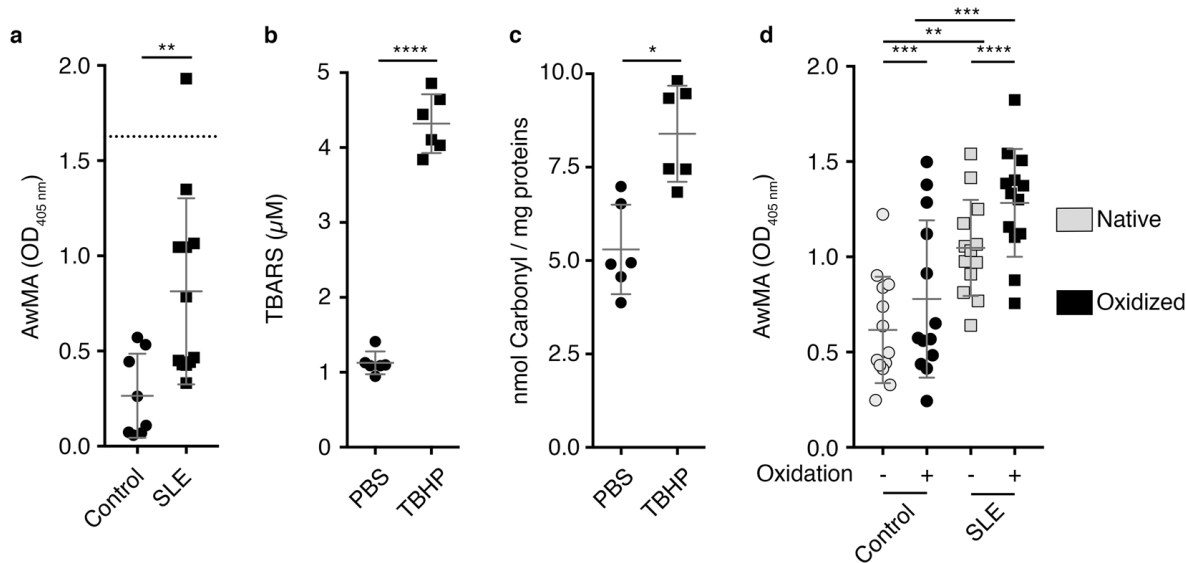
## 1.10 Figures



**1.10.Figure 1. Assessment of the mitochondrial preparations**

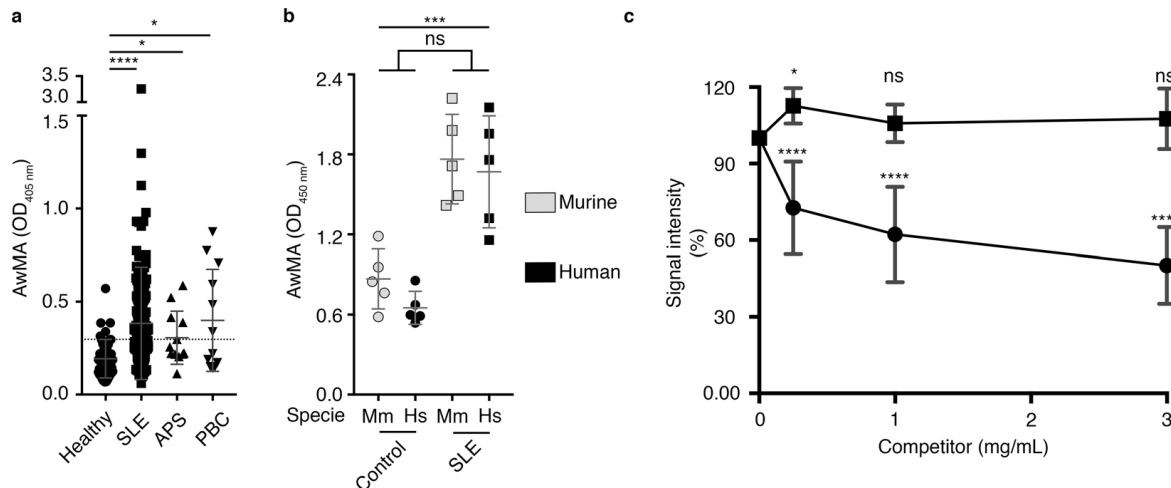
(a) Mitochondria were isolated from either mouse liver or human Hep-G2 cell line by differential centrifugations and further purified by ultracentrifugation against Percoll gradient. Alkaline lysis was used to retrieve mtDNA. Pure mitochondria or mtDNA were used as coating antigens in direct ELISAs. (b) Cytoplasmic (C), nuclear (N)

and mitochondrial (M) markers were assessed by western blotting in murine (left) and human (right) mitochondrial preparations (25  $\mu$ g protein per lane). Results are representative of three distinct preparations. Blots separated by dashed lines are non-contiguous but from same membrane. Blots separated by full lines were performed on distinct membranes; (c) Functionality of murine mitochondria was determined by measurement of the oxygen consumption rate (OCR) of 10  $\mu$ g mitochondria treated successively with 2  $\mu$ M rotenone, 10 mM succinate, 40  $\mu$ M antimycin A and 100  $\mu$ M N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) along with 10 mM ascorbate (Asc). (d) The hydrodynamic size of the murine mitochondria was determined using zetasizer nano ZS (n=3, left panel) and their morphology was visualized by electron microscopy (right panel). Inner membrane (black arrowhead), outer membrane (white arrowhead), cristae (black arrow), mitochondrial matrix (white arrow) are presented (scale bar account for 500 nm); (e) Size representation of purified murine mitochondria using high sensitivity-flow cytometry. Double-positive mitochondria (Mitotracker<sup>+</sup> TOMM22<sup>+</sup>) were used for quantification. Silica beads were used to determine 100 – 1000 nm size scale. Data are mean  $\pm$  SD. Anti-A: antimycin A; CytC: cytochrome C; FSC: forward scatter; PCNA: proliferating cell nuclear antigen; SSC: side scatter; Total: total starting material; TOMM22: translocase of the outer mitochondrial membrane; VDAC: voltage-dependent anion channel.



### 1.10. Figure 2. Antibodies targeting mitochondrial antigens are produced in a murine model of SLE

(a) Elevated levels of anti-whole mitochondria antibodies (AwMA) were detected by direct ELISA in sera (1:150) from an inducible murine model of systemic lupus erythematosus (SLE) compared to control mice. An isotype-matched monoclonal mouse anti-translocase of the outer mitochondrial membrane 22 (TOMM22) antibody (clone IC9-2, 4 µg/mL) was included as a positive assay control (dotted line). (Control: N=8, SLE: N=12, Student's t-test); (b) Lipid peroxidation following *in-vitro* oxidation of the mitochondria by 500 µM tert-butyl hydroperoxide (TBHP) was quantified by thiobarbituric reactive substances (TBARS) assay (N=3, Wilcoxon test); (c) Protein oxidation was determined by carbonyl assay (n=6, Wilcoxon test); (d) The effect of oxidation of mitochondrial epitopes on their recognition by serum AwMA (1:20) was assessed by direct ELISA, using either native (grey symbols) or oxidized mitochondria (black symbols) as coating antigens (N=13, two-way ANOVA with multiple comparisons; Sidak's correction). All experiment presented in the figure were performed using mouse mitochondria. Data are mean ± SD. \* p<0.05. \*\* p<0.01. \*\*\* p<0.001. \*\*\*\* p<0.0001.

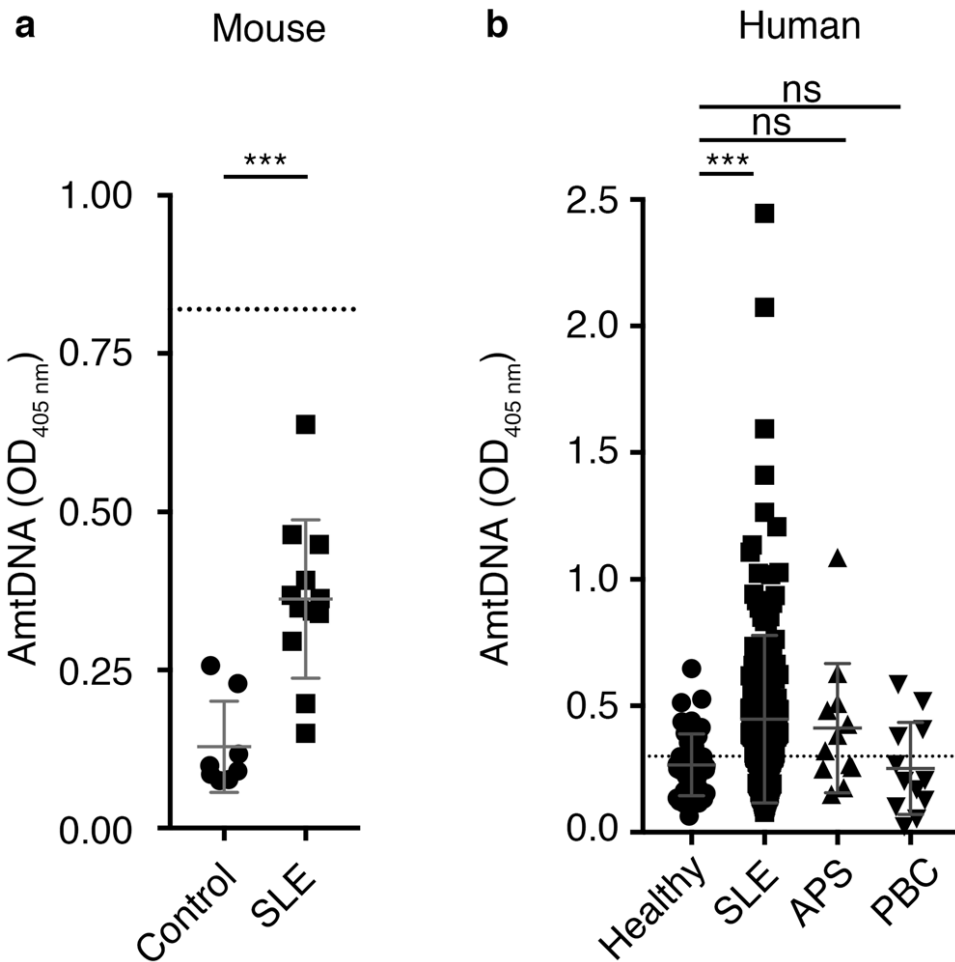


### 1.10. Figure 3. Detection of anti-mitochondrial antibodies in SLE patients and specificity of the assay

(a) Increased amounts of anti-whole mitochondria antibodies (AwMA) were detected by direct ELISA in sera (1:150) from systemic lupus erythematosus (SLE), anti-phospholipid syndrome (APS) and primary biliary cirrhosis (PBC) patients. Healthy: N=43. SLE: N=175. APS: N=12, PBC: N=12. The dotted line corresponds to the cutoff value as determined by Youden's Index (see **Table 5**). Kruskal-Wallis test with multiple comparisons to healthy donors; Dunn's correction.

(b) No significant differences were detected by direct ELISA when either murine (Mm, gray symbols) or human mitochondria (Hs, black symbols) were used as coating antigens to detect AwMAs in control and SLE patient sera (1:100). Two-way ANOVA.

(c) AwMA binding to coating mitochondria is inhibited in presence of mitochondria (filled circles) but not by red blood cells microparticles (filled squares). Two-way repeated measures ANOVA with multiple comparison (Dunnnett's correction) to signals detected without competitors (i.e., 100%). Experiments presented in panels 3 a and 3 c were performed using mouse mitochondria, the experiment presented in panel 3 b was performed in parallel on murine and human mitochondria. Data are mean  $\pm$  SD. Not significant (ns):  $p > 0.05$ . \*  $p < 0.05$ . \*\*\*  $p < 0.001$ . \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . Hs: *Homo sapiens*; Mm: *Mus musculus*.



#### 1.10. Figure 4. Antibodies targeting mitochondrial DNA in SLE

(a) Anti-mitochondrial DNA antibodies (AmtDNA) are measured by direct ELISA in sera (1:50) from a mouse model of systemic lupus erythematosus (SLE) and control mice (Control: N=8, SLE: N=12, Student's t-test). An isotype-matched monoclonal mouse anti-DNA antibody (clone 3519 DNA, 10  $\mu$ g/mL) was included as a positive assay control (dotted line). (b) Elevated levels of AmtDNA are observed in sera (1:150) from SLE but not from anti-phospholipid syndrome (APS) or primary biliary cirrhosis (PBC) patients. Healthy: N=43. SLE: N=175. APS: N=12. PBC: N=12. The dotted line corresponds to the cutoff value as determined by Youden's index (see **Table 5**). Kruskal-Wallis test with multiple comparisons to controls/healthy donors; Dunn's correction). All experiment presented in the figure were performed using mouse mtDNA. Data are mean  $\pm$  SD. Not significant (ns):  $p > 0.05$ . \*\*\*  $p < 0.001$ . PBC: primary biliary cirrhosis.

## 1.11 Tables:

**1.11.Table 1. Various types of anti-mitochondrial antibodies (AMA) implicated in human diseases**

| Type of anti-mitochondrial antibodies: | Molecular target(s):            | Localization: | Associated disease(s):          | Method(s) of detection:       | References: |
|--|---------------------------------|---------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------|
| <b>Anti-M1</b>                         | Cardiolipin                     | IMM           | APS, SLE, secondary syphilis    | IIF, ELISA <sup>1</sup> , CFT | [778]       |
| <b>Anti-M2</b>                         | 2-oxoacid dehydrogenase complex | IMM           | PBC                             | IIF, ELISA <sup>1</sup> , CFT | [741]       |
| <b>Anti-M3</b>                         | <i>Unknown</i>                  | OMM           | Venocuran-induced PLE           | IIF, CFT                      | [758]       |
| <b>Anti-M4</b>                         | Sulfite oxidase                 | OMM           | PBC                             | ELISA <sup>2</sup> , CFT      | [779]       |
| <b>Anti-M5</b>                         | <i>Unknown</i>                  | OMM, IMM      | APS, SLE, SS, haemolytic anemia | IIF, CFT                      | [413]       |
| <b>Anti-M6</b>                         | Monoamine oxydase B             | OMM           | Iproniazid-induced hepatitis    | IIF, ELISA <sup>2</sup> , CFT | [421,780]   |
| <b>Anti-M7</b>                         | Sarcosine dehydrogenase         | IMM           | Cardiomyopathies                | ELISA <sup>1,2,3</sup>        | [417]       |
| <b>Anti-M8</b>                         | <i>Unknown</i>                  | OMM           | PBC                             | CFT                           | [407]       |
| <b>Anti-M9</b>                         | Glycogen phosphorylase          | OMM           | PBC                             | ELISA                         | [781, 782]  |

<sup>1</sup> ELISA performed on sub-mitochondrial particles (sonicated “crude” mitochondria)

<sup>2</sup> ELISA performed on purified antigen

<sup>3</sup> The exact antigen recognized by M7 antibodies is yet to fully characterize.

APS, anti-phospholipid syndrome; CFT, complement fixation test; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IIF, indirect immunofluorescence on rodent and/or human tissues; IMM, inner mitochondrial membrane; OMM, outer mitochondrial membrane; PBC, primary biliary cirrhosis;

PLE, pseudolupus erythematosus; SLE, systemic lupus erythematosus;  
SS: Sjögren syndrome

**References:** AMA-M1: <sup>802</sup>, M2: <sup>767</sup>, M3: <sup>782</sup>, M4: <sup>803</sup>, M5: <sup>413</sup>, M6: <sup>421,804</sup>, M7: <sup>417</sup>, M8: <sup>407</sup>,  
M9: <sup>805,806</sup>.

**1.11. Table 2. Demographics and clinical characteristics (ACR criteria) for SLE patients included in the study (n=175, unless stated otherwise)**

| Characteristics  |  | SLE patients      |
|--|--|-------------------|
| Age  | Range, years                               | 20-78             |
|  | Mean $\pm$ S.D, years                      | 47 $\pm$ 15       |
| Disease duration   | Range, years                               | 0-57              |
|  | Mean $\pm$ S.D, years                      | 18 $\pm$ 12       |
| Gender - Female  | n (%)                                      | 175 (100)         |
| Thrombotic events  | n (%)                                      | 35 (20)           |
| Increased anti-dsDNA   | n (%)                                      | 59 (34)           |
| Lupus nephritis  | n (%) (n = 172)                            | 67 (39)           |
| Currently Prescribed Medication                                | n (%)                                      |                   |
|  | Anticoagulation or anti-platelet (n = 172) | 40 (23)           |
|  | Antimalarial                               | 127 (73)          |
|  | Prednisone                                 | 81 (46)           |
|  | Lipid lowering                             | 26 (15)           |
|  | Diabetes medication                        | 6 (3)             |
| American College of Rheumatology (ACR) Classification criteria |  |                   |
|  | Malar rash                                 | 127 (72.6)        |
|  | Discoid rash                               | 24 (13.7)         |
|  | Photosensitivity                           | 113 (64.6)        |
|  | Oral ulcers                                | 108 (61.7)        |
|  | Arthritis ( $\geq$ 2 peripheral joints)    | 151 (86.3)        |
|  | Serositis                                  | 67 (38.3)         |
|  | Neurologic disorder (seizure or psychosis) | 24 (12.0)         |
|  | Renal disorder <sup>A</sup>                | 100 (57.1)        |
|  | eGFR (n=160)                               |                   |
|  | Range, mL/min/1.73m <sup>2</sup>           | 17-121            |
|  | Mean $\pm$ S.D, mL/min/1.73m <sup>2</sup>  | 84.38 $\pm$ 24.70 |
|  | < 60 mL/min/1.73m <sup>2</sup> , n (%)     | 26 (16.3)         |
|  | Hematologic disorder <sup>B</sup>          | 155 (88.6)        |
|  | Immunologic disorder <sup>C</sup>          | 159 (90.9)        |
|  | Anti-nuclear antibodies (ANA)              | 170 (97.1)        |
| American College of Rheumatology (ACR) criteria score          | Range                                      | 3-11              |
|  | Mean $\pm$ S.D                             | 6.83 $\pm$ 1.62   |
| SLEDAI-2K $\geq$ 4   | n (%)                                      | 57 (33)           |
| SDI $\geq$ 1   | n (%)                                      | 124 (71)          |

<sup>A</sup>: > 0.5 g per day of protein in urine or cellular cast or end-stage renal disease.

<sup>B</sup>: Hemolytic anemia (low red blood cell count) or leukopenia (White blood cells < 4000/ $\mu$ l), lymphopenia (< 100 000/ $\mu$ l) in the absence of offending drug.

<sup>C</sup>: Positive anti-Smith, anti-dsDNA, antiphospholipid antibody and/or false positive serological test for syphilis.

eGFR: estimated glomerular filtration test.



**1.11. Table 3. Intercorrelations of anti-mtDNA, anti-whole mitochondria, anti-dsDNA and anti-cardiolipin antibodies in SLE patients (n=175)**

|            | AmtDNA <sup>A</sup> | AwMA <sup>A</sup>    | DNA (Farr) <sup>A</sup> | ACA (+/-) <sup>B</sup>                       |
|------------|---------------------|----------------------|-------------------------|--|
| Anti-HSP60 | 0.07<br>p=0.37      | 0.10<br>p=0.21       | 0.02<br>p = 0.81        | (+) 0.28 ± 0.52<br>(-) 0.52 ± 0.53<br>p=0.08 |
| AmtDNA     | -                   | <b>0.23, p=0.003</b> | 0.05<br>p = 0.46        | (+) 0.33 ± 0.17<br>(-) 0.37 ± 0.27<br>p=0.40 |
| AwMA       | -                   | -                    | 0.10<br>p = 0.19        | (+) 0.32 ± 0.20<br>(-) 0.33 ± 0.23<br>p=0.51 |

<sup>A</sup>: Values are presented as Spearman correlation coefficient and p-value.

<sup>B</sup>: Values presented as median ± IQR and Wilcoxon test p-value for patient positives (+) or negatives (-) for ACA.

ACA: anti-cardiolipin antibodies; AwMA: anti-whole mitochondria antibodies. AmtDNA: anti-mitochondrial DNA antibodies; DNA Farr: quantification of anti-dsDNA antibodies by Farr assay; HSP60: heat-shock protein 60 kDa.

**1.11. Table 4. AmtDNA and AwMA associations with clinical manifestations in SLE patients (n=175)**

| Clinical Outcomes                 | AmtDNA                       |               | AwMA                 |        |
|-----------------------------------|------------------------------|---------------|----------------------|--------|
|                                   | OR (CI)                      | p             | OR (CI)              | p      |
| Thrombotic events                 | 0.43 (0.10 – 1.79)           | 0.25          | 0.27 (0.04 – 1.99)   | 0.20   |
|                                   | [0.35 (0.07 – 1.67)]*        | [0.19]        | [0.21 (0.02 – 1.82)] | [0.15] |
| SLEDAI-2K $\geq$ 4                | 0.96 (0.37 – 2.51)           | 0.93          | 1.34 (0.49 – 3.69)   | 0.57   |
|                                   | [1.01 (0.33 – 3.05)]         | [0.99]        | [1.08 (0.37 – 3.14)] | [0.89] |
| SDI $\geq$ 1                      | 0.91 (0.35 – 2.42)           | 0.86          | 0.85 (0.30 – 2.40)   | 0.76   |
|                                   | [0.93 (0.32 – 2.68)]         | [0.90]        | [0.69 (0.23 – 2.09)] | [0.52] |
| Increased anti-dsDNA <sup>A</sup> | <b>3.34 (1.22 – 9.16)</b>    | <b>0.02</b>   | 1.15 (0.42 – 3.16)   | 0.79   |
|                                   | <b>[3.94 (1.33 – 11.69)]</b> | <b>[0.01]</b> | [1.16 (0.40 – 3.35)] | [0.79] |
| Lupus nephritis                   | <b>4.45 (1.50 – 13.20)</b>   | <b>0.007</b>  | 1.06 (0.39 – 2.90)   | 0.91   |
|                                   | <b>[4.60 (1.41 – 14.99)]</b> | <b>[0.01]</b> | [0.97 (0.34 – 2.73)] | [0.95] |

A: Occurrences of patients with anti-dsDNA antibodies above the clinical threshold.

AwMA: anti-whole mitochondria antibodies. AmtDNA: anti-mitochondrial DNA antibodies. SDI: lupus severity disease index. SLEDAI-2K: systemic lupus erythematosus disease activity index - 2000. OR (CI): Odds ratios (95% Wald Confidence Interval). P from logistic regressions.

\*Bivariate results (N = 175) are followed by multivariate results in square brackets (N=169).

**1.11. Table 5. Performance of cut-off values for AwMA and AmtDNA (Healthy donors: n=43, SLE: n=175)**

|               | <b>Cutpoint<br/>(OD405 nm)</b> | <b>Sensitivity</b>  | <b>Specificity</b>  | <b>PPV</b>          | <b>NPV</b>          | <b>AUC</b>          |
|---------------|--------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>AwMA</b>   | 0.30<br>(0.17-0.32)            | 0.58<br>(0.50-0.65) | 0.88<br>(0.75-0.96) | 0.95<br>(0.89-0.98) | 0.34<br>(0.25-0.43) | 0.80<br>(0.73;0.87) |
| <b>AmtDNA</b> | 0.30<br>(0.25-0.45)            | 0.63<br>(0.55-0.70) | 0.74<br>(0.59-0.87) | 0.91<br>(0.84-0.95) | 0.33<br>(0.24-0.43) | 0.71<br>(0.63;0.79) |

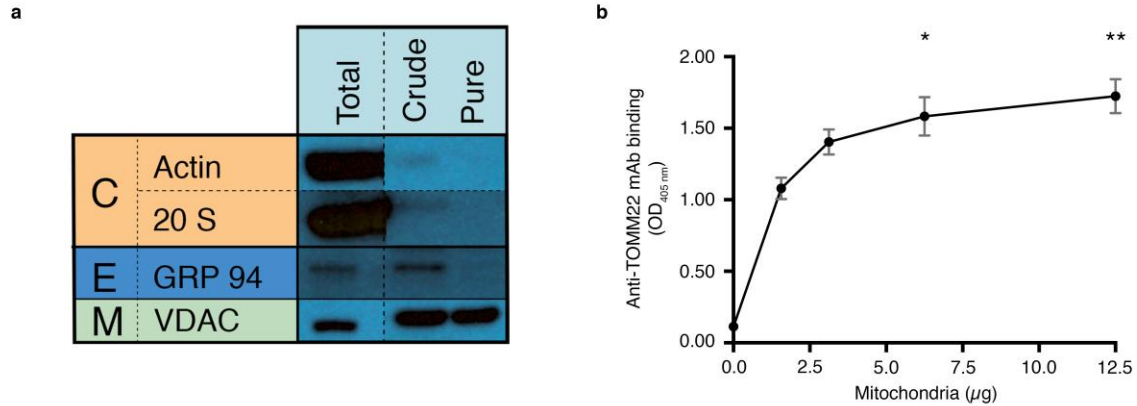
AwMA: anti-whole mitochondria antibodies. AmtDNA: anti-mitochondrial DNA antibodies.

AUC: area under the curve. OD: optical density. PPV: Positive Predictive Value.

NPP: Negative Predictive Value.

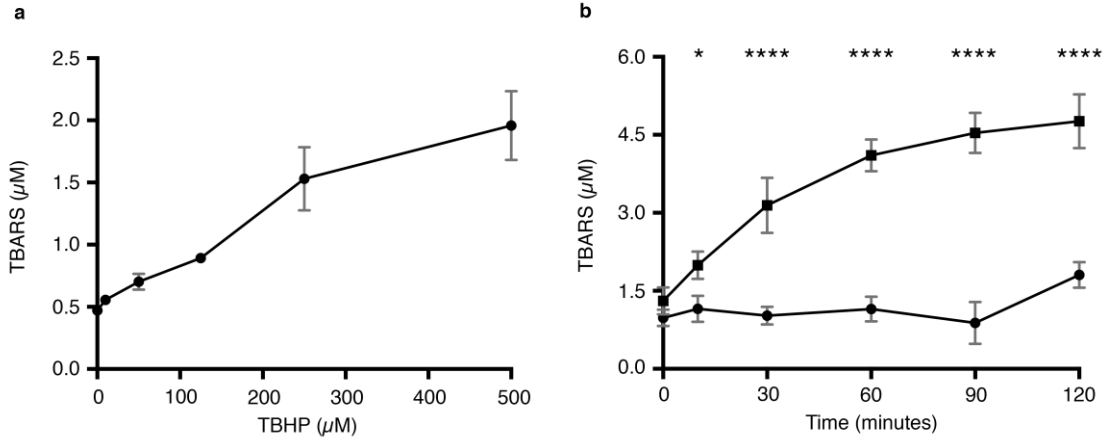
## 1.12 Supplementary information:

### 1.12.1 Supplementary figures:



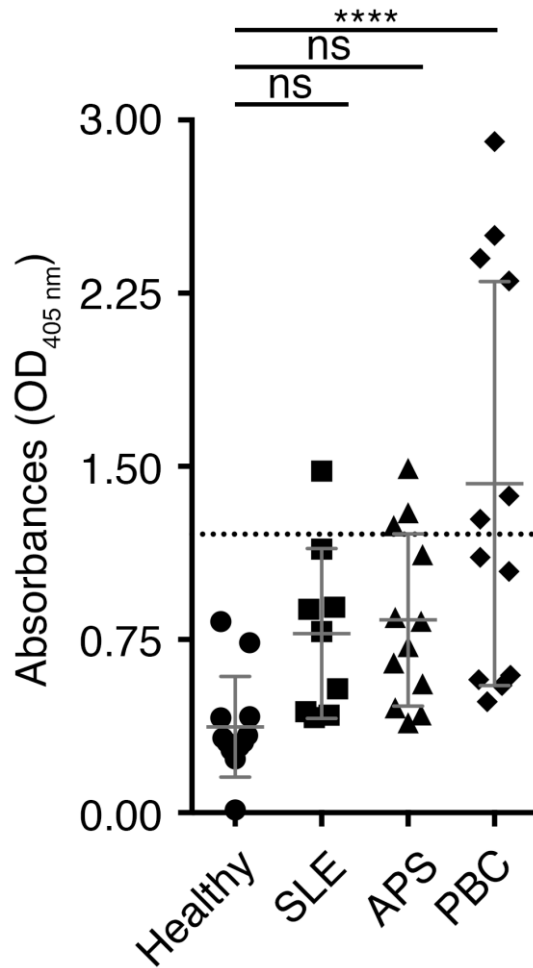
#### 1.12.1. Supplementary Figure 1. Isolation of highly purified isolated mitochondria

(a) Crude mitochondria carry contaminants from the endoplasmic reticulum (E) and from the proteasome (20S) that are lost upon ultracentrifugation using a Percoll gradient, yielding more highly purified mitochondria (pure mitochondria). Results are representative of three distinct preparations. Blots (20  $\mu\text{g}$  protein per lane) separated by the dashed line are non-contiguous but from same membrane. (b) Wells were coated in quadruplicate with increasing amounts of isolated mitochondria, ranging from 1.6 to 12.5  $\mu\text{g}$ , and incubated with a murine anti-TOMM22 monoclonal antibody (clone IC9-2, 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Antibody binding was detected with an alkaline-phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG and revealed with p-nitrophenol phosphate for 30 minutes. ODs were read at 405 nm. Friedman test with multiple comparisons (Dunn's correction) OD detected were compared to the OD measured in wells without mitochondria. All experiment presented in the figure were performed using mouse mitochondria. Data are mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ . \*\* $p < 0.01$ . C: cytosolic markers; Crude: crude mitochondria; GRP 94: 94 kDa glucose-related protein; M: mitochondrial markers; mAb: monoclonal antibody; Pure: pure mitochondria; Total: Total liver; VDAC: voltage-dependent anion channel; 20S: 20S proteasome.



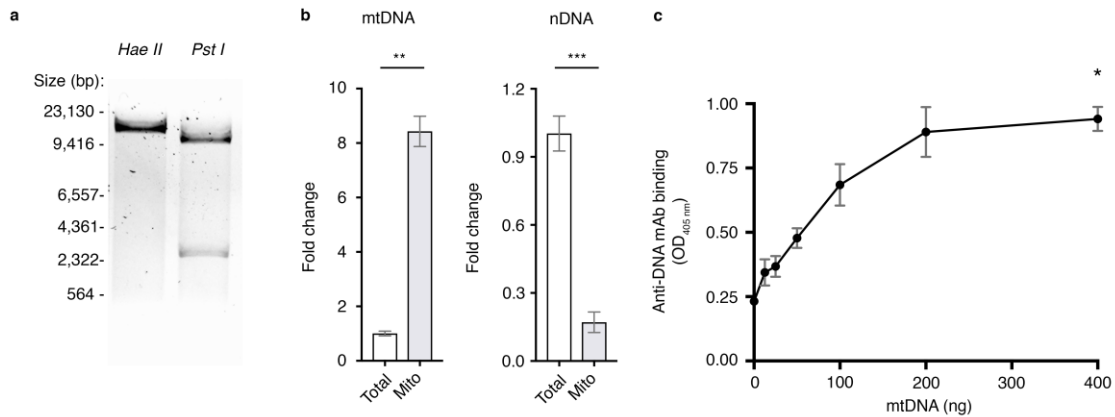
### 1.12.1. Supplementary Figure 2. Assessment of mitochondrial oxidation.

(a) Isolated mitochondria ( $n = 3$ ) were treated with increasing concentrations of tert-butyl hydroperoxide (TBHP) (10 - 500  $\mu\text{M}$  in PBS) and lipid oxidation was quantified using a commercial kit. Friedman test with multiple comparisons (Dunn's correction). (b) The optimal duration of the oxidative treatment was determined by the kinetics of the lipid oxidation (10 - 120 min) with 500  $\mu\text{M}$  TBHP (filled squares), as detected with a commercial kit ( $n = 3$ ), and compared with mitochondria resuspended in PBS buffer devoid of TBHP (filled circles). Statistical differences were determined by two-way repeated measures ANOVA with multiple comparisons (Bonferroni's correction) between native and oxidized mitochondria for each time point. All experiment presented in the figure were performed using mouse mitochondria. Data are mean  $\pm$  SD. Data shown are the mean  $\pm$  SD of three samples. \* $p < 0.05$ . \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



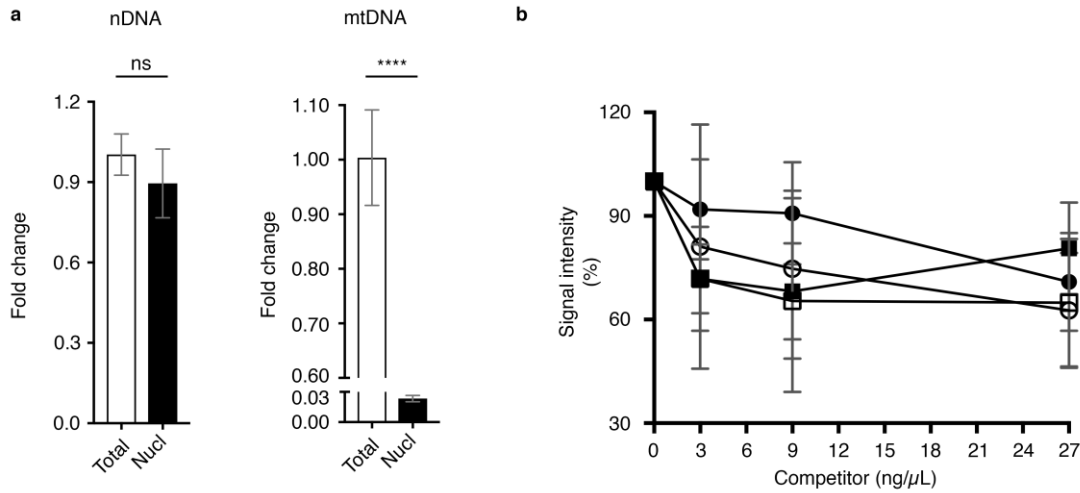
**1.12.1. Supplementary Figure 3. Detection of autoantibodies targeting submitochondrial particles.**

Direct ELISA was performed using murine submitochondrial particles (1.25  $\mu\text{g}$ ) as coating antigen. A significant elevation in the autoantibody titer was detected in sera (1:150) from primary biliary cirrhosis (PBC) patients when compared to sera from healthy donors, but not in sera from patients suffering from systemic lupus erythematosus (SLE) or antiphospholipid syndrome (APS). An isotype-matched monoclonal mouse anti-cytochrome C antibody (clone 7H8.2C12, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was included as a positive assay control (dotted line). Healthy donors:  $n = 12$ ; SLE:  $n = 9$ ; APS:  $n = 12$ ; PBC:  $n = 12$ . Statistical differences were determined by one-way ANOVA test with multiple comparisons (Dunnett's correction) to healthy donors. Data shown are the mean  $\pm$  SD for each group. Not significant (ns):  $p > 0.05$ . \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



#### 1.12.1. Supplementary Figure 4. Assessment of the isolated mitochondrial DNA purity

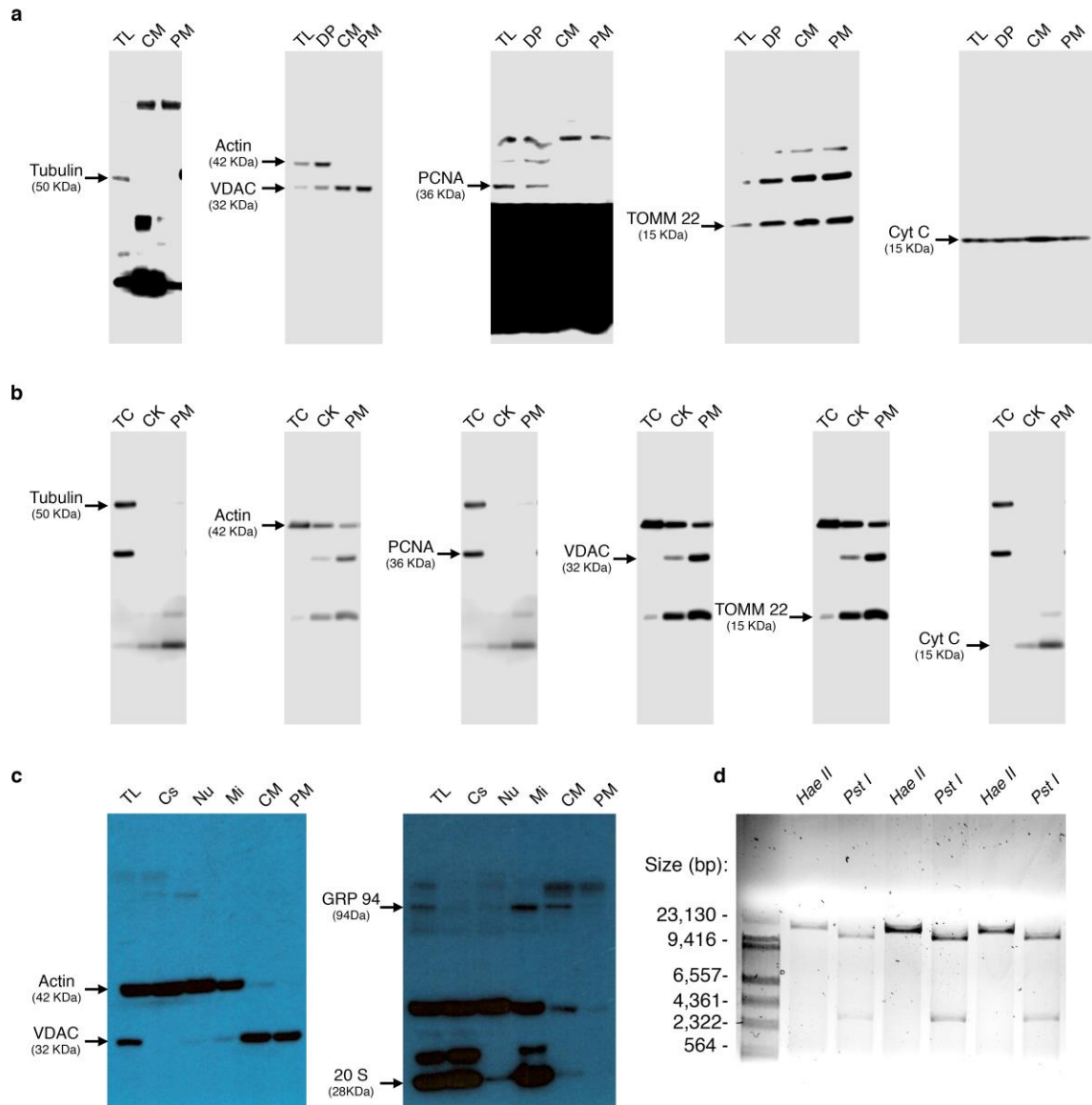
(a) 1.5  $\mu$ g of mtDNA was digested by two different restriction enzymes; *Hae II* (left lane) or *Pst I* (right lane). Fragments were resolved on a 0.5 % agarose gel. (b) Mitochondrial DNA (mtDNA) (left panel) and nuclear DNA (nDNA, right panel) were amplified by qPCR to assess the presence of contaminating nucleic acids originating from the nucleus. mtDNA isolated from isolated mitochondria (Mito) was compared to total DNA extracted from mouse liver (Total). N = 3, Data were analyzed by One sample Student's t-tests. (c) Saturation of protamine-sulfate pre-coated wells by mtDNA was performed using increasing doses of mtDNA (12.5 - 400 ng per well in triplicate) incubated with a mouse anti-DNA monoclonal antibody (Anti-DNA mAb, clone 35I9 DNA, 10  $\mu$ g/mL). Friedman test with multiple comparisons (Dunn's correction) to the OD values measured in wells with no mtDNA. All experiment presented in the figure were performed on murine samples. Data are mean  $\pm$  SD. \*p<0.05. \*\* p<0.01. \*\*\* p<0.001. Mito: mtDNA isolated from mitochondrial samples; total: DNA extracted from total mouse liver.



### 1.12.1. Supplementary Figure 5. AmtDNA display cross-reactivities between mitochondrial and nuclear DNA.

(a) Quality of the nDNA isolated from mouse hepatocytes was assessed by qPCR using primers specific to nuclear DNA (nDNA, left panel) or to mitochondrial DNA (mtDNA, right panel). DNA samples isolated from nuclei (Nucl) were compared to total DNA extracted from mouse liver (Total).  $N = 3$ , Data were analyzed by One sample Student's t-tests. (b) Cross-reactivities of AmtDNA was assessed by competitive ELISA ( $N=9$  SLE patients per condition). Increased concentrations (0, 3, 9 and 27 ng/μL) of mtDNA (circles) or nDNA (squares), treated (filled symbols) or not (hollow symbols) with S1 nuclease were used as competitors. Increased concentrations of competitors significantly decreased AmtDNA binding to the assay (\*\*\*\*,  $p<0.0001$ ). However, no significant differences were found between the competitors' effects. Two-ways ANOVA with repeated measures. All experiment presented in the figure were performed on DNA isolated from mouse liver. Data are mean  $\pm$  SD. Not significant (ns):  $p>0.05$ . \*\*\*\*  $p<0.0001$ . Nucl: nDNA purified from nuclei isolated from murine hepatocytes; total: DNA extracted from total mouse liver.





### 1.12.1. Supplementary Figure 6. Full length images for western blots and agarose gels.

Image corresponding to samples from various steps of the murine and human protocols for mitochondria isolation were acquired using the Image Studio Digit software on high sensitivity setup (maximal acquisition time: 12 min.), brightness and contrast were adjusted on the machine, as shown, for each protein of interest. Images were subsequently cropped and assembled as presented in **Figure 1 b** with no further editing. (a) The quality of the murine preparations was assessed by blotting (25  $\mu$ g protein per lane) protein lysates obtained: from total liver (TL);

the pellet obtained after the first 700 g centrifugation step containing unbroken cells and nuclei (DP); crude mitochondria (CM); and pure mitochondria (PM), results from TL and PM were presented in the figure. (b) Two different methods for the isolation of human mitochondria from Hep G2 cells were tested using total cell lysates (TC): one from a commercial kit (CK) and the other following the protocol described in the Material and Methods section (PM). Results from TC and PM are presented in the figure. The commercial kit was not used for any other results obtained in this study. (c) Differences between crude and pure mitochondria isolated from mouse liver were assessed. Images were acquired analogically on X-ray film, developed and scanned. Several cellular sub-compartments were tested [i.e., total liver (TL), cytosol (Cs), nuclei (Nu), microsomes (Mi), crude (CM) and pure mitochondria (PM)] but only TL, CM and PM are presented in the **supplementary figure 1 a**. (d) Mitochondrial DNA digestion by restriction enzymes, acquired using the Image Lab software and presented in the **supplementary figure 4 a**. From left to right: DNA ladder, *Hae II*-digested sample, *Pst I*-digested sample. PCNA: proliferating cell nuclear antigen; TOMM22: translocase of the outer mitochondrial membrane; VDAC: voltage-dependent anion channel.

### 1.12.2 Supplementary tables:

**1.12.2.Supplementary Table 1. Additional demographics and clinical variables for SLE patients included in the study (n=175)**

| Demographic variables   | SLE patients   |               |
|---|----------------|---------------|
| Ethnicity, n (%) (n=174)  | Caucasian      | 99 (57)       |
|   | Asian          | 36 (21)       |
|   | Black          | 31 (18)       |
|   | Others         | 8 (5)         |
| Body Mass Index (BMI)   | Range          | 15-55         |
|   | Mean $\pm$ S.D | 26 $\pm$ 6    |
| Average carotid intima-media thickness(CIMT) (n = 103), in $\mu$ m                    | Range          | 388-969       |
|   | Mean $\pm$ S.D | 611 $\pm$ 104 |
| Percent change of the flow-mediated dilatation, brachial artery, (n = 72), in percent | Range          | -8.7-34.3     |
|   | Mean $\pm$ S.D | 8.5 $\pm$ 8.8 |
| Flow mediated dilatation of the brachial artery, n (%)                                |                | 82 (47)       |
| Presence of plaque in the carotid, n (%) (n = 103)                                    |                | 36 (35)       |
| Biopsy class,(n=62), n (%)  | 0              | 1 (2)         |
|   | 1              | 4 (7)         |
|   | 2              | 11 (18)       |
|   | 3              | 13 (21)       |
|   | 4              | 18 (29)       |
|   | 5              | 12 (19)       |
|   | 6              | 1 (2)         |
|   | 45             | 2 (3)         |
| Activity Index from the biopsy, (n = 58)  | Range          | 0-11          |
|   | Mean $\pm$ S.D | 4 $\pm$ 3     |
| Chronicity Index from the biopsy, (n = 58)  | Range          | 0-9           |
|   | Mean $\pm$ S.D | 2 $\pm$ 2     |

LDL: low-density lipoproteins.

<sup>A</sup>: Reference range 150 - 400.

<sup>B</sup>: Reference range 4.0 - 5.1.

### 1.12.2. Supplementary Table 2: Serologic variables for SLE patients

| Serologic parameters  |                | SLE patients<br>(n = 175 except when specified) |
|---|----------------|---|
| Cholesterol total<br>(n=173), in mmol / L                       | Range          | 2.75-6.52                                       |
|   | Mean $\pm$ S.D | 4.40 $\pm$ 0.81                                 |
| LDL cholesterol<br>(n=169), in mmol / L                         | Range          | 0.94-3.99                                       |
|   | Mean $\pm$ S.D | 2.37 $\pm$ 0.60                                 |
| HDL cholesterol<br>(n=169), in mmol / L                         | Range          | 0.78-2.90                                       |
|   | Mean $\pm$ S.D | 1.54 $\pm$ 0.42                                 |
| TC/HDL cholesterol<br>(n=169), in mmol / L                      | Range          | 1.65-6.73                                       |
|   | Mean $\pm$ S.D | 3.01 $\pm$ 0.79                                 |
| Platelets <sup>A</sup><br>(n=170), x10 <sup>9</sup> / L         | Range          | 17-573  |
|   | Mean $\pm$ S.D | 242.57 $\pm$ 74.53                              |
| White blood cells <sup>B</sup><br>(n=170), x10 <sup>9</sup> / L | Range          | 1.7-12.3  |
|   | Mean $\pm$ S.D | 5.63 $\pm$ 2.10                                 |
| DNA Farr<br>(n=174), in U / mL                                  | Range          | 1-101   |
|   | Mean $\pm$ S.D | 15.90 $\pm$ 27.77                               |
|   | < 7, n (%)     | 102 (58.6)                                      |
| Increased anti-dsDNA antibodies                                 | n (%)          | 59 (33.7)                                       |

<sup>A</sup>: Reference range 150 - 400.

<sup>B</sup>: Reference range 4.0 - 5.1.

TC: total cholesterol. DNA Farr: quantification of anti-dsDNA antibodies by Farr assay.

HDL: high-density lipoproteins. LDL: low-density lipoproteins.

### 1.12.2. Supplementary Table 3: Autoantibodies detected in SLE patients

| Variable of interest               | SLE patients<br>(n=175 except when specified) |                 |
|------------------------------------|---|-----------------|
| Anti-HSP60 (n=172)                 | Range   | 0.00-1.81       |
|                                    | Mean $\pm$ SD                                 | 0.60 $\pm$ 0.38 |
| AmtDNA mean                        | Range   | 0.08-2.45       |
|                                    | Mean $\pm$ SD                                 | 0.45 $\pm$ 0.33 |
| AwMA mean                          | Range   | 0.06-3.25       |
|                                    | Mean $\pm$ SD                                 | 0.38 $\pm$ 0.30 |
| Lupus anticoagulant, n (%) (n=168) | 19 (11.3)                                     |                 |
| ACA positive, n (%)                | 14 (8.0)                                      |                 |

ACA: anti-cardiolipin antibodies within 1 year of assessment.  
AwMA: anti-whole mitochondria antibodies. AmtDNA: anti-mitochondrial DNA antibodies,  
HSP60: 60 kDa heat-shock protein.

## **Chapitre 2 : Les patients atteints de lupus érythémateux disséminé expriment des autoanticorps circulants autoanticorps dirigés contre l'ARN mitochondrial**

### **2.1 Résumé**

La mitochondrie approvisionne la cellule en énergie et régule l'apoptose. Elles contiennent plusieurs copies d'un génome circulaire capable d'activer le système immunitaire et ciblé par certains autoanticorps exprimés par les patients atteints de SLE. Toutefois, l'immunogénicité du mtRNA n'est pas connue dans le cadre du SLE. Dans la présente étude, nous évaluons la présence d'AmtRNA chez les patients lupiques. Les niveaux des AmtRNA des classes IgG et IgM sont significativement augmentés chez les patients SLE (n=86), comparés aux donneurs sains (n=30, respectivement  $p < 0.0001$  et  $p = 0.0493$ ). Les AmtRNA-IgG sont plus élevés chez les patients positifs pour les anti-dsDNA ( $p < 0.0001$ ) et présentent des associations négatives avec la formation de plaques d'athérosclérose dans la carotide ( $p = 0.04$ ) et la LN ( $p = 0.03$ ). Ces résultats indiquent que le mtRNA est un des antigènes reconnus par les autoanticorps lupiques et renforcent le concept que la mitochondrie est une importante source d'autoantigènes dans le SLE.

## 2.2 Abstract

The mitochondrion supplies energy to the cell and regulates apoptosis. Unlike other mammalian organelles, mitochondria are formed by binary fission and cannot be directly produced by the cell. They contain numerous copies of a compact circular genome that encodes RNA molecules and proteins involved in mitochondrial oxidative phosphorylation. Whereas mitochondrial DNA (mtDNA) activates the innate immune system if present in the cytosol or the extracellular milieu, it is also the target of circulating autoantibodies in systemic lupus erythematosus (SLE). However, it is not known whether mitochondrial RNA is also recognized by autoantibodies in SLE. In the present study, we evaluated the presence of autoantibodies targeting mitochondrial RNA (AmtRNA) in SLE. We quantified AmtRNA in an inducible model of murine SLE. The AmtRNA were also determined in SLE patients and healthy volunteers. AmtRNA titers were measured in both our induced model of murine SLE and in human SLE, and biostatistical analyses were performed to determine whether the presence and/or levels of AmtRNA were associated with clinical features expressed by SLE patients. Both IgG and IgM classes of AmtRNA were increased in SLE patients ( $n = 86$ ) compared to healthy controls ( $n = 30$ ) ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.0493$ , respectively). AmtRNA IgG levels correlated with anti-mtDNA-IgG titers ( $r_s = 0.54$ ,  $p < 0.0001$ ) as well as with both IgG and IgM against  $\beta$ -2-glycoprotein I (anti- $\beta$ <sub>2</sub>GPI;  $r_s = 0.22$ ,  $p = 0.05$ ), and AmtRNA-IgG antibodies were present at higher levels when patients were positive for autoantibodies to double-stranded-genomic DNA ( $p < 0.0001$ ). AmtRNA-IgG were able to specifically discriminate SLE patients from healthy controls, and were negatively associated with plaque formation ( $p = 0.04$ ) and lupus nephritis ( $p = 0.03$ ). Conversely, AmtRNA-IgM titers correlated with those of anti- $\beta$ <sub>2</sub>GPI-IgM ( $r_s = 0.48$ ,  $p < 0.0001$ ). AmtRNA-IgM were higher when patients were positive for anticardiolipin antibodies (aCL-IgG:  $p = 0.01$ ; aCL-IgM:  $p = 0.002$ ), but AmtRNA-IgM were not associated with any of the clinical manifestations assessed. These findings identify mtRNA as a novel mitochondrial antigen target in SLE, and support the concept that mitochondria may provide an important source of circulating autoantigens in SLE.

# **Autoantibodies in systemic lupus erythematosus target mitochondrial RNA**

Yann Becker<sup>1</sup>, Geneviève Marcoux<sup>1</sup>, Isabelle Allaeys<sup>1</sup>, Anne-Sophie Julien<sup>2</sup>, Renée-Claude Loignon<sup>3</sup>, Hadrien Benk-Fortin<sup>1</sup>, Emmanuelle Rollet-Labelle<sup>1</sup>, Joyce Rauch<sup>4</sup>, Paul R. Fortin<sup>1,3,5\*</sup>, Eric Boilard<sup>1,5\*</sup>.

<sup>1</sup> Centre de Recherche du CHU de Québec – Université Laval, Département de microbiologie et immunologie, Faculté de Médecine de l'Université Laval, Québec, Qc, Canada.

<sup>2</sup> Département de mathématiques et statistique, Université Laval, Québec, Qc, Canada.

<sup>3</sup> Division de Rhumatologie, Département de Médecine, CHU de Québec – Université Laval, Québec, Qc, Canada.

<sup>4</sup> Division of Rheumatology, Department of Medicine, Research Institute of the McGill University Health Centre, Montreal, Qc H4A 3J1, Canada

<sup>5</sup> Axe maladies infectieuses et inflammatoires, Centre de recherche du CHU de Québec – Université Laval, Québec, Qc, Canada.

To whom correspondence should be addressed:

Eric Boilard, PhD, and Paul R. Fortin, MD, MPH, FRCPC



## 2.3 Introduction

The mitochondrion is an intracellular organelle involved in the regulation of numerous cellular functions, among which the best known are ATP production and programmed cell death<sup>751,752</sup>. Mitochondria are considered as deriving from the endosymbiosis of an  $\alpha$ -proteobacteria<sup>13,755</sup>, providing the organelles many bacterial features<sup>306,358,649,754-756</sup>.

Different cellular lineages<sup>298,303,307,310-315</sup> may extrude their mitochondria upon activation. Extracellular mitochondria have been identified in damaged tissues<sup>306-309</sup>; diverse inflammatory conditions<sup>298,311,313,331,343,761,762</sup>; and in the blood of critical care patients<sup>762</sup>. As mitochondria retained several characteristics of their ancestral prokaryotic origin, the release of mitochondrial components onto the extracellular milieu can activate the innate immune system<sup>749,807</sup>. The efflux of mtDNA is facilitated by megapores formed in the mitochondrial membrane during apoptosis, and detected by the cytosolic DNA sensors cGAS and stimulator of interferon genes (STING) pathway, thereby leading to type I interferon synthesis<sup>154</sup>. Cardiolipin, N-formylated peptides, mtDNA, ATP and reactive oxygen species are known mitochondrial damage-associated molecular patterns<sup>358,757-759</sup>. They further activate cells through nuclear oligomerization domain-like receptors<sup>757,758,760</sup>, toll-like receptors (TLR) (*e.g.*, TLR9 for mtDNA), or formyl peptide receptors<sup>358,757-760</sup>.

Systemic lupus erythematosus is an autoimmune disease characterized by the presence of circulating immune complexes and inflammation in multiple organs and tissues. Recent evidence point to an involvement of mtDNA, liberated by neutrophils, in the activation of STING and type-I IFN production in SLE<sup>298,311</sup>. Moreover, extracellular mtDNA can enhance leukocyte migration and degranulation<sup>808</sup>, and promotes the secretion of the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  by plasmacytoid dendritic cells<sup>327</sup>. Production of autoantibodies targeting several mitochondrial components was reported in SLE as well as in other diseases [*e.g.*, primary biliary cirrhosis (PBC), antiphospholipid syndrome (APS), and cardiomyopathies] (**Figure 1**). Anti-mitochondrial autoantibodies recognize proteins, such as those involved in oxidative phosphorylation, phospholipids or unidentified epitopes present in the mitochondrial membrane. Despite the extensive literature regarding antibodies targeting the cardiolipin

(also known as the mitochondrial antigen M1) in SLE, the anti-mitochondrial autoantibody repertoire in SLE and their antigenic targets remains mostly uncharacterized <sup>2,311,771,772,809</sup>. Using intact mitochondria and mtDNA as antigens to screen autoantibodies in SLE patients, we have shown that different sets of autoantibodies also target the mitochondrial outer membrane and mtDNA <sup>2</sup>. Given the accumulating evidence for mitochondrial release during inflammatory pathogenesis, these observations point to a role for mitochondria both in the stimulation of the innate immune system and as a potential source of autoantigens.

Whereas the mitochondrion has already been described as a source of mtDNA during inflammation <sup>315,761,808</sup>, it is not known whether its important RNA content (mtRNA) can contribute to the autoantigenic load in SLE. Despite its presence at high copy numbers, the mitochondrial genome is very compact <sup>11,12,810</sup>. During its translation into mitochondrial messenger RNA <sup>11</sup>, a long polycistronic transcript is generated from each strand of mtDNA prior to undergoing processing into mtRNA molecules. This highly regulated process is thought to occur in a particular location in the mitochondrion, called mitochondrial RNA granules <sup>811</sup>, and requires key RNA processing enzymes such as the members of the FASTK family of proteins <sup>812</sup>. The human mitochondrial transcriptome comprises 16S ribosomal RNA molecules (78%), transfer (13%), messenger (8%) and small noncoding antisense (1%) mtRNA molecules. The complete mitochondria transcriptome is controlled by the cell's energy requirements, and therefore varies greatly depending on its tissue distribution. In the heart, 30% of the total messenger RNA molecules are of mitochondrial origin, whereas approximately 5% of the total messenger RNA load in less metabolically active cells such as leukocytes is encoded by mitochondrial genes <sup>12</sup>. The important quantity of mtRNA may thus represent a major antigenic load for the adaptive immune system upon release of mitochondria onto the extracellular milieu.

With the accumulating evidence supporting the liberation of mitochondrial components into the extracellular milieu in SLE <sup>298,311</sup>, it is crucial to identify the various mitochondrial antigens. In the present study, we examined whether the RNA molecules present in mitochondria are antigenic. The levels of anti-mtRNA (AmtRNA) were measured in SLE sera, and we determined whether AmtRNA were associated with antibodies against whole mitochondrial organelles (AwMA) and mtDNA (AmtDNA). We also investigated

the occurrence of AmtRNA in an induced model of murine SLE. Finally, we determined whether AmtRNA were associated with disease manifestations in patients with SLE.

## 2.4 Material and methods

### 2.4.1. *Induced model of murine SLE:*

This study was carried out in accordance with the recommendations of the Canadian Council on Animal Care. The protocol was approved by McGill University Animal Care Committee. C57BL/6 mice were obtained from Harlan Sprague Dawley Inc. (Indianapolis, IN, USA) and housed in a specific-pathogen-free animal facility at the animal facility of the Research Institute of the McGill University Health Centre. Female (10–12-week-old) mice were injected intravenously (i.v.) with 100  $\mu$ L human  $\beta$ 2GPI (20  $\mu$ g) (Crystal Chem Inc., Elk Grove Village, IL, USA), followed 24 h later by a 100  $\mu$ L i.v. injection of lipopolysaccharide (LPS from *E.coli*, serotype O111:B4; 10  $\mu$ g) (List Biological Laboratories, Campbell, CA, USA).  $\beta$ 2GPI and LPS injections were repeated every two weeks for a total of three rounds of immunizations, and then at two-month intervals for the fourth and the fifth immunizations. C57BL/6 mice injected i.v. with PBS and LPS following the same schedule were used as controls. Mice were bled one week after the fifth immunization and serum was kept frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$  until testing.

### 2.4.2. *Mitochondria isolation:*

Mitochondria were isolated from the livers of C57BL/6 mice as previously described <sup>447</sup>. In brief, cells and tissues were disrupted by grinding in a glass/Teflon tissue potter containing 12 mL ice-cold mitochondrial isolation buffer (10 mM Tris, 1 mM EGTA, 200 mM sucrose) for each gram of liver. Debris were pelleted twice at 700 g, for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$  and the supernatants were transferred to fresh tubes. Mitochondria were further separated from other cellular fractions by three centrifugation steps (twice at 7,000 g and once at 10,000 g, for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ ). Between each step, pelleted mitochondria were resuspended in 12 mL isolation buffer. Samples were kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until required for RNA isolation.

### 2.4.3. *Mitochondrial RNA isolation:*

Mitochondrial RNA was isolated using the Aurum<sup>TM</sup> Total RNA Mini Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), following the manufacturer's instructions. Ribonucleic acid yields were quantified using a BioDrop  $\mu$ LITE and its proprietary software (BioDrop Ltd., Cambridge,

UK). The absence of contamination by mitochondrial DNA was assessed by resolution of 1 µg untreated mtRNA and the same amount of RNase A-treated (QIAGEN, 100 µg/mL) mtRNA on a 1.5 % (w:v) agarose gel (**Supplementary Figure 1a**).  $15.09 \pm 2.74$  µg mtRNA were isolated for each mg of bicinchoninic acid assay (BCA)-dosed mitochondria used (n = 3).

#### *2.4.4. Enzyme-linked immunoassays for the detection of antibodies targeting mitochondrial antigens:*

Clear 96-well High Bind half-area flat bottom ELISA microplates (Corning, New York, USA) were pre-coated with 100 µL per well of 1% protamine sulfate (Sigma-Aldrich) in double-distilled water for 1 h at RT. Plates were then washed thrice with PBS and loaded with mtRNA. Plates were coated overnight at 4°C, washed thrice and non-specific binding was blocked for 4 h at 37°C with 100 µL per well of ELISA blocking buffer (PBS – 10% FBS - 0.5% gelatin). Wells were rinsed three times with PBS and incubated in duplicate with serum diluted (1:150 for human and 1:50 for mice) in incubation buffer (PBS – 10% FCS – 0.3% gelatin). Plates were washed thrice with PBS and incubated for 90 min at RT with either  $\gamma$  or  $\mu$  chain-specific-alkaline phosphatase-(AP) conjugated goat anti-human IgG or IgM (Sigma-Aldrich) for human serum, or  $\gamma$  chain-specific-horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich) for mice (1:1000) in secondary antibody buffer (PBS – 0.4 % bovine serum albumin [BSA]). Unbound antibodies were washed thrice with PBS. Signals from AP-conjugated antibodies were developed with *para*-nitrophenol phosphate (*p*-NPP) for ~30 min at 37°C, and HRP-conjugated antibodies were developed with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) at RT. The reaction was stopped with 2 N sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Optical densities (OD) were measured at 405 nm (*p*-NPP) or 450 nm (HRP) on a SpectraMax 190 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), using SoftMax Pro 5.4.1 (Molecular Devices). For each experiment, blank values (*i.e.*, wells coated with mtRNA, but without sera) were subtracted from each measurement.

The quantity of purified mitochondrial RNA (mtRNA) required for coating half-area flat-bottom 96-well ELISA microplates (Corning, New York, USA) was optimized following the aforementioned protocol, by using increasing concentrations

from 0 to 1600 ng of coating mtRNA. Pooled sera (1:150) from 6 SLE patients, who had previously tested positive for AmtDNA and AwMA, were incubated after blocking non-specific binding. The peak signal for optical densities at 405 nm was obtained with 200 ng of coating mtRNA (**Supplementary Figure 1b**).

#### *2.4.5. Ethics and study approval:*

This study was carried out in accordance with the recommendations of the Research Ethics Board of the CHU de Québec – Université Laval with written informed consent from all subjects. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by Research Ethics Board of the CHU de Québec – Université Laval.

#### *2.4.6. Human serum samples:*

The human sera tested in this study were obtained from the Systemic Autoimmune Rheumatic Disease (SARD) biobank and data repository (SARD-BDB) located at the *CHU de Québec-Université Laval* (UL). This SARD-BDB and the specific use of the sera for the present study were approved by the *CHU de Québec-UL* research ethics board (#B13-06-1243 and #B14-08-2108, respectively). Patients with SLE met the 1982 ACR classification criteria for SLE (revised in 1997)<sup>666,667</sup>. A peripheral blood sample was collected at the time of their first visit. Serum samples from 30 healthy donors and 87 SLE patients included in the SARD-DBD cohort were used in the present study. However, one patient had no clinical data available and was therefore excluded for bio-statistical comparisons (i.e., n = 86 SLE donors for these tests).

#### *2.4.7. Additional serum samples:*

Sera from a cohort of patients and controls from the University of Toronto Lupus Clinic, as well as patients with primary biliary cirrhosis (PBC) from Quebec City, were used in additional exploratory analyses to test the presence of AmtRNA in patients with the antiphospholipid syndrome (APS, n = 12) and PBC (n = 12). APS patients and healthy controls, distinct from those included in the SARD-BDB (n = 43), were originally recruited between August 2010 and October 2011, and gave consent to allow remaining biospecimens to be used for future studies on lupus biomarkers. This study has been reviewed and approved by the Research Ethics Board of the University Health Network (#10-0637-BE) and

of the *CHU de Québec – Université Laval* (#B14-08-2108). APS patients met 1999 Sapporo criteria for the disease (revised in 2006) <sup>411,682</sup>, and healthy controls were recruited if they had no known illnesses and had no infectious symptoms at the time of the blood draw. Donors gave a single blood sample that was linked to their anonymized clinical data. PBC patients were positive for anti-mitochondrial antibodies and presented clinical criteria for the disease <sup>770</sup>.

#### *2.4.8. Clinical variables collected in SLE patients:*

**Sociodemographic variables:** information was collected concerning patient's age, gender, marital status, and ethnicity at the first visit in the SARD-BDB.

**Patient characteristics including exposures to cardiovascular risk factors.** A body mass index was calculated and reported as underweight, normal, overweight and obese. Hypertension and diabetes mellitus were documented as present or absent. Smoking history was reported as non-smokers, ex-smokers or current smokers. Female patients were considered post-menopausal in the absence of menstruations for more than 12 continuous months.

**Disease specific characteristics.** ACR classification criteria <sup>666,667</sup> were documented for each of the 11 categories and a total score calculated ( $5 \pm 1.28$ ). Disease duration, lupus disease activity using the SLE Disease Activity Index (SLEDAI) <sup>813,814</sup> and lupus damage using the Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC)/ACR damage index (SDI) <sup>815,816</sup> were collected during the clinical visit matched to the blood specimen draw. Both the SLEDAI and the SDI are reported as continuous variables and they both have proven validity, reliability, and perform well in observational studies.

**Medication variables.** Antimalarial use was defined as use of hydroxychloroquine or chloroquine at the current visit. Steroid use was defined as prednisone use in the past year.

**Clinical outcomes.** Clinically relevant lupus disease activity and damage were used as clinical outcome in our analyses and were defined as a SLEDAI of 4 or more to capture clinically active lupus and a SDI of 1 or more to capture clinically significant damage.

Other outcome variables included arterial and venous thrombotic event ever in the past and presence of lupus nephritis according to the presence or absence of the renal item of the SLICC Classification criteria for SLE <sup>669</sup>. Presence or absence of carotid plaques, as well as average carotid-intima media thickness (CIMT) was also documented by carotid ultrasound following a standard examination of both carotids (standard carotid ultrasound research protocol using an Esaote MyLab Five ultrasound machine with digital images sent for blind reading at the IMT Core Laboratory of the Montreal Heart Institute).

**Information from clinical laboratories.** For SLE patients, an automated complete blood count was documented. The anti-dsDNA, anticardiolipin antibodies (aCL) (IgG and IgM – laboratory cut-offs of 40 GPL or MPL units) and anti- $\beta$ 2GPI (IgG and IgM – laboratory cut-offs above the 99th percentile of controls) were measured by ELISA. The lupus anticoagulant assay (LA) followed international guidelines for the performance of this functional assay <sup>817</sup>. The above tests were performed in a clinical laboratory at *CHU de Quebec-UL* as part of routine care.

**Information from research laboratories.** In addition to the measurements provided by the clinical laboratories, our research laboratory performed antibody assays to detect AwMA- and AmtDNA, following previously described methods <sup>2</sup>.

#### *2.4.9. Statistical analyses:*

Descriptive statistics are presented as mean with standard deviation or frequency with percentage without missing values for continuous and categorical variables respectively. Comparisons between groups were performed using the Student's, Wilcoxon or Kruskal-Wallis tests depending on the nature of the variables and their distribution. Spearman correlations were calculated to assess association between continuous variables. Associations between AmtRNA and clinical outcomes were studied by bivariate and multivariate logistic regressions, for dichotomous and continuous outcomes respectively. The latter were adjusted for gender, disease duration, age, body mass index (BMI), antimalarial medication and prednisone use. ROC curves were generated to assess the predictive ability of AmtRNA to discriminate between SLE and controls, and their area under the curve (AUC) was calculated. Participants' results were considered positive for AmtRNA when their value was above the cut-off value



identified after maximizing Youden's Index. A 95 % confidence interval was obtained for the cut-off using 10,000 bootstrap samples. Performance measures are presented with their 95 % exact confidence interval. Statistical analyses were performed with Prism 7 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) and SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) and Figures were assembled with Photoshop CS6 13.0 (Adobe Systems Inc., Mountain View, CA, USA).

## 2.5 Results

We used our quantitative ELISA to assess whether AmtRNA from the IgG subclass (AmtRNA-IgG) could be detected in an induced model of murine SLE in which the production of circulating IgG against whole mitochondria (AwMA) and mitochondrial DNA (AmtDNA) was previously reported <sup>2</sup>. Antibodies against mtRNA were significantly increased ( $p = 0.0005$ ) in the sera of SLE mice compared with control mice (**Figure 2**).

A cohort of 86 SLE patients (**Tables 1 - 5**) and 30 healthy controls (19 females [63.3 %], 11 males [36.7 %], age:  $49.33 \pm 7.68$  years) was studied to determine the occurrence of AmtRNA-IgG and AmtRNA-IgM in human SLE. The proportion of male donors in the healthy group was higher than in the SLE cohort (i.e., 36.7% vs 16.3% of male donors respectively) as well as than the 1:10 male-to-female sex bias reported in the disease. We thus verified that the anti-mitochondrial antibody titers measured were not influenced by sex, using Wilcoxon test and found no significant differences ( $p$ -values between 0.14 and 0.97). Both AmtRNA-IgG and -IgM were significantly increased in SLE patients, compared with healthy individuals ( $p = 0.0002$  and  $p = 0.0493$ , respectively) (**Figure 3, Supplementary Figure 1**). In healthy donors, AmtRNA-IgM were higher than AmtRNA-IgG levels ( $0.32 \pm 0.24$  vs  $0.16 \pm 0.12$ ), suggesting that antibodies targeting mitochondrial epitopes may be present in healthy individuals even in the absence of any detectable pathology.

In a separate exploratory analysis using donors distinct from those included in the SARD-BDB, AmtRNA-IgG were also significantly increased in patients with APS, an autoimmune condition often associated with SLE ( $p < 0.001$  versus healthy controls). However, no differences in AmtRNA-IgG were observed between patients with PBC, a disease known for an adaptive immune response against mitochondrial autoantigens, and healthy controls ( $p = 0.31$ ). (**Figure 4**).

Autoantibodies to genomic dsDNA (anti-dsDNA) and to  $\beta$ -2-glycoprotein I (anti- $\beta$ <sub>2</sub>GPI, IgG and IgM) were evaluated during the clinical work-up of a patient with an increased likelihood of SLE. We examined whether titers in AmtRNA (IgG and IgM) and levels of anti-dsDNA

or anti- $\beta_2$ GPI were associated with each other in the patients, and found correlations between levels of AmtRNA-IgG and those of both anti- $\beta_2$ GPI-IgG and IgM ( $r_s = 0.22$ ,  $p = 0.05$ ). AmtRNA-IgM titers only displayed a strong correlation with anti- $\beta_2$ GPI-IgM ( $r_s = 0.48$ ,  $p < 0.0001$ ). Conversely, no correlations were observed between AmtRNA and concentrations of anti-dsDNA (**Table 6**). We also determined whether the levels of AmtRNA correlated with IgG and IgM antibodies targeting mitochondrial epitopes localized in diverse sub-compartments of the organelle <sup>2</sup>. Specifically, we measured antibodies recognizing intact whole mitochondria (AwMA), which most likely bind epitopes found on the outer mitochondrial membrane; aCL, which target cardiolipin, a phospholipid located mainly within the mitochondrial inner membrane; and AmtDNA, which recognize mitochondrial DNA. We found that AmtRNA-IgG levels correlated with AmtDNA-IgG ( $r_s = 0.54$ ,  $p < 0.0001$ ) and with AwMA-IgG ( $r_s = 0.24$ ,  $p = 0.03$ ), but not with aCL (IgG and IgM). AmtRNA-IgM concentrations correlated with AmtDNA-IgM ( $r_s = 0.83$ ,  $p < 0.0001$ ), AwMA-IgM ( $r_s = 0.71$ ,  $p < 0.0001$ ), aCL-IgG ( $r_s = 0.27$ ,  $p = 0.02$ ), and aCL-IgM ( $r_s = 0.57$ ,  $p < 0.0001$ ). Thus, in addition to the newly described AmtRNA, different sets of anti-mitochondrial antibodies occur conjointly in SLE.

One of the main features of SLE is the expression of numerous autoantibodies in patients <sup>604</sup>, some of which are known to be associated with the clinical expression of the disease <sup>689</sup>. We assessed whether AmtRNA are qualitatively associated with positivity to several autoantibodies commonly found in SLE, including anti-dsDNA, aCL, and LA. AmtRNA-IgG levels were higher in presence of anti-dsDNA antibodies ( $p < 0.0001$ ), whereas AmtRNA-IgM titers were elevated in presence of aCL-IgG and -IgM ( $p = 0.01$  and  $p = 0.002$ , respectively) (**Table 7**). Of note, circulating AmtRNA-IgM tended ( $p = 0.06$ ) to be increased in the presence of LA in SLE patients.

We examined whether AmtRNA were associated with disease manifestations in 86 SLE patients for whom detailed clinical information were available (**Table 8**). Higher levels of AmtRNA-IgG were associated with a lower occurrence of plaque in the carotid using a bivariate analysis [OR(95 % CI) = 0.14 (0.02 – 0.91);  $p = 0.04$ ], but this significance was lost in the multivariate logistic regression [OR(95 % CI) = 0.16 (0.01 – 1.81);  $p = 0.14$ ]. We found no association

between AmtRNA-IgG and two clinical indices; one measuring SLE disease activity (SLEDAI-2K  $\geq 4$ ) and the other indicating damages (SDI  $>0$ ), both by bi- and multivariate analyses. However, higher concentrations of AmtRNA-IgG were positively associated with elevated anti-dsDNA antibodies in both models. AmtRNA-IgG were not associated with lupus nephritis in a bivariate analysis [OR(95 % CI) = 0.17 (0.02 – 1.71); p = 0.13], but this association became significant in the multivariate model [OR(95 % CI) = 0.02 (0.00 – 0.68); p = 0.03]. In contrast, AmtRNA-IgM were not significantly associated with any of these clinical outcomes by either the bi- or multivariate analysis.

Furthermore, we assessed if our conclusions were identical in patients with higher disease activity by repeating our calculations with patients having a SLEDAI-2K score  $> 6$  (i.e., for 15 patients, compared to 36 with a cut-off value at a SLEDAI-2K score  $\geq 4$ ). The associations between AmtRNA-IgG with SLEDAI-2K  $> 6$  were [OR(95 % CI) = 2.71 (0.71-10.31)] for the bivariate logistic regression and [OR(95 % CI) = 1.99 (0.40-10.00)] for the multivariate regression model. Values for the associations between AmtRNA-IgM and SLEDAI-2K  $> 6$  for bi- and multivariate analyses were [OR(95 % CI) = 0.53 (0.12-2.25)] and [OR(95 % CI) = 0.37 (0.07-1.89)], respectively. Thus, the conclusions remain the same using either SLEDAI-2K cut-off value.

To determine whether AmtRNAs might qualify as efficient predictors of SLE, we optimized cut-off values by Youden's method (**Table 9**). Calculated cut-off values were 0.30 for AmtRNA-IgG and 0.52 for AmtRNA-IgM. Both parameters were very specific for SLE (0.90 for IgG and 0.87 for IgM). Even though both Ig isotypes displayed a certain lack of sensitivity [43 SLE patients (49%) positive for AmtRNA-IgG and 33 (38%) for IgM], their positive predictive values (0.93 and 0.89) suggest that AmtRNAs may be considered as biomarkers of interest. Importantly, of all of the anti-mitochondrial autoantibodies measured, AmtRNA-IgG was the most potent at discriminating SLE patients from healthy donors. In this regard, AmtRNA-IgG was closely followed by AmtDNA-IgM. In contrast, AwMA (IgG and IgM) and AmtDNA-IgG failed to efficiently discriminate SLE patients from healthy controls.

## 2.6 Discussion

Although the interplay between extracellular mitochondria and innate immunity has been well described, the interactions between mitochondria and the adaptive immune system are less appreciated. Mitochondrial components are generally seen as potential damage-associated molecular pattern (DAMP) if released by cells, but their inflammatory potential may be different if they are also recognized by autoantibodies. Herein, we propose mtRNA as a novel source of mitochondrial autoantigens with high relevance to SLE.

Mitochondrial RNA is not the only mitochondrial sub-component with antigenic potential in SLE. The first descriptions of anti-mitochondrial antibodies (AMA) were published in the 1980's. However, the actual epitope(s) of some AMA remain unidentified<sup>399</sup>. Thus, AmtRNA add to the more recently appreciated AmtDNA and AwMA<sup>2</sup>. Adaptive autoimmunity targeting mitochondrial motifs is not unique to SLE: a humoral immune response against mitochondrial autoantigens was reported in various diseases, and described as 9 different types of AMA targeting distinct epitopes (namely, M1 to M9)<sup>2,399</sup>. While AMA have been observed in different contexts such as in cardiovascular diseases, iatrogenic disorders, secondary syphilis, APS and SLE, they are best characterized in PBC<sup>399,818</sup>. The latter is characterized by progressive infiltration of autoreactive lymphocytes through the hepatic portal system<sup>401,770,819</sup>. These cells display targeted autoreactivities directed against different mitochondrial antigens specifically expressed by bile ducts<sup>401</sup> such as the E2 subunit of the pyruvate dehydrogenase complex (PDC-E2, also known as mitochondrial antigen M2)<sup>820-823</sup>, sulfite oxidase (M4)<sup>403</sup>, glycogen oxidase (M9)<sup>805,824,825</sup> as well as other antigens that have not yet been described (M8). Detection of these AMA in PBC by ELISA have a prognostic value: patients positive for AMA-M4 and -M8 suffer from active and/or progressive forms of the disease<sup>404</sup>, whereas patients with only AMA-M2 and -M9 display diseases with delayed evolutions<sup>826</sup>. (recapitulated in **Figure 1**)

How exactly the mitochondrial antibodies are produced is not completely understood, but mitochondrial antigens can be generated through the degradation of old or damaged mitochondria by a specific form of autophagy known as mitophagy. Autophagosomes containing mitochondria travel through the endo-lysosomal system, leading to the degradation of its cargo and allowing the production of mitochondrial peptides that can be

processed and expressed by the major histocompatibility complex (MHC). Both MHC-I and MHC-II have been implicated <sup>827</sup>, an involvement for the latter being suggested in the surveillance of mitochondrial mutations occurring in cancer <sup>395,828</sup>. However, a recent study revealed that mitochondrial antigen processing can also occur independently of mitophagy. In this case, mitochondrial antigens are carried to endosomes by mitochondrial-derived vesicles formed by a mechanism regulated by the proteins PINK1 and Parkin <sup>69,829</sup>. Whether these mechanisms are involved in the processing of mtRNA molecules remains to be established.

Mitochondrial RNA is a recognized trigger of TLR8, which similarly to bacterial RNA, stimulates peripheral blood mononuclear cells <sup>324</sup>. As the most metabolically active cells express more mtRNA, they are more likely to contribute to mtRNA antigenic load <sup>12</sup>. Our study demonstrates that mtRNA is also recognized by antibodies, suggesting that Fc receptors may be implicated in the internalization of mtRNA-IgG complexes by endosomes, thereby favoring interactions with TLR8. Mitochondria express various RNA species, the main one being ribosomal 16S RNA molecules <sup>12</sup>. However, the respective antigenicity of each mtRNA species was not assessed in the present study. Moreover, the presence of certain nuclear messenger RNA has been described within mitochondria <sup>12</sup>, which could also account for the antigenicity potential of the mitochondria. Considering the evidence for mitochondrial release in different pathogeneses, our demonstration of the presence of antibodies directed against mitochondrial RNA further confirms the role of mitochondria as a source of autoantigens in autoimmunity.

We observed associations between the three sets of mitochondrial antibodies (AwMA, AmtDNA and AmtRNA), pointing to their common source. Moreover, both AmtDNA-IgG and AmtRNA-IgG were associated with positivity for anti-dsDNA antibodies, suggesting close relationships between auto-antibodies targeting distinct nucleic acids.

While the IgG targeting mtRNA were significantly elevated in SLE patients, the IgG recognizing mtDNA and whole mitochondria were not increased in these patients. These observations contrast with our previous findings, which involved a different cohort of patients and showed that AmtDNA and AwMA were significantly increased in SLE Becker, 2019 #912}. The patients included in our previous work were recruited by the University of

Toronto Lupus Clinic. The patients recruited in the present study (SARD-BDB) are characterized by a shorter median duration of the disease (10 versus 6 years) that may account for reduced organ damage as indicated by the SDI score (median: Toronto = 1; SARD-BDB = 0) and the frequency of patients with lupus nephritis (Toronto: 38.5 %; SARD-BDB: 16.3 %). These differences may reflect the course of the disease with earlier titers of autoantibodies clearing detrimental circulating autoantigens (*i.e.*, in the SARD-BDB cohort) until other pathophysiological processes such as epitope spread occur, eliciting immune complex-mediated organ damage. Another interesting aspect is the discrepancy between the representation of the various ethnicities included in both cohorts. The SARD-BDB is almost exclusively composed of Caucasians (Caucasian: 97.7 %, Black: 1.2 %, Other ethnicities: 1.2 %), whereas the Toronto cohort includes a more diverse ethnic panel (Caucasian: 57 %, Black: 18 %, Asian: 21 %, Other: 5 %). Such differences between two groups of patients may also impact results such as the incidence, prevalence and mortality rates <sup>501,830-832</sup>. Together, these differences may reflect upon the protective effects of AmtRNA-IgG reported in the present study. Moreover, these elements suggest that the spectrum of anti-mitochondrial antibodies may shift during the course of the disease.

The heterogeneity of the disease duration for the SLE patients included in the SARD-BDB allows the optimization of cut-offs by Youden's method that discriminate positive from negative samples. However, calculation of a universal cut-off requires detection of AmtRNA in newly-diagnosed SLE patients. Additionally, associations between AmtRNA and clinical features of the disease should be interpreted with caution, as clinical outcomes identified might have occurred before or at the same time than the blood draw. Verification of the temporal relationship between the production of AmtRNA and clinical outcomes would require a study of the variation in anti-mitochondrial antibodies titers over time and their levels at the onset of a clinical outcome in a large prospective inception cohort.

Systemic lupus erythematosus is a highly complex disease, many aspects of which still elude researchers <sup>833</sup>. To date, only a limited number of biomarkers are available <sup>660,747</sup>. There is an intense effort to discover new biomarkers that would allow specific discrimination of SLE patients from both healthy individuals and those with diseases that have clinical features close to those of SLE <sup>834</sup>. From this perspective, we present AmtRNA-IgG as antibodies present in

SLE and APS, two diseases that are often associated with each other. Interestingly, AmtRNA-IgG appeared to be associated with less lupus nephritis and plaque formation in the carotid. Together, these elements indicate that AmtRNA may have prognostic value and help to identify patients with specific clinical profiles. Moreover, the different associations of AmtDNA and AmtRNA with lupus nephritis (AmtDNA are positively associated with nephritis, while AmtRNA display a negative association) may help predict SLE patients at risk of kidney damage.

Our study highlights that expression of a broad repertoire of anti-mitochondrial antibody subtypes (AMA; AMA-M1, AMA-M5, AwMA, AmtDNA, AmtRNA) is a major feature of SLE, with specific targets being associated with different clinical features. Future studies dedicated to the characterization of the mitochondrial autoantigens recognized in SLE and their outcome on disease progression may provide useful information that will ultimately help to improve diagnosis, prognosis, and stratification of SLE patients.



## **2.7 Acknowledgements:**

Support for this work was provided by an operating grant from the Arthritis Society (# 225638) (to PRF), by a Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Foundation grant (EB), and a CIHR operating grant (MOP-97916) (to JR). The authors have no competing interests. EB is recipient of a new investigator award from the CIHR and is a Canadian National Transplant Research Program (CNTRP) researcher. PRF is recipient of a tier 1 Canada Research Chair on Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases. YB is recipient of a fellowship from the Arthritis Society and an award from the *fondation du CHU de Québec*. GM is a recipient of awards from the Canadian Blood Services. The authors acknowledge the technical assistance of Rebecca Subang in generating sera from mice with induced SLE. The views expressed herein do not necessarily represent the view of the federal government.

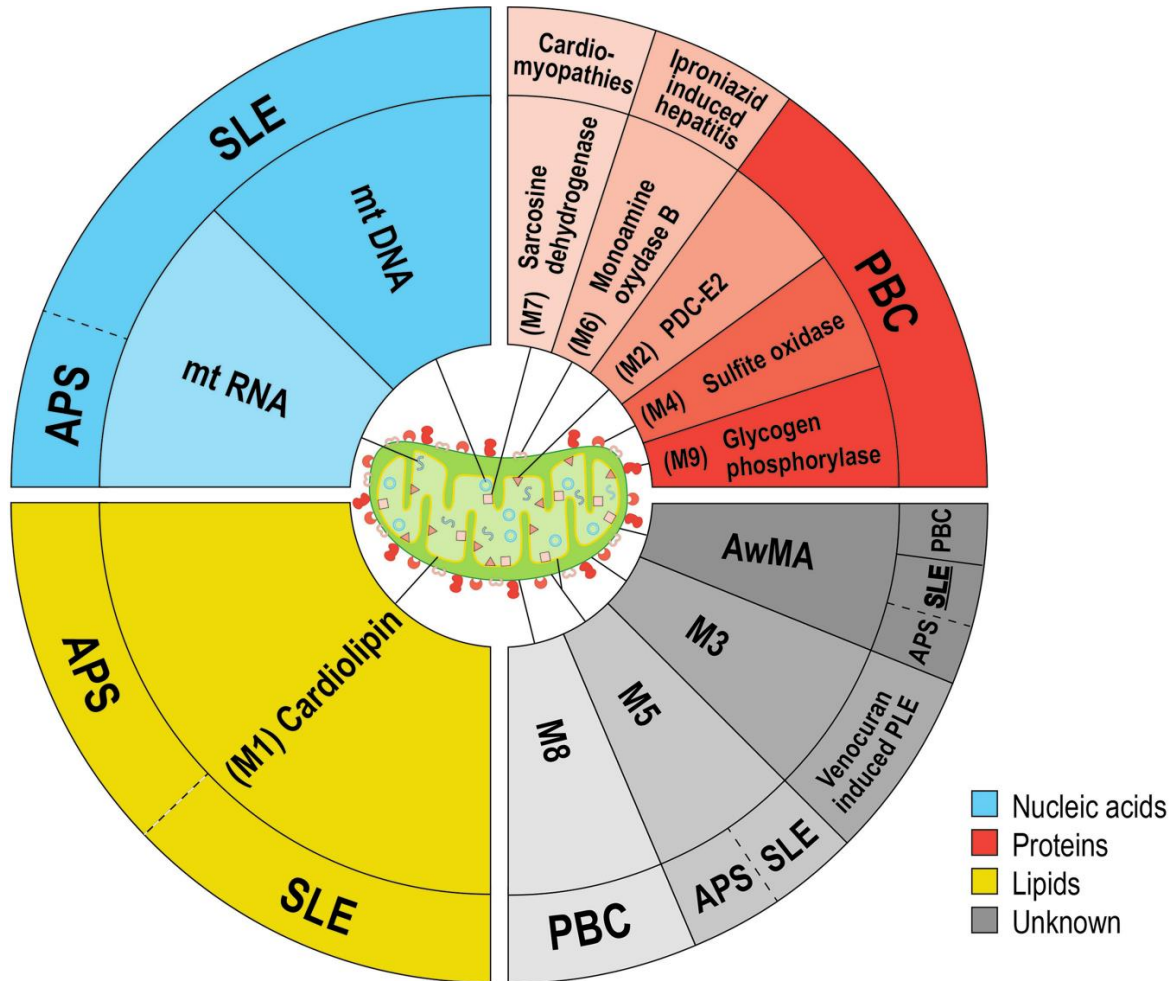
## **2.8 Author contribution:**

Experiments were conceived and designed by YB, IA, PF, and EB. Contributed critical reagent, resources and expertise: JR. Experiments were performed by YB, GM, IA, and HBF. Data were processed and analyzed by YB, GM, IA, RCL, ASJ, and supervised by RCL, ASJ, PF and EB. The manuscript was written by YB, GM, PF and EB, and critically reviewed by all authors.

## **2.9 Conflict of Interest:**

The authors have no conflict of interest to declare.

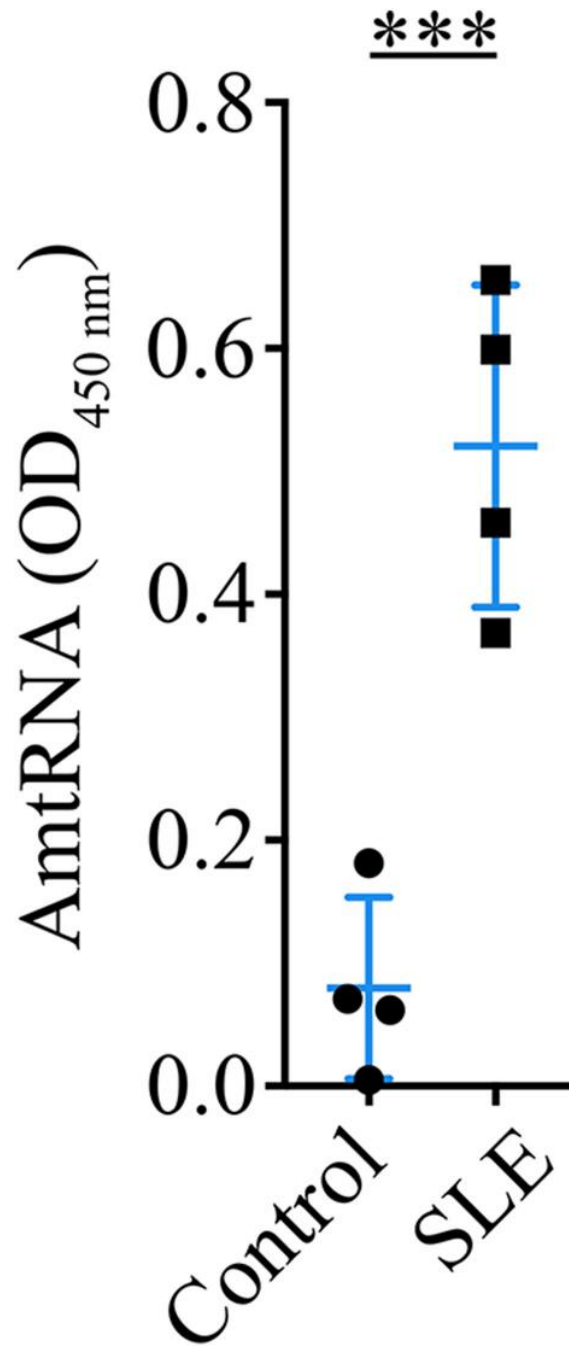
## 2.10 Figures :



**2.10. Figure 1: Anti-mitochondrial antibodies and related diseases.**

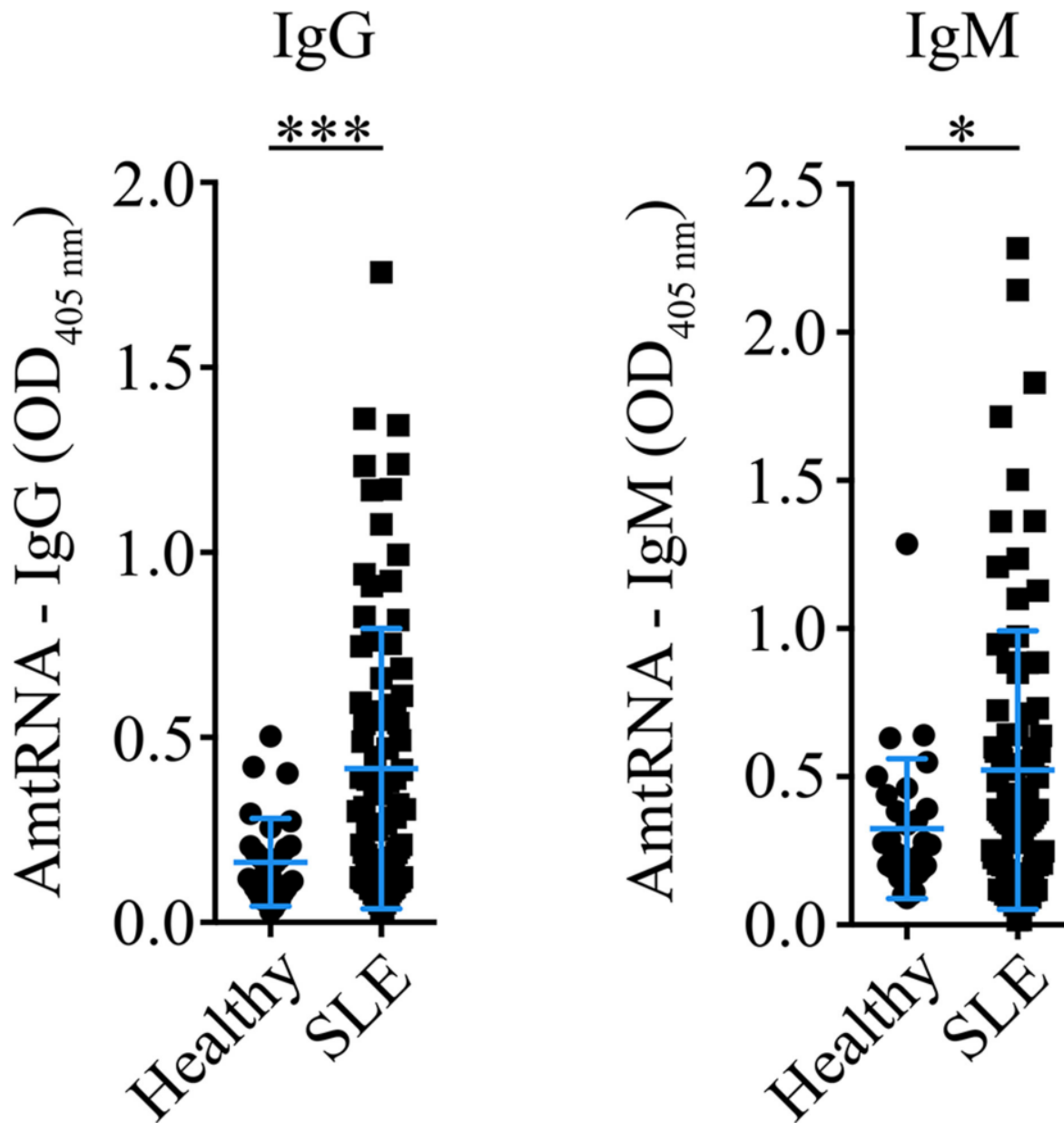
Several types of anti-mitochondrial antibodies (AMA) have been reported in various diseases. The epitopes targeted by AMA cover all families of biomolecules: lipids (yellow background), proteins (red hues) or nucleic acids (blue hues). However, the precise nature of some mitochondrial epitopes targeted by AMA are still unclear. (grey hues). To date, the sole mitochondrion-specific phospholipid antigen reported in both APS and SLE is cardiolipin (M1). M1 is located within the mitochondrial inner membrane (MIM) in healthy organelles, but may be displayed on the outer membrane (MOM) upon damages to the organelle. Distinct AMA against an unknown antigen (M5) were also reported in both APS and SLE. Four antigens are associated with PBC; PDC-E2 (M2, MIM), sulfite oxidase (M4, MOM), M8 (MOM) and glycogen phosphorylase (M9, MOM). These mitochondrial

antigens are peptidic, with the exception of M8, whose nature remains uncharacterized. Sarcosine dehydrogenase (M7) is another immunogenic protein that is targeted by autoantibodies in patients suffering from cardiac conditions (i.e., hypertrophic or idiopathic cardiomyopathies or acute myocarditis). Two types of AMA were reported as iatrogenically induced in human patients: AMA-M3 (unknown, MOM) and AMA-M6 (monoamine oxidase B, MOM). In addition to these autoantibodies, we have reported the presence of autoantibodies targeting whole mitochondria (AwMA) in patients with SLE, APS and PBC (with higher titers found in SLE donors). Moreover, antibodies specific to the mtDNA were specific to SLE patients. In the present study, we describe autoantibodies against mtRNA in patients with SLE and APS.



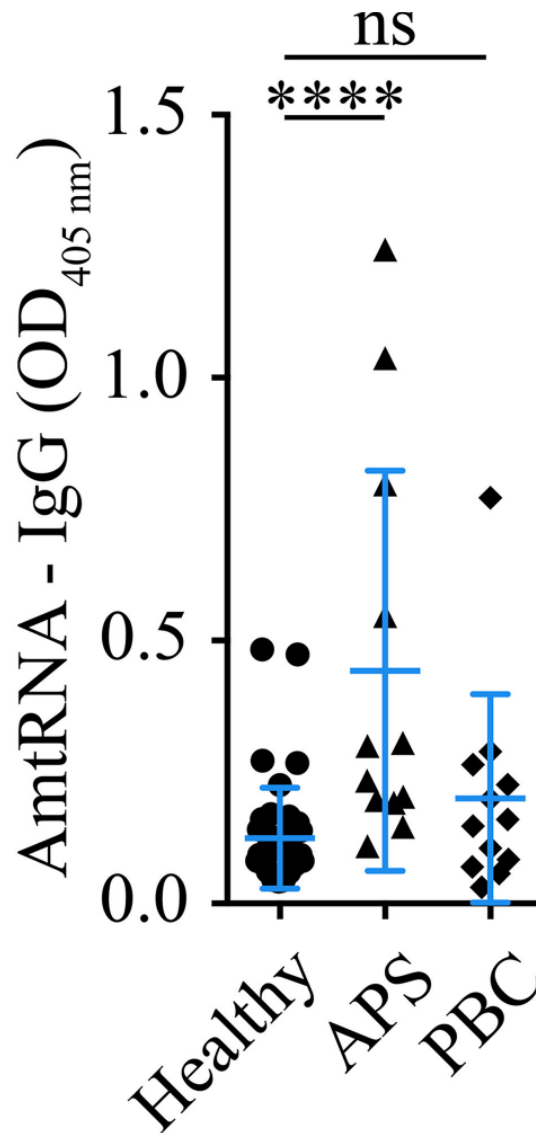
**2.10. Figure 2: Circulating anti-mitochondrial RNA autoantibodies are detectable in sera from mice with induced SLE.**

Sera (1:50) from mice with induced SLE were incubated on ELISA plates coated with 200 ng murine mtRNA per well. Mice with induced SLE displayed a significant increase in serum antibodies against mtRNA in comparison to control mice. N = 4 mice per group. Data show the mean  $\pm$  SD. Student's t-test. \*\*\*:  $p < 0.001$ .



**2.10. Figure 3: Antibodies targeting mitochondrial RNA (AmtRNA) are elevated in SLE patients.**

Two different isotypes of antibodies against mtRNA, IgG (left panel) and IgM (right panel), were assessed in SLE patients and healthy individuals included in the SARD-BDB. Both AmtRNA IgG and IgM were significantly increased in SLE patients, compared to healthy individuals ( $p = 0.0002$  and  $p = 0.0493$ , respectively). SLE:  $N = 86$ ; Healthy controls:  $N = 30$ . Data show the mean  $\pm$  SD. Student's t-test. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .



**2.10. Figure 4: Detection of AmtRNA in two different diseases with anti-mitochondrial antibodies.**

Antiphospholipid syndrome (APS) and primary biliary cirrhosis (PBS) are two diseases with antibodies targeting mitochondrial antigens; cardiolipin (M1) in APS and PDC-E2 (M2), sulfite oxidase (M4), M8 (whose target is still unclear) and glycogen phosphorylase (M9) in PBC. Sera (1:150) from patients with APS presented a significant increase in circulating autoantibodies against mtRNA, compared to healthy individuals, whereas PBC patients had levels similar to the controls. Healthy: N=43, APS: N=12, PBC N=12. Data are Mean  $\pm$  SD. Kruskal-Wallis test with multiple comparisons to controls/healthy donors; Dunn's correction. \*\*\*\*:  $p < 0.001$ .

## 2.11 Tables:

2.11.Table 1: Sociodemographic characteristics in the SARD-BDB.

| Variable              | n  | Mean $\pm$ SD<br>[or n (%)] |
|-----------------------|----|-----------------------------|
| <b>Female</b>         | 86 | 72 (83.7)                   |
| <b>Age (years)</b>    | 86 | 49.41 $\pm$ 14.60           |
| <b>Marital status</b> |    |                             |
| Single                | 82 | 14 (17.1)                   |
| Married               |    | 55 (67.1)                   |
| <b>Tobacco intake</b> |    |                             |
| Non-smokers           | 83 | 48 (57.8)                   |
| Smokers               |    | 14 (16.9)                   |
| Ex-smokers            |    | 21 (25.3)                   |

2.11. Table 2: Clinical characteristics in the SARD-BDB.

| <b>Variable</b>   | <b>n</b> | <b>Mean <math>\pm</math> SD<br/>[or n (%)]</b> |
|---|----------|--|
| <b>Disease duration</b>                                 | 86       | 10.43 $\pm$ 10.69                              |
| <b>Body mass index</b>                                  | 86       | 25.55 $\pm$ 4.97                               |
| <b>Post-menopausal</b>                                  | 64       | 38 (59.4)                                      |
| <b>Hypertension</b>                                     | 86       | 11 (12.8)                                      |
| <b>Diabetes</b>   | 84       | 2 (2.4)  |
| <b>Malar rash</b>                                       | 85       | 19 (22.4)                                      |
| <b>Discoid rash</b>                                     | 85       | 12 (14.1)                                      |
| <b>Photosensitivity</b>                                 | 85       | 36 (42.4)                                      |
| <b>Oral ulcers</b>                                      | 85       | 26 (30.6)                                      |
| <b>Arthritis (<math>\geq</math>2 peripheral joints)</b> | 85       | 69 (81.2)                                      |
| <b>Serositis</b>  | 85       | 22 (25.9)                                      |
| <b>Renal disorders</b>                                  | 85       | 22 (25.9)                                      |
| <b>Neurological disorders</b>                           | 85       | 4 (4.7)  |
| <b>Hematological disorders</b>                          | 85       | 68 (80.0)                                      |
| <b>Immunological disorders</b>                          | 85       | 62 (72.9)                                      |
| <b>Anti-nuclear antibodies (ANA)</b>                    | 85       | 85 (100.0)                                     |



2.11. Table 3: Outcome variables of the study

| Variable  | n  | Mean $\pm$ SD<br>[or n (%)] |
|---|----|-----------------------------|
| <b>SLEDAI-2K (Score)</b>  |    | 3.24 $\pm$ 3.96             |
| SLEDAI-2K $\geq$ 4  | 86 | 36 (41.9)                   |
| <b>SDI (score)</b>  |    | 3.24 $\pm$ 3.96             |
| SDI $\geq$ 0  | 86 | 36 (41.9)                   |
| <b>Thrombosis</b>   |    | 10 (11.6)                   |
| Arterial events   | 86 | 3 (3.5)                     |
| Venous events   |    | 4 (4.7)                     |
| <b>Presence of plaque in the carotid</b>                            | 63 | 24 (38.1)                   |
| <b>Carotid intima-media thickness<br/>(CIMT, <math>\mu</math>M)</b> | 34 | 0.63 $\pm$ 0.13             |
| <b>Nephritis</b>  | 61 | 14 (23.0)                   |

SDI: lupus severity disease index; SLEDAI-2K: systemic lupus erythematosus disease activity index - 2000.

**2.11. Table 4: Information about medications taken by SLE patients (n=86) in the SARD-BDB**

| <b>Variable</b>                        | <b>n (%)</b> |
|--|--------------|
| <b>Anticoagulation / antiplatelets</b> | 13 (15.1)    |
| <b>Antimalarial</b>                    | 70 (81.4)    |
| <b>Prednisone</b>                      | 18 (20.9)    |
| <b>Lipid lowering</b>                  | 14 (16.3)    |
| <b>Diabetes medication</b>             | 2 (2.3)      |
| <b><u>Lupus treatments</u></b>         |              |
| <b>Hydroxychloroquine</b>              | 65 (76)      |
| <b>Chloroquine</b>                     | 6 (7)        |
| <b>Azathioprine</b>                    | 15 (17)      |
| <b>Methotrexate</b>                    | 15 (17)      |
| <b>Leflunomide</b>                     | 1 (1)        |
| <b>Mycophenolate Mofetil</b>           | 11 (13)      |
| <b>Mycophenolic Acid</b>               | 1 (1)        |
| <b>Cyclophosphamide (PO or IV)</b>     | 3 (4)        |

IV: intravenous injection; PO: *per os*

**2.11. Table 5: Laboratory measurements.**

| <b>Variable</b>                                | <b>n</b> | <b>Mean ± SD<br/>[or n (%)]</b> |
|--|----------|---------------------------------|
| <b>Platelets (.10<sup>9</sup> / L)</b>         | 86       | 221.63 ± 72.68                  |
| <b>White blood cells (.10<sup>9</sup> / L)</b> | 86       | 5.80 ± 2.06                     |
| <b>Creatinin clearance</b>                     | 26       | 91.88 ± 21.31                   |
| <b>AmtDNA (OD 405 nm)</b>                      |          |                                 |
| IgG  | 86       | 0.49 ± 0.53                     |
| IgM  | 86       | 0.45 ± 0.38                     |
| <b>AwMA (OD 405 nm)</b>                        |          |                                 |
| IgG  | 86       | 0.34 ± 0.37                     |
| IgM  | 86       | 0.56 ± 0.58                     |
| <b>AmtRNA (OD 405 nm)</b>                      |          |                                 |
| IgG  | 86       | 0.42 ± 0.38                     |
| IgM  | 86       | 0.52 ± 0.47                     |
| <b>Lupus anticoagulant (LA)</b>                | 61       | 8.69 ± 22.76                    |
| <b>Anticardiolipin antibodies (aCL)</b>        |          |                                 |
| IgG  | 79       | 11.33 ± 12.39                   |
| IgM  | 79       | 6.92 ± 13.92                    |
| <b>Anti-β<sub>2</sub>GPI antibodies</b>        |          |                                 |
| IgG  | 79       | 2.78 ± 6.59                     |
| IgM  | 79       | 3.36 ± 3.89                     |
| <b>Anti-dsDNA antibodies</b>                   | 22       | 31.01 ± 80.40                   |

β<sub>2</sub>GPI: β-2-glycoprotein I; AmtDNA: anti-mitochondrial DNA antibodies; AmtRNA: anti-mitochondrial RNA antibodies; AwMA: anti-whole mitochondria antibodies. OD: optical density

**2.11. Table 6. Correlations of anti-mtRNA levels, with titers of other auto-antibodies in SLE patients**

|                                |     | AmtRNA                       |                              |
|--------------------------------|-----|------------------------------|------------------------------|
|                                |     | IgG                          | IgM                          |
| AmtDNA                         | IgG | $r_s = 0.54$<br>$p < 0.0001$ | $r_s = 0.19$<br>$p = 0.08$   |
|                                | IgM | $r_s = -0.01$<br>$p = 0.92$  | $r_s = 0.83$<br>$p < 0.0001$ |
| AwMA                           | IgG | $r_s = 0.24$<br>$p = 0.03$   | $r_s = 0.14$<br>$p = 0.21$   |
|                                | IgM | $r_s = -0.03$<br>$p = 0.78$  | $r_s = 0.71$<br>$p < 0.0001$ |
| AmtRNA                         | IgG | /                            | $r_s = 0.16$<br>$p = 0.15$   |
|                                | IgM | $r_s = 0.16$<br>$p = 0.15$   | /                            |
| Anti- $\beta_2$ GPI antibodies | IgG | $r_s = 0.22$<br>$p = 0.05$   | $r_s = 0.18$<br>$p = 0.11$   |
|                                | IgM | $r_s = 0.22$<br>$p = 0.05$   | $r_s = 0.48$<br>$p < 0.0001$ |
| Anti-dsDNA antibodies          |     | $r_s = 0.13$<br>$p = 0.56$   | $r_s = 0.11$<br>$p = 0.62$   |

Values are presented as Spearman correlation coefficient ( $r_s$ ) and p-value.

$\beta_2$ GPI:  $\beta$ -2-glycoprotein I; aCL: anti-cardiolipin antibodies; AwMA: anti-whole mitochondria antibodies. AmtDNA: anti-mitochondrial DNA antibodies; Anti-dsDNA: antibodies against double-stranded DNA.

**2.11. Table 7. Association of AmtRNA with clinically relevant SLE autoantibodies**

|                       |     | AmtRNA   |  |
|-----------------------|-----|--|--|
|                       |     | IgG  | IgM  |
| aCL                   | IgG | (-) 0.26 ± 0.43<br>(+) 0.42 ± 0.91<br>p = 0.14                           | (-) <b>0.34 ± 0.40</b><br>(+) <b>0.56 ± 0.90</b><br><b>p = 0.01</b>  |
|                       | IgM | (-) 0.26 ± 0.43<br>(+) 0.53 ± 0.95<br>p = 0.19                           | (-) <b>0.33 ± 0.38</b><br>(+) <b>0.86 ± 1.43</b><br><b>p = 0.002</b> |
| Lupus anticoagulant   |     | (-) 0.25 ± 0.45<br>(+) 0.40 ± 0.67<br>p = 0.20                           | (-) 0.35 ± 0.40<br>(+) 0.57 ± 0.98<br>p = 0.06                       |
| Anti-dsDNA antibodies |     | (-) <b>0.19 ± 0.28</b><br>(+) <b>0.70 ± 0.71</b><br><b>p &lt; 0.0001</b> | (-) 0.34 ± 0.41<br>(+) 0.55 ± 0.27<br>p = 0.10                       |

Values presented as median ± IQR and Wilcoxon test p-value for patient positives (+) or negatives (-) for each variable.

aCL: anti-cardiolipin antibodies; AmtRNA: anti-mitochondrial RNA antibodies; Anti-dsDNA: antibodies against double-stranded DNA.

**2.11. Table 8. Association of AmtRNA with clinical manifestations in SLE**

|  | AmtRNA   |                                      |  |                |
|--|--|--------------------------------------|--|----------------|
|  | IgG  |                                      | IgM  |                |
|  | OR (CI)  | p                                    | OR (CI)                                    | p              |
| <b>Thrombotic events</b>                   | 1.28(0.24;6.77)<br>[1.15(0.17;7.87)]                           | 0.77<br>[0.88]                       | 0.93(0.22;3.93)<br>[1.00(0.18;5.61)]       | 0.92<br>[1.00] |
| <b>Presence of plaque</b>                  | <b>0.14 (0.02 – 0.91)</b><br>[0.16 (0.01 – 1.81)]              | <b>0.04</b><br>[0.14]                | 0.83 (0.25 – 2.76)<br>[0.82 (0.23 – 2.91)] | 0.76<br>[0.76] |
| <b>SLEDAI-2K <math>\geq</math> 4*</b>      | 2.30 (0.73 – 7.26)<br>[3.04 (0.78 – 11.77)]                    | 0.16<br>[0.11]                       | 0.86 (0.34 – 2.17)<br>[0.68 (0.25 – 1.88)] | 0.75<br>[0.46] |
| <b>SDI <math>\geq</math> 0</b>             | 0.95 (0.28 – 3.21)<br>[0.85 (0.15 – 4.92)]                     | 0.94<br>[0.85]                       | 0.50 (0.16 – 1.58)<br>[0.46 (0.11 – 1.86)] | 0.24<br>[0.28] |
| <b>Positivity to anti-dsDNA antibodies</b> | <b>34.97 (6.26 – 195.55)</b><br><b>[70.60 (6.31 – 789.47)]</b> | <b>&lt;0.0001</b><br><b>[0.0005]</b> | 1.92 (0.67 – 5.50)<br>[2.01 (0.50 – 8.11)] | 0.23<br>[0.33] |
| <b>Lupus nephritis</b>                     | 0.17 (0.02 – 1.71)<br><b>[0.02 (0.00 – 0.68)]</b>              | 0.13<br><b>[0.03]</b>                | 0.43 (0.08 – 2.30)<br>[0.25 (0.04 – 1.48)] | 0.33<br>[0.12] |

Values presented as odds ratios (95 % Wald Confidence Interval) and p-value from logistic regressions. In each instance, bivariate results are followed by multivariate analysis (between square brackets). Values in bold have a p-value  $\leq$  0.05.

AmtRNA: anti-mitochondrial RNA antibodies; CI: 95 % Wald Confidence Interval; OR: odds ratio; SDI: lupus severity disease index; SLEDAI-2K: SLE disease activity index - 2000.

**2.11. Table 9. Performance of cut-off values for AmtRNA, AwMA and AmtDNA (OD 405<sub>nm</sub>)**

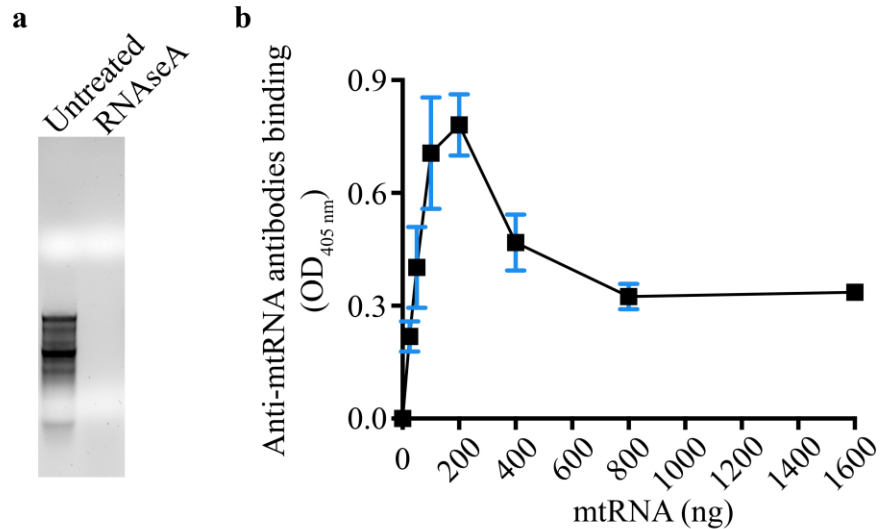
|        |     | Cutpoint<br>(95% BCI)      | Sensitivity<br>(95% ECI)   | Specificity<br>(95% ECI)   | PPV<br>(95% ECI)           | NPV<br>(95% ECI)           | AUC<br>(95% ECI)           |
|--------|-----|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| AmtRNA | IgG | <b>0.30</b><br>(0.11-0.54) | <b>0.49</b><br>(0.38-0.60) | <b>0.90</b><br>(0.73-0.98) | <b>0.93</b><br>(0.82-0.99) | <b>0.38</b><br>(0.27-0.50) | <b>0.72</b><br>(0.62-0.82) |
|        | IgM | <b>0.52</b><br>(0.24-0.64) | <b>0.38</b><br>(0.28-0.49) | <b>0.87</b><br>(0.69-0.96) | <b>0.89</b><br>(0.75-0.97) | <b>0.33</b><br>(0.23-0.44) | <b>0.62</b><br>(0.51-0.72) |
| AwMA   | IgG | 0.30<br>(0.12-0.44)        | 0.36<br>(0.26-0.47)        | 0.80<br>(0.61-0.92)        | 0.84<br>(0.68-0.94)        | 0.30<br>(0.21-0.42)        | 0.57<br>(0.45-0.69)        |
|        | IgM | 0.68<br>(0.19-1.37)        | 0.24<br>(0.16-0.35)        | 0.87<br>(0.69-0.96)        | 0.84<br>(0.64-0.96)        | 0.29<br>(0.20-0.39)        | 0.48<br>(0.37-0.60)        |
| AmtDNA | IgG | 0.44<br>(0.22-1.25)        | 0.35<br>(0.25-0.46)        | 0.77<br>(0.58-0.90)        | 0.81<br>(0.65-0.92)        | 0.29<br>(0.19-0.40)        | 0.51<br>(0.40-0.62)        |
|        | IgM | <b>0.36</b><br>(0.24-0.57) | <b>0.51</b><br>(0.40-0.62) | <b>0.83</b><br>(0.65-0.94) | <b>0.90</b><br>(0.78-0.97) | <b>0.37</b><br>(0.26-0.50) | <b>0.65</b><br>(0.55-0.75) |

Values in bold have an AUC significantly different than 50 %.

AmtDNA: anti-mitochondrial DNA antibodies. AmtRNA: anti-mitochondrial RNA antibodies. AUC: area under the curve. AwMA: anti-whole mitochondria antibodies. BCI: Bootstrap Confidence Interval. ECI: Exact Confidence Interval. NPV: Negative Predictive Value. OD: optical density. PPV: Positive Predictive Value.

## 2.12 Supplementary information:

### 2.12.1 Supplementary figure:



#### 2.12.1. Supplementary Figure 1. Saturation of ELISA microplates by mitochondrial RNA.

(a) Mitochondrial RNA (mtRNA) was isolated from C57BL/6J mice. For quality control, mtRNA treated or not with RNaseA were resolved on an 1.5% agarose gel. Full-length image representative of 3 different experiments. (b) Increasing concentrations of mtRNA (0-1600 ng,  $n = 3$ ) were used to cover protamine sulfate pre-treated ELISA microplates. After blocking of non-specific binding and incubation with pooled sera from 6 SLE patients, plates were incubated with secondary antibodies specific to  $\gamma$  chains of human IgG coupled with alkaline phosphatase. Signal was revealed using para-Nitrophenolphosphate (p-NPP) and read on a microplate reader. The maximum signal was obtained using 200 ng mtRNA. Data are Mean  $\pm$  SD.



# Chapitre 3 : Étude pilote – détection des anticorps antimitochondriaux dans le cadre du syndrome des antiphospholipides.

## 3.1 Résumé

**Contexte :** Nous avons précédemment rapporté l'expression de différents AMA chez des patients atteints de SLE. L'APS est une maladie auto-immune qui peut être isolée ou associée à d'autres maladies, notamment le SLE.

**Objectifs :** Détection des niveaux en AMA chez des patients atteints d'APS et leur association avec les paramètres cliniques de la maladie.

**Patients/Méthodes :** Les AMA ont été mesurés par ELISA direct puis associés aux caractéristiques de la maladie.

**Résultats :** Les AmtDNA-IgM et AmtRNA-IgG et -IgM sont augmentés chez les patients atteints d'APS, (respectivement  $p=0.009$ ,  $p=0.0005$  et  $p=0.01$ ) et les AmtDNA-IgM associés avec une réduction des thromboses artérielles [OR=0.86(0.74;1.00),  $p=0.047$ ]

**Conclusion :** Cette étude pilote indique que les AMA font aussi parti du répertoire des autoanticorps dans l'APS et semblent être associés avec les manifestations cliniques de la maladie. La reproduction de ces résultats dans de plus grandes cohortes longitudinales permettra de confirmer ces résultats préliminaires.

### 3.2 Abstract

**Background:** Mitochondria are intracellular organelles of bacterial origin capable of stimulating the immune system when released into the extracellular milieu. We previously reported the expression of anti-mitochondrial antibodies (AMA) targeting whole organelles (AwMA), mitochondrial DNA (AmtDNA) or mitochondrial RNA (AmtRNA) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). Antiphospholipid syndrome (APS) is an autoimmune condition that may be independent of, or associated with, other diseases, usually SLE.

**Objectives:** Detection of AMA in patients with APS and association with clinical features of APS.

**Patients/Methods:** AwMA, AmtDNA and AmtRNA-IgG and -IgM were detected in a pilot study [healthy controls (n=30) and APS patients (n=24)] by direct ELISA and their levels were associated with demographic and disease characteristics.

**Results:** AmtDNA-IgM and AmtRNA were elevated in APS, compared to healthy controls (respectively,  $p = 0.009$ ,  $p = 0.0005$  and  $p = 0.01$ ). AwMA-IgG were increased in patients positive for lupus anticoagulant (median  $\pm$  IQR:  $0.36 \pm 0.31$  vs.  $0.14 \pm 0.08$ ,  $p = 0.008$ ) and optical density values for AwMA-IgM were correlated with titers of IgM against cardiolipin ( $r_s = 0.51$ ,  $p = 0.01$ ). An increment of 0.1 unit of AmtDNA-IgM levels were associated with reduced prior reporting of arterial events [OR=0.86 (0.74; 1.00),  $p = 0.047$ ].

**Conclusion:** Our pilot study suggests that AMA are represented within the autoantibody repertoire in APS and may display different associations with the clinical manifestations of the disease. Further studies should be dedicated to reproducing these preliminary results by following AMA levels through time in larger prospective cohorts.

# **Anti-Mitochondrial antibodies in the Antiphospholipid Syndrome (AMAPS) pilot study.**

Yann LC Becker<sup>\*</sup>, Anne-Sophie Julien<sup>†</sup>, Alexandra Godbout<sup>\*,‡</sup>, Éric Boilard<sup>\*,‡</sup>, Paul R. Fortin<sup>‡,§</sup>.

<sup>\*</sup> Centre de Recherche ARThrite - Arthrite, Recherche et Traitements, Université Laval, Québec, Qc, Canada.

<sup>†</sup> Département de mathématiques et statistique, Université Laval, Québec, Qc, Canada.

<sup>‡</sup> Axe maladies infectieuses et inflammatoires, Centre de recherche du CHU de Québec – Université Laval, Québec, Qc, Canada.

<sup>§</sup> Division de Rhumatologie, Département de Médecine, CHU de Québec – Université Laval, Québec, Qc, Canada.

**Corresponding authors:** Paul R. Fortin, MD, MPH, FRCP and Eric Boilard, PhD

**Keywords:** Antiphospholipid Syndrome; Autoantibodies; Mitochondria; RNA, mitochondrial; DNA, mitochondrial

### 3.3 Introduction

Mitochondria are intracellular organelles implicated in many biological pathways and pathophysiological mechanisms<sup>835</sup>. While mitochondria are cytoplasmic organelles under normal circumstances, they may also be extruded into the extracellular milieu upon the activation of many cell lineages or following tissue damage<sup>313,749</sup>. Extracellular mitochondria with preserved morphology and functionality or mitochondrial components [*e.g.*, mitochondrial DNA (mtDNA)] have been detected in platelet concentrates used for transfusion<sup>303,304</sup> as well as in various conditions<sup>2,298,749</sup>.

Mitochondria are considered as descending from the endosymbiosis between an  $\alpha$ -proteobacteria and a primitive eukaryotic cell<sup>749</sup>, conferring the organelle several molecular motifs that are specific to bacteria<sup>749</sup>. Extracellular mitochondria or mitochondrial components have been described as eliciting a proinflammatory response upon the recognition of their bacterial features (*i.e.*, mitochondrial damage-associated molecular patterns, mtDAMPs)<sup>749</sup> by the innate immune system. A humoral response, through the production of anti-mitochondrial antibodies (AMA), was also reported in various diseases<sup>399</sup>, some of which are routinely assessed by clinical laboratories<sup>2,3</sup>.

Antiphospholipid syndrome (APS) is an autoimmune condition that may be independent of (*i.e.*, primary APS), or associated with other diseases (*i.e.*, secondary APS), usually SLE. The disease is characterized by the persistent presence of autoantibodies targeting phospholipids or protein–phospholipid complexes (aPL), recurrent thrombosis and miscarriages. Various phospholipids are recognized by aPL, and can be detected by clinical assays such as the lupus anticoagulant (LA), anti-beta-2-glycoprotein I (anti- $\beta_2$ GPI) and anti-cardiolipin (aCL) antibodies<sup>836</sup>. Anti-cardiolipin antibodies (also known as AMA-M1) and AMA-M5<sup>399</sup> are two AMA that have been detected in the APS autoantibody repertoire. Of note, AMA-M1 was originally described in patients with syphilis. AMA-M1 developed subsequent to an infection, exclusively targeted cardiolipin (CL) and were not reported to be associated with thrombosis. However, their counterpart observed in APS (*i.e.*, primarily referred to as aCL) appears to require recognition of other co-factors such as  $\beta_2$ GPI-bound CL to be pathogenic, with both aCL-IgG and -IgM being risk factors for thrombosis. While the precise nature of

AMA-M5 is still unknown, it is distinct from aCL and anti- $\beta_2$ GPI antibodies <sup>399</sup> and is described as detected in the absence of other serological markers.

In SLE, levels of antibodies to mtRNA (AmtRNA) correlate with those of anti- $\beta_2$ -GPI-IgG and their presence is associated with positivity to both aCL-IgG and -IgM <sup>3</sup>. These associations between AMA and aPL suggest that circulating AMA may also be found in sera from APS patients. The aim of this pilot study was to determine the presence of AMA in APS, and to examine whether their levels correlated with those of the three most commonly detected aPL (aCL, anti- $\beta_2$ -GPI-IgG and LA) and their associations with clinical features of the disease.

### 3.4 Material and methods

#### *3.4.1. Population:*

A convenience sample of 24 patients with APS were included in this study and compared to 30 healthy controls.

#### *3.4.2. Detection of anti-mitochondrial antibodies by direct ELISA:*

Antibodies against whole mitochondria, mitochondrial DNA or -RNA (respectively AwMA, AmtDNA and AmtRNA) were detected by direct ELISA following previously published procedures<sup>2,3</sup>.

#### *3.4.3. The Systemic Autoimmune Rheumatic Disease biobank and database repository (SARD-BDB), ethics and study approval:*

Approbation from the Research Ethics Board of the *CHU de Québec–Université Laval* was obtained for the present study (2014-1243/B13-06-1243), every subject provided written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki and every blood sample was associated with their anonymized clinical data.

Participants were recruited from the SARD-BDB. Inclusion criteria for the thirty healthy volunteers were that they were not on any medication and had no illnesses or infections at the time of the blood draw. APS patients (n=24), met the 2006-revised Sapporo Criteria<sup>411</sup>.

#### *3.4.4. Clinical variables collected in healthy controls and APS patients:*

The following variables were collected at the time of the first visit to the SARD-BDB: sociodemographic variables, clinical variables, disease characteristics, cardiovascular risk factors and thrombophilic risks and current use of medications. Information obtained from analyses performed at our clinical laboratory as part of routine care included detection of IgG and IgM against cardiolipin (using cut-off of 40 UPL) and  $\beta_2$ -GPI (cut off above the 99<sup>th</sup> percentile of controls) by ELISA, and LA assays were performed following international guidelines<sup>817</sup>. AMA and aPL were detected in samples isolated from the same blood puncture for 20(83.33%) patients. The 4 remaining patients had aPL assessed respectively 21, 53, 71, and 171 days prior to the sampling used for AMA detection. Information collected from healthy donors included age, gender and ethnicity.

#### *3.4.5. Statistical analyses:*

Data are mean±standard deviation(SD) or median±interquartile range(IQR), or percentages. Comparisons between groups were performed using the Wilcoxon-Mann Whitney. Associations between continuous variables were measured using Spearman correlation coefficient ( $r_s$ ). Associations with clinical outcomes were identified using univariable logistic regression. Statistical analyses were performed with Prism 7 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) and SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), and Figures were assembled with Photoshop CS6 13.0 (Adobe Systems Inc., Mountain View, CA, USA).

### 3.5 Results

Antibodies against mitochondria (AMA) were detected in a cohort of 30 healthy controls and 24 patients with APS. The sociodemographic, clinical and laboratory characteristics are described in **Table 1**. Seven (29.2%) of the APS patients had no other associated diseases (primary APS, PAPS), while 17(70.8%) had both APS and SLE (secondary APS, SAPS).

Among the six AMA assessed (**Figure 1, Table 2a**), optical density values ( $OD_{405\text{ nm}}$ ) measured for AmtDNA-IgM were significantly higher in APS patients compared to healthy individuals ( $p=0.009$ ). Similarly, both AmtRNA-IgG ( $p=0.0005$ ) and -IgM ( $p=0.01$ ) were higher in APS patients. Interestingly, broad dynamic ranges of  $OD_{405\text{ nm}}$  values for healthy donors were measured for every AMA, indicating that they may be detectable even in the absence of any documented disease. However, while both AmtRNA and AmtDNA-IgM were able to discriminate healthy donors from patients with any type of APS, none of the AMA could efficiently discriminate between patients with PAPS or SAPS (**Table 2a**). These results require cautious interpretation given the small group of patients with PAPS [ $n=7(29.2\%)$ ].

We found that  $OD_{405\text{ nm}}$  for AwMA-IgG are significantly elevated in patients with LA ( $p=0.008$ ) (**Table 2b**). AwMA-IgM levels correlated with those of aCL-IgM ( $p=0.01$ ). These results suggest that AMA are not only detectable in APS, but are also associated with the presence of aPL in patient blood. Of note, no associations were found between AMA levels and disease duration, presence of cardiovascular risk factors or current medications (data not shown).

We assessed the associations between these results and the clinical manifestations of the disease (**Table 2c**). Of all the combinations assessed, only AmtDNA-IgM levels were significantly associated with lower odds of reporting an arterial thrombosis [ $OR(95\%CI)=0.86(0.74;1.00)$  for a 0.1 unit increment;  $p=0.047$ ].



### 3.6 Discussion

Production of AMA was previously reported in SLE <sup>2,3</sup>. In these studies, we reported correlations between AMA and aPL as well as associations with a history of nephritis in SLE. Our laboratory previously reported significant increases of IgG against whole mitochondria, mtDNA and mtRNA in APS patients (n=12) from the University of Toronto Lupus Clinic <sup>2,3</sup>. Of note, AMA levels were not associated with the clinical features of APS; prompting the examination of the presence of AMA in another set of APS patients and the assessment of clinical associations. Herein, in a different cohort from Quebec City (i.e., the SARD-BDB), AmtDNA-IgM and AmtRNA-IgG and -IgM are increased in APS patient, compared to healthy individuals.

When exploring associations between AMA and aPL, we found that OD<sub>405 nm</sub> measured for AwMA-IgM correlated with aCL-IgM titers; and AwMA-IgG levels were significantly elevated in APS patients with LA. Correlations between OD<sub>405 nm</sub> for AmtRNA-IgG and titers of anti- $\beta_2$ GPI-IgM also neared significance. In our studies, AwMA were measured by immobilizing intact mitochondria as sources of mtAg, with the possible implication that this preserved integrity may hinder fixation of autoantibodies on antigens located in the mitochondrial inner membrane (MIM), such as cardiolipin <sup>2</sup>. These elements underline that the AMA repertoire comprises antibodies directed against mitochondrial antigens located in both membranes of the mitochondria as well as in the mitochondrial matrix (i.e., mtDNA and mtRNA). In addition to nucleic acids (i.e., mtDNA and mtRNA) and lipids (e.g., cardiolipin), mitochondria also carry an estimated proteome of 1,100–1,900 proteins <sup>10</sup> that could represent other sources of antigens. Thus, extracellular mitochondria and mitochondrial components convey an important cargo of potentially immunogenic biomolecules. Further studies to characterize new mitochondrial antigens targeted by autoantibodies in autoimmune diseases will permit their identification.

Patients were then grouped according to their clinical characteristics and we assessed whether AMA were associated with these characteristics. AmtDNA-IgM were associated with a lower likelihood of reporting a previous arterial thrombosis, and their levels were not influenced by, the duration of the disease, cardiovascular risk factors or medications (*data not shown*).

In this study, we found a wide range of OD<sub>405 nm</sub> values in healthy controls for each of the six AMA studied. While these autoantibodies may be produced during the pathogenesis of APS, it is tempting to postulate that these potentially protective antibodies may be related to naturally occurring mitochondrial antibodies (NOMA). Previous studies reported the presence of AMA with specific antigenic determinants in healthy donors. It was suggested that NOMA belong to the natural repertoire of antibodies<sup>443</sup>, usually IgM – but IgG and IgA were also reported – produced without exogenous stimulation of the immune system with the function of clearing circulating autoantigens and vesicles (*e.g.*, apoptosomes displaying cardiolipin on their surface)<sup>187</sup>. We postulate that the auto-immunization processes occurring during the pathophysiology leading to APS may lead to the production of various autoantibodies, some detrimental during the course of the disease (*i.e.*, aPL) and others that are protective. For example, the production of natural antibodies may be a protective mechanism intended to opsonize circulating mtDAMPs to prevent their proinflammatory influence and/or to dampen the risks of producing pathogenic immune responses.

Although this is the most thorough exploration of AMA in APS patients to date, we acknowledge that our results stem from a small cohort and are exploratory. A large inception cohort with clinical events occurring after the baseline blood draw would be ideal to validate our preliminary results and infer a causal relationship between a possible protective effect of AmtDNA-IgG and thrombovascular events in APS. The nature of the SARD-BDB did not allow the assessment of the causal predictive power of AmtDNA-IgG on arterial events. Additionally, the detection of AMA in thrombotic patients devoid of aPL would allow to evaluate the associations between AMA and thrombovascular events independently of any contribution from the aPL to the pro-thrombotic phenotype.

Furthermore, in our study, aPL were detected by the clinical laboratory and AMA levels were determined in our facilities on serum samples drawn at the time of inclusion of the APS patients into the SARD-BDB (*i.e.*, at a single time-point, distinct from the moment of the onset of disease or of the vascular event itself). The associations between the various antibody assessed and the clinical features of the disease presented herein are only representative of whether AMA levels bore statistical associations with odds of past reports pertaining to these clinical events. We emphasize that, as autoantibody levels may fluctuate throughout the

disease, further studies dedicated to the assessment of AMA levels during the course of the disease in a large inception cohort is required to appreciate the power of AMA in the prediction of clinical events in APS. This may explain discrepancies in the aPL results and the fact that some of the aPL levels reported in this study would no longer meet APS criteria.

The present study highlights that APS patients express autoantibodies to several mitochondrial epitopes (AMA-M1/aCL AmtDNA-IgM, AmtRNA). These antibodies display associations with various aPL and AmtDNA-IgM are associated with report of a previous arterial event. Additional studies should be dedicated to the characterization of the mitochondrial autoantigens targeted by AMA and the variations in AMA levels during the course of the disease. If our results were to be confirmed in a larger prospective cohort, AMA and their targets may represent a powerful repertoire of new biomarkers of interests for a better estimation of the thrombovascular risks in APS patients.

### **3.7 Acknowledgements:**

This study was supported by an operating grant from the Arthritis Society [# 225638 (to P.R. Fortin)], a Canadian Institutes of Health Research [CIHR Foundation grant (E. Boilard)], and a CIHR operating grant (MOP-97916). The authors have no competing interests. E. Boilard is recipient of an award from the *Fonds de Recherche en Santé du Québec* (FRQS Senior Fellowship) and is a Canadian Donation and Transplantation Research Program (CDTRP) researcher. P.R. Fortin is recipient of a tier 1 Canada Research Chair on Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases. Y. Becker is recipient of a fellowships from the FRQS (# 282342), from the Arthritis Society (TGP-18-0257) and of a bursary from the APS foundation of America. The authors acknowledge Dr. E. Rollet-Labelle for her assistance.

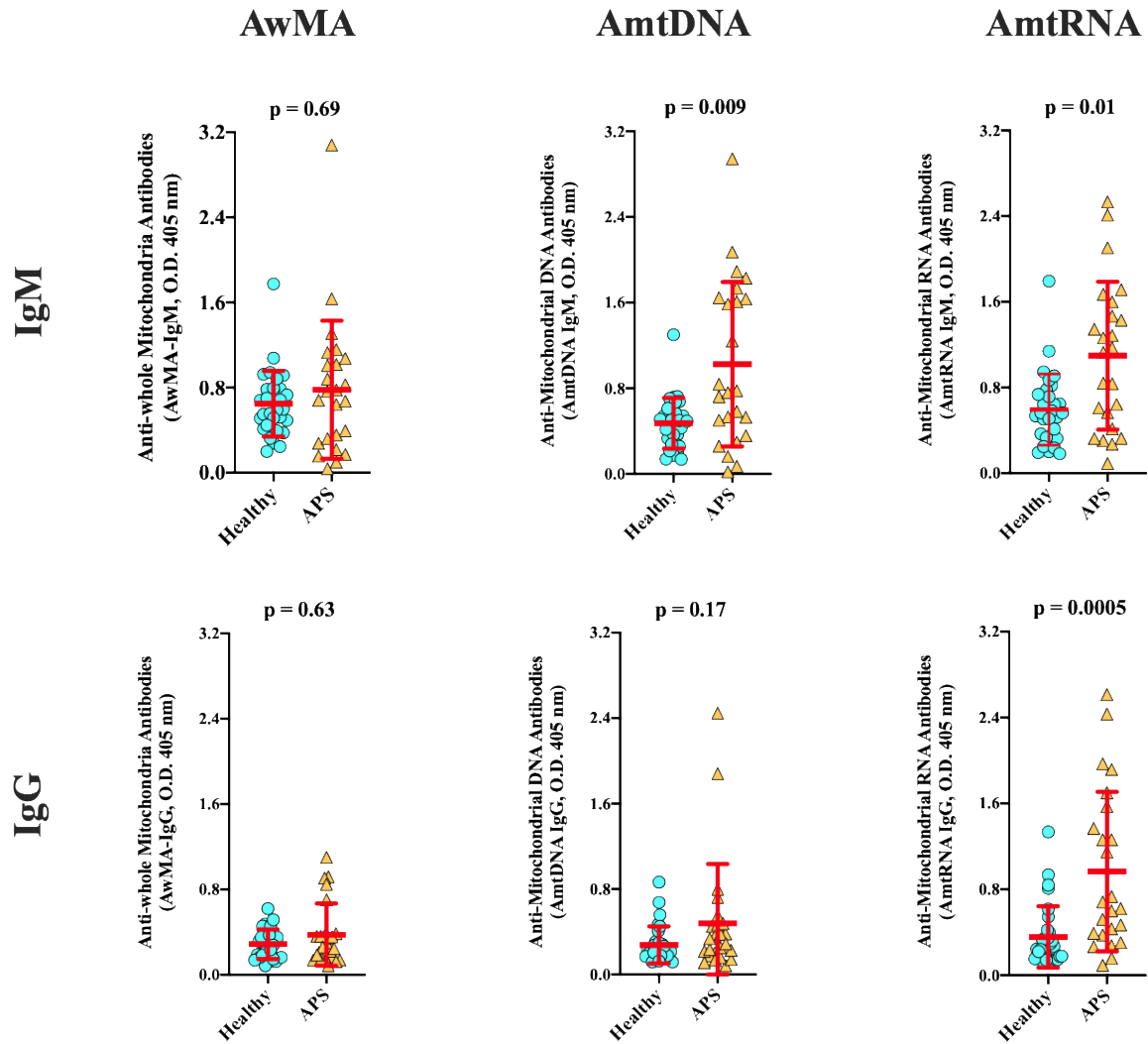
### **3.8 Authorship details:**

Experiments were conceived and designed by Y. Becker, E. Boilard and P.R. Fortin and performed by Y. Becker. Contributed, resources and expertise: A. Godbout and A.-S. Julien. Data were processed and analyzed by Y. Becker, A.-S. Julien, and supervised by E. Boilard and P.R. Fortin. The manuscript was written by Y. Becker, and critically reviewed by all authors.

### **3.9 Conflict of Interest:**

The authors have no conflict of interest to disclose.

### 3.10 Figures



**3.10. Figure 1: Detection of antibodies targeting whole mitochondria, mtDNA and mtRNA in APS patients.**

IgG and IgM against whole (*i.e.*, intact) mitochondria (AwMA), mtDNA (AmtDNA) and mtRNA (AmtRNA) were detected by direct ELISA, using sera (1:150) from patients (APS: n=24) included in the SARD-BDB and compared to controls (healthy: n=30). Data are mean  $\pm$  SD for optical densities measured at 405 nm ( $OD_{405\text{ nm}}$ ) and p-values (Wilcoxon-Mann Whitney tests)

### 3.11. Tables:

**3.11.Table 1: Sociodemographic, clinical and laboratory characteristics of the APS patients included in the SARD-BDB.**

| Sociodemographic variables<br>(n=24 unless stated otherwise) | Mean ± SD<br>[or n (%)] | Laboratory variables<br>(n=24 unless stated otherwise) | Median ± IQR<br>[or n (%)] | Cardiovascular risk factors and medications<br>(n=24 unless stated otherwise) | n (%)     |
|--|-------------------------|--|----------------------------|---|-----------|
| <b>Gender:</b>   |                         | <b>Lupus anticoagulant (LA): (n=23)</b>                |                            | <b>Cardiovascular risk-factors:</b>   |           |
| Female   | 15 (62.5)               | Negative   | 7 (29.2)                   | Smoking (past or present)   | 16 (66.7) |
| Male   | 9 (37.5)                | Positive   | 16 (69.6)                  | Obesity (i.e. BMI ≥ 30)   | 9 (37.5)  |
| <b>Age (years):</b>  | 52.38 ± 15.92           | <b>Anticardiolipin antibodies (aCL, in UPL):</b>       |                            | Hypertension  | 8 (33.3)  |
| <b>Diagnosis:</b>  |                         | IgG  | 8.30 ± 15.7                | Diabetes  | 2 (8.3)   |
| Primary APS (PAPS)   | 7 (29.2)                | IgM  | 6.20 ± 10.35               | Dyslipidemia  | 2 (8.3)   |
| Secondary APS (SAPS)   | 17 (70.8)               | Medium-to-high titer                                   | 6 (25.0)                   | Menopause (n =15)   | 10 (66.7) |
| <b>Disease classification:</b>                               |                         | <b>Anti-β2 Glycoprotein I (β2GPI, in U/mL):</b>        |                            | <b>Congenital thrombophilic risk:</b>   |           |
| Obstetrical APS (OAPS)                                       | 2 (8.3)                 | IgG  | 1.85 ± 3.95                | Protein C deficiency (n = 10)   | 0 (0)     |
| Thrombotic APS (TAPS)  | 20 (83.3)               | IgM  | 3.15 ± 12.7                | Protein S deficiency (n = 9)  | 1 (4.2)   |
| OAPS + TAPS  | 2 (8.3)                 | Medium-to-high titer                                   | 4 (17.4)                   | Antithrombin III Deficiency (n = 9)   | 0 (0)     |
| <b>Disease duration (years):</b>                             | 10.17 ± 10.07           | <b>aPL profile:</b>                                    |                            | Factor V Leiden Mutation (n = 11)   | 2 (8.3)   |
| <b>Body mass index (BMI):</b>                                | 28.70 ± 6.44            | Simple positives (anti-β2GPI or aCL)                   | 3 (12.5)                   | Prothrombin 20210A Mutation (n = 12)  | 1 (4.2)   |
| <b>Waist size (cm):</b>                                      | 95.65 ± 15.86           | Simple positives (LA)                                  | 6 (25.0)                   | <b>Medication (current):</b>  |           |
| <b>Hip size (cm):</b>  | 103.79 ± 14.12          | Double positives (LA + aCL)                            | 5 (20.8)                   | <b>Anti-platelet</b>  |           |
| <b>Blood pressure (mmHg):</b>                                |                         | Double positives (anti-β2GPI+ other)                   | 3 (12.5)                   | Aspirin   | 11 (45.8) |
| Systolic   | 125.05 ± 16.57          | Triple positives (aCL + anti-β2GPI + LA)               | 7 (29.2)                   | Clopidogrel   | 1 (4.2)   |
| Diastolic  | 70.68 ± 7.80            | <b>Anti-whole mitochondria antibodies (AwMA):</b>      |                            | <b>Anticoagulant</b>  |           |
| <b>History of vascular events:</b>                           |                         | IgG  | 0.28 ± 0.21                | Antivitamin K   | 13 (54.2) |
| Any  | 22 (91.7)               | IgM  | 0.72 ± 0.75                | Low molecular weight heparin  | 4 (16.7)  |
| Arterial   | 10 (41.7)               | <b>Anti-mitochondrial DNA antibodies (AmtDNA):</b>     |                            | Factor Xa inhibitors  | 1 (4.2)   |
| Venous   | 15 (62.5)               | IgG  | 0.31 ± 0.28                | <b>Corticosteroids</b>  | 1 (4.2)   |
| <b>History of pregnancy: (n = 10)</b>                        |                         | IgM  | 0.77 ± 1.21                | <b>Antimalarials (Hydroxychloroquine)</b>                                     | 16 (66.7) |
| History of any pregnancy morbidity                           | 4 (40.0)                | <b>Anti-mitochondrial RNA antibodies (AmtRNA):</b>     |                            | <b>Immunosuppressors</b>  |           |
|  |                         | IgG  | 0.65 ± 1.09                | Azathioprine  | 3 (12.5)  |
|  |                         | IgM  | 1.15 ± 1.04                | Cyclosporine  | 1 (4.2)   |
|  |                         |  |                            | Methotrexate  | 3 (12.5)  |
|  |                         |  |                            | Mycophenolate   | 4 (16.7)  |
|  |                         |  |                            | <b>Cardiovascular risk management drugs</b>                                   |           |
|  |                         |  |                            | Statins   | 7 (29.2)  |
|  |                         |  |                            | Antihypertensives   | 10 (41.7) |
|  |                         |  |                            | ACE inhibitor   | 6 (25.0)  |
|  |                         |  |                            | Diabetes medication   | 2 (8.3)   |
|  |                         |  |                            | Lipid lowering  | 7 (29.2)  |
|  |                         |  |                            | <b>Hormones (Estrogen and/or progesterone replacement)</b>                    | 1 (4.2)   |

**Abbreviations:** ACE: angiotensin conversion enzyme. aPL: antiphospholipid antibodies. APS: antiphospholipid syndrome. Ig: Immunoglobulin. IQR: interquartile range. SD: standard deviation.

**3.11. Table 2. AMA may allow discrimination of APS patients from healthy individuals and are associated with APS classification criteria.**

|                                       |                                    | AwMA   |  | AmtDNA   |  | AmtRNA  |   |  |
|---------------------------------------|------------------------------------|--|--|--|--|---|---|--|
|                                       |                                    | IgG  | IgM  | IgG  | IgM  | IgG   | IgM   |  |
| a. Discrimination                     | Healthy vs. APS                    | (H) 0.26 ± 0.21<br>(A) 0.28 ± 0.21<br>p = 0.63 | (H) 0.59 ± 0.34<br>(A) 0.72 ± 0.75<br>p = 0.69                       | (H) 0.22 ± 0.13<br>(A) 0.31 ± 0.28<br>p = 0.17 | <b>(H) 0.49 ± 0.33</b><br><b>(A) 0.77 ± 1.21</b><br><b>p = 0.009</b> | <b>(H) 0.25 ± 0.24</b><br><b>(A) 0.65 ± 1.09</b><br><b>p = 0.0005</b> | <b>(H) 0.56 ± 0.38</b><br><b>(A) 1.15 ± 1.04</b><br><b>p = 0.01</b> |  |
|                                       | PAPS vs. SAPS                      | (P) 0.25 ± 0.14<br>(S) 0.33 ± 0.25<br>p = 0.87 | (P) 0.51 ± 0.99<br>(S) 0.77 ± 0.70<br>p = 0.77                       | (P) 0.43 ± 0.32<br>(S) 0.27 ± 0.29<br>p = 0.21 | (P) 1.62 ± 1.11<br>(S) 0.65 ± 1.23<br>p = 0.17                       | (P) 0.40 ± 0.17<br>(S) 0.94 ± 1.05<br>p = 0.17                        | (P) 1.15 ± 1.26<br>(S) 1.05 ± 0.85<br>p = 0.97                      |  |
| b. Laboratory values                  | Lupus anticoagulant                |  | (+) <b>0.36 ± 0.31</b><br>(-) <b>0.14 ± 0.08</b><br><b>p = 0.008</b> | (+) 0.72 ± 0.80<br>(-) 0.68 ± 0.88<br>p = 0.77 | (+) 0.31 ± 0.26<br>(-) 0.36 ± 1.74<br>p = 1.00                       | (+) 0.65 ± 0.89<br>(-) 1.59 ± 1.30<br>p = 0.21                        | (+) 0.61 ± 0.88<br>(-) 1.57 ± 1.69<br>p = 0.53                      | (+) 0.84 ± 0.87<br>(-) 1.60 ± 1.81<br>p = 0.34 |
|                                       | aCL                                | IgG  | r <sub>s</sub> = 0.009<br>p = 0.97                                   | r <sub>s</sub> = - 0.28<br>p = 0.19            | r <sub>s</sub> = 0.21<br>p = 0.33                                    | r <sub>s</sub> = - 0.18<br>p = 0.40                                   | r <sub>s</sub> = 0.12<br>p = 0.58                                   | r <sub>s</sub> = - 0.08<br>p = 0.70            |
|                                       |                                    | IgM  | r <sub>s</sub> = 0.34<br>p = 0.11                                    | <b>r<sub>s</sub> = 0.51</b><br><b>p = 0.01</b> | r <sub>s</sub> = 0.09<br>p = 0.67                                    | r <sub>s</sub> = 0.37<br>p = 0.08                                     | r <sub>s</sub> = 0.07<br>p = 0.74                                   | r <sub>s</sub> = 0.31<br>p = 0.14              |
|                                       | Anti-β <sub>2</sub> GPI antibodies | IgG  | r <sub>s</sub> = 0.13<br>p = 0.54                                    | r <sub>s</sub> = - 0.36<br>p = 0.08            | r <sub>s</sub> = 0.31<br>p = 0.13                                    | r <sub>s</sub> = - 0.27<br>p = 0.19                                   | r <sub>s</sub> = 0.35<br>p = 0.09                                   | r <sub>s</sub> = - 0.18<br>p = 0.40            |
|                                       |                                    | IgM  | r <sub>s</sub> = 0.40<br>p = 0.053                                   | r <sub>s</sub> = - 0.03<br>p = 0.89            | r <sub>s</sub> = 0.16<br>p = 0.46                                    | r <sub>s</sub> = 0.03<br>p = 0.90                                     | r <sub>s</sub> = 0.39<br>p = 0.06                                   | r <sub>s</sub> = - 0.07<br>p = 0.76            |
|                                       | c. Clinical outcomes               | Thrombotic events                              | Any  | 1.55 (0.48;5.06)<br>p = 0.46                   | 0.72 (0.46;1.14)<br>p = 0.16   | 0.84 (0.70;1.02)<br>p = 0.08  | 0.54 (0.18;1.62)<br>p = 0.27  | 1.34 (0.75;2.42)<br>p = 0.32                   |
| Venous                                |                                    |  | 1.27 (0.87;1.85)<br>p = 0.22   | 0.95 (0.83;1.08)<br>p = 0.42                   | 0.96 (0.82;1.11)<br>p = 0.56   | 1.03 (0.92;1.15)<br>p = 0.67  | 1.13 (0.97;1.32)<br>p = 0.11  | 0.95 (0.83;1.07)<br>p = 0.38                   |
| Arterial                              |                                    |  | 0.92 (0.68;1.24)<br>p = 0.58   | 0.90 (0.76;1.08)<br>p = 0.26                   | 0.93(0.77;1.12)<br>p = 0.44  | <b>0.86 (0.74;1.00)</b><br><b>p = 0.047</b>                           | 1.00 (0.90;1.12)<br>p = 0.98  | 0.96(0.85;1.09)<br>p = 0.55                    |
| Morbidity during pregnancy (any type) |                                    | 1.25 (0.33;4.74)<br>p = 0.74                   | 1.06 (0.91;1.24)<br>p = 0.44   | 2.60 (0.55;12.36)<br>p = 0.23                  | 1.06 (0.91;1.23)<br>p = 0.49   | 1.06 (0.87;1.28)<br>p = 0.57  | 1.00 (0.84;1.20)<br>p = 0.97  |  |

(a) Differences in AMA levels between healthy donors (H; n=30) and APS patients (A; n=24), and between patients with primary (P; n = 7) or secondary S APS (S; n=17). Values presented as median  $\pm$  IQR and p-values (Wilcoxon-Mann Whitney test). (b) Associations with clinical laboratory measurements are presented as median  $\pm$  IQR and p-values (Wilcoxon-Mann Whitney test) for patients positive (+) or negative (-) for LA or as Spearman coefficient ( $r_s$ ) and p-value. (c) Associations with clinical outcomes of APS are presented as OR (95% CI) for an increase of 0.1 OD450 nm unit of the AMA from univariable logistic regression. Bold values are significant (i.e.,  $p \leq 0.05$ ).

Abbreviations:  $\beta$ 2GPI:  $\beta$ 2 glycoprotein I. aCL: anticardiolipin antibodies. AmtDNA: anti--mitochondrial DNA. AmtRNA: anti-mitochondrial RNA antibodies. aPL: antiphospholipid antibodies. APS: antiphospholipid syndrome. AwMA: anti-whole mitochondria antibodies. Ig: Immunoglobulin. IQR: interquartile range. LA: lupus anticoagulant. OR: odds ratio. PAPS: primary APS. SAPS: secondary APS



# **Chapitre 4 : Identifications des protéines mitochondriales et des facteurs associés aux anticorps anti-mitochondriaux dans le lupus érythémateux disséminé.**

## **4.1 Résumé**

**Contexte :** Les cibles antigéniques d'origine mitochondriale ciblées par les AMA dans le SLE restent, à l'heure actuelle, méconnues. Cette étude vise à identifier des protéines ciblées par les AMA dans le SLE et identification de candidats d'intérêt.

**Méthodes :** 431 protéines mitochondriales ont été identifiées par une approche protéomique. Les niveaux d'AMA dirigés contre les candidats sélectionnés ont été testés par ELISA direct (sains: n=30, SLE: n=87) et associés avec différents paramètres cliniques de la maladie.

**Résultats :** Les anticorps dirigés contre la protéine associée au C1q (C1qBP) sont augmentés chez les patients ( $p=0.049$ ) et associés avec la positivité au LA ( $p=0.049$ ). Les anti-mitofusin 1 (Mfn1) sont des candidats potentiels pour prédire la maladie (aOR:2.99, 95%CI:1.39-6.43,  $p=0.0052$ ) et sont associés à la positivité aux aPL ( $p=0.011$ ) et anti-dsDNA ( $p=0.0005$ ).

**Conclusion :** Notre approche a permis d'identifier des antigènes sécrétés/de surface d'origine mitochondriale ciblés par les autoanticorps lupiques.

## 4.2 Abstract

**Objective:** Mitochondria are organelles that possess several bacterial features such as a double-stranded genome with hypomethylated CpG islets, formylated proteins, and cardiolipin-containing membranes. In systemic lupus erythematosus (SLE), mitochondria and their inner components are released into the extracellular space, potentially eliciting a proinflammatory response by the immune system. While cardiolipin and mitochondrial DNA and RNA are confirmed targets of autoantibodies, other antigenic mitochondrial proteins in SLE remain to be identified. Herein, we aim to characterize the protein repertoire recognized by anti-mitochondrial antibodies (AMA) in SLE patients.

**Methods:** Using shotgun proteomic profiling, we identified 1345 proteins, 431 of which were associated with the mitochondrial proteome. Immunoreactivities to several of these candidates were assessed by direct ELISA in serum samples from a local cohort (healthy: n=30, SLE: n=87) and associated with demographic and disease characteristics.

**Results:** We determined that IgGs to the C1q-binding protein (C1qBP) are significantly elevated in SLE patients included in our cohort ( $p=0.049$ ) and are associated with positivity for lupus anticoagulant ( $p=0.049$ ). IgG against the mitochondrial protein mitofusin 1 (Mfn1) displayed promising performances in the prediction of SLE diagnoses (aOR: 2.99, 95%CI: 1.39–6.43,  $p=0.0044$ ) in our cohort. Moreover, anti-Mfn1 were associated with positivity to anti-phospholipids ( $p=0.011$ ) and anti-dsDNA ( $p=0.0005$ ).

**Conclusion:** This study presents the mitochondrial repertoire targeted in SLE, indicating that autoantibodies can recognize secreted and/or surface proteins of mitochondrial origin. Profiling of the AMA repertoire in large prospective cohorts may improve our knowledge on mitochondrial biomarkers and their usefulness for patient stratification.

# Identification of mitofusin 1 and complement component 1 Q subcomponent-binding protein as mitochondrial targets in systemic lupus erythematosus

Yann LC Becker, M. Sc.<sup>1,2,4</sup>; Jean-Philippe Gagné, Ph. D.<sup>2,8</sup>; Anne-Sophie Julien, M. Sc.<sup>3</sup>; Tania Lévesque, DCS<sup>1,2,4</sup>; Isabelle Allaëys, Ph. D.<sup>1,2,4</sup>; Nadine Gougeard, BTS.<sup>5,6</sup>; Vicente Rubio, M.D., Ph. D.<sup>5,6</sup>; François-Michel Boisvert, Ph. D.<sup>7</sup>; Dominique Jean, Ph. D.<sup>7</sup>; Eric Wagner, Ph. D.<sup>4,8</sup>; Guy G. Poirier, Ph. D.<sup>2,9</sup>; Paul R. Fortin, M.D., MPH, FRCPC<sup>1,10</sup>, Éric Boilard, Ph. D.<sup>1,2,4</sup>.

<sup>1</sup> Centre de Recherche ARThrite - Arthrite, Recherche et Traitements, Université Laval, Québec, Qc, Canada.

<sup>2</sup> Axe Maladies infectieuses et immunitaires, Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec - Université Laval, Québec, Qc, Canada

<sup>3</sup> Département de mathématiques et statistique, Université Laval, Québec, Qc, Canada.

<sup>4</sup> Département de microbiologie et immunologie, Université Laval, Québec, Qc, Canada

<sup>5</sup> Structural Enzymopathology Unit, Instituto de Biomedicina de Valencia of the CSIC (IBV-CSIC), Valencia, Spain

<sup>6</sup> Group 739, Centro de Investigación Biomédica en Red para Enfermedades Raras (CIBERER-ISCIII), Madrid, Spain

<sup>7</sup> Department of Anatomy and Cell Biology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada

<sup>8</sup> Laboratoire d'Immunologie et Histocompatibilité, CHU de Québec-Université Laval, Département de Médecine de Laboratoire, Québec, Qc, Canada.

<sup>9</sup> Département de biologie moléculaire, de biochimie médicale et de pathologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Qc, Canada

<sup>10</sup> Division de Rhumatologie, Département de Médecine, CHU de Québec – Université Laval, Québec, Qc, Canada.

## **Correspondence should be sent to**

**Eric Boilard, PhD :** [eric.boilard@crchudequebec.ulaval.ca](mailto:eric.boilard@crchudequebec.ulaval.ca)

Centre de Recherche du CHU de Québec – Université Laval,

2705 Boulevard Laurier, Room T1-49

Quebec City, Quebec, G1V 4G2, Canada.

**Telephone:** (418) 525-4444 Ext : 46175

**Authors' Twitter handles:** Yann LC Becker: @YannBECKER4, Eric Boilard: @boilard\_eric

**Keywords:** Systemic Lupus Erythematosus (SLE); Autoantigens; Autoantibodies; Mitochondria.

### 4.3 Introduction

The mitochondrion, a peculiar organelle in charge of numerous cellular pathways, is derived from the endosymbiosis between an  $\alpha$ -proteobacterium and a primitive eukaryotic cell<sup>13</sup>. Despite their intracellular nature, whole mitochondria and/or mitochondrial components may be released into the extracellular milieu in conditions of necrosis, tissue damage<sup>306,309</sup>, or cellular activation<sup>298,305,312,313</sup>. The release of whole mitochondria and/or mitochondrial components [i.e. molecular patterns (mtDAMPs)] skews innate immunity toward a proinflammatory response<sup>749,807</sup>. Mitochondrial antigens may also be targeted by the adaptive immune system as indicated by the presence of a humoral response, comprised of various types of anti-mitochondrial autoantibodies (AMA)<sup>2-4,399</sup>, in various inflammatory and autoimmune conditions. However, both the pathophysiological pathway leading to the production of AMA and several of the antigens targeted by several AMA remain to be characterized<sup>2,3,399</sup>.

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a complex autoimmune disease in which the immune system generates autoantibodies recognizing self-epitopes. Antibodies directed against DNA and nuclear components are hallmarks of SLE<sup>796</sup>. Autoantibodies against the mitochondrial phospholipid cardiolipin (aCL) are associated with both thrombotic and obstetric events in SLE and the antiphospholipid syndrome (APS)<sup>411</sup>. Simultaneous presence of aCL and antibodies to the 60-kDa heat-shock protein (HSP60) were associated with arterial thrombosis<sup>422</sup>. Studies have also revealed that the lupus autoantibody repertoire comprises immunoglobulins against mtDNA and mtRNA<sup>2-4</sup>.

Despite the description of antibodies targeting mitochondrial antigens, the mitochondrial epitopes expressed on the outer membrane remains to be identified <sup>2,3,399</sup>. Herein, we aim to characterize the antigenic protein repertoire recognized by AMA in SLE patients.

## 4.4 Material and methods

### *4.4.1. The CHU de Québec – Université Laval Systemic Autoimmune Rheumatic Disease Biobank and DataBase repository (SARD-BDB).*

Serum samples from healthy donors and lupus patients were gathered, in accordance with the Declaration of Helsinki, as previously reported <sup>2</sup>. Additional information provided in **Supplementary methods**.

### *4.4.2. Mitochondrial samples:*

Mitochondria were isolated, following previously published procedures <sup>2</sup> and subsequently lysed. Additional information provided in **Supplementary methods**.

### *4.4.3. Sample preparation for mass spectrometry identification of mitochondrial antigens targeted by AMA in SLE:*

**Immunoprecipitations:** All incubations and washings used gentle rotary mixing, and were performed at ambient temperature (about 21°C) – unless indicated. In all experiments, 3mg of Dynabeads®-ProteinG were used. Before use, beads were washed three times with 1ml of 1X PBS (Wisent, Montréal, Qc, Canada). For retention of the beads in the tubes, a DynaMag™-2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) magnetic strip was used.

**Total mitochondrial antigens:** Dynabeads®-Protein G were incubated for 2hrs with 1mL pooled sera (Additional information provided in **Supplementary methods**) diluted to an IgG concentration of 24µg/ml in protease inhibitors-containing lysis buffer (see above). Dynabeads®-bound total IgG were then washed three times in 1.5mL PBS and once in the same volume of lysis buffer. Samples were incubated overnight at 4 °C with 1.5ml of mitochondrial lysate brought to a protein concentration of 3mg/mL. Washing steps in 1.5mL total volume were then performed as follows: thrice in lysis buffer, containing

a protease inhibitor cocktail, and twice in PBS. Beads were then resuspended in 100 $\mu$ L of 75mM ammonium bicarbonate at pH8.0 and stored at -80°C until used.

***Enrichment in mitochondrial outer membrane (MOM) antigens by panning:*** Intact mitochondria (0.5mg as quantitated by BCA assay) were incubated overnight at 4°C with 1mL of diluted pooled sera (10%, in PBS with a protease inhibitor cocktail) from pooled samples of healthy individuals or lupus patients. Unbound serum components were removed by three 7,000g centrifugal washing steps, each performed for 10min at 4°C, with 1.5ml PBS. AwMA, bound to their outer membrane mitochondrial antigens were released by incubation in 1mL lysis buffer containing a protease inhibitor cocktail, overnight at 4°C to ensure the capture of IgGs by Dynabeads®-Protein G. Three washing steps were performed in PBS containing a protease inhibitor cocktail, followed by two final washes with PBS devoid of protease inhibitors. Samples were resuspended in 100 $\mu$ L ammonium bicarbonate buffer, pH8.0 and stored at -80°C.

***Negative controls:*** The same procedure as for total mitochondrial antigens was performed, using an irrelevant monoclonal IgG (Clone IV.3, i.e. targeting Fc $\gamma$ RIIa) instead of serum-containing IgG in order to mitigate non-specific capture of proteins caused by either polyreactive or natural antibodies that may target mitochondrial antigens.

#### *4.4.4. Identification of mitochondrial antigens recognized by AMA:*

***On-bead proteolysis:*** isolated samples were resuspended in 200 $\mu$ L of 75mM ammonium bicarbonate pH8.0 and supplemented with 2 $\mu$ g of a trypsin/Lys-C mix (Promega, Madison, WI, USA). Proteins in the samples were digested overnight at 37°C on a rotating mixer. The digested products were acidified with trifluoroacetic acid and the peptides generated from the proteolytic digestion were isolated and washed on C18 tips (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. The purified peptides were then dried by vacuum centrifugation and stored at -80 °C before analysis by liquid chromatography

with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS. Additional information provided in **Supplementary methods**).

#### *4.4.5. Detection of autoantibodies targeting selected mitochondrial antigens*

The assessment of autoantibody levels against several mitochondrial antigens was performed either by direct ELISA, using diluted sera (1:100) from healthy individuals or patients with either primary biliary cirrhosis (PBC), SLE or APS – as previously described<sup>2-4</sup>.

To assess reactivity patterns in routine clinical testing, indirect immunofluorescence (IIF) assays were performed using HEp-2 cells (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA). Patient serum (Healthy: n=3. PBC: n=3. AwMA-positive SLE: n=9) samples were tested at 1:80 and 1:160 dilutions using a PhD 1x workstation (Bio-Rad laboratories). Polyclonal antibodies against C1qBP (Rabbit anti-C1qBP. Milipore Corporation, Burlington, MA, USA) and Mfn1 (Rabbit anti-C1qBP. Proteintech, Rosemont, IL, USA) were also tested (5 µg / mL in PBS 1X) for their reactivity patterns on HEp-2 cells. Samples were incubated with HEp-2 cells for 30 minutes at room temperature, washed twice in PBS for 10 minutes and incubated for another 30min in the dark either with fluorescein isothiocyanate–conjugated goat anti-human IgG (heavy and light chains) for healthy donors and patients, or AF488-conjugated goat anti-rabbit IgG (heavy and light chains) for rabbit antibodies. After two washes, slides were assembled with antifade mounting medium and coverslips. Reactivity patterns were assessed by a trained member of the personnel and validated by the laboratory director, using a BX53 immunofluorescence microscope (Olympus Corporation, Shinjuku, Japan). Pictures presented herein were subsequently acquired, using a Z2 confocal microscope with an LSM 800 scanning system (Carl-Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany). Images were captured with a 40x oil objective (Carl-Zeiss, Apochromat / 1.4). ZEN 2.3 software (Carl-Zeiss) was used to acquire and process images. Z-stack projections of 1µm in total thickness are represented. Additional information is provided in **Supplementary methods**.



#### *4.4.6. Statistical analyses:*

Sociodemographic, clinical and laboratory values are presented as either median  $\pm$  inter-quartile range (IQR), n (%), or as mean  $\pm$  SD. Groups (i.e. healthy donors versus SLE patients) were compared using the Wilcoxon-Mann-Whitney test and multiple comparisons to healthy donors were performed, using the Kruskal-Wallis. Spearman correlations were calculated to see associations between AMA and antibodies assessed in routine clinical serology tests. Youden's index was determined to set a cut-off value for positivity to anti-C1qBP and anti-Mfn1. Logistic regressions were performed to predict diagnosis, separately for C1qBP and Mfn1. Additional information on these tests provided in **Supplementary methods**. Statistical analyses were performed with Prism 9 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) and SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), while figures were assembled with Photoshop CC 2019 version 20.0.4 (Adobe Systems Inc.).

## 4.5 Results

We adopted two complementary approaches to identify proteins targeted by AMA in SLE: 1) we used mitochondrial lysates to examine the complete spectrum of mitochondrial proteins targeted by AMA and identified by immunoprecipitation, and 2) whole (i.e. intact) mitochondria were used to capture AMA recognizing components from the mitochondrial outer membrane (MOM). An irrelevant antibody, targeting a protein absent in mitochondria, was also used as a control. The latter strategy permitted to appreciate both the non-specific binding and potential endogenous proteins interacting with IgG (e.g. the complement pathway) (**Figure 1**).

A total of 1345 proteins were identified by the combined approaches, 252 of which were withdrawn as usual contaminants (**Supplementary Table 4**). When grouped for protein interactions, we observed an enrichment of three networks in SLE samples: the C1q complement component, the serin protease inhibitor (serpin) superfamily, and members of the pyruvate dehydrogenase complex. Analysis through gene ontology highlighted the mitochondrial metabolism as the functions / processes with the highest significance (**Figure 2C**).

The complement component 1q subcomponent-binding protein (C1qBP), also known as p32, the receptor of the globular head of the C1q (gC1qR) or hyaluronic acid binding protein 1 (HABP1), is a protein which RNA is encoded in the nucleus by the chromosome 17. It contains a mitochondrial-targeting sequence that may be cleaved for translocating C1qBP to other compartments (e.g. to the surface of the plasma membrane, nucleus, and/or shed into the extracellular space)<sup>837</sup>. Although C1qBP is not strictly a mitochondrial protein, its enrichment in SLE samples and its relevance to mitochondria and complement stimulated further analyses (**Figure 2**). When assessed by direct ELISA, IgG against C1qBP was significantly ( $p=0.049$ ) elevated in patients with SLE (**Figure 3A**) in comparison with

healthy individuals. In contrast, the levels of anti-C1qBP were not significantly increased in APS or PBC (**Figure 3A**), two diseases in which AMA are reported <sup>4,399</sup>.

While antibodies in PBC target proteins from the mitochondria inner membrane (MIM), the inter-membrane space (IMS) or the matrix (MM) <sup>399,400,403,406</sup>, previous findings determined that antibodies may also recognize components on the surface of the outer membrane in SLE <sup>2-4,413</sup>. Thus, we assessed the localizations of the proteins to identify members of the mitochondrial proteome. 431 mitochondrial proteins were assigned to the mitochondrion, 168 of which lacked references pertaining to their mitochondrial sublocalization. Ninety-three proteins were expressed within the MM, 6 in the IMS, 130 in the MIM and 35 in the MOM. Of note, 13 proteins were associated with more than one mitochondrial compartment (**Supplementary Table 4**).

A protein from the MOM, associated to the pyruvate dehydrogenase complex but distinct from the antigenic targets of AMA-M2 and presenting an elevated score in our panning approach was selected – mitofusin-1 (Mfn1). IgGs against Mfn-1 were significantly increased in SLE in comparison with healthy individuals ( $p=0.0044$ ). In contrast, they were not significantly increased in PBC and APS (**Figure 3B**). For comparisons, we tested the antigenicity of other mitochondrial proteins with lower prediction scores in our panning approach. Thus, enzymes from the MM involved either in the urea cycle (i.e. ornithine carbamoyltransferase, carbamoyl-phosphate synthase and N-acetylglutamate synthase), or in the mitochondrial metabolism (i.e. aspartate aminotransferase and aldehyde dehydrogenase) and proteins from the MIM implicated in oxidative phosphorylation (i.e. beta subunit of ATP synthase) or the electron transfer chain (i.e. alpha subunit of the electron transfer flavoprotein), were tested. The levels of autoantibodies against these other candidates were not significantly increased in SLE patients in comparison to healthy individuals (**Supplementary Figure 1**).

Whether the autoantibodies to either of these two components, C1qBP and Mfn 1, are associated with a definable cytoplasmic immunofluorescent staining pattern on routine Hep-2 substrates, as seen with antibodies to pyruvate dehydrogenase complex in PBC sera<sup>399,767</sup>, was determined next. Indirect immunofluorescence labelling of Hep2 cells with a commercial antibody against C1qBP produced an intense speckled staining of the nuclear region and a lower signal in the cytosol. Conversely, commercial anti-Mfn 1 displayed a reticular staining of the cytoplasm, typical of anti-mitochondrial antibodies (**Figure 4A**). AwMA<sup>+</sup> SLE sera displayed a wide variety of patterns, but none was qualified as positive for mitochondrial staining. In contrast, PBC sera utilized using the same approach revealed an obvious cytosolic pattern, with no nuclear staining when observed using a regular fluorescence microscope. However, when the same slides were examined using a confocal microscope, the autoantibodies from 7 out of the 9 SLE patients tested displayed various intensities of cytoplasmic staining, reminiscent of those observed in PBC or observed using commercial antibodies against C1qBP and Mfn 1 (**Figure 4, Supplementary Table 5**).

Although it is acknowledged that the number of patients examined is insufficient to draw definite conclusions on the clinical implications of these findings, exploratory biostatistical analyses were performed to determine potential associations between anti-C1qBP or anti-Mfn1 with disease characteristics in the SLE patients included in our cohort. While neither anti-C1qBP nor anti-Mfn1 displayed significant association to the various clinical manifestations assessed using univariate and multivariate logistic (i.e. thrombosis, carotid plaque, SDI $\geq$ 1, SLEDAI-2K $\geq$ 4, arthritis, nephropathies or dermatological disorders) and linear (i.e. carotid intima-media thickness and Lupus Severity Index Score) regressions (*data not shown*), we assessed the ability of these two AMA to efficiently discriminate SLE samples from healthy controls using Youden's index. Calculated cut-off values were 0.064 for anti-C1qBP and 0.116 for anti-Mfn1. Antibodies to Mfn1 displayed suboptimal sensitivity, but good specificities, while anti-C1qBP had high sensitivity, but lower specificity (**Supplementary Table 6**). However, both autoantibodies showed high positive predictive values. Anti-Mfn1 antibodies

also displayed promising preliminary performances in the prediction of SLE diagnoses (aOR: 2.99, 95%CI: 1.39–6.43,  $p=0.0044$ ), in our cohort.

Moreover, SLE patients positive for the lupus anticoagulant (i.e. LA) displayed increased anti-C1qBP IgGs (**Table 1**). Anti-Mfn1 IgGs were increased in patients with positivity to anti-phospholipids (i.e. any, or a combination of the various anti-phospholipids assessed), as well as anti-double-stranded DNA autoantibodies (i.e. anti-dsDNA). When considering individual IgGs, anti-Mfn1 were increased in patients positive for anti-cardiolipin and neared significance in patients with anti- $\beta_2$  glycoprotein I (i.e. anti- $\beta_2$ GPI). These results were further confirmed by the correlations between  $OD_{405\text{ nm}}$  measured for anti-Mfn1 and continuous variables available for anti-cardiolipin, anti- $\beta_2$ GPI and anti-dsDNA (**Table 2**). When matched with levels of other AMA, levels of anti-C1qBP were associated with both AwMA-IgG and AmtDNA-IgG. Anti-Mfn1 correlated with all the AMA assessed in our cohort (**Table 2**). Of note, levels of anti-C1qBP also correlated with those of anti Mfn1 ( $r_s=0.49$ ;  $p>0.0001$ ).

## 4.6 Discussion

Patients with SLE display antibodies from various subclasses (e.g. IgG, IgM, IgA) against a wide array of self-antigens<sup>605</sup>. The epitopes targeted by these autoantibodies comprise, but are not limited to<sup>604</sup>, phospholipids [e.g. aPL, aCL, LA]<sup>838</sup>, anti- $\beta_2$  GPI<sup>839</sup>, nucleic acids (e.g. anti-dsDNA, AmtDNA, AmtRNA)<sup>2,3</sup>, transcription factors and ribonucleoproteins [i.e. anti-nuclear antibodies (ANA)]<sup>840</sup>. Furthermore, distinct autoantibodies targeting various types of mitochondrial biomolecules such as phospholipids (i.e. aCL targeting cardiolipin)<sup>841</sup>, nucleic acids (i.e. mtDNA, mtRNA)<sup>2-4</sup> and antigens whose precise nature remains to be characterized (i.e. AMA-M5) were reported in SLE<sup>399,414</sup>.

While various proteins involved in the mitochondrial processing of pyruvate (e.g. PDC-E2), sulfite oxidase and glycogen phosphorylase are mitochondrial proteins known to be targeted by AMA (i.e. respectively by AMA-M2, -M4 and -M9) in PBC<sup>399</sup>, limited knowledge is available concerning the extent of the mitochondrial proteome targeted by AMA in SLE. Antibodies to cardiolipin, a phospholipid uniquely synthesized in mitochondria in humans are known to be associated with vascular and obstetrical events in SLE and APS<sup>410-412</sup>. To date, the only mitochondrial protein with autoantibodies associated with disease manifestations in SLE is HSP60<sup>422</sup>. Herein, we used several approaches to enrich mitochondrial antigens. Thus, we identified 1093 different proteins with 431 (39.43%) of which were associated with the mitochondrial proteome<sup>10</sup>. These mitochondrial proteins, targeted by circulating AMA, reveal the extent of the mitochondrial antigenicity in SLE. Of note, among all the previously known mitochondrial proteins targeted by AMA, each of the currently known protein antigen targeted by AMA – with the exception of glycogen phosphorylase – were detected by our mass spectrometry analyses.

Samples were treated with the benzonase nuclease in order to prevent the co-isolation of nucleic acid interacting proteins, such as mtRNA with bound ribonucleoproteins (mtRNP). Despite these precautions, our methods indicated the presence of non-mitochondrial proteins (e.g. complement proteins, ficolin-3, serpins). While we restricted the focus of our study

on the proteins assigned to the mitochondrial proteome, such entities should be considered with caution as, in addition to their own potential antigenicities, they can be co-isolated in association with other biomolecules (e.g. interactors, ligands). Anti-RNP autoantibodies such as anti-small nuclear ribonucleoproteins (snRNP), Ro/SSA and La/SSB are detected in mixed connective tissue disease as well as in SLE, Sjögren syndrome, scleroderma and myositis<sup>842</sup>. Of note is that ANA of the anti-Th/To family were reported to cross-react with mitochondrial RNA processing in systemic sclerosis<sup>843</sup>. These elements suggest that, while we subtracted mtRNP given their recognition as common contaminants in proteomic analyses, further studies are needed to appreciate their immunogenicity and the overlap between AMA and ANA in various systemic autoimmune rheumatic diseases. Such studies could allow improvements to patient classification in cases of difficult diagnoses or overlapping syndromes. While we tested a handful of mitochondrial proteins, systematic characterization of patients' immunoreactivities to large subsets of mitochondrial antigens would be enhanced by the use of high-throughput screening methods such as nucleic acid programmable protein array<sup>844</sup>.

Two proteins with significant immunogenicities stood out from the various candidates assessed due to their increase in SLE samples when compared to healthy individuals. First, C1qBP, a protein stored within the mitochondrion and dispatched to the MOM and/or the cell membrane, or secreted into the circulation<sup>845,846</sup>, where it may be targeted by circulating AMA. Second, Mfn1, a protein embedded in the MOM that could be recognized by AMA upon the release of whole mitochondria into the extracellular space<sup>23</sup>. Of note, neither autoantibodies to C1qBP or Mfn-1 were increased in PBC, another autoimmune condition characterized by the production of various AMA by patients<sup>399</sup>. They were also not increased in APS, a disease that may be associated to SLE with pathogenic antibodies against cardiolipin<sup>411</sup>. Complement molecules in circulation, thus in the sera tested, may target mitochondria directly<sup>847</sup>. Moreover, studies indicate that C1qBP expressed at the surface of CD8+ T cells may bind C1q and that translocation of the C1q/C1qBP complex to the nucleus induced a metabolic switch, leading to a reduction of inflammation and tissue damages<sup>641,848-850</sup>. We thus speculate that C1qBP might constitute

a circulating autoantigen enabling the formation of protein complexes with C1q that may be targeted by autoantibodies in SLE, thus potentially contributing to the dysregulation of the biological pathways regulated by the classical complement pathway <sup>641,850,851</sup>. Autoantibodies, in association with C1q-C1qBP complexes may also form proinflammatory protein-protein scaffolds (i.e. immune complexes, signaling through Fcγ receptors) <sup>847</sup>, and their deposition in tissues may promote tissue damages such as lupus nephritis. However, our preliminary observations did not show associations between anti-C1qBP and kidney damages.

The strong correlation between anti-Mfn1 and AwMA suggests that mitofusin 1 might represent one of the main mitochondrial antigens of the MOM. Moreover, our previous work on AMA in SLE and the correlations of AMA with circulating mtDNA or anti-cardiolipin (**Tables 1 and 2**) showcase the mitochondrion as the source of various immunogenic biomolecules <sup>2-4,305</sup>. When considering the preliminary performances of the two identified AMA, both displayed high positive predictive values for the likelihood of an SLE diagnosis in samples from this cohort. Anti-C1qBP displayed suboptimal specificity, but high sensitivity, whereas anti-Mfn1 presented high specificity and suboptimal sensitivity (**Supplementary table 6**).

Routine detection of AMA generally implicates indirect immunofluorescence and confirmation by ELISA <sup>852</sup>. Of note, several studies used line immunoassays or bead-based assays to detect multiple autoantibodies, including various subsets of AMA <sup>852</sup>. We observed that commercial antibodies against Mfn1 produce a classical mitochondrial staining, whereas anti-C1qBP shows staining of both nuclear and cytoplasmic regions of Hep2 cells. These observations are concordant with the fact that Mfn1 is known to be uniquely expressed at the surface of the mitochondrion, while C1qBP may also be found in other organelles such as the nucleus or the Golgi apparatus <sup>853</sup>. Clinical observation of SLE sera positive for AwMA, using a fluorescence microscope as routinely performed in clinical laboratories, indicated that none of the 9 samples assessed displayed cytoplasmic staining. However, upon further scrutiny using a confocal microscope, a proportion of these patients displayed significant cytoplasmic fluorescence resembling those observed in PBC, along with nuclear staining. The use



of confocal microscopy, rather than wide-field fluorescence imaging, may thus be more optimal to discriminate different subcellular stainings in conditions where the nucleus shows dominant staining. Every patient included in our cohort was positive for ANA, thus we could not assess indirect immunofluorescence patterns observed in AwMA<sup>+</sup> / ANA<sup>-</sup> specimens. SLE being characterized by a wide repertoire of autoantibodies, confocal microscopy may thus be of use in order to visualize indirect immunofluorescence patterns across each cellular sublocalizations<sup>604,605,854</sup>. The lack of specific indirect immunofluorescence pattern in our preliminary study suggests that direct ELISA may be more informative for the detection of AMA, as this technique would provide quantitative information on the levels of autoantibodies specific to this target.

Our study has limitations. Due to the nature of the patient recruitment, the blood samples used for this study were collected at the time of patient inclusion into the cohort, not at time of first diagnosis. Thus, the levels of autoantibodies that we measured do not necessarily reflect the antibodies present at the time of diagnosis. Moreover, phlebotomies were not performed at time of occurrence of the clinical events. AMA levels were thus assessed for associations with histories of any past and/or active clinical events. Furthermore, the sample size, the ethnic distribution of the patients and the relatively low clinical activity scores of the patients at the time of the phlebotomy may have influenced the various data assessed. Our preliminary findings presented herein should therefore be confirmed in large inception cohorts with a broader spectrum of autoantibody repertoires. Such studies would allow to appreciate fluctuations of AMA levels around the time of active disease manifestations in SLE and to assess the performances of AMA as biomarkers in SLE. Considering the dynamic range of antibody levels measured in patients with PBC and APS, the replication of the present study in larger cohorts of patients and the evaluation of other rheumatic conditions (e.g. myositis, scleroderma) would also provide information about the distribution of AMA in autoimmune diseases.

In conclusion, the autoantibodies repertoire in SLE targets multiple representatives of the mitochondrial proteome, notably C1qBP and Mfn1. Further studies may reveal whether the detection of AMA in SLE or other autoimmune conditions may improve diagnosis, prognosis and/or patient stratification in SLE.

#### **4.7 Acknowledgements:**

This study was supported by an operating grant from the Arthritis Society [# 225638 (to P.R. Fortin)], a Canadian Institutes of Health Research [CIHR Foundation grant (E. Boilard)], and a CIHR operating grant (MOP-97916). E. Boilard is the recipient of an award from the *Fonds de Recherche en Santé du Québec* (FRQS Senior Fellowship) and is a Canadian Donation and Transplantation Research Program (CDTRP) researcher. P.R. Fortin is the recipient of a tier 1 Canada Research Chair on Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases. G.G. Poirier is the recipient of a CIHR grant. Y. Becker is the recipient of a fellowship from the FRQS (# 282342) and from the Arthritis Society (TGP-18-0257). V. Rubio is the recipient of grants from the Spanish Government (BFU2017-84264-P, *Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación*) and Fundación Ramón Areces XXth call. The authors acknowledge the contribution of Dominique Jean and François-Michel Boisvert (*Université de Sherbrooke*) on mass spectrometry experiments, and Jonathan Côté (CHU de Québec-Université Laval) on indirect immunofluorescence assays.

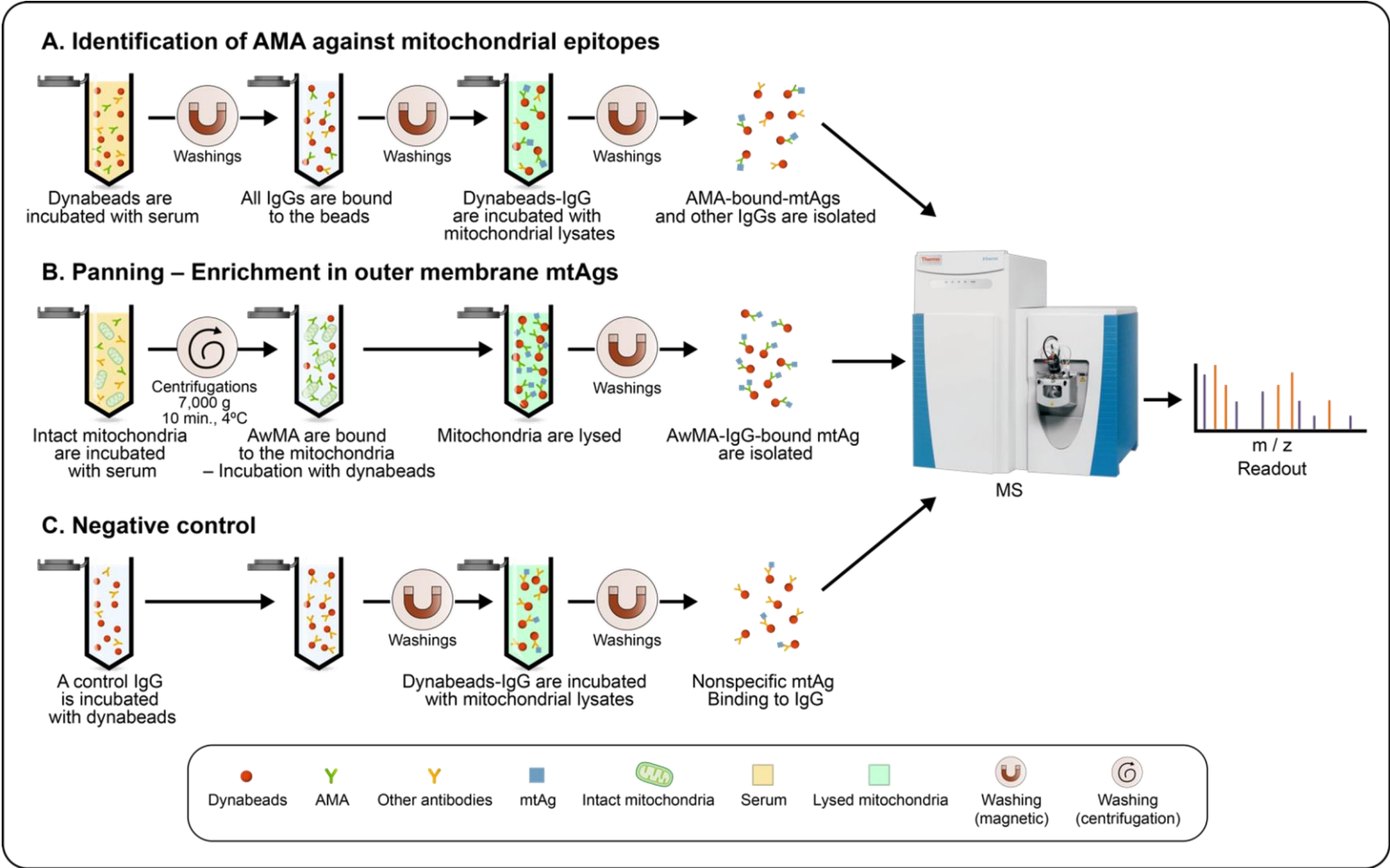
#### **4.8 Authorship details:**

Experiments were conceived and designed by Y. Becker, J-P. Gagné, G.G. Poirier, P.R. Fortin, and E. Boilard, and performed by Y. Becker and J-P. Gagné. Contributed, resources and expertise: J-P. Gagné, G.G. Poirier, N. Gougeard, V. Rubio, E. Wagner; T. Lévesque and I. Allaeys. Data were processed and analyzed by Y. Becker, J-P. Gagné, A-S. Julien, and supervised by E. Boilard and P.R. Fortin. The manuscript was written by Y. Becker and E. Boilard, and critically reviewed by all authors.

#### **4.9 Conflict of Interest:**

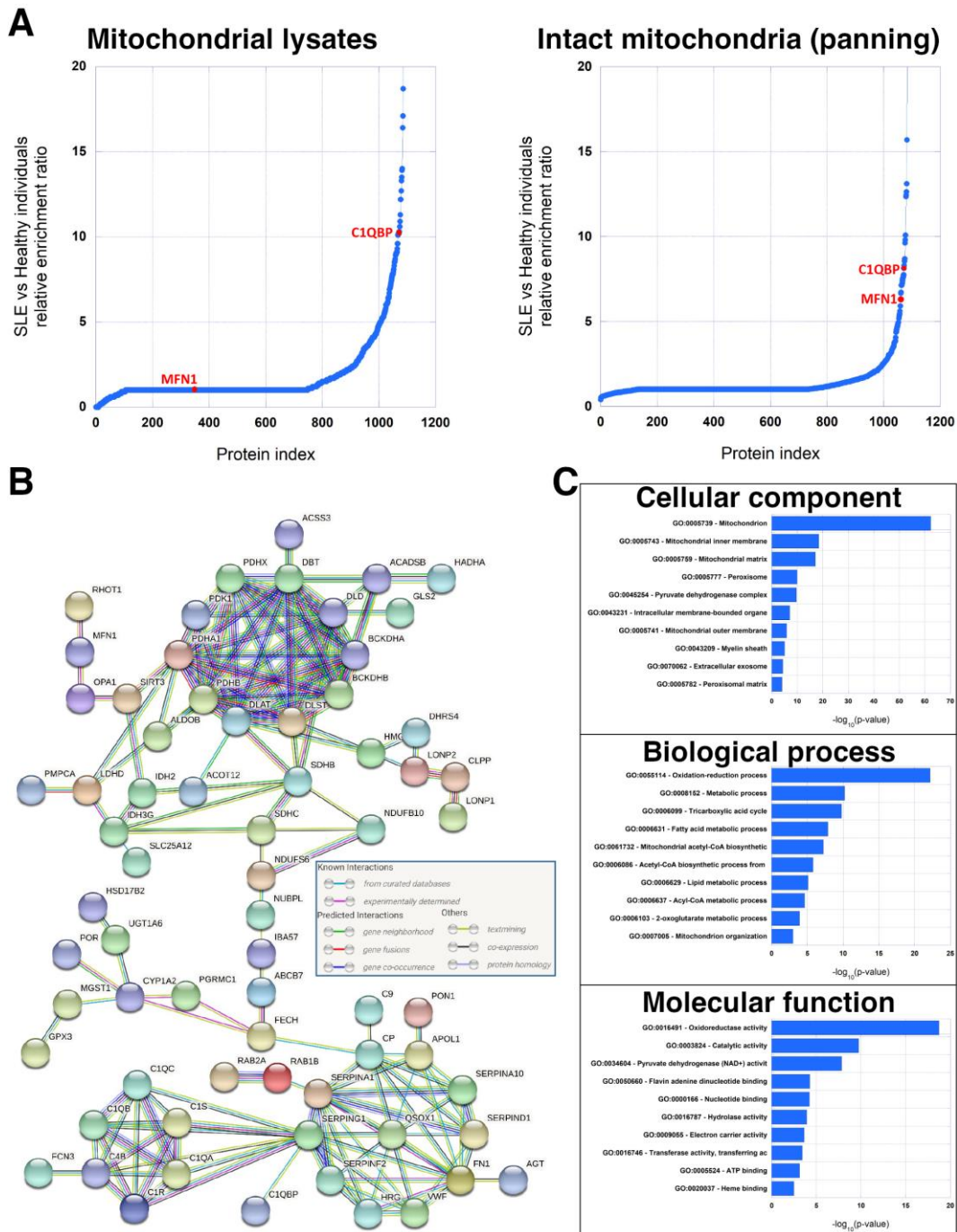
YB, PRF and EB have filed a provisional patent related to the work presented herein.

4.10 Figures:



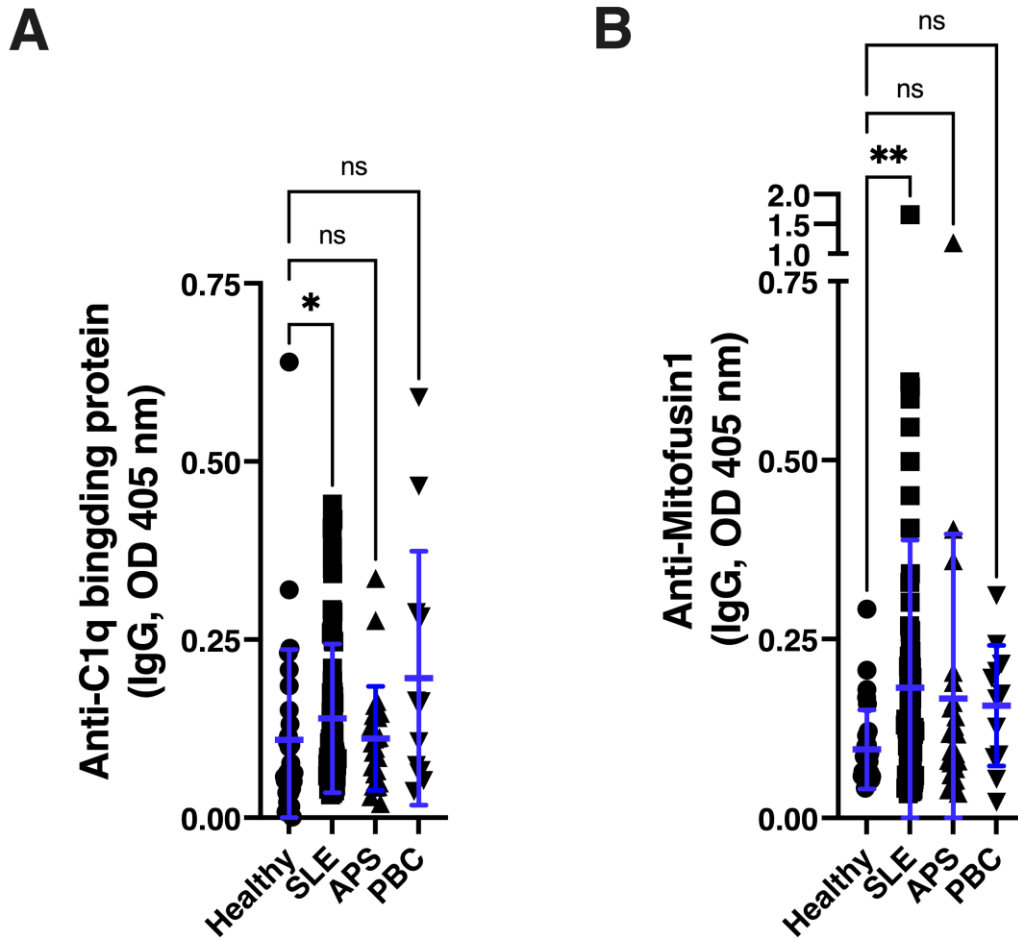
**4.10. Figure 1: Workflow used for the detection of mitochondrial antigens targeted by anti-mitochondrial antibodies in SLE.**

(A) Antibodies of the IgG subclass are isolated, using Dynabeads®-Protein G, from pooled sera from either 10 healthy donors or 10 SLE patients with high levels of anti-whole mitochondrial IgG (AwMA-IgG). Dynabeads®-bound IgG were subsequently incubated with mitochondrial lysates, allowing the affinity purification of mitochondrial antigens (mtAgs) from all sub-localizations. (B) Freshly isolated intact mitochondria were incubated with pooled sera. Mitochondria incubated with AwMA were then lysed and AwMA-IgG isolated with Dynabeads™. (C) An irrelevant monoclonal IgG targeting FcγRIIa – a protein absent from mitochondria, is bound to Dynabeads™ and incubated with mitochondrial lysates in order to identify non-specific binding of mtAgs. For each approach, samples were acquired in triplicate and mtAgs were identified by mass-spectrometry (MS).



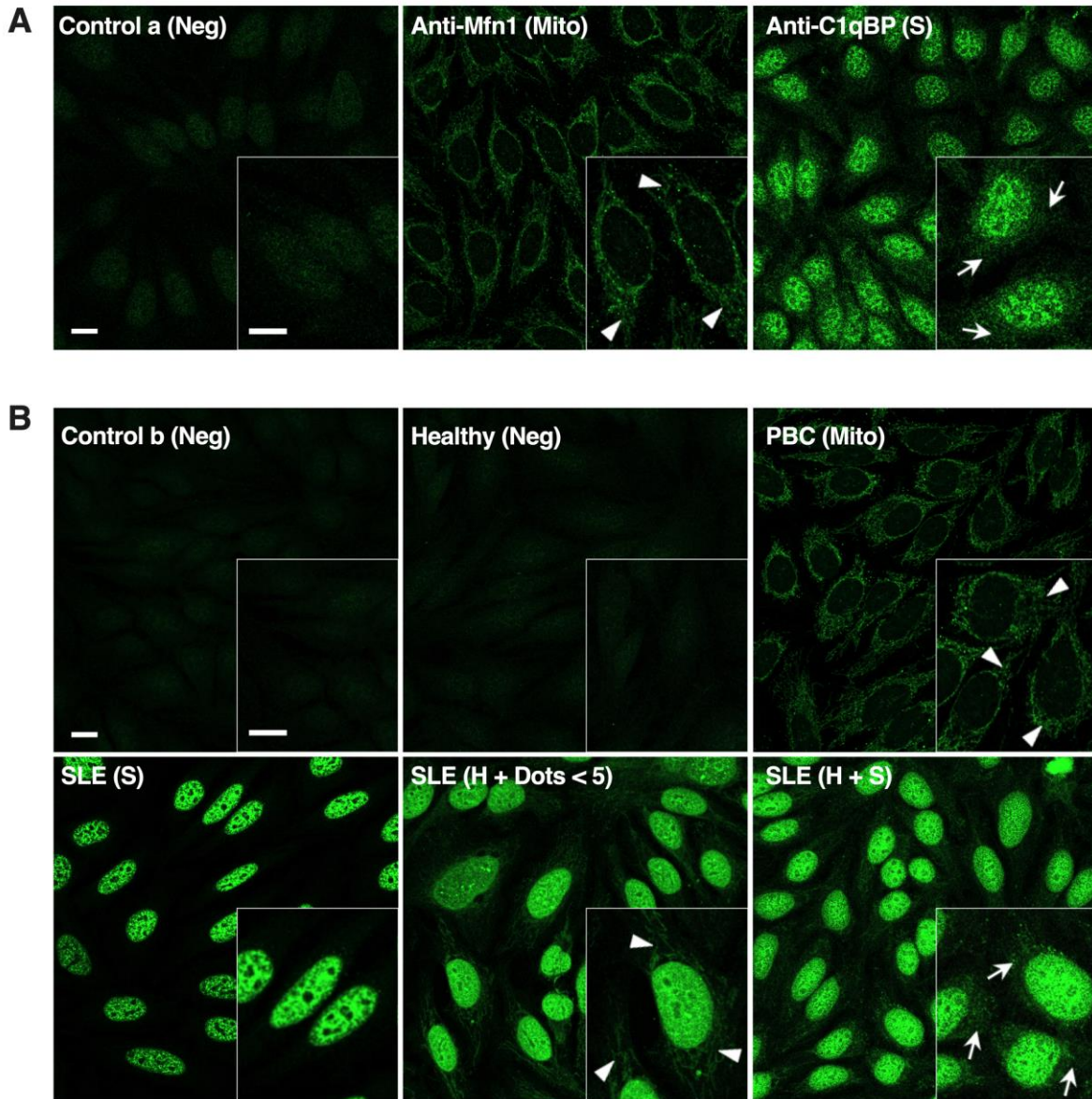
**4.10. Figure 2: Mitochondrial hits identified and their mitochondrial sub-localization.**

(A) Proteins are plotted in the order of increasing ratio. A ratio > 1 suggests enrichment in SLE patients relative to healthy individuals. Refer to **Supplementary Table 4** for a complete protein listing and calculated ratios. (B) High-confidence protein interaction networks of proteins enriched in SLE patients (ratio > 2). (C) Subcellular locations, processes and functions of the proteins targeted by AMA in SLE.



**4.10. Figure 3: C1qBP and Mfn1 are two surface mitochondrial antigens with increased immunoreactivity in SLE.**

Immunoreactivity against mitochondrial proteins was assessed by direct ELISA. (A) The receptor for the complement component C1q (C1qBP) is a protein stored within the mitochondrion and subsequently dispatched to the cell surface and/or released into the extracellular space. SLE patients display increased levels of IgGs targeting C1qBP, compared with healthy individuals ( $p=0.049$ ). (B) Mitofusin 1 (Mfn1) is a protein expressed at the surface of the mitochondrion and is responsible for the fusion of mitochondrial outer membranes; anti-Mfn-1-IgG are significantly increased in patients with SLE, compared with healthy donors ( $p=0.0044$ ). Of note neither autoantibodies were significantly increased in APS and PBC. Healthy:  $n=30$ , SLE:  $n=87$ , APS:  $n=27$ , PBC:  $n=12$ . Data are mean optical densities read at 405 nm ( $OD_{405\text{ nm}}$ )  $\pm$  standard deviation. Wilcoxon-Mann-Whitney test. Ns:  $p \geq 0.05$ ; \*:  $p \leq 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ .



**4.10. Figure 4: Indirect immunofluorescence (IIF) staining of Hep2 cells.**

(A) HEp2 cells were stained with an isotype-matched irrelevant antibody (Control a), or commercial antibodies (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  each) specific to either mitofusin 1 (Anti-Mfn1) or C1qBP (Anti-C1qBP). While anti-mfn1 displayed a reticular staining of the cytoplasm (arrowheads), typical of anti-mitochondrial antibodies (Mito), anti-C1qBP provided a speckled staining of the nucleus (S) and the cytoplasm (arrows). (B, *top row*) HEp2 cells, stained with a FITC-labelled anti-human IgG secondary antibody (Control b. Human serum-based negative control: Liquicheck negative control, Bio-Rad Laboratories,



Hercules, CA), or diluted sera (1:80) from healthy donors - negative for AwMA, provided no signal (Neg). Sera from PBC patients showed the typical mitochondrial-associated cytoplasmic reticular staining pattern provided by AMA. (C, *bottom row*) Routine clinical staining of Hep2 cells with AwMA<sup>+</sup> SLE sera allowed for the observation of various nuclear fluorescence patterns [i.e. speckled, homogenous (H), dots] but no sample was qualified as positive for AMA. However, confocal microscopy revealed that some samples may display cytoplasmic patterns resembling those seen in PBC. Scale bar account for 10  $\mu$ m.

#### 4.11 Tables:

4.11.Table 1: Table 1: Associations between anti-C1qBP, anti-Mitofusin 1 and autoantibodies routinely assessed in SLE.

|                                    |                    | Anti-C1qBP   | Anti-Mitofusin 1 |
|------------------------------------|--------------------|--------------|------------------|
| Anti-phospholipids                 | Negatives (n = 51) | 0.09 ± 0.11  | 0.12 ± 0.11      |
|                                    | Positives (n = 23) | 0.12 ± 0.21  | 0.18 ± 0.15      |
|                                    | p-value            | 0.097        | <b>0.011</b>     |
| Anticardiolipin                    | Negatives (n = 60) | 0.09 ± 0.11  | 0.12 ± 0.10      |
|                                    | Positives (n = 14) | 0.17 ± 0.27  | 0.25 ± 0.24      |
|                                    | p-value            | 0.053        | <b>0.0004</b>    |
| Anti-β <sub>2</sub> Glycoprotein I | Negatives (n = 64) | 0.09 ± 0.11  | 0.12 ± 0.13      |
|                                    | Positives (n = 10) | 0.11 ± 0.24  | 0.22 ± 0.25      |
|                                    | p-value            | 0.656        | 0.065            |
| Lupus anticoagulant                | Negatives (n = 67) | 0.09 ± 0.10  | 0.12 ± 0.13      |
|                                    | Positives (n = 12) | 0.13 ± 0.24  | 0.18 ± 0.12      |
|                                    | p-value            | <b>0.049</b> | 0.068            |
| Anti-double-stranded DNA           | Negatives (n = 62) | 0.09 ± 0.10  | 0.12 ± 0.08      |
|                                    | Positives (n = 20) | 0.10 ± 0.18  | 0.22 ± 0.23      |
|                                    | p-value            | 0.602        | <b>0.0005</b>    |

Positivity to anti-phospholipids is defined here as the positivity to any, or a combination of the various anti-phospholipids assessed. Data are median ± IQR. Associations presented, herein, for anti-cardiolipin, anti-β<sub>2</sub>-GPI and anti-dsDNA were tested for IgGs.

4.11. Table 2: Correlations between anti-C1qBP, anti-Mitofusin 1 and clinical serologies and AMAs in SLE patients.

|                               |  | Anti-C1qBP                 | Anti-Mitofusin 1             |                              |
|-------------------------------|--|----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Clinical serology             | Anticardiolipin antibodies<br>(n = 80)     | $r_s = 0.25$<br>$p = 0.02$ | $r_s = 0.45$<br>$p < 0.0001$ |                              |
|                               | Anti- $\beta_2$ Glycoprotein I<br>(n = 80) | $r_s = 0.12$<br>$p = 0.28$ | $r_s = 0.26$<br>$p = 0.02$   |                              |
|                               | Anti-double-stranded DNA<br>(n = 22)       | $r_s = 0.11$<br>$p = 0.63$ | $r_s = 0.44$<br>$p = 0.04$   |                              |
| Anti-mitochondrial antibodies | Anti whole mitochondria<br>(AwMA)          | IgG                        | $r_s = 0.32$<br>$p = 0.003$  | $r_s = 0.65$<br>$p < 0.0001$ |
|                               |  | IgM                        | $r_s = 0.08$<br>$p = 0.46$   | $r_s = 0.31$<br>$p = 0.003$  |
|                               | Anti-mitochondrial DNA<br>(AmtDNA)         | IgG                        | $r_s = 0.23$<br>$p = 0.03$   | $r_s = 0.52$<br>$p < 0.0001$ |
|                               |  | IgM                        | $r_s = 0.07$<br>$p = 0.50$   | $r_s = 0.24$<br>$p = 0.03$   |
|                               | Anti-mitochondrial RNA<br>(AmtRNA)         | IgG                        | $r_s = 0.03$<br>$p = 0.75$   | $r_s = 0.27$<br>$p = 0.01$   |
|                               |  | IgM                        | $r_s = 0.03$<br>$p = 0.82$   | $r_s = 0.27$<br>$p = 0.01$   |

Correlations presented, herein, for anti-cardiolipins or anti- $\beta_2$ -GPI were tested for IgGs.

## 4.12 Supplementary information:

### 4.12.1. Supplementary methods

*4.12.1.1. Human serum samples – healthy donors, and patients with SLE or APS from the CHU de Québec – Université Laval Systemic Autoimmune Rheumatic Disease Biobank and DataBase repository (SARD-BDB).*

#### **Human serum samples from healthy donors and patients with autoimmune conditions:**

This study was approved by the research ethics board of the *CHU de Québec – Université Laval* (CHUL. #B13-06-1243 and #B14-08-2108). Healthy volunteers (i.e. with no signs or symptoms of acute infection and not on medications) were recruited at the CHUL. Serum samples were obtained from peripheral blood punctures performed at the time of inclusion. In accordance with the Declaration of Helsinki, written consent was provided by each subject, and their clinical information and biological specimen were associated with an anonymized reference number. A convenience sample was used and no sample size calculation was done. SLE patients met ACR classification criteria and each of the 11 categories was documented<sup>666,667</sup>. APS patients met the 2006 revised Sapporo Criteria<sup>411</sup>, and PBC patients the 2018 PBC classification criteria<sup>770</sup>.

**Clinical data collection:** Information on sociodemographic variables (e.g. age, sex, ethnicity. **Supplementary Table 1**) were collected at the first visit of the patients at the SARD-BDB. Smoking history was characterized as any the consumption of tobacco, past or present. Body metrics and blood pressure were measured at the time of the visit, and co-morbidities were documented as present or absent. Information about SLE indexes was collected during the clinical visit corresponding to the blood sample drawn. Medications presented in **Supplementary Table 1** were defined as treatments, ongoing at the time of the visit – apart from corticosteroids, that was defined as the use of prednisone in the past year.

Each of the 11 categories of the ACR classification criteria was documented<sup>666,667</sup>. Disease activity was assessed, using the SLE Disease Activity Index–2000

(SLEDAI-2K)<sup>813,814</sup>. SLE damages were evaluated using the Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC)/ACR damage index (SDI) (**Supplementary Table 2**)<sup>815,816</sup>. Positivity for the various clinical outcomes assessed (e.g. lupus nephritis, arthritis, dermatological manifestations, thrombovascular events) was defined as past or present reports of one or more of these events, as defined by the SLICC Classification criteria for SLE<sup>669</sup>.

**Data from SLE patients' serology:** Blood samples drawn at the time of the visit in the SARD-BDB were used to assess the various autoantibodies measured. Serological data was obtained as part of the routine care and included measurements of anti-dsDNA, anticardiolipin and anti- $\beta_2$ GPI antibodies by ELISA (i.e. laboratory cut-off of 40 UPL or above the 99<sup>th</sup> percentile of controls). Detection of LA activity was performed, following international guidelines for this assay<sup>817</sup>. Detection of AMA (i.e. AwMA, AmtDNA, AmtRNA, IgG and IgM) was performed by our research laboratory, as previously published<sup>2</sup> (**Supplementary Table 3**).

*4.12.1.2. Sample preparation for the identification of mitochondrial antigens targeted by AMA in SLE using mass spectrometry:*

**Preparation of mitochondrial lysates:** Freshly isolated mitochondria were used for the panning of antibodies targeting the mitochondrial outer membrane (i.e. anti-whole mitochondria antibodies, AwMA). Dry-pelleted mitochondria were stored at -80°C until needed. Frozen mitochondria were resuspended in hypotonic lysis buffer (10mM HEPES, 2mM KCl, 0.1% CHAPS, pH7.2) with protease inhibitors (cOmplete protease inhibitor cocktail; Roche, Basel, Switzerland) and underwent three cycles, alternating between thawing in a water bath (37°C) and freezing in an ethanol-dry ice bath, followed by a 15min sonication in an ice bath. Unbroken mitochondria were pelleted at 7,000g for 10min at 4°C and discarded. Supernatant protein (i.e. mitochondrial lysates) content was determined by the bicinchoninic acid method (BCA protein assay kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Nucleic acids were digested by addition

of benzonase nuclease (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA. 100 U/mL, 30min, 37°C). Lysates were stored at -80°C until use.

***Serum selection and pooling:*** Optical densities at 405 nm (OD<sub>405 nm</sub>) for 1:150 dilutions of serum samples from the SARD-BDB were previously assessed with our direct AwMA-ELISA<sup>2</sup> and a cut-off value for positivity to AwMA-IgG was calculated for OD<sub>405 nm</sub> values  $\geq 0.30$ . To account for interpersonal variabilities in autoantibody production, equal volumes of sera from either ten healthy donors (OD<sub>405 nm</sub> values ranging from 0.08 to 0.17), or from ten SLE patients positive for AwMA (OD<sub>405 nm</sub>, 0.68 to 3.00) were pooled and their IgG concentrations were determined by Human IgG total uncoated ELISA kit (Thermo Fisher Scientific). Experiments were performed in triplicate.

#### *4.12.1.3. Identification of mitochondrial antigens recognized by AMA:*

***LC-MS/MS analysis:*** Trypsin/Lys-C-digested peptides were separated on a Dionex Ultimate 3000 nanoHPLC system coupled to a Q Exactive™ OrbiTrap mass spectrometer (Thermo Fisher). 10µl of sample (a total of 1.5µg) resuspended in 1% (vol/vol) formic acid were loaded with a constant flow of 4 µl/min onto an Acclaim PepMap100 C18 column (0.3mm id × 5mm; Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA). After trap enrichment, peptides were eluted onto an EasySpray PepMap C18 nano column (75µm × 50cm; Dionex Corporation) with a linear gradient of 8–40% solvent B (80% acetonitrile with 0.1% formic acid) over 240min with a constant flow of 200nl/min. The HPLC system was coupled to the mass spectrometer via an EasySpray source. The spray voltage was set to 2.0kV and the temperature of the column set to 40°C. Full scan MS survey spectra (m/z 350–1600) in profile mode were acquired in the Orbitrap with a resolution of 70,000 after accumulation of 1,000,000 ions. The ten most intense peptide ions from the preview scan in the Orbitrap were fragmented by collision-induced dissociation (normalized collision energy 25% and resolution of 17,500) after the accumulation of 50,000 ions. Maximal filling times were 250ms for the full scans and

60ms for the MS/MS scans. Precursor ion charge state screening was enabled and all unassigned charge states as well as single, 7 and 8 charged species were rejected. The dynamic exclusion list was restricted to a maximum of 500 entries with a maximum retention period of 40 seconds and a relative mass window of 10ppm. The lock mass option was enabled for survey scans to improve mass accuracy. Data were acquired using the XCalibur software (Thermo Fisher Scientific).

**Mass spectrometry data analysis:** Mass spectra data (.RAW files) were loaded into MaxQuant version 1.6.17.0 and searched against a protein database generated by merging the *Homo sapiens* and *Mus musculus* reference proteomes (Uniprot, versions 01-29-2021: 77 027 human and 55 470 mouse proteins) complemented with a list of common contaminants maintained by MaxQuant and concatenated with the reversed version of all sequences (decoy mode). The minimum peptide length was set to 7 amino acids and trypsin was specified as the protease allowing up to two missed cleavages. The mass tolerance was set to 7ppm for the precursor ions and 20ppm for the fragment ions. The following parameters were used: fixed carbamidomethylation of cysteine (+57.0214 Da), oxidation of methionine (+15.9949 Da) as a variable modification and a peptide-spectrum and protein match false-discovery rate of 0.01.

Intensity-based label-free quantification (LFQ) values were used to estimate the relative abundance of proteins in each replicate groups, which correspond to the sum of all peak intensities over all tandem mass spectra assigned to a particular protein. Missing LFQ data imputation was estimated by using a noise value corresponding to the lowest 1% percentile of the LFQ distribution. This noise value was imputed for each sample when the intensity value is missing (i.e. undetected proteins) and selected as the minimum LFQ intensity for low abundance protein identification for which LFQ values fall below the 1% percentile background.

***Filtering and data analysis of proteomic data:*** Matches to reverse proteins, proteins with zero intensity values in all datasets, proteins with negative MaxQuant scores and common contaminants were removed from the final protein repertoire. Identified proteins were cross-referenced using their Uniprot ID for their cellular localization and, when the information was available, for their mitochondrial sub-localization. Pathways involving the mitochondrial proteins identified were analyzed, using the Reactome pathway knowledge base <https://reactome.org/> and the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID).

#### *4.12.1.4. Detection of autoantibodies targeting selected mitochondrial antigens*

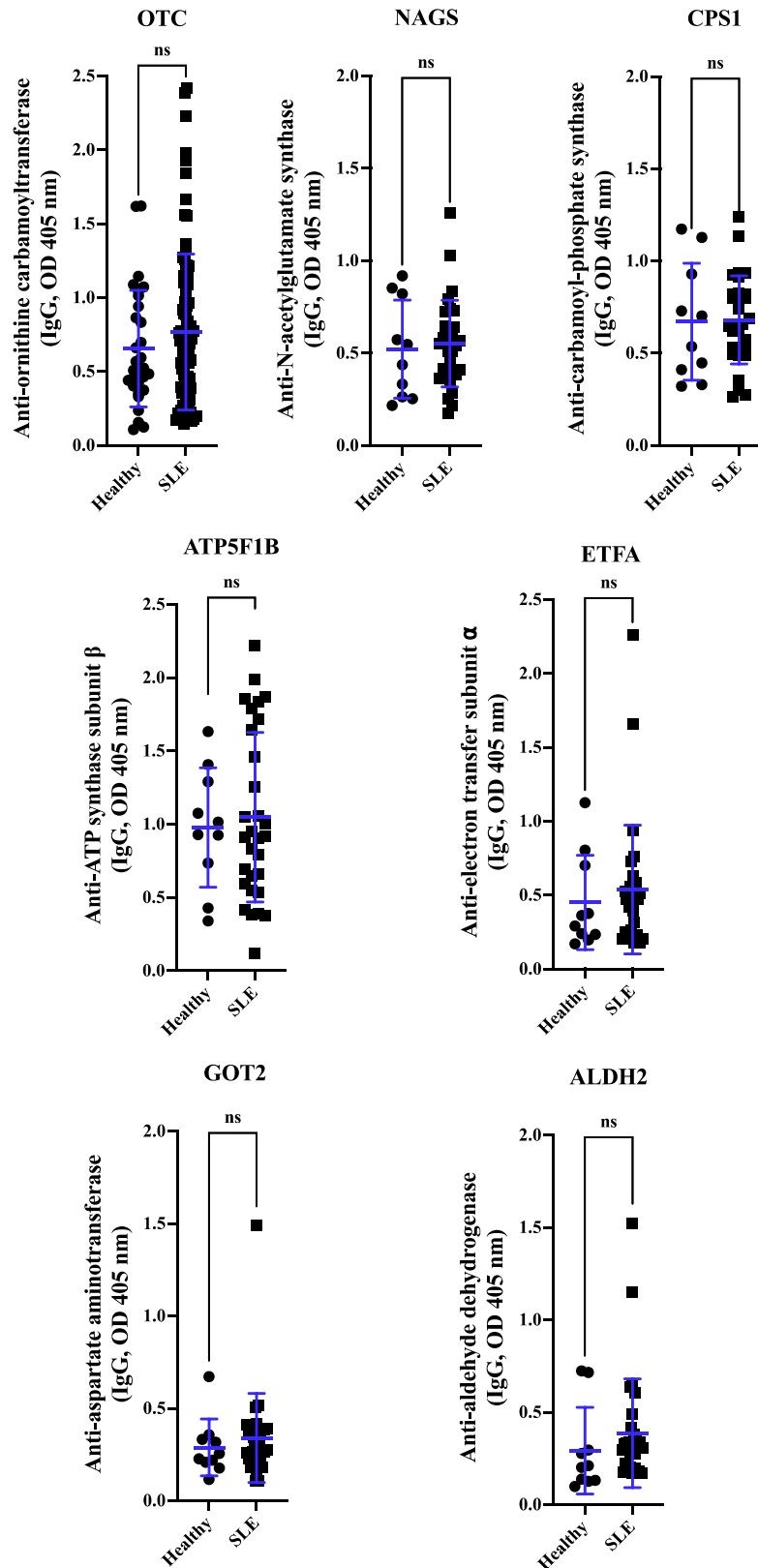
***Enzyme-Linked Immunoassays (ELISAs):*** Detection of IgG, using various sources of mtAgs (i.e. whole/intact mitochondria, mtDNA, mtRNA) were performed as previously described<sup>2-4</sup>. Immunoreactivity against other mitochondrial proteins were assessed. These proteins included the complement component 1 Q subcomponent-binding protein (C1qBP. Novus Biologicals, Centennial, CO, USA), mitofusin 1 (Mfn 1. Origene Technologies, Rockville, MD, USA) (Healthy: n=30, SLE: n=87, APS: n=27, PBC: n=12). Other mitochondrial proteins available, with MIM or MM locations identified by our proteomic approaches were assessed (Healthy: n=10; SLE n=30). These miscellaneous proteins were three representatives of the urea pathways [i.e. ornithine carbamoyltransferase (OTC), carbamoyl-phosphate synthase (CPS1) and N-acetylglutamate synthase (NAGS)] and two proteins implicated in electron transfer and oxidative phosphorylation [i.e. the beta subunit of the MIM complex ATP synthase (ATP5F1B. Cusabio, Wuhan, China) and electron transfer flavoprotein subunit alpha (ETFA. Origene Technologies)] as well as two proteins involved in metabolic processes [i.e. aspartate aminotransferase (GOT2. BioVision Inc., Milpitas, California, USA) and aldehyde dehydrogenase (ALDH2. RayBiotech Life, Peachtree Corners, GA, USA)]. OTC, CPS 1 and NAGS were prepared as published<sup>855,856</sup>. Immunoreactivities against recombinant mitochondrial proteins were assessed by coating plates overnight at 4°C with 225ng protein in 25µL PBS 1X (i.e. 9ng/µL).



#### *4.12.1.5. Statistical analyses:*

The logistic regression models to predict diagnosis were adjusted for sex and age, and are expressed as their adjusted odds ratio (aOR), 95% confidence interval (95% CI) and p-value. Univariable and multivariable logistic and linear regressions were performed to predict clinical outcomes (thrombosis, presence of carotid plaque, presence of damage according to SLICC Damage Index, presence of disease activity [SLEDAI-2k > 4], presence of nephropathies, presence of dermatological disorder and presence of arthritis, as well as continuous variables carotid intima-media thickness and Lupus Severity Index Score), separately for C1qBP and Mfn1. These models were adjusted for disease duration, age, BMI, sex, antimalarial drugs, and prednisone use.

#### 4.12.2 Supplementary figure:



#### **4.12.2. Supplementary Figure 1: Immunoreactivity of several mitochondrial proteins in SLE.**

Autoantibodies against mitochondrial proteins implicated in the urea cycle (i.e., OTC, NAGS, CPS1), OxPhos (i.e., ATP5F1B, ETFA) and mitochondrial metabolism (i.e., GOT2, ALDH2) were assessed in serum samples from the SARD-BDB (Anti-OTC-IgG: Healthy n=30, SLE: n=87. Other autoantibodies: Healthy n=10, SLE: n=30). No differences were observed between the two groups for any of the antigens assessed. Data are mean optical densities read at 405 nm ( $OD_{405\text{ nm}}$ )  $\pm$  standard deviation. Wilcoxon-Mann Whitney test. Ns:  $p > 0.05$ .

**Abbreviations:** ALDH2: aldehyde dehydrogenase. ATP5F1B: ATP synthase –  $\beta$  subunit. CPS1: carbamoyl-phosphate synthase. ETFA: electron transfer flavoprotein subunit  $\alpha$ . GOT2: Aspartate aminotransferase. NAGS: N-acetylglutamate synthase. OTC: ornithine carbamoyltransferase.

### 4.12.3 Supplementary tables

**4.12.3. Supplementary Table 1: Sociodemographic and clinical characteristics of the SLE patients included in the SARD-BDB.**

| Variable                   |  | Sample size | Value [n (%) or median $\pm$ IQR] |
|----------------------------|--|-------------|-----------------------------------|
| Sex (%)                    | Female                                       | 87          | 72 (82.8)                         |
|                            | Male   |             | 15 (17.2)                         |
| Age, in years              |  | 86          | 49.58 $\pm$ 20.65                 |
| Ethnicity (%)              | Caucasian                                    | 86          | 84 (97.7)                         |
|                            | Black  |             | 1 (1.2)                           |
|                            | Other  |             | 1 (1.2)                           |
| Disease duration, in years |  | 87          | 5.00 $\pm$ 19                     |
| Body metrics               | Waist, in cm                                 | 61          | 87 $\pm$ 17                       |
|                            | Hip, in cm                                   | 59          | 98 $\pm$ 10                       |
|                            | Waist / Hip ratio                            | 59          | 0.86 $\pm$ 0.11                   |
| Blood pressure (mmHg)      | Systolic                                     | 69          | 124 $\pm$ 15                      |
|                            | Diastolic                                    | 69          | 73 $\pm$ 12                       |
| Comorbidities (%)          | Menopause                                    | 65          | 38 (58.5)                         |
|                            | Tobacco, past or present                     | 83          | 35 (42.2)                         |
|                            | Obesity ( <i>i.e.</i> BMI $\geq$ 30)         | 86          | 13 (15.1)                         |
|                            | Hypertension                                 | 87          | 11 (12.6)                         |
|                            | Diabetes                                     | 86          | 2 (2.3)                           |
|                            | Dyslipidaemia                                | 87          | 7 (8.0)                           |
| Medications (%)            | Corticosteroids                              | 86          | 17 (19.8)                         |
|                            | Hydroxychloroquine                           | 87          | 65 (74.7)                         |
|                            | Chloroquine                                  | 87          | 6 (6.9)                           |
|                            | Azathioprine                                 | 87          | 15 (17.2)                         |
|                            | Methotrexate                                 | 87          | 14 (16.1)                         |
|                            | Leflunomide                                  | 87          | 1 (1.1)                           |
|                            | Mycophenolate mofetil                        | 87          | 10 (11.5)                         |
|                            | Mycophenolic acid                            | 87          | 1 (1.1)                           |
|                            | Cyclophosphamide                             | 87          | 2 (2.3)                           |
|                            | Anti-platelet / anticoagulants               | 86          | 13 (15.1)                         |
|                            | Hormones replacement (estrogen/progesterone) | 87          | 2 (2.3)                           |
|                            | Contraception                                | 87          | 5 (5.7)                           |
|                            | Diabetes medication                          | 86          | 2 (2.3)                           |
|                            | Lipid lowering drug                          | 86          | 14 (16.3)                         |

4.12.3. Supplementary table 2: SLE disease characteristics expressed by the patients included in the SARD-BDB.

|  | Variable                        | Sample size | Value [n(%) or median $\pm$ IQR] |
|--|---------------------------------|-------------|----------------------------------|
| Clinical Scores  | ACR                             | 86          | 5.00 $\pm$ 2.00                  |
|  | LSI                             | 86          | 5.62 $\pm$ 2.92                  |
|  | SDI                             | 86          | 0.00 $\pm$ 1.00                  |
|  | SLEDAI - 2K                     | 86          | 2.00 $\pm$ 6.00                  |
| American College of Rheumatology Classification criteria | Malar rash                      | 86          | 20 (23.3)                        |
|  | Discoid rash                    | 86          | 13 (15.1)                        |
|  | Photosensitivity                | 86          | 37 (43.0)                        |
|  | Oral ulcers                     | 86          | 27 (31.4)                        |
|  | Arthritis                       | 86          | 70 (81.4)                        |
|  | Serositis                       | 86          | 23 (26.7)                        |
|  | <i>Pleuritis</i>                | 86          | 17 (19.8)                        |
|  | <i>Pericarditis</i>             | 86          | 13 (15.1)                        |
|  | Renal disorders                 | 86          | 24 (27.9)                        |
|  | <i>Proteinuria</i>              | 86          | 24 (27.9)                        |
|  | <i>Cellular casts</i>           | 86          | 9 (10.5)                         |
|  | Neurological disorders          | 86          | 4 (4.7)                          |
|  | <i>Seizure</i>                  | 86          | 4 (4.7)                          |
|  | <i>Psychosis</i>                | 86          | 1 (1.2)                          |
|  | Haematological disorders        | 86          | 69 (80.2)                        |
|  | <i>Haemolytic anemia</i>        | 86          | 5 (5.8)                          |
|  | <i>Leucopenia</i>               | 86          | 33 (38.4)                        |
|  | <i>Lymphopenia</i>              | 86          | 51 (58.6)                        |
|  | <i>Thrombocytopenia</i>         | 86          | 24 (59.3)                        |
|  | Anti-nuclear antibodies         | 86          | 86 (100)                         |
|  | Immunological disorders         | 86          | 63 (73.3)                        |
|  | <i>Anti-double-stranded DNA</i> | 86          | 49 (57.0)                        |
|  | <i>Anti-Smith</i>               | 86          | 12 (14.0)                        |
|  | <i>Antiphospholipids</i>        | 86          | 42 (48.8)                        |
|  | <i>Anticardiolipin</i>          | 86          | 29 (33.7)                        |
|  | <i>Lupus anticoagulant</i>      | 86          | 23 (26.7)                        |
| <i>Venereal Disease Research Laboratory</i>              | 86                              | 2 (2.3)     |                                  |
| Miscellaneous clinical information                       | Platelets                       | 87          | 211 $\pm$ 82                     |
|  | Red blood cells                 | 87          | 5.60 $\pm$ 2.70                  |
|  | Carotid-intima media thickness  | 34          | 0.61 $\pm$ 0.12                  |
|  | Creatinine clearance            | 26          | 98.50 $\pm$ 22.00                |
|  | Thromboses                      | 87          | 10 (11.5)                        |
|  | Carotid plaque                  | 64          | 24 (37.5)                        |
|  | Dermatological manifestations   | 86          | 71 (82.6)                        |

4.12.3. Supplementary table 3: Continuous variables acquired in blood samples acquired from SLE patients drawn at the time of their inclusion in the SARD-BDB.

|                               | Variable                             | Sample size | Value (median $\pm$ IQR) |
|-------------------------------|--------------------------------------|-------------|--------------------------|
| Clinical serology             | Anticardiolipin - IgG                | 80          | 2.70 $\pm$ 6.30          |
|                               | - IgM                                | 80          | 6.95 $\pm$ 9.50          |
|                               | Anti- $\beta_2$ Glycoprotein I - IgG | 80          | 1.30 $\pm$ 0.80          |
|                               | - IgM                                | 80          | 2.15 $\pm$ 2.10          |
|                               | Anti-double-stranded DNA             | 22          | 6.00 $\pm$ 21            |
| Anti-mitochondrial antibodies | Anti-whole mitochondria - IgG        | 87          | 0.25 $\pm$ 0.19          |
|                               | - IgM                                | 87          | 0.41 $\pm$ 0.43          |
|                               | Anti-mitochondrial DNA - IgG         | 87          | 0.35 $\pm$ 0.25          |
|                               | - IgM                                | 87          | 0.37 $\pm$ 0.49          |
|                               | Anti-mitochondrial RNA - IgG         | 87          | 0.28 $\pm$ 0.47          |
|                               | - IgM                                | 87          | 0.37 $\pm$ 0.44          |
|                               | Anti-C1qBP - IgG                     | 87          | 0.13 $\pm$ 0.13          |
|                               | Anti-Mitofusine 1 - IgG              | 87          | 0.09 $\pm$ 0.11          |

**4.12.3. Supplementary table 4: Mass spectrometry identification of proteins associated with anti-mitochondrial autoantibodies in SLE.**

*See attached appendix*

**4.12.3. Supplementary table 5: Confocal microscopy observation in indirect immunofluorescence allows the detection of cytoplasmic patterns that are undetected using an epifluorescence microscope.**

|                                  | Type of microscope |             |
|----------------------------------|--------------------|-------------|
|                                  | Epifluorescence    | Confocal    |
| <b>Homogenous</b>                | 7 (77.78 %)        | 7 (77.78 %) |
| <b>Speckled</b>                  | 1 (11.11 %)        | 1 (11.11 %) |
| <b>Nucleolar</b>                 | 1 (11.11 %)        | 1 (11.11 %) |
| <b>Cytoplasmic/mitochondrial</b> | 0 (0 %)            | 7 (77.78 %) |
| <b>Negative</b>                  | 1 (11.11 %)        | 1 (11.11 %) |



**4.12.3. Supplementary table 6: Performance of cut-off values for anti-C1qBP and anti-Mitofusin 1.**

|                         | Cut-off                  | Sensitivity             | Specificity             | PPV                     | NPV                      | AUC                   | p-value           |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------|-------------------|
| <b>Anti-C1qBP</b>       | 0.064<br>(0.038 - 0.419) | 0.79<br>(0.693 - 0.873) | 0.53<br>(0.343 - 0.717) | 0.83<br>(0.733 - 0.905) | 0.47<br>(0.298 - 0.649)  | 0.65<br>(0.52 - 0.78) | <b>0.021</b>      |
| <b>Anti-Mitofusin 1</b> | 0.116<br>(0.088 - 0.125) | 0.61<br>(0.499 - 0.712) | 0.80<br>(0.614 - 0.923) | 0.90<br>(0.792 - 0.962) | 0.41<br>(0.2860 - 0.551) | 0.69<br>(0.59 - 0.79) | <b>&lt; 0.001</b> |

Data are proportions (95% exact confidence interval), except for the cut-off with 95% bootstrap confidence interval. PPV=positive predictive value. NPV=negative predictive value. AUC=Area under the curve. P-value for the test H0: AUC=0.50, H1 : AUC≠0.50.

# Conclusion

## Mise en contexte

Les mitochondries sont des organelles intracellulaires impliquées dans de nombreuses voies métaboliques, concourantes à la production d'énergie et/ou de biomolécules nécessaires aux fonctions cellulaires. Par ailleurs, les mitochondries sont aussi impliquées dans la mort cellulaire programmée par apoptose. L'origine procaryote de l'organelle a été rapportée et justifie l'expression par la mitochondrie de molécules caractéristiques des bactéries (e.g., génome hypométhylé, peptides N-formylés) <sup>298,311,326-329,357,358</sup>. En temps normal, les mitochondries sont présentes au sein de la cellule, mais peuvent être extrudées à destination du milieu extracellulaire <sup>303-305</sup> lors d'évènements d'activation <sup>298,303,304,310-315,748</sup> ou de mort cellulaire <sup>187,306-309</sup>. Les mitochondries intactes, endommagées ou bien les composantes mitochondriales présentes hors de la cellule pourront être détectées en tant que mtDAMPs par les PRRs exprimés par les cellules du système immunitaire inné et promouvoir une réponse proinflammatoire <sup>187,305,365,380,381,384-386,749</sup>. Bien que son origine reste méconnue, une réponse humorale dirigée contre les mitochondries a été décrite dans différentes conditions présentant une composante auto-immune (e.g., PBC, SLE, APS, maladies cardiovasculaires, troubles iatrogènes) <sup>399</sup>. Ainsi, les AMA-M2 sont des biomarqueurs dont la détection est requise pour établir un diagnostic de PBC <sup>401,402,587</sup>. En janvier 2018, date de début de mon programme doctoral, l'antigénicité mitochondriale avait principalement été étudiée dans le cadre de la caractérisation des 9 types d'AMA et des anti-HSP60 <sup>399,422,650</sup>. Les aCL (i.e., comprenant les AMA-M1) participent à la composante sérologique du diagnostic de l'APS et les anti-HSP60 sont associés avec les thromboses artérielles chez les patients lupiques positifs pour les aPL <sup>410,411,422,650</sup>.

Toutefois, les protéines mitochondriales dans le SLE étaient encore méconnues et aucun anticorps n'avait été directement associé avec les manifestations de la maladie. **Les travaux présentés dans cette thèse portent sur la caractérisation de l'antigénicité mitochondriale dans le SLE et l'APS.**

## **Inconvénients et avantages des méthodes utilisées :**

Le principal défaut de notre approche réside dans la nature transversale (i.e., *cross-sectional*) des cohortes de l'UTLC et des MRAS <sup>2-4</sup> (**Chapitres 1 à 4**). Ainsi, les échantillons de séra utilisés ne sont représentatifs que d'un unique point dans le temps (i.e., celui de la prise de sang). Les niveaux des autoanticorps circulants pouvant fluctuer au cours de la maladie, ces échantillons ne reflètent que les paramètres sérologiques du patient au moment de la prise de sang, et peuvent par conséquent différer des bilans sérologiques ayant concouru à établir un diagnostic clinique.

De même, les patients APS inclus dans la cohorte MRAS permettent d'apprécier la présence d'AMA chez des patients qui remplissent les critères de Sapporo/Sydney (**Chapitre 3**). Toutefois, la faible taille de l'échantillon, et par extension des différentes variations des manifestations cliniques de la maladie ne permettent pas d'avoir la puissance statistique suffisante pour déterminer avec précision la capacité des AMA à discriminer les différentes formes cliniques de la maladie (i.e., PAPS, SAPS, TAPS, OAPS et CAPS) ou bien à apprécier leurs associations biostatistiques avec chacune des différentes manifestations (e.g., thromboses veineuses, artérielles ou microvasculaires, avortements spontanés précoces, prééclampsies).

La force de mon projet est qu'il propose des techniques versatiles et robustes permettant la détection des autoanticorps à l'aide de divers antigènes (e.g., mitochondries, mtDNA, mtRNA, protéines recombinantes, cardiolipine, LPS. **Chapitres 1, 2, 4** et **Annexe**) dans de nombreux modèles (e.g., échantillons de patients ou de souris) et à l'aide de différents fluides biologiques (e.g., produits sanguins, urine) <sup>2-4,305</sup>. Ces ELISAs ont par ailleurs confirmé la production d'AwMA et d'AmtDNA avant les manifestations aux organes dans un modèle de SLE murin <sup>305</sup>. Ce qui indique que la détection des AMA par ELISA direct est une méthode permettant d'étudier les AMA au cours de la pathogenèse du SLE dans un modèle murin, autant que des niveaux d'AMA au fil des phases d'exacerbation et de rémission chez les patients. Un autre avantage de cette technique est qu'elle peut être adaptée pour détecter différents isotypes d'anticorps (**Chapitres 2 et 3**. E.g., IgGs, IgMs, IgAs) ainsi que la réactivité croisée entre un antigène-cible et un compétiteur (**Chapitre 1**)

Une approche similaire à celle présentée ici a été utilisée afin de détecter les AMA dans les plasmas de 204 patients lupiques inclus dans une cohorte du *Karolinska Institutet* (Stockholm, Suède) avec des résultats comparables aux miens <sup>857</sup>, confirmant ainsi la robustesse des résultats que j'ai obtenus.

## Résumé des découvertes et discussion

### Les mitochondries sont immunogéniques dans le SLE.

Les AMA sont connus depuis plusieurs décennies pour être des autoanticorps exprimés chez des patients souffrant de maladies à composantes auto-immunes avec des manifestations impliquant des tissus riches en mitochondries <sup>3,399</sup>. Dans la PBC (i.e., maladie hépatique et biliaire), les AMA ciblent différentes protéines mitochondriales dont PDC-E2, la *sulfite oxidase* et la *glycogen phosphorylase* <sup>805,806,820-824,826</sup>. Certains antidépresseurs de la famille des inhibiteurs de la *monoamine oxidase B* (e.g., Iproniazide/Marsilid®) peuvent causer des hépatites iatrogènes incluant l'expression d'AMA-M6, dirigés contre la même cible que ces drogues <sup>421,804,858</sup>. Chez certains patients souffrant de cardiomyopathies, il est possible de détecter des anticorps contre la *sarcosine dehydrogenase* et la *succinate dehydrogenase* <sup>416-418,859</sup>. Enfin, les aCL (i.e., incluant les AMA-M1) sont associés avec les manifestations thrombovasculaires de l'APS et sont associés à des manifestations thrombovasculaires <sup>779,780</sup>.

Mes travaux indiquent que les AMA sont associés, à la fois avec la présence de marqueurs sérologiques et les manifestations cliniques de la maladie. Les IgGs dirigés contre les mitochondries intactes sont significativement élevés chez les patients lupiques et leurs titres corrélaient avec ceux de l'ensemble des AMA mesurés dans le cadre de mon projet – à l'exception des anti-HSP60. (**Chapitres 1, 2 et 4**). Les AwMA-IgG ne sont toutefois associés avec aucune des manifestations cliniques mesurées. Cet ELISA utilisant des mitochondries entières, il mesure l'antigénicité générale de toute l'organelle ; ainsi il est possible que l'absence d'association cliniques soit liée à la détection simultanée de nombreux AMA reconnaissant les antigènes mitochondriaux. Il est donc nécessaire

de déterminer les biomolécules individuellement reconnues par les AMA afin de pouvoir apprécier leurs associations individuelles avec les critères cliniques exprimés par les patients (cf. **chapitre 4**). De même, l'oxydation *in vitro* des mitochondries n'occasionne pas de changement significatif de l'immunoréactivité des séra de patients contre l'organelle.

Ces résultats permettent une première appréciation de l'immunogénicité des mitochondries intactes dans le SLE. Les observations préalables ainsi que les travaux publiés par l'équipe du Dr. Boilard au cours de mon doctorat indiquent que les plaquettes activées peuvent extruder des mitochondries intactes – en contact direct avec la circulation ou bien empaquetées au sein d'un système membranaire d'origine plaquettaire – au cours de la physiopathologie du SLE <sup>305,313</sup>. Bien qu'il soit tentant de postuler que les AwMA mesurés chez les patients lupiques ciblent des antigènes exprimés à la surface de la mitochondrie (i.e., MOM), à destination du cytoplasme <sup>153,154</sup>, les paramètres expérimentaux des mesures réalisées ne permettent pas de l'affirmer. En effet, d'une part, la mitochondrie présente la capacité d'assembler le macropore permettant la fuite de composantes mitochondriales à destination du cytoplasme <sup>153,154</sup>. D'autre part, le pH du tampon carbonate-bicarbonate n'assure pas nécessairement la préservation de l'intégrité de l'organelle. Ainsi, les expériences réalisées ne permettent pas d'écarter la fuite de composantes mitochondriales et leur fixation au fond de la plaque ELISA, pour ultimement être reconnues par les autoanticorps de patients. Additionnement, les séra de patients positifs pour les AwMA sont capables de produire un marquage cytosolique moucheté (*speckled*) en immunofluorescence indirecte. Toutefois, nous n'avons pas détecté de motifs spécifiques à la présence des AMA (**Chapitre 4**). Considérant la taille de l'échantillon et la positivité de tous les patients de la cohorte MRAS pour le facteur anti-nucléaire, ces résultats sont préliminaires et nécessiteront d'être confirmés à l'aide d'un plus grand nombre d'échantillons avec des présentations cliniques plus diversifiées. En considérant l'immunogénicité des acides nucléiques mitochondriaux (**Chapitres 1 et 2**) ainsi que l'expression d'aCL et d'anti-HSP60 dans le lupus (i.e., ciblant des composantes internes à la mitochondrie) <sup>422,860</sup>, **nous pouvons considérer que la mesure des AwMA est indicative de l'immunogénicité générale de l'organelle, indépendamment de la nature des cibles (e.g., protéines, acides nucléiques, lipide) et de la sous-localisation mitochondriale des antigènes** <sup>10,26,861</sup>.

### **Les AmtDNA, ciblent un acide nucléique extra-nucléaire et présentent des associations avec les anti-dsDNA.**

Les acides nucléiques ainsi que les protéines associées (i.e., anti-dsDNA, ANA, anti-RNP) d'origine nucléaires sont des cibles reconnues des autoanticorps dans diverses maladies auto-immunes<sup>606,840,842</sup>. La détection de ces anticorps est incluse dans les critères cliniques permettant le diagnostic et le pronostic de plusieurs maladies auto-immunes [e.g., SLE, SS, sclérose systémique (SSc), myosites]<sup>862-864</sup>. La présence de mtDNA en circulation ayant été indiquée dans différentes conditions traumatiques et physiopathologiques<sup>330-348</sup>. De plus, du mtDNA oxydé associé à la protéine TFAM sont libérés lors de la NETose dans le SLE<sup>298,311</sup>. L'ensemble de ces éléments permettent de penser que les acides nucléiques mitochondriaux ainsi que les protéines associées pourraient être immunogéniques dans la maladie. Mes travaux indiquent que les AmtDNA-IgG sont significativement augmentés dans le SLE, comparé aux donneurs sains (**Chapitre 1**), sont associés avec la positivité pour les anti-dsDNA ainsi qu'avec un accroissement des antécédents de néphrite lupique. La présence d'anticorps anti-dsDNA peut être testée à l'aide d'un ADN circulaire de bactéries (i.e., *E.coli*) d'une nature biochimique proche du mtDNA<sup>693,694</sup> et les ANA peuvent être évalués en observant le marquage du kinetoplaste en CLIFT<sup>695,696</sup>. La présence d'anti dsDNA est, par ailleurs, associée à la néphrite lupique<sup>865</sup>. Si l'on considère que les anti dsDNA et les AmtDNA reconnaissent tous deux des ADN sur la base de structures semblables sur le plan biochimique ; il est probable – comme indiqué par les expériences d'ELISA par compétition – que certains des autoanticorps lupiques présentent des réactivité croisées (**Chapitre 1, figures supplémentaires**) entre les différents types d'ADN double-brins (i.e., dsDNA d'origine nucléaire, mtDNA ou ADN plasmidique bactérien). Ainsi, considérant l'implication connue des anti-dsDNA dans la physiopathologie de la néphrite lupique<sup>689</sup>, il serait tentant d'imputer l'association observée entre les AmtDNA et les antécédents de néphrite lupique avec ce phénomène de réactivité croisée. Notre laboratoire a récemment mis en évidence que la majorité du mtDNA circulant dans un modèle murin de SLE provenait des mitochondries extracellulaires issues

de plaquettes activées<sup>305</sup>. L'ensemble de ces résultats semble indiquer que **les composantes mitochondriales extracellulaires (i.e., organelles complètes ou fragmentées) constituent une source d'ADN non nucléaire antigénique contribuant à la production d'anticorps anti-dsDNA dans le SLE.**

**Le mtDNA n'est pas le seul acide nucléique d'origine mitochondriale qui soit antigénique dans le SLE.**

En plus des multiples copies de son génome, la matrice mitochondriale contient la machinerie nécessaire à la réplication et à la transcription du mtDNA. Malgré le faible nombre de protéines, tRNA et de rRNA codé par le génome mitochondrial<sup>317-320</sup>, le nombre important de copies du mtDNA ainsi que son mode de transcription polycistronique<sup>11,12,811</sup> font que le mtRNA représente une fraction importante du transcriptome des cellules métaboliquement actives<sup>12</sup>. Les souris 564Igi expriment de façon constitutive les gènes codant pour un anticorps anti-RNA<sup>866</sup>. À l'instar d'autres modèles murins caractérisés par le développement d'anti-RNA, les souris 564Igi développent une réponse humorale anti-RNA ainsi qu'un accroissement des populations de neutrophiles et de monocytes associé avec une signalisation IFN de Type I, la stimulation du TLR7 et du FcγRIV<sup>867,868</sup>. Mes résultats indiquent que les IgGs et IgMs circulant dirigés contre le mtRNA sont significativement augmentés chez les patients lupiques. Les AmtRNA sont par ailleurs associés et/ou corrélés avec différents autoanticorps (i.e., AMA que j'ai mesurés au laboratoire de recherche ou anticorps détectés en routine clinique). **Il est surprenant d'observer que les AmtRNA-IgG sont associés avec des historiques moindres de plaque carotidienne et de néphrite lupique alors qu'ils sont aussi associés à la positivité aux anti-dsDNA.** Considérant que la libération de mitochondries extracellulaires est associée à la détection de mtDNA circulant dans un modèle murin de lupus<sup>305</sup>, et que les acides nucléiques mitochondriaux mtDNA lors de la NETose peut être associé à des facteurs de transcriptions (e.g. TFAM)<sup>311</sup>; il envisageable que la libération de mitochondries extracellulaires entraîne l'extrusion de plusieurs types d'antigènes mitochondriaux à destination de la circulation pouvant mener à la production concomitante

de plusieurs autoanticorps. Ce phénomène permettrait d'envisager que les associations et/ou corrélations observées au cours de mon projet de doctorat (e.g., AwMA et aCL, AmtRNA/AmtDNA et anti-dsDNA).

La littérature sur les autoanticorps lupiques fait mention d'anticorps – généralement des IgMs, bien que d'autres isotypes aient été rapportés – qui peuvent être produits sans immunisation préalable (i.e., anticorps naturels) et/ou présentant des associations protectrices contre certaines manifestations cliniques du SLE <sup>869</sup>. Les anticorps anti-phosphatidylcholine sont diminués chez les patients lupiques et leurs niveaux sont inversement associés avec l'activité et les dommages dans la maladie <sup>870</sup>. Il est ainsi suggéré que des anticorps dirigés contre des épitopes exprimés par les apoptosomes (e.g., dsDNA, CL, phosphatidylcholine) soient produits de façon homéostatique, afin de pouvoir clarifier ces débris avant qu'ils ne contribuent à l'inflammation et à la rupture de la tolérance <sup>187,871</sup>. Des anticorps naturels dirigés contre des composantes mitochondriales, désignés sous le terme NOMA ont été décrits dans la PBC, l'athérosclérose et l'hémodialyse <sup>187,441,769</sup>.

Les complexes immuns des patients lupiques ont été précédemment caractérisés comme étant enrichis en anticorps anti-acides nucléique – principalement en anticorps anti-RNA <sup>872</sup>. Certains des autoanticorps du répertoire des anti-RNP ciblent une des petites ribonucléoprotéines nucléaires (i.e., anti-*small nuclear ribonucleoprotein*, anti-snRNP). Le snRNP U1 est constitué d'un snRNA de 163 p.b (i.e., snRNA-U1) possédant plusieurs séquences de repliement en épingle à cheveux, et de dix (10) RNP [i.e., sept (7) RNP de la famille des Sm communes à tous les snRNP et trois (3) protéines spécifiques au snRNP-U1] et contribue à la formation du spliceosome (i.e structure permettant l'épissage des ARN) <sup>873,874</sup>. Des autoanticorps anti-snRNP-U1 semblent exprimer des réactivités croisées avec les anti-ADN <sup>875,876</sup> et ont été décrites dans le cadre de connectivites mixtes (i.e., *mixed connective tissue disease*, MCTD) ainsi qu'associés à différentes manifestations cliniques du SLE, dont des formes modérées de néphrites <sup>877,878</sup>. L'ensemble de ces éléments permet de postuler que le mtRNA et, potentiellement, les facteurs associés (i.e., mtRNP) pourraient représenter des sources d'antigènes permettant la formation d'anticorps dirigés contre



les acides nucléiques à structure en double-brins (e.g., segments en épingle à cheveux, dsDNA) et/ou les RNP.

La caractérisation des AmtRNA et de leurs relations avec d'autres autoanticorps pourront être explorées à l'aide de plusieurs approches. Dans un premier temps, les AmtRNA pourront être mesurés au sein d'un sous-groupe de patients lupiques présentant une double positivité pour les anti-snRNP-U1 et les anti-dsDNA, puis les associations biostatistiques entre ces trois anticorps pourront être calculées. La possibilité de l'existence d'autoanticorps polyréactifs ou bien la production concomitante d'immunoglobulines ciblant le snRN-U1, le dsDNA et/ou le mtRNA pourra être étudiée par l'inhibition de la fixation de ces autoanticorps en ELISA direct, en présence d'un compétiteur (i.e., un des deux autres antigènes, cf. **Chapitre 1**). **Enfin, la mesure de l'évolution des niveaux d'AmtRNA au fil de l'évolution du SLE et son association avec l'expression de manifestations vasculaires ou rénales permettront de confirmer – ou non – que les AmtRNA puissent être protecteurs** (cf. section perspectives).

**Les AMA mesurés ne sont pas spécifiques au SLE et peuvent être identifiés dans d'autres maladies auto-immunes.**

Le syndrome des antiphospholipides est un trouble auto-immun souvent associé au SLE (i.e., SAPS), notamment caractérisé par la production d'aCL par les patients. La cardiolipine étant un phospholipide dont la seule source de biosynthèse endogène est la mitochondrie chez l'humain, j'ai cherché à déterminer si les AMA-IgGs et -IgMs que j'avais précédemment identifiés chez les patients étaient aussi détectables chez les patients vivant avec l'APS.

Les patients souffrant d'APS présentent une élévation des AmtDNA-IgM ainsi que des AmtRNA (i.e., IgGs et IgMs par rapport aux donneurs en santé). **Les patients présentant des niveaux accrus d'AmtDNA-IgM présentent par ailleurs une association avec une réduction des événements de thromboses artérielles.** La présence de ces AMA n'est donc pas spécifique au SLE, toutefois les associations

entre les AMA et les manifestations sérologiques ne sont pas similaires entre les patients diagnostiqués avec le SLE ou bien l'APS – et ce, même si la majorité (i.e., 70.8 %) des patients de ce dernier groupe présentent un SAPS (i.e., APS associé au SLE). **Le profil des AMA ainsi que leurs associations cliniques pourraient donc être spécifiques à chaque maladie.**

Toutefois, étant donné la taille de l'échantillon des patients APS testés, l'étude présentée dans le **chapitre 3** n'est pas représentative de la diversité des profils de la maladie (i.e., PAPS, SAPS, CAPS, OAPS, TAPS). Ce point, ainsi que la nature transversale de la cohorte MRAS, font que ces résultats constituent une étude-pilote et nécessitent donc d'être confirmés dans une grande cohorte prospective telle que celle de l'*APS Alliance for Clinical Trials and International Networking* (i.e., APS ACTION) incluant, en 2019, plus de 800 patients positifs pour les aPL <sup>879</sup>. **Aussi, les associations entre les AMA et les manifestations « hors critères », notamment les néphropathies permettraient d'affiner de mieux caractériser les relations entre les AMA et les manifestations cliniques propres au SLE et/ou à l'APS afin d'envisager les qualités des AMA en tant que biomarqueurs de diagnostic et/ou de pronostic** <sup>684,880</sup>.

#### **De nombreuses protéines mitochondriales sont ciblées par les autoanticorps lupiques**

La cardiolipine est un phospholipide, dont la production endogène est uniquement assurée par la mitochondrie, qui peut être ciblée par les aCL dans l'APS ainsi que par les AMA-M1 chez les patients atteints de syphilis secondaire. Le mtDNA est une biomolécule capable de stimuler l'immunité innée au travers des voies de signalisation de cGAS-STING et du TLR9. De plus, le mtDNA a déjà été décrit comme détectable en circulation dans certaines conditions pathologiques. Le laboratoire du Dr. Boilard a publié récemment que le mtDNA circulant provenait de l'activation plaquettaire dans un modèle murin de SLE <sup>305</sup>. De même, mes travaux indiquent que les deux types d'acides nucléiques mitochondriaux sont immunogéniques dans le SLE et l'APS (**Chapitres 1-3**). Enfin, différentes protéines (e.g., PDC-E2, HSP60, *sulfite oxidase*)

sont ciblées dans différentes pathologies. Il est ainsi manifeste que la mitochondrie constitue une importante source d'autoantigènes – sans toutefois que le spectre des protéines mitochondriales antigéniques ne soit caractérisé dans les troubles auto-immuns autres que la PBC.

Mes travaux du **chapitre 4** identifient 431 protéines mitochondriales associées aux IgGs isolés d'échantillons de séra de donneurs sains et de patients lupiques incubés avec une source d'antigènes mitochondriaux. J'ai dans un premier temps choisi la protéine associée au C1q (i.e., C1qBP) parmi les candidats de cette liste, considérant le *protein index* élevé (i.e., ratio des spectres observés dans le lupus sur ceux observés dans les échantillons de donneurs sains), l'appartenance de la protéine au réactome du C1q ainsi que l'importance des déficits en C1q dans la physiopathologie du SLE. Par la suite, j'ai choisi la mitofusine 1 (Mfn1) - une protéine enrichie dans les échantillons de SLE et appartenant au réactome de la PDC (i.e., famille dont la PDC-E2 est l'antigène immunodominant, reconnu par les AMA-M2). Les anticorps dirigés contre le C1qBP ainsi que les anti-Mfn1 sont significativement augmentés dans le SLE, mais pas dans les deux autres maladies, **indiquant que les anti-C1qBP et anti-Mfn1 constituaient de nouveaux candidats en tant que biomarqueurs d'intérêt pour la prise en charge clinique du SLE.** La positivité pour le LA ainsi que les titres en aCL-IgG sont associés avec les niveaux d'anti-C1qBP alors que les anti-Mfn1 sont augmentés chez les patients positifs pour les aPL, les aCL-IgG et les anti-dsDNA ainsi que corrélés avec *tous* les anticorps que j'ai testés *ainsi que* ceux détectés en routine par le laboratoire de sérologie clinique. **L'ensemble de ces éléments permettent d'avancer que la Mfn1 est un contributeur important à l'immunogénicité mitochondriale dans le cadre du SLE.**

De précédentes études ont indiqué que des composantes mitochondriales oxydées pouvaient être libérées par les neutrophiles au cours de la NETose<sup>298,311</sup> ou que des phospholipides mitochondriaux oxydés sont exprimés à la surface des apoptosomes dans le SLE<sup>187,441</sup>. Bien que l'oxydation *in-vitro* des mitochondries intactes augmente leur immunoréactivité, cette augmentation est observée à la fois chez les donneurs sains **et** les patients SLE (**Chapitre 1**). Cette observation représente ainsi la mesure concomitante

de tous les épitopes reconnus par les AwMA-IgG et non l'immunogénicité d'une cible unique. Dans le **chapitre 4**, l'identification des protéines mitochondriales reconnues par les AMA a été réalisée sur des échantillons provenant de mitochondries murines saines (i.e., issues de foies de souris C57BL6/J). **Cette approche permet l'identification des protéines mitochondriales endogènes reconnues par les AMA, mais pourrait négliger la contribution de l'oxydation par les ROS émis par les mitochondries endommagées dans la maladie (i.e., production de néoantigènes).** Ainsi, un *addendum* aux paramètres de l'analyse *in-silico* pour détecter les modifications post-transcriptionnelles des protéines par les mtROS (e.g., carbonylation) <sup>881</sup>. De plus, les protocoles expérimentaux du **chapitre 4** pourraient être répétés à l'aide de mitochondries oxydées *ex-vivo* selon la méthode présentée au **chapitre 1**. Enfin, l'identification des couples mtAg/AMA dans différentes maladies auto-immunes médiées par les anticorps (e.g., RA, SSc, dermatomyosites, SS, MTCDD) afin de pouvoir déterminer s'il existe un spectre commun d'immunogénicité mitochondriale dans ces maladies et/ou si certains couples mtAg/AMA peuvent être exclusivement associés à l'une de ces conditions et/ou à leurs expressions cliniques respectives. Le profil des couples autoanticorps/autoantigènes pourrait aussi être apprécié de façon qualitative à l'aide de criblages multiplexés, par exemple à l'aide de la technique du *nucleic acids programmable protein array* (NAPPA) <sup>844</sup>. Ces spectres d'antigénicité pourraient ainsi permettre d'établir de nouveaux arbres décisionnels contribuant à l'amélioration des diagnostics différentiels.

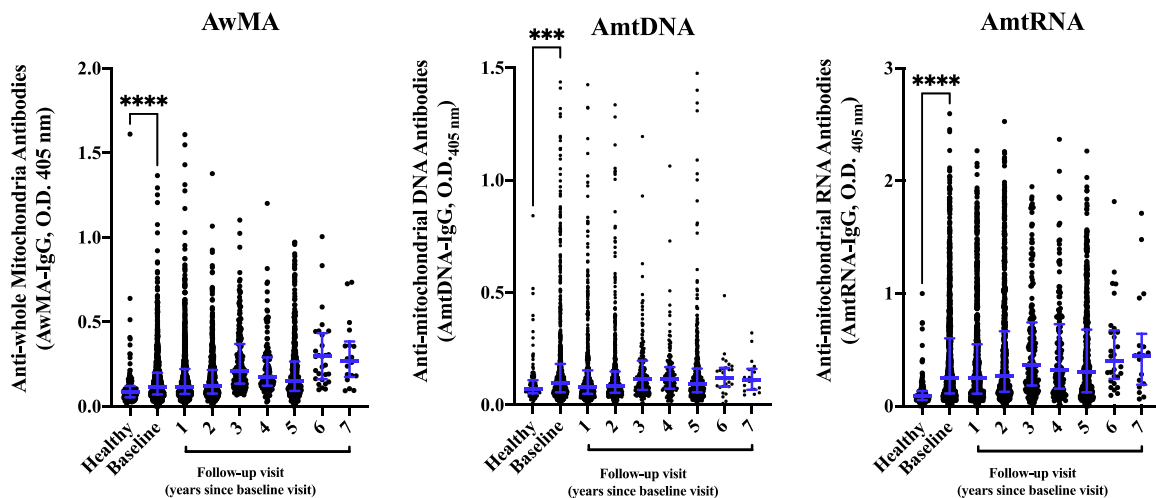
La mitofusine 1 est une protéine importante dans la dynamique cellulaire, elle est impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques, allant de l'immunométabolisme à la division cellulaire en passant par la reproduction <sup>23,882-884</sup>. Des autoanticorps ont été détectés par l'équipe du Dr. Boilard, dans le cytoplasme des neurones dans un modèle murin de SLE (Mlle. Audrée Laroche, communication personnelle). La capacité de certains autoanticorps à pénétrer au sein de la cellule <sup>885,886</sup>, ainsi qu'à traverser (i.e., transcytose) les interfaces vasculaires (e.g., barrière hémato-encéphalique, glomérules rénaux) <sup>887,888</sup> ont par ailleurs été mises en évidence dans plusieurs modèles animaux. S'ils sont capables de pénétrer le cytoplasme d'une cellule, les anti-Mfn1 pourraient ainsi occasionner

d'importantes dérégulations cellulaires en perturbant, par leur fixation, la dynamique mitochondriale. Cette hypothèse pourrait être testée par un nouveau projet l'injection d'anti-mfn1 (e.g., commerciaux ou obtenus avec un hybridome) et le suivi de leur distribution histologique au sein des tissus ou cellules ainsi que leurs effets sur les fonctions cellulaires (e.g., par cocubation avec une culture cellulaire *in vitro*). Le composant C1q du complément se complexe avec deux protéines à la surface des cellules, cC1qR et gC1qR (i.e., C1qBP)<sup>889-891</sup>. Le C1qBP peut s'associer au récepteur de l'urokinase pour contribuer à la voie de l'activation de contact du plasma<sup>892,893</sup>, laissant présumer que les anti-C1qBP contribuent à la perturbation de la coagulation, déjà suggérée par la littérature (i.e., contribuant à son association à la positivité au test pour le LA)<sup>846</sup>. De par le tropisme du C1q pour les ICs et son affinité pour le C1qBP, ainsi que l'identification de C1qBP au sein d'ICs<sup>894,895</sup>, il est envisageable que les anti-C1qBP contribuent à la formation des ICs et/ou à leur persistance en circulation. Des modèles animaux de coagulation et de production d'IC injectés avec des anti-C1qBP permettraient, avec des protocoles similaires à ceux proposés précédemment pour les anti-Mfn1, d'évaluer le rôle de ces AMA à la physiopathologie du lupus.

**Mes travaux indiquent que la mitochondrie est antigénique dans plusieurs troubles auto-immuns et que les anticorps anti-mitochondriaux présentent des associations avec les manifestations cliniques différentes pour chacune des maladies testées. Ces résultats suggèrent l'importance de la caractérisation du répertoire des antigènes mitochondriaux spécifiques à chacune des maladies rhumatismales afin de pouvoir proposer de nouveaux critères sérologiques permettant l'amélioration des options permettant le diagnostic différentiel ou l'établissement de pronostics dans les maladies auto-immunes médiées par les anticorps, ainsi que la stratification des malades en sous-groupes au sein d'une même maladie. L'ensemble de ces découvertes pourraient par conséquent améliorer la prise en charge des patients, d'optimiser leurs traitements selon leur pronostic et, ultimement, à augmenter la qualité de vie des personnes vivant avec des maladies auto-immunes.**

## Perspectives présentement étudiées :

Les travaux présentés dans ma thèse ouvrent différentes avenues de recherche dont certaines sont déjà en cours d'exploration au laboratoire du Dr. Boilard. Nous avons reçu des échantillons de séra provenant de 127 donneurs sains ainsi que 1114 patients lupiques suivis jusqu'à 7 ans après le diagnostic initial de SLE et leur inclusion dans la maladie (i.e., un échantillon à l'inclusion pour chaque patient, ainsi que – selon leur disponibilité – jusqu'à 3 séra prélevés pendant le suivi de la maladie, pour un total de 3577 échantillons). Ces résultats permettront dans un premier temps de confirmer le spectre des antigènes mitochondriaux dans la maladie et leur évolution dans le temps (i.e., selon les phases d'exacerbation et de rémission ainsi que des traitements administrés. Le suivi dans le temps des niveaux d'AMA chez les patients et leurs associations avec les manifestations cliniques de la maladie permettra de déterminer l'efficacité des AMA en tant que biomarqueurs associés aux dommages et/ou à l'activité du lupus. Enfin, le profil des AMA permettra de stratifier les patients en sous-groupes en fonction de critères communs permettant la prédiction de l'évolution de la maladie. Ces résultats permettront, additionnellement, de poser les jalons (e.g., organisation, personnel mobilisé, réactifs requis, durée des phases d'expérimentation et d'analyse) permettant de pouvoir répliquer ce projet pour étudier les AMA au sein d'autres cohortes de grandes envergures (e.g., *APS ACTION*). Au moment du dépôt du présent manuscrit, des résultats préliminaires ont été obtenus à l'aide d'échantillons de donneurs sains (i.e., *Healthy*:  $n = 127$ ) et de patients lupiques, inclus jusqu'à 18 mois après le premier diagnostic de la maladie (*Baseline*:  $n = 1114$ ), ainsi qu'à différentes visites médicales de suivi (i.e., *follow-up*) entre 1 et 7 ans après le diagnostic (i.e., 1 an:  $n = 787$ ; 2 ans:  $n = 694$ ; 3 ans:  $n = 191$ ; 4 ans:  $n = 141$ ; 5 ans:  $n = 476$ ; 6 ans:  $n = 29$ ; 7 ans:  $n = 18$ ). Ces résultats indiquent qu'au moment de l'inclusion dans la cohorte, les trois AMA sont significativement augmentés chez les patients lupiques, par rapport aux donneurs sains ( $A_{wMA}$  et  $A_{mtRNA}$ :  $p < 0.0001$ .  $A_{mtDNA}$ :  $p = 0.0001$ . **Figure 10**). Chez les patients lupiques, les niveaux en  $A_{wMA}$  présentent une forte corrélation avec ceux d' $A_{mtDNA}$  et d' $A_{mtRNA}$  (respectivement,  $r_s = 0.37$  et  $0.38$ ;  $p < 0.0001$ ) ainsi que ceux d' $A_{mtDNA}$  et d' $A_{mtRNA}$  ( $r_s = 0.58$ ;  $p < 0.0001$ ).



**Figure 10. Détection des AMA dans les échantillons issus de la cohorte SLICC – données préliminaires.**

Mesure par ELISAs directs des AMA chez les donneurs sains (i.e., *Healthy* n = 137) et les patients lupiques, lors de leur inclusion dans la cohorte SLICC (*SLE - Diagnosis* : n = 1114) ainsi que de 1 à 7 ans après le diagnostic (1 an: n = 787; 2 ans: n = 694; 3 ans: n = 191; 4 ans: n = 141; 5 ans: n = 476; 6 ans: n = 29; 7 ans: n = 18). Tests de Wilcoxon-Mann Whitney Les données sont présentées avec leurs médianes  $\pm$  IQR. \*\* p<0.01. \*\*\*\* p < 0.0001

À une date ultérieure au dépôt de cette thèse, ces données seront analysées en collaboration avec Mlle. Anne-Sophie Julie, biostatisticienne (Service de consultation statistique de l'Université Laval) ainsi que la Dre. May Choi (*Cumming School of Medicine*). De même, des cohortes populationnelles telles que la cohorte du département de la défense des États-Unis ou encore la cohorte Québécoise CARTaGENE permettraient d'étudier la cinétique d'apparition des AMA antérieurement au premier diagnostic clinique. De telles études ont été réalisées par le passé, afin de cartographier la progression des autoanticorps antérieurement à la phase clinique de la maladie <sup>606,896,897</sup>.

Les titres des AMA étant moindre chez les donneurs sains, en étant malgré tout détectables. Ils sont par ailleurs associés à la diminution de certains antécédents cliniques.

Ces éléments ainsi que la description d'anticorps anti-mitochondriaux produits sans stimulation immunitaire (i.e., NOMA), pourraient permettre de postuler que ces autoanticorps soient, à l'origine, des anticorps naturels. La Dre. Isabelle Allaëys est actuellement en charge d'un projet étudiant les relations entre les AMA et les anticorps naturels (*communication personnelle*). Ainsi, la stimulation de certains PRRs dans un modèle murin de souris aboutit à la production d'IgM ainsi que d'IgG dirigés contre la mitochondrie. Ces résultats ont été répétés *in-vitro*. Dre. Allaëys a, par ailleurs, produit des hybridomes à partir de lymphocytes B stimulés. Le profil d'immunoréactivité des anticorps monoclonaux obtenus suggère la production d'anticorps monoclonaux monospécifiques, ainsi que d'anticorps pouvant réagir contre plusieurs antigènes distincts, et même contre le 2,4 dinitrophénol (i.e., 2,4 DNP), un haptène synthétique qui n'est pas présent dans la nature. Ces propriétés sont caractéristiques des anticorps naturels, ayant la capacité de reconnaître plusieurs molécules du fait de la flexibilité de la poche permettant la fixation de l'antigène <sup>438</sup>.

La présence d'AMA dirigés contre la Mfn1 ou le C1qBP ainsi que leurs qualités respectives en tant que biomarqueurs dans le SLE pourront être étudiées au sein de la cohorte SLICC. Enfin, les présences des anti-C1qBP et anti-Mfn1 dans d'autres maladies auto-immunes pourront être étudiées à l'aide d'autres groupes de patients inclus dans la cohorte MRAS.

Les anticardiolipines, les anti-HSP60, les AMA-M2 et -M5 sont différent type d'AMA précédemment décrits dans la littérature, comme potentiellement détectables chez les patients souffrant de SLE et/ou d'APS <sup>3,399,414,422,648</sup>. Les **chapitres 1 à 4** présentent différentes associations entre les AMA que j'ai mesurés et les aCL dans le SLE et l'APS ainsi que l'absence d'associations entre les AMA et les anti-HSP60 dans le SLE. Dans le **chapitre 4**, j'ai indiqué que l'un des réseaux protéiques associés avec les protéines mitochondriales identifiées correspond au complexe de la pyruvate déshydrogénase (i.e., PDC), telles que la la DBT (i.e., *lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase*) et l'OGDH (i.e., *2-oxoglutarate dehydrogenase*) <sup>898</sup>. Toutefois, je n'ai pas identifié la présence de la sous-unité E2 de la PDC [i.e., *dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase*



*complex* (abrévée PDC-E2, DLAT ou DLTA)]. Il est ainsi possible que les AwMA présentent un certain degré de redondance avec les AMA-M2.

Les AMA-M5 ne sont pas détectés en routine clinique et nécessitent une expertise spécifique pour être détectés en immunofluorescence indirecte; nous ne les avons donc pas inclus mon projet de thèse. Le Dr. Paul R. Fortin et moi-même avons approché le Dr. Pier Luigi Meroni (Rhumatologue à l'*Istituto Auxologico Italiano*. Milan, Italie) au cours de l'édition 2019 de l'*International Congress on Antiphospholipid Antibodies* (i.e., ICAPA 2019. Manchester, Royaume-Uni). Une collaboration serait envisageable afin de détecter les AMA-M5 par immunofluorescence dans la cohorte SLICC et/ou de reproduire les expériences du **chapitre 4** sur des échantillons issus patients caractérisés comme positifs pour les AMA-M5 afin d'identifier quelles seraient les protéines mitochondriales potentiellement ciblées par ces autoanticorps.

À l'heure actuelle, des groupes de patients souffrant d'APS (n = 27) ou de PBC (n = 12) ont été ajoutés au test présenté au **Chapitre 4**. Malgré l'influence de l'ajout de nouveaux groupes sur les résultats statistiques, les anti-C1qBP et anti-Mfn1 restent significativement augmentés chez les patients lupiques (respectivement, p = 0.049 et p = 0.0044. **Figure 10**) par rapport aux volontaires en santé. Les tests statistiques n'indiquent pas de différences significatives entre les autres groupes et les donneurs sains. Bien que l'injection de mitochondries intactes et d'AmtDNA n'aient jamais aboutis à la production d'AMA chez la souris, les effets chroniques ou aigus d'injections d'antigènes mitochondriaux pourraient être évaluées à l'aide des modèles murins de lupus disponibles au laboratoire du Dr. Boilard.

Au cours de son doctorat, la Dre. Melki a mesuré les paramètres d'activation plaquettaire (i.e., détection par FACS des marqueurs d'activation et des microparticules plaquettaires, dosage des molécules libérées au cours de la dégranulation), ainsi que les sources d'autoantigènes mitochondriaux en circulation (i.e., quantification du mtDNA circulant par qPCR et des mitochondries extracellulaires par FACS) dans des échantillons de plasma de patients inclus dans la cohorte MRAS.

Les associations entre ces données, celles sur AMA que j'ai acquises (**chapitre 2**) ainsi qu'avec les différentes caractéristiques sérologiques et cliniques exprimées par ces patients sont présentement à l'étude, en collaboration avec un groupe d'étudiants au programme de biostatistiques de l'Université Laval (i.e., Mlles Thi-Duong-Chi Pham et Anne-Marie Sauvageau ainsi que M. Olivier Flamand). Ces informations nous permettront d'apprécier la relation menant de l'activation plaquettaire, permettant la libération de motifs mitochondriaux antigéniques, la production d'AMA et leur contribution à la physiopathologie du SLE.

# Bibliographie

- 1 Becker, Y. L. C. *Caractérisation de la présence d'anticorps anti-mitochondriaux associés au lupus érythémateux disséminé* Masters' degree (M. Sc.) thesis, Université Laval, (2017).
- 2 Becker, Y. *et al.* Anti-mitochondrial autoantibodies in systemic lupus erythematosus and their association with disease manifestations. *Sci Rep* **9**, 4530, doi:10.1038/s41598-019-40900-3 (2019).
- 3 Becker, Y. *et al.* Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus Target Mitochondrial RNA. *Front Immunol* **10**, 1026, doi:10.3389/fimmu.2019.01026 (2019).
- 4 Becker, Y. L., Julien, A. S., Godbout, A., Boilard, E. & Fortin, P. R. Pilot study of anti-mitochondrial antibodies in antiphospholipid syndrome. *Lupus* **29**, 1623-1629, doi:10.1177/0961203320944481 (2020).
- 5 Becker, Y. L. C. *et al.* in *Arthritis & Rheumatology* (2022).
- 6 Benda, C. Ueber die spermatogenese der vertebraten und höherer evertebraten, II. Theil: Die histiogenese der spermien. *Arch. Anat. Physiol* **73**, 393-398 (1898).
- 7 Dukanovic, J. & Rapaport, D. Multiple pathways in the integration of proteins into the mitochondrial outer membrane. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1808**, 971-980 (2011).
- 8 Schnaitman, C. & Greenawalt, J. W. Enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. *J Cell Biol* **38**, 158-175, doi:10.1083/jcb.38.1.158 (1968).
- 9 Veltri, K. L., Espiritu, M. & Singh, G. Distinct genomic copy number in mitochondria of different mammalian organs. *J Cell Physiol* **143**, 160-164, doi:10.1002/jcp.1041430122 (1990).
- 10 Palmfeldt, J. & Bross, P. Proteomics of human mitochondria. *Mitochondrion* **33**, 2-14, doi:10.1016/j.mito.2016.07.006 (2017).
- 11 Rorbach, J. & Minczuk, M. The post-transcriptional life of mammalian mitochondrial RNA. *Biochem J* **444**, 357-373, doi:10.1042/BJ20112208 (2012).
- 12 Mercer, T. R. *et al.* The human mitochondrial transcriptome. *Cell* **146**, 645-658, doi:10.1016/j.cell.2011.06.051 (2011).
- 13 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).
- 14 Liesa, M. & Shirihai, O. S. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab* **17**, 491-506, doi:10.1016/j.cmet.2013.03.002 (2013).
- 15 Hales, K. G. Mitochondrial Fusion and Division. *Nature Education* **3** (2010).
- 16 Molina, A. J. *et al.* Mitochondrial networking protects beta-cells from nutrient-induced apoptosis. *Diabetes* **58**, 2303-2315, doi:10.2337/db07-1781 (2009).
- 17 Xie, L. L. *et al.* Mitochondrial network structure homeostasis and cell death. *Cancer Sci* **109**, 3686-3694, doi:10.1111/cas.13830 (2018).

- 18 Labbé, K., Murley, A. & Nunnari, J. Determinants and Functions of Mitochondrial Behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **30**, 357-391, doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155756 (2014).
- 19 Rambold, A. S., Kosteleccky, B., Elia, N. & Lippincott-Schwartz, J. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 10190-10195, doi:10.1073/pnas.1107402108 (2011).
- 20 Abarca-Rojano, E. *et al.* Re-organization of mitochondria at the NK cell immune synapse. *Immunol Lett* **122**, 18-25 (2009).
- 21 Baixauli, F. *et al.* The mitochondrial fission factor dynamin-related protein 1 modulates T-cell receptor signalling at the immune synapse. *Embo j* **30**, 1238-1250, doi:10.1038/emboj.2011.25 (2011).
- 22 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 (2004).
- 23 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).
- 24 Choi, S. Y. *et al.* A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat Cell Biol* **8**, 1255-1262, doi:10.1038/ncb1487 (2006).
- 25 Gao, Q. & Frohman, M. A. Roles for the lipid-signaling enzyme MitoPLD in mitochondrial dynamics, piRNA biogenesis, and spermatogenesis. *BMB Rep* **45**, 7-13, doi:10.5483/bmbrep.2012.45.1.7 (2012).
- 26 Huang, H. & Frohman, M. A. Lipid signaling on the mitochondrial surface. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 839-844, doi:10.1016/j.bbali.2009.05.012 (2009).
- 27 MacVicar, T. & Langer, T. OPA1 processing in cell death and disease - the long and short of it. *J Cell Sci* **129**, 2297-2306, doi:10.1242/jcs.159186 (2016).
- 28 Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T. & Mihara, K. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J* **25**, 2966-2977 (2006).
- 29 Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V. & Prudent, J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem* **62**, 341-360, doi:10.1042/EBC20170104 (2018).
- 30 Friedman, J. R. *et al.* ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* **334**, 358-362, doi:10.1126/science.1207385 (2011).
- 31 Korobova, F., Ramabhadran, V. & Higgs, H. N. An actin-dependent step in mitochondrial fission mediated by the ER-associated formin INF2. *Science* **339**, 464-467, doi:10.1126/science.1228360 (2013).
- 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 (2005).
- 34 Xie, Z. & Klionsky, D. J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* **9**, 1102-1109, doi:10.1038/ncb1007-1102 (2007).

- 35 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).
- 36 Reggiori, F. & Ungermann, C. Autophagosome Maturation and Fusion. *J Mol Biol* **429**, 486-496, doi:10.1016/j.jmb.2017.01.002 (2017).
- 37 Ganley, I. G. Autophagosome maturation and lysosomal fusion. *Essays Biochem* **55**, 65-78, doi:10.1042/bse0550065 (2013).
- 38 Ravanan, P., Srikumar, I. F. & Talwar, P. Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life Sci* **188**, 53-67, doi:10.1016/j.lfs.2017.08.029 (2017).
- 39 Johansen, T. & Lamark, T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* **7**, 279-296, doi:10.4161/auto.7.3.14487 (2011).
- 40 Dudek, J. Role of Cardiolipin in Mitochondrial Signaling Pathways. *Front Cell Dev Biol* **5**, 90, doi:10.3389/fcell.2017.00090 (2017).
- 41 Yamano, K. & Youle, R. J. PINK1 is degraded through the N-end rule pathway. *Autophagy* **9**, 1758-1769, doi:10.4161/auto.24633 (2013).
- 42 Thomas, R. E., Andrews, L. A., Burman, J. L., Lin, W. Y. & Pallanck, L. J. PINK1-Parkin pathway activity is regulated by degradation of PINK1 in the mitochondrial matrix. *PLoS Genet* **10**, e1004279, doi:10.1371/journal.pgen.1004279 (2014).
- 43 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 (2013).
- 44 Schweers, R. L. *et al.* NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19500-19505, doi:10.1073/pnas.0708818104 (2007).
- 45 Liu, L. *et al.* Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol* **14**, 177-185, doi:10.1038/ncb2422 (2012).
- 46 Xiang, G. *et al.* BNIP3L-dependent mitophagy accounts for mitochondrial clearance during 3 factors-induced somatic cell reprogramming. *Autophagy*. *Autophagy* **13**, 1543-1555 (2017).
- 47 Buck, M. D. *et al.* Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming. *Cell* **166**, 63-76, doi:10.1016/j.cell.2016.05.035 (2016).
- 48 Vats, D. *et al.* Oxidative metabolism and PGC-1beta attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metab* **4**, 13-24, doi:10.1016/j.cmet.2006.05.011 (2006).
- 49 Amini, P. *et al.* Neutrophil extracellular trap formation requires OPA1-dependent glycolytic ATP production. *Nat Commun* **9**, 2958, doi:10.1038/s41467-018-05387-y (2018).
- 50 Onoguchi, K. *et al.* Virus-infection or 5'ppp-RNA activates antiviral signal through redistribution of IPS-1 mediated by MFN1. *PLoS Pathog* **6**, e1001012, doi:10.1371/journal.ppat.1001012 (2010).
- 51 Kwon, D., Park, E. & Kang, S. J. Stimulator of IFN genes-mediated DNA-sensing pathway is suppressed by NLRP3 agonists and regulated by mitofusin 1 and TBC1D15, mitochondrial dynamics mediators. *Faseb j* **31**, 4866-4878, doi:10.1096/fj.201700328R (2017).
- 52 Zaccagnino, P. *et al.* An active mitochondrial biogenesis occurs during dendritic cell differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* **44**, 1962-1969, doi:10.1016/j.biocel.2012.07.024 (2012).

- 53 Ferreira, G. B. *et al.* Vitamin D3 Induces Tolerance in Human Dendritic Cells by Activation of Intracellular Metabolic Pathways. *Cell Rep* **10**, 711-725, doi:10.1016/j.celrep.2015.01.013 (2015).
- 54 Dimeloe, S. *et al.* The Immune-Metabolic Basis of Effector Memory CD4+ T Cell Function under Hypoxic Conditions. *J Immunol* **196**, 106-114, doi:10.4049/jimmunol.1501766 (2016).
- 55 Jang, K. J. *et al.* Mitochondrial function provides instructive signals for activation-induced B-cell fates. *Nat Commun* **6**, 6750, doi:10.1038/ncomms7750 (2015).
- 56 Kijima, K. *et al.* Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Hum Genet* **116**, 23-27, doi:10.1007/s00439-004-1199-2 (2005).
- 57 Voo, I. *et al.* Hereditary motor and sensory neuropathy type VI with optic atrophy. *Am J Ophthalmol* **136**, 670-677, doi:10.1016/s0002-9394(03)00390-8 (2003).
- 58 Chung, K. W. *et al.* Early onset severe and late-onset mild Charcot-Marie-Tooth disease with mitofusin 2 (MFN2) mutations. *Brain* **129**, 2103-2118, doi:10.1093/brain/awl174 (2006).
- 59 Delettre, C. *et al.* Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* **26**, 207-210, doi:10.1038/79936 (2000).
- 60 Yu-Wai-Man, P. *et al.* Multi-system neurological disease is common in patients with OPA1 mutations. *Brain* **133**, 771-786, doi:10.1093/brain/awq007 (2010).
- 61 De Rasmio, D. *et al.* PBMC of Multiple Sclerosis Patients Show Dereglulation of OPA1 Processing Associated with Increased ROS and PHB2 Protein Levels. *Biomedicines* **8**, doi:10.3390/biomedicines8040085 (2020).
- 62 Haileselassie, B. *et al.* Drp1/Fis1 interaction mediates mitochondrial dysfunction in septic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* **130**, 160-169, doi:10.1016/j.yjmcc.2019.04.006 (2019).
- 63 Joshi, A. U., Saw, N. L., Shamloo, M. & Mochly-Rosen, D. Drp1/Fis1 interaction mediates mitochondrial dysfunction, bioenergetic failure and cognitive decline in Alzheimer's disease. *Oncotarget* **9**, 6128-6143, doi:10.18632/oncotarget.23640 (2018).
- 64 Oaks, Z. *et al.* Mitochondrial Dysfunction in the Liver and Antiphospholipid Antibody Production Precede Disease Onset and Respond to Rapamycin in Lupus-Prone Mice. *Arthritis Rheumatol* **68**, 2728-2739, doi:10.1002/art.39791 (2016).
- 65 Joshi, S. *et al.* 1,25-dihydroxyvitamin D(3) ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. *Mol Cell Biol* **31**, 3653-3669, doi:10.1128/mcb.05020-11 (2011).
- 66 Mancini, N. L. *et al.* Perturbed Mitochondrial Dynamics Is a Novel Feature of Colitis That Can Be Targeted to Lessen Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **10**, 287-307, doi:10.1016/j.jcmgh.2020.04.004 (2020).
- 67 de Arriba, G., Calvino, M., Benito, S. & Parra, T. Cyclosporine A-induced apoptosis in renal tubular cells is related to oxidative damage and mitochondrial fission. *Toxicol Lett* **218**, 30-38, doi:10.1016/j.toxlet.2013.01.007 (2013).
- 68 Ge, P., Dawson, V. L. & Dawson, T. M. PINK1 and Parkin mitochondrial quality control: a source of regional vulnerability in Parkinson's disease. *Mol Neurodegener* **15**, 20, doi:10.1186/s13024-020-00367-7 (2020).

- 69 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).
- 70 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).
- 71 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).
- 72 Morris, S. M., Jr. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr* **22**, 87-105, doi:10.1146/annurev.nutr.22.110801.140547 (2002).
- 73 Elston, T., Wang, H. & Oster, G. Energy transduction in ATP synthase. *Nature* **391**, 510-513, doi:10.1038/35185 (1998).
- 74 Schrader, M., Costello, J., Godinho, L. F. & Islinger, M. Peroxisome-mitochondria interplay and disease. *J Inherit Metab Dis* **38**, 681-702, doi:10.1007/s10545-015-9819-7 (2015).
- 75 Angajala, A. *et al.* Diverse Roles of Mitochondria in Immune Responses: Novel Insights Into Immuno-Metabolism. *Front Immunol* **9**, 1605, doi:10.3389/fimmu.2018.01605 (2018).
- 76 Raud, B., McGuire, P. J., Jones, R. G., Sparwasser, T. & Berod, L. Fatty acid metabolism in CD8(+) T cell memory: Challenging current concepts. *Immunol Rev* **283**, 213-231, doi:10.1111/imr.12655 (2018).
- 77 Krebs, H. A. & Johnson, W. A. Metabolism of ketonic acids in animal tissues. *Biochem J* **31**, 645-660, doi:10.1042/bj0310645 (1937).
- 78 Alabduladhem, T. O. & Bordoni, B. *Physiology, Krebs Cycle*, <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32310492>> (2022).
- 79 De Meirleir, L. J., Brivet, M. & Garcia-Cazorla, A. in *Inborn Metabolic Diseases* Ch. Chapter 12, 187-200 (2012).
- 80 Matsumoto, S. *et al.* Urea cycle disorders-update. *J Hum Genet* **64**, 833-847, doi:10.1038/s10038-019-0614-4 (2019).
- 81 Barmore, W., Azad, F. & Stone, W. L. in *StatPearls* (StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC., 2022).
- 82 Cartagena, A. *et al.* Recurrent encephalopathy: NAGS (N-acetylglutamate synthase) deficiency in adults. *Can J Neurol Sci* **40**, 3-9, doi:10.1017/s0317167100012877 (2013).
- 83 Choi, J. H. *et al.* Clinical outcomes and the mutation spectrum of the OTC gene in patients with ornithine transcarbamylase deficiency. *J Hum Genet* **60**, 501-507, doi:10.1038/jhg.2015.54 (2015).
- 84 Camacho, J. A., Rioseco-Camacho, N., Andrade, D., Porter, J. & Kong, J. Cloning and characterization of human ORNT2: a second mitochondrial ornithine transporter that can rescue a defective ORNT1 in patients with the hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria syndrome, a urea cycle disorder. *Mol Genet Metab* **79**, 257-271, doi:10.1016/s1096-7192(03)00105-7 (2003).
- 85 Alghamdi, M. *et al.* An Overview of the Intrinsic Role of Citrullination in Autoimmune Disorders. *J Immunol Res* **2019**, 7592851, doi:10.1155/2019/7592851 (2019).
- 86 Boilard, E., Duchez, A. C. & Brisson, A. The diversity of platelet microparticles. *Curr Opin Hematol* **22**, 437-444, doi:10.1097/MOH.000000000000166 (2015).

- 87 Villar-Vesga, J. *et al.* Platelet-derived microparticles generated in vitro resemble circulating vesicles of patients with rheumatoid arthritis and activate monocytes. *Cell Immunol* **336**, 1-11, doi:10.1016/j.cellimm.2018.12.002 (2019).
- 88 Yasuda, H. *et al.* DNA demethylation increases NETosis. *Arch Biochem Biophys* **689**, 108465, doi:10.1016/j.abb.2020.108465 (2020).
- 89 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).
- 90 Horvath, S. E. & Daum, G. Lipids of mitochondria. *Prog Lipid Res* **52**, 590-614, doi:10.1016/j.plipres.2013.07.002 (2013).
- 91 Tamura, Y. *et al.* Tam41 is a CDP-diacylglycerol synthase required for cardiolipin biosynthesis in mitochondria. *Cell Metab* **17**, 709-718, doi:10.1016/j.cmet.2013.03.018 (2013).
- 92 Chin, M. T. & Conway, S. J. Role of Tafazzin in Mitochondrial Function, Development and Disease. *J Dev Biol* **8**, doi:10.3390/jdb8020010 (2020).
- 93 Sustarsic, E. G. *et al.* Cardiolipin Synthesis in Brown and Beige Fat Mitochondria Is Essential for Systemic Energy Homeostasis. *Cell Metab* **28**, 159-174 (2018).
- 94 Houtkooper, R. H. & Vaz, F. M. Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cell Mol Life Sci* **65**, 2493-2506, doi:10.1007/s00018-008-8030-5 (2008).
- 95 Piel, R. B., 3rd, Dailey, H. A., Jr. & Medlock, A. E. The mitochondrial heme metabolon: Insights into the complex(ity) of heme synthesis and distribution. *Mol Genet Metab* **128**, 198-203, doi:10.1016/j.ymgme.2019.01.006 (2019).
- 96 Paul, B. T., Manz, D. H., Torti, F. M. & Torti, S. V. Mitochondria and Iron: current questions. *Expert Rev Hematol* **10**, 65-79, doi:10.1080/17474086.2016.1268047 (2017).
- 97 Lecha, M., Puy, H. & Deybach, J. C. Erythropoietic protoporphyria. *Orphanet J Rare Dis* **4**, 19, doi:10.1186/1750-1172-4-19 (2009).
- 98 Stroud, D. A. *et al.* Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I. *Nature* **538**, 123-126, doi:10.1038/nature19754 (2016).
- 99 Vartak, R., Deng, J., Fang, H. & Bai, Y. Redefining the roles of mitochondrial DNA-encoded subunits in respiratory Complex I assembly. *Biochim Biophys Acta* **1852**, 1531-1539, doi:10.1016/j.bbadis.2015.04.008 (2015).
- 100 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).
- 101 Jackson, C. B. *et al.* Mutations in SDHD lead to autosomal recessive encephalomyopathy and isolated mitochondrial complex II deficiency. *J Med Genet* **51**, 170-175, doi:10.1136/jmedgenet-2013-101932 (2014).
- 102 Rutter, J., Winge, D. R. & Schiffman, J. D. Succinate dehydrogenase - Assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion* **10**, 393-401, doi:10.1016/j.mito.2010.03.001 (2010).
- 103 Ghisla, S. & Thorpe, C. Acyl-CoA dehydrogenases. A mechanistic overview. *Eur J Biochem* **271**, 494-508, doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03946.x (2004).
- 104 He, M. *et al.* A new genetic disorder in mitochondrial fatty acid beta-oxidation: ACAD9 deficiency. *Am J Hum Genet* **81**, 87-103, doi:10.1086/519219 (2007).



- 105 Hoskins, D. D. & Mackenzie, C. G. Solubilization and electron transfer flavoprotein requirement of mitochondrial sarcosine dehydrogenase and dimethylglycine dehydrogenase. *J Biol Chem* **236**, 177-183 (1961).
- 106 Watmough, N. J. & Frerman, F. E. The electron transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta* **1797**, 1910-1916, doi:10.1016/j.bbabi.2010.10.007 (2010).
- 107 Valnot, I. *et al.* A mitochondrial cytochrome b mutation but no mutations of nuclearly encoded subunits in ubiquinol cytochrome c reductase (complex III) deficiency. *Hum Genet* **104**, 460-466, doi:10.1007/s004390050988 (1999).
- 108 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.bbabi.2016.03.010 (2016).
- 109 Dennerlein, S. & Rehling, P. Human mitochondrial COX1 assembly into cytochrome c oxidase at a glance. *J Cell Sci* **128**, 833-837, doi:10.1242/jcs.161729 (2015).
- 110 Rak, M. *et al.* Mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency. *Clin Sci (Lond)* **130**, 393-407, doi:10.1042/CS20150707 (2016).
- 111 Palmieri, F. in *Encyclopedia of Biological Chemistry* (eds William J. Lennarz & M. Daniel Lane) 149-158 (Academic Press, 2013).
- 112 Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. & Kinoshita, K., Jr. Direct observation of the rotation of F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature* **386**, 299-302, doi:10.1038/386299a0 (1997).
- 113 Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* **417**, 1-13 (2009).
- 114 Pearce, E. L. & Pearce, E. J. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity* **38**, 633-643, doi:10.1016/j.immuni.2013.04.005 (2013).
- 115 Chandel, N. S. *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11715-11720, doi:10.1073/pnas.95.20.11715 (1998).
- 116 Kaelin, W. G., Jr. & McKnight, S. L. Influence of metabolism on epigenetics and disease. *Cell* **153**, 56-69, doi:10.1016/j.cell.2013.03.004 (2013).
- 117 Peyssonnaud, C. *et al.* HIF-1 $\alpha$  expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest* **115**, 1806-1815, doi:10.1172/JCI23865 (2005).
- 118 Tannahill, G. M. *et al.* Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . *Nature* **496**, 238-242, doi:10.1038/nature11986 (2013).
- 119 Fossati, G. *et al.* The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis. *J Immunol* **170**, 1964-1972, doi:10.4049/jimmunol.170.4.1964 (2003).
- 120 He, C. & Carter, A. B. The Metabolic Prospective and Redox Regulation of Macrophage Polarization. *J Clin Cell Immunol* **6**, doi:10.4172/2155-9899.1000371 (2015).
- 121 Murray, P. J. & Wynn, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* **11**, 723-737, doi:10.1038/nri3073 (2011).
- 122 Meiser, J. *et al.* Proinflammatory Macrophages Sustain Pyruvate Oxidation through Pyruvate Dehydrogenase for the Synthesis of Itaconate and to Enable Cytokine Expression. *J Biol Chem* **291**, 3932-3946, doi:10.1074/jbc.M115.676817 (2016).
- 123 Michelucci, A. *et al.* Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 7820-7825, doi:10.1073/pnas.1218599110 (2013).

- 124 Oren, R., Farnham, A. E., Saito, K., Milofsky, E. & Karnovsky, M. L. Metabolic patterns in three types of phagocytizing cells. *J Cell Biol* **17**, 487-501, doi:10.1083/jcb.17.3.487 (1963).
- 125 Jha, A. K. *et al.* Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity* **42**, 419-430, doi:10.1016/j.immuni.2015.02.005 (2015).
- 126 Jantsch, J. *et al.* Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function. *J Immunol* **180**, 4697-4705, doi:10.4049/jimmunol.180.7.4697 (2008).
- 127 Krawczyk, C. M. *et al.* Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood* **115**, 4742-4749, doi:10.1182/blood-2009-10-249540 (2010).
- 128 Frauwirth, K. A. *et al.* The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity* **16**, 769-777, doi:10.1016/s1074-7613(02)00323-0 (2002).
- 129 Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029-1033, doi:10.1126/science.1160809 (2009).
- 130 Wang, R. *et al.* The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity* **35**, 871-882, doi:10.1016/j.immuni.2011.09.021 (2011).
- 131 Gerriets, V. A. *et al.* Metabolic programming and PDHK1 control CD4+ T cell subsets and inflammation. *J Clin Invest* **125**, 194-207, doi:10.1172/JCI76012 (2015).
- 132 Fiedorczuk, K. & Sazanov, L. A. Mammalian Mitochondrial Complex I Structure and Disease-Causing Mutations. *Trends Cell Biol* **28**, 835-867, doi:10.1016/j.tcb.2018.06.006 (2018).
- 133 Talla, V., Koilkonda, R. & Guy, J. Gene Therapy with Single-Subunit Yeast NADH-Ubiquinone Oxidoreductase (NDI1) Improves the Visual Function in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) Mice Model of Multiple Sclerosis (MS). *Mol Neurobiol* **57**, 1952-1965, doi:10.1007/s12035-019-01857-6 (2020).
- 134 Zimmermann, F. A. *et al.* Deficiency of respiratory chain complex I in Hashimoto thyroiditis. *Mitochondrion* **26**, 1-6, doi:10.1016/j.mito.2015.11.002 (2016).
- 135 King, A., Selak, M. A. & Gottlieb, E. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene* **25**, 4675-4682, doi:10.1038/sj.onc.1209594 (2006).
- 136 de Lonlay, P. *et al.* A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat Genet* **29**, 57-60, doi:10.1038/ng706 (2001).
- 137 Fernandez-Vizarra, E. *et al.* Impaired complex III assembly associated with BCS1L gene mutations in isolated mitochondrial encephalopathy. *Hum Mol Genet* **16**, 1241-1252, doi:10.1093/hmg/ddm072 (2007).
- 138 Hinson, J. T. *et al.* Missense mutations in the BCS1L gene as a cause of the Björnstad syndrome. *N Engl J Med* **356**, 809-819, doi:10.1056/NEJMoa055262 (2007).
- 139 Reddy, P. H. & Oliver, D. M. Amyloid Beta and Phosphorylated Tau-Induced Defective Autophagy and Mitophagy in Alzheimer's Disease. *Cells* **8**, doi:10.3390/cells8050488 (2019).

- 140 Cardoso, S. M., Proença, M. T., Santos, S., Santana, I. & Oliveira, C. R. Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets. *Neurobiol Aging* **25**, 105-110, doi:10.1016/s0197-4580(03)00033-2 (2004).
- 141 Rothwell, S., Lilleker, J. B. & Lamb, J. A. Genetics in inclusion body myositis. *Curr Opin Rheumatol* **29**, 639-644, doi:10.1097/BOR.0000000000000431 (2017).
- 142 Gangcuango, L. M. A., Mitchell, B. I. & Siriwardhana, C. Mitochondrial oxidative phosphorylation in peripheral blood mononuclear cells is decreased in chronic HIV and correlates with immune dysregulation. *PLoS One* **15**, e0231761-e0231761 (2020).
- 143 Qi, R., Wang, D., Xing, L. & Wu, Z. Cyclosporin A inhibits mitochondrial biogenesis in Hep G2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **496**, 941-946, doi:10.1016/j.bbrc.2018.01.113 (2018).
- 144 Dautant, A. *et al.* ATP Synthase Diseases of Mitochondrial Genetic Origin. *Front Physiol* **9**, 329, doi:10.3389/fphys.2018.00329 (2018).
- 145 Kominami, E. *et al.* Specific storage of subunit c of mitochondrial ATP synthase in lysosomes of neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten's disease). *J Biochem* **111**, 278-282, doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123749 (1992).
- 146 Kroemer, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* **16**, 3-11, doi:10.1038/cdd.2008.150 (2009).
- 147 Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35**, 495-516, doi:10.1080/01926230701320337 (2007).
- 148 Jost, P. J. *et al.* XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* **460**, 1035-1039 (2009).
- 149 Fadok, V. A. *et al.* Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* **148**, 2207-2216 (1992).
- 150 Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C. & Haslett, C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* **2**, 965-975, doi:10.1038/nri957 (2002).
- 151 Baines, C. P. Role of the mitochondrion in programmed necrosis. *Front Physiol* **1**, 156, doi:10.3389/fphys.2010.00156 (2010).
- 152 Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J. & Green, D. R. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* **37**, 299-310, doi:10.1016/j.molcel.2010.01.025 (2010).
- 153 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).
- 154 McArthur, K. *et al.* BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis. *Science* **359**, eaao6047-eaao6047, doi:10.1126/science.aao6047 (2018).
- 155 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).
- 156 Kroemer, G., Galluzzi, L. & Brenner, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* **87**, 99-163, doi:10.1152/physrev.00013.2006 (2007).
- 157 Baliga, B. & Kumar, S. Apaf-1/cytochrome c apoptosome: an essential initiator of caspase activation or just a sideshow? *Cell Death Differ* **10**, 16-18 (2003).

- 158 Pellegrini, M. *et al.* Loss of Bim increases T cell production and function in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* **200**, 1189-1195, doi:10.1084/jem.20041328 (2004).
- 159 Li, W. Q., Jiang, Q., Khaled, A. R., Keller, J. R. & Durum, S. K. Interleukin-7 inactivates the pro-apoptotic protein Bad promoting T cell survival. *J Biol Chem* **279**, 29160-29166, doi:10.1074/jbc.M401656200 (2004).
- 160 Mandal, M. *et al.* The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival. *J Exp Med* **201**, 603-614, doi:10.1084/jem.20041924 (2005).
- 161 Sun, Z. *et al.* Requirement for RORgamma in thymocyte survival and lymphoid organ development. *Science* **288**, 2369-2373, doi:10.1126/science.288.5475.2369 (2000).
- 162 Clybouw, C. *et al.* Alternative splicing of Bim and Erk-mediated Bim(EL) phosphorylation are dispensable for hematopoietic homeostasis in vivo. *Cell Death Differ* **19**, 1060-1068, doi:10.1038/cdd.2011.198 (2012).
- 163 Bouillet, P. *et al.* BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* **415**, 922-926, doi:10.1038/415922a (2002).
- 164 McCarty, N. *et al.* Signaling by the kinase MINK is essential in the negative selection of autoreactive thymocytes. *Nat Immunol* **6**, 65-72, doi:10.1038/ni1145 (2005).
- 165 Enders, A. *et al.* Loss of the pro-apoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim inhibits BCR stimulation-induced apoptosis and deletion of autoreactive B cells. *J Exp Med* **198**, 1119-1126, doi:10.1084/jem.20030411 (2003).
- 166 McKinstry, K. K., Strutt, T. M. & Swain, S. L. Regulation of CD4+ T-cell contraction during pathogen challenge. *Immunol Rev* **236**, 110-124, doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00921.x (2010).
- 167 Wu, J. L. *et al.* Temporal regulation of Lsp1 O-GlcNAcylation and phosphorylation during apoptosis of activated B cells. *Nat Commun* **7**, 12526, doi:10.1038/ncomms12526 (2016).
- 168 Bhattacharya, D. *et al.* Transcriptional profiling of antigen-dependent murine B cell differentiation and memory formation. *J Immunol* **179**, 6808-6819, doi:10.4049/jimmunol.179.10.6808 (2007).
- 169 Wang, Z., Karras, J. G., Howard, R. G. & Rothstein, T. L. Induction of bcl-x by CD40 engagement rescues sIg-induced apoptosis in murine B cells. *J Immunol* **155**, 3722-3725 (1995).
- 170 Chhabra, A., Mukherji, B. & Batra, D. Activation induced cell death (AICD) of human melanoma antigen-specific TCR engineered CD8 T cells involves JNK, Bim and p53. *Expert Opin Ther Targets* **21**, 117-129, doi:10.1080/14728222.2017.1270941 (2017).
- 171 Heibein, J. A. *et al.* Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *J Exp Med* **192**, 1391-1402, doi:10.1084/jem.192.10.1391 (2000).
- 172 Klanova, M. & Klener, P. BCL-2 Proteins in Pathogenesis and Therapy of B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas. *Cancers (Basel)* **12**, doi:10.3390/cancers12040938 (2020).
- 173 Akao, Y. *et al.* An anti-Parkinson's disease drug, N-propargyl-1(R)-aminoindan (rasagiline), enhances expression of anti-apoptotic bcl-2 in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* **326**, 105-108, doi:10.1016/s0304-3940(02)00332-4 (2002).

- 174 Shao, K., Xi, L., Cang, Z., Chen, C. & Huang, S. Knockdown of NEAT1 exerts suppressive effects on diabetic retinopathy progression via inactivating TGF-beta1 and VEGF signaling pathways. *J Cell Physiol* **235**, 9361-9369, doi:10.1002/jcp.29740 (2020).
- 175 Su, J. H., Deng, G. & Cotman, C. W. Bax protein expression is increased in Alzheimer's brain: correlations with DNA damage, Bcl-2 expression, and brain pathology. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**, 86-93, doi:10.1097/00005072-199701000-00009 (1997).
- 176 Zhang, Y. *et al.* Sequential activation of individual caspases, and of alterations in Bcl-2 proapoptotic signals in a mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem* **87**, 1184-1192, doi:10.1046/j.1471-4159.2003.02105.x (2003).
- 177 Martin, L. J. Mitochondrial pathobiology in ALS. *J Bioenerg Biomembr* **43**, 569-579, doi:10.1007/s10863-011-9395-y (2011).
- 178 Cuadrado-Tejedor, M. *et al.* Enhanced expression of the voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) in Alzheimer's disease transgenic mice: an insight into the pathogenic effects of amyloid- $\beta$ . *J Alzheimers Dis* **23**, 195-206, doi:10.3233/jad-2010-100966 (2011).
- 179 Zeng, F. *et al.* Central role of RIPK1-VDAC1 pathway on cardiac impairment in a non-human primate model of rheumatoid arthritis. *J Mol Cell Cardiol* **125**, 50-60, doi:10.1016/j.yjmcc.2018.10.015 (2018).
- 180 Majewski, N. *et al.* Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Mol Cell* **16**, 819-830, doi:10.1016/j.molcel.2004.11.014 (2004).
- 181 Fu, M., Shi, W., Li, Z. & Liu, H. Activation of mPTP-dependent mitochondrial apoptosis pathway by a novel pan HDAC inhibitor resminostat in hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **477**, 527-533, doi:10.1016/j.bbrc.2016.04.147 (2016).
- 182 Hou, W. *et al.* Cyclophilin D promotes tubular cell damage and the development of interstitial fibrosis in the obstructed kidney. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **45**, 250-260, doi:10.1111/1440-1681.12881 (2018).
- 183 Whang, J. *et al.* Mycobacterium abscessus glycopeptidolipids inhibit macrophage apoptosis and bacterial spreading by targeting mitochondrial cyclophilin D. *Cell Death Dis* **8**, e3012, doi:10.1038/cddis.2017.420 (2017).
- 184 Gan, X. *et al.* CypD-mPTP axis regulates mitochondrial functions contributing to osteogenic dysfunction of MC3T3-E1 cells in inflammation. *J Physiol Biochem* **74**, 395-402, doi:10.1007/s13105-018-0627-z (2018).
- 185 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).
- 186 Colonna, L., Lood, C. & Elkon, K. B. Beyond apoptosis in lupus. *Curr Opin Rheumatol* **26**, 459-466, doi:10.1097/BOR.0000000000000083 (2014).
- 187 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).
- 188 Emlen, W., Niebur, J. & Kadera, R. Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **152**, 3685-3692 (1994).

- 189 Drago, I., Pizzo, P. & Pozzan, T. After half a century mitochondrial calcium in- and  
efflux machineries reveal themselves. *EMBO J* **30**, 4119-4125,  
doi:10.1038/emboj.2011.337 (2011).
- 190 Kirichok, Y., Krapivinsky, G. & Clapham, D. E. The mitochondrial calcium uniporter  
is a highly selective ion channel. *Nature* **427**, 360-364 (2004).
- 191 Rizzuto, R. *et al.* Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of  
mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses. *Science* **280**, 1763-1766 (1998).
- 192 Luongo, T. S. *et al.* The mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger is essential for Ca<sup>2+</sup>  
homeostasis and viability. *Nature* **545**, 93-97 (2017).
- 193 Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A. & Mammucari, C. Mitochondria as sensors  
and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 566-578,  
doi:10.1038/nrm3412 (2012).
- 194 Zheng, X. *et al.* Phosphorylation of dynamin-related protein 1 at Ser616 regulates  
mitochondrial fission and is involved in mitochondrial calcium uniporter-mediated  
neutrophil polarization and chemotaxis. *Mol Immunol* **87**, 23-32,  
doi:10.1016/j.molimm.2017.03.019 (2017).
- 195 Contento, R. L. *et al.* Adhesion shapes T cells for prompt and sustained T-cell  
receptor signalling. *EMBO J* **29**, 4035-4047, doi:10.1038/emboj.2010.258 (2010).
- 196 Quintana, A. *et al.* Calcium microdomains at the immunological synapse: how ORAI  
channels, mitochondria and calcium pumps generate local calcium signals for  
efficient T-cell activation. *Embo j* **30**, 3895-3912, doi:10.1038/emboj.2011.289  
(2011).
- 197 Hall, D. D., Wu, Y., Domann, F. E., Spitz, D. R. & Anderson, M. E. Mitochondrial  
calcium uniporter activity is dispensable for MDA-MB-231 breast carcinoma cell  
survival. *PLoS One* **9**, e96866, doi:10.1371/journal.pone.0096866 (2014).
- 198 Tang, S. *et al.* Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter is critical for store-operated Ca<sup>2+</sup> entry-  
dependent breast cancer cell migration. *Biochem Biophys Res Commun* **458**, 186-193,  
doi:10.1016/j.bbrc.2015.01.092 (2015).
- 199 Tosatto, A. *et al.* The mitochondrial calcium uniporter regulates breast cancer  
progression via HIF-1 $\alpha$ . *EMBO Mol Med* **8**, 569-585,  
doi:10.15252/emmm.201606255 (2016).
- 200 Logan, C. V. *et al.* Loss-of-function mutations in MICU1 cause a brain and muscle  
disorder linked to primary alterations in mitochondrial calcium signaling. *Nat Genet*  
**46**, 188-193, doi:10.1038/ng.2851 (2014).
- 201 Calvo-Rodriguez, M. *et al.* Increased mitochondrial calcium levels associated with  
neuronal death in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Commun* **11**, 2146,  
doi:10.1038/s41467-020-16074-2 (2020).
- 202 Ivanova, A. V. *et al.* Autoimmunity, spontaneous tumourigenesis, and IL-15  
insufficiency in mice with a targeted disruption of the tumour suppressor gene Fus1.  
*J Pathol* **211**, 591-601, doi:10.1002/path.2146 (2007).
- 203 Uzhachenko, R. *et al.* Fus1/Tusc2 is a novel regulator of mitochondrial calcium  
handling, Ca<sup>2+</sup>-coupled mitochondrial processes, and Ca<sup>2+</sup>-dependent NFAT and  
NF- $\kappa$ B pathways in CD4<sup>+</sup> T cells. *Antioxid Redox Signal* **20**, 1533-1547 (2014).
- 204 Maxfield, F. R. & Wustner, D. Intracellular cholesterol transport. *J Clin Invest* **110**,  
891-898, doi:10.1172/JCI16500 (2002).
- 205 Boström, P. *et al.* SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets  
and are implicated in insulin sensitivity. *Nat Cell Biol* **9**, 1286-1293 (2007).

- 206 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).
- 207 Clark, B. J., Wells, J., King, S. R. & Stocco, D. M. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem* **269**, 28314-28322 (1994).
- 208 Papadopoulos, V. *et al.* Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 402-409 (2006).
- 209 Bose, M., Whittal, R. M., Miller, W. L. & Bose, H. S. Steroidogenic activity of StAR requires contact with mitochondrial VDAC1 and phosphate carrier protein. *J Biol Chem* **283**, 8837-8845, doi:10.1074/jbc.M709221200 (2008).
- 210 Wenceslau, C. F., McCarthy, C. G., Szasz, T., Gouloupoulou, 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).
- 211 McEnery, M. W., Snowman, A. M., Trifiletti, R. R. & Snyder, S. H. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3170-3174, doi:10.1073/pnas.89.8.3170 (1992).
- 212 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).
- 213 White, P. C., Curnow, K. M. & Pascoe, L. Disorders of steroid 11 beta-hydroxylase isozymes. *Endocr Rev* **15**, 421-438, doi:10.1210/edrv-15-4-421 (1994).
- 214 Biswas, L., Farhan, F., Reilly, J., Bartholomew, C. & Shu, X. TSPO Ligands Promote Cholesterol Efflux and Suppress Oxidative Stress and Inflammation in Choroidal Endothelial Cells. *Int J Mol Sci* **19**, doi:10.3390/ijms19123740 (2018).
- 215 Fairweather, D. *et al.* Sex differences in translocator protein 18 kDa (TSPO) in the heart: implications for imaging myocardial inflammation. *J Cardiovasc Transl Res* **7**, 192-202, doi:10.1007/s12265-013-9538-0 (2014).
- 216 Daugherty, D. J. *et al.* A TSPO ligand is protective in a mouse model of multiple sclerosis. *EMBO Mol Med* **5**, 891-903, doi:10.1002/emmm.201202124 (2013).
- 217 Ekholm, M. & Kahan, T. The Impact of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System on Inflammation, Coagulation, and Atherothrombotic Complications, and to Aggravated COVID-19. *Front Pharmacol* **12**, 640185, doi:10.3389/fphar.2021.640185 (2021).
- 218 Laghnam, D., Jozwiak, M. & Nguyen, L. S. Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Immunomodulation: A State-of-the-Art Review. *Cells* **10**, 1767-1767, doi:10.3390/cells10071767 (2021).
- 219 Sun, Y. *et al.* Aldosterone-induced inflammation in the rat heart : role of oxidative stress. *Am J Pathol* **161**, 1773-1781, doi:10.1016/S0002-9440(10)64454-9 (2002).
- 220 Fujita, T. Mineralocorticoid receptors, salt-sensitive hypertension, and metabolic syndrome. *Hypertension* **55**, 813-818, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.149062 (2010).

- 221 Blasi, E. R. *et al.* Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int* **63**, 1791-1800, doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00929.x (2003).
- 222 Felder, R. B. Mineralocorticoid receptors, inflammation and sympathetic drive in a rat model of systolic heart failure. *Exp Physiol* **95**, 19-25, doi:10.1113/expphysiol.2008.045948 (2010).
- 223 Herrada, A. A. *et al.* Aldosterone promotes autoimmune damage by enhancing Th17-mediated immunity. *J Immunol* **184**, 191-202, doi:10.4049/jimmunol.0802886 (2010).
- 224 Ayroldi, E. & Riccardi, C. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB J* **23**, 3649-3658, doi:10.1096/fj.09-134684 (2009).
- 225 Perretti, M. & Ahluwalia, A. The microcirculation and inflammation: site of action for glucocorticoids. *Microcirculation* **7**, 147-161 (2000).
- 226 Iwata, M., Ohoka, Y., Kuwata, T. & Asada, A. Regulation of T cell apoptosis via T cell receptors and steroid receptors. *Stem Cells* **14**, 632-641, doi:10.1002/stem.140632 (1996).
- 227 Perretti, M. *et al.* Endogenous lipid- and peptide-derived anti-inflammatory pathways generated with glucocorticoid and aspirin treatment activate the lipoxin A4 receptor. *Nat Med* **8**, 1296-1302, doi:10.1038/nm786 (2002).
- 228 Zhang, Y. *et al.* Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. *J Immunol* **188**, 2127-2135, doi:10.4049/jimmunol.1102412 (2012).
- 229 Stio, M. *et al.* The Vitamin D analogue TX 527 blocks NF-kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells of patients with Crohn's disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* **103**, 51-60, doi:10.1016/j.jsbmb.2006.07.008 (2007).
- 230 Takeuchi, A. *et al.* Nuclear factor of activated T cells (NFAT) as a molecular target for 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-mediated effects. *J Immunol* **160**, 209-218 (1998).
- 231 Hamzaoui, K. *et al.* Cytokine profile in Behcet's disease patients. Relationship with disease activity. *Scand J Rheumatol* **31**, 205-210, doi:10.1080/030097402320318387 (2002).
- 232 King, S. R., Bhangoo, A. & Stocco, D. M. Functional and physiological consequences of StAR deficiency: role in lipoid congenital adrenal hyperplasia. *Endocr Dev* **20**, 47-53, doi:10.1159/000321214 (2011).
- 233 Shoshan-Barmatz, V., Pittala, S. & Mizrachi, D. VDAC1 and the TSPO: Expression, Interactions, and Associated Functions in Health and Disease States. *Int J Mol Sci* **20**, doi:10.3390/ijms20133348 (2019).
- 234 Guilarte, T. R. TSPO in diverse CNS pathologies and psychiatric disease: A critical review and a way forward. *Pharmacol Ther* **194**, 44-58, doi:10.1016/j.pharmthera.2018.09.003 (2019).
- 235 Narayan, N. *et al.* Translocator Protein as an Imaging Marker of Macrophage and Stromal Activation in Rheumatoid Arthritis Pannus. *J Nucl Med* **59**, 1125-1132, doi:10.2967/jnumed.117.202200 (2018).
- 236 Forsberg, A. *et al.* Disease activity in rheumatoid arthritis is inversely related to cerebral TSPO binding assessed by [(11)C]PBR28 positron emission tomography. *J Neuroimmunol* **334**, 577000, doi:10.1016/j.jneuroim.2019.577000 (2019).



- 237 Taylor, J. M., Borthwick, F., Bartholomew, C. & Graham, A. Overexpression of steroidogenic acute regulatory protein increases macrophage cholesterol efflux to apolipoprotein AI. *Cardiovasc Res* **86**, 526-534, doi:10.1093/cvr/cvq015 (2010).
- 238 Ning, Y. *et al.* Overexpression of mitochondrial cholesterol delivery protein, StAR, decreases intracellular lipids and inflammatory factors secretion in macrophages. *Atherosclerosis* **204**, 114-120, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.09.006 (2009).
- 239 Attar, E. & Bulun, S. E. Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects. *Hum Reprod Update* **12**, 49-56, doi:10.1093/humupd/dmi034 (2006).
- 240 Garay, L. *et al.* Progesterone treatment modulates mRNA OF neurosteroidogenic enzymes in a murine model of multiple sclerosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* **165**, 421-429, doi:10.1016/j.jsbmb.2016.09.001 (2017).
- 241 Hannen, R. *et al.* Dysfunctional Skin-Derived Glucocorticoid Synthesis Is a Pathogenic Mechanism of Psoriasis. *J Invest Dermatol* **137**, 1630-1637, doi:10.1016/j.jid.2017.02.984 (2017).
- 242 Fanelli, F. & Di Dalmazi, G. Serum steroid profiling by mass spectrometry in adrenocortical tumors: diagnostic implications. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **26**, 160-165, doi:10.1097/MED.0000000000000475 (2019).
- 243 Joehrer, K. *et al.* CYP11B1 mutations causing non-classic adrenal hyperplasia due to 11 beta-hydroxylase deficiency. *Hum Mol Genet* **6**, 1829-1834, doi:10.1093/hmg/6.11.1829 (1997).
- 244 Bernhardt, R. The potential of targeting CYP11B. *Expert Opin Ther Targets* **20**, 923-934, doi:10.1517/14728222.2016.1151873 (2016).
- 245 White, P. C. Aldosterone synthase deficiency and related disorders. *Mol Cell Endocrinol* **217**, 81-87, doi:10.1016/j.mce.2003.10.013 (2004).
- 246 Miao, H. *et al.* Analysis of novel heterozygous mutations in the CYP11B2 gene causing congenital aldosterone synthase deficiency and literature review. *Steroids* **150**, 108448, doi:10.1016/j.steroids.2019.108448 (2019).
- 247 White, P. C., Hautanen, A. & Kupari, M. Aldosterone synthase (CYP11B2) polymorphisms and cardiovascular function. *J Steroid Biochem Mol Biol* **69**, 409-412, doi:10.1016/s0960-0760(99)00071-0 (1999).
- 248 Davies, E. & Kenyon, C. J. CYP11B2 polymorphisms and cardiovascular risk factors. *J Hypertens* **21**, 1249-1253, doi:10.1097/00004872-200307000-00008 (2003).
- 249 Perez-Rivas, L. G., Williams, T. A. & Reincke, M. Inherited Forms of Primary Hyperaldosteronism: New Genes, New Phenotypes and Proposition of A New Classification. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **127**, 93-99, doi:10.1055/a-0713-0629 (2019).
- 250 Cali, J. J., Hsieh, C. L., Francke, U. & Russell, D. W. Mutations in the bile acid biosynthetic enzyme sterol 27-hydroxylase underlie cerebrotendinous xanthomatosis. *J Biol Chem* **266**, 7779-7783 (1991).
- 251 Barchetta, I. *et al.* Liver vitamin D receptor, CYP2R1, and CYP27A1 expression: relationship with liver histology and vitamin D3 levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis or hepatitis C virus. *Hepatology* **56**, 2180-2187, doi:10.1002/hep.25930 (2012).
- 252 Alfaqih, M. A. *et al.* CYP27A1 Loss Dysregulates Cholesterol Homeostasis in Prostate Cancer. *Cancer Res* **77**, 1662-1673, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2738 (2017).

- 253 Baek, A. E. *et al.* The cholesterol metabolite 27 hydroxycholesterol facilitates breast cancer metastasis through its actions on immune cells. *Nat Commun* **8**, 864, doi:10.1038/s41467-017-00910-z (2017).
- 254 Brown, A. J. & Jessup, W. Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Mol Aspects Med* **30**, 111-122, doi:10.1016/j.mam.2009.02.005 (2009).
- 255 Testa, G. *et al.* Changes in brain oxysterols at different stages of Alzheimer's disease: Their involvement in neuroinflammation. *Redox Biol* **10**, 24-33, doi:10.1016/j.redox.2016.09.001 (2016).
- 256 Alzahrani, A. S. *et al.* A novel G102E mutation of CYP27B1 in a large family with vitamin D-dependent rickets type 1. *J Clin Endocrinol Metab* **95**, 4176-4183, doi:10.1210/jc.2009-2278 (2010).
- 257 Lopez, E. R. *et al.* A promoter polymorphism of the CYP27B1 gene is associated with Addison's disease, Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease and type 1 diabetes mellitus in Germans. *Eur J Endocrinol* **151**, 193-197, doi:10.1530/eje.0.1510193 (2004).
- 258 Ramagopalan, S. V. *et al.* Rare variants in the CYP27B1 gene are associated with multiple sclerosis. *Ann Neurol* **70**, 881-886, doi:10.1002/ana.22678 (2011).
- 259 Fichna, M. *et al.* Association of the CYP27B1 C(-1260)A polymorphism with autoimmune Addison's disease. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **118**, 544-549, doi:10.1055/s-0029-1241206 (2010).
- 260 Bailey, R. *et al.* Association of the vitamin D metabolism gene CYP27B1 with type 1 diabetes. *Diabetes* **56**, 2616-2621, doi:10.2337/db07-0652 (2007).
- 261 Du, J., Wei, X., Ge, X., Chen, Y. & Li, Y. C. Microbiota-Dependent Induction of Colonic Cyp27b1 Is Associated With Colonic Inflammation: Implications of Locally Produced 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in Inflammatory Regulation in the Colon. *Endocrinology* **158**, 4064-4075, doi:10.1210/en.2017-00578 (2017).
- 262 Jiang, Y., Liao, L., Li, J., Wang, L. & Xie, Z. Older Age Is Associated with Decreased Levels of VDR, CYP27B1, and CYP24A1 and Increased Levels of PTH in Human Parathyroid Glands. *Int J Endocrinol* **2020**, 7257913, doi:10.1155/2020/7257913 (2020).
- 263 Jones, G., Prosser, D. E. & Kaufmann, M. 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): its important role in the degradation of vitamin D. *Arch Biochem Biophys* **523**, 9-18, doi:10.1016/j.abb.2011.11.003 (2012).
- 264 Carpenter, T. O. CYP24A1 loss of function: Clinical phenotype of monoallelic and biallelic mutations. *J Steroid Biochem Mol Biol* **173**, 337-340, doi:10.1016/j.jsbmb.2017.01.006 (2017).
- 265 Schlingmann, K. P. *et al.* Mutations in CYP24A1 and idiopathic infantile hypercalcemia. *N Engl J Med* **365**, 410-421, doi:10.1056/NEJMoa1103864 (2011).
- 266 Pillai, D. K. *et al.* Associations between genetic variants in vitamin D metabolism and asthma characteristics in young African Americans: a pilot study. *J Investig Med* **59**, 938-946, doi:10.2310/JIM.0b013e318220df41 (2011).
- 267 Wjst, M. *et al.* Asthma families show transmission disequilibrium of gene variants in the vitamin D metabolism and signalling pathway. *Respir Res* **7**, 60, doi:10.1186/1465-9921-7-60 (2006).

- 268 Agnello, L. *et al.* CYP27A1, CYP24A1, and RXR-alpha Polymorphisms, Vitamin D, and Multiple Sclerosis: a Pilot Study. *J Mol Neurosci* **66**, 77-84, doi:10.1007/s12031-018-1152-9 (2018).
- 269 Spach, K. M. & Hayes, C. E. Vitamin D3 confers protection from autoimmune encephalomyelitis only in female mice. *J Immunol* **175**, 4119-4126, doi:10.4049/jimmunol.175.6.4119 (2005).
- 270 Penna-Martinez, M. *et al.* Impaired vitamin D activation and association with CYP24A1 haplotypes in differentiated thyroid carcinoma. *Thyroid* **22**, 709-716, doi:10.1089/thy.2011.0330 (2012).
- 271 Fam, M. S. *et al.* Contribution of CYP27B1 and CYP24A1 genetic variations to the incidence of acute coronary syndrome and to vitamin D serum level. *Can J Physiol Pharmacol* **97**, 1152-1158, doi:10.1139/cjpp-2019-0258 (2019).
- 272 Navarro-Barriuso, J. *et al.* MAP7 and MUCL1 Are Biomarkers of Vitamin D3-Induced Tolerogenic Dendritic Cells in Multiple Sclerosis Patients. *Front Immunol* **10**, 1251, doi:10.3389/fimmu.2019.01251 (2019).
- 273 Bertholet, A. M. & Kirichok, Y. UCP1: A transporter for H(+) and fatty acid anions. *Biochimie* **134**, 28-34, doi:10.1016/j.biochi.2016.10.013 (2017).
- 274 Krauss, S. *et al.* Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction. *J Clin Invest* **112**, 1831-1842, doi:10.1172/JCI19774 (2003).
- 275 Talbot, D. A., Lambert, A. J. & Brand, M. D. Production of endogenous matrix superoxide from mitochondrial complex I leads to activation of uncoupling protein 3. *FEBS Lett* **556**, 111-115, doi:10.1016/s0014-5793(03)01386-3 (2004).
- 276 Vozza, A. *et al.* UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 960-965, doi:10.1073/pnas.1317400111 (2014).
- 277 Trenker, M., Malli, R., Fertschai, I., Levak-Frank, S. & Graier, W. F. Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniport. *Nat Cell Biol* **9**, 445-452, doi:10.1038/ncb1556 (2007).
- 278 De Simone, R. *et al.* The mitochondrial uncoupling protein-2 is a master regulator of both M1 and M2 microglial responses. *J Neurochem* **135**, 147-156, doi:10.1111/jnc.13244 (2015).
- 279 Tagen, M. *et al.* Mitochondrial uncoupling protein 2 inhibits mast cell activation and reduces histamine content. *J Immunol* **183**, 6313-6319, doi:10.4049/jimmunol.0803422 (2009).
- 280 Vogler, S. *et al.* Uncoupling protein 2 has protective function during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* **168**, 1570-1575, doi:10.2353/ajpath.2006.051069 (2006).
- 281 Horvath, T. L. *et al.* Uncoupling proteins-2 and 3 influence obesity and inflammation in transgenic mice. *Int J Obes Relat Metab Disord* **27**, 433-442, doi:10.1038/sj.ijo.0802257 (2003).
- 282 Zhang, H., Kuai, X. Y., Yu, P., Lin, L. & Shi, R. Protective role of uncoupling protein-2 against dextran sodium sulfate-induced colitis. *J Gastroenterol Hepatol* **27**, 603-608, doi:10.1111/j.1440-1746.2011.06879.x (2012).
- 283 Emre, Y. *et al.* Role of uncoupling protein UCP2 in cell-mediated immunity: how macrophage-mediated insulinitis is accelerated in a model of autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19085-19090, doi:10.1073/pnas.0709557104 (2007).

- 284 Nisoli, E. *et al.* Multiple symmetric lipomatosis may be the consequence of defective noradrenergic modulation of proliferation and differentiation of brown fat cells. *J Pathol* **198**, 378-387, doi:10.1002/path.1212 (2002).
- 285 Bernal-Mizrachi, C. *et al.* Vascular respiratory uncoupling increases blood pressure and atherosclerosis. *Nature* **435**, 502-506, doi:10.1038/nature03527 (2005).
- 286 Heilbronn, L. K. *et al.* Association of -3826 G variant in uncoupling protein-1 with increased BMI in overweight Australian women. *Diabetologia* **43**, 242-244, doi:10.1007/s001250050036 (2000).
- 287 Symonds, M. E., Farhat, G., Aldiss, P., Pope, M. & Budge, H. Brown adipose tissue and glucose homeostasis - the link between climate change and the global rise in obesity and diabetes. *Adipocyte* **8**, 46-50, doi:10.1080/21623945.2018.1551689 (2019).
- 288 Johnson, K. T. *et al.* Examination of orbital tissues in murine models of Graves' disease reveals expression of UCP-1 and the TSHR in retrobulbar adipose tissues. *Horm Metab Res* **45**, 401-407, doi:10.1055/s-0032-1333224 (2013).
- 289 Normoyle, K. P. *et al.* The emerging neuroprotective role of mitochondrial uncoupling protein-2 in traumatic brain injury. *Transl Neurosci* **6**, 179-186, doi:10.1515/tnsci-2015-0019 (2015).
- 290 Yasuno, K. *et al.* Synergistic association of mitochondrial uncoupling protein (UCP) genes with schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **144B**, 250-253, doi:10.1002/ajmg.b.30443 (2007).
- 291 Srivastava, N. *et al.* A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with obesity and hyperinsulinemia in northern Indians. *Mol Cell Biochem* **337**, 293-298, doi:10.1007/s11010-009-0311-2 (2010).
- 292 Yamasaki, H. *et al.* Uncoupling protein 2 promoter polymorphism -866G/A affects peripheral nerve dysfunction in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* **29**, 888-894, doi:10.2337/diacare.29.04.06.dc05-1984 (2006).
- 293 Friederich-Persson, M., Persson, P., Hansell, P. & Palm, F. Deletion of Uncoupling Protein-2 reduces renal mitochondrial leak respiration, intrarenal hypoxia and proteinuria in a mouse model of type 1 diabetes. *Acta Physiol (Oxf)* **223**, e13058, doi:10.1111/apha.13058 (2018).
- 294 Deng, M., Wang, D., He, S., Xu, R. & Xie, Y. SIRT1 confers protection against ischemia/reperfusion injury in cardiomyocytes via regulation of uncoupling protein 2 expression. *Mol Med Rep* **16**, 7098-7104, doi:10.3892/mmr.2017.7452 (2017).
- 295 van Abeelen, A. F. *et al.* Variations in the uncoupling protein-3 gene are associated with specific obesity phenotypes. *Eur J Endocrinol* **158**, 669-676, doi:10.1530/EJE-07-0834 (2008).
- 296 O'Leary, A. J. & O'Halloran, K. D. Diaphragm muscle weakness and increased UCP-3 gene expression following acute hypoxic stress in the mouse. *Respir Physiol Neurobiol* **226**, 76-80, doi:10.1016/j.resp.2015.10.018 (2016).
- 297 Zaitso, K. *et al.* Metabolome analysis of the serotonin syndrome rat model: Abnormal muscular contraction is related to metabolic alterations and hyper-thermogenesis. *Life Sci* **207**, 550-561, doi:10.1016/j.lfs.2018.06.031 (2018).
- 298 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).

- 299 Vorobjeva, N. *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species are involved in  
chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils in  
vitro. *Eur J Cell Biol* **96**, 254-265, doi:10.1016/j.ejcb.2017.03.003 (2017).
- 300 Rousset, S. *et al.* The uncoupling protein 2 modulates the cytokine balance in innate  
immunity. *Cytokine* **35**, 135-142, doi:10.1016/j.cyto.2006.07.012 (2006).
- 301 Subramanian, N., Natarajan, K., Clatworthy, M. R., Wang, Z. & Germain, R. N. The  
adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome  
activation. *Cell* **153**, 348-361, doi:10.1016/j.cell.2013.02.054 (2013).
- 302 Cai, X. *et al.* Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral  
immune defense and inflammasome activation. *Cell* **156**, 1207-1222,  
doi:10.1016/j.cell.2014.01.063 (2014).
- 303 Marcoux, G. *et al.* Microparticle and mitochondrial release during extended storage  
of different types of platelet concentrates. *Platelets* **28**, 272-280,  
doi:10.1080/09537104.2016.1218455 (2017).
- 304 Marcoux, G. *et al.* Platelet-derived extracellular vesicles convey mitochondrial  
DAMPs in platelet concentrates and their levels are associated with adverse reactions.  
*Transfusion* **59**, 2403-2414 (2019).
- 305 Melki, I. *et al.* Platelets release mitochondrial antigens in systemic lupus  
erythematosus. *Sci Transl Med* **13**, eaav5928-eaav5928,  
doi:10.1126/scitranslmed.aav5928 (2021).
- 306 McDonald, B. *et al.* Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile  
inflammation. *Science* **330**, 362-366, doi:10.1126/science.1195491 (2010).
- 307 Garcia-Martinez, I. *et al.* Hepatocyte mitochondrial DNA drives nonalcoholic  
steatohepatitis by activation of TLR9. *J Clin Invest* **126**, 859-864,  
doi:10.1172/JCI83885 (2016).
- 308 Marques, P. E. *et al.* Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to  
amplify organ injury during mouse acute liver failure. *Hepatology* **56**, 1971-1982,  
doi:10.1002/hep.25801 (2012).
- 309 Oka, T. *et al.* Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation  
and heart failure. *Nature* **485**, 251-255, doi:10.1038/nature10992 (2012).
- 310 Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I. & Simon, H. U. Viable  
neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell  
Death Differ* **16**, 1438-1444, doi:10.1038/cdd.2009.96 (2009).
- 311 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).
- 312 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).
- 313 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).
- 314 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**, 49767-49767 (2012).

- 315 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).
- 316 Cardon, L. R., Burge, C., Clayton, D. A. & Karlin, S. Pervasive CpG suppression in animal mitochondrial genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3799-3803, doi:10.1073/pnas.91.9.3799 (1994).
- 317 Bogenhagen, D. F. Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochim Biophys Acta* **1819**, 914-920, doi:10.1016/j.bbagr.2011.11.005 (2012).
- 318 Wolstenholme, D. R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int Rev Cytol* **141**, 173-216, doi:10.1016/s0074-7696(08)62066-5 (1992).
- 319 Anderson, S. *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457-465, doi:10.1038/290457a0 (1981).
- 320 Chomyn, A. *et al.* URF6, last unidentified reading frame of human mtDNA, codes for an NADH dehydrogenase subunit. *Science* **234**, 614-618, doi:10.1126/science.3764430 (1986).
- 321 West, A. P. *et al.* Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature* **520**, 553-557, doi:10.1038/nature14156 (2015).
- 322 Aarreberg, L. D. *et al.* Interleukin-1beta Induces mtDNA Release to Activate Innate Immune Signaling via cGAS-STING. *Mol Cell* **74**, 801-815 e806, doi:10.1016/j.molcel.2019.02.038 (2019).
- 323 Shi, H. X. *et al.* Mitochondrial ubiquitin ligase MARCH5 promotes TLR7 signaling by attenuating TANK action. *PLoS Pathog* **7**, e1002057, doi:10.1371/journal.ppat.1002057 (2011).
- 324 Kruger, A. *et al.* Human TLR8 senses UR/URR motifs in bacterial and mitochondrial RNA. *EMBO Rep* **16**, 1656-1663, doi:10.15252/embr.201540861 (2015).
- 325 Kang, D., Kim, S. H. & Hamasaki, N. Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. *Mitochondrion* **7**, 39-44, doi:10.1016/j.mito.2006.11.017 (2007).
- 326 Julian, M. W., Shao, G. & Bao, S. Mitochondrial transcription factor A serves as a danger signal by augmenting plasmacytoid dendritic cell responses to DNA. *J Immunol* **189**, 433-443 (2012).
- 327 Julian, M. W., Shao, G., Vangundy, Z. C., Papenfuss, T. L. & Crouser, E. D. Mitochondrial transcription factor A, an endogenous danger signal, promotes TNF $\alpha$  release via RAGE- and TLR9-responsive plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* **8**, e72354, doi:10.1371/journal.pone.0072354 (2013).
- 328 Andreeva, L. *et al.* cGAS senses long and HMGB/TFAM-bound U-turn DNA by forming protein-DNA ladders. *Nature* **549**, 394-398, doi:10.1038/nature23890 (2017).
- 329 Chung, W. W., Wu, R., Ji, Y., Dong, W. & Wang, P. Mitochondrial transcription factor A is a proinflammatory mediator in hemorrhagic shock. *Int J Mol Med* **30**, 199-203, doi:10.3892/ijmm.2012.959 (2012).
- 330 Duvvuri, B. & Lood, C. Cell-Free DNA as a Biomarker in Autoimmune Rheumatic Diseases. *Front Immunol* **10**, 502, doi:10.3389/fimmu.2019.00502 (2019).
- 331 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 Res Ther* **5**, R234-240, doi:10.1186/ar787 (2003).

- 332 Meng, X. *et al.* Circulating Mitochondrial DNA is Linked to Progression and  
Prognosis of Epithelial Ovarian Cancer. *Transl Oncol* **12**, 1213-1220 (2019).
- 333 Kohler, C. *et al.* Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial  
DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Mol Cancer* **8**, 105-105 (2009).
- 334 Gambardella, S. *et al.* ccf-mtDNA as a Potential Link Between the Brain and Immune  
System in Neuro-Immunological Disorders. *Front Immunol* **10**, 1064,  
doi:10.3389/fimmu.2019.01064 (2019).
- 335 Lowes, H., Pyle, A., Duddy, M. & Hudson, G. Cell-free mitochondrial DNA in  
progressive multiple sclerosis. *Mitochondrion* **46**, 307-312,  
doi:10.1016/j.mito.2018.07.008 (2019).
- 336 Lowes, H., Pyle, A., Santibanez-Koref, M. & Hudson, G. Circulating cell-free  
mitochondrial DNA levels in Parkinson's disease are influenced by treatment. *Mol  
Neurodegener* **15**, 10, doi:10.1186/s13024-020-00362-y (2020).
- 337 Pyle, A. *et al.* Reduced cerebrospinal fluid mitochondrial DNA is a biomarker for  
early-stage Parkinson's disease. *Ann Neurol* **78**, 1000-1004 (2015).
- 338 Alfatni, A. *et al.* Peripheral Blood Mononuclear Cells and Platelets Mitochondrial  
Dysfunction, Oxidative Stress, and Circulating mtDNA in Cardiovascular Diseases.  
*J Clin Med* **9**, 311-311, doi:10.3390/jcm9020311 (2020).
- 339 Bae, J. H. *et al.* Circulating Cell-Free mtDNA Contributes to AIM2 Inflammasome-  
Mediated Chronic Inflammation in Patients with Type 2 Diabetes. *Cells* **8**, 328-328,  
doi:10.3390/cells8040328 (2019).
- 340 Catano Canizales, Y. G. *et al.* Increased Levels of AIM2 and Circulating  
Mitochondrial DNA in Type 2 Diabetes. *Iran J Immunol* **15**, 142-155, doi:IIJv15i2A7  
(2018).
- 341 Cossarizza, A. *et al.* Increased plasma levels of extracellular mitochondrial DNA  
during HIV infection: a new role for mitochondrial damage-associated molecular  
patterns during inflammation. *Mitochondrion* **11**, 750-755,  
doi:10.1016/j.mito.2011.06.005 (2011).
- 342 Shi, Q. *et al.* Circulating mitochondrial biomarkers for drug-induced liver injury.  
*Biomark Med* **9**, 1215-1223, doi:10.2217/bmm.15.59 (2015).
- 343 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).
- 344 He, J. *et al.* Circulating Mitochondrial DAMPs Are Not Effective Inducers of  
Proteinuria and Kidney Injury in Rodents. *PLoS One* **10**, 0124469-0124469 (2015).
- 345 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).
- 346 Pinti, M. *et al.* Circulating mitochondrial DNA increases with age and is a familiar  
trait: Implications for "inflamm-aging.". *Eur J Immunol* **44**, 1552-1562 (2014).
- 347 Trumpff, C. *et al.* Acute psychological stress increases serum circulating cell-free  
mitochondrial DNA. *Psychoneuroendocrinology* **106**, 268-276,  
doi:10.1016/j.psyneuen.2019.03.026 (2019).
- 348 Kageyama, Y. *et al.* The relationship between circulating mitochondrial DNA and  
inflammatory cytokines in patients with major depression. *J Affect Disord* **233**, 15-  
20 (2018).

- 349 Bueno, M. *et al.* PINK1 attenuates mtDNA release in alveolar epithelial cells and  
TLR9 mediated profibrotic responses. *PLoS One* **14**, e0218003,  
doi:10.1371/journal.pone.0218003 (2019).
- 350 Mehra, N. *et al.* Circulating mitochondrial nucleic acids have prognostic value for  
survival in patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res* **13**, 421-426,  
doi:10.1158/1078-0432.Ccr-06-1087 (2007).
- 351 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).
- 352 Ronnblom, L. & Eloranta, M. L. The interferon signature in autoimmune diseases.  
*Curr Opin Rheumatol* **25**, 248-253, doi:10.1097/BOR.0b013e32835c7e32 (2013).
- 353 Chauhan, S. K., Singh, V. V., Rai, R., Rai, M. & Rai, G. Distinct autoantibody  
profiles in systemic lupus erythematosus patients are selectively associated with  
TLR7 and TLR9 upregulation. *J Clin Immunol* **33**, 954-964, doi:10.1007/s10875-  
013-9887-0 (2013).
- 354 Sacre, K., Criswell, L. A. & McCune, J. M. Hydroxychloroquine is associated with  
impaired interferon-alpha and tumor necrosis factor-alpha production by  
plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* **14**,  
R155, doi:10.1186/ar3895 (2012).
- 355 Costedoat-Chalumeau, N., Dunogue, B., Morel, N., Le Guern, V. & Guettrot-Imbert,  
G. Hydroxychloroquine: a multifaceted treatment in lupus. *Presse Med* **43**, e167-180,  
doi:10.1016/j.lpm.2014.03.007 (2014).
- 356 Galper, J. B. Mitochondrial protein synthesis in HeLa cells. *J Cell Biol* **60**, 755-763,  
doi:10.1083/jcb.60.3.755 (1974).
- 357 Migeotte, I., Communi, D. & Parmentier, M. Formyl peptide receptors: a  
promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune  
responses. *Cytokine Growth Factor Rev* **17**, 501-519,  
doi:10.1016/j.cytogfr.2006.09.009 (2006).
- 358 Zhang, Q. *et al.* Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to  
injury. *Nature* **464**, 104-107, doi:10.1038/nature08780 (2010).
- 359 Ban, T. *et al.* Molecular basis of selective mitochondrial fusion by heterotypic action  
between OPA1 and cardiolipin. *Nat Cell Biol* **19**, 856-863 (2017).
- 360 Bustillo-Zabalbeitia, I. *et al.* Specific interaction with cardiolipin triggers functional  
activation of Dynamin-Related Protein 1. *PLoS One* **9**, e102738,  
doi:10.1371/journal.pone.0102738 (2014).
- 361 Zhang, M., Mileykovskaya, E. & Dowhan, W. Gluing the respiratory chain together.  
Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial  
membrane. *J Biol Chem* **277**, 43553-43556, doi:10.1074/jbc.C200551200 (2002).
- 362 Muenzner, J. & Pletneva, E. V. Structural transformations of cytochrome c upon  
interaction with cardiolipin. *Chem Phys Lipids* **179**, 57-63 (2014).
- 363 Iyer, S. S. *et al.* Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome  
activation. *Immunity* **39**, 311-323 (2013).
- 364 Liu, Q., Zhang, D., Hu, D., Zhou, X. & Zhou, Y. The role of mitochondria in NLRP3  
inflammasome activation. *Mol Immunol* **103**, 115-124,  
doi:10.1016/j.molimm.2018.09.010 (2018).
- 365 Vitiello, L., Gorini, S., Rosano, G. & la Sala, A. Immunoregulation through  
extracellular nucleotides. *Blood* **120**, 511-518 (2012).



- 366 North, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* **82**, 1013-1067, doi:10.1152/physrev.00015.2002 (2002).
- 367 Karmakar, M., Katsnelson, M. A., Dubyak, G. R. & Pearlman, E. Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 $\beta$  secretion in response to ATP. *Nat Commun* **7**, 10555, doi:10.1038/ncomms10555 (2016).
- 368 Seiffert, K., Ding, W., Wagner, J. A. & Granstein, R. D. ATP $\gamma$ S 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).
- 369 Matute, C. *et al.* P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* **27**, 9525-9533, doi:10.1523/jneurosci.0579-07.2007 (2007).
- 370 Burnstock, G. & Knight, G. E. The potential of P2X7 receptors as a therapeutic target, including inflammation and tumour progression. *Purinergic Signal* **14**, 1-18, doi:10.1007/s11302-017-9593-0 (2018).
- 371 Takeda, A. *et al.* Crucial role of P2X(7) receptor for effector T cell activation in experimental autoimmune uveitis. *Jpn J Ophthalmol* **62**, 398-406 (2018).
- 372 Abbracchio, M. P. *et al.* International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* **58**, 281-341, doi:10.1124/pr.58.3.3 (2006).
- 373 von Kugelgen, I. & Hoffmann, K. Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology* **104**, 50-61, doi:10.1016/j.neuropharm.2015.10.030 (2016).
- 374 Holmfeldt, P. *et al.* Functional screen identifies regulators of murine hematopoietic stem cell repopulation. *J Exp Med* **213**, 433-449, doi:10.1084/jem.20150806 (2016).
- 375 Burnstock, G. Blood cells: an historical account of the roles of purinergic signalling. *Purinergic Signal* **11**, 411-434, doi:10.1007/s11302-015-9462-7 (2015).
- 376 Elliott, M. R. *et al.* Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* **461**, 282-286 (2009).
- 377 Qin, C. *et al.* Critical Role of P2Y(12) Receptor in Regulation of Th17 Differentiation and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Pathogenesis. *J Immunol* **199**, 72-81, doi:10.4049/jimmunol.1601549 (2017).
- 378 Woods, L. T. *et al.* P2Y(2) R deletion ameliorates sialadenitis in IL-14 $\alpha$ -transgenic mice. *Oral Dis* **24**, 761-771, doi:10.1111/odi.12823 (2018).
- 379 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 (2004).
- 380 Shirai, R., Hirano, F., Ohkura, N., Ikeda, K. & Inoue, S. Up-regulation of the expression of leucine-rich  $\alpha$ 2-glycoprotein in hepatocytes by the mediators of acute-phase response. *Biochem Biophys Res Commun* **382**, 776-779 (2009).
- 381 Druhan, L. J. *et al.* Leucine Rich alpha-2 Glycoprotein: A Novel Neutrophil Granule Protein and Modulator of Myelopoiesis. *PLoS One* **12**, e0170261, doi:10.1371/journal.pone.0170261 (2017).
- 382 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).

- 383 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).
- 384 Dickinson, B. C. & Chang, C. J. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat Chem Biol* **7**, 504-511, doi:10.1038/nchembio.607 (2011).
- 385 Morgan, P. E., Sturgess, A. D. & Davies, M. J. Evidence for chronically elevated serum protein oxidation in systemic lupus erythematosus patients. *Free Radic Res* **43**, 117-127, doi:10.1080/10715760802623896 (2009).
- 386 Wang, Z. *et al.* The role of mitochondria-derived reactive oxygen species in hyperthermia-induced platelet apoptosis. *PLoS One* **8**, e75044, doi:10.1371/journal.pone.0075044 (2013).
- 387 Chouchani, E. T. *et al.* Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* **515**, 431-435, doi:10.1038/nature13909 (2014).
- 388 Wiegman, C. H. *et al.* Oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction drives inflammation and airway smooth muscle remodeling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* **136**, 769-780, doi:10.1016/j.jaci.2015.01.046 (2015).
- 389 Angelova, P. R. & Abramov, A. Y. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS Lett* **592**, 692-702, doi:10.1002/1873-3468.12964 (2018).
- 390 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).
- 391 Zhi, L., Ustyugova, I. V., Chen, X., Zhang, Q. & Wu, M. X. Enhanced Th17 differentiation and aggravated arthritis in IEX-1-deficient mice by mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling. *J Immunol* **189**, 1639-1647, doi:10.4049/jimmunol.1200528 (2012).
- 392 Chen, J., Stimpson, S. E., Fernandez-Bueno, G. A. & Mathews, C. E. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Type 1 Diabetes. *Antioxid Redox Signal* **29**, 1361-1372, doi:10.1089/ars.2017.7346 (2018).
- 393 Bell, C. *et al.* Quantitative proteomics reveals the induction of mitophagy in tumor necrosis factor-alpha-activated (TNFalpha) macrophages. *Mol Cell Proteomics* **12**, 2394-2407, doi:10.1074/mcp.M112.025775 (2013).
- 394 Dabhi, V. M. & Lindahl, K. F. Short peptides sensitize target cells to CTL specific for the MHC class Ib molecule, H2-M3. *Eur J Immunol* **28**, 3773-3782, doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199811)28:11<3773::AID-IMMU3773>3.0.CO;2-B (1998).
- 395 Qi, L., Rojas, J. M. & Ostrand-Rosenberg, S. Tumor cells present MHC class II-restricted nuclear and mitochondrial antigens and are the predominant antigen presenting cells in vivo. *J Immunol* **165**, 5451-5461, doi:10.4049/jimmunol.165.10.5451 (2000).
- 396 Dieudé, M. *et al.* Cardiolipin binds to CD1d and stimulates CD1d-restricted gamma delta T cells in the normal murine repertoire. *J Immunol* **186**, 4771-4781, doi:10.4049/jimmunol.1000921 (2011).

- 397 Singh, R. R., Yang, J. Q., Kim, P. J. & Halder, R. C. Germline deletion of  $\beta 2$  microglobulin or CD1d reduces anti-phospholipid antibody, but increases autoantibodies against non-phospholipid antigens in the NZB/W F1 model of lupus. *Arthritis Res Ther* **15**, R47, doi:10.1186/ar4206 (2013).
- 398 Walker, J. G., Doniach, D., Roitt, I. M. & Sherlock, S. Serological Tests in Diagnosis of Primary Biliary Cirrhosis. *Lancet* **1**, 827-831, doi:10.1016/s0140-6736(65)91372-3 (1965).
- 399 Berg, P. A. & Klein, R. Mitochondrial antigens and autoantibodies: from anti-M1 to anti-M9. *Klin Wochenschr* **64**, 897-909, doi:10.1007/BF01728613 (1986).
- 400 Tomizawa, M. *et al.* Anti-mitochondrial M2 antibody-positive autoimmune hepatitis. *Exp Ther Med* **10**, 1419-1422, doi:10.3892/etm.2015.2694 (2015).
- 401 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. *J Clin Invest* **108**, 223-232, doi:10.1172/JCI10716 (2001).
- 402 Bowlus, C. L. & Gershwin, M. E. The diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Autoimmun Rev* **13**, 441-444, doi:10.1016/j.autrev.2014.01.041 (2014).
- 403 Klein, R. & Berg, P. A. Anti-M4 antibodies in primary biliary cirrhosis react with sulphite oxidase, an enzyme of the mitochondrial inter-membrane space. *Clin Exp Immunol* **84**, 445-448 (1991).
- 404 Berg, P. A., Wiedmann, K. H., Sayers, T., Klöppel, G. & Lindner, H. Serological classification of chronic cholestatic liver disease by the use of two different types of antimitochondrial antibodies. *Lancet* **2**, 1329-1332 (1980).
- 405 Bunn, C. C. & McMorrow, M. Anti-M4 antibodies measured by a sulphite oxidase ELISA in patients with both anti-centromere and anti-M2 antibodies. *Clin Exp Immunol* **102**, 131-136 (1995).
- 406 Berg, P. A. & Klein, R. Mitochondrial antigen/antibody systems in primary biliary cirrhosis: revisited. *Liver* **15**, 281-292, doi:10.1111/j.1600-0676.1995.tb00687.x (1995).
- 407 Weber, P., Brenner, J. & Stechemesser, E. Characterization and clinical relevance of a new complement-fixing antibody--anti-M8--in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **6**, 553-559 (1986).
- 408 Bialynicki-Birula, R. The 100th anniversary of Wassermann-Neisser-Bruck reaction. *Clin Dermatol* **26**, 79-88, doi:10.1016/j.clindermatol.2007.09.020 (2008).
- 409 Rauch, J., Tannenbaum, H., Stollar, B. D. & Schwartz, R. S. Monoclonal anti-cardiolipin antibodies bind to DNA. *Eur J Immunol* **14**, 529-534, doi:10.1002/eji.1830140609 (1984).
- 410 Aringer, M. *et al.* European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol* **78**, 1151-1159 (2019).
- 411 Miyakis, S. *et al.* International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* **4**, 295-306, doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x (2006).
- 412 Vreede, A. P., Bockenstedt, P. L. & Knight, J. S. Antiphospholipid syndrome: an update for clinicians and scientists. *Curr Opin Rheumatol* **29**, 458-466, doi:10.1097/BOR.0000000000000410 (2017).

- 413 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. *Clin Exp Immunol* **31**, 357-366 (1978).
- 414 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. *Clin Exp Immunol* **112**, 144-151, doi:10.1046/j.1365-2249.1998.00562.x (1998).
- 415 Desamparados, O.-M., Sanchez-Ramón, S., Rodriguez-Mahou, M., Alvarez, S. & Fernández-Cruz, E. Isolated type 5 antimitochondrial autoantibodies are associated with a history of thrombocytopenia and fetal loss. *Fertil Steril* **87**, 917-976 (2007).
- 416 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. *Clin Exp Immunol* **58**, 283-292 (1984).
- 417 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. *Clin Exp Immunol* **128**, 83-87 (2002).
- 418 Otto, A. *et al.* Anti-mitochondrial antibodies in patients with dilated cardiomyopathy (anti-M7) are directed against flavoenzymes with covalently bound FAD. *Clin Exp Immunol* **111**, 541-547, doi:10.1046/j.1365-2249.1998.00531.x (1998).
- 419 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. *Clin Exp Immunol* **115**, 404-408, doi:10.1046/j.1365-2249.1999.00832.x (1999).
- 420 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. *Clin Exp Immunol* **37**, 68-75 (1979).
- 421 Homberg, J. C. *et al.* A new antimitochondria antibody (anti-M6) in iproniazid-induced hepatitis. *Clin Exp Immunol* **47**, 93-102 (1982).
- 422 Dieudé, M. *et al.* Association of autoantibodies to heat-shock protein 60 with arterial vascular events in patients with antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum* **63**, 2416-2424, doi:10.1002/art.30411 (2011).
- 423 Dieudé, M. *et al.* Autoantibodies to heat shock protein 60 promote thrombus formation in a murine model of arterial thrombosis. *J Thromb Haemost* **7**, 710-719, doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03305.x (2009).
- 424 Kidd, B. A. *et al.* Epitope spreading to citrullinated antigens in mouse models of autoimmune arthritis and demyelination. *Arthritis Res Ther* **10**, R119, doi:10.1186/ar2523 (2008).
- 425 Talwar, G. P. & Raghupathy, R. Anti-fertility vaccines. *Vaccine* **7**, 97-101, doi:10.1016/0264-410x(89)90043-1 (1989).
- 426 Uibo, R. *et al.* Autoantibodies to cytochrome P450 enzymes P450scc, P450c17, and P450c21 in autoimmune polyglandular disease types I and II and in isolated Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* **78**, 323-328, doi:10.1210/jcem.78.2.8106620 (1994).
- 427 Cihakova, D. *et al.* Novel AIRE mutations and P450 cytochrome autoantibodies in Central and Eastern European patients with APECED. *Hum Mutat* **18**, 225-232, doi:10.1002/humu.1178 (2001).

- 428 Griffin, D. O., Holodick, N. E. & Rothstein, T. L. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup> CD70. *J Exp Med* **208**, 67-80, doi:10.1084/jem.20101499 (2011).
- 429 Rodriguez-Zhurbenko, N., Quach, T. D., Hopkins, T. J., Rothstein, T. L. & Hernandez, A. M. Human B-1 Cells and B-1 Cell Antibodies Change With Advancing Age. *Front Immunol* **10**, 483, doi:10.3389/fimmu.2019.00483 (2019).
- 430 Descatoire, M., Weill, J. C., Reynaud, C. A. & Weller, S. A human equivalent of mouse B-1 cells? *J Exp Med* **208**, 2563-2564, doi:10.1084/jem.20112232 (2011).
- 431 Perez-Andres, M. *et al.* The nature of circulating CD27<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> B cells. *J Exp Med* **208**, 2565-2566, doi:10.1084/jem.20112203 (2011).
- 432 Reynaud, C. A. & Weill, J. C. Gene profiling of CD11b<sup>+</sup> and CD11b<sup>-</sup> B1 cell subsets reveals potential cell sorting artifacts. *J Exp Med* **209**, 433-434, doi:10.1084/jem.20120402 (2012).
- 433 Holodick, N. E., Rodriguez-Zhurbenko, N. & Hernandez, A. M. Defining Natural Antibodies. *Front Immunol* **8**, 872, doi:10.3389/fimmu.2017.00872 (2017).
- 434 Baumgarth, N., Waffarn, E. E. & Nguyen, T. T. Natural and induced B-1 cell immunity to infections raises questions of nature versus nurture. *Ann N Y Acad Sci* **1362**, 188-199, doi:10.1111/nyas.12804 (2015).
- 435 Weismann, D. & Binder, C. J. The innate immune response to products of phospholipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* **1818**, 2465-2475, doi:10.1016/j.bbamem.2012.01.018 (2012).
- 436 Kantor, A. B., Merrill, C. E., Herzenberg, L. A. & Hillson, J. L. An unbiased analysis of V(H)-D-J(H) sequences from B-1a, B-1b, and conventional B cells. *J Immunol* **158**, 1175-1186 (1997).
- 437 Shaw, P. X. *et al.* Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. *J Clin Invest* **105**, 1731-1740 (2000).
- 438 Gunti, S. & Notkins, A. L. Polyreactive Antibodies: Function and Quantification. *J Infect Dis* **212 Suppl 1**, S42-S46, doi:10.1093/infdis/jiu512 (2015).
- 439 Rothstein, T. L., Griffin, D. O., Holodick, N. E., Quach, T. D. & Kaku, H. Human B-1 cells take the stage. *Ann N Y Acad Sci* **1285**, 97-114, doi:10.1111/nyas.12137 (2013).
- 440 Ehrenstein, M. R. & Notley, C. A. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat Rev Immunol* **10**, 778-786, doi:10.1038/nri2849 (2010).
- 441 Frostegård, A. G. *et al.* Immunoglobulin (Ig)M antibodies against oxidized cardiolipin but not native cardiolipin are novel biomarkers in haemodialysis patients, associated negatively with mortality. *Clin Exp Immunol* **174**, 441-448 (2013).
- 442 Berg, P. A. & Klein, R. Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis and other disorders: definition and clinical relevance. *Dig Dis* **10**, 85-101, doi:10.1159/000171347 (1992).
- 443 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).
- 444 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).

- 445 Selmi, C. & Gershwin, M. E. Bacteria and human autoimmunity: the case of primary biliary cirrhosis. *Curr Opin Rheumatol* **16**, 406-410, doi:10.1097/01.bor.0000130538.76808.c2 (2004).
- 446 Graham, J. M. Isolation of Mitochondria from Tissues and Cells by Differential Centrifugation. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 3**, Unit 3.3.-Unit 3.3. (1999).
- 447 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).
- 448 Wettmarshausen, J. & Perocchi, F. in *Methods Mol Biol* Vol. 1567 15-32 (2017).
- 449 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).
- 450 Hornig-Do, H. T. *et al.* Isolation of functional pure mitochondria by superparamagnetic microbeads. *Anal Biochem* **389**, 1-5, doi:10.1016/j.ab.2009.02.040 (2009).
- 451 Franko, A. *et al.* Efficient isolation of pure and functional mitochondria from mouse tissues using automated tissue disruption and enrichment with anti-TOM22 magnetic beads. *PLoS One* **8**, e82392, doi:10.1371/journal.pone.0082392 (2013).
- 452 Léger, J. L., Jogleux, J. L., Savadogo, F., Pichaud, N. & Boudreau, L. H. Rapid isolation and purification of functional platelet mitochondria using a discontinuous Percoll gradient. *Platelets* **31**, 258-264, doi:10.1080/09537104.2019.1609666 (2020).
- 453 Rybka, V. *et al.* Transmission Electron Microscopy Study of Mitochondria in Aging Brain Synapses. *Antioxidants (Basel)* **8**, 171-171, doi:10.3390/antiox8060171 (2019).
- 454 Tobias, I. C., Khazaei, R. & Betts, D. H. Analysis of Mitochondrial Dimensions and Cristae Structure in Pluripotent Stem Cells Using Transmission Electron Microscopy. *Curr Protoc Stem Cell Biol* **47**, e67, doi:10.1002/cpsc.67 (2018).
- 455 Picard, M., White, K. & Turnbull, D. M. Mitochondrial morphology, topology, and membrane interactions in skeletal muscle: a quantitative three-dimensional electron microscopy study. *J Appl Physiol (1985)* **114**, 161-171, doi:10.1152/japphysiol.01096.2012 (2013).
- 456 MacDonald, J. A., Fowle, W. H., Shin, E. & Woods, D. C. A method for freeze-fracture and scanning electron microscopy of isolated mitochondria. *MethodsX* **5**, 593-598, doi:10.1016/j.mex.2018.05.006 (2018).
- 457 Millar, D., Murphy, L., Labrie, A. & Maurer-Spurej, E. Routine Screening Method for Microparticles in Platelet Transfusions. *J Vis Exp*, doi:10.3791/56893 (2018).
- 458 Malik, A. N., Shahni, R., Rodriguez-de-Ledesma, A., Laftah, A. & Cunningham, P. Mitochondrial DNA as a non-invasive biomarker: accurate quantification using real time quantitative PCR without co-amplification of pseudogenes and dilution bias. *Biochem Biophys Res Commun* **412**, 1-7, doi:10.1016/j.bbrc.2011.06.067 (2011).
- 459 Hunter, S. E., Jung, D., Di Giulio, R. T. & Meyer, J. N. The QPCR assay for analysis of mitochondrial DNA damage, repair, and relative copy number. *Methods* **51**, 444-451, doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.033 (2010).
- 460 Shimada, K. *et al.* Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* **36**, 401-414, doi:10.1016/j.immuni.2012.01.009 (2012).
- 461 Shang, J., Yang, Y., Wu, L., Zou, M. & Huang, Y. The *S. pombe* mitochondrial transcriptome. *RNA* **24**, 1241-1254, doi:10.1261/rna.064477.117 (2018).

- 462 Han, C. B. *et al.* Quantitative analysis of tumor mitochondrial RNA using microarray. *World J Gastroenterol* **11**, 36-40 (2005).
- 463 Hayashi, T. *et al.* Role of mitochondria in the maintenance of platelet function during in vitro storage. *Transfus Med* **21**, 166-174, doi:10.1111/j.1365-3148.2010.01065.x (2011).
- 464 Chazotte, B. Labeling mitochondria with MitoTracker dyes. *Cold Spring Harb Protoc* **2011**, 990-992, doi:10.1101/pdb.prot5648 (2011).
- 465 Smale, S. T. Luciferase assay. *Cold Spring Harb Protoc* **2010**, pdb prot5421, doi:10.1101/pdb.prot5421 (2010).
- 466 Patergnani, S. *et al.* in *Methods in Enzymology* Vol. 542 Ch. 16, 313-332 (2014).
- 467 Martinez-Pastor, F. *et al.* Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. *Anim Reprod Sci* **84**, 121-133 (2004).
- 468 Chazotte, B. Labeling mitochondria with JC-1. *Cold Spring Harb Protoc* **2011**, doi:10.1101/pdb.prot065490 (2011).
- 469 Silva, A. M. & Oliveira, P. J. in *Methods Mol Biol* Vol. 810 7-24 (2012).
- 470 Smolina, N., Bruton, J., Kostareva, A. & Sejersen, T. in *Methods Mol Biol* Vol. 1601 79-87 (2017).
- 471 Zhang, J. & Zhang, Q. in *Methods Mol Biol* Vol. 1928 353-363 (2019).
- 472 Zhang, J. *et al.* Measuring energy metabolism in cultured cells, including human pluripotent stem cells and differentiated cells. *Nat Protoc* **7**, 1068-1085, doi:10.1038/nprot.2012.048 (2012).
- 473 Wisniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N. & Mann, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* **6**, 359-362, doi:10.1038/nmeth.1322 (2009).
- 474 Mishkovsky, M., Comment, A. & Gruetter, R. In vivo detection of brain Krebs cycle intermediate by hyperpolarized magnetic resonance. *J Cereb Blood Flow Metab* **32**, 2108-2113, doi:10.1038/jcbfm.2012.136 (2012).
- 475 Kauffman, M. E. *et al.* MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS. *React Oxyg Species (Apex)* **2**, 361-370, doi:10.20455/ros.2016.865 (2016).
- 476 Puleston, D. Detection of Mitochondrial Mass, Damage, and Reactive Oxygen Species by Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc* **2015**, pdb prot086298, doi:10.1101/pdb.prot086298 (2015).
- 477 Roelofs, B. A., Ge, S. X., Studlack, P. E. & Polster, B. M. Low micromolar concentrations of the superoxide probe MitoSOX uncouple neural mitochondria and inhibit complex IV. *Free Radic Biol Med* **86**, 250-258, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.032 (2015).
- 478 Kumar, A. *et al.* Oxidative stress mediates ethanol-induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction and dysregulated protein synthesis and autophagy. *Free Radic Biol Med* **145**, 284-299, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.09.031 (2019).
- 479 Dikalov, S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med* **51**, 1289-1301, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.033 (2011).
- 480 Bernas, T. & Dobrucki, J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry* **47**, 236-242, doi:10.1002/cyto.10080 (2002).

- 481 Berridge, M. V., Herst, P. M. & Tan, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* **11**, 127-152, doi:10.1016/s1387-2656(05)11004-7 (2005).
- 482 Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P. & Waterhouse, N. J. Analysis of Cytochrome c Release by Immunocytochemistry. *Cold Spring Harb Protoc* **2016**, doi:10.1101/pdb.prot087338 (2016).
- 483 Galluzzi, L. *et al.* Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis. *Apoptosis* **12**, 803-813, doi:10.1007/s10495-007-0720-1 (2007).
- 484 Davis, C. H. *et al.* Transcellular degradation of axonal mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 9633-9638, doi:10.1073/pnas.1404651111 (2014).
- 485 Chao, S. *et al.* Endocytosis-mediated mitochondrial transplantation: Transferring normal human astrocytic mitochondria into glioma cells rescues aerobic respiration and enhances radiosensitivity. *Theranostics* **9**, 3595-3607 (2019).
- 486 Sinha, P., Islam, M. N., Bhattacharya, S. & Bhattacharya, J. Intercellular mitochondrial transfer: Bioenergetic crosstalk between cells. *Current Opinion in Genetics and Development* **38**, 97-101 (2016).
- 487 Wu, T. H. *et al.* Mitochondrial Transfer by Photothermal Nanoblade Restores Metabolite Profile in Mammalian Cells. *Cell Metab* **23**, 921-929, doi:10.1016/j.cmet.2016.04.007 (2016).
- 488 Lu, M. *et al.* Factors Associated With Prevalence and Treatment of Primary Biliary Cholangitis in United States Health Systems. *Clin Gastroenterol Hepatol* **16**, 1333-1341 e1336, doi:10.1016/j.cgh.2017.10.018 (2018).
- 489 Yoshida, E. M. *et al.* Epidemiology and liver transplantation burden of primary biliary cholangitis: a retrospective cohort study. *CMAJ Open* **6**, E664-E670, doi:10.9778/cmajo.20180029 (2018).
- 490 Jepsen, P., Gronbaek, L. & Vilstrup, H. Worldwide Incidence of Autoimmune Liver Disease. *Dig Dis* **33 Suppl 2**, 2-12, doi:10.1159/000440705 (2015).
- 491 Boonstra, K., Beuers, U. & Ponsioen, C. Y. Epidemiology of primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis: a systematic review. *J Hepatol* **56**, 1181-1188, doi:10.1016/j.jhep.2011.10.025 (2012).
- 492 Sun, Y. *et al.* Women and primary biliary cirrhosis. *Clin Rev Allergy Immunol* **48**, 285-300, doi:10.1007/s12016-014-8449-4 (2015).
- 493 Galoosian, A., Hanlon, C., Tana, M., Cheung, R. & Wong, R. J. Race/Ethnicity and Insurance-Specific Disparities in In-Hospital Mortality Among Adults with Primary Biliary Cholangitis: Analysis of 2007-2014 National Inpatient Sample. *Dig Dis Sci* **65**, 406-415, doi:10.1007/s10620-019-05809-x (2020).
- 494 Gershwin, M. E. *et al.* Risk factors and comorbidities in primary biliary cirrhosis: a controlled interview-based study of 1032 patients. *Hepatology* **42**, 1194-1202, doi:10.1002/hep.20907 (2005).
- 495 Selmi, C. *et al.* Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: genetics, epigenetics, and environment. *Gastroenterology* **127**, 485-492, doi:10.1053/j.gastro.2004.05.005 (2004).
- 496 Li, Y., Tang, R. & Ma, X. *Epigenetics of Primary Biliary Cholangitis*. (2020).
- 497 Carter, E. E., Barr, S. G. & Clarke, A. E. The global burden of SLE: prevalence, health disparities and socioeconomic impact. *Nat Rev Rheumatol* **12**, 605-620, doi:10.1038/nrrheum.2016.137 (2016).



- 498 Danchenko, N., Satia, J. A. & Anthony, M. S. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus* **15**, 308-318, doi:10.1191/0961203306lu2305xx (2006).
- 499 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).
- 500 Lockshin, M. D. Sex differences in autoimmune disease. *Lupus* **15**, 753-756, doi:10.1177/0961203306069353 (2006).
- 501 Rees, F., Doherty, M., Grainge, M. J., Lanyon, P. & Zhang, W. The worldwide incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: a systematic review of epidemiological studies. *Rheumatology (Oxford)* **56**, 1945-1961, doi:10.1093/rheumatology/kex260 (2017).
- 502 Gergianaki, I. *et al.* Epidemiology and burden of systemic lupus erythematosus in a Southern European population: data from the community-based lupus registry of Crete, Greece. *Ann Rheum Dis* **76**, 1992-2000, doi:10.1136/annrheumdis-2017-211206 (2017).
- 503 Lewis, M. J. & Jawad, A. S. The effect of ethnicity and genetic ancestry on the epidemiology, clinical features and outcome of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* **56**, i67-i77, doi:10.1093/rheumatology/kew399 (2017).
- 504 Barber, M. R. W. & Clarke, A. E. Socioeconomic consequences of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* **29**, 480-485, doi:10.1097/BOR.0000000000000416 (2017).
- 505 Kuo, C. F. *et al.* Familial Aggregation of Systemic Lupus Erythematosus and Coaggregation of Autoimmune Diseases in Affected Families. *JAMA Intern Med* **175**, 1518-1526, doi:10.1001/jamainternmed.2015.3528 (2015).
- 506 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).
- 507 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).
- 508 Kyogoku, C. *et al.* Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *Am J Hum Genet* **75**, 504-507, doi:10.1086/423790 (2004).
- 509 Leffler, J., Bengtsson, A. A. & Blom, A. M. The complement system in systemic lupus erythematosus: an update. *Ann Rheum Dis* **73**, 1601-1606, doi:10.1136/annrheumdis-2014-205287 (2014).
- 510 Tedeschi, S. K. *et al.* Obesity and the risk of systemic lupus erythematosus among women in the Nurses' Health Studies. *Semin Arthritis Rheum* **47**, 376-383, doi:10.1016/j.semarthrit.2017.05.011 (2017).
- 511 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).
- 512 Takvorian, S. U., Merola, J. F. & Costenbader, K. H. Cigarette smoking, alcohol consumption and risk of systemic lupus erythematosus. *Lupus* **23**, 537-544, doi:10.1177/0961203313501400 (2014).

- 513 Barbhैया, M. *et al.* Influence of Alcohol Consumption on the Risk of Systemic Lupus Erythematosus Among Women in the Nurses' Health Study Cohorts. *Arthritis Care Res (Hoboken)* **69**, 384-392, doi:10.1002/acr.22945 (2017).
- 514 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).
- 515 Harris, H. R. *et al.* Endometriosis and the risks of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in the Nurses' Health Study II. *Ann Rheum Dis* **75**, 1279-1284, doi:10.1136/annrheumdis-2015-207704 (2016).
- 516 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).
- 517 Parks, C. G. & De Roos, A. J. Pesticides, chemical and industrial exposures in relation to systemic lupus erythematosus. *Lupus* **23**, 527-536, doi:10.1177/0961203313511680 (2014).
- 518 Bernatsky, S. *et al.* Fine particulate air pollution and systemic autoimmune rheumatic disease in two Canadian provinces. *Environ Res* **146**, 85-91, doi:10.1016/j.envres.2015.12.021 (2016).
- 519 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).
- 520 Duarte-Garcia, A. *et al.* Epidemiology of Antiphospholipid Syndrome: A Population-Based Study - Meeting Abstracts. *Arthritis Rheumatol* **69** (2017).
- 521 Jara, L. J., Medina, G., Vera-Lastra, O. & Barile, L. The impact of gender on clinical manifestations of primary antiphospholipid syndrome. *Lupus* **14**, 607-612, doi:10.1191/0961203305lu2176oa (2005).
- 522 de Amorim, L. C., Maia, F. M. & Rodrigues, C. E. Stroke in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome: risk factors, clinical manifestations, neuroimaging, and treatment. *Lupus* **26**, 529-536, doi:10.1177/0961203316688784 (2017).
- 523 De Carolis, S. *et al.* Antiphospholipid syndrome: An update on risk factors for pregnancy outcome. *Autoimmun Rev* **17**, 956-966, doi:10.1016/j.autrev.2018.03.018 (2018).
- 524 Ortiz-Fernandez, L. & Sawalha, A. H. Genetics of Antiphospholipid Syndrome. *Curr Rheumatol Rep* **21**, 65, doi:10.1007/s11926-019-0869-y (2019).
- 525 Fredi, M. *et al.* IRF5 is associated with primary antiphospholipid syndrome, but is not a major risk factor. *Arthritis Rheum* **62**, 1201-1202, doi:10.1002/art.27345 (2010).
- 526 Santiago, M. *et al.* Anti-beta2 glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in leptospirosis, syphilis and Kala-azar. *Clin Exp Rheumatol* **19**, 425-430 (2001).
- 527 Fiallo, P., Travaglino, C., Nunzi, E. & Cardo, P. P. beta 2-Glycoprotein I-dependence of anticardiolipin antibodies in multibacillary leprosy patients. *Lepr Rev* **69**, 376-381, doi:10.5935/0305-7518.19980038 (1998).
- 528 Shen, C. Y. *et al.* Autoantibody prevalence in active tuberculosis: reactive or pathognomonic? *BMJ Open* **3**, doi:10.1136/bmjopen-2013-002665 (2013).
- 529 Cicconi, V. *et al.* Disappearance of antiphospholipid antibodies syndrome after *Helicobacter pylori* eradication. *Am J Med* **111**, 163-164, doi:10.1016/s0002-9343(01)00738-0 (2001).

- 530 Labarca, J. A. *et al.* Antiphospholipid syndrome associated with cytomegalovirus infection: case report and review. *Clin Infect Dis* **24**, 197-200, doi:10.1093/clinids/24.2.197 (1997).
- 531 Yuste, J. R. & Prieto, J. Anticardiolipin antibodies in chronic viral hepatitis. Do they have clinical consequences? *Eur J Gastroenterol Hepatol* **15**, 717-719, doi:10.1097/01.meg.0000059144.68845.61 (2003).
- 532 van Hal, S., Senanayake, S. & Hardiman, R. Splenic infarction due to transient antiphospholipid antibodies induced by acute Epstein-Barr virus infection. *J Clin Virol* **32**, 245-247, doi:10.1016/j.jcv.2004.07.013 (2005).
- 533 Cervera, R. & Asherson, R. A. Clinical and epidemiological aspects in the antiphospholipid syndrome. *Immunobiology* **207**, 5-11, doi:10.1078/0171-2985-00213 (2003).
- 534 Merrill, J. T., Shen, C., Gugnani, M., Lahita, R. G. & Mongey, A. B. High prevalence of antiphospholipid antibodies in patients taking procainamide. *J Rheumatol* **24**, 1083-1088 (1997).
- 535 Todorova, M., Kamenov, Z., Baleva, M., Christov, V. & Nicolov, K. Anticardiolipin antibodies during hormone replacement therapy in healthy postmenopausal women. *Maturitas* **48**, 393-397, doi:10.1016/j.maturitas.2003.10.009 (2004).
- 536 Kamradt, T. & Mitchison, N. A. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* **344**, 655-664, doi:10.1056/nejm200103013440907 (2001).
- 537 Cashman, K. S. *et al.* Understanding and measuring human B-cell tolerance and its breakdown in autoimmune disease. *Immunol Rev* **292**, 76-89, doi:10.1111/imr.12820 (2019).
- 538 Martin, D. A. & Elkon, K. B. Autoantibodies make a U-turn: the toll hypothesis for autoantibody specificity. *J Exp Med* **202**, 1465-1469, doi:10.1084/jem.20052228 (2005).
- 539 Eggleton, P., Haigh, R. & Winyard, P. G. Consequence of neo-antigenicity of the "altered self.". *Rheumatology* **47**, 567-571 (2008).
- 540 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 (2013).
- 541 Holdsworth, S. R. & Gan, P. Y. Cytokines: Names and Numbers You Should Care About. *Clin J Am Soc Nephrol* **10**, 2243-2254, doi:10.2215/CJN.07590714 (2015).
- 542 Coffman, R. L. Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. *Nat Immunol* **7**, 539-541, doi:10.1038/ni0606-539 (2006).
- 543 Horak, I., Lohler, J., Ma, A. & Smith, K. A. Interleukin-2 deficient mice: a new model to study autoimmunity and self-tolerance. *Immunol Rev* **148**, 35-44, doi:10.1111/j.1600-065x.1995.tb00092.x (1995).
- 544 Refaeli, Y., Van Parijs, L., London, C. A., Tschopp, J. & Abbas, A. K. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity* **8**, 615-623, doi:10.1016/s1074-7613(00)80566-x (1998).
- 545 Wolf, M., Schimpl, A. & Hunig, T. Control of T cell hyperactivation in IL-2-deficient mice by CD4(+)CD25(-) and CD4(+)CD25(+) T cells: evidence for two distinct regulatory mechanisms. *Eur J Immunol* **31**, 1637-1645, doi:10.1002/1521-4141(200106)31:6<1637::aid-immu1637>3.0.co;2-t (2001).
- 546 Skapenko, A., Lipsky, P. E., Kraetsch, H. G., Kalden, J. R. & Schulze-Koops, H. Antigen-independent Th2 cell differentiation by stimulation of CD28: regulation via

- IL-4 gene expression and mitogen-activated protein kinase activation. *J Immunol* **166**, 4283-4292, doi:10.4049/jimmunol.166.7.4283 (2001).
- 547 Suzuki, H., Zhou, Y. W., Kato, M., Mak, T. W. & Nakashima, I. Normal regulatory alpha/beta T cells effectively eliminate abnormally activated T cells lacking the interleukin 2 receptor beta in vivo. *J Exp Med* **190**, 1561-1572, doi:10.1084/jem.190.11.1561 (1999).
- 548 Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* **10**, 45-65, doi:10.1038/sj.cdd.4401189 (2003).
- 549 Kollias, G., Douni, E., Kassiotis, G. & Kontoyiannis, D. The function of tumour necrosis factor and receptors in models of multi-organ inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Ann Rheum Dis* **58 Suppl 1**, I32-39, doi:10.1136/ard.58.2008.i32 (1999).
- 550 Cope, A. P. Regulation of autoimmunity by proinflammatory cytokines. *Curr Opin Immunol* **10**, 669-676, doi:10.1016/s0952-7915(98)80087-3 (1998).
- 551 Campbell, I. L., Oxbrow, L., Koulmanda, M. & Harrison, L. C. IFN-gamma induces islet cell MHC antigens and enhances autoimmune, streptozotocin-induced diabetes in the mouse. *J Immunol* **140**, 1111-1116 (1988).
- 552 Vallin, H., Blomberg, S., Alm, G. V., Cederblad, B. & Rönnblom, L. Patients with systemic lupus erythematosus (SLE) have a circulating inducer of interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) production acting on leucocytes resembling immature dendritic cells. *Clin Exp Immunol* **115**, 196-202 (1999).
- 553 Rönnblom, L. The type I interferon system in the etiopathogenesis of autoimmune diseases. *Ups J Med Sci* **116**, 227-237, doi:10.3109/03009734.2011.624649 (2011).
- 554 Deng, Y. & Tsao, B. P. Advances in lupus genetics and epigenetics. *Curr Opin Rheumatol* **26**, 482-492, doi:10.1097/BOR.0000000000000086 (2014).
- 555 Vidovic, M., Sparacio, S. M., Elovitz, M. & Benveniste, E. N. Induction and regulation of class II major histocompatibility complex mRNA expression in astrocytes by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Neuroimmunol* **30**, 189-200, doi:10.1016/0165-5728(90)90103-t (1990).
- 556 Pujol-Borrell, R. *et al.* HLA class II induction in human islet cells by interferon-gamma plus tumour necrosis factor or lymphotoxin. *Nature* **326**, 304-306, doi:10.1038/326304a0 (1987).
- 557 Bottazzo, G. F., Pujol-Borrell, R., Hanafusa, T. & Feldmann, M. Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet* **2**, 1115-1119, doi:10.1016/s0140-6736(83)90629-3 (1983).
- 558 Sutton, C., Brereton, C., Keogh, B., Mills, K. H. G. & Lavelle, E. C. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* **203**, 1685-1691 (2006).
- 559 Zhou, L. *et al.* IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* **8**, 967-974 (2007).
- 560 Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**, 179-189, doi:10.1016/j.immuni.2006.01.001 (2006).
- 561 Ouyang, W., Kolls, J. K. & Zheng, Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* **28**, 454-467, doi:10.1016/j.immuni.2008.03.004 (2008).

- 562 Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K. & Iwakura, Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* **171**, 6173-6177, doi:10.4049/jimmunol.171.11.6173 (2003).
- 563 Komiyama, Y. *et al.* IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **177**, 566-573, doi:10.4049/jimmunol.177.1.566 (2006).
- 564 Schwartz, S., Beaulieu, J. F. & Ruemmele, F. M. Interleukin-17 is a potent immunomodulator and regulator of normal human intestinal epithelial cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* **18**, 505-509 (2005).
- 565 Rocamora-Reverte, L., Melzer, F. L., Wurzner, R. & Weinberger, B. The Complex Role of Regulatory T Cells in Immunity and Aging. *Front Immunol* **11**, 616949, doi:10.3389/fimmu.2020.616949 (2020).
- 566 Schuler, P. J. *et al.* Human CD4+CD39+ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73+ exosomes or CD73+ cells. *Clin Exp Immunol* **177**, 531-543 (2014).
- 567 Ohta, A. & Sitkovsky, M. Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells. *Front Immunol* **5**, 304, doi:10.3389/fimmu.2014.00304 (2014).
- 568 Fassbender, M. *et al.* Cyclic adenosine monophosphate and IL-10 coordinately contribute to nTreg cell-mediated suppression of dendritic cell activation. *Cell Immunol* **265**, 91-96, doi:10.1016/j.cellimm.2010.07.007 (2010).
- 569 Akkaya, B. *et al.* Regulatory T cells mediate specific suppression by depleting peptide-MHC class II from dendritic cells. *Nat Immunol* **20**, 218-231, doi:10.1038/s41590-018-0280-2 (2019).
- 570 Qureshi, O. S. *et al.* Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* **332**, 600-603, doi:10.1126/science.1202947 (2011).
- 571 Jansen, K. *et al.* Regulatory B cells, A to Z. *Allergy* **76**, 2699-2715 (2021).
- 572 Rosser, E. C. & Mauri, C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity* **42**, 607-612, doi:10.1016/j.immuni.2015.04.005 (2015).
- 573 Carter, N. A., Rosser, E. C. & Mauri, C. Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* **14**, R32, doi:10.1186/ar3736 (2012).
- 574 Ye, Z. *et al.* IL-10 has a distinct immunoregulatory effect on naive and active T cell subsets. *J Interf Cytokine Res* **27**, 1031-1038 (2007).
- 575 Schioppa, T. *et al.* B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF-alpha during squamous carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 10662-10667, doi:10.1073/pnas.1100994108 (2011).
- 576 Bosma, A., Abdel-Gadir, A., Isenberg, D. A., Jury, E. C. & Mauri, C. Lipid-antigen presentation by CD1d(+) B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells. *Immunity* **36**, 477-490, doi:10.1016/j.immuni.2012.02.008 (2012).
- 577 Boyer, J. L. Bile formation and secretion. *Compr Physiol* **3**, 1035-1078, doi:10.1002/cphy.c120027 (2013).
- 578 Harada, K., Isse, K., Sato, Y., Ozaki, S. & Nakanuma, Y. Endotoxin tolerance in human intrahepatic biliary epithelial cells is induced by upregulation of IRAK-M. *Liver Int* **26**, 935-942, doi:10.1111/j.1478-3231.2006.01325.x (2006).

- 579 Barbatis, C. *et al.* Immunohistochemical analysis of HLA (A, B, C) antigens in liver disease using a monoclonal antibody. *Gut* **22**, 985-991, doi:10.1136/gut.22.12.985 (1981).
- 580 Leon, M. P. *et al.* Immunogenicity of biliary epithelium: investigation of antigen presentation to CD4+ T cells. *Hepatology* **24**, 561-567, doi:10.1002/hep.510240317 (1996).
- 581 Barnes, B. H. *et al.* Cholangiocytes as immune modulators in rotavirus-induced murine biliary atresia. *Liver Int* **29**, 1253-1261, doi:10.1111/j.1478-3231.2008.01921.x (2009).
- 582 Vaerman, J. P. *et al.* Antibody against the human J chain inhibits polymeric Ig receptor-mediated biliary and epithelial transport of human polymeric IgA. *Eur J Immunol* **28**, 171-182, doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199801)28:01<171::AID-IMMU171>3.0.CO;2-# (1998).
- 583 Palmer, J. M. *et al.* Secretory autoantibodies in primary biliary cirrhosis (PBC). *Clin Exp Immunol* **122**, 423-428, doi:10.1046/j.1365-2249.2000.01403.x (2000).
- 584 Matsumura, S. *et al.* Caspase induction by IgA antimitochondrial antibody: IgA-mediated biliary injury in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **39**, 1415-1422, doi:10.1002/hep.20175 (2004).
- 585 Lan, R. Y. *et al.* Hepatic IL-17 responses in human and murine primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* **32**, 43-51, doi:10.1016/j.jaut.2008.11.001 (2009).
- 586 Kita, H. *et al.* Identification of HLA-A2-restricted CD8+ cytotoxic T cell responses in primary biliary cirrhosis: T cell activation is augmented by immune complexes cross-presented by dendritic cells. *J Exp Med* **195**, 113-123 (2002).
- 587 Invernizzi, P. Liver auto-immunology: the paradox of autoimmunity in a tolerogenic organ. *J Autoimmun* **46**, 1-6, doi:10.1016/j.jaut.2013.08.006 (2013).
- 588 Labonte, A. C. *et al.* Identification of alterations in macrophage activation associated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *PLoS One* **13**, e0208132, doi:10.1371/journal.pone.0208132 (2018).
- 589 Tas, S. W., Quartier, P., Botto, M. & Fossati-Jimack, L. Macrophages from patients with SLE and rheumatoid arthritis have defective adhesion in vitro, while only SLE macrophages have impaired uptake of apoptotic cells. *Ann Rheum Dis* **65**, 216-221 (2006).
- 590 Zhao, Y., Wei, W. & Liu, M. L. Extracellular vesicles and lupus nephritis - New insights into pathophysiology and clinical implications. *Journal of Autoimmunity* **115**, 102540-102540 (2020).
- 591 Griffiths, H. R. Is the generation of neo-antigenic determinants by free radicals central to the development of autoimmune rheumatoid disease? *Autoimmunity Reviews* **7**, 544-549 (2008).
- 592 Carroll, M. C. A protective role for innate immunity in systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Immunol* **4**, 825-831, doi:10.1038/nri1456 (2004).
- 593 Lourenço, E. V. & La Cava, A. Cytokines in systemic lupus erythematosus. *Curr Mol Med* **9**, 242-254, doi:10.2174/156652409787847263 (2009).
- 594 Palucka, A. K., Blanck, J. P., Bennett, L., Pascual, V. & Banchereau, J. Cross-regulation of TNF and IFN-alpha in autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3372-3377, doi:10.1073/pnas.0408506102 (2005).

- 595 Klarquist, J., Zhou, Z., Shen, N. & Janssen, E. M. Dendritic Cells in Systemic Lupus Erythematosus: From Pathogenic Players to Therapeutic Tools. *Mediators Inflamm* **2016**, 5045248, doi:10.1155/2016/5045248 (2016).
- 596 Kim, S. J. SLE-associated risk factors affect DC function. *Curr Rheumatol Rep* **21**, 4, doi:10.1007/s11926-019-0802-4 (2019).
- 597 Seitz, H. M. & Matsushima, G. K. Dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Int Rev Immunol* **29**, 184-209, doi:10.3109/08830181003602507 (2010).
- 598 Katsuyama, T., Tsokos, G. C. & Moulton, V. R. Aberrant T Cell Signaling and Subsets in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol* **9**, 1088, doi:10.3389/fimmu.2018.01088 (2018).
- 599 Geginat, J. *et al.* IL-10 producing regulatory and helper T-cells in systemic lupus erythematosus. *Semin Immunol* **44**, 101330, doi:10.1016/j.smim.2019.101330 (2019).
- 600 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).
- 601 Junker, F., Gordon, J. & Qureshi, O. Fc Gamma Receptors and Their Role in Antigen Uptake, Presentation, and T Cell Activation. *Front Immunol* **11**, 1393, doi:10.3389/fimmu.2020.01393 (2020).
- 602 Jackson, S. W. & Davidson, A. BAFF inhibition in SLE-Is tolerance restored? *Immunol Rev* **292**, 102-119, doi:10.1111/imr.12810 (2019).
- 603 Zhao, L., Ye, Y. & Zhang, X. B cells biology in systemic lupus erythematosus-from bench to bedside. *Sci China Life Sci* **58**, 1111-1125, doi:10.1007/s11427-015-4953-x (2015).
- 604 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).
- 605 Dema, B. & Charles, N. Autoantibodies in SLE: Specificities, Isotypes and Receptors. *Antibodies (Basel)* **5**, 2-2, doi:10.3390/antib5010002 (2016).
- 606 Arbuckle, M. R. *et al.* Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med* **349**, 1526-1533, doi:10.1056/NEJMoa021933 (2003).
- 607 Raschi, E. *et al.* beta2-glycoprotein I, lipopolysaccharide and endothelial TLR4: three players in the two hit theory for anti-phospholipid-mediated thrombosis. *J Autoimmun* **55**, 42-50, doi:10.1016/j.jaut.2014.03.001 (2014).
- 608 Ames, P. R., Batuca, J. R., Ciampa, A., Iannaccone, L. & Delgado Alves, J. Clinical relevance of nitric oxide metabolites and nitrate stress in thrombotic primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* **37**, 2523-2530, doi:10.3899/jrheum.100494 (2010).
- 609 Canaud, G. *et al.* Inhibition of the mTORC Pathway in the Antiphospholipid Syndrome. *N Engl J Med* **371**, 303-312 (2014).
- 610 Wu, M., Barnard, J., Kundu, S. & McCrae, K. R. A novel pathway of cellular activation mediated by antiphospholipid antibody-induced extracellular vesicles. *J Thromb Haemost* **13**, 1928-1940, doi:10.1111/jth.13072 (2015).
- 611 Bontadi, A. *et al.* Platelet and endothelial activation in catastrophic and quiescent antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* **109**, 901-908, doi:10.1160/TH12-03-0212 (2013).

- 612 Amirkhosravi, A. *et al.* CalDAG-GEFI deficiency protects mice from Fc $\gamma$ R2a-mediated thrombotic thrombocytopenia induced by CD40L and beta2GPI immune complexes. *J Thromb Haemost* **12**, 2113-2119, doi:10.1111/jth.12748 (2014).
- 613 Zhang, W. *et al.* Anti-beta2 glycoprotein I antibodies in complex with beta2 glycoprotein I induce platelet activation via two receptors: apolipoprotein E receptor 2' and glycoprotein I b $\alpha$ . *Front Med* **10**, 76-84, doi:10.1007/s11684-015-0426-7 (2016).
- 614 Hulstein, J. J. J. *et al.*  $\beta$ 2-Glycoprotein I inhibits vonWillebrand factor-dependent platelet adhesion and aggregation. *Blood* **110**, 1483-1491 (2007).
- 615 Fischetti, F. *et al.* Thrombus formation induced by antibodies to  $\beta$ 2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood* **106**, 2340-2346 (2005).
- 616 Pericleous, C. *et al.* Measuring IgA Anti-beta2-Glycoprotein I and IgG/IgA Anti-Domain I Antibodies Adds Value to Current Serological Assays for the Antiphospholipid Syndrome. *PLoS One* **11**, e0156407, doi:10.1371/journal.pone.0156407 (2016).
- 617 Holers, V. M. *et al.* Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody-induced fetal loss. *J Exp Med* **195**, 211-220, doi:10.1084/jem.200116116 (2002).
- 618 Shamoni, J. M., Salmon, J. E., Hyjek, E. & Baergen, R. N. Excessive complement activation is associated with placental injury in patients with antiphospholipid antibodies. *Am J Obstet Gynecol* **196**, 161-167 (2007).
- 619 Girardi, G. *et al.* Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest* **112**, 1644-1654, doi:10.1172/JCI18817 (2003).
- 620 Hasunuma, Y. *et al.* Involvement of beta 2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages. *Clin Exp Immunol* **107**, 569-573, doi:10.1046/j.1365-2249.1997.d01-948.x (1997).
- 621 Ritis, K. *et al.* A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. *J Immunol* **177**, 4794-4802, doi:10.4049/jimmunol.177.7.4794 (2006).
- 622 Leffler, J. *et al.* Degradation of neutrophil extracellular traps is decreased in patients with antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol* **32**, 66-70 (2014).
- 623 Yalavarthi, S. *et al.* Release of neutrophil extracellular traps by neutrophils stimulated with antiphospholipid antibodies: a newly identified mechanism of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheumatol* **67**, 2990-3003, doi:10.1002/art.39247 (2015).
- 624 Zuo, Y. *et al.* Anti-Neutrophil Extracellular Trap Antibodies and Impaired Neutrophil Extracellular Trap Degradation in Antiphospholipid Syndrome. *Arthritis Rheumatol* **72**, 2130-2135, doi:10.1002/art.41460 (2020).
- 625 McDonald, B. *et al.* Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice. *Blood* **129**, 1357-1367, doi:10.1182/blood-2016-09-741298 (2017).
- 626 Vyshkina, T. *et al.* Association of common mitochondrial DNA variants with multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* **129**, 31-35, doi:10.1016/j.clim.2008.07.011 (2008).



- 627 Lee, H. T. *et al.* Leukocyte mitochondrial DNA alteration in systemic lupus erythematosus and its relevance to the susceptibility to lupus nephritis. *Int J Mol Sci* **13**, 8853-8868, doi:10.3390/ijms13078853 (2012).
- 628 Jonsen, A. *et al.* Mitochondrial DNA polymorphisms are associated with susceptibility and phenotype of systemic lupus erythematosus. *Lupus* **18**, 309-312, doi:10.1177/0961203308097477 (2009).
- 629 Young, K. A. *et al.* Combined role of vitamin D status and CYP24A1 in the transition to systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* **76**, 153-158, doi:10.1136/annrheumdis-2016-209157 (2017).
- 630 Gkirtzimanaki, K. *et al.* IFNalpha Impairs Autophagic Degradation of mtDNA Promoting Autoreactivity of SLE Monocytes in a STING-Dependent Fashion. *Cell Rep* **25**, 921-933 e925, doi:10.1016/j.celrep.2018.09.001 (2018).
- 631 Perl, A. Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol* **9**, 674-686, doi:10.1038/nrrheum.2013.147 (2013).
- 632 Perl, A., Gergely, P., Jr. & Banki, K. Mitochondrial dysfunction in T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Int Rev Immunol* **23**, 293-313, doi:10.1080/08830180490452576 (2004).
- 633 Morgan, P. E., Sturges, 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 Radic Res* **41**, 1301-1312, doi:10.1080/10715760701684809 (2007).
- 634 Gergely, P., Jr. *et al.* Mitochondrial hyperpolarization and ATP depletion in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **46**, 175-190, doi:10.1002/1529-0131(200201)46:1<175::AID-ART10015>3.0.CO;2-H (2002).
- 635 Kovacs, B., Vassilopoulos, D., Vogelgesang, S. A. & Tsokos, G. C. Defective CD3-mediated cell death in activated T cells from patients with systemic lupus erythematosus: role of decreased intracellular TNF-alpha. *Clin Immunol Immunopathol* **81**, 293-302, doi:10.1006/clin.1996.0192 (1996).
- 636 Caielli, S. *et al.* A CD4(+) T cell population expanded in lupus blood provides B cell help through interleukin-10 and succinate. *Nat Med* **25**, 75-81, doi:10.1038/s41591-018-0254-9 (2019).
- 637 López-Pedraza, C. *et al.* Therapeutic Potential and Immunomodulatory Role of Coenzyme Q(10) and Its Analogues in Systemic Autoimmune Diseases. *Antioxidants (Basel)* **10**, doi:10.3390/antiox10040600 (2021).
- 638 Perez-Sanchez, C. *et al.* Mitochondrial dysfunction in antiphospholipid syndrome: implications in the pathogenesis of the disease and effects of coenzyme Q(10) treatment. *Blood* **119**, 5859-5870, doi:10.1182/blood-2011-12-400986 (2012).
- 639 Bengtsson, A. A., Gullstrand, B., Truedsson, L. & Sturfelt, G. SLE serum induces classical caspase-dependent apoptosis independent of death receptors. *Clin Immunol* **126**, 57-66, doi:10.1016/j.clim.2007.10.003 (2008).
- 640 Buang, N. *et al.* Type I interferons affect the metabolic fitness of CD8(+) T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Nat Commun* **12**, 1980, doi:10.1038/s41467-021-22312-y (2021).
- 641 Ling, G. S. *et al.* C1q restrains autoimmunity and viral infection by regulating CD8(+) T cell metabolism. *Science* **360**, 558-563, doi:10.1126/science.aao4555 (2018).

- 642 Yu, H., Yang, Z., Ding, X., Wang, Y. & Han, Y. Effects of serum from patients with early-onset pre-eclampsia, HELLP syndrome, and antiphospholipid syndrome on fatty acid oxidation in trophoblast cells. *Arch Gynecol Obstet* **292**, 559-567, doi:10.1007/s00404-015-3669-2 (2015).
- 643 Manganelli, V. *et al.* Altered Traffic of Cardiolipin during Apoptosis: Exposure on the Cell Surface as a Trigger for "Antiphospholipid Antibodies". *J Immunol Res* **2015**, 847985, doi:10.1155/2015/847985 (2015).
- 644 Green, D. Pathophysiology of Antiphospholipid Syndrome. *Thromb Haemost*, doi:10.1055/a-1701-2809 (2021).
- 645 Zussman, R. *et al.* Antiphospholipid antibodies can specifically target placental mitochondria and induce ROS production. *J Autoimmun* **111**, 102437, doi:10.1016/j.jaut.2020.102437 (2020).
- 646 Caza, T. N. *et al.* HRES-1/Rab4-mediated depletion of Drp1 impairs mitochondrial homeostasis and represents a target for treatment in SLE. *Ann Rheum Dis* **73**, 1888-1897, doi:10.1136/annrheumdis-2013-203794 (2014).
- 647 Zurgil, N. *et al.* Antimitochondrial (pyruvate dehydrogenase) autoantibodies in autoimmune rheumatic diseases. *J Clin Immunol* **12**, 201-209, doi:10.1007/bf00918090 (1992).
- 648 Pelka, K., Stec-Polak, M., Wojas-Pelc, A. & Pastuszczyk, M. Prevalence of antimitochondrial antibodies in subacute cutaneous lupus erythematosus. *Int J Dermatol* **60**, 88-92, doi:10.1111/ijd.15225 (2021).
- 649 Tincani, A. *et al.* Anti-phospholipid and anti-mitochondrial type M5 antibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* **3**, 321-326 (1985).
- 650 Dieudé, M., Senecal, J. L. & Raymond, Y. Induction of endothelial cell apoptosis by heat-shock protein 60-reactive antibodies from anti-endothelial cell autoantibody-positive systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum* **50**, 3221-3231, doi:10.1002/art.20564 (2004).
- 651 Mosca, M., Tani, C. & Bombardieri, S. Defining undifferentiated connective tissue diseases: a challenge for rheumatologists. *Lupus* **17**, 278-280, doi:10.1177/0961203307088004 (2008).
- 652 Wielosz, E., Majdan, M., Zychowska, I. & Jeleniewicz, R. Coexistence of five autoimmune diseases: diagnostic and therapeutic difficulties. *Rheumatol Int* **28**, 919-923 (2008).
- 653 Salle, V. Syndrome des antiphospholipides « séronégatif »: mythe ou réalité ? *Rev Med Interne* **41**, 265-274, doi:10.1016/j.revmed.2020.02.005 (2020).
- 654 Esdaile, J. M. [Lupus. The disease with a thousand faces]. *Union Med Can* **120**, 357-358 (1991).
- 655 Stockl, A. Complex syndromes, ambivalent diagnosis, and existential uncertainty: the case of Systemic Lupus Erythematosus (SLE). *Soc Sci Med* **65**, 1549-1559, doi:10.1016/j.socscimed.2007.05.016 (2007).
- 656 Kelly, A. & Panush, R. S. Diagnostic uncertainty and epistemologic humility. *Clin Rheumatol* **36**, 1211-1214, doi:10.1007/s10067-017-3631-8 (2017).
- 657 Oglesby, A. *et al.* Impact of early versus late systemic lupus erythematosus diagnosis on clinical and economic outcomes. *Appl Health Econ Health Policy* **12**, 179-190, doi:10.1007/s40258-014-0085-x (2014).
- 658 Adamichou, C. *et al.* In an early SLE cohort the ACR-1997, SLICC-2012 and EULAR/ACR-2019 criteria classify non-overlapping groups of patients: use of all

- three criteria ensures optimal capture for clinical studies while their modification earlier classification and treatment. *Ann Rheum Dis* **79**, 232-241 (2020).
- 659 Felten, R. *et al.* 10 most important contemporary challenges in the management of SLE. *Lupus Sci Med* **6**, e000303-e000303 (2019).
- 660 Arriens, C., Wren, J. D., Munroe, M. E. & Mohan, C. Systemic lupus erythematosus biomarkers: the challenging quest. *Rheumatology (Oxford)* **56**, i32-i45, doi:10.1093/rheumatology/kew407 (2017).
- 661 Vasquez-Canizares, N., Wahezi, D. & Putterman, C. Diagnostic and prognostic tests in systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **31**, 351-363, doi:10.1016/j.berh.2017.10.002 (2017).
- 662 van Gerven, N. M., de Boer, Y. S., Mulder, C. J., van Nieuwkerk, C. M. & Bouma, G. Auto immune hepatitis. *World J Gastroenterol* **22**, 4651-4661, doi:10.3748/wjg.v22.i19.4651 (2016).
- 663 Hennes, E. M. *et al.* Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology* **48**, 169-176, doi:10.1002/hep.22322 (2008).
- 664 Kuiper, E. M., Zondervan, P. E. & van Buuren, H. R. Paris criteria are effective in diagnosis of primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis overlap syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* **8**, 530-534, doi:10.1016/j.cgh.2010.03.004 (2010).
- 665 Wei, Z. *et al.* New scoring classification for primary biliary cholangitis–autoimmune hepatitis overlap syndrome. *Hepatol Commun* **2**, 245-253 (2018).
- 666 Tan, E. M. *et al.* The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **25**, 1271-1277, doi:10.1002/art.1780251101 (1982).
- 667 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/art.1780400928 (1997).
- 668 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-art30>3.0.co;2-w (1998).
- 669 Petri, M. *et al.* Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **64**, 2677-2686, doi:10.1002/art.34473 (2012).
- 670 Lam, G. K. & Petri, M. Assessment of systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* **23**, S120-132 (2005).
- 671 Mikdashi, J. & Nived, O. Measuring disease activity in adults with systemic lupus erythematosus: the challenges of administrative burden and responsiveness to patient concerns in clinical research. *Arthritis Res Ther* **17**, 183, doi:10.1186/s13075-015-0702-6 (2015).
- 672 Gladman, D. D., Ibanez, D. & Urowitz, M. B. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol* **29**, 288-291 (2002).
- 673 Hay, E. M. *et al.* The BILAG index: a reliable and valid instrument for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. *Q J Med* **86**, 447-458 (1993).
- 674 Isenberg, D. A. *et al.* BILAG 2004. Development and initial validation of an updated version of the British Isles Lupus Assessment Group's disease activity index for patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* **44**, 902-906, doi:10.1093/rheumatology/keh624 (2005).

- 675 Liang, M. H., Socher, S. A., Larson, M. G. & Schur, P. H. Reliability and validity of six systems for the clinical assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **32**, 1107-1118, doi:10.1002/anr.1780320909 (1989).
- 676 Petri, M. Disease activity assessment in SLE: do we have the right instruments? *Ann Rheum Dis* **66 Suppl 3**, iii61-64, doi:10.1136/ard.2007.078477 (2007).
- 677 Romero-Diaz, J., Isenberg, D. & Ramsey-Goldman, R. Measures of adult systemic lupus erythematosus: updated version of British Isles Lupus Assessment Group (BILAG 2004), European Consensus Lupus Activity Measurements (ECLAM), Systemic Lupus Activity Measure, Revised (SLAM-R), Systemic Lupus Activity Questionnaire for Population Studies (SLAQ), Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K), and Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index (SDI). *Arthritis Care Res (Hoboken)* **63 Suppl 11**, S37-46, doi:10.1002/acr.20572 (2011).
- 678 Gladman, D. *et al.* The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **39**, 363-369, doi:10.1002/art.1780390303 (1996).
- 679 Seror, R. in *Lupus érythémateux* Ch. 21, 209-223 (2013).
- 680 Costenbader, K. H. *et al.* Development and Initial Validation of the Self-Assessed Lupus Damage Index Questionnaire (LDIQ). *Arthritis Care Res* **62**, 559-568 (2010).
- 681 Yazdany, J. *et al.* The Brief Index of Lupus Damage (BILD): A patient-reported measure of damage in SLE NIH Public Access. *Arthritis Care Res* **63**, 1170-1177 (2011).
- 682 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).
- 683 Gardiner, C., Hills, J., Machin, S. J. & Cohen, H. Diagnosis of antiphospholipid syndrome in routine clinical practice. *Lupus* **22**, 18-25, doi:10.1177/0961203312460722 (2013).
- 684 Xourgia, E. & Tektonidou, M. G. Management of Non-criteria Manifestations in Antiphospholipid Syndrome. *Curr Rheumatol Rep* **22**, 51, doi:10.1007/s11926-020-00935-2 (2020).
- 685 Mavrogeni, S., Koutsogeorgopoulou, L., Dimitroulas, T., Markousis-Mavrogenis, G. & Kolovou, G. Complementary role of cardiovascular imaging and laboratory indices in early detection of cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **26**, 227-236, doi:10.1177/0961203316671810 (2017).
- 686 Pieta, A., Pelechas, E., Gerolymatou, N., Voulgari, P. V. & Drosos, A. A. Calcified constrictive pericarditis resulting in tamponade in a patient with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* **41**, 651-670, doi:10.1007/s00296-020-04747-6 (2021).
- 687 Oh Song, J. R. & Hc Kang, S. R. The Clinical Usefulness of 18F-FDG PET/CT in Patients with Systemic Autoimmune Disease. *Nucl Med Mol Imaging* **45**, 177-184 (2010).
- 688 Aringer, M. Inflammatory markers in systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* **110**, 102374, doi:10.1016/j.jaut.2019.102374 (2020).
- 689 Soliman, S. & Mohan, C. Lupus nephritis biomarkers. *Clin Immunol* **185**, 10-20, doi:10.1016/j.clim.2016.08.001 (2017).

- 690 Umeda, R. *et al.* Comparison of the 2018 and 2003 International Society of  
Nephrology/Renal Pathology Society classification in terms of renal prognosis in  
patients of lupus nephritis: a retrospective cohort study. *Arthritis Res Ther* **22**, 260,  
doi:10.1186/s13075-020-02358-x (2020).
- 691 Okon, L. G. & Werth, V. P. Cutaneous lupus erythematosus: diagnosis and treatment.  
*Best Pract Res Clin Rheumatol* **27**, 391-404, doi:10.1016/j.berh.2013.07.008 (2013).
- 692 Burdash, N. M., Teti, G. & Papadopoulos, V. The Crithidia luciliae and Farr assays  
for the detection of systemic lupus erythematosus. *Ann Clin Lab Sci* **13**, 49-54 (1983).
- 693 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, doi:10.1111/j.1398-9995.1978.tb01505.x (1978).
- 694 Mahler, M. & Fritzler, M. J. Anti-dsDNA antibody testing in the clinic: Farr or  
ELISA? *Nat Clin Pract Rheumatol* **3**, 72-73, doi:10.1038/ncprheum0398 (2007).
- 695 Losito, A., Zampi, I., Bertotto, A. & Zucchetti, P. The Crithidia luciliae test in the  
diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Ric Clin Lab* **9**, 141-145 (1979).
- 696 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 (2015).
- 697 Rountree, K. M., Yaker, Z. & Lopez, P. P. *Partial Thromboplastin Time*,  
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29939549>> (2022).
- 698 Briones, M. A. in *Transfusion Medicine and Hemostasis* 699-702 (Elsevier Inc.,  
2009).
- 699 Pengo, V. *et al.* in *Methods in Molecular Biology* Vol. 1646 169-176 (Humana  
Press Inc., 2017).
- 700 Bertolaccini, M. L. *et al.* 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies  
Task Force. Report on antiphospholipid syndrome laboratory diagnostics and trends.  
*Autoimmun Rev* **13**, 917-930, doi:10.1016/j.autrev.2014.05.001 (2014).
- 701 Rasool, Z. S. & Tiwari, V. *Biochemistry, Lupus Anticoagulant*,  
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31335077>> (2022).
- 702 Fox, R. I. Mechanism of action of hydroxychloroquine as an antirheumatic drug.  
*Semin Arthritis Rheum* **23**, 82-91 (1993).
- 703 Wozniacka, A., Lesiak, A., Narbutt, J., McCauliffe, D. P. & Sysa-Jedrzejowska, A.  
Chloroquine treatment influences proinflammatory cytokine levels in systemic lupus  
erythematosus patients. *Lupus* **15**, 268-275, doi:10.1191/0961203306lu2299oa  
(2006).
- 704 Kuznik, A. *et al.* Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and  
imidazoquinolines. *J Immunol* **186**, 4794-4804, doi:10.4049/jimmunol.1000702  
(2011).
- 705 Nguyen, T. Q., Capra, J. D. & Sontheimer, R. D. 4-Aminoquinoline antimalarials  
enhance UV-B induced c-jun transcriptional activation. *Lupus* **7**, 148-153,  
doi:10.1191/096120398678919912 (1998).
- 706 Lange, Y., Duan, H. & Mazzone, T. Cholesterol homeostasis is modulated by  
amphiphiles at transcriptional and post-transcriptional loci. *J Lipid Res* **37**, 534-539  
(1996).
- 707 Gu, J. Q. *et al.* A Toll-like receptor 9-mediated pathway stimulates perilipin 3 (TIP47)  
expression and induces lipid accumulation in macrophages. *Am J Physiol Endocrinol  
Metab* **299**, E593-600, doi:10.1152/ajpendo.00159.2010 (2010).

- 708 Espinola, R. G., Pierangeli, S. S., Gharavi, A. E. & Harris, E. N. Hydroxychloroquine reverses platelet activation induced by human IgG antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* **87**, 518-522 (2002).
- 709 Rand, J. H. *et al.* Hydroxychloroquine protects the annexinA5 anticoagulant shield from disruption by antiphospholipid antibodies: Evidence for a novel effect for an old antimalarial drug. *Blood* **115**, 2292-2299 (2010).
- 710 Stahn, C. & Buttgereit, F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Clin Pract Rheumatol* **4**, 525-533, doi:10.1038/ncprheum0898 (2008).
- 711 Porta, S. *et al.* Glucocorticoids in Systemic Lupus Erythematosus. Ten Questions and Some Issues. *J Clin Med* **9**, doi:10.3390/jcm9092709 (2020).
- 712 Luijten, R. K., Fritsch-Stork, R. D., Bijlsma, J. W. & Derksen, R. H. The use of glucocorticoids in systemic lupus erythematosus. After 60 years still more an art than science. *Autoimmun Rev* **12**, 617-628, doi:10.1016/j.autrev.2012.12.001 (2013).
- 713 Du, J. *et al.* Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3543-3548, doi:10.1073/pnas.0812671106 (2009).
- 714 Maltzman, J. S. & Koretzky, G. A. Azathioprine: old drug, new actions. *J Clin Invest* **111**, 1122-1124, doi:10.1172/JCI18384 (2003).
- 715 Tiede, I. *et al.* CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest* **111**, 1133-1145, doi:10.1172/JCI16432 (2003).
- 716 Bruni, C., Shirai, Y., Kuwana, M. & Matucci-Cerinic, M. Cyclophosphamide: similarities and differences in the treatment of SSc and SLE The pathogenic process, similarities and differences. *Lupus* **28**, 571-574 (2019).
- 717 Fox, R. I. *et al.* How does leflunomide modulate the immune response in rheumatoid arthritis? *BioDrugs*. **12**, 301-315 (1999).
- 718 Brown, P. M., Pratt, A. G. & Isaacs, J. D. Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers. *Nat Rev Rheumatol* **12**, 731-742, doi:10.1038/nrrheum.2016.175 (2016).
- 719 Matsuda, S. & Koyasu, S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* **47**, 119-125, doi:10.1016/s0162-3109(00)00192-2 (2000).
- 720 Allison, A. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil. *Lupus* **14**, 2-8 (2005).
- 721 Schoot, T. S., Kerckhoffs, A. P. M., Hilbrands, L. B. & van Marum, R. J. Immunosuppressive Drugs and COVID-19: A Review. *Front Pharmacol* **11**, 1333, doi:10.3389/fphar.2020.01333 (2020).
- 722 Chang, C., Tanaka, A., Bowlus, C. & Gershwin, M. E. The use of biologics in the treatment of autoimmune liver disease. *Vol* **29**, 385-398 (2020).
- 723 Samotij, D. & Reich, A. Biologics in the Treatment of Lupus Erythematosus: A Critical Literature Review. *Biomed Res Int* **2019**, 8142368, doi:10.1155/2019/8142368 (2019).
- 724 Kotyla, P. J. Are Janus Kinase Inhibitors Superior over Classic Biologic Agents in RA Patients? *Biomed Res Int* **2018**, 7492904, doi:10.1155/2018/7492904 (2018).
- 725 Kalunian, K. C. Interferon-targeted therapy in systemic lupus erythematosus: Is this an alternative to targeting B and T cells? *Lupus* **25**, 1097-1101 (2016).
- 726 Kazzaz, N. M., McCune, W. J. & Knight, J. S. Treatment of catastrophic antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheumatol* **28**, 218-227, doi:10.1097/BOR.000000000000269 (2016).

- 727 Paumgartner, G. & Beuers, U. Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: Mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology* **36**, 525-531 (2002).
- 728 Tektonidou, M. G. *et al.* EULAR recommendations for the management of antiphospholipid syndrome in adults. *Ann Rheum Dis* **78**, 1296-1304 (2019).
- 729 Schramm, A. M. & Clowse, M. E. Aspirin for prevention of preeclampsia in lupus pregnancy. *Autoimmune Dis* **2014**, 920467, doi:10.1155/2014/920467 (2014).
- 730 Bala, M. M. *et al.* Antiplatelet and anticoagulant agents for primary prevention of thrombosis in individuals with antiphospholipid antibodies. *Cochrane Database Syst Rev* **7**, Cd012534, doi:10.1002/14651858.CD012534.pub2 (2018).
- 731 Wijeyeratne, Y. D. & Heptinstall, S. Anti-platelet therapy: ADP receptor antagonists. *Br J Clin Pharmacol* **72**, 647-657, doi:10.1111/j.1365-2125.2011.03999.x (2011).
- 732 Whitlon, D. S., Sadowski, J. A. & Suttie, J. W. Mechanism of coumarin action: significance of vitamin K epoxide reductase inhibition. *Biochemistry* **17**, 1371-1377, doi:10.1021/bi00601a003 (1978).
- 733 Riva, N. & Ageno, W. Pros and cons of vitamin K antagonists and non-vitamin K antagonist oral anticoagulants. *Semin Thromb Hemost* **41**, 178-187, doi:10.1055/s-0035-1544231 (2015).
- 734 Dufrost, V. *et al.* New Insights into the Use of Direct Oral Anticoagulants in Non-high Risk Thrombotic APS Patients: Literature Review and Subgroup Analysis from a Meta-analysis. *Current Rheumatology Reports* **22**, 25-25 (2020).
- 735 Mulloy, B., Hogwood, J., Gray, E., Lever, R. & Page, C. P. Pharmacology of Heparin and Related Drugs. *Pharmacol Rev* **68**, 76-141, doi:10.1124/pr.115.011247 (2016).
- 736 Cohen, H., Efthymiou, M. & Devreese, K. M. J. Monitoring of anticoagulation in thrombotic antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* **19**, 892-908, doi:10.1111/jth.15217 (2021).
- 737 Kostopoulou, M., Nikolopoulos, D., Parodis, I. & Bertsias, G. Cardiovascular Disease in Systemic Lupus Erythematosus: Recent Data on Epidemiology, Risk Factors and Prevention. *Curr Vasc Pharmacol* **18**, 549-565 (2019).
- 738 Tselios, K., Gladman, D. D., Su, J. & Urowitz, M. Impact of the new American College of Cardiology/American Heart Association definition of hypertension on atherosclerotic vascular events in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* **79**, 612-617, doi:10.1136/annrheumdis-2019-216764 (2020).
- 739 Taylor, E. B. & Ryan, M. J. Understanding mechanisms of hypertension in systemic lupus erythematosus. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease* **11**, 20-32 (2017).
- 740 Ferguson, L. D., Sattar, N. & McInnes, I. B. Managing Cardiovascular Risk in Patients with Rheumatic Disease. *Med Clin North Am* **105**, 247-262, doi:10.1016/j.mcna.2020.09.010 (2021).
- 741 Shoenfeld, Y. *et al.* Vitamin D and systemic lupus erythematosus - The hype and the hope. *Autoimmun Rev* **17**, 19-23, doi:10.1016/j.autrev.2017.11.004 (2018).
- 742 Gompel, A. & Piette, J. C. Systemic lupus erythematosus and hormone replacement therapy. *Menopause Int* **13**, 65-70, doi:10.1258/175404507780796433 (2007).
- 743 Martínez, T. *et al.* Mechanisms of action and historical facts on the use of intravenous immunoglobulins in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* **18**, 279-286 (2019).
- 744 Mulhearn, B. & Bruce, I. N. Indications for IVIG in rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxford)* **54**, 383-391, doi:10.1093/rheumatology/keu429 (2015).

- 745 Sewell, W. A. & Jolles, S. Immunomodulatory action of intravenous immunoglobulin. *Immunology* **107**, 387-393, doi:10.1046/j.1365-2567.2002.01545.x (2002).
- 746 Uthman, I., Shamseddine, A. & Taher, A. The role of therapeutic plasma exchange in the catastrophic antiphospholipid syndrome. *Transfus Apher Sci* **33**, 11-17, doi:10.1016/j.transci.2004.10.025 (2005).
- 747 Liu, C. C., Kao, A. H., Manzi, S. & Ahearn, J. M. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: challenges and prospects for the future. *Ther Adv Musculoskelet Dis* **5**, 210-233, doi:10.1177/1759720X13485503 (2013).
- 748 Boilard, E. *et al.* Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* **327**, 580-583, doi:10.1126/science.1181928 (2010).
- 749 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).
- 750 Cloutier, N. *et al.* The exposure of autoantigens by microparticles underlies the formation of potent inflammatory components: the microparticle-associated immune complexes. *EMBO Mol Med* **5**, 235-249, doi:10.1002/emmm.201201846 (2013).
- 751 Andersen, J. L. & Kornbluth, S. The tangled circuitry of metabolism and apoptosis. *Mol Cell* **49**, 399-410, doi:10.1016/j.molcel.2012.12.026 (2013).
- 752 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).
- 753 Gray, M. W. Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, a011403, doi:10.1101/cshperspect.a011403 (2012).
- 754 Arechaga, I. Membrane invaginations in bacteria and mitochondria: common features and evolutionary scenarios. *J Mol Microbiol Biotechnol* **23**, 13-23, doi:10.1159/000346515 (2013).
- 755 Lang, B. F. *et al.* An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* **387**, 493-497, doi:10.1038/387493a0 (1997).
- 756 Friedman, J. R. & Nunnari, J. Mitochondrial form and function. *Nature* **505**, 335-343, doi:10.1038/nature12985 (2014).
- 757 Weinberg, S. E., Sena, L. A. & Chandel, N. S. Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity. *Immunity* **42**, 406-417, doi:10.1016/j.immuni.2015.02.002 (2015).
- 758 West, A. P., Shadel, G. S. & Ghosh, S. Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol* **11**, 389-402, doi:10.1038/nri2975 (2011).
- 759 Sandhir, R., Halder, A. & Sunkaria, A. Mitochondria as a centrally positioned hub in the innate immune response. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1863**, 1090-1097, doi:10.1016/j.bbadis.2016.10.020 (2017).
- 760 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).
- 761 Zhao, Z. *et al.* Cardiolipin-mediated procoagulant activity of mitochondria contributes to traumatic brain injury-associated coagulopathy in mice. *Blood* **127**, 2763-2772, doi:10.1182/blood-2015-12-688838 (2016).
- 762 Nakahira, K. *et al.* Circulating mitochondrial DNA in patients in the ICU as a marker of mortality: derivation and validation. *PLoS Med* **10**, e1001577; discussion e1001577, doi:10.1371/journal.pmed.1001577 (2013).



- 763 Yasui, K. *et al.* Mitochondrial damage-associated molecular patterns as potential proinflammatory mediators in post-platelet transfusion adverse effects. *Transfusion* **56**, 1201-1212, doi:10.1111/trf.13535 (2016).
- 764 Simmons, J. D. *et al.* Potential contribution of mitochondrial DNA damage associated molecular patterns in transfusion products to the development of acute respiratory distress syndrome after multiple transfusions. *J Trauma Acute Care Surg* **82**, 1023-1029, doi:10.1097/TA.0000000000001421 (2017).
- 765 Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**, 373-384, doi:10.1038/ni.1863 (2010).
- 766 Cloutier, N. *et al.* Platelets release pathogenic serotonin and return to circulation after immune complex-mediated sequestration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E1550-E1559, doi:10.1073/pnas.1720553115 (2018).
- 767 Meek, F., Khoury, E. L., Doniach, D. & Baum, H. Mitochondrial antibodies in chronic liver diseases and connective tissue disorders: further characterization of the autoantigens. *Clin Exp Immunol* **41**, 43-54 (1980).
- 768 Doniach, D., Walker, J. G., Roitt, I. M. & Berg, P. A. "Autoallergic" hepatitis. *N Engl J Med* **282**, 86-88, doi:10.1056/NEJM197001082820207 (1970).
- 769 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).
- 770 Lindor, K. D. *et al.* Primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **50**, 291-308, doi:10.1002/hep.22906 (2009).
- 771 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).
- 772 Reimer, G., Rubin, R. L., Kotzin, B. L. & Tan, E. M. Anti-native DNA antibodies from autoimmune sera also bind to DNA in mitochondria. *J Immunol* **133**, 2532-2536 (1984).
- 773 Bradwell, A. R., Hughes, R. G. & Karim, A. R. in *Manual of molecular and clinical laboratory immunology* (ed Barbara Hamilton Robert G. Folds James D. Detrick) Ch. 112, (ASM Press, 2006).
- 774 Deegan, M. J., Walker, S. E. & Lovell, S. E. Antibodies to double stranded DNA. A comparison of the indirect immunofluorescent test using *Crithidia luciliae* and the DNA binding assay. *Am J Clin Pathol* **69**, 599-604 (1978).
- 775 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).
- 776 Crowe, W. & Kushner, I. An immunofluorescent method using *Crithidia luciliae* to detect antibodies to double-stranded DNA. *Arthritis Rheum* **20**, 811-814 (1977).
- 777 Jessop, S. & Botha, P. False-positive test results for syphilis in relatives of a patient with systemic lupus erythematosus. *Br J Vener Dis* **55**, 292-294, doi:10.1136/sti.55.4.292 (1979).
- 778 Claypool, S. M. & Koehler, C. M. The complexity of cardiolipin in health and disease. *Trends Biochem Sci* **37**, 32-41, doi:10.1016/j.tibs.2011.09.003 (2012).

- 779 Hudson, M. *et al.* The presence of multiple prothrombotic risk factors is associated  
with a higher risk of thrombosis in individuals with anticardiolipin antibodies. *J*  
*Rheumatol* **30**, 2385-2391 (2003).
- 780 Neville, C. *et al.* Thromboembolic risk in patients with high titre anticardiolipin and  
multiple antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* **90**, 108-115 (2003).
- 781 Cheng, M. Y., Hartl, F. U. & Horwich, A. L. The mitochondrial chaperonin hsp60 is  
required for its own assembly. *Nature* **348**, 455-458, doi:10.1038/348455a0 (1990).
- 782 Grob, P. J., Muller-Schoop, J. W., Hacki, M. A. & Joller-Jemelka, H. I. Drug-induced  
pseudolupus. *Lancet* **2**, 144-148, doi:10.1016/s0140-6736(75)90055-0 (1975).
- 783 Meroni, P. L. *et al.* Anti-mitochondrial type M5 and anti-cardiolipin antibodies in  
autoimmune disorders: studies on their association and cross-reactivity. *Clin Exp*  
*Immunol* **67**, 484-491 (1987).
- 784 Mouritsen, S., Demant, E., Permin, H. & Wiik, A. High prevalence of anti-  
mitochondrial antibodies among patients with some well-defined connective tissue  
diseases. *Clin Exp Immunol* **66**, 68-76 (1986).
- 785 Gusdon, A. M., Chen, J., Votyakova, T. V. & Mathews, C. E. Chapter 24  
Quantification, localization, and tissue specificities of mouse mitochondrial reactive  
oxygen species production. *Methods Enzymol* **456**, 439-457, doi:10.1016/s0076-  
6879(08)04424-8 (2009).
- 786 Lindor, K. D., Bowlus, C. L., Boyer, J., Levy, C. & Mayo, M. Primary Biliary  
Cholangitis: 2018 Practice Guidance from the American Association for the Study of  
Liver Diseases. *Hepatology* **69**, 394-419, doi:10.1002/hep.30145 (2019).
- 787 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, doi:10.4049/jimmunol.177.9.6504  
(2006).
- 788 Nagata, T., Redman, R. S. & Lakshman, R. Isolation of intact nuclei of high purity  
from mouse liver. *Anal Biochem* **398**, 178-184, doi:10.1016/j.ab.2009.11.017 (2010).
- 789 Ullal, A. J. *et al.* Microparticles as antigenic targets of antibodies to DNA and  
nucleosomes in systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* **36**, 173-180,  
doi:10.1016/j.jaut.2011.02.001 (2011).
- 790 Mobarrez, F. *et al.* Microparticles in the blood of patients with systemic lupus  
erythematosus (SLE): phenotypic characterization and clinical associations. *Sci Rep*  
**6**, 36025, doi:10.1038/srep36025 (2016).
- 791 Sisirak, V. *et al.* Digestion of Chromatin in Apoptotic Cell Microparticles Prevents  
Autoimmunity. *Cell* **166**, 88-101, doi:10.1016/j.cell.2016.05.034 (2016).
- 792 Hirschfield, G. M. & Gershwin, M. E. The immunobiology and pathophysiology of  
primary biliary cirrhosis. *Annu Rev Pathol* **8**, 303-330, doi:10.1146/annurev-pathol-  
020712-164014 (2013).
- 793 Serbinova, E., Kagan, V., Han, D. & Packer, L. Free radical recycling and  
intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-  
tocotrienol. *Free Radic Biol Med* **10**, 263-275, doi:10.1016/0891-5849(91)90033-y  
(1991).
- 794 Claycamp, H. G. Phenol sensitization of DNA to subsequent oxidative damage in 8-  
hydroxyguanine assays. *Carcinogenesis* **13**, 1289-1292,  
doi:10.1093/carcin/13.7.1289 (1992).

- 795 Soltys, B. J. & Gupta, R. S. Immunolectron microscopic localization of the 60-kDa heat shock chaperonin protein (Hsp60) in mammalian cells. *Exp Cell Res* **222**, 16-27, doi:10.1006/excr.1996.0003 (1996).
- 796 de Leeuw, K., Bungener, L., Roozendaal, C., Bootsma, H. & Stegeman, C. A. Auto-antibodies to double-stranded DNA as biomarker in systemic lupus erythematosus: comparison of different assays during quiescent and active disease. *Rheumatology (Oxford)* **56**, 698-703, doi:10.1093/rheumatology/kew462 (2017).
- 797 Swaak, A. J., Aarden, L. A., Stadius van Eps, L. W. & Feltkamp, T. E. Anti-dsDNA and complement profiles as prognostic guides in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **22**, 226-235, doi:10.1002/art.1780220304 (1979).
- 798 Binder, C. J. Natural IgM antibodies against oxidation-specific epitopes. *J Clin Immunol* **30 Suppl 1**, S56-60, doi:10.1007/s10875-010-9396-3 (2010).
- 799 Avrameas, S. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunol Today* **12**, 154-159, doi:10.1016/s0167-5699(05)80045-3 (1991).
- 800 Mouthon, L. *et al.* Analysis of the normal human IgG antibody repertoire: Evidence that IgG autoantibodies of healthy adults recognize a limited and conserved set of protein antigens in homologous tissues. *J Immunol* **154**, 5769-5778 (1995).
- 801 Macpherson, A. J. & Uhr, T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* **303**, 1662-1665, doi:10.1126/science.1091334 (2004).
- 802 Wright, D. J. *et al.* New antibody in early syphilis. *Lancet* **1**, 740-743, doi:10.1016/s0140-6736(70)90972-4 (1970).
- 803 Klein, R., Klöppel, G., Garbe, W., Fintelmann, V. & Berg, P. A. Antimitochondrial antibody profiles determined at early stages of primary biliary cirrhosis differentiate between a benign and a progressive course of the disease. A retrospective analysis of 76 patients over 6-18 years. *J Hepatol* **12**, 21-27 (1991).
- 804 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).
- 805 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. *Clin Exp Immunol* **74**, 68-74 (1988).
- 806 Klein, R. & Berg, P. A. Anti-M9 antibodies in sera from patients with primary biliary cirrhosis recognize an epitope of glycogen phosphorylase. *Clin Exp Immunol* **81**, 65-71, doi:10.1111/j.1365-2249.1990.tb05292.x (1990).
- 807 Calfee, C. S. & Matthay, M. A. Clinical immunology: Culprits with evolutionary ties. *Nature* **464**, 41-42, doi:10.1038/464041a (2010).
- 808 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).
- 809 Aatonen, M. T. *et al.* Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* **3**, doi:10.3402/jev.v3.24692 (2014).
- 810 Smeitink, J., van den Heuvel, L. & DiMauro, S. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet* **2**, 342-352, doi:10.1038/35072063 (2001).
- 811 Jourdain, A. A., Boehm, E., Maundrell, K. & Martinou, J. C. Mitochondrial RNA granules: Compartmentalizing mitochondrial gene expression. *J Cell Biol* **212**, 611-614, doi:10.1083/jcb.201507125 (2016).

- 812 Jourdain, A. A. *et al.* The FASTK family of proteins: emerging regulators of mitochondrial RNA biology. *Nucleic Acids Res* **45**, 10941-10947, doi:10.1093/nar/gkx772 (2017).
- 813 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, doi:10.1002/art.1780350606 (1992).
- 814 Gladman, D. D. *et al.* The Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus International Comparison. *J Rheumatol* **27**, 373-376 (2000).
- 815 Gladman, D. *et al.* Systemic lupus international collaborative clinics: development of a damage index in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* **19**, 1820-1821 (1992).
- 816 Gladman, D. D. *et al.* The reliability of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **40**, 809-813, doi:10.1002/art.1780400506 (1997).
- 817 Pengo, V. *et al.* Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost* **7**, 1737-1740, doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03555.x (2009).
- 818 Witt-Sullivan, H. *et al.* The demography of primary biliary cirrhosis in Ontario, Canada. *Hepatology* **12**, 98-105, doi:10.1002/hep.1840120116 (1990).
- 819 Kita, H. *et al.* Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. *J Clin Invest* **109**, 1231-1240, doi:10.1172/JCI14698 (2002).
- 820 Yeaman, S. J. *et al.* Primary biliary cirrhosis: identification of two major M2 mitochondrial autoantigens. *Lancet* **1**, 1067-1070, doi:10.1016/s0140-6736(88)91894-6 (1988).
- 821 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, doi:10.1002/hep.1840050510 (1985).
- 822 Gershwin, M. E. *et al.* Primary biliary cirrhosis: an orchestrated immune response against epithelial cells. *Immunol Rev* **174**, 210-225, doi:10.1034/j.1600-0528.2002.017402.x (2000).
- 823 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).
- 824 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). *J Hepatol* **5**, 36-36 (1987).
- 825 Klein, R., Muting, D., Fintelmann, V., Kloppel, G. & Berg, P. A. Anti M9 — A marker antibody for early asymptomatic primary biliary cirrhosis (PBC). *J Hepatol* **1**, 264-264 (1985).

- 826 Klein, R. *et al.* The antimitochondrial antibody anti-M9. A marker for the diagnosis of early primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* **6**, 299-306, doi:10.1016/s0168-8278(88)80046-1 (1988).
- 827 Gu, Y., Wang, C., Roifman, C. M. & Cohen, A. Role of MHC class I in immune surveillance of mitochondrial DNA integrity. *J Immunol* **170**, 3603-3607, doi:10.4049/jimmunol.170.7.3603 (2003).
- 828 Dengjel, J. *et al.* Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7922-7927, doi:10.1073/pnas.0501190102 (2005).
- 829 Roberts, R. F. & Fon, E. A. Presenting mitochondrial antigens: PINK1, Parkin and MDVs steal the show. *Cell Res* **26**, 1180-1181, doi:10.1038/cr.2016.104 (2016).
- 830 Liang, M. H. *et al.* Strategies for reducing excess morbidity and mortality in blacks with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **34**, 1187-1196, doi:10.1002/art.1780340918 (1991).
- 831 Williams, E. M. *et al.* I too, am America: a review of research on systemic lupus erythematosus in African-Americans. *Lupus Sci Med* **3**, e000144, doi:10.1136/lupus-2015-000144 (2016).
- 832 Molokhia, M. & McKeigue, P. Risk for rheumatic disease in relation to ethnicity and admixture. *Arthritis Res* **2**, 115-125, doi:10.1186/ar76 (2000).
- 833 Peschken, C. A. *et al.* The 1000 Canadian faces of lupus: determinants of disease outcome in a large multiethnic cohort. *J Rheumatol* **36**, 1200-1208, doi:10.3899/jrheum.080912 (2009).
- 834 Nicolaou, O. *et al.* Biomarkers of systemic lupus erythematosus identified using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review. *J Cell Mol Med* **21**, 993-1012, doi:10.1111/jcmm.13031 (2017).
- 835 Dard, L., Blanchard, W., Hubert, C., Lacombe, D. & Rossignol, R. Mitochondrial functions and rare diseases. *Mol Aspects Med* **71**, 100842, doi:10.1016/j.mam.2019.100842 (2020).
- 836 Levine, J. S., Branch, D. W. & Rauch, J. The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* **346**, 752-763, doi:10.1056/NEJMra002974 (2002).
- 837 Ghebrehiwet, B., Geisbrecht, B. V., Xu, X., Savitt, A. G. & Peerschke, E. I. B. The C1q Receptors: Focus on gC1qR/p33 (C1qBP, p32, HABP-1)(1). *Semin Immunol* **45**, 101338, doi:10.1016/j.smim.2019.101338 (2019).
- 838 Unlu, O., Zuily, S. & Erkan, D. The clinical significance of antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus. *Eur J Rheumatol* **3**, 75-84, doi:10.5152/eurjrheum.2015.0085 (2016).
- 839 Price, B. E. *et al.* Anti-phospholipid autoantibodies bind to apoptotic, but not viable, thymocytes in a beta 2-glycoprotein I-dependent manner. *J Immunol* **157**, 2201-2208 (1996).
- 840 Pisetsky, D. S. & Lipsky, P. E. New insights into the role of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol* **16**, 565-579, doi:10.1038/s41584-020-0480-7 (2020).
- 841 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).

- 842 Alves, M. R. & Isenberg, D. A. "Mixed connective tissue disease": a condition in  
search of an identity. *Clin Exp Med* **20**, 159-166, doi:10.1007/s10238-020-00606-7  
(2020).
- 843 Mahler, M., Fritzler, M. J. & Satoh, M. Autoantibodies to the mitochondrial RNA  
processing (MRP) complex also known as Th/To autoantigen. *Autoimmun Rev* **14**,  
254-257, doi:10.1016/j.autrev.2014.11.007 (2015).
- 844 Sibani, S. & LaBaer, J. Immunoprofiling using NAPPA protein microarrays. *Methods*  
*Mol Biol* **723**, 149-161, doi:10.1007/978-1-61779-043-0\_10 (2011).
- 845 Ghebrehiwet, B. *et al.* Soluble gC1qR is an autocrine signal that induces B1R  
expression on endothelial cells. *J Immunol* **192**, 377-384,  
doi:10.4049/jimmunol.1302031 (2014).
- 846 Xu, H., Frojmovic, M. M., Wong, T. & Rauch, J. p32, a platelet autoantigen  
recognized by an SLE-derived autoantibody that inhibits platelet aggregation. *J*  
*Autoimmun* **8**, 97-119, doi:10.1006/jaut.1995.0008 (1995).
- 847 Pednekar, L. *et al.* Analysis of the Interaction between Globular Head Modules of  
Human C1q and Its Candidate Receptor gC1qR. *Frontiers in Immunology* **7** (2016).
- 848 Brinkmann, C. R. *et al.* Mitochondria and the lectin pathway of complement. *J Biol*  
*Chem* **288**, 8016-8027, doi:10.1074/jbc.M112.430249 (2013).
- 849 Yagi, M. *et al.* p32/gC1qR is indispensable for fetal development and mitochondrial  
translation: importance of its RNA-binding ability. *Nucleic Acids Res* **40**, 9717-9737,  
doi:10.1093/nar/gks774 (2012).
- 850 Weyand, C. M. & Goronzy, J. J. A Mitochondrial Checkpoint in Autoimmune  
Disease. *Cell Metab* **28**, 185-186, doi:10.1016/j.cmet.2018.07.014 (2018).
- 851 Trendelenburg, M. Autoantibodies against complement component C1q in systemic  
lupus erythematosus. *Clin Transl Immunology* **10**, e1279, doi:10.1002/cti2.1279  
(2021).
- 852 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).
- 853 Choi, K. *et al.* Overexpressed p32 localized in the endoplasmic reticulum and  
mitochondria negatively regulates calciumdependent endothelial nitric oxide  
synthase activit. *Mol Med Rep* **22**, 2395-2403, doi:10.3892/mmr.2020.11307 (2020).
- 854 Jonkman, J. & Brown, C. M. Any Way You Slice It-A Comparison of Confocal  
Microscopy Techniques. *Journal of biomolecular techniques: JBT* **26**, 54-65 (2015).
- 855 Morizono, H. *et al.* Expression, purification and kinetic characterization of wild-type  
human ornithine transcarbamylase and a recurrent mutant that produces "late onset".  
*hyperammonaemia. Biochem J* **322**, 625-631 (1997).
- 856 Diez-Fernandez, C. *et al.* Molecular characterization of carbamoyl-phosphate  
synthetase (CPS1) deficiency using human recombinant CPS1 as a key tool. *Hum*  
*Mutat* **34**, 1149-1159, doi:10.1002/humu.22349 (2013).
- 857 Pisetsky, D. S. *et al.* The binding of SLE autoantibodies to mitochondria. *Clin*  
*Immunol* **212**, 108349, doi:10.1016/j.clim.2020.108349 (2020).
- 858 Homberg, J. C. *et al.* Drug-induced hepatitis associated with anticytoplasmic  
organelle autoantibodies. *Hepatology* **5**, 722-727, doi:10.1002/hep.1840050504  
(1985).

- 859 Klein, R. & Berg, P. A. Anti-mitochondrial antibodies (anti-M7) in heart diseases recognize epitopes on bacterial and mammalian sarcosine dehydrogenase. *Clin Exp Immunol* **82**, 289-293, doi:10.1111/j.1365-2249.1990.tb05441.x (1990).
- 860 Alard, J.-E. *et al.* Autoantibodies to endothelial cell surface ATP synthase, the endogenous receptor for hsp60, might play a pathogenic role in vasculitides. *PLoS One* **6**, e14654-e14654 (2011).
- 861 Vogtle, F. N. *et al.* Landscape of submitochondrial protein distribution. *Nat Commun* **8**, 290, doi:10.1038/s41467-017-00359-0 (2017).
- 862 Seelig, C. A., Bauer, O. & Seelig, H. P. Autoantibodies Against DFS70/LEDGF Exclusion Markers for Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases (SARD). *Clin Lab* **62**, 499-517, doi:10.7754/clin.lab.2015.150905 (2016).
- 863 Bowman, S. J. Primary Sjogren's syndrome. *Lupus* **27**, 32-35, doi:10.1177/0961203318801673 (2018).
- 864 Kuwana, M. Circulating Anti-Nuclear Antibodies in Systemic Sclerosis: Utility in Diagnosis and Disease Subsetting. *J Nippon Med Sch* **84**, 56-63, doi:10.1272/jnms.84.56 (2017).
- 865 Rekvig, O. P. The dsDNA, anti-dsDNA antibody, and lupus nephritis: What we agree on, what must be done, and what the best strategy forward could be. *Front Immunol* **10**, 1104-1104 (2019).
- 866 Berland, R. *et al.* Toll-like receptor 7-dependent loss of B cell tolerance in pathogenic autoantibody knockin mice. *Immunity* **25**, 429-440, doi:10.1016/j.immuni.2006.07.014 (2006).
- 867 Hwang, S. H. *et al.* B cell TLR7 expression drives anti-RNA autoantibody production and exacerbates disease in systemic lupus erythematosus-prone mice. *J Immunol* **189**, 5786-5796, doi:10.4049/jimmunol.1202195 (2012).
- 868 Han, J. H. *et al.* Expression of an anti-RNA autoantibody in a mouse model of SLE increases neutrophil and monocyte numbers as well as IFN-I expression. *Eur J Immunol* **44**, 215-226, doi:10.1002/eji.201343714 (2014).
- 869 Bijlsma, J. W., Plater-Zyberk, C., Mumford, P. & Maini, R. N. Lack of natural antibodies in rheumatic diseases. *Rheumatol Int* **10**, 107-112, doi:10.1007/BF02274824 (1990).
- 870 Su, J. *et al.* Natural antibodies against phosphorylcholine as potential protective factors in SLE. *Rheumatology* **47**, 1144-1150 (2008).
- 871 Gronwall, C. *et al.* IgM autoantibodies to distinct apoptosis-associated antigens correlate with protection from cardiovascular events and renal disease in patients with SLE. *Clin Immunol* **142**, 390-398, doi:10.1016/j.clim.2012.01.002 (2012).
- 872 Ahlin, E. *et al.* Autoantibodies associated with RNA are more enriched than anti-dsDNA antibodies in circulating immune complexes in SLE. *Lupus* **21**, 586-595, doi:10.1177/0961203311434938 (2012).
- 873 Nagai, K. *et al.* Structure and assembly of the spliceosomal snRNPs. Novartis Medal Lecture. *Biochem Soc Trans* **29**, 15-26, doi:10.1042/0300-5127:0290015 (2001).
- 874 Wahl, M. C., Will, C. L. & Luhrmann, R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* **136**, 701-718, doi:10.1016/j.cell.2009.02.009 (2009).
- 875 Reichlin, M. & Koren, E. US5681700A - Assay for pathogenicity of anti-DNA antibodies. (1994).
- 876 Reichlin, M. *et al.* Lupus autoantibodies to native DNA cross-react with the A and D SnRNP polypeptides. *J Clin Invest* **93**, 443-449, doi:10.1172/JCI116980 (1994).

- 877 Dima, A., Jurcut, C. & Baicus, C. The impact of anti-U1-RNP positivity: systemic lupus erythematosus versus mixed connective tissue disease. *Rheumatol Int* **38**, 1169-1178, doi:10.1007/s00296-018-4059-4 (2018).
- 878 Migliorini, P., Baldini, C., Rocchi, V. & Bombardieri, S. Anti-Sm and anti-RNP antibodies. *Autoimmunity* **38**, 47-54, doi:10.1080/08916930400022715 (2005).
- 879 Erkan, D., Sciascia, S., Bertolaccini, M. L., Cohen, H. & Committee, A. A. E. Antiphospholipid Syndrome Alliance for Clinical Trials and International Networking (APS ACTION): 10-Year Update. *Curr Rheumatol Rep* **23**, 45, doi:10.1007/s11926-021-01008-8 (2021).
- 880 Cervera, R. *et al.* Task Force on Catastrophic Antiphospholipid Syndrome (APS) and Non-criteria APS Manifestations (I): catastrophic APS, APS nephropathy and heart valve lesions. *Lupus* **20**, 165-173, doi:10.1177/0961203310395051 (2011).
- 881 Frohnert, B. I. & Bernlohr, D. A. Protein carbonylation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance. *Adv Nutr* **4**, 157-163, doi:10.3945/an.112.003319 (2013).
- 882 Chen, Y., Liu, Y. & W Dorn, G., 2nd. Mitochondrial fusion is essential for organelle function and cardiac homeostasis. *Circ Res* **109**, 1327-1331 (2011).
- 883 Park, Y. Y. & Cho, H. Mitofusin 1 is degraded at G2/M phase through ubiquitylation by MARCH5. *Cell Div* **7**, 1-6 (2012).
- 884 Zhang, M. *et al.* Mitofusin 1 is required for female fertility and to maintain ovarian follicular reserve. *Cell Death Dis* **10**, 1-15 (2019).
- 885 Deng, S. X., Hanson, E. & Sanz, I. In vivo cell penetration and intracellular transport of anti-Sm and anti-La autoantibodies. *Int Immunol* **12**, 415-423, doi:10.1093/intimm/12.4.415 (2000).
- 886 Maier-Moore, J. S. *et al.* Passive transfer of antibodies to the linear epitope 60kD Ro 273-289 induces features of Sjögren's syndrome in naive mice. *Clin Exp Immunol* **180**, 19-27 (2015).
- 887 Kobayashi, N. *et al.* FcRn-mediated transcytosis of immunoglobulin G in human renal proximal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**, F358-365, doi:10.1152/ajprenal.0164.2001 (2002).
- 888 Ruano-Salguero, J. S. & Lee, K. H. Antibody transcytosis across brain endothelial-like cells occurs nonspecifically and independent of FcRn. *Sci Rep* **10**, 3685, doi:10.1038/s41598-020-60438-z (2020).
- 889 van den Berg, R. H. *et al.* Anti-C1q receptor/calreticulin autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol* **111**, 359-364, doi:10.1046/j.1365-2249.1998.00473.x (1998).
- 890 Xu, J. *et al.* Globular C1q Receptor (gC1qR/p32/HABP1) Suppresses the Tumor-Inhibiting Role of C1q and Promotes Tumor Proliferation in 1q21-Amplified Multiple Myeloma. *Front Immunol* **11**, 1292, doi:10.3389/fimmu.2020.01292 (2020).
- 891 Peerschke, E. I. & Ghebrehiwet, B. cC1qR/CR and gC1qR/p33: observations in cancer. *Mol Immunol* **61**, 100-109, doi:10.1016/j.molimm.2014.06.011 (2014).
- 892 Mahdi, F., Madar, Z. S., Figueroa, C. D. & Schmaier, A. H. Factor XII interacts with the multiprotein assembly of urokinase plasminogen activator receptor, gC1qR, and cytokeratin 1 on endothelial cell membranes. *Blood* **99**, 3585-3596, doi:10.1182/blood.v99.10.3585 (2002).



- 893 Kaira, B. G. *et al.* Factor XII and kininogen asymmetric assembly with gC1qR/C1QBP/P32 is governed by allostery. *Blood* **136**, 1685-1697, doi:10.1182/blood.2020004818 (2020).
- 894 Sansonno, D. *et al.* Role of the receptor for the globular domain of C1q protein in the pathogenesis of hepatitis C virus-related cryoglobulin vascular damage. *J Immunol* **183**, 6013-6020, doi:10.4049/jimmunol.0902038 (2009).
- 895 Hosszu, K. K., Valentino, A., Peerschke, E. I. & Ghebrehiwet, B. SLE: Novel Postulates for Therapeutic Options. *Front Immunol* **11**, 583853, doi:10.3389/fimmu.2020.583853 (2020).
- 896 Awadalla, P. *et al.* Cohort profile of the CARTaGENE study: Quebec's population-based biobank for public health and personalized genomics. *Int J Epidemiol* **42**, 1285-1299, doi:10.1093/ije/dys160 (2013).
- 897 Zhao, N. *et al.* Sunlight Exposure, Sun-Protective Behavior, and Anti-Citrullinated Protein Antibody Positivity: A General Population-Based Study in Quebec, Canada. *Arthritis Care Res (Hoboken)* **74**, 236-242, doi:10.1002/acr.24448 (2022).
- 898 Moteki, S. *et al.* Epitope mapping and reactivity of autoantibodies to the E2 component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis using recombinant 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Hepatology* **23**, 436-444, doi:10.1002/hep.510230307 (1996).

## **Annexe : Identification par spectrométrie de masse des antigènes mitochondriaux reconnus par les AMA dans le SLE.**

**Note de l'étudiant :** l'annexe relative à l'identification des protéines mitochondriales reconnues par les anticorps anti-mitochondriaux dans le lupus érythémateux disséminé est présentée dans un fichier distinct (i.e., Annexe pour Chapitre 4) afin de leur permettre une lecture plus confortable de ces données de recherche pour le lecteur.