



# **Étude de l'expression de FcyRIIA aux reins dans le lupus érythémateux disséminé**

**Mémoire**

**Sara Michel**

**Maîtrise en microbiologie-immunologie - avec mémoire**  
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

# **Étude de l'expression de Fc $\gamma$ RIIA aux reins dans le lupus érythémateux disséminé**

**Mémoire**

**Sara Michel**

Sous la direction de :

Éric Boilard, directeur de recherche

## Résumé

La néphrite lupique est le prédicteur le plus important de mortalité dans le lupus érythémateux disséminé. Elle se caractérise par le dépôt d'auto-anticorps, essentiellement des immunoglobulines G, aux reins et à la formation de complexes immuns. Les plaquettes humaines sont activées par les complexes immuns dans le lupus via Fc $\gamma$ RIIA, leur unique récepteur ciblant la portion Fc des immunoglobulines G (Fc $\gamma$ R). Considérant l'abondance des plaquettes, Fc $\gamma$ RIIA est le Fc $\gamma$ R le plus important du sang. L'ajout de Fc $\gamma$ RIIA dans le modèle murin NZB/WF1 de lupus accélère le développement de la néphrite lupique. Les neutrophiles contribuent aux dommages rénaux dans la maladie. Une interaction efficace avec les plaquettes est requise en contexte inflammatoire pour permettre leur extravasation. Notre hypothèse est qu'en réponse aux complexes immuns, Fc $\gamma$ RIIA accélère le recrutement des plaquettes et des neutrophiles aux reins dans la néphrite lupique. Pour vérifier notre hypothèse, les deux types cellulaires ont été marqués en immunofluorescence et dénombrés aux reins de souris NZB/WF1.Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> et sauvages aux différents stades de néphrite lupique. Fc $\gamma$ RIIA augmente le recrutement des plaquettes, mais pas celui des neutrophiles, aux reins dans la maladie. Le recrutement des plaquettes concorde avec le développement de la néphrite lupique uniquement pour les souris Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup>. Aucune corrélation entre le recrutement des plaquettes et des neutrophiles aux reins n'a pu être établie. Bien qu'ils expriment le récepteur dans le sang, ces deux cellules expriment faiblement Fc $\gamma$ RIIA aux reins. Fc $\gamma$ RIIA est exprimé par des cellules AIF-1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> aux reins pointant vers un rôle potentiel des phagocytes mononucléaires dans la pathogenèse de la néphrite lupique. En somme, ce travail a permis de faire la caractérisation spatiotemporelle de Fc $\gamma$ RIIA aux reins dans le modèle NZB/WF1 de lupus. Des études supplémentaires seront nécessaires pour comprendre la contribution des cellules Fc $\gamma$ RIIA<sup>+</sup> résidentes et infiltrant le rein dans la pathogenèse de la néphrite lupique.

## Abstract

Lupus nephritis is the most important predictor of mortality in systemic lupus erythematosus. It is characterized by the deposition of autoantibodies, essentially immunoglobulins G, to the kidneys and the formation of immune complexes. Human platelets are activated by immune complexes in lupus through Fc $\gamma$ R1IA, their unique receptor targeting the Fc portion of immunoglobulins G (Fc $\gamma$ R). Given the abundance of platelets, Fc $\gamma$ R1IA is the most important Fc $\gamma$ R in blood. The addition of Fc $\gamma$ R1IA in the NZB/WF1 lupus mouse model accelerates the development of lupus nephritis. Neutrophils contribute to kidney damage in the disease. An efficient interaction with platelets is required to allow their extravasation in inflammatory contexts. We hypothesized that in response to immune complexes, Fc $\gamma$ R1IA accelerates the recruitment of platelets and neutrophils to kidneys in lupus nephritis. To verify our hypothesis, the two cell types were identified in immunofluorescence and counted in the kidneys of NZB/WF1.Fc $\gamma$ R1IA<sup>TGN</sup> and wild type mice at different stages of lupus nephritis. Fc $\gamma$ R1IA increases the recruitment of platelets, but not neutrophils, to the kidneys in the disease. Platelet recruitment is consistent with the development of lupus nephritis only for Fc $\gamma$ R1IA<sup>TGN</sup> mice. No correlation between the recruitment of platelets and neutrophils to the kidneys could be established. Although they express the receptor in the blood, these two cells weakly express Fc $\gamma$ R1IA in the kidneys. Fc $\gamma$ R1IA is expressed by AIF-1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> cells in the kidneys pointing to a potential role of mononuclear phagocytes in the pathogenesis of lupus nephritis. Overall, this work has allowed to achieve the spatiotemporal characterization of Fc $\gamma$ R1IA in the kidneys in the NZB/WF1 lupus model. Further studies will be needed to understand the contribution of renal resident and infiltrating Fc $\gamma$ R1IA<sup>+</sup> cells in the pathogenesis of lupus nephritis.

# Table des matières

Résumé .....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières .....	iv
Liste des figures, tableaux, illustrations .....	x
Liste des abréviations, sigles, acronymes .....	xii
Remerciements.....	xvi
Introduction .....	1
1 Le système immunitaire .....	1
1.1 Les barrières physiques et chimiques du corps .....	1
1.2 L'immunité innée .....	2
1.2.1 Les cellules de l'immunité innée .....	2
1.2.2 Détection des signaux de danger et des agents pathogènes.....	2
1.2.2.1 Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires.....	2
1.2.2.2 Système du complément.....	3
1.2.3 Réponses induites par l'engagement des PRR et des récepteurs du complément.....	3
1.2.3.1 Phagocytose.....	3
1.2.3.1.1 Initiation de la phagocytose .....	4
1.2.3.1.2 Formation du phagolysosome .....	4
1.2.3.1 Activation de la réponse immunitaire adaptative.....	4
1.2.3.1.1 Complexe majeur d'histocompatibilité .....	4
1.2.3.1.2 Apprêtement des antigènes.....	5
1.2.3.1.3 Présentation d'antigènes .....	5
1.2.3.2 Initiation de la réponse inflammatoire.....	5
1.2.3.2.1 Activation des cellules résidentes.....	6
1.2.3.2.2 Recrutement de cellules immunitaires au site inflammatoire .....	6
1.2.3.2.3 Mécanismes pour contenir et éliminer l'infection.....	6
1.2.3.2.4 Résolution de l'inflammation.....	7
1.3 L'immunité adaptative .....	7
1.3.1 Ontogénie des lymphocytes .....	8
1.3.1.1 Développement des récepteurs des lymphocytes.....	8
1.3.1.1.1 TCR .....	8
1.3.1.1.2 BCR.....	9
1.3.2 Activation des lymphocytes T .....	9
1.3.2.1 Lymphocytes T auxiliaires.....	10
1.3.2.2 Les lymphocytes T cytotoxiques .....	10

1.3.3	Activation des lymphocytes B .....	11
1.3.3.1	Les différentes classes d'anticorps .....	12
1.3.3.1.1	IgM.....	12
1.3.3.1.1	IgA .....	13
1.3.3.1.2	IgG.....	13
1.3.3.1	Commutation isotypique.....	13
1.3.3.2	Hypermutation somatique .....	13
1.3.4	Tolérance immunitaire .....	14
1.3.4.1	Tolérance immunitaire centrale .....	14
1.3.4.1.1	Régulation de la tolérance immunitaire dans le thymus .....	14
1.3.4.1.2	Régulation de la tolérance immunitaire dans la moelle osseuse.....	15
1.3.4.2	Tolérance immunitaire périphérique.....	15
1.3.4.3	Rupture de la tolérance immunitaire .....	15
2	Le lupus érythémateux disséminé .....	16
2.1	Prévalence et incidence .....	17
2.2	Étiologie.....	17
2.2.1	Prédispositions génétiques.....	17
2.2.1.1	Allèles de susceptibilité .....	18
2.2.1.1	Inactivation du chromosome X.....	18
2.2.2	Influences hormonales.....	18
2.2.3	Facteurs environnementaux .....	19
2.2.3.1	Rayonnement ultraviolet.....	19
2.2.3.2	Infections .....	19
2.2.3.3	Médicaments .....	20
2.2.3.4	Polluants et produits chimiques.....	20
2.3	Pathogenèse .....	21
2.3.1	Perte de tolérance immunitaire.....	21
2.3.1.1	Présence de lymphocytes T et B autoréactifs en périphérie .....	22
2.3.2	La présence d'antigènes du soi dans le milieu extracellulaire .....	23
2.3.2.1	Défauts dans les mécanismes de mort cellulaire .....	23
2.3.2.2	Défauts dans les mécanismes de clairance des auto-antigènes .....	24
2.3.3	Activation des cellules T et B autoréactives.....	25
2.3.3.1	Rôle des DC dans l'activation des lymphocytes T autoréactifs.....	26
2.3.3.1.1	Modifications post-traductionnelles des auto-antigènes.....	26
2.3.3.1.2	Les IFN de type I .....	26
2.3.3.1.3	Présentation immunogénique des antigènes du soi.....	26
2.3.3.2	Activation des lymphocytes T autoréactifs .....	27
2.3.3.3	Activation des lymphocytes B autoréactifs.....	27
2.3.4	Les auto-anticorps .....	28

2.4	Diagnostic.....	28
2.4.1	Symptômes.....	29
2.4.2	Critères de classification.....	29
2.5	Traitements.....	29
2.5.1	Anti-inflammatoires non-stéroïdiens.....	30
2.5.2	Anti-malariens.....	31
2.5.3	Glucocorticoïdes.....	31
2.5.4	Thérapies biologiques.....	31
2.5.5	Autres agents immunosuppresseurs.....	31
2.6	Évolution de la maladie.....	32
3	La néphrite lupique.....	32
3.1	Facteurs de risques.....	33
3.1.1	Prédispositions génétiques.....	33
3.2	Les reins.....	34
3.2.1	Anatomie des reins.....	34
3.2.1.1	Anatomie vasculaire.....	34
3.2.2	Le néphron.....	35
3.2.2.1	Filtration.....	36
3.2.2.2	Réabsorption et sécrétion.....	37
3.2.2.3	Autres fonctions rénales.....	38
3.3	Pathogenèse de la néphrite lupique.....	38
3.3.1	Les CI aux reins dans la néphrite lupique.....	38
3.3.1.1	Les auto-anticorps associés aux atteintes rénales.....	39
3.3.1.2	Mécanismes de déposition des auto-anticorps.....	39
3.3.1.3	Site de déposition des auto-anticorps.....	40
3.3.1	Inflammation et dommages tissulaires médiés par les CI.....	41
3.3.1.1	Mécanismes de clairance des CI.....	41
3.3.1.1.1	Clairance des CI par le système du complément.....	41
3.3.1.1.2	Clairance des CI par les FcγR.....	42
3.3.1.1.3	Déficiences dans les mécanismes de clairance des CI.....	43
3.3.1.2	Recrutement de cellules immunitaires.....	43
3.3.1.3	Activation cellulaire.....	44
3.3.1.3.1	Les cellules endothéliales.....	45
3.3.1.3.2	Les podocytes.....	45
3.3.1.3.3	Cellules mésangiales.....	46
3.3.1.3.4	Cellules épithéliales tubulaires.....	46
3.3.1.3.5	Système phagocytaire mononucléaire rénal.....	47
3.3.1.3.5.1	DC.....	47
3.3.1.3.5.2	Macrophages.....	48
3.3.1.3.6	Neutrophiles.....	48
3.3.1.3.7	Les NK.....	49

3.3.1.3.8	Lymphocytes T .....	49
3.3.1.3.9	Lymphocytes B .....	50
3.3.1.3.10	Myofibroblastes .....	50
3.4	Diagnostic .....	50
3.4.1	Test diagnostic .....	51
3.4.2	Classes de néphrite lupique .....	51
3.4.2.1	Classe I : Néphrite lupique mésangiale minimale .....	52
3.4.2.2	Classe II : Néphrite lupique mésangiale proliférative .....	52
3.4.2.3	Classe III : Néphrite lupique focale (proliférative et/ou sclérosante) .....	52
3.4.2.4	Classe IV : Néphrite lupique diffuse (segmentaire ou globale) .....	52
3.4.2.5	Classe V : Néphrite lupique membraneuse .....	52
3.4.2.6	Classe VI : Néphrite lupique sclérosante avancée .....	52
3.4.3	Lésions vasculaires et tubulointerstitielles .....	52
3.4.4	Limites dans le diagnostic de la néphrite lupique .....	53
3.5	Traitements .....	53
3.6	Évolution de la maladie .....	54
4	Les plaquettes .....	55
4.1	Origine des plaquettes .....	55
4.2	Contenu des plaquettes .....	55
4.2.1	Vésicules sécrétoires .....	56
4.2.2	Transcriptome et traduction .....	56
4.2.3	Protéasome .....	56
4.2.4	Mitochondries .....	56
4.2.5	Cytosquelette .....	57
4.3	Rôle dans l'hémostase .....	57
4.4	Rôle dans l'inflammation et l'immunité .....	58
4.4.1	Recrutement de cellules immunitaires au site inflammatoire .....	58
4.4.2	Amplification de l'inflammation .....	59
4.4.3	Régulation de l'immunité adaptative .....	60
4.5	Les plaquettes dans la néphrite lupique .....	60
5	Le modèle murin NZB/WF1.Fc $\gamma$ RIIAT <sup>GN</sup> de LED .....	62
5.1	Ajout du transgène humain codant pour Fc $\gamma$ RIIA dans le modèle murin NZB/WF1 de LED .....	63
6	Problématique, hypothèse de recherche et objectifs expérimentaux .....	64
6.1	Problématique .....	64
6.2	Hypothèse de recherche .....	64
6.3	Objectifs expérimentaux .....	65
6.3.1	Étudier la présence de plaquettes et de neutrophiles aux reins aux différents stades du développement de la néphrite lupique .....	65
6.3.2	Localiser les plaquettes et les neutrophiles dans les différentes zones anatomiques rénales pendant la maladie .....	65

6.3.3	Étudier la relation entre le recrutement des plaquettes et des neutrophiles aux reins dans la néphrite lupique .....	65
6.3.4	Vérifier la contribution de Fc $\gamma$ RIIA dans le recrutement des plaquettes et des neutrophiles aux reins .....	65
6.3.5	Caractériser l'expression spatiotemporelle de Fc $\gamma$ RIIA aux reins pendant le développement de la néphrite lupique .....	65
Chapitre 1 : Méthodes .....		66
1	Modèle murin NZB/WF1.Fc $\gamma$ RIIA <sup>TGN</sup> .....	66
1.1	Génération du modèle murin NZB/WF1.Fc $\gamma$ RIIA <sup>TGN</sup> de néphrite lupique .....	66
1.2	Points limites .....	66
1.3	Mesure de l'albuminurie .....	66
1.4	Critères de sélection pour les groupes d'âges .....	66
2	Marquages par immunofluorescence .....	67
2.1	Perfusion transcardiaque .....	67
2.2	Congélation et coupe des reins .....	68
2.3	Décomptes des plaquettes et des neutrophiles aux reins .....	68
2.3.1	Marquage CD41, Ly6G et Fc $\gamma$ RIIA .....	68
2.3.2	Décomptes des plaquettes et des neutrophiles aux reins .....	69
2.4	Marquage des capillaires et des plaquettes aux reins .....	71
2.4.1	Marquage de l'endomucine et de CD42b .....	71
2.5	Caractérisation des cellules exprimant Fc $\gamma$ RIIA aux reins .....	71
2.5.1	Marquage Fc $\gamma$ RIIA, AIF-1 et F4/80 .....	71
3	Dosage immuno-enzymatique des Ig .....	72
3.1	Perfusion transcardiaque .....	72
3.2	Préparation de lysat cellulaire rénal .....	72
3.3	Dosage des protéines .....	72
3.4	Dosage des principales classes d'Ig dans les lysats de reins .....	73
Chapitre 2 : Résultats .....		74
1	Le recrutement des plaquettes aux reins dans la néphrite lupique .....	74
1.1	Les plaquettes sont présentes aux reins en conditions normales et sont majoritairement localisées aux glomérules .....	74
1.2	Les plaquettes sont recrutées aux glomérules pendant le développement de la néphrite lupique .....	74
1.3	Les plaquettes sont présentes dans les compartiments vasculaire et extravasculaire dans les glomérules .....	74
2	Le recrutement des neutrophiles aux reins dans la néphrite lupique .....	76
2.1	Les neutrophiles sont présents en conditions normales aux reins et sont majoritairement localisés aux glomérules .....	77
2.2	La densité neutrophilaire augmente aux glomérules avec le développement de la néphrite lupique sévère .....	77
3	Corrélation entre le recrutement des plaquettes et des neutrophiles aux reins .....	77

4	Contribution de Fc $\gamma$ RIIA dans le recrutement des plaquettes et des neutrophiles aux reins dans la néphrite lupique .....	80
4.1	Les plaquettes et les neutrophiles s'accumulent aux reins dans la néphrite lupique seulement lorsque Fc $\gamma$ RIIA est exprimé .....	80
4.2	Les plaquettes sont davantage recrutées aux reins lors de la néphrite lupique lorsqu'elles expriment Fc $\gamma$ RIIA.....	80
5	Dosage des auto-anticorps aux reins .....	82
5.1	Les IgM, IgA et IgG s'accumulent aux reins pendant la néphrite lupique .....	82
5.2	Les IgG se déposent plus hâtivement et les IgM en moins grand nombre aux reins des souris Fc $\gamma$ RIIA <sup>TGN</sup> que sauvages .....	82
6	Caractérisation de l'expression de Fc $\gamma$ RIIA aux reins pendant la néphrite lupique .....	82
6.1	Les plaquettes et les neutrophiles ne sont pas responsables de l'expression majoritaire de Fc $\gamma$ RIIA aux reins .....	82
6.2	Fc $\gamma$ RIIA est majoritairement localisé dans le cortex et le FIME aux reins dans la néphrite lupique....	83
6.3	Fc $\gamma$ RIIA est majoritairement exprimé aux reins par une cellule AIF-1 <sup>+</sup> F4/80 <sup>+</sup> .....	86
	Chapitre 3 : Discussion.....	88
	Conclusion .....	96
	Bibliographie .....	97

# Liste des figures, tableaux, illustrations

## Introduction

**Figure 1.1** Critères de classification du LED établis par l'EULAR/ACR en 2019.

**Figure 1.2** Représentation transversale des structures anatomiques rénales.

**Figure 1.3** Représentation de l'anatomie vasculaire du rein.

**Figure 1.4** Structure d'un néphron.

**Figure 1.5** Structure des glomérules rénaux.

**Figure 1.6** Patron d'expression des Fc $\gamma$ R humains.

**Figure 1.7** Principales interactions entre les plaquettes et les neutrophiles en contexte inflammatoire.

## Méthodes

**Figure 2.1** Les différents moment-clés dans le développement de la néphrite lupique dans le modèle NZB/WF1.

**Figure 2.2** Délimitation des zones rénales pour le décompte des plaquettes et des neutrophiles aux reins.

## Résultats

**Figure 3.1** Les plaquettes sont présentes aux reins en conditions normales et sont recrutées aux glomérules pendant le développement de la néphrite lupique.

**Figure 3.2** Des plaquettes sont présentes dans les compartiments vasculaire et extravasculaire aux glomérules pendant le développement de la néphrite lupique.

**Figure 3.3** La densité neutrophilaire augmente aux glomérules avec le développement de la néphrite lupique sévère.

**Figure 3.4** Corrélation entre le recrutement des plaquettes et des neutrophiles aux glomérules pendant la néphrite lupique.

**Figure 3.5** L'expression de Fc $\gamma$ RIIA augmente le recrutement des plaquettes aux reins pendant la néphrite lupique.

**Figure 3.6** Les IgG se déposent plus hâtivement et les IgM en moins grand nombre aux reins de souris lupiques transgéniques que sauvages.

**Figure 3.7** Les plaquettes et les neutrophiles ne sont pas responsables de l'expression majoritaire de Fc $\gamma$ RIIA aux reins.

**Figure 3.8** Fc $\gamma$ RIIA est essentiellement localisé dans le cortex et le FIME pendant la néphrite lupique.

**Figure 3.9** Les cellules exprimant Fc $\gamma$ RIIA aux reins sont positives pour AIF-1 et F4/80.

# Liste des abréviations, sigles, acronymes

ACR : *American College of Rheumatology*

ADCC : Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps

ADNmt : ADN mitochondrial

AICD : Mort cellulaire induite par l'activation

AIF-1 : Facteur inflammatoire d'allogreffe 1

AINS : Anti-inflammatoire non-stéroïdien

AIRE : Gène régulateur de l'auto-immunité

ALR : Récepteur de type AIM2

ANA : Anticorps anti-nucléaire

BAFF : Facteur d'activation des lymphocytes B

BCA : Acide bicinchoninique

BCR : Récepteur des lymphocytes B

BSA : Albumine de sérum bovin

CD40L : CD40 ligand

CD41 : Glycoprotéine IIb

CD42b : Glycoprotéine Ib $\alpha$

CG : Centre germinatif

cGAS : Guanosine monophosphate-adénosine monophosphate cyclique synthase

CI : Complexe immun

CLEC-2 : Récepteur de type lectine de type C 2

CLR : Récepteur lectine de type C

CMH : Complexe majeure d'histocompatibilité

CMH I : Complexe majeure d'histocompatibilité de classe I

CMH II : Complexe majeure d'histocompatibilité de classe II

CMH III : Complexe majeure d'histocompatibilité de classe III

CPA : Cellule présentatrice d'antigènes

CSH : Cellule souche hématopoïétique

DAMP : Motif moléculaire associé aux dommages

DC : Cellule dendritique

ELISA : Dosage immuno-enzymatique

ERO : Espèce réactive de l'oxygène

EULAR : *European League Against Rheumatism*

Fab : Fragment variable des immunoglobulines

Fc : Fragment constant des immunoglobulines

FcR : Récepteur ciblant la portion Fc des immunoglobulines

Fc $\gamma$ R : Récepteur ciblant la portion Fc des immunoglobulines G

Fc $\gamma$ RIIA : Récepteur ciblant la portion Fc des immunoglobulines G IIA

Fc $\gamma$ RIIB : Récepteur inhibiteur ciblant la portion Fc des immunoglobulines G IIB

FEME : Feuillet externe de la médulla externe

FIME : Feuillet interne de la médulla externe

GBM : Membrane basale glomérulaire

HLA : Antigène des leucocytes humains

HMGB1 : *High mobility group box 1*

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IgA : Immunoglobuline de type A

IgD : Immunoglobuline de type D

IgE : Immunoglobuline de type E

IgG : Immunoglobuline de type G

IgM : Immunoglobuline de type M

ITAM : Motif d'activation à base de tyrosine

ITIM : Motif d'inhibition à base de tyrosine

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  : Dihydrogénophosphate de potassium

LED : Lupus érythémateux disséminé

Ly6G : *Lymphocyte antigen 6 complex, locus G*

mDC : Cellule dendritique myéloïde

ME : Médulla externe

MI : Médulla interne

MBL : Lectine liant le mannose

NaCl : Chlorure de sodium

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  : Hydrogénophosphate de sodium

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  : Dihydrogénophosphate de sodium

$\text{Na}_2\text{PO}_4$  : Phosphate disodique

NK : Cellule tueuse naturelle

NKT : Cellule tueuse naturelle T

NLR : Récepteur de type NOD

NZB : *New Zealand Black*

NZW : *New Zealand White*

PAF : Facteur d'activation plaquettaire

PAMP: Motif moléculaire associé aux pathogènes

PBS : Tampon phosphate salin

pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde

PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes

PF4 : Facteur plaquettaire 4

PFA : Paraformaldéhyde

PRR : Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires

PSGL-1 : Ligand de la sélectine P

RIG-1 : Gène 1 inductible par l'acide rétinoïque

RLR : Récepteur de type RIG-1

SD : Déviation standard

SDF-1 $\alpha$  : Facteur 1 $\alpha$  dérivé des cellules stromales

SDS : Dodécylsulfate de sodium

SLICC : *Systemic Lupus International Collaborating Clinics*

sPLA2-IIA : Phospholipase A2 de groupe IIA sécrétée

STING : Stimulateur de gènes d'interférons

NDS : Sérum normalisé d'âne

TCR : Récepteur des lymphocytes T (*T cell receptor*)

Tfh : Lymphocyte T auxiliaire folliculaire

TGF- $\beta$  : Facteur de croissance transformant  $\beta$

TLR : Récepteur de type *Toll* (*Toll-like receptor*)

TNF $\alpha$  : Facteur de nécrose tumoral alpha

Treg : Lymphocyte T régulateur

Tris : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

UV : Rayonnement ultraviolet

vWF : Facteur von Willebrand

# Remerciements

Je souhaite remercier dans un premier temps mon directeur de recherche, le Dr Éric Boilard. Merci de m'avoir fait une place dans ton équipe et pour toute la confiance que tu m'as portée dès le début de mon parcours à la maîtrise. Merci pour ta disponibilité et toutes les discussions pertinentes que nous avons eues sur mon projet et qui m'ont portées à réflexion. Tout particulièrement, merci pour ta bienveillance et de m'avoir permis de concilier mes études et ma vie familiale.

Je remercie les Dre Sylvie Breton et Dre Mélanie Dieudé d'avoir accepté de réviser mon travail et d'avoir pris de votre temps pour en faire la lecture rigoureuse. Merci d'avoir mis à profit votre expertise sur les reins, l'inflammation et le lupus érythémateux disséminé et pour tous vos commentaires qui ont permis d'améliorer ce travail.

Je tiens à faire une mention spéciale à la Dre Imène Melki qui a développé, mis au point et étudié le modèle murin NZB/WF1.FcγRIIA<sup>TGN</sup> pendant son doctorat. Sans ses travaux, mon projet n'aurait jamais pu voir le jour. Merci de m'avoir partagé tes connaissances et de m'avoir aidé dans la mise en place de mon projet. Je remercie la Dre Isabelle Allaëys qui m'a également beaucoup aidé à définir mon projet de maîtrise. Merci de m'avoir partagé ton expertise sur les diverses techniques expérimentales que j'ai touché pendant ma formation, pour tous tes conseils qui ont grandement orientés mes travaux et pour l'aide dans le prélèvement des reins qui ont été utilisés dans ce projet.

Je souhaite également remercier le Dr Paul R Fortin d'avoir participé activement à mon projet de maîtrise dans le cadre de nos rencontres d'équipe et pour tous les précieux conseils qui ont permis d'assurer la significativité clinique de mon projet. Merci à la Dre Emmanuelle Rollet-Labelle pour toute l'aide apportée dans les processus de demandes de bourses et ses encouragements tout au long de mon parcours.

Je remercie également Tania Lévesque pour m'avoir transmis ses méthodes de travail et ses connaissances en laboratoire. Merci Tania pour ta générosité dans l'aide que tu m'as apporté entre autres avec l'ensemble des expériences avec les souris. Mais surtout, tu es beaucoup plus qu'une collègue et tu as été d'un soutien sans égal pendant ma maîtrise. Merci pour ta présence, ta sagesse et ton amitié. Un merci tout spécial à Audrée qui a également été si généreuse de son temps. Je te remercie pour toute l'aide à l'animalerie et de m'avoir introduit notamment aux techniques d'immunofluorescence, de congélation et de coupe de tissus. Merci pour tes encouragements et je suis heureuse que nous ayons pu partager ensemble nos réussites et (malheureusement) nos infortunes dans les expériences d'immunofluorescence. Merci à Etienne qui a répondu à mes innombrables questions avec toute la patience du monde et pour tes encouragements dans les moments plus difficiles en fin de parcours. Merci à Julie pour ta bonne humeur et de m'avoir donné un bon coup de main pour le marquage en immunofluorescence, à Marie pour ton écoute et

pour toutes les discussions que nous avons eu sur nos projets respectifs et à Yann pour son partage de connaissances sur les ELISA et les statistiques. Je tiens aussi à remercier Myriam et Florian d'avoir contribué à la réussite de mon projet dans le cadre de nos rencontres d'équipe.

Je souhaite remercier tous les membres actuels et les anciens membres du laboratoire, les stagiaires que j'ai côtoyés et les collègues des autres équipes sur l'étage avec qui j'ai partagé de bons moments. Vous avez tous marqués à votre façon mon parcours et contribué à le rendre encore plus agréable. Je tiens également à remercier Abdherahim qui a été un mentor dans mes premiers pas en recherche et de qui j'ai énormément appris. Je souhaite remercier les plateformes d'analyse d'images à haut débit et de bio-imagerie du Centre de recherche du CHU de Québec – Université Laval pour le service de microscopie offert et plus spécifiquement les responsables de ces plateformes, respectivement Marc Bazin et Julie-Christine Lévesque.

Je ne peux pas terminer mes remerciements sans avoir un mot pour toutes ces personnes dans mon entourage qui ont contribué à la réalisation de ce projet. Je tiens à remercier toute ma famille, plus particulièrement mes parents, ma sœur, mes grands-parents, mon oncle Steven et ma tante Émilie pour toute la confiance que vous avez en moi et toute la fierté que vous m'avez transmis pendant mon parcours. Merci à ma belle-famille pour vos encouragements et de vous être si bien occupée d'Ethan pendant la période de rédaction de ce mémoire. Merci à toutes mes amies d'avoir été à mes côtés pendant mon parcours à la maîtrise et de m'avoir permis de garder l'équilibre. Mais surtout, merci à mes parents de croire si fort en moi et de m'avoir toujours encouragée dans tout ce que j'entreprends. Merci maman de porter un aussi grand intérêt à tous mes projets, pour ton aide, ton soutien et ton amour inconditionnel. Je tiens aussi à remercier Etienne de partager ma vie et de m'avoir soutenue dans mon cheminement, pas toujours simple, à la maîtrise. Merci de m'avoir écouté parler pendant des heures du laboratoire et de FcγRIIA. Merci pour tous tes encouragements, la fierté que tu me portes et d'avoir pris soin d'Ethan plus souvent qu'à ton tour pendant la rédaction de mon mémoire. Finalement, merci à mon fils d'amour qui, sans même le savoir, a énormément contribué à ma réussite. Par ta simple présence, tu as été une source de bonheur et de motivation inépuisable.

# Introduction

## 1 Le système immunitaire

Chaque jour, nous sommes exposés à des milliers, voire des millions, de micro-organismes potentiellement pathogènes<sup>1</sup>. Tous les organismes vivants, vertébrés ou invertébrés, sont munis d'un système immunitaire plus ou moins complexe qui orchestrent des mécanismes de défense en cas d'invasion d'agents pathogènes<sup>2</sup>. Ce sont des réponses qui sont hautement conservées dans l'évolution, soulignant le rôle crucial du système immunitaire dans la survie de l'hôte<sup>1</sup>. Les fonctions du système immunitaire sont de détecter la présence d'agents pathogènes et de répondre à cette invasion de manière à contenir et éliminer l'infection, mais également de limiter les dommages à l'hôte<sup>1,3</sup>. Chez la plupart des vertébrés, le système immunitaire possède une mémoire immunologique permettant une réponse rapide, précise et efficace contre une infection subséquente du même agent pathogène<sup>3</sup>. De plus, le système immunitaire prévient la formation de tumeurs en assurant la mise en place d'une réponse anti-tumorale<sup>4</sup>. En plus de son rôle dans la défense de l'hôte, celui-ci joue également un rôle clé dans différents processus physiologiques tels que le développement et la reproduction<sup>5</sup>. Il assure également le maintien de l'homéostasie des tissus et des systèmes du corps comme les systèmes cardiovasculaire et nerveux. Le système immunitaire se divise en deux branches en fonction de la vitesse d'activation et de la spécificité à l'antigène de la réponse immune le système immunitaire inné et adaptatif<sup>1</sup>. Bien qu'elles soient catégorisées en deux types de réponses distincts, il y a de multiples interactions entre les réponses innées et adaptatives et les deux travaillent de pair afin d'assurer la protection de l'hôte<sup>6</sup>.

### 1.1 Les barrières physiques et chimiques du corps

Les barrières physiques et chimiques du corps constituent la première ligne de défense de l'hôte afin de limiter les infections. La peau et les muqueuses des voies respiratoires, oro-pharyngiennes et uro-génitales, et du tractus gastro-intestinal constituent la première interface entre l'hôte et son environnement<sup>7-10</sup>. La desquamation naturelle et continue des cellules mortes de la couche cornée, ainsi que le pH acide, la faible composition en eau, la présence de lipides antimicrobiens et le microbiote commensal limite la prolifération de micro-organismes sur la peau<sup>7,9,10</sup>. L'épithélium stratifié et les jonctions serrées entre les cellules épithéliales de la peau limite également l'infiltration de corps étrangers<sup>7,9</sup>. Les cellules épithéliales qui forment les muqueuses sont aussi liées entre elles par des jonctions serrées qui assurent l'étanchéité de l'épithélium<sup>8,11</sup>. La salive et le mucus qui couvrent les muqueuses contiennent des peptides antimicrobiens qui empêchent la croissance des microorganismes<sup>11</sup>. Les corps étrangers sont emprisonnés dans le mucus et sont expulsés du corps par le mouvement des cils dans les voies respiratoires<sup>10,12</sup>. La majorité des agents pathogènes ingérés

est éliminée grâce au pH acide des sucs gastriques<sup>10</sup>. Tout comme la peau, les muqueuses sont colonisées par un microbiote commensal qui limite la prolifération de microorganismes nuisibles<sup>10</sup>. Mis ensembles, toutes les barrières physiques et chimiques du corps limitent significativement l'invasion d'agents pathogènes.

## **1.2 L'immunité innée**

Malgré la présence de barrières physiques et chimiques, l'hôte n'est pas à l'abri de l'invasion d'agents pathogènes. Le système immunitaire doit donc être en mesure de rapidement détecter leur présence dans l'organisme et de lutter efficacement contre cette invasion<sup>10</sup>. Le système immunitaire inné est la première ligne de défense de l'hôte en réponse à l'invasion d'agents pathogènes. Bien que les réponses mises en place dans l'immunité innée soient non-spécifiques à l'antigène, la réponse immunitaire innée est essentielle à la défense de l'hôte et permet d'orchestrer l'immunité adaptative<sup>13</sup>.

### **1.2.1 Les cellules de l'immunité innée**

L'immunité innée se compose de différentes cellules immunitaires présentes en tout temps dans le sang ou résidant dans les tissus<sup>10</sup>. Les cellules de l'immunité innée qui patrouillent la circulation sanguine sont essentiellement les neutrophiles, les monocytes, les basophiles, les éosinophiles, les cellules tueuses naturelles (NK) et les cellules tueuses naturelles T (NKT), alors que les cellules résidentes dans les tissus sont les mastocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (DC). Les cellules de l'immunité innée sont des cellules dérivées des cellules souches hématopoïétiques (CSH) de lignée myéloïde, à l'exception des cellules NK qui sont de la lignée lymphoïde<sup>3</sup>. Les DC peuvent quant à eux être dérivées de cellules progénitrices myéloïdes ou lymphoïdes<sup>14</sup>. D'autres acteurs sont aussi impliqués dans la réponse immunitaire innée tels que les plaquettes, les érythrocytes, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales<sup>6</sup>. Ensembles, ces cellules assurent les différentes fonctions du système immunitaire inné : la détection et l'élimination des agents pathogènes, l'activation et le recrutement de cellules immunitaires au site infectieux et la mise en place de la réponse immunitaire adaptative.

### **1.2.2 Détection des signaux de danger et des agents pathogènes**

#### ***1.2.2.1 Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires***

La mise en place d'une réponse immunitaire rapide et efficace repose sur la capacité du système immunitaire inné à détecter les agents pathogènes et les dommages tissulaires<sup>10</sup>. Les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) sont exprimés à la surface des cellules de l'immunité innée. Ils reconnaissent les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) qui sont des motifs moléculaires conservés dans l'évolution et communs aux agents pathogènes. Puisque les PAMP sont absents chez l'hôte, les PRR assurent la distinction entre l'hôte et les agents pathogènes et donc leur détection. Les PRR peuvent également reconnaître les motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP)<sup>15</sup>. Les DAMP sont des

molécules endogènes intracellulaires libérées dans le milieu extracellulaire en conséquence aux dommages tissulaires dans un contexte d'infection ou d'inflammation stérile. Lorsque détectées, ces molécules normalement à l'abri du système immunitaire agissent comme des signaux de danger et permettent d'activer une réponse inflammatoire<sup>15,16</sup>. Les PRR comprennent des récepteurs cytoplasmiques tels que les récepteurs de type RIG-1 (RLR) et de type NOD (NLR), ainsi que des récepteurs membranaires et endosomaux comme les récepteurs de type Toll (TLR). Leur activation par leurs ligands respectifs mène notamment à la libération de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines menant au recrutement et à l'activation de cellules immunitaires. Leur activation peut également favoriser le processus de phagocytose par les phagocytes.

### **1.2.2.2 Système du complément**

Le système du complément est rapidement activé en cas d'infection afin de lutter contre les agents pathogènes<sup>17</sup>. Il se compose d'une multitude de protéines présentes en tout temps dans le plasma et les tissus sous une forme inactive. Il existe trois voies d'activation du système du complément: la voie classique, la voie des lectines et la voie alterne<sup>17-19</sup>. Ces voies peuvent être activées soit par interaction directe des composantes du complément avec l'agent pathogène dans le contexte de la réponse immunitaire innée ou encore par interaction indirecte avec des anticorps liés à l'agent pathogène. Une fois initiées, elles mènent à l'activation des protéines du complément via une cascade de clivages protéolytiques. Cela conduit, d'une part, à la formation du complexe d'attaque membranaire et à la lyse cellulaire des agents infectieux. D'autre part, certaines composantes du complément agissent à titre d'opsonines en couvrant les agents pathogènes et favorisent ainsi leur phagocytose. De plus, certaines composantes du complément sont des anaphylatoxines qui vont favoriser par chimiotactisme le recrutement et l'activation de différentes cellules immunitaires et ainsi mener à une réaction inflammatoire. Le système du complément favorise aussi l'élimination des corps apoptotiques et des complexes antigène-anticorps, nommés complexes immuns (CI), par les phagocytes<sup>20,21</sup>.

### **1.2.3 Réponses induites par l'engagement des PRR et des récepteurs du complément**

Différents mécanismes sont mis en place par le système immunitaire inné afin d'éliminer les corps étrangers et contenir l'infection. Tout dépendant du type cellulaire, l'activation des cellules de l'immunité innée suivant l'engagement des récepteurs du complément et des PRR induit une myriade de réponses immunes.

#### **1.2.3.1 Phagocytose**

La phagocytose est un processus d'internalisation cellulaire de particules de diamètre supérieur à  $0,5\mu\text{m}$ <sup>22</sup>. Bien que plusieurs types cellulaires possèdent des habiletés phagocytaires, les neutrophiles, les macrophages et les DC ont été décrits comme des phagocytes professionnels dus à leur grande capacité et efficacité de

phagocytose<sup>13,22</sup>. Ce processus peut impliquer la clairance d'agents pathogènes, de particules étrangères, de CI et des débris de mort cellulaire comme les corps apoptotiques<sup>13,22,23</sup>.

#### 1.2.3.1.1 Initiation de la phagocytose

Différents récepteurs phagocytaires exprimés à la surface des phagocytes professionnels permettent d'initier la phagocytose. Certains PRR comme plusieurs membres de la famille des récepteurs lectines de type C (CLR) sont capables d'initier la phagocytose, mais ce n'est pas le cas pour tous<sup>22,24</sup>. Par exemple, les TLR peuvent favoriser la phagocytose en préparant les phagocytes pour cette tâche, mais ne peuvent pas directement l'induire<sup>22</sup>. De plus, lors de la mort cellulaire programmée par apoptose, les cellules exposent à leur surface de la phosphatidylsérine et de la lysophosphatidylcholine<sup>22,25</sup>. Les phagocytes possèdent des récepteurs pour ces molécules qui, lorsque activés, induisent la phagocytose des corps apoptotiques<sup>13,22,23,25</sup>. L'opsonisation induit aussi la phagocytose<sup>22</sup>. Dans ce processus, des opsonines, soient des composantes du système du complément ou des anticorps, recouvrent les agents pathogènes. Ces complexes activent respectivement des récepteurs du complément et des récepteurs Fc (FcR) conduisant à l'activation des phagocytes et à la phagocytose.

#### 1.2.3.1.2 Formation du phagolysosome

Suivant l'engagement des récepteurs à phagocytose, la signalisation intracellulaire induit un réarrangement du cytosquelette d'actine et la formation d'une protrusion de la membrane cellulaire entourant la particule à phagocyter<sup>13,22</sup>. Les particules se retrouvent ensuite à l'intérieur de phagosomes qui mûrissent et fusionnent éventuellement avec les lysosomes pour former les phagolysosomes. Dans les phagolysosomes, le pH très acide, la présence de différentes molécules microbicides telles que des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la formation d'acide hypochloreux par la myéloperoxydase vont assurer la dégradation de l'agent pathogène. De plus, différentes hydrolases comme des lysozymes, des protéases et des cathepsines vont également participer à ce processus de dégradation de la particule phagocytée.

#### **1.2.3.1 Activation de la réponse immunitaire adaptative**

La présentation d'antigène permet l'activation de la réponse immunitaire adaptative et fait ainsi le pont entre l'immunité innée et adaptative. La présentation d'antigènes est le processus par lequel les antigènes étrangers qui ont été internalisés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) sont apprêtés en peptides et présentés aux lymphocytes T via les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)<sup>1</sup>.

#### 1.2.3.1.1 Complexe majeur d'histocompatibilité

Il existe trois classes de CMH : CMH de classe I (CMH I), de classe II (CMH II) et de classe III (CMH III)<sup>6</sup>. Chez l'humain, les molécules du CMH sont codées par des gènes du locus des antigènes des leucocytes

humains (HLA). Les gènes qui codent pour CMH I sont HLA-A, -B et -C et pour CMH II HLA-DP, -DQ et -DR et sont impliqués dans la présentation d'antigènes. Les molécules du CMH III sont, entre autres, des molécules du système du complément et des cytokines. Toutes les cellules nucléées expriment constitutivement des molécules du CMH I et présentent des peptides du soi qui sont apprêtés dans le protéasome<sup>1,6</sup>. Toutefois, seules les CPA, soient les neutrophiles, les macrophages, les DC et les lymphocytes B, expriment à la fois les molécules du CMH I et CMH II à leur surface et peuvent présenter des antigènes endogènes et exogènes.

#### 1.2.3.1.2 Apprêtement des antigènes

Les antigènes qui ont été internalisés par endocytose par les phagocytes doivent être apprêtés avant d'être présentés dans le contexte des molécules du CMH II<sup>1</sup>. Par clivage protéolytique, les antigènes sont dégradés en peptides par des protéases dans les endosomes. Les peptides antigéniques sont ensuite chargés sur les molécules de CMH II et le complexe CMH-peptide est transporté des endosomes vers la surface des CPA. Les peptides endogènes sont quant à eux apprêtés par le protéasome et chargés dans le réticulum endoplasmique sur les molécules du CMH I avant d'être présentés aux lymphocytes T<sup>1,3,6</sup>. Les antigènes exogènes qui sont synthétisés dans une cellule infectée ou tumorale peuvent également être présentés sur des molécules du CMH I. Dans le processus de présentation croisée, ces complexes CMH I - peptides exogènes peuvent être transférés aux CPA qui pourront, à leur tour, présenter les antigènes viraux et tumoraux à leur surface<sup>26</sup>.

#### 1.2.3.1.3 Présentation d'antigènes

Les CPA professionnelles sont les cellules capables de phagocytose soient les macrophages et les DC, mais aussi les lymphocytes B<sup>1</sup>. Les CPA naïfs ont des capacités élevées de phagocytose, mais faibles de présentation d'antigènes<sup>27</sup>. Les CPA expriment de façon constitutive des récepteurs à chimiokines qui permettent leur migration vers les ganglions lymphatiques drainants suivant leur activation au sein du foyer inflammatoire<sup>1,6</sup>. Une fois activées, les CPA ont des capacités réduites de phagocytose et augmentent leur expression de molécules de CMH I et II et de molécules B7, CD40 et autres molécules de co-stimulation nécessaires à l'activation des lymphocytes T<sup>6,28</sup>. En contrôlant l'expression des molécules de co-stimulation, le système immunitaire inné orchestre la réponse immunitaire adaptative<sup>29</sup>. Les DC sont particulièrement importants pour l'activation des lymphocytes T naïfs lors d'une exposition primaire à un antigène<sup>1</sup>.

#### **1.2.3.2 Initiation de la réponse inflammatoire**

L'inflammation est une réponse normale et vitale suivant l'activation du système immunitaire afin d'assurer la protection de l'hôte<sup>15</sup>. En effet, elle est essentielle pour l'élimination des agents pathogènes et pour assurer la réparation tissulaire. Elle conduit à la formation d'un foyer inflammatoire caractérisé par les quatre signes cliniques cardinaux de l'inflammation : la chaleur, la rougeur, l'œdème et la douleur<sup>30</sup>.

#### 1.2.3.2.1 Activation des cellules résidentes

Les cellules résidentes, soient les macrophages, les DC, les mastocytes et les cellules épithéliales, sont des cellules sentinelles dans les tissus et les premières à détecter via leurs PRR les PAMP et les DAMP résultants d'une infection ou d'une inflammation stérile<sup>31</sup>. L'activation des cellules résidentes par les PRR mène à leur libération de différents médiateurs de l'inflammation. D'une part, les mastocytes libèrent de l'histamine qui agit sur les muscles lisses et engendre une vasodilatation. Les cellules résidentes libèrent des chimiokines qui permettent par chimiotactisme le recrutement de différentes cellules immunitaires qui possèdent des récepteurs pour ces chimiokines. De plus, elles libèrent diverses cytokines qui augmentent l'expression de molécules d'adhésion sur l'endothélium telles que des ligands des sélectines et des intégrines, favorisant ainsi le recrutement de leucocytes au foyer inflammatoire.

#### 1.2.3.2.2 Recrutement de cellules immunitaires au site inflammatoire

Une fonction importante du système immunitaire inné est le recrutement rapide de cellules immunitaires au site infectieux<sup>1,10</sup>. Les neutrophiles sont les cellules immunitaires les plus nombreuses dans le sang et sont les premiers, à l'exception des cellules résidentes, à être recrutés au site inflammatoire<sup>31,32</sup>. D'une part, les neutrophiles agissent sur l'endothélium augmentant l'expression de molécules d'adhésion. Les neutrophiles produisent des leucotriènes B<sub>4</sub>, ce qui amplifie l'inflammation en s'activant eux-mêmes de façon autocrine, mais en activant aussi localement les autres cellules inflammatoires. En plus des cytokines et des chimiokines libérées par les cellules résidentes, les anaphylatoxines résultantes de l'activation du système du complément favorisent aussi le recrutement par chimiotactisme des leucocytes qui expriment à leur surface des récepteurs à anaphylatoxines<sup>21</sup>. Certaines composantes du système du complément peuvent également réguler la vasodilatation et augmenter la perméabilité des capillaires sanguins<sup>1,33</sup>. Les leucocytes recrutés sur le site inflammatoire vont, à leur tour, être activés par les PAMP et les DAMP et libérer des cytokines qui agiront sur les autres cellules du micro-environnement.

#### 1.2.3.2.3 Mécanismes pour contenir et éliminer l'infection

En plus de la mise en place de la phagocytose par les phagocytes, les cellules recrutées au site inflammatoire mettent en place différents mécanismes d'élimination ou de neutralisation des agents pathogènes afin de contenir l'infection. Par exemple, l'activation par les PRR et les récepteurs pour les composantes C3a et C5a du complément déclenche le stress oxydatif chez les macrophages, les neutrophiles et les éosinophiles<sup>6</sup>. Chez les phagocytes, le stress oxydatif permet l'élimination directe des agents pathogènes internalisés dans les endosomes, alors que les éosinophiles libèrent dans le milieu extracellulaire des ERO qui exercent un effet cytotoxique sur les agents pathogènes<sup>1,6</sup>. De la même façon, les granulocytes, soient les neutrophiles, les basophiles et les éosinophiles, entraînent un effet cytotoxique sur les microbes en libérant le contenu de leurs granules en réponse à leur activation par les PRR<sup>6</sup>. L'activation de certains TLR et des récepteurs du

complément C3 et C5a par certains stimuli mène à la libération de pièges extracellulaires par les neutrophiles<sup>34</sup>. Dans ce processus de mort cellulaire connu sous le nom de NETose, les neutrophiles piègent les agents pathogènes de taille trop importante pour être phagocytés avec leurs pièges extracellulaires essentiellement composés d'ADN nucléaire, mais également d'ADN mitochondrial, d'histones et certaines composantes antimicrobiennes présentes dans les granules des neutrophiles comme la myéloperoxydase, la calprotectine et des cathélicidines<sup>32,34</sup>. La NETose permet donc la neutralisation et l'élimination de certains agents pathogènes.

L'activation des NLR et des récepteurs de type AIM2 (ALR), deux types de PRR cytosoliques, par les PAMP et les DAMP mènent à la formation de l'inflammasome<sup>35</sup>. L'inflammasome est un complexe multi-protéique dont l'activation est nécessaire dans la lutte contre les infections intracellulaires d'origine bactérienne, virale, parasitaire ou fongique. La formation de l'inflammasome conduit à la pyroptose des cellules infectées, mort cellulaire programmée hautement pro-inflammatoire et à la libération de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18.

D'autre part, toutes les cellules nucléées saines expriment des molécules du CMH I<sup>6,36</sup>. En contexte infectieux ou tumoral, les cellules peuvent changer de phénotype et perdre leur habilité à exprimer ces molécules. Les cellules NK possèdent des récepteurs capables de détecter si les cellules qu'elles rencontrent expriment des molécules de CMH I. Si le récepteur se lie, alors les NK reçoivent un signal inhibiteur. Au contraire, si le récepteur ne rencontre aucune molécule du CMH I, la cellule NK recevra le signal de tuer la cellule anormale. Les cellules NK libèrent alors des perforines qui forment un pore dans la membrane cellulaire de la cellule cible. Les NK libèrent des granzymes, hautement cytotoxiques, via le pore menant à la mort cellulaire. De plus, lorsque les cellules NK rencontrent des cellules recouvertes d'immunoglobulines (Ig) de type G (IgG), elles sont activées via leurs récepteurs ciblant la portion Fc des IgG (Fc $\gamma$ R) conduisant à la lyse des cellules cibles.

#### 1.2.3.2.4 Résolution de l'inflammation

Dans la lutte contre l'agent pathogène, il est essentiel que l'inflammation reste contrôlée dans le temps et l'espace afin d'éviter qu'elle ne mène à la destruction tissulaire<sup>15</sup>. Si l'insulte initiale n'est pas résolue ou que les signaux d'activation du système immunitaire inné persistent, la réponse inflammatoire peut se perpétuer dans le temps en inflammation chronique, engendrer des dommages tissulaires permanents et ultimement conduire au développement de différentes maladies inflammatoires.

## 1.3 L'immunité adaptative

La réponse immunitaire adaptative permet une lutte spécifique contre les agents pathogènes<sup>1,6</sup>. Contrairement à l'immunité innée qui est présente autant chez les vertébrés que les invertébrés, l'immunité adaptative est

exclusive aux vertébrés à mâchoire, soient 99 % de tous les vertébrés<sup>2</sup>. La réponse immunitaire adaptative prend plusieurs jours voire semaines à se développer et elle est essentiellement médiée par les différentes sous-populations de lymphocytes T et B<sup>1,6</sup>. L'immunité à médiation cellulaire médiée par les lymphocytes T et l'immunité humorale médiée par les lymphocytes B sont les deux types des réponses mises en place dans l'immunité adaptative pour contrôler et éliminer l'infection. Une caractéristique évolutive importante du système immunitaire adaptatif est sa capacité à développer une mémoire immunologique permettant une réponse spécifique à l'antigène de plus en plus rapide, précise et vigoureuse lors d'expositions subséquentes<sup>1,10</sup>.

### **1.3.1 Ontogénie des lymphocytes**

Le développement et la maturation des lymphocytes se fait au niveau des organes lymphoïdes primaires, soient la moelle osseuse et le thymus<sup>1</sup>. Le micro-environnement dans la moelle osseuse, essentiellement dicté par les cellules stromales, va mener à la différenciation subséquente des CSH en progéniteurs lymphoïdes précoces, puis en progéniteurs lymphoïdes communs<sup>37</sup>. Les lymphocytes B atteignent leur maturité dans la moelle osseuse, alors que les cellules progénitrices lymphoïdes, cellules donnant naissance aux lymphocytes T, migrent au thymus. Pendant leur développement dans le thymus, les lymphocytes T se différencient en deux sous-populations en fonction du co-récepteur, CD4 ou CD8, qu'ils expriment<sup>3</sup>. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont connus sous le nom d'auxiliaires, alors que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont appelés cytotoxiques. Les lymphocytes T et B subissent différents processus de maturation dans le thymus et la moelle osseuse respectivement avant d'être relâchés dans la périphérie sous forme de lymphocytes matures naïfs, c'est-à-dire des cellules qui expriment un récepteur fonctionnel, mais qui n'ont pas encore rencontrés leur antigène spécifique<sup>6,37</sup>. Ils migrent vers les organes lymphoïdes secondaires, soient les ganglions lymphatiques, la rate et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses où la réponse immunitaire adaptative est initiée.

#### **1.3.1.1 Développement des récepteurs des lymphocytes**

Afin d'exercer leurs fonctions effectrices et d'initier la réponse adaptative, les lymphocytes T et B possèdent respectivement des récepteurs des lymphocytes T (TCR) et B (BCR) capables de reconnaître des antigènes étrangers<sup>37-39</sup>. Chaque lymphocyte acquiert pendant sa maturation un récepteur avec une spécificité unique à un épitope antigénique. Les TCR et les BCR sont des Ig membranaires qui sont composées d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère générées à partir du réarrangement des segments de gènes variables (V), de diversité (D) et de jonction (J).

##### **1.3.1.1.1 TCR**

Deux sous-populations de lymphocytes T peuvent prendre naissance à partir des thymocytes doubles négatifs (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) dans le thymus, les lymphocytes T  $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$ <sup>40</sup>. Leur TCR est donc un hétérodimère qui se compose soit de chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  ou de chaînes  $\gamma$  et  $\delta$ . Les lymphocytes T  $\alpha\beta$  représentent environ 95% et les

lymphocytes  $\gamma\delta$  que 5 % des lymphocytes T en circulation<sup>41</sup>. Conséquemment, à moins de mentions contraires, ce mémoire se concentrera sur les lymphocytes T  $\alpha\beta$ . Le TCR des lymphocytes T subit d'abord un premier réarrangement VDJ de la chaîne  $\beta$  et un réarrangement de la chaîne  $\alpha$  immature, menant à la formation du pré-TCR chez les thymocytes doubles négatifs<sup>6,39</sup>. La chaîne  $\alpha$  est réarrangée au stade double positif ( $CD4^+CD8^+$ ) générant ainsi un TCR fonctionnel. Les thymocytes doubles positifs perdent ensuite l'expression de l'un des deux corécepteurs nécessaires à la signalisation du TCR et deviennent des thymocytes simples positifs,  $CD4^+$  ou  $CD8^+$ . Contrairement aux lymphocytes T  $\alpha\beta$ , la plupart des lymphocytes T  $\gamma\delta$  n'exprime pas les co-récepteurs CD4 et CD8<sup>42</sup>. Comme pour les lymphocytes T, une grande proportion des cellules NKT possède un TCR $\alpha\beta$  et une faible proportion un TCR $\gamma\delta$ <sup>43</sup>.

#### 1.3.1.1.2 BCR

Pour les lymphocytes B, un premier réarrangement intracytoplasmique des segments V, D et J se produit d'abord chez les cellules pro-B dans la moelle osseuse au niveau de la chaîne lourde du BCR<sup>44</sup>. Si elle est fonctionnelle, un second réarrangement se produit au stade des cellules pré-B au niveau de la chaîne légère, pour donner lieu à des cellules B immatures ayant un BCR membranaire fonctionnel. Les lymphocytes B matures naïfs qui quittent la moelle osseuse expriment à leur surface des Ig de type M (IgM) et D (IgD) à titre de BCR<sup>2,45</sup>.

### 1.3.2 Activation des lymphocytes T

Les lymphocytes T naïfs sont constamment en mouvement et migrent d'un organe lymphoïde secondaire à un autre par le sang ou la lymphe<sup>1</sup>. L'activation des lymphocytes T se fait par la reconnaissance via leur TCR de leur antigène spécifique présenté dans le contexte d'une molécule du CMH du soi par une CPA<sup>1,3</sup>. Les lymphocytes  $CD4^+$  reconnaissent uniquement les peptides qui sont présentés via des molécules du CMH II, alors que les  $CD8^+$  sont activés dans le contexte des molécules du CMH I. Des signaux de co-stimulation doivent également être fournis par les CPA, sans quoi les lymphocytes meurent par apoptose ou deviennent anergiques, c'est-à-dire réfractaires à l'activation ultérieure par leur antigène spécifique. De plus, l'activation du co-récepteur CD4 ou CD8 des lymphocytes est également requise pour permettre l'activation des lymphocytes T<sup>1</sup>. L'activation d'un clone de lymphocyte T va mener à l'expansion clonale et la prolifération de centaines de cellules filles et leur différenciation en cellules effectrices<sup>1,10</sup>. Celles-ci pourront ensuite quitter les tissus lymphoïdes secondaires et migrer vers le site inflammatoire. Suivant la résolution de l'infection, les lymphocytes T vont subir une phase de contraction pendant laquelle la majorité des lymphocytes T effecteurs vont cesser de recevoir des signaux de prolifération et de survie et seront éliminés par apoptose<sup>10,46</sup>. Toutefois, certaines de ces cellules vont survivre et devenir des cellules mémoires. Ces cellules pourront être réactivées lors d'une rencontre subséquente avec leur antigène spécifique<sup>1,10</sup>. L'activation des lymphocytes T

CD8<sup>+</sup> va essentiellement mener à la mort de cellules infectées ou tumorales, alors que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> permettent la régulation des réponses cellulaires et humorales de l'immunité adaptative<sup>1,3,10</sup>.

### **1.3.2.1 Lymphocytes T auxiliaires**

Les cellules filles dérivées d'un clone de lymphocyte T auxiliaire activé se différencient en différentes sous-populations de lymphocytes dont les principales sont les lymphocytes Th1, Th2, Th17, T régulateurs (Treg) ou T auxiliaires folliculaires (Tfh)<sup>1,28</sup>. La polarisation préférentielle vers l'un des sous-types est dictée par différents facteurs dont la quantité et la nature de l'antigène et le type de CPA. Les molécules de co-stimulation fournies par les CPA et le microenvironnement cytokinique sont également des facteurs qui influencent la polarisation des cellules T auxiliaires. Ces sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> se distinguent entre elles par le profil de cytokines qu'elles produisent et l'expression de certaines molécules de surface<sup>1,27</sup>. L'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conduit à la libération de différentes cytokines inflammatoires affectant les cellules dans leur environnement<sup>1</sup>. Les lymphocytes Th1 sont pro-inflammatoires et associés à l'immunité à médiation cellulaire en libérant de l'IL-2 ce qui favorise l'activation et la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup><sup>1,27</sup>. Ils libèrent également de l'interféron (IFN)  $\gamma$  permettant l'activation de macrophages pro-inflammatoires et permettent une protection contre les infections intracellulaires. Les lymphocytes Th2 sont, au contraire, impliqués dans la réponse humorale. En effet, ces cellules libèrent essentiellement de l'IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 et de l'IL-23 dont certaines vont favoriser la production d'anticorps par les lymphocytes B. Les lymphocytes Th17 sont associés à la production d'IL-17, IL-21 et IL-22<sup>27,47</sup>. Cette sous-population est souvent considérée comme étant pro-inflammatoire, puisqu'elle favorise la libération de TNF $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  par les macrophages, deux cytokines pro-inflammatoires. Les Th17 peuvent également jouer un rôle immunosuppresseur par exemple dans l'immunité des muqueuses<sup>47</sup>. De façon similaire, l'activation des lymphocytes T  $\gamma\delta$  conduit à la libération de différentes chimiokines et cytokines inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), l'IFN $\gamma$ , IL-17, IL-21, and IL-22<sup>42</sup>. D'autre part, les Treg régulent la réponse immunitaire en limitant la prolifération des lymphocytes T<sup>27,48</sup>. Certains atteignent leur maturité dans le thymus et n'ont donc pas besoin de rencontrer leur antigène pour exercer leur fonction immunosuppressive, alors que d'autres deviennent des cellules régulatrices dans la périphérie suivant l'activation de leur TCR par leur antigène spécifique<sup>48</sup>. Finalement, les lymphocytes Tfh sont des cellules T auxiliaires jouant un rôle majeur dans la réponse humorale en permettant l'activation des lymphocytes B, la génération d'anticorps de haute affinité et de cellules B mémoires<sup>27,48</sup>.

### **1.3.2.2 Les lymphocytes T cytotoxiques**

Les lymphocytes T cytotoxiques naïfs sont activés par les DC dans les organes lymphoïdes secondaires<sup>26</sup>. Il y a ainsi expansion clonale et différenciation en cellules T cytotoxiques effectrices. Bien que toutes les cellules

nucléées présentent des peptides au sein des molécules du CMH I, seuls les DC fournissent les signaux nécessaires pour l'activation primaire des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et permettent l'initiation de la réponse cytotoxique. Suivant la reconnaissance des antigènes tumoraux ou infectieux dans le contexte du CMH I, les cellules T CD8<sup>+</sup> effectrices libèrent de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\alpha$ , deux cytokines connues pour leurs propriétés anti-tumorales et antimicrobiennes. Les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> et les lymphocytes T  $\gamma\delta$  possèdent également des granules cytotoxiques contenant des enzymes de la famille des perforines et des granzymes, similaires à celles retrouvées chez les cellules NK<sup>26,42,49</sup>. Une fois relâchées, ces granules forment un pore dans la cellule cible à l'aide des perforines, et les granzymes mènent à l'apoptose de la cellule cible. L'engagement du TCR des cellules NKT peut également conduire à un effet cytotoxique<sup>50</sup>. En effet, les cellules activées libèrent de l'IL-2 et de l'IFN $\gamma$  menant à l'activation des cellules NK. Les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> et les lymphocytes T  $\gamma\delta$  activés peuvent, par interaction des récepteurs de mort cellulaire Fas et leur ligand FasL sur les cellules cibles, mener directement à leur apoptose<sup>42,49,51</sup>.

### **1.3.3 Activation des lymphocytes B**

Les lymphocytes B matures naïfs possédant un BCR fonctionnel quittent la moelle osseuse et migrent vers la zone folliculaire des organes lymphoïdes secondaires<sup>37</sup>. Les lymphocytes B sont activés suivant l'engagement de leur BCR par leur antigène spécifique sous forme d'antigène intact soluble, contrairement aux lymphocytes T qui sont activés par un peptide apprêté et présenté dans le contexte du CMH du soi<sup>45</sup>. L'engagement du BCR par son antigène spécifique entraîne une cascade de signalisation intracellulaire menant à l'expansion clonale du lymphocyte B<sup>37</sup>. Les différents stimuli antigéniques mènent à la formation de centres germinatifs (CG) au sein des organes lymphoïdes secondaires où les lymphocytes B subissent différents processus de prolifération et de différenciation en plasmocytes ou en cellules B mémoires<sup>52,53</sup>. Les plasmocytes assurent la libération d'anticorps, alors que les cellules mémoires le maintien d'une mémoire immunologique. En plus des lymphocytes B, les CG sont également colonisés par les lymphocytes Tfh. Ceux-ci permettent le maintien des CG et assurent les processus de commutation isotypique et d'hypermutation somatique permettant la maturation et le développement de lymphocytes B produisant des anticorps de haute affinité pour leur antigène spécifique<sup>52-54</sup>. Les processus de commutation isotypique et d'hypermutation somatique se produisent également pour les lymphocytes B mémoires, permettant une réponse plus rapide et spécifique en réponse à des expositions subséquentes à l'antigène. Des lymphocytes B régulateurs ont également été identifiés comme cellules B effectrices limitant l'inflammation et la polarisation des lymphocytes T en Th1 et Th2 via la libération d'IL-10<sup>37,55</sup>. En plus de leur rôle dans la production d'anticorps, les lymphocytes B interviennent dans la présentation d'antigènes et la co-stimulation des lymphocytes T. En effet, la liaison du BCR avec son antigène spécifique peut mener à l'internalisation du complexe et à la présentation de cet antigène au sein des molécules du CMH II aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. La DC est la principale CPA

responsable de l'activation de la réponse immunitaire adaptative et la présentation d'antigène aux cellules T naïves<sup>6</sup>. Toutefois, les lymphocytes B et les macrophages sont très efficaces pour activer les cellules T mémoires. Les lymphocytes B interviennent aussi dans libération de cytokines comme l'IL-6, l'IL-10 et l'IFN $\gamma$ , la régulation de l'activité des DC, la polarisation des lymphocytes T vers un phénotype Th1 ou Th2, l'organogenèse des organes lymphoïdes, le rejet de greffe, le développement de tumeur et la cicatrisation<sup>38</sup>. Dans des contextes d'infection et d'inflammation chronique où l'exposition antigénique est persistante, des organes lymphoïdes tertiaires peuvent également se former au sein même des foyers inflammatoires dans des tissus non-lymphoïdes<sup>56</sup>. Ces structures permettent une interaction avec les DC et une activation locale des lymphocytes T et B.

### **1.3.3.1 Les différentes classes d'anticorps**

Les Ig sous forme monomérique sont des glycoprotéines qui se composent de deux chaînes légères et deux chaînes lourdes maintenues ensemble par des ponts disulfures<sup>6,45</sup>. Elles peuvent être membranaires à la surface des lymphocytes B ou solubles, connues sous le nom anticorps sous cette forme. Les anticorps sont fabriqués par les lymphocytes B et leur producteur est une composante essentielle de la réponse immunitaire adaptative. Ils permettent de neutraliser les agents infectieux en s'y liant pour former des CI, des agrégats antigènes-anticorps. Les anticorps sont composés d'un fragment variable (Fab) impliqué dans la liaison de leur antigène spécifique et d'un fragment constant (Fc) qui détermine la classe d'Ig à laquelle ils appartiennent. Le Fc est impliqué dans la fonction effectrice des anticorps en permettant l'activation de la voie classique du système du complément et des FcR exprimés par les cellules immunitaires. Les Ig qui sont sécrétées en réponse à l'activation des lymphocytes B ont la même spécificité que celles qui composent le BCR. Les Ig de type E (IgE), de type A (IgA), IgM, IgG, et IgD sont les cinq principales classes d'Ig et possèdent des fonctions effectrices différentes. Parmi elles, les IgM, IgA et les IgG sont les plus communément retrouvées chez l'humain.

#### **1.3.3.1.1 IgM**

Les IgM sont les premières Ig à être produites et exprimées à la surface des lymphocytes B pendant leur développement<sup>45</sup>. Suivant l'activation du BCR des lymphocytes B par leur antigène spécifique, elles sont également les premières à être sécrétées par les plasmocytes lors d'une infection primaire et sont présentes essentiellement sous forme de pentamères dans le milieu extracellulaire. Cette structure pentamérique rend les IgM très efficaces dans l'opsonisation et l'activation du système du complément<sup>45,57</sup>. Les IgM sont de plus faibles affinités pour leur antigène spécifique que les IgG.

#### 1.3.3.1.1 IgA

Les IgA sont la classe d'Ig qui prédomine dans les muqueuses du corps et certains fluides biologiques comme la salive et le lait maternel<sup>45,58</sup>. Elles se divisent en deux sous-classes, les IgA1 et IgA2, et sont retrouvées toutes deux sous formes de monomères et de dimères. Leur présence à haute concentration dans les muqueuses et certains fluides biologiques souligne un rôle évolutif essentiel dans la défense de l'hôte. En effet, elles représentent l'une des premières lignes de défense immunitaire du corps contre les infections dans les muqueuses et permettent de neutraliser les toxines, les bactéries et les virus dans la lumière du tractus gastro-intestinal. Les IgA sont également retrouvées dans le sang et sont la classe d'anticorps qui prévale après les IgG dans le sérum. Les IgA activent peu le système du complément, mais sont efficaces pour neutraliser les agents pathogènes et pour enclencher l'agglutination.

#### 1.3.3.1.2 IgG

Les IgG sont la classe d'Ig la plus abondante du corps et qui a la plus longue demi-vie<sup>45</sup>. Elles se divisent en quatre sous-classes : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4. Les IgG1 représentent environ 70 % des IgG qui sont générées lors d'une infection secondaire. Parmi les mécanismes d'action des IgG, on compte l'opsonisation, l'activation du système du complément, la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) et l'agglutination. Les IgG sont générées à la suite des processus de commutation isotypique et d'hypermutation somatique et possèdent donc une grande spécificité pour leur antigène.

##### **1.3.3.1 Commutation isotypique**

Dans les premiers jours d'une infection primaire, les lymphocytes B matures activés libèrent, par clivage protéolytique, la partie extracellulaire des IgM exprimées à leur surface menant à une augmentation des niveaux circulants d'IgM, Ig de faible affinité<sup>45</sup>. Après quelques jours, des mutations somatiques dans les gènes codant pour la portion Fc des chaînes lourdes des Ig surviennent, processus connu sous le nom de commutation isotypique<sup>45,53,54</sup>. Ainsi, la chaîne lourde des IgM est substituée par la chaîne lourde d'une autre classe d'Ig sans pour autant modifier la portion Fab de l'anticorps et donc sa spécificité pour son antigène spécifique. La production d'IgM par les lymphocytes B cesse pour laisser place aux IgG, IgA ou IgE qui ont des fonctions effectrices différentes des IgM. La commutation isotypique préférentiellement vers une classe d'Ig peut être influencée par les cytokines libérées par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

##### **1.3.3.2 Hypermutation somatique**

Suivant l'engagement du BCR, il y aura maturation de l'affinité des anticorps produits par les lymphocytes B activés dans les CG<sup>45,53</sup>. L'hypermutation somatique est un processus pendant lequel la Fab de la chaîne lourde des Ig est modifiée par substitution de nucléotides permettant ainsi d'augmenter l'affinité des anticorps

pour leur antigène. Au fil des expositions à leur antigène spécifique, les lymphocytes B subissent différentes étapes de maturation de l'affinité de leurs anticorps qui sont de plus en plus spécifiques à l'antigène.

### **1.3.4 Tolérance immunitaire**

Un large répertoire de TCR et BCR est généré par réarrangements aléatoires des segments VDJ dont il est impossible de prédire leur spécificité. Cela peut donner lieu à des lymphocytes T et B autoréactifs, c'est-à-dire capables de reconnaître les antigènes du soi<sup>44</sup>. Il est estimé que 20 à 50 % des lymphocytes produits ont une affinité suffisamment forte avec les antigènes du soi pour représenter un risque d'auto-immunité s'ils ne sont pas pris en charge<sup>59</sup>. La majorité des cellules autoréactives sont éliminées pendant leur développement dans les organes lymphoïdes primaires<sup>44,60</sup>. Toutefois, certaines d'entre elles réussissent à échapper aux mécanismes de tolérance centrale et sont relarguées dans la périphérie. Les mécanismes de tolérance périphérique assurent une régulation des cellules autoréactives ayant échappées aux mécanismes de tolérance centrale afin d'éviter une réponse immunitaire dirigée contre le soi dans la périphérie.

#### ***1.3.4.1 Tolérance immunitaire centrale***

##### **1.3.4.1.1 Régulation de la tolérance immunitaire dans le thymus**

Suivant la formation d'un TCR fonctionnel, une sélection du répertoire parmi tous les thymocytes simples positifs CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> est effectuée dans le thymus lors de l'éducation thymique<sup>1,61,62</sup>. Pendant la sélection positive, les thymocytes sont sélectionnés par restriction au CMH du soi dans le cortex<sup>1,61</sup>. Ainsi, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> capables de reconnaître respectivement les molécules du CMH II et du CMH I du soi exprimées par les cellules épithéliales corticales sont sélectionnés positivement, alors que les autres thymocytes sont éliminés par apoptose. Dans la zone juxtamedullaire, les cellules épithéliales médullaires expriment des niveaux élevés de facteurs de transcription pour les gènes régulateurs de l'auto-immunité (AIRE) codant pour des antigènes des tissus de la périphérie du corps<sup>62</sup>. La présentation ectopique d'antigènes du soi de la périphérie aux thymocytes peut se faire directement par les cellules épithéliales médullaires ou par les DC de la médulla thymique<sup>1,62</sup>. Lors de la sélection négative, les thymocytes qui possèdent un TCR qui réagit fortement avec les antigènes du soi présentés dans le contexte du CMH du soi peuvent être éliminés par apoptose. Certains lymphocytes T autoréactifs vont, au contraire, se différencier dans le thymus en cellules Treg par le processus de diversion clonale et exercer des fonctions immunosuppressives dans la périphérie<sup>61</sup>. De plus, les lymphocytes T qui possèdent un TCR autoréactif peuvent subir un réarrangement secondaire des gènes codant pour le TCR permettant de générer une autre version de TCR fonctionnel<sup>63,64</sup>. Finalement, les cellules T autoréactives peuvent devenir anergiques<sup>61</sup>.

#### 1.3.4.1.2 Régulation de la tolérance immunitaire dans la moelle osseuse

Pendant le développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse, différents mécanismes de régulation permettent également de limiter la présence de cellules B autoréactives dans la périphérie<sup>44,65,66</sup>. Suivant le réarrangement de la chaîne lourde des cellules pro-B, les cellules immatures présentant un BCR fonctionnel reçoivent des signaux de survie, alors que ceux qui présentent un BCR non-fonctionnel sont éliminés. Une fois que le réarrangement de la chaîne légère a lieu, les pré-BCR qui reconnaissent des antigènes du soi dans la moelle osseuse sont éliminés par apoptose<sup>65,67</sup>. De la même façon, il y aura délétion clonale des cellules présentant un BCR fonctionnel autoréactif plus tard dans leur développement dans la moelle osseuse. Tout comme pour les lymphocytes T, les lymphocytes B munis d'un BCR autoréactif ne seront pas nécessairement éliminés et pourront procéder au réarrangement secondaire du BCR ou devenir anergiques<sup>37,44,67</sup>.

#### **1.3.4.2 Tolérance immunitaire périphérique**

Les mécanismes périphériques de maintien de la tolérance immunitaire sont essentiels afin d'assurer la prise en charge des lymphocytes T et B autoréactifs ayant échappés à la tolérance centrale. Les DC tolérogènes jouent un rôle dans le maintien de la tolérance immunitaire périphérique<sup>28,61,68,69</sup>. En effet, ces DC immatures présentent des antigènes du soi aux lymphocytes T en absence de signaux de co-stimulation induisant un état d'anergie ou la délétion clonale du lymphocyte T autoréactif. De plus, les DC tolérogènes peuvent également favoriser la génération et l'activation de cellules Treg<sup>68</sup>. Ces cellules permettent dans la périphérie l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T<sup>48</sup>. D'autre part, la résolution de la réponse immunitaire est assurée par la mort cellulaire induite par l'activation (*activation induced cell death* - AICD) dans les lymphocytes T qui sont activés à de multiples reprises par leur antigène<sup>70</sup>. Ce mécanisme de délétion clonale est nécessaire pour limiter les risques de réactions inflammatoires incontrôlées pouvant engendrer des dommages tissulaires et représenter un risque d'auto-immunité. De la même façon, l'activation chronique du BCR par son antigène mène à l'anergie ou la délétion du clone de lymphocyte B<sup>71</sup>. De plus, des mécanismes de délétion des clones de lymphocytes B autoréactifs nouvellement générés par hypermutation somatique sont présents au sein des CG<sup>72,73</sup>. Ces lymphocytes B activés réagissant avec le soi cessent de recevoir de l'aide des lymphocytes Tfh accélérant leur élimination par apoptose<sup>74</sup>.

#### **1.3.4.3 Rupture de la tolérance immunitaire**

L'échappement de lymphocytes T et B autoréactifs aux mécanismes de tolérance centrale dans le thymus et la moelle osseuse respectivement est un facteur important de bris de la tolérance immunitaire<sup>62,66,75</sup>. La rupture de la tolérance immunitaire résulte toutefois d'une inefficacité à la fois des mécanismes de maintien de la tolérance immunitaire centrale et périphérique et a pour résultat l'auto-immunité. La délétion clonale des cellules autoréactives est le seul mécanisme qui est irréversible et assurent ainsi un rôle crucial dans la

tolérance immunitaire. Des mutations génétiques procurant aux lymphocytes une résistance à l'apoptose peuvent conduire à la rupture de la tolérance immunitaire. De plus, des défauts dans la signalisation du TCR ou du BCR peuvent induire une signalisation inadéquate, une résistance cellulaire à la délétion clonale et mener à la présence de cellules autoréactives dans la périphérie<sup>37</sup>. D'autre part, des défauts dans l'expression des facteurs de transcription AIRE et dans la maturation des DC et des cellules épithéliales thymiques impliquées dans la présentation d'antigènes du soi dans le thymus sont également des facteurs de risques<sup>62</sup>. Le mécanisme de réarrangement secondaire des BCR et TCR autoréactifs dans les organes lymphoïdes secondaires comprend un risque d'expression de deux récepteurs fonctionnels dont l'un étant autoréactif dans la périphérie, représentant également un risque d'auto-immunité<sup>64,66</sup>. Dans la périphérie, une augmentation des signaux de survie des lymphocytes sont également impliqués dans le développement de maladies auto-immunes<sup>76</sup>. De plus, plutôt que d'être tolérogènes, certaines DC immatures qui présentent des antigènes du soi sont activés et mènent à leur tour à l'activation de lymphocytes T autoréactifs<sup>69</sup>.

Bien qu'ils constituent des facteurs clés, le bris de la tolérance immunitaire et l'auto-immunité qui en résulte ne sont pas suffisants à eux seuls pour expliquer le développement de maladies auto-immunes<sup>38</sup>. Des facteurs génétiques, environnementaux et hormonaux sont également impliqués.

## **2 Le lupus érythémateux disséminé**

Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie auto-immune chronique qui touche environ un Canadien sur 2000<sup>77</sup>. Sa pathogenèse se caractérise par une perte de tolérance immunitaire menant à la production d'auto-anticorps dirigés contre les antigènes du soi et à la formation de CI<sup>77,78</sup>. Le LED est décrit comme systémique, car tous les tissus et organes du corps peuvent être endommagés en réponse à la présence de CI. Elle est souvent surnommée la maladie aux mille visages tant les manifestations cliniques sont hétérogènes chez un même patient et variables d'un patient à l'autre rendant le diagnostic extrêmement complexe<sup>78</sup>. Chez la plupart des patients, le LED fluctue entre des périodes d'activité de la maladie et de rémission<sup>79</sup>. Le LED affecte plusieurs aspects de la vie des patients qui doivent composer, entre autres, avec les effets secondaires de leur traitement, des troubles du sommeil, de la fatigue chronique, des troubles de l'humeur, de la douleur chronique et des problèmes de fertilité réduisant considérablement leur qualité de vie<sup>80,81</sup>. Ils ont aussi un risque accru de mortalité comparativement à la population générale<sup>79,82</sup>. Celle-ci peut être attribuable aux dommages aux organes vitaux résultants de l'activité de la maladie ou à des séquelles à long terme par exemple sur le système cardiovasculaire dû à la maladie ou aux traitements<sup>82</sup>. D'autre part, la prise d'immunosuppresseurs rend les patients à risque de contracter des infections et peut également être à l'origine de la mortalité dans le LED.

## 2.1 Prévalence et incidence

La prévalence et l'incidence mondiale du LED varie entre 3 et 518 cas par 100 000 habitants et entre 0 et 23 cas pour 100 000 personnes-années respectivement<sup>83</sup>. Ces variations substantielles dans la prévalence et l'incidence de la maladie à travers le monde est attribuable à différents facteurs dont le sexe, l'âge, la localisation géographique et l'ethnicité des patients<sup>78,83,84</sup>. De façon générale, les femmes sont davantage touchées par le LED que les hommes avec un ratio d'environ 9 : 1<sup>85</sup>. Toutefois, cet écart entre les sexes est moins important chez les patients plus jeunes ou plus âgés<sup>83</sup>. D'autre part, les femmes en âge de procréer, entre 15 et 44 ans, développent davantage le LED<sup>78,83,85</sup>. Le sommet d'incidence du LED est atteint plus tardivement pour les hommes, avec un nombre de nouveaux cas maximal chez les hommes d'âges mûrs entre 45 et 60 ans. La localisation géographique semble aussi avoir un impact dans le développement du LED. En effet, l'Amérique du Nord possède les taux d'incidence et de prévalence les plus élevés, alors que les plus faibles taux d'incidence et de prévalence ont été retrouvés respectivement en Afrique et en Australie<sup>83</sup>. Finalement, la prévalence et l'incidence du LED sont les plus importants chez les patients Afro-Américains, les plus faibles chez les patients d'origine caucasienne et des taux intermédiaires ont été observés chez les patients d'origine hispanique et asiatique. En somme, les facteurs de risques les plus importants pour le développement du LED sont le sexe féminin, le jeune âge de la patiente et l'ethnie afro-américaine<sup>82</sup>. Une tendance à la hausse dans la prévalence mondiale du LED semble se dessiner avec le temps<sup>83</sup>.

## 2.2 Étiologie

Les facteurs génétiques sont une composante importante dans le développement du LED, mais ils sont insuffisants à eux seuls pour initier la maladie<sup>79,84</sup>. Ainsi, le LED est une maladie multifactorielle complexe où des composantes épigénétiques et des facteurs environnementaux interviennent pour initier le développement de la maladie chez des individus présentant des prédispositions génétiques.

### 2.2.1 Prédispositions génétiques

Différentes évidences indiquent que la composante génétique joue un rôle important dans la prédisposition de certains patients à développer le LED. En effet, la fréquence de personnes malades au sein de la famille d'un patient atteint du LED est plus élevée que dans la population générale<sup>79,86</sup>. De plus, le taux de concordance dans la maladie entre des jumeaux monozygotes partageant le même génome varie entre 24 et 58 %, alors que chez les jumeaux dizygotes le taux de concordance varie entre 2 et 5 %<sup>79</sup>. Toutefois, des discordances dans la pathogenèse et l'évolution du LED entre des jumeaux monozygotes sont observées<sup>87</sup>. À eux seuls, les facteurs génétiques sont donc insuffisants pour expliquer le développement du LED et des facteurs environnementaux interviennent également dans l'étiologie de la maladie<sup>84</sup>. La présence d'un chromosome X supplémentaire chez les femmes peut expliquer, au moins en partie, leur risque accru de développer la maladie<sup>88,89</sup>.

### **2.2.1.1 Allèles de susceptibilité**

Plus d'une soixantaine d'allèles de susceptibilité au LED ont été identifiés dans la population<sup>90</sup>. Ceux-ci se trouvent essentiellement sur des gènes codant pour différentes composantes du système immunitaire. Chez la majorité des patients, il est estimé qu'au moins quatre allèles de susceptibilité sont nécessaires pour développer le LED. Bien que rare, une déficience homozygote des premières composantes du système du complément peut être suffisante pour initier le LED<sup>91</sup>. Des polymorphismes au niveau des gènes codant pour les molécules du CMH II sont également retrouvés dans le LED<sup>79,86,92</sup>. Certains polymorphismes des gènes codant pour le TNF $\alpha$ , le récepteur ciblant la portion Fc des IgG IIA (Fc $\gamma$ RIIA) et le TCR sont d'autres exemples d'allèles de susceptibilité associés au développement de la maladie<sup>86</sup>.

### **2.2.1.1 Inactivation du chromosome X**

Comme pour la majorité des maladies auto-immunes, les femmes sont plus fréquemment touchées par le LED que les hommes<sup>88</sup>. Plusieurs gènes codant pour le système immunitaire sont localisés sur le chromosome X dont certains sont des gènes de susceptibilité au LED. Le processus d'inactivation du chromosome X chez la femme permet l'inactivation aléatoire de l'un des deux chromosomes X dans chaque cellule somatique. Les mécanismes épigénétiques de méthylation de l'ADN et de désacétylation des histones assurent le blocage de la transcription des gènes et le maintien de l'inactivation du chromosome X lors des divisions cellulaires subséquentes<sup>88,89</sup>. Ce processus permet d'avoir un niveau d'expression similaire des gènes entre les hommes et les femmes<sup>88</sup>. Toutefois, certains gènes réussissent à échapper au processus d'inactivation du chromosome X et prédisposent ces femmes au développement du LED<sup>88,89</sup>. Le LED est d'ailleurs moins fréquent chez les femmes atteintes du syndrome de Turner qui ne possèdent qu'un seul chromosome X (45, X) et plus fréquent chez les hommes qui sont atteints du syndrome de Klinefelter (47, XXY) possédant deux chromosomes X que dans la population générale<sup>89,93,94</sup>.

### **2.2.2 Influences hormonales**

La dichotomie dans la prévalence du LED entre les hommes et les femmes peut également être expliquée par la différence dans le métabolisme des hormones sexuelles entre les sexes<sup>83,85,86,93,95</sup>. Le taux maximal d'incidence du LED est atteint chez les femmes en âge de procréer et le développement de la maladie survient rarement avant la puberté ou après la ménopause. De plus, les périodes de poussées de la maladie chez la femme coïncident avec des périodes de changements hormonaux telles que le cycle menstruel et la grossesse. Cela met en évidence le rôle des hormones sexuelles dans le développement et la sévérité de la maladie. De façon générale, les niveaux d'œstrogènes sont plus élevés et les niveaux d'androgènes plus faibles chez les individus de sexe féminin que masculin<sup>95</sup>. Le développement du LED est associé à une dérégulation dans le métabolisme de ces hormones sexuelles pour les deux sexes : des niveaux élevés d'œstrogènes et faibles d'androgènes augmentent le risque de développer la maladie<sup>86</sup>. Les cellules

myéloïdes et les lymphocytes T et B expriment des récepteurs des œstrogènes et androgènes indiquant que les hormones sexuelles peuvent moduler l'activité des cellules immunitaires<sup>28</sup>. Alors que les androgènes semblent avoir un effet protecteur dans le LED, les œstrogènes favorisent la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires et augmentent la survie des cellules autoréactives, la prolifération des lymphocytes B et la production d'auto-anticorps<sup>86,95</sup>. Toutefois, l'œstrogène joue probablement davantage un rôle dans la sévérité de la maladie que dans l'initiation, puisque le biais entre les sexes, bien que moins important, est également présent chez les patients plus jeunes et plus âgés où les variations hormonales sont moins importantes<sup>89</sup>.

### **2.2.3 Facteurs environnementaux**

Les facteurs environnementaux interviennent dans le développement du LED chez des individus présentant des prédispositions génétiques lorsqu'un certain seuil est atteint<sup>79,96</sup>. Ces influences de l'environnement peuvent également être à l'origine de l'exacerbation de la maladie. Les mécanismes sous-jacents sont une augmentation du stress oxydatif, des mutations et des dommages à l'ADN, la production de cytokines pro-inflammatoires, des déséquilibres hormonaux et de l'inflammation systémique<sup>96</sup>. De plus, les facteurs environnementaux peuvent aussi avoir un impact sur l'expression génique et induire des modifications épigénétiques telles que la déméthylation de l'ADN ou l'acétylation des histones augmentant ainsi le risque de développer le LED<sup>88,96</sup>.

#### **2.2.3.1 Rayonnement ultraviolet**

La photosensibilité est une caractéristique commune à près de 60 % des patients atteints du LED<sup>97</sup>. Elle cause une réaction inflammatoire anormale et exagérée au niveau de la peau à la suite d'une exposition au rayonnement ultraviolet (UV). L'exposition au UV, surtout les rayons UV-B, est une cause fréquente de déclenchement des phases de poussées chez les patients atteints du LED<sup>84,97</sup>. Alors que les rayons UV-A semblent bénéfiques dans le LED, l'exposition aux rayons UV-B induit la libération de cytokines inflammatoires, du stress oxydatif, des dommages au niveau de l'ADN et une diminution de sa méthylation, l'apoptose des kératinocytes et l'exposition d'antigènes du soi<sup>97,98</sup>. En plus d'induire des dommages au niveau cutané, les rayons UV-B engendrent également une réaction inflammatoire systémique et initient des phases de poussées et l'exacerbation de la maladie. L'exposition aux rayons UV-B est aussi la source principale de vitamine D. Paradoxalement, la vitamine D exerce des effets immunomodulateurs bénéfiques dans le LED<sup>96,98</sup>. Les bienfaits de l'exposition aux rayons UV pour les patients atteints du LED sont donc controversés.

#### **2.2.3.2 Infections**

Le mimétisme moléculaire est le principal mécanisme à l'origine de l'apparition de l'auto-immunité à la suite d'une infection<sup>99,100</sup>. Dans ce processus, des anticorps dirigés contre des antigènes infectieux partageant des

épitopes communs ou très similaires à certains antigènes du soi reconnaissent le soi par réactivité croisée. L'une des infections les plus étroitement liées avec le développement du LED est le virus d'Epstein-Barr<sup>100</sup>. Plusieurs protéines virales partagent des séquences communes à des antigènes du soi et par mimétisme moléculaire, plusieurs anticorps dirigés contre des épitopes viraux ont une réactivité croisée avec les antigènes du soi. Les CI composés d'antigènes du soi sont ensuite internalisés par les lymphocytes B et, par diffusion des épitopes, des anticorps dirigés contre d'autres épitopes de l'antigène du soi internalisé que l'épitope initial sont produits. La diffusion des épitopes dans un contexte de mimétisme moléculaire peut conduire à la perte de tolérance immunitaire et au développement du LED chez des individus génétiquement prédisposés. D'autres cas de mimétisme moléculaire pouvant être à l'origine de l'auto-immunité dans le LED ont été observés dans le contexte d'infections virales notamment avec le virus de Coxsackie et le parvovirus B19, ainsi que des infections bactériennes telles que *Klebsiella pneumoniae* et *Burkholderia fungorum*<sup>99</sup>.

### **2.2.3.3 Médicaments**

Plus d'une centaine de médicaments ont été décrits comme pouvant induire le développement de maladies auto-immunes s'apparentant au LED<sup>101</sup>. Environ 10 % des cas de LED seraient induits par la prise de médicaments, mais les manifestations se résorbent habituellement suivant l'interruption du traitement<sup>84,101,102</sup>. Tout comme pour les autres facteurs environnementaux, ce phénomène est observable chez des individus présentant des prédispositions génétiques. Parmi ces médicaments, la procainamide et l'hydralazine ont été associées à un risque élevé, l'isoniazide à un risque modéré et la minocycline et les inhibiteurs du TNF $\alpha$  à un risque faible d'induire une maladie de type LED<sup>101</sup>. La procainamide et l'hydralazine sont des agents qui agissent sur la déméthylation de l'ADN, l'acétylation des histones et la prolifération de lymphocytes T autoréactifs<sup>84,101,103</sup>. Certains métabolites de la procainamide, l'hydralazine et l'isoniazide peuvent également favoriser l'auto-immunité en interférant avec l'activation du système du complément ce qui mène à l'accumulation de CI<sup>101</sup>. Bien que le mécanisme permettant aux inhibiteurs du TNF $\alpha$  d'induire le LED reste à être élucidé, il est considéré que son inhibition systémique interfère avec l'apoptose et affecte la clairance par les phagocytes des corps apoptotiques et des pièges extracellulaires libérés par les neutrophiles, menant à la production d'auto-anticorps suite à l'exposition de ces antigènes du soi dans le milieu extracellulaire<sup>102</sup>. D'autre part, le traitement de la ménopause avec l'hormonothérapie substitutive et la prise de contraceptifs oraux sont également des agents qui augmentent le risque de développer le LED en altérant les niveaux d'œstrogènes<sup>96</sup>.

### **2.2.3.4 Polluants et produits chimiques**

L'exposition à une variété de polluants et de substances chimiques a été associée à des risques accrues de développer le LED chez des individus génétiquement prédisposés<sup>96</sup>. Bien qu'ils ne représentent pas l'agent causal, ils accélèrent le développement de la maladie. La cigarette contient des centaines de substances

chimiques et toxiques pouvant induire du stress oxydatif et des dommages à l'ADN. Fumer la cigarette a également été associé avec une production accrue d'anticorps dirigés contre l'ADN double brin, le principal auto-anticorps retrouvé dans le LED. Chez les personnes exposées à des poussières contenant de la silice cristalline retrouvée dans le sable, les roches et le sol, un nombre de cas augmenté de maladies auto-immunes, dont le LED, a été observé en comparaison à la population générale<sup>96,104</sup>. La pollution de l'air par des particules fines a aussi été liée à un risque accru de développer des maladies rhumatismales auto-immunes systémiques comme le LED<sup>96,105</sup>. L'exposition occupationnelle chez les agriculteurs ou résidentielle à des pesticides a été associée à un risque augmenté de développer le LED et à l'exacerbation des symptômes chez les patients ayant déjà développé la maladie<sup>96</sup>. Des perturbateurs endocriniens tels que les métaux lourds et les solvants peuvent également avoir un rôle à jouer dans le développement de la maladie en engendrant un déséquilibre hormonal, mais leur rôle reste à confirmer.

## **2.3 Pathogenèse**

La pathogenèse du LED est extrêmement complexe et n'est toujours pas entièrement comprise. Les mécanismes qui initient et perpétuent l'activité de la maladie sont le résultat d'une multitude de dysfonctions au niveau du système immunitaire inné et adaptatif et des mécanismes régulateurs menant à une perte de tolérance immunitaire<sup>84</sup>. Le point central de la pathogenèse du LED est la production d'auto-anticorps pathogéniques dirigés contre les antigènes du soi résultant de l'activation de lymphocytes T et B autoréactifs<sup>86</sup>. Les auto-anticorps se lient aux antigènes du soi pour former des CI qui peuvent se retrouver au sein de tous les organes et tissus du corps à l'origine des manifestations cliniques hétérogènes du LED. Les CI engendrent de l'inflammation locale ou systémique conduisant ultimement à des dommages tissulaires irréversibles si l'activité de la maladie n'est pas adéquatement prise en charge<sup>106</sup>.

### **2.3.1 Perte de tolérance immunitaire**

Différents mécanismes de régulation de la tolérance immunitaire sont mis en place par le système immunitaire afin d'assurer la régulation et la prise en charge des lymphocytes T et B autoréactifs au niveau central et périphérique en conditions normales. Parmi ceux-ci, on compte la délétion clonale, la diversion clonale, l'anergie et la recombinaison secondaire du TCR et du BCR. Les mécanismes de maintien de la tolérance immunitaire sont plus largement décrits dans la section 1.3.4 de ce mémoire. L'auto-immunité dans le LED est la conséquence d'un bris dans la tolérance immunitaire par une dysfonction de l'un ou plusieurs de ces mécanismes chez un individu présentant des prédispositions génétiques<sup>99</sup>. Les antigènes du soi sont ainsi reconnus comme étant étrangers et sont attaqués par le système immunitaire. Les facteurs environnementaux et hormonaux entrent également en jeu dans le processus de perte de tolérance immunitaire dans le LED<sup>38,86</sup>.

### **2.3.1.1 Présence de lymphocytes T et B autoréactifs en périphérie**

La recombinaison des segments VDJ qui survient pendant le développement des lymphocytes T et B dans les organes lymphoïdes primaires génèrent un grand nombre de lymphocytes autoréactifs, c'est-à-dire capables de reconnaître les antigènes du soi<sup>44,59</sup>. Les recombinaisons secondaires des TCR et des BCR autoréactifs dans les organes lymphoïdes primaires peuvent également générer des clones autoréactifs qui pourront être relargués dans la périphérie<sup>107</sup>. Dans le LED, différents mécanismes de maintien de la tolérance immunitaire centrale semblent être délétères et conduire à la présence de lymphocytes T et B en périphérie<sup>75</sup>. Des défauts menant à une réduction de la signalisation du BCR ont été associés au LED conduisant à un échappement de la délétion des clones autoréactifs lors de la sélection négative et au développement de ces cellules autoréactives dans la moelle osseuse<sup>108</sup>. Une diminution dans les niveaux d'expression des gènes codant pour FasL et pour les caspases 8 et 9 a été observée dans les lymphocytes T chez les patientes en début de maladie qui ne prennent pas ou de très faibles doses de glucocorticoïdes<sup>109</sup>. Ces protéines sont impliquées dans les voies de l'apoptose responsables de la délétion centrale et périphérique des clones de lymphocytes autoréactifs.

Les lymphocytes T et B dans le sang périphérique ont aussi été décrits comme anormaux dans leur phénotype et leurs fonctions dans le LED<sup>75,110-112</sup>. Dans la maladie, les lymphocytes T sont hyperréactifs et prompts à l'activation, mais présentent à la fois un phénotype de cellules anergiques et des anomalies dans l'expression génique. Malgré cet état d'hyperactivation, les lymphocytes T libèrent, par exemple, très peu d'IL-2, cytokine impliquée dans la survie et la prolifération de ce type cellulaire<sup>70,110,113</sup>. Une réduction dans les niveaux d'IL-2 produits par les lymphocytes T chez les patients atteints du LED a aussi été liée à une baisse de l'AICD conduisant à l'activation chronique de ces cellules et aux dommages tissulaires<sup>110,114</sup>. De plus, la baisse d'IL-2 dans le LED est également associée à une diminution du nombre de cellules Treg en périphérie<sup>114</sup>. D'autre part, une hausse de l'expression de COX-2 dans les lymphocytes T a été observée dans le LED et est responsable de la résistance à l'anergie et à l'apoptose de ces cellules autoréactives au niveau périphérique<sup>115</sup>. D'autre part, des perturbations dans les mécanismes de différenciation et de maturation des lymphocytes B dans la moelle osseuse ont également été identifiées<sup>75</sup>. En effet, des cellules précurseurs des lymphocytes B aux différents stades de maturation sont retrouvées dans le sang périphérique dans le LED<sup>111</sup>. Ces cellules immatures présentent tout de même la capacité de présenter des auto-antigènes aux lymphocytes T et peuvent être activées de façon inappropriée et contribuer au développement du LED. D'autre part, les niveaux du facteur d'activation des lymphocytes B (BAFF) sont souvent élevés dans la maladie favorisant donc la survie de ces cellules B autoréactives et leur production d'auto-anticorps<sup>76</sup>. De plus, les lymphocytes B régulateurs semblent avoir des fonctions régulatrices réduites dans le LED comparativement à la population générale, mais de plus amples études sont requises afin de bien comprendre le rôle de ces cellules dans la pathogenèse de cette maladie<sup>75</sup>.

D'autre part, le processus d'hypermutation somatique dans les CG peut également engendrer des mutations dans le BCR conduisant à la transition de clones de lymphocytes B non-autoréactifs en cellules B activées autoréactives<sup>75,116-118</sup>. Les mécanismes de maintien de la tolérance immunitaire dans les CG sont défectueux dans le LED<sup>119,120</sup>. Une activation excessive des TLR7, des défauts dans la régulation de l'expression du récepteur inhibiteur ciblant la portion Fc des IgG IIB (Fc $\gamma$ RIIB) et des défauts dans les voies d'apoptose dans les lymphocytes B ont, entre autres, été associés à la survie des clones autoréactifs générés dans les CG et à la production d'auto-anticorps<sup>119</sup>.

### **2.3.2 La présence d'antigènes du soi dans le milieu extracellulaire**

Les auto-anticorps dans le LED sont dirigés essentiellement contre des antigènes nucléaires, cytoplasmiques, mitochondriaux et situés au niveau de la membrane plasmique<sup>86,121-123</sup>. Étant d'origine intracellulaire, ces antigènes sont normalement à l'abri du système immunitaire. La présence anormale d'antigènes du soi dans le milieu extracellulaire dans le LED a été associée à des défauts dans les mécanismes de mort cellulaire et de clairance des débris cellulaires<sup>86,122,124,125</sup>.

#### **2.3.2.1 Défauts dans les mécanismes de mort cellulaire**

La présence d'antigènes du soi dans le milieu extracellulaire dans le LED est une conséquence de défauts dans les mécanismes de mort cellulaire comme l'apoptose, la nécrose, la NETose et la pyroptose<sup>122,124-128</sup>.

L'apoptose est une mort cellulaire programmée finement régulée qui ne cause normalement pas d'inflammation<sup>122,129</sup>. Les corps apoptotiques sont rapidement éliminés du milieu extracellulaire par phagocytose en conditions normales<sup>23</sup>. Dans le LED, l'apoptose est augmentée<sup>130-133</sup>. Cela peut être dû à des facteurs environnementaux tels que les UV, les infections ou encore à la prise de certains médicaments augmentant le taux de cellules qui entrent en apoptose et donc la quantité de corps apoptotiques produite<sup>129,133-135</sup>. D'autre part, des études ont démontré des niveaux élevés de facteurs pro-apoptotiques dans le sérum de patients atteints de LED induisant une hausse de cette voie de mort cellulaire<sup>130,132,136</sup>. Suite à l'apoptose, les antigènes du soi se retrouvent à l'intérieur ou à la surface des corps apoptotiques<sup>137</sup>.

Contrairement à l'apoptose, les nécroses primaires et secondaires sont des morts cellulaires non-silencieuses menant à la libération de DAMP tels que la *high mobility group box 1* (HMGB1) et les nucléosomes contenant de l'ADN double brin et des histones<sup>128,138</sup>. La nécrose primaire est activée par différents stress et dommages cellulaires comme une déplétion en ATP ou du stress oxydatif. Les cellules en apoptose ne sont pas bien éliminées dans le LED, s'accumulent et peuvent entrer en nécrose secondaire<sup>128,133</sup>. Les DAMP libérés par les cellules en nécrose échafaudent une réponse inflammatoire via l'activation des PRR, mais peuvent également représenter des cibles pour les auto-anticorps et contribuer au développement du LED. De plus, lorsque les cellules sont endommagées, celles-ci peuvent libérer leurs mitochondries dans le milieu extracellulaire<sup>123,139</sup>. Des antigènes du soi mitochondriaux tels que de l'ARN,

l'ADN et les antigènes à la surface des mitochondries sont exposées au système immunitaire dans le LED et également ciblés par des auto-anticorps<sup>123,140</sup>. Par leur origine bactérienne, les mitochondries arborent des PAMP reconnus par les PRR, leur conférant également un potentiel hautement inflammatoire<sup>139,141</sup>.

La NETose est une forme spécialisée de mort cellulaire des neutrophiles qui, suivant leur activation, peuvent libérer des pièges extracellulaires composés de chromatine décondensée et de différentes protéines antimicrobiennes des granules comme de l'élastase, la myéloperoxydase et la cathepsine G<sup>122,142</sup>. En plus des stimuli microbiens, la libération de pièges extracellulaires par les neutrophiles peut être stimulée par exemple par les ERO, le TNF $\alpha$ , l'IL-8, l'IL-1 $\beta$ , le facteur d'activation plaquettaire (PAF), la composante C5a du complément et les CI<sup>122,143-145</sup>. Dans le contexte hautement inflammatoire et avec la présence accrue de CI dans le LED, la NETose est augmentée en comparaison à la population générale<sup>143</sup>. Un type immature de neutrophile est également retrouvé chez les patients atteints de LED, les granulocytes de faible densité<sup>146</sup>. Cette sous-population de neutrophiles hautement inflammatoire libère de l'IFN de type I capable d'agir de façon autocrine et paracrine et d'induire la libération de pièges extracellulaires<sup>122</sup>. Notamment, les pièges extracellulaires peuvent contenir une quantité importante d'ADN mitochondrial (ADNmt) oxydé et d'autres protéines qui ont été identifiées comme étant des cibles des auto-anticorps dans le LED et médiant ainsi l'inflammation et les dommages tissulaires<sup>142,144,147</sup>. Une altération dans les mécanismes de clairance des pièges extracellulaires a été associée à des manifestations cliniques plus graves telles que la néphrite lupique<sup>148</sup>. Les antigènes du soi contenus dans les pièges extracellulaires peuvent médier l'inflammation en activant directement les cellules immunitaires ou le système du complément.

La pyroptose mise en place suivant l'activation de l'inflammasome est une autre forme de mort cellulaire inflammatoire pouvant être impliquée dans la pathogénèse du LED en exposant des antigènes du soi dans le milieu extracellulaire<sup>126-128</sup>. L'activation de l'inflammasome par des stimuli infectieux entraînent notamment la libération de la protéine HMGB1, de noyaux intacts et d'antigènes du soi précédemment internalisés dans le cas précis des phagocytes<sup>126,128</sup>. Des dérégulations dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages ont notamment été associés au LED<sup>149</sup>. L'IL-1 $\beta$ , l'IL-18 et la protéine HMGB1 peuvent entre autres mener à la libération de pièges extracellulaires par les neutrophiles qui, à leur tour, peuvent conduire à la pyroptose et accentuer la charge d'antigènes du soi dans le milieu extracellulaire<sup>128</sup>.

### **2.3.2.2 Défaits dans les mécanismes de clairance des auto-antigènes**

Les débris cellulaires et le déversement du contenu intracellulaire dérivés des mécanismes de mort cellulaire doivent être rapidement et efficacement éliminés du milieu extracellulaire afin de limiter les risques d'inflammation et d'auto-immunité. Le système du complément et la phagocytose sont étroitement impliqués dans ce processus. Toutefois, que ce soit par surcharge ou par déficience, ces mécanismes ne sont pas en mesure d'assurer l'élimination des auto-antigènes résultants de la mort cellulaire dans le LED engendrant une

persistance des antigènes intracellulaires dans le milieu extracellulaire<sup>150</sup>. Il y a donc une augmentation de la charge et de la disponibilité des antigènes du soi dans le milieu extracellulaire dans la maladie<sup>124</sup>.

En conditions normales, les débris cellulaires issus de la NETose, la nécrose et l'apoptose sont rapidement internalisés et éliminés du milieu extracellulaire par les phagocytes, principalement les macrophages<sup>151</sup>. Dans le LED, les macrophages peuvent présenter une activité phagocytaire déficiente et des défauts dans l'internalisation des débris cellulaires<sup>125,152,153</sup>. Le système du complément peut aussi jouer un rôle clé dans l'élimination des antigènes du soi du milieu extracellulaire. En effet, l'activation du système du complément permet de libérer des opsonines capables de lier les débris cellulaires et les auto-antigènes et activent leur récepteur respectif à la surface des macrophages<sup>154</sup>. Des déficiences génétiques dans les composantes C1q, C2 et C4 du complément ont été associées avec le développement du LED<sup>124,134,155</sup>. Plus de 90 % des patients présentant des déficiences pour C1q, C1r et C1s développent le LED<sup>150,154</sup>. De plus, une déficience homozygote pour la composante C1q mènent au développement du LED à un très jeune âge<sup>134</sup>. Les pièges extracellulaires issus de la NETose sont normalement dégradés par la DNase1 et opsonisés par la composante C1q du complément favorisant leur phagocytose par les macrophages<sup>151</sup>. Toutefois, en plus de la déficience de la composante C1q, le LED a également été lié à une activité réduite de la DNase1 qui favorise la persistance des auto-antigènes des pièges extracellulaires le milieu extracellulaire<sup>156</sup>. D'autre part, une déficience génétique entraînant une diminution des niveaux sériques de la protéine lectine liant le mannose (MBL) qui initie l'activation de la voie des lectines du complément a été identifiée dans la maladie<sup>157</sup>. Ces déficiences des premières composantes du système du complément entraînent une réduction de la clairance des débris cellulaires et donc l'exposition d'antigènes du soi dans le milieu extracellulaire<sup>150,158</sup>. En plus des déficiences génétiques, la mort cellulaire est augmentée pendant les phases de poussées pouvant ainsi mener à la consommation des composantes du complément, à une surcharge de ce mécanisme d'élimination des débris cellulaires et une dysfonction dans leur clairance<sup>150,159</sup>.

### **2.3.3 Activation des cellules T et B autoréactives**

L'activation des cellules T et B autoréactives est centrale dans la pathogenèse du LED. Les lymphocytes T et B sont hyperactivés dans la maladie<sup>86,160,161</sup>. Les DC sont la principale CPA capable d'activer les cellules T matures naïves, leur conférant un rôle clé dans la pathogenèse du LED<sup>162</sup>. La dérégulation des mécanismes de mort cellulaire et de clairance des débris cellulaires augmente la charge et la disponibilité des auto-antigènes dans le milieu extracellulaire<sup>124</sup>. Ceux-ci sont internalisés par les DC et présentés aux lymphocytes T autoréactifs, menant à leur activation. Les lymphocytes B sont activés à leur tour par les lymphocytes Tfh autoréactifs ou directement par les antigènes du soi en circulation engendrant la production d'auto-anticorps pathogéniques.

### **2.3.3.1 Rôle des DC dans l'activation des lymphocytes T autoréactifs**

Il existe essentiellement deux sous-types de DC : les DC myéloïdes (mDC) et plasmacytoïdes (pDC)<sup>163</sup>. En conditions normales, les antigènes du soi dérivés des débris de mort cellulaire sont présentés par des mDC immatures aux lymphocytes T sans les signaux de co-stimulation adéquats menant à l'anergie ou la délétion clonale des cellules T autoréactives ou encore au développement de lymphocytes Treg<sup>68,69,164,165</sup>. Dans le LED, les mDC sont matures et la présentation d'antigènes du soi mènent à l'activation des cellules T autoréactives<sup>162</sup>.

#### **2.3.3.1.1 Modifications post-traductionnelles des auto-antigènes**

Les auto-antigènes dérivés des débris de mort cellulaire dans le LED sont propices à subir des modifications post-traductionnelles par des enzymes impliquées dans les mécanismes de mort cellulaire<sup>166-168</sup>. Parmi les mécanismes de modification d'auto-antigènes impliqués dans le LED, on compte la transglutamination, la phosphorylation, la désamidation, la citrullination, l'oxydation, le clivage par des caspases, des endonucléases ou des granzymes B, la méthylation et le clivage de l'ADN et l'acétylation des histones<sup>124,166-171</sup>. Ces antigènes du soi modifiés ne sont plus reconnus comme du soi par le système immunitaire entraînant la maturation des DC et l'activation de lymphocytes T<sup>162,168</sup>. Ces lymphocytes T pourront contribuer à l'activation des lymphocytes B et à la libération d'anticorps dirigés contre les antigènes du soi modifiés. De plus, les lymphocytes B qui possèdent un BCR pour un antigène du soi modifié internalisent le complexe antigénique et peuvent ensuite présenter les épitopes non-modifiés de l'antigène du soi par le processus de diffusion des épitopes<sup>162</sup>. Ces lymphocytes B activent des lymphocytes T autoréactifs qui, à leur tour, pourront activer des lymphocytes B autoréactifs et conduire à la production d'auto-anticorps.

#### **2.3.3.1.2 Les IFN de type I**

Les IFN de type I, notamment les IFN $\alpha$  et  $\beta$ , sont des cytokines clés impliquées dans la pathogenèse du LED et leur niveau sérique traduit l'activité de la maladie<sup>69,172-175</sup>. En effet, le LED est caractérisé par une signature IFN de type I avec une augmentation de l'expression de ces cytokines et des gènes induits par les IFN de type I. Ces cytokines agissent à différents niveaux sur le système immunitaire et contribuent à la perte de tolérance immunitaire dans le LED. Entre autres, elles induisent la différenciation des monocytes en mDC, cellules présentatrices d'antigènes du soi aux lymphocytes T<sup>69,175,176</sup>. Les IFN de type I sont principalement libérés par les pDC suivant la phagocytose des antigènes du soi issus des débris de mort cellulaire<sup>69,133</sup>. L'ARN et l'ADN activent respectivement les TLR endosomaux 7 et 9 menant à leur libération d'IFN de type I<sup>69</sup>.

#### **2.3.3.1.3 Présentation immunogénique des antigènes du soi**

Les nécroses primaires et secondaires sont augmentées dans le LED et sont des voies de mort cellulaire inflammatoires qui mènent à la libération de DAMP<sup>153,162</sup>. Ces DAMP sont reconnus par les mDC via leur PRR

menant à leur maturation. De grandes quantités de corps apoptotiques peuvent également fournir les signaux nécessaires à la maturation des mDC<sup>177</sup>. Dans cet environnement, les mDC matures sont aptes à présenter des antigènes du soi, modifiés ou non, aux lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques et à monter une réponse immunitaire contre ces auto-antigènes<sup>69,162,177,178</sup>.

### **2.3.3.2 Activation des lymphocytes T autoréactifs**

Les signaux de co-stimulation et les cytokines libérées par les DC lors de la présentation d'antigènes influencent la polarisation des lymphocytes T auxiliaires en Th1, Th2, Th17, Tfh ou Treg<sup>176</sup>. Les lymphocytes Tfh jouent un rôle clé dans la formation et le maintien des CG, l'activation des lymphocytes B de haute affinité et la production d'auto-anticorps<sup>179</sup>. Le nombre de cellules Tfh en circulation est augmenté chez les patients atteints de LED et corrèle avec la quantité sérique d'anti-ADN double brin et l'activité de la maladie<sup>180</sup>. Une dérégulation des réponses Th1, Th2 et Th17 a été retrouvée chez les patients dans le LED avec une augmentation des cytokines typiques de ces réponses avec l'activité de la maladie<sup>181</sup>. Toutefois, la réponse Th17 semble être prédominante dans la pathogenèse de LED<sup>133,182-184</sup>. Les lymphocytes Th17 sont importants dans la médiation de l'inflammation et des dommages tissulaires. La réponse Th17 est normalement régulée par les Treg. Toutefois, le LED a été associé avec un débalancement dans les réponses Th17 et Treg : les Treg sont diminués pendant l'activité de la maladie, alors que les Th17 sont augmentés<sup>133,185-187</sup>.

### **2.3.3.3 Activation des lymphocytes B autoréactifs**

L'activation de lymphocytes B autoréactifs est essentielle à la production d'auto-anticorps et donc à la pathogenèse du LED<sup>44</sup>. Le nombre de cellules B à toutes étapes d'activation est augmenté en périphérie pendant les phases de poussées<sup>86</sup>. Entre 25 à 50 % des cellules B naïves matures en périphérie sont des cellules autoréactives comparativement à 5 à 20 % chez les patients sains<sup>188</sup>. De très faibles quantités d'antigènes solubles sont requis pour l'activation des lymphocytes B autoréactifs et la production d'auto-anticorps<sup>108</sup>. De plus, les lymphocytes B internalisent le complexe BCR-antigène et appréhendent les peptides du soi pour la présentation antigénique<sup>189</sup>. Par le processus de diffusion des épitopes, des épitopes autres que celui ciblé par le BCR peuvent ensuite être présentés aux lymphocytes T autoréactifs avec les signaux de co-stimulation nécessaires à leur activation<sup>37,44,108,190</sup>. Ce même processus de diffusion des épitopes est observable avec les antigènes du soi modifiés<sup>162</sup>. Ainsi, les lymphocytes T et B s'influencent réciproquement à être délétères dans le LED et assurent la progression de la maladie : les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> aide la réponse humorale et la production d'auto-anticorps par les plasmocytes, alors que les lymphocytes B permettent l'activation de lymphocytes T autoréactifs qui pourront, à leur tour, activer davantage de lymphocytes B autoréactifs<sup>37</sup>. De plus, différents signaux présents dans le LED tels que des niveaux élevés du BAFF, l'activation des TLR, la surexpression de signaux de co-stimulation par les lymphocytes T et l'augmentation de cytokines comme l'IL-21 peuvent mener à l'activation polyclonale de lymphocytes B naïfs et la commutation

isotypique indépendamment du BCR et de la présence de leur antigène spécifique<sup>191,192</sup>. De plus, une grande proportion des lymphocytes B naïfs dans le LED produisent des auto-anticorps polyréactifs, c'est-à-dire capable de reconnaître plusieurs épitopes d'antigènes du soi, avec un potentiel pathogénique considérable<sup>191</sup>.

### **2.3.4 Les auto-anticorps**

La production d'auto-anticorps pathogéniques est une composante importante de la pathogenèse du LED<sup>78,121</sup>. Ils se lient aux antigènes du soi pour former des CI dans la circulation sanguine ou localement dans les tissus et médient l'inflammation et les dommages tissulaires<sup>78</sup>. Tous les tissus et organes du corps peuvent être touchés par les CI dans le LED<sup>134,193</sup>. Plus d'une centaine d'anticorps ciblant des antigènes du soi ont été identifiés dans le LED<sup>121</sup>. Les auto-anticorps sont essentiellement dirigés contre des antigènes intracellulaires nucléaires, cytoplasmiques et situés au niveau de la membrane plasmique, normalement à l'abri du système immunitaire<sup>86,121</sup>. Les anticorps anti-nucléaires (ANA) sont retrouvés chez environ 99 % des patients et sont le type d'auto-anticorps les plus caractéristiques du LED avec les anti-Smith dirigés contre certaines petites ribonucléoprotéines<sup>86,121,194</sup>. De 55 à 75 % du répertoire de lymphocytes B autoréactifs produisent des ANA et sont polyréactifs dans le LED<sup>188</sup>. Les auto-anticorps dirigés contre les nucléosomes et l'ADN double brin sont également présents chez la majorité des patients<sup>121</sup>. Les anticorps anti-ADN double brin ne sont pas dirigés uniquement contre l'ADN double brin, mais sont également capables de lier l'ADNmt<sup>195</sup>. Des auto-anticorps dirigés contre les antigènes à la surface des mitochondries et l'ADNmt sont fréquemment retrouvés chez les patients atteints de LED<sup>123</sup>. Les autres auto-anticorps sont moins répandus dans l'ensemble des patients et sont associés à des manifestations cliniques spécifiques<sup>121</sup>. De plus, ils peuvent ou non corrélérer avec l'activité de la maladie comme c'est le cas par exemple avec les auto-anticorps dirigés contre l'ADN double brin.

Toutes les classes d'Ig peuvent être associées à de l'autoréactivité dans le LED<sup>194</sup>. Cependant, ils ne contribuent pas tous de la même façon à la pathogenèse de la maladie. En effet, les auto-anticorps de type IgG représentent la classe d'Ig la plus importante en termes de quantité, mais également la plus pathologique dans le LED, alors que les IgM sont davantage protecteurs et diminuent les manifestations de la maladie en favorisant une meilleure clairance des corps apoptotiques<sup>194,196-198</sup>. Le changement de classes des anticorps libérés par les plasmocytes des IgM vers les IgG promeut les dommages tissulaires via l'activation du système du complément et des Fc $\gamma$ R des cellules immunitaires<sup>194</sup>. La commutation isotypique est favorisée par les œstrogènes et limitée par les androgènes. Une corrélation positive est établie entre les niveaux sériques d'IgG et l'apparition des manifestations cliniques de la maladie.

## **2.4 Diagnostic**

Le diagnostic de LED est posé en moyenne six ans après l'apparition des premiers symptômes et 63 % des patients reçoivent un mauvais diagnostic avant celui du LED<sup>199</sup>. Le diagnostic est difficile à établir pour différentes raisons. D'une part, les manifestations cliniques sont extrêmement hétérogènes et fluctuent au fil

du temps chez un même patient<sup>134,193</sup>. De plus, ces symptômes peuvent être attribuables à plusieurs maladies et les patients sont amenés à consulter différents spécialistes de la santé avant que le LED soit suspecté. D'autre part, l'absence d'un test diagnostique unique rend d'autant plus difficile l'identification du LED<sup>193</sup>.

### **2.4.1 Symptômes**

Tous les tissus du corps peuvent être touchés par le dépôt ou la formation *in situ* de CI dans le LED<sup>134,193</sup>. La maladie couvre donc un très large spectre de symptômes. Fatigue chronique, perte d'appétit, variations de poids, fièvre inexplicée, sensibilité au soleil, éruptions cutanées, ulcères buccaux, alopecie, douleurs et enflures articulaires, douleurs et faiblesses musculaires, douleur thoracique à l'inspiration, maux de tête, problèmes de mémoire, convulsions, psychose et troubles de l'humeur sont tous des symptômes du LED qui peuvent amener les patients à consulter un professionnel de la santé<sup>200</sup>.

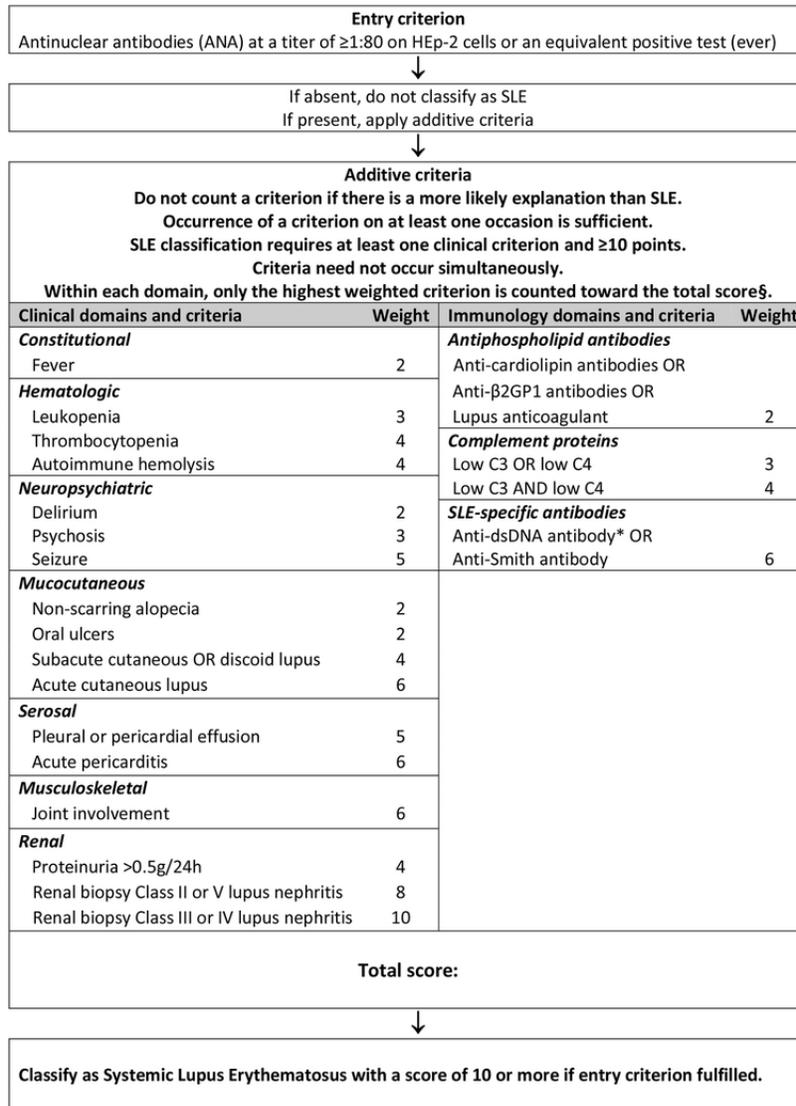
### **2.4.2 Critères de classification**

Pendant des dizaines d'années, les critères de classification établis par l'*American College of Rheumatology* (ACR) en 1971, puis mis à jour en 1982 et en 1997, ont été utilisés mondialement pour établir le diagnostic de LED<sup>201</sup>. Des avancées scientifiques dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie ont mené à une actualisation des critères de classification de l'ACR en 2012 par le groupe *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC). Cela a conduit à l'augmentation de la sensibilité, mais une perte de la spécificité du diagnostic par rapport à la version de 1997 de l'ACR menant donc à des diagnostics erronés de LED. En 2019, la *European League Against Rheumatism* (EULAR) et l'ACR ont développé une nouvelle classification de la maladie qui est utilisée aujourd'hui avec une sensibilité et une spécificité très élevées.

Dans les critères de classifications de l'EULAR/ACR de 2019, le critère d'entrée est un test hématologique positif pour les ANA (Figure 1.1). Davantage de critères immunologiques et cliniques sont ensuite étudiés avec un pointage spécifique ayant été attribué à chacun d'entre eux. Si le pointage total est supérieur à 10, alors le diagnostic de LED est posé.

## **2.5 Traitements**

La prise en charge rapide et adéquate des patients avec des traitements immunomodulateurs est essentielle suivant le diagnostic du LED<sup>134</sup>. Le but du traitement est, d'une part, de minimiser l'activité de la maladie afin de limiter au maximum les dommages aux organes et tissus du corps. D'autre part, il permet de limiter l'apparition de comorbidités secondaires au LED et de diminuer les symptômes de fatigue et de douleur afin d'améliorer la qualité de vie des patients. Contrairement à d'autres maladies rhumatismales, les traitements spécifiques au LED restent limités et certains comportent des effets secondaires considérables<sup>78</sup>. Le ratio bénéfices-risques de chaque traitement doit donc être rigoureusement évalué et les patients sont étroitement suivis médicalement. De plus, les études cliniques ne sont pour la plupart pas faites chez des patients atteints



**Figure 1.1 Critères de classification du LED établis par l'EULAR et l'ACR en 2019.** Le critère d'entrée pour le diagnostic du LED est la présence sérique d'ANA (titre de 1 : 80). Différents critères cliniques pour les manifestations multi-organes et les critères immunologiques sont ensuite étudiés chez les patients. Au minimum un critère du domaine clinique doit être présent et le pointage doit être minimalement de 10 points pour établir le diagnostic de LED. Figure tirée de Aringer M., *et al.* Arthritis Rheumatology. 2019.

du LED et plusieurs traitements s'avèrent inefficaces ou peu tolérés chez une grande proportion de ces patients. Comme le LED est une maladie systémique qui résulte d'une dérégulation à plusieurs niveaux du système immunitaire, il existe différentes classes de médicaments qui agissent sur l'activité du système immunitaire typiquement offerts aux patients atteints du LED.

### 2.5.1 Anti-inflammatoires non-stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) sont utilisés chez environ 80 % des patients atteints du LED pour soulager notamment les symptômes de maux de tête, de fièvre et de douleurs musculo-squelettiques<sup>202</sup>.

Toutefois, les AINS peuvent interférer avec la clairance de certains autres traitements du LED tels que le méthotrexate et la warfarine et causer de la toxicité. De plus, les AINS peuvent avoir des effets néfastes sur le système gastro-intestinal, les reins, le foie, le système nerveux central, la peau et sur la fonction reproductrice. La prise d'AINS s'avère bénéfique pour la plupart des patients avec un suivi étroit.

### **2.5.2 Anti-malariens**

L'hydroxychloroquine et la chloroquine sont des agents anti-malariens les plus largement utilisés dans le LED<sup>84,134</sup>. Parmi les effets attribuables aux anti-malariens, on compte une inhibition de l'activation des TLR limitant ainsi la production d'IFN $\alpha$  et la présentation d'auto-antigènes, deux composantes importantes dans la pathogenèse de la maladie<sup>203</sup>. Les principaux effets secondaires sont de la toxicité rétinale, cardiovasculaire et neurologique. Toutefois, la prise à long terme et pendant la grossesse d'anti-malariens reste sécuritaire et permet une diminution des phases de poussées et une meilleure longévité chez ces patients<sup>204,205</sup>.

### **2.5.3 Glucocorticoïdes**

Les glucocorticoïdes sont fréquemment utilisés dans le traitement du LED et ont un effet anti-inflammatoire systémique<sup>206</sup>. Parmi les effets secondaires non négligeables, on compte un risque accru d'infections et une augmentation du risque de développer du diabète mellitus, de l'ostéoporose et de l'hypertension. L'usage à long terme et de doses élevées de glucocorticoïdes ne sont pas recommandées, mais parfois nécessaires.

### **2.5.4 Thérapies biologiques**

Les thérapies biologiques fonctionnent très bien chez un certain nombre de patients. Ce sont essentiellement des anticorps monoclonaux qui ciblent différents aspects de la réponse immunitaire impliqués dans la pathogenèse du LED<sup>134</sup>. À titre d'exemple, le rituximab mène à la déplétion des lymphocytes B périphériques, l'abatacept intervient dans la co-stimulation des lymphocytes T, alors que l'épratuzumab module la signalisation du BCR menant à une diminution de l'activation des lymphocytes B<sup>84,134,207,208</sup>. Le bélimumab est le premier traitement biologique à avoir été développé et accepté pour le traitement du LED en 60 ans<sup>84,209</sup>. Il agit aussi sur la survie des lymphocytes B en ciblant le BAFF. Malheureusement, il est dispendieux et doit être administré par voie intraveineuse, le rendant inaccessible pour certains patients<sup>210</sup>.

### **2.5.5 Autres agents immunosuppresseurs**

D'autre part, différents médicaments avec des caractéristiques immunosuppressives et qui agissent à différents niveaux sur le système immunitaire sont également utilisés dans le traitement du LED. Parmi les plus utilisés, l'azathioprine bloque le signal des molécules CD28 des lymphocytes T et le méthotrexate interfère avec la réplication de l'ADN<sup>134</sup>. De plus, les inhibiteurs de la calcineurine bloquent l'activation des lymphocytes T et B, le mycophénolate mofétil bloque leur prolifération et la cyclophosphamide assure leur

déplétion<sup>134,210</sup>. Ces agents permettent de diminuer efficacement l'activité de la maladie et de diminuer les doses de glucocorticoïdes utilisés.

## **2.6 Évolution de la maladie**

Le diagnostic rapide est essentiel pour limiter les atteintes multi-organes et les complications à long terme du LED. En effet, les patients qui reçoivent rapidement un diagnostic de LED après l'apparition des premiers symptômes sont moins propices à avoir des périodes de poussées et ont moins recours à des soins de santé<sup>193</sup>. De plus, la mise en place rapide d'un traitement est cruciale dans l'évolution de la maladie. La prise en charge et l'accès à des médecins spécialistes sont donc essentiels<sup>211</sup>. En ce sens, les conditions socio-économiques peuvent également être déterminantes sur l'évolution de la maladie, puisque les patients moins fortunés n'auront peut-être pas la chance d'avoir recours aux soins de santé et aux traitements dont ils ont besoin<sup>210,211</sup>. Parmi les autres facteurs pouvant influencer l'activité de la maladie, on compte l'âge, le sexe, la localisation géographique et l'ethnicité des patients<sup>82</sup>. Les patients qui développent le LED à un jeune âge sont davantage à risques de subir des dommages irréversibles aux organes vitaux et d'être touchés par une mortalité prématurée<sup>194</sup>. Un suivi étroit de l'activité de la maladie pour ces patients, et de façon générale dans le LED, est donc nécessaire<sup>84</sup>. Le risque de mortalité est augmenté de 3 à 4 fois chez les patients atteints du LED comparativement à la population générale<sup>210,211</sup>. Ce risque accru de mortalité peut être relié à des complications cardiovasculaires associées à une accélération de l'athérosclérose conséquemment à la persistance de l'activité de la maladie<sup>84,205</sup>. La prise d'agents immunosuppresseurs rend les patients particulièrement vulnérables aux infections et au développement de cancers et est également reliée à la mortalité dans le LED. L'ostéoporose est aussi une comorbidité chez les patients atteints du LED et est surveillée étroitement lors des suivis médicaux<sup>84</sup>.

## **3 La néphrite lupique**

Plus de 60% des patients atteints du LED développent une forme plus ou moins sévère de néphrite lupique<sup>212</sup>. La néphrite lupique englobe toutes les manifestations rénales dans le LED. Le développement des atteintes rénales implique les mêmes mécanismes de perte de tolérance immunitaire que ceux impliqués de façon générale dans le LED. En effet, la néphrite lupique est associée à la production d'auto-anticorps pathogéniques et à leur présence sous forme de CI aux reins. Via l'activation de cellules effectrices et du système du complément, les CI médient une réponse inflammatoire locale délétère menant à des dommages tissulaires. Les atteintes rénales dans le LED sont le prédicteur le plus important de morbidité et de mortalité<sup>82,84,212,213</sup>. Entre 10 à 30 % des patients présentant des implications rénales développent de l'insuffisance rénale terminale dans les 15 ans suivant le diagnostic de néphrite lupique<sup>212</sup>.

## 3.1 Facteurs de risques

Dans plus de 60 % des cas, les patients atteints du LED développent une forme de néphrite lupique<sup>212</sup>. Il est estimé qu'un pourcentage beaucoup plus important de patients lupiques présentent des atteintes rénales sans aucune manifestation clinique, condition connue sous le nom de néphrite lupique silencieuse<sup>214</sup>. Différents facteurs de risques ont été associés à la progression de la néphrite lupique jusqu'à l'insuffisance rénale terminale, la condition la plus sérieuse et grave de la maladie<sup>215</sup>. Le jeune âge des patients est l'un des principaux facteurs de risque pour le développement de la néphrite lupique<sup>212,216</sup>. En effet, 75 % des enfants atteints du LED développent la néphrite lupique à un moment ou à un autre de la maladie et 18 à 50 % d'entre eux de l'insuffisance rénale terminale. De plus, la prise en charge des patients atteints de néphrite lupique à un jeune âge nécessite des traitements immunosuppresseurs beaucoup plus agressifs, les rendant plus à risques de souffrir d'effets secondaires reliés à leur médication. Puisque les patients de sexe féminin sont davantage touchés par le LED que ceux de sexe masculin, davantage de femmes que d'hommes développent la néphrite lupique<sup>212</sup>. Toutefois, les hommes sont touchés beaucoup plus sévèrement et ont plus de chances de développer des formes sévères d'atteintes rénales<sup>212,217</sup>. Les patients afro-américains, afro-caribéens et d'origine hispanique et asiatique développent davantage et plus hâtivement la néphrite lupique que les patients caucasiens et sont également plus à risque de développer des formes sévères de la maladie<sup>79,212,216,218-220</sup>. L'accès à des soins de santé et le traitement rapide de la néphrite lupique sont associés à un meilleur pronostic<sup>212,221</sup>. La compliance du patient est également un facteur important et favorable dans la gestion de l'activité de la maladie. De plus, les facteurs socio-économiques influencent l'évolution de la néphrite lupique, la pauvreté étant associée à un moins bon pronostic<sup>222</sup>. La présence de certaines comorbidités telles que l'obésité, le diabète et de l'hypertension a été associée à un plus grand risque de développer de l'insuffisance rénale terminale<sup>212</sup>.

### 3.1.1 Prédipositions génétiques

Une cinquantaine d'allèles de susceptibilité ont été reliés aux atteintes rénales dans le LED<sup>156</sup>. Ils peuvent être associés à des dérégulations du système immunitaire au niveau systémique contribuant en amont au développement de la néphrite lupique ou encore à des mécanismes pathogéniques intra-rénaux qui mènent aux dommages tissulaires et aux manifestations rénales dans LED. Des polymorphismes au niveau des gènes codant pour le récepteur Fas et son ligand FasL favorisant les voies de l'apoptose, ainsi que du gène DNASE1 diminuant la dégradation des pièges extracellulaires ont été associés au développement de la néphrite lupique<sup>223-225</sup>. Différents polymorphismes dans les gènes codant pour différents FcγR tels que FcγRIIA-R131, FcγRIIB-T232, FcγRIIIA-158V, FcγRIIIB-NA1 et FcγRIIIB-NA2 ont également été observés dans la néphrite lupique<sup>226-231</sup>. Une déficience génétique pour l'opsonine C1q et des mutations au niveau des récepteurs des composantes C2 et C4 du complément sont aussi associées aux atteintes rénales dans le LED<sup>232</sup>. Certains

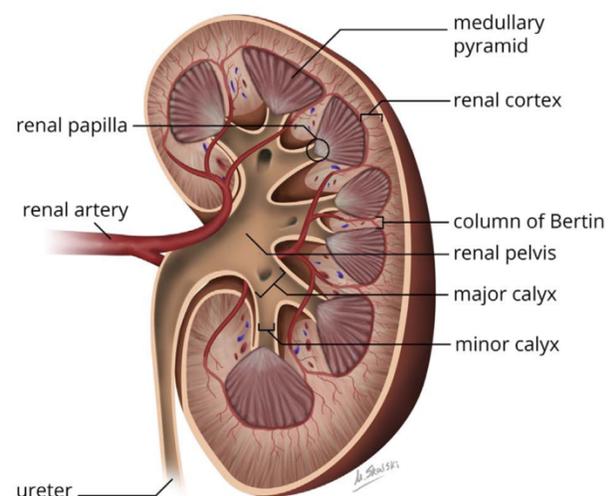
allèles de susceptibilité au niveau des gènes codant pour HLA-DR2 et HLA-DR3 impliqués dans la présentation d'antigènes aux lymphocytes T sont liés au développement de la néphrite lupique<sup>233</sup>.

## 3.2 Les reins

Les reins sont de petits organes d'environ 150 g avec une forme rappelant celle d'un haricot rouge<sup>234</sup>. Pour leur petite taille, les reins reçoivent un apport sanguin impressionnant pouvant aller jusqu'à 20 % du débit cardiaque au repos<sup>234,235</sup>. Ils sont localisés dans la cavité abdominale postérieure de chaque côté de la colonne vertébrale : le rein droit se situe sous le foie et le rein gauche sous la rate<sup>225</sup>. En plus d'être protégés par la cage thoracique, les reins sont aussi recouverts d'une couche de tissu adipeux, graisse périnéphrique, qui assure l'absorption des chocs corporels. Via les processus de filtration, de réabsorption et de sécrétion, les reins assurent l'épuration du sang et l'élimination des déchets via l'urine. L'appareil urinaire est constitué des reins, des uretères, de la vessie et de l'urètre.

### 3.2.1 Anatomie des reins

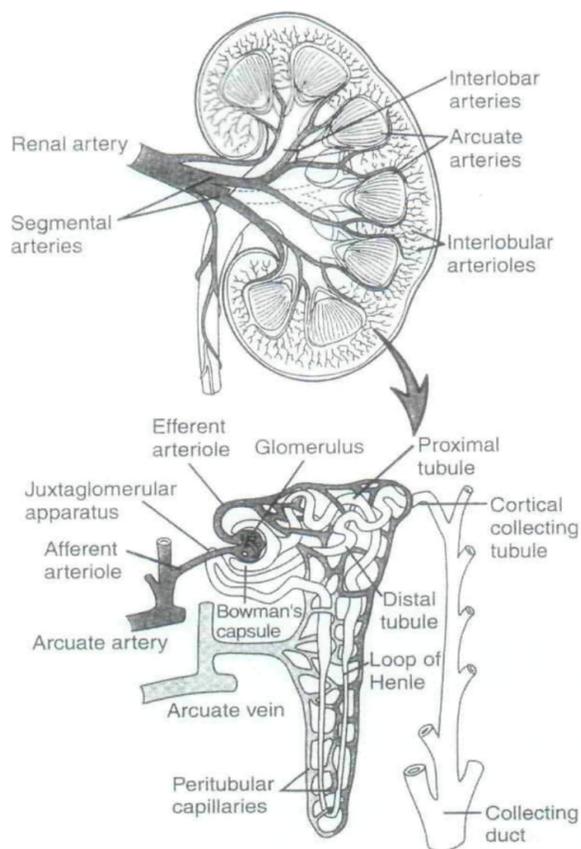
Les reins se composent essentiellement d'une zone externe, le cortex, et d'une zone interne, la médulla rénale<sup>234,236</sup> (Figure 1.2). La médulla est formée de structures pyramidales nommées pyramides de Malpighi et chaque rein en comprend entre 5 et 11<sup>236</sup>. La médulla s'étend jusqu'aux papilles rénales à la base des pyramides de Malpighi. Chaque pyramide de Malpighi se déverse dans un calice mineur<sup>234</sup>. Les calices majeurs reçoivent l'urine de trois à quatre calices mineurs, puis se déversent à leur tour dans le pelvis rénal. L'urine est acheminée du pelvis rénal jusqu'à la vessie par l'uretère et jusqu'à l'extérieur du corps via l'urètre.



**Figure 1.2 Représentation transversale des structures anatomiques rénales.** Les reins se composent d'une zone externe, le cortex (*renal cortex*), et d'une zone interne, la médulla. Le cortex comprend la zone superficielle du rein, mais également les colonnes de Bertin (*column of Bertin*) qui lui servent d'ancrage. La médulla se compose des pyramides de Malpighi (*medullary pyramid*) et se termine au niveau des papilles rénales (*renal papilla*). L'urine formée dans chacune des pyramides de Malpighi se déverse dans un calice mineur (*minor calyx*). Les calices majeurs (*major calyx*) reçoivent l'urine de plusieurs calices mineurs. Finalement, l'urine converge vers le pelvis rénal (*renal pelvis*) et est conduite vers la vessie via l'uretère (*ureter*). Figure tirée avec permissions de Gulati M., et al. *Clinical Imaging*. 2018.

#### 3.2.1.1 Anatomie vasculaire

Le rein est un organe hautement vascularisé et reçoit jusqu'à 20 % du débit cardiaque au repos, soit environ 1,2 litre de sang par minute<sup>234,235</sup>. Le rein est irrigué par l'aorte abdominale et le sang veineux retourne au cœur via la veine cave inférieure<sup>234</sup>. L'aorte abdominale donne lieu aux artères rénales qui



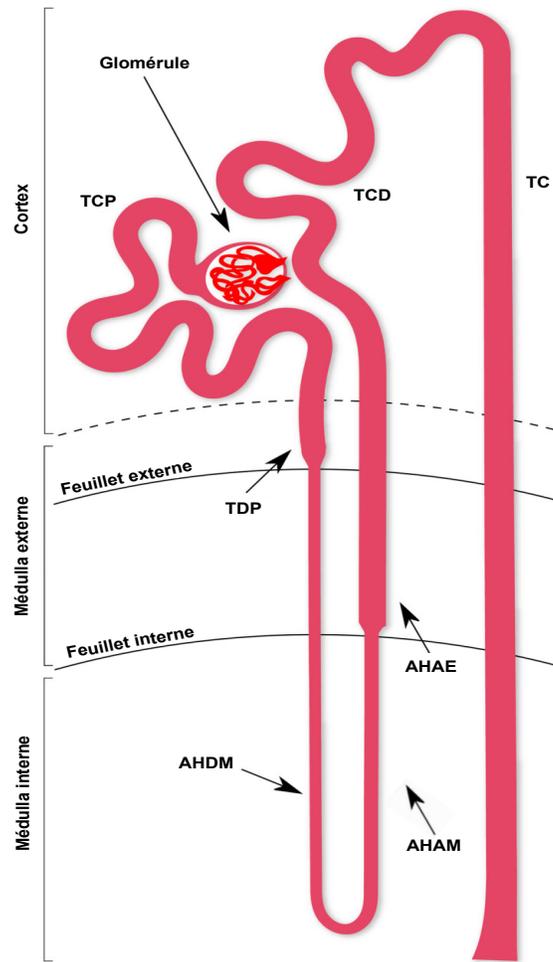
**Figure 1.3 Représentation de l'anatomie vasculaire du rein.** Le rein est irrigué par l'artère rénale qui donne lieu à son tour aux artères segmentaires (*segmental arteries*), interlobaires (*interlobar arteries*), arquées (*arcuate arteries*), puis aux artérioles interlobulaires (*interlobular arterioles*) et afférentes (*afferent arteriole*). Le sang est filtré au niveau des capillaires glomérulaires qui composent les glomérules (*glomerulus*). Le sang est ensuite acheminé aux capillaires péritubulaires (*peritubular capillaries*) par l'artériole efférente (*efferent arteriole*). Le sang quitte le rein subséquemment par les veinules efférentes et interlobulaires, puis par les veines arquées, interlobaires, segmentaires et finalement par la veine cave inférieure. Figure tirée avec permissions du *Nephrology Nursing Journal* de Chmielewski C., *Nephrology Nursing Journal*, 2003.

se subdivisent dans le parenchyme rénal en artères de taille de plus en plus petite (Figure 1.3). Une particularité de la circulation sanguine rénale est la présence de deux lits capillaires en série. Le premier lit capillaire prend forme à partir des artérioles afférentes et se compose d'un amas de capillaires glomérulaires où a lieu la filtration du sang. Le réseau glomérulaire et les capillaires péritubulaires où se produisent l'échange de nutriments sont reliés par l'artériole efférente. Une seconde caractéristique des capillaires glomérulaires est leur porosité. En effet, par leur fonction de filtration et d'épuration du sang, les capillaires glomérulaires permettent l'exsudation de davantage de liquide et de protéines du plasma comparativement aux capillaires systémiques. Le réseau péritubulaire est quant à lui de faible pression et permet la réabsorption de l'eau et des nutriments qui sont continuellement libérés dans l'interstitium de la médulla rénale lors du processus de réabsorption. Le sang quitte les reins par un réseau veineux similaire au réseau artériel.

### 3.2.2 Le néphron

L'unité fonctionnelle du rein est le néphron et chaque rein en comprend environ un million<sup>234,237,238</sup>. Le néphron se compose d'un glomérule suivi d'un système tubulaire comprenant

un tubule contourné proximal, un tubule droit proximal, l'anse de Henle, un tubule contourné distal et un tubule collecteur (Figure 1.4)<sup>234,239</sup>. Les glomérules et les tubules proximaux sont situés dans le cortex. Tout dépendant de la localisation des glomérules dans le cortex, les néphrons peuvent être corticaux (85 %) pour les glomérules davantage en périphérie du rein ou juxtamédullaires (15 %) pour ceux qui sont plus près de la jonction entre le cortex et la médulla. Le tubule proximal est ensuite suivi de l'anse de Henle qui est formée d'un segment descendant et ascendant parcourant la médulla rénale. Finalement, une partie de l'anse ascendante épaisse et du tubule distal se retrouvent dans le cortex. Ceux-ci se déversent dans les tubules



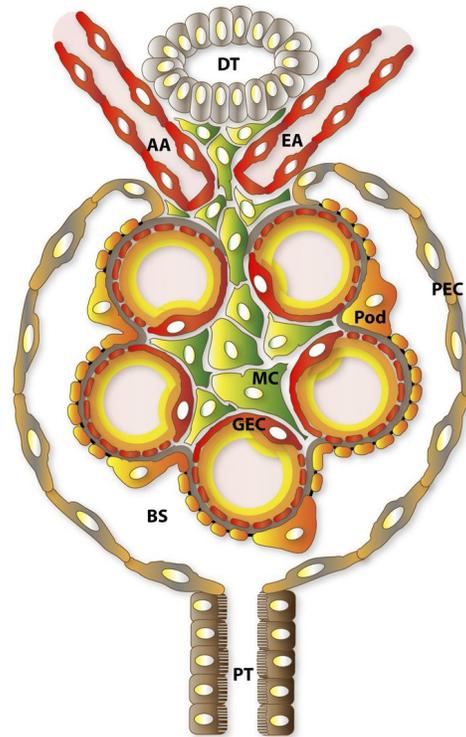
**Figure 1.4 Structure d'un néphron.** Le néphron se compose d'un glomérule suivi d'un système tubulaire comprenant successivement un tubule contourné proximal (TCP), un tubule droit proximal (TDP), un segment descendant mince (AHDM), ascendant mince (AHAM) et ascendant épais (AHAE) de l'anse de Henlé, un tubule contourné distal (TCD) et un tubule collecteur (TC). Image adaptée de la figure 1 de Kumaran G.K. & Hanukoglu I., *The FEBS Journal*, 2019.

collecteurs qui descendent le long de la médulla et qui se déversent dans le calice mineur. Toutes les parties du néphron sont impliquées dans la formation de l'urine<sup>234,240</sup>. La production d'urine dépend de la filtration glomérulaire, mais aussi des processus de réabsorption et de sécrétion par les tubules rénaux.

### 3.2.2.1.1 Filtration

La fonction de filtration du sang est assurée par les glomérules rénaux<sup>234,235</sup>. Ceux-ci se composent d'un réseau de capillaires glomérulaires enchevêtrés sous forme de sphère et encapsulé dans la capsule de Bowman (Figure 1.5). Les cellules mésangiales assurent l'ancrage des capillaires glomérulaires dans les glomérules. Les capillaires glomérulaires sont formés de trois couches de filtration : un endothélium capillaire, une membrane basale glomérulaire (GBM) et un épithélium formé par les podocytes. L'endothélium des capillaires glomérulaires est caractéristique : celui-ci possède des fenestrations de 60 à 100 nm laissant

passer l'eau, les électrolytes, le glucose, des petites protéines et certains déchets métaboliques comme l'urée et la créatinine. La GBM est quant à elle composée d'une matrice notamment formée de collagène, de laminine et de protéoglycanes à héparane sulfate. En plus de limiter le passage des grosses molécules du sang, elle présente une charge nette négative ce qui limite la filtration de macromolécules anioniques du sang comme l'albumine. Les podocytes sont un type spécialisé de cellules épithéliales qui composent le feuillet externe de la capsule de Bowman. Ils forment des extensions nommées pédicelles qui s'étendent et reposent sur la GBM. Ensembles, ces pédicelles forment des fentes de filtration qui assurent également la rétention des molécules de grandes tailles. En somme, la présence de deux réseaux capillaires en série permet d'avoir une pression hydrostatique dans les capillaires glomérulaires assurant la filtration du sang et certains solutés et la formation de l'urine primaire dans l'espace de Bowman<sup>234,241</sup>. En contrepartie, la pression oncotique exercée par les protéines plasmatiques assure que tout le liquide plasmatique n'est pas filtré et en retient une partie à l'intérieur des vaisseaux sanguins<sup>241</sup>.



**Figure 1.5 Structure des glomérules rénaux.** La capsule de Bowman qui délimite les glomérules est tapissée de cellules pariétales épithéliales (PEC). Les capillaires glomérulaires sont composés de trois couches de filtration : les cellules endothéliales glomérulaires (GEC), de la GBM représentée en gris et des podocytes avec leurs pédicelles (Pod). L'urine primaire se retrouve dans l'espace de Bowman (BS) et continue vers le tubule proximal (PT). Les cellules mésangiales (MC) servent d'ancrage aux capillaires glomérulaires. AA, artériole afférente ; EA, artériole efférente ; DT, tubule distal. Image tirée de la figure 1 de Scott P.R. & Quaggin E.S., *Journal of Cell Biology*, 2015.

### 3.2.2.1.2 Réabsorption et sécrétion

Le rein a un taux de filtration glomérulaire d'environ 125 ml par minute et donc environ 180 litres de sang sont filtrés par les reins chaque jour<sup>234</sup>. Ce n'est qu'une infime partie de ce volume, environ 1,5 litres, qui est excrétée via l'urine, alors que près de 99 % est réabsorbée par les tubules rénaux. Le processus de sécrétion permet à des substances qui auraient été insuffisamment ou n'auraient pas été filtrées au niveau des glomérules d'être éliminées dans l'urine à l'aide de transporteurs spécifiques dans les tubules rénaux.

Bien qu'elle ait lieu tout au long du néphron, les tubules proximaux sont un site de réabsorption majeur<sup>234</sup>. En effet, la majorité du glucose, des acides aminés, du bicarbonate et des phosphates, une grande

partie du chlore, du sodium, de l'urée et du calcium et une partie du potassium sont notamment réabsorbés par transport passif et actif au niveau des tubules proximaux. De plus, l'albumine qui est filtrée au niveau des glomérules est réabsorbée par un processus d'endocytose au niveau des tubules proximaux<sup>242</sup>. La présence d'albumine dans l'urine, albuminurie, traduit un défaut dans les processus de filtration et/ou de réabsorption de l'albumine. La réabsorption du chlore, du sodium, du potassium, du bicarbonate, du magnésium et du calcium se fait passivement au niveau des anses minces de Henlé et des tubules distaux<sup>234</sup>. L'anse de Henlé ascendante épaisse est un site important de réabsorption active du sodium et du potassium via des pompes  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ <sup>243</sup>. D'autre part, la réabsorption de l'eau notamment dans les tubules collecteurs est régulée par l'hormone antidiurétique qui contrôle la perméabilité des tubules<sup>234</sup>. Ceux-ci sont aussi le lieu d'acidification de l'urine avec la sécrétion active d'hydrogène dans l'urine. De plus, les tubules collecteurs se composent des cellules principales et intercalaires dont ces dernières ont récemment été identifiées comme participant dans les mécanisme d'inflammation aux reins<sup>234,244</sup>.

#### 3.2.2.1.3 Autres fonctions rénales

Par ses fonctions de filtration, réabsorption et sécrétion, le rein joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie du corps en éliminant les déchets et en assurant la régulation du volume et de l'équilibre électrolytique et acido-basique du sang<sup>234,235,245</sup>. Le glomérule est également couplé à l'appareil juxtaglomérulaire, structure endocrine et autorégulatrice. Cet appareil produit la rénine, une enzyme capable de réguler la pression artérielle via le système rénine-angiotensine-aldostérone et, par conséquent, la filtration glomérulaire. De plus, l'érythropoïétine, une hormone responsable de la synthèse des érythrocytes dans la moelle osseuse, est majoritairement produite par les reins<sup>235,246</sup>. Les cellules épithéliales proximales produisent aussi du calcitriol, la forme active de vitamine D<sup>235,247</sup>.

### 3.3 Pathogenèse de la néphrite lupique

La pathogenèse de la néphrite lupique est associée à la formation de CI aux reins. Ceux-ci médient l'activation du système du complément et le recrutement de cellules immunitaires dans le parenchyme rénal. Les cellules effectrices sont activées via les récepteurs pour les composantes du complément, les  $\text{Fc}\gamma\text{R}$  et les PRR cytosoliques et endosomaux menant à de l'inflammation locale<sup>197</sup>. Si elle n'est pas adéquatement prise en charge, la chronicité de l'inflammation peut conduire à des dommages glomérulaires, tubulointerstitiels ou vasculaires, à une perte de fonction rénale et ultimement à l'insuffisance rénale terminale<sup>248</sup>.

#### 3.3.1 Les CI aux reins dans la néphrite lupique

Par leur fonction d'épuration du sang, les reins filtrent une quantité importante de sang chaque jour. Ils sont ainsi particulièrement vulnérables au dépôt d'auto-anticorps présents dans le sang dans le LED<sup>249</sup>. La

présence d'anticorps dirigés contre les antigènes du soi aux reins est une composante importante dans la pathogenèse du LED et l'initiation des dommages tissulaires<sup>248,250</sup>.

### **3.3.1.1 Les auto-anticorps associés aux atteintes rénales**

Parmi la centaine d'auto-anticorps identifiée dans le LED, les auto-anticorps dirigés contre l'ADN double brin et le nucléosome sont ceux qui sont le plus étroitement liés avec le développement de la néphrite lupique<sup>86,108,248</sup>. La corrélation n'est toutefois pas absolue entre la néphrite lupique et les anticorps anti-ADN double brin et ceux-ci sont absents chez certains patients présentant des atteintes rénales<sup>86</sup>. Dans les modèles murins de la maladie, les anticorps anti-ADN double brin sont capables d'induire la néphrite lupique et ont été localisés au niveau des capillaires glomérulaires<sup>251</sup>. Des dépôts intranucléaires de ces auto-anticorps, liés à l'ADN, ont également été identifiés dans les glomérules. La présence d'auto-anticorps dirigés contre l'ADNmt corrèle avec le développement de la néphrite lupique dans le LED<sup>123</sup>. Les anticorps dirigés contre la composante C1q du complément sont également très étroitement liés avec le développement de la néphrite lupique chez les patients atteints du LED<sup>248,252,253</sup>.

Les auto-anticorps de type IgG sont les principaux isotypes à se déposer aux reins dans le LED et sont présents chez tous les patients<sup>254</sup>. Parfois, les IgG sont accompagnées d'IgA et d'IgM<sup>255</sup>. Les auto-anticorps ne sont pas tous pathogéniques et délétères dans la néphrite lupique<sup>254,256,257</sup>. Les anticorps provenant de la commutation isotypique des plasmocytes des IgM vers les IgG sont ceux qui sont les plus pathogéniques dans le LED<sup>258</sup>. En effet, les anticorps dirigés contre l'ADN double brin de type IgM sont davantage protecteurs dans la néphrite lupique, alors que ceux de type IgG sont davantage pathogéniques. De plus, les anticorps de type IgG sont ceux qui ont subis le plus de mutations hypersomatiques et ont donc une affinité plus grande pour leur antigène spécifique les rendant plus pathogéniques<sup>259</sup>. En effet, les anticorps de faible affinité sont associés à une faible activité de la maladie, alors que les anticorps de haute affinité sont retrouvés chez les patients ayant développés des formes sévères de néphrite lupique telles que l'insuffisance rénale terminale<sup>260</sup>. De plus, les auto-anticorps présentant de la réactivité croisée pour différentes composantes glomérulaires ont également un important potentiel pathogénique<sup>191,254</sup>.

### **3.3.1.2 Mécanismes de déposition des auto-anticorps**

Les reins sont particulièrement touchés par le dépôt d'auto-anticorps et de CI dans le LED. Par leur fonction de filtration du sang, les reins reçoivent un débit cardiaque important de sang<sup>234,235</sup>. Les auto-anticorps dans le LED peuvent se retrouver aux reins dans la néphrite lupique par différents mécanismes<sup>86,257</sup>. L'un des premiers mécanismes proposé pour expliquer la présence d'auto-anticorps aux reins est que les auto-anticorps se lient à leur antigène spécifique dans la circulation sanguine et peuvent se déposer aux reins sous forme de CI<sup>86,254,261</sup>. Toutefois, des études ont révélé que la formation *in situ* de CI était un mécanisme plus

probable pour expliquer la présence de CI aux reins<sup>248,261</sup>.

D'autre part, il y a une dérégulation des mécanismes de mort cellulaire et de clairance de ces débris cellulaires dans le LED. Des antigènes du soi, essentiellement de l'ADN et des nucléosomes, peuvent se retrouver en circulation<sup>248</sup>. L'endothélium de type fenêtré au niveau des capillaires glomérulaires permet la rétention passive d'antigènes du soi en circulation dans le sang. La charge négative de la GBM notamment conférée par les protéoglycanes d'héparan sulfate permet, par sélectivité de charge, la capture des antigènes du soi chargés positivement en circulation<sup>262</sup>. Étant de charge positive, les nucléosomes en circulation peuvent être captés par la GBM exposant ainsi l'ADN<sup>248</sup>. Les anticorps dirigés contre l'ADN double brin en circulation peuvent ensuite se fixer à l'ADN et conduire à la formation locale de CI. Les anticorps anti-ADN double brin isolés des reins sont davantage cationiques que ceux retrouvés dans le sérum, pouvant expliquer la déposition préférentielle de ces anticorps aux reins<sup>263</sup>. De plus, la composante C1q du complément se dépose également aux reins dans la néphrite lupique et représente une cible pour les auto-anticorps<sup>264,265</sup>. Au même titre, les composantes des pièges extracellulaires libérés par les neutrophiles aux reins sont également ciblés par des auto-anticorps dans la néphrite lupique<sup>148</sup>.

D'autre part, avec la progression de la maladie, les dommages tissulaires mènent à l'exposition des composantes intrinsèques du rein, soient des composantes cellulaires ou de la matrice extracellulaire menant à la production d'auto-anticorps pouvant se lier directement à leur antigène spécifique aux reins. Certains anticorps dirigés contre l'ADN double brin sont polyréactifs dans le LED et, par réactivité croisée, peuvent lier des antigènes intrinsèques du rein tels que le collagène, la fibronectine, la laminine, l' $\alpha$ -actine, l'annexine II et les protéoglycanes à héparane sulfate<sup>217,248</sup>.

Des études ont également révélé la présence de plasmocytes aux reins de patients atteints de formes sévères de néphrite lupique et dans les modèles murins de la maladie<sup>266</sup>. Des tissus lymphoïdes tertiaires contenant des CG ont également été identifiés aux reins dans la néphrite lupique<sup>108,250,267-269</sup>. Les auto-anticorps peuvent ainsi être produits localement dans les reins dans le LED.

### **3.3.1.3 Site de déposition des auto-anticorps**

Les auto-anticorps libres ou sous forme de CI peuvent se déposer n'importe où dans les reins<sup>270</sup>. Les néphrons se composent de membranes basales qui permettent le support de l'endothélium et de l'épithélium formé par les podocytes au niveau des glomérules, la GBM, mais également qui supportent du côté basal les cellules épithéliales des tubules rénaux, la membrane basale tubulaire<sup>271</sup>. Les membranes basales du rein sont des lieux de déposition des auto-anticorps et de formation de CI. Les cellules épithéliales tubulaires peuvent aussi être directement ciblées par les auto-anticorps. Au niveau glomérulaire, les sites de déposition comprennent le mésangium et les compartiments sous-endothéliaux et sous-épithéliaux de la GBM<sup>86,272</sup>. Les CI pré-formés dans la circulation ont tendance à se déposer au niveau du mésangium et de l'espace sous-

endothélial dans les glomérules, leur grande taille limitant le passage au travers de la GBM<sup>261</sup>. Au contraire, les auto-anticorps libres sont de plus petites tailles permettant leur passage jusque dans l'espace sous-épithélial au niveau de la membrane de filtration formée par les podocytes. La charge nette négative des glomérules favorise la rétention d'antigènes du soi en circulation de charge positive et le dépôt subséquent de leur antigène spécifique. Par leur fonction de filtration et leur charge nette négative, les CI se forment préférentiellement au niveau des glomérules aux reins. Finalement, les CI peuvent également se former au niveau de l'endothélium de la microcirculation des reins<sup>255,273</sup>. Les conséquences cliniques dépendent du lieu de déposition et de formation des CI allant de dommages au niveau des podocytes, aux dommages tubulointerstitiels et endothéliaux<sup>248,250</sup>.

### **3.3.1 Inflammation et dommages tissulaires médiés par les CI**

L'inflammation et les dommages tissulaires dans la néphrite lupique sont initiés par le dépôt d'auto-anticorps et la formation de CI aux reins<sup>248</sup>. Les CI sont difficilement éliminés dans le LED et mènent à l'activation du système du complément et des cellules résidentes rénales<sup>57,274,275</sup>. Des cellules immunitaires sont recrutées et activées aux reins et contribuent à la réponse inflammatoire délétère via l'activation des Fc $\gamma$ R et des récepteurs du complément<sup>217,276,277</sup>. Les mécanismes pathogéniques impliqués sont variables d'un patient à l'autre et dépendent de plusieurs facteurs comme la classe, la durée et la sévérité de la néphrite lupique, ainsi que les lieux de formation des CI aux reins<sup>255,278</sup>. Si les réponses inflammatoires médiées par les CI ne sont pas adéquatement prises en charge, le résultat ultime et commun à tous les mécanismes pathogéniques associés à la pathogenèse de la néphrite lupique est la déposition de matrice extracellulaire dans le parenchyme rénal initiant le processus de fibrose<sup>248</sup>. Les dommages tissulaires deviennent irréversibles menant à une perte de fonction rénale et éventuellement à l'insuffisance rénale terminale<sup>279</sup>.

#### **3.3.1.1 Mécanismes de clairance des CI**

En réponse à la présence de CI, différents mécanismes sont mis en place afin de favoriser leur élimination par phagocytose. Les CI activent les Fc $\gamma$ R et les récepteurs du complément menant à leur internalisation par les phagocytes. Les mécanismes de clairance des CI sont déficients et ils s'accumulent aux reins dans le LED.

##### **3.3.1.1.1 Clairance des CI par le système du complément**

En plus de leur rôle dans l'élimination des corps apoptotiques et débris de mort cellulaire, les trois voies d'activation du système du complément sont activées par les CI dans la néphrite lupique<sup>57,274</sup>. Alors que les CI de type IgA n'activent que les voies alternes et des lectines, les CI de type IgG et IgM peuvent activer les trois voies du complément<sup>57</sup>. L'activation de la voie classique se fait via la reconnaissance des IgG ou des IgM formant les CI par la composante C1q. Toutefois, la réactivité de la composante C1q n'est pas la même pour toutes les sous-classes d'IgG chez l'humain. Elle a une forte réactivité pour les IgG3, intermédiaire pour

les IgG1, faible pour les IgG2 et peu, voire aucune réactivité pour les IgG4. La voie des lectines peut quant à elle être activée par reconnaissance des sites de glycosylation sur les IgG par la MBL<sup>57,280</sup>. L'activation de ces trois voies convergent vers la formation d'opsonines telles que C3b, iC3b et C4b<sup>18</sup>. Les CI sont opsonisés et ces complexes sont reconnus par des récepteurs du complément comme CR1, CR3 et CR4 à la surface de différentes cellulaires immunitaires phagocytaires<sup>57,281,282</sup>. Les érythrocytes participent également à l'élimination des CI solubles via leur expression de CR1<sup>249,283</sup>. Ce récepteur permet le transport des CI par les érythrocytes jusqu'au foie ou la rate. Les CI sont ensuite reconnus via les Fc $\gamma$ R et le récepteur CR1 des macrophages dans ces organes menant à leur internalisation et élimination du milieu extracellulaire.

### 3.3.1.1.2 Clairance des CI par les Fc $\gamma$ R

Les FcR sont une famille de récepteurs qui ciblent la portion Fc de Ig<sup>284</sup>. Puisque les CI aux reins sont essentiellement composés d'IgG, les Fc $\gamma$ R sont les principaux FcR impliqués dans la réponse aux CI dans la néphrite lupique<sup>254,285</sup>. Les Fc $\gamma$ R font le pont entre l'immunité innée et adaptative et sont importants à plusieurs niveaux dans la réponse immunitaire<sup>286</sup>. Ils jouent un rôle notamment dans la présentation d'antigènes, les mécanismes de maintien de la tolérance des lymphocytes B et de régulation de la production d'anticorps, l'activation et l'inhibition des cellules effectrices immunitaires et la phagocytose de CI. Chez l'humain, la famille des Fc $\gamma$ R comprend Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIC, Fc $\gamma$ RIIIA, Fc $\gamma$ RIIIB, FcRL5, FcRN et TRIM21<sup>284</sup> (Figure 1.6). Les Fc $\gamma$ R diffèrent par leur affinité pour les sous-classes d'IgG, leur expression cellulaire et leur

Human IgG receptors									
Name	Fc $\gamma$ RI	Fc $\gamma$ RIIA	Fc $\gamma$ RIIB	Fc $\gamma$ RIIC <sup>a</sup>	Fc $\gamma$ RIIIA	Fc $\gamma$ RIIIB	FcRn	TRIM21	FcRL5
CD	CD64	CD32A	CD32B	CD32C	CD16A	CD16B	-	-	CD307
B cell	-	-	+	-	-	-	-	+	+
T cell	-	-	-	-	-	-	-	+	-
NK cell	-	-	- <sup>†</sup>	+ <sup>‡</sup>	+	-	-	+	-
Mono/Macro	+	+	+/-	+ <sup>‡</sup>	+	-	+	+	-
Neutrophil	(+)	+	+/-	+ <sup>‡</sup>	-	+	+	+	-
Dendritic Cell <sup>§</sup>	+	+	+	-	-	-	+	+	-
Basophil	-	+	+	-	-	+/-	-	+	-
Mast cell	(+)	+	-	-	-	-	NA	+	-
Eosinophil	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Platelet	-	+	-	-	-	-	NA	NA	-
Endothelium	-	-	-	-	-	-	+	+	-

**Figure 1.6 Patron d'expression des Fc $\gamma$ R humains.** Les Fc $\gamma$ R sont exprimés par une variété de cellules immunitaires hématopoïétiques. Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIC et Fc $\gamma$ RIIIA sont couplés à des motifs ITAM, alors que Fc $\gamma$ RIIB est couplé à un motif ITIM. Fc $\gamma$ RIIA et Fc $\gamma$ RIIIA impliqués dans l'internalisation des CI de type IgG dans le LED sont exprimés par les phagocytes. +, expression;  $\gamma_2$ , chaînes Fc $\gamma$ ; (+), expression inductible; +/-, faible niveau d'expression; -, absence d'expression; NA, expression non-analysé; ITAM, motif d'activation à base de tyrosine; ITIM, motif d'inhibition à base de tyrosine. Figure tirée de Gillis, C. *et al. Frontiers in Immunology*, 2014.

fonction dans les cellules effectrices<sup>284,286</sup>. Ils sont exprimés par un large éventail de cellules immunitaires hématopoïétiques<sup>284,287-289</sup>. Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIC et Fc $\gamma$ RIIIA mènent à l'activation cellulaire, alors que Fc $\gamma$ RIIB est le seul Fc $\gamma$ R inhibiteur<sup>284,286,288,290</sup>. Fc $\gamma$ RIIA et Fc $\gamma$ RIIC sont directement couplés à des motifs d'activation à base de tyrosine (ITAM), alors que Fc $\gamma$ RIIB est directement couplé à un motif d'inhibition à base de tyrosine (ITIM). Au contraire, la signalisation ITAM induite par l'engagement de Fc $\gamma$ RI et Fc $\gamma$ RIIIA provient de leur association à la chaîne Fc $\gamma$  qui contient le motif activateur. Fc $\gamma$ RI a une forte affinité pour les anticorps monomériques, alors que Fc $\gamma$ RIIA et Fc $\gamma$ RIIIA sont des récepteurs possédant une affinité faible à moyenne pour les IgG monomériques, mais avec des interactions de forte avidité avec les CI<sup>285,288</sup>. Ainsi, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA et Fc $\gamma$ RIIIA sont les principaux Fc $\gamma$ R impliqués dans le processus d'internalisation des CI de type IgG par les phagocytes dans la néphrite lupique<sup>285</sup>. Fc $\gamma$ RIIA est exprimé par tous les phagocytes, Fc $\gamma$ RIIIA uniquement par les monocytes et les macrophages et Fc $\gamma$ RI par les monocytes, les macrophages et les DC<sup>284</sup>. L'expression simultanée des Fc $\gamma$ R activateurs et inhibiteur par les phagocytes permet de fixer un seuil d'activation cellulaire<sup>291</sup>.

#### 3.3.1.1.3 Déficiences dans les mécanismes de clairance des CI

Des déficiences génétiques pour les composantes du système du complément, les récepteurs du complément et les Fc $\gamma$ R ont été identifiées dans le LED et sont associées aux atteintes rénales<sup>156,292</sup>. Par exemple, des déficiences génétiques pour les composantes C1q, C1r, C1s, C2 et C4 et pour les récepteurs du complément CR1, CR3 et CR4, ainsi que certains polymorphismes pour les récepteurs activateurs Fc $\gamma$ RIIA et Fc $\gamma$ RIIIA ont été liés à une mauvaise clairance des CI dans la maladie<sup>150,156,159,228,231,283,293</sup>. De plus, la capacité de prise en charge des CI par le système du complément est également diminuée en conséquence à la consommation des composantes du complément et donc une diminution de leur disponibilité pendant les périodes de poussées<sup>150</sup>. La composante C1q est aussi ciblée par des auto-anticorps dans le LED diminuant d'autant plus sa disponibilité<sup>264,265</sup>. Le système du complément joue donc un rôle à la fois protecteur et délétère dans la néphrite lupique<sup>150,159</sup>. En effet, une déficience des premières composantes du complément est associée au développement de la néphrite lupique due à une mauvaise clairance des corps apoptotiques et des CI<sup>155</sup>. Au contraire, des niveaux élevés des premières composantes du complément sont associés à leur dépôt aux reins et aux dommages tissulaires dans le LED<sup>158</sup>. En somme, ces déficiences dans les mécanismes de clairance de CI conduisent à l'accumulation et la persistance des CI aux reins et mènent à une réponse inflammatoire disproportionnée à l'origine du développement de la néphrite lupique.

#### **3.3.1.2 Recrutement de cellules immunitaires**

L'activation du système du complément par les CI mène à la libération d'anaphylatoxines telles que C3a, C4a et C5a<sup>18,33,294,295</sup>. Elles agissent sur l'endothélium en augmentant la perméabilité vasculaire et ont un effet

chimiotactique sur les leucocytes qui expriment des récepteurs pour ces composantes du complément, en plus de promouvoir leur diapédèse et leur activation aux reins. Le dépôt et la formation de CI au niveau de l'endothélium de la microcirculation des reins favorisent le recrutement de cellules myéloïdes exprimant des récepteurs Fc $\gamma$ R<sup>250,273,276,277,296,297</sup>. L'expression de ces récepteurs à CI favorise leur extravasation vers le parenchyme rénal. Ces cellules peuvent s'activer au niveau vasculaire et médient la réponse inflammatoire et les dommages tissulaires dans la néphrite lupique. Les cellules immunitaires activées libèrent, à leur tour, des chimiokines menant au recrutement de davantage de cellules immunitaires<sup>217</sup>. Les leucocytes qui sont recrutés et qui s'activent aux reins dans la néphrite lupique sont essentiellement les monocytes, les neutrophiles et les cellules NK<sup>250</sup>. Des lymphocytes T et B ont également été identifiés dans les biopsies rénales de patients atteints de néphrite lupiques dans des structures lymphoïdes tertiaires<sup>108,250,267-269</sup>.

### **3.3.1.3 Activation cellulaire**

Les cellules résidentes rénales et les cellules immunitaires recrutées aux reins sont activées en réponse à la présence de CI<sup>248,275</sup>. D'une part, l'engagement des Fc $\gamma$ R activateurs et des récepteurs du complément favorisent l'internalisation des CI par les phagocytes et l'activation cellulaire. Les TLR endosomaux 7 et 9 sont activés respectivement par l'ARN et l'ADN double brin contenus dans les CI suite à leur internalisation<sup>298</sup>. De plus, des PRR cytosoliques comme le gène 1 inductible par l'acide rétinoïque (RIG-1) et la voie guanosine monophosphate- adénosine monophosphate cyclique (cGAS) - stimulateur de gènes d'interférons (STING) sont capables de détecter la présence d'ADN double brin nucléaire ou mitochondrial dans le cytosol<sup>147,299,300</sup>. L'engagement de ces récepteurs par l'ADN, mais aussi par l'ARN, mènent à la libération d'IFN de type I par les pDC et les cellules rénales résidentes<sup>275,301</sup>. Les Fc $\gamma$ R, les récepteurs du complément et les PRR sont souvent co-exprimés par les cellules rénales et immunitaires et les fonctions effectrices de ces cellules sont le résultat de l'intégration de tous ces signaux<sup>57,217</sup>.

Suivant leur activation, les cellules rénales, les neutrophiles et les macrophages peuvent libérer des ERO<sup>302</sup>. Celles-ci contribuent aux dommages rénaux aiguës et chroniques aux reins et au développement de l'insuffisance rénale terminale. Par exemple, les ERO induisent des dommages irréversibles aux cellules environnantes par la peroxydation des membranes cellulaires et en causant des dommages à l'ADN. Elles favorisent également le processus de fibrose et le dépôt excessif de matrice extracellulaire dans le rein conduisant de façon chronique à la perte de fonction. D'autre part, les dommages tissulaires induits par l'activation du système du complément peuvent être directs avec un effet cytolytique résultant de la formation du complexe d'attaque membranaire ou encore indirectement par l'opsonisation et l'activation cellulaire suivant l'engagement des récepteurs du complément<sup>303,304</sup>. La libération de cytokines inflammatoires et de chimiokines en réponse à l'activation cellulaire mènent au recrutement et à l'activation de davantage de cellules immunitaires aux reins conduisant ainsi aux dommages rénaux<sup>305</sup>.

#### 3.3.1.3.1 Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales du rein sont en contact direct avec les antigènes du soi, les auto-anticorps et les CI en circulation dans le sang<sup>306</sup>. Les CI peuvent se déposer au niveau de l'espace sous-endothéliale et altérer les fonctions des cellules endothéliales. En effet, en présence de CI, la production intracellulaire d'oxyde nitrique augmente dans les cellules endothéliales et peut engendrer un effet cytotoxique. De plus, les cellules endothéliales sont capables de procéder à l'endocytose des CI formés d'ADN double brin<sup>307</sup>. Ceux-ci sont reconnus par des PRR cytosoliques ce qui engendre la libération de chimiokines et le recrutement de cellules immunitaires aux reins. En réponse à la présence de CI, il y a une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales et de la perméabilité vasculaire favorisant l'extravasation des leucocytes<sup>307,308</sup>. Les cellules endothéliales libèrent également des cytokines telles que l'IFN de type I<sup>307</sup>. Les cellules endothéliales, les cellules mésangiales et les podocytes sont étroitement liés et s'influencent réciproquement via la libération de cytokines qui agissent sur les deux autres types cellulaires<sup>305,309</sup>. Des dommages à l'un d'entre eux peuvent donc altérer la fonction des deux autres types cellulaires. D'autre part, les cellules endothéliales peuvent se différencier en cellules mésenchymateuses, processus connu sous le nom de transition endo-mésenchymateuse, sous l'action de différents stimuli incluant les pièges extracellulaires libérés par les neutrophiles<sup>310</sup>. Ce processus accélère la fibrose rénale.

#### 3.3.1.3.2 Les podocytes

Les podocytes composent la barrière de filtration glomérulaire et sont essentiels au maintien de l'intégrité des glomérules<sup>275,311</sup>. Ils sont capables d'internaliser les CI présents au niveau de la GBM via FcRn et les présenter aux lymphocytes T autoréactifs via des molécules du CMH I et CMH II permettant de perpétuer le cycle délétère de production d'auto-anticorps dans le LED<sup>312,313</sup>. Les podocytes expriment différents PRR comme les TLR7, TLR9 et RIG-1 qui sont activés par les CI contenant de l'ARN ou de l'ADN internalisés par les podocytes<sup>275,311</sup>. L'inflammasome NLRP3 est également activé dans les podocytes pendant la néphrite lupique et contribue aux atteintes podocytaires, ainsi qu'à la protéinurie<sup>314</sup>. Les podocytes libèrent aussi de l'IL-23, cytokine importante dans la polarisation des lymphocytes T auxiliaires effecteurs vers un phénotype Th17 impliqué dans l'inflammation et les dommages rénaux dans la maladie<sup>275</sup>. Lorsque les podocytes sont endommagés, l'intégrité de la barrière de filtration glomérulaire est altérée engendrant de la protéinurie<sup>275</sup>. Cela cause un stress important sur les cellules épithéliales tubulaires conduisant à leur activation et pouvant contribuer à l'inflammation chronique et aux dommages tissulaires aux reins<sup>315,316</sup>. Notamment, la présence d'albumine dans l'urine conduit à la production d'ERO et à la sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales proximales menant au recrutement, entre autres, de neutrophiles aux reins<sup>317</sup>. En réponse aux CI, les podocytes libèrent des substances capables d'induire la sécrétion d'endothéline-1 par les cellules

endothéliales glomérulaires<sup>318</sup>. L'endothéline-1 contribue à la perte des jonctions serrées entre les cellules endothéliales et induit des dommages aux podocytes.

#### 3.3.1.3.3 Cellules mésangiales

Les cellules mésangiales constituent environ 40 % des cellules du glomérule et permettent l'ancrage et le maintien de l'intégrité structurelle des glomérules<sup>248</sup>. Elles fabriquent la matrice extracellulaire du mésangium, contrôlent le débit de filtration glomérulaire et assurent la phagocytose des débris de mort cellulaire et des CI qui s'accumulent dans le mésangium et au niveau de la barrière de filtration glomérulaire<sup>309,319</sup>. Par réactivité croisée, les cellules mésangiales peuvent être la cible des anticorps anti-ADN double brin. De plus, certains auto-anticorps dans le LED ciblent directement des antigènes des cellules mésangiales comme l'annexine II et l' $\alpha$ -actine ou des composantes de la matrice extracellulaire mésangiale telles que la laminine et la fibronectine<sup>319,320</sup>. Ces auto-anticorps sont internalisés par les cellules mésangiales menant à leur prolifération et à la libération de chimiokines permettant le recrutement de cellules inflammatoires<sup>320</sup>. De plus en réponse aux CI, les cellules mésangiales libèrent des cytokines comme l'IFN- $\gamma$  et l'IL-12 favorisant une réponse inflammatoire de type Th1. D'autre part, leur activation conduit à la dégradation de la GBM via la libération de métalloprotéinases et à une diminution de l'activité de la DNase<sup>1320,321</sup>. De plus, la présence de CI favorise une augmentation de l'expression de certains gènes pro-apoptotiques tels que Fas/FasL et de la famille des Bcl-2 dans les cellules mésangiales<sup>320</sup>. La mort cellulaire couplée à une diminution de l'activité de la DNase1 augmente la charge d'antigènes du soi dans le mésangium. D'autre part, les cellules mésangiales contribuent de façon importante à l'accumulation de matrice extracellulaire et à la fibrose via la libération du facteur de croissance transformant  $\beta$  (TGF- $\beta$ )<sup>319-321</sup>. Finalement, les cellules mésangiales sont une source importante d'IFN de type I en réponse à la formation de CI dans le mésangium<sup>319</sup>.

#### 3.3.1.3.4 Cellules épithéliales tubulaires

Jusqu'à 70 % des patients atteints de néphrite lupique présentent un dépôt de CI au niveau de la membrane basale tubulaire engendrant l'activation du système du complément et de l'inflammation locale<sup>248,322</sup>. Pendant la néphrite lupique, des composantes du complément, par exemple la composante C3, peuvent également se retrouver dans l'urine et être activées par son acidité ou la présence d'urée<sup>217</sup>. La formation du complexe d'attaque membranaire qui en résulte engendre des dommages au niveau apical des cellules épithéliales tubulaires rénales. De plus, les anticorps anti-ADN double brin peuvent notamment se lier aux cellules épithéliales des tubules proximaux<sup>248</sup>. Une augmentation de l'expression de TLR9 par ces cellules a été observée pendant la néphrite lupique et corrèle avec la protéinurie et les dommages tubulointerstitiels<sup>323</sup>. Les cellules épithéliales tubulaires rénales sont activées en présence d'anticorps anti-ADN double brin et de CI et sont ainsi des médiateurs importants de la pathogenèse tubulointerstitielle<sup>322</sup>. Les cellules épithéliales

tubulaires proximales sont reconnues dans la néphrite lupique pour leur production d'IL-6 impliquée dans l'atrophie tubulaire et l'infiltration de cellules inflammatoires aux reins<sup>324</sup>. D'autre part, les cellules épithéliales tubulaires libèrent des substances chimiotactiques et des cytokines capables d'activer les cellules immunitaires infiltrant le rein telles que les macrophages, les DC et les lymphocytes B<sup>322</sup>. Les cellules épithéliales libèrent aussi de l'IFN de type I, ainsi que de la matrice extracellulaire et du TGF- $\beta$  impliqués dans le processus de fibrose et de perte de fonction rénale. Pendant la néphrite lupique, des études ont indiqué que les cellules épithéliales tubulaires pourraient se différencier en cellules mésenchymateuses via le processus de transition épithélio-mésenchymateuse<sup>322,325</sup>. Elles pourraient ensuite être une source de myofibroblastes, cellules impliquées dans la fibrose tubulointerstitielle et glomérulaire dans la néphrite lupique<sup>296</sup>.

### 3.3.1.3.5 Système phagocytaire mononucléaire rénal

Le système phagocytaire mononucléaire du rein comprend les macrophages et les DC<sup>326</sup>. Ensembles, ils assurent l'homéostasie, la défense et la réparation tissulaire des reins. En conditions normales, les phagocytes mononucléaires sont les cellules immunitaires les plus importantes du rein et le colonisent en entier<sup>305,327</sup>. Ces cellules résidentes sont localisées autour des glomérules, des tubules et des capillaires péri-tubulaires<sup>305</sup>. En contexte inflammatoire, les phagocytes mononucléaires peuvent également être recrutés aux reins<sup>305,328</sup>. L'infiltration et une augmentation de ces cellules aux reins constitue un signe de néphrite lupique<sup>305,329</sup>. Les différentes sous-populations de phagocytes mononucléaires peuvent jouer un rôle autant dans la clairance des CI et la réparation tissulaire que dans la présentation d'antigènes du soi et la contribution aux dommages tissulaires dans la maladie<sup>305</sup>.

#### 3.3.1.3.5.1 DC

Les mDC et pDC s'accumulent au niveau des glomérules et le tubulointerstitium dans la néphrite lupique<sup>330,331</sup>. Les mDC sont un type de CPA important dans l'activation des cellules T naïves autoréactives dans la maladie<sup>331</sup>. En effet, l'activation des Fc $\gamma$ R mène à la phagocytose des CI par les mDC, à leur maturation et la présentation d'antigènes du soi aux lymphocytes T autoréactifs<sup>288,291,332</sup>. De plus, les IFN de type I favorisent la maturation et l'activation des mDC et, ainsi, leur présentation d'auto-antigènes<sup>175,333</sup>. L'activation des Fc $\gamma$ R des pDC par les CI de type IgG mènent à leur phagocytose et à la libération d'IFN de type I<sup>291,334</sup>. Plus particulièrement, la stimulation de Fc $\gamma$ RIIA est importante dans le processus d'internalisation des CI et pour activer la voie des IFN dans ces cellules<sup>335</sup>. Ils expriment TLR7 et 9 et l'activation de ces deux récepteurs par leurs ligands respectifs favorisent également à la libération de ces cytokines<sup>336</sup>. La co-stimulation de Fc $\gamma$ RIIA et de TLR9 par les CI contenant des acides nucléiques potentialise la libération d'IFN de type I<sup>334</sup>. Ainsi, les pDC accentue la signature IFN dans le LED, favorisent la perte de tolérance immunitaire et l'exacerbation de la maladie<sup>337</sup>. Les mDC et les pDC sont tous deux responsables de la libération de différentes cytokines pro-inflammatoires aux reins dans la néphrite lupique et favorisent le processus de fibrose rénale<sup>331</sup>.

#### 3.3.1.3.5.2 *Macrophages*

Le recrutement des macrophages aux reins dans la néphrite lupique concorde avec les dommages rénaux<sup>338,339</sup>. Certains macrophages sont localisés entre la GBM et les cellules endothéliales des capillaires rénaux et peuvent capter les CI dans la microcirculation du rein via Fc $\gamma$ RIV chez la souris, l'équivalent de Fc $\gamma$ RIIIA chez l'humain<sup>340</sup>. Cette capture des CI en circulation mène à la libération de chimiokines et au recrutement de monocytes et de neutrophiles aux reins. En présence de CI formés d'acides nucléiques, les TLR9 endosomaux sont également engagés et conduisent à une activation soutenue des macrophages. L'engagement des Fc $\gamma$ R activateurs mènent à la phagocytose des CI, la libération d'ERO et de différents médiateurs inflammatoires<sup>288,291</sup>. De plus, les macrophages ont été associés au processus de fibrose et de perte de la fonction rénale dans la néphrite lupique<sup>338,339</sup>.

#### 3.3.1.3.6 Neutrophiles

Le principal rôle délétère des neutrophiles dans le LED est l'exposition d'antigènes du soi dans le milieu extracellulaire<sup>142</sup>. Par le processus de NETose, les neutrophiles libèrent des pièges extracellulaires et ceux-ci contribuent à la perpétuation de la maladie. Entre autres, la libération de pièges extracellulaires peut être induite par la présence d'antigènes mitochondriaux dans le milieu extracellulaire<sup>341</sup>. Différentes protéines antimicrobiennes contenues dans les pièges extracellulaires telle que la myéloperoxydase peuvent avoir un effet cytotoxique local et contribuer directement aux dommages tissulaires<sup>142,342</sup>. De plus, les protéines contenues dans les pièges extracellulaires, comme l'ADN nucléaire, l'ADNmt et la chromatine, mènent à l'activation locale de différentes cellules immunitaires par les PRR et à leur libération de cytokines inflammatoires<sup>31142</sup>. Les pièges extracellulaires stimulent aussi la production d'IFN de type I par les pDC via l'engagement de TLR9<sup>337,343,344</sup>. Les neutrophiles dans le LED présentent un phénotype altéré avec des capacités réduites de phagocytose et sont capables de s'activer dans la circulation sanguine<sup>142</sup>. Des neutrophiles immatures hautement inflammatoires, les granulocytes de faibles densités, sont libérés de la moelle osseuse et ont la capacité de produire des IFN de type I contribuant à la signature cytokinique de la maladie<sup>142,173</sup>. L'activation de Fc $\gamma$ RIIA par les CI peut aussi mener à la libération d'ERO par les neutrophiles et de chimiokines permettant le recrutement de davantage de cellules immunitaires<sup>345</sup>. L'activation de TLR7 des neutrophiles mènent aux clivages de leur récepteur Fc $\gamma$ RIIA, mais également au clivage de ce même récepteur sur les pDC et les monocytes par les neutrophiles<sup>346</sup>. Ainsi, l'activation de TLR7 mène à une diminution des capacités phagocytaires des neutrophiles, des pDC et des monocytes et à une diminution de la clairance des CI. Cela conduit aussi à une augmentation de l'activation du système du complément et de la libération de l'anaphylatoxine C5a favorisant le recrutement de davantage de cellules inflammatoires aux reins.

#### 3.3.1.3.7 Les NK

Des cellules NK ont été identifiées dans les biopsies de reins de patients atteints de néphrite lupique<sup>347</sup>. Les cellules NK sont associées à la libération de cytokines pro-inflammatoires et à la mort de cellules cibles via les granzymes et les perforines. De plus, les cellules NK peuvent répondre à la présence de CI via leur expression de Fc $\gamma$ RIIC et Fc $\gamma$ RIIA et induire une ADCC. Toutefois, les cellules NK commencent à être étudiées dans le contexte de la néphrite lupique et de plus amples études sont nécessaires pour bien comprendre leur contribution dans la physiopathologie de la maladie.

#### 3.3.1.3.8 Lymphocytes T

Le rôle des lymphocytes T dans la pathogenèse de la néphrite lupique est central, puisqu'ils permettent d'activer les lymphocytes B et la production d'auto-anticorps<sup>183,348</sup>. Les lymphocytes T sont recrutés aux reins pendant la maladie et ont été identifiés dans les biopsies de patients atteints de néphrite lupique<sup>183,349</sup>. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> sont localisés au niveau des lésions tubulointerstitielles dans ces biopsies et pourraient donc jouer un rôle dans les dommages rénaux<sup>183</sup>. Les lymphocytes T sont aussi retrouvés dans les organes lymphoïdes tertiaires suggérant qu'ils pourraient activer les lymphocytes B directement aux reins. De plus, les lymphocytes T libèrent des cytokines pro-inflammatoires pouvant contribuer à la réponse inflammatoire délétère et favoriser au recrutement et à l'activation de cellules inflammatoires aux reins dans la néphrite lupique<sup>183</sup>. Toutefois, les études sur la contribution des sous-populations Th1, Th2 et Th17 aux reins dans la néphrite lupique sont contradictoires. La contribution des différentes sous-populations de lymphocytes T semble avoir un impact sur le type de dommages induits aux reins et être associée à des classes spécifiques de néphrite lupique<sup>182,349</sup>. De façon générale, les Th17 ont été associés à l'auto-immunité, aux dommages tissulaires et à l'inflammation dans le LED notamment via la libération d'IL-17<sup>183,184,350,351</sup>. Dans la néphrite lupique, il y a une hausse des lymphocytes Th17 et une diminution des Treg aux reins<sup>350</sup>. Cette perte de la balance Th17/Treg pourrait être impliquée dans les atteintes rénales. Les Th17 favorisent le recrutement des neutrophiles et des macrophages et leur activation aux reins<sup>352</sup>. De plus, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont également une source importante d'IL-17 dans la néphrite lupique et contribuent ainsi à l'auto-immunité<sup>353</sup>. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> pourraient également être une source importante de nouveaux antigènes du soi via le clivage par les granzymes B<sup>166</sup>.

Différentes études révèlent que les cellules NKT, type cellulaire hybride entre les cellules NK et les lymphocytes T, sont protecteurs dans la maladie<sup>354,355</sup>. Toutefois, une étude met en évidence que le transfert de cellules NKT aux souris conduit au développement d'une néphrite lupique sévère accompagnée de protéinurie dans un modèle murin de la maladie<sup>356</sup>. D'autre part, les cellules NKT libèrent aussi de l'IL-17 et contribuent de cette façon à la pathogenèse de la néphrite lupique<sup>357</sup>. Leur rôle dans le développement des atteintes rénales dans le LED reste à être élucidé.

### 3.3.1.3.9 Lymphocytes B

Les CI composés d'ADN activent les lymphocytes B exprimant un BCR spécifique pour ces antigènes via le BCR et TLR9<sup>358</sup>. Au même titre, l'ARN peut activer les lymphocytes B via l'engagement du BCR et du TLR7<sup>336</sup>. Cet co-engagement BCR/TLR9 ou BCR/TLR7 est particulièrement important pour l'activation des lymphocytes B possédant un BCR de faible affinité<sup>358</sup>. L'activation des lymphocytes B conjointement par le BCR et les TLR est beaucoup plus vigoureuse que lorsqu'ils sont activés uniquement par l'une ou l'autre des deux voies<sup>108</sup>. TLR9 favorise la maturation des lymphocytes B autoréactifs en plasmocytes et leur production d'auto-anticorps dirigés contre l'ADN double brin chez l'humain<sup>359</sup>. L'engagement de Fc $\gamma$ RIIB est important pour augmenter le seuil d'activation des lymphocytes B<sup>285,286,288</sup>. Toutefois, un polymorphisme du gène codant pour Fc $\gamma$ RIIB a été identifié dans le LED et mène à une perte de fonction du récepteur abaissant ainsi le seuil d'activation des lymphocytes B<sup>108,226</sup>. D'autre part, l'expression du facteur de prolifération et de survie des lymphocytes B BAFF est augmentée aux reins pendant la néphrite lupique et corrèle avec l'activité de la maladie<sup>267</sup>. BAFF est produit par certaines cellules myéloïdes recrutées aux reins telles que les neutrophiles, les macrophages et les DC<sup>108,267</sup>. Entre autres, BAFF favorise la commutation isotypique des lymphocytes B et la libération d'anticorps de type IgG qui sont davantage pathogéniques. Les lymphocytes B participent également à la libération de différentes cytokines dans le LED telles que l'IL-6, l'IFN $\gamma$  et la lymphotoxine- $\alpha$ <sup>360</sup>. Cette dernière promeut la formation de tissus lymphoïdes tertiaires à l'intérieur même des reins dans la néphrite lupique. Ce site local permet l'amplification de la réponse auto-immune en favorisant des interactions lymphocytes Tfh et B et la production d'auto-anticorps directement aux reins. Ces CG ectopiques sont associés avec la présence de CI au niveau de la membrane basale tubulaire et l'inflammation tubulointerstitielle dans les biopsies rénales de néphrite lupique<sup>361</sup>. Via leur fonction de CPA, les lymphocytes B peuvent également présenter des antigènes du soi aux lymphocytes T autoréactifs aux reins<sup>183</sup>.

### 3.3.1.3.10 Myofibroblastes

Dans la néphrite lupique, les myofibroblastes sont activés notamment par le TGF- $\beta$  et l'IFN de type I aux reins<sup>319,362</sup>. Ces cytokines sont libérées par la majorité des cellules rénales résidentes et infiltrant le rein. Cela conduit à l'accumulation de matrice extracellulaire et au remplacement du parenchyme rénal par du tissu fibreux. La fibrose glomérulaire et tubulointerstitielle engendre une perte de fonction du parenchyme rénal, un processus menant ultimement à l'insuffisance rénale terminale.

## 3.4 Diagnostic

Seulement 25 % des patients présentent des symptômes de néphrite lupique au moment du diagnostic du LED<sup>216</sup>. Comme la majorité des patients développeront à un point de leur maladie des manifestations rénales, les signes de néphrite lupique sont fréquemment évalués lors des suivis médicaux<sup>201,221,363</sup>. Les symptômes de

néphrite lupique comprennent des envies fréquentes d'uriner particulièrement la nuit, de l'urine écumeuse due à la protéinurie, de l'hématurie, de l'œdème, une prise de poids, une pression artérielle élevée, des douleurs musculaires et de la fièvre inexplicée<sup>216,364</sup>.

### **3.4.1 Test diagnostic**

L'analyse de l'urine, plus précisément de l'hématurie, de la protéinurie et de la leucocyturie, est souvent ce qui mène vers le diagnostic de néphrite lupique. En effet, la présence d'érythrocytes, de protéines et de leucocytes en absence d'infection dans l'urine sont des signes d'une altération de la fonction rénale<sup>216</sup>. Des analyses sérologiques visant à mesurer les niveaux de créatinine sérique, un déchet métabolique normalement éliminé par les reins, sont également effectuées en parallèle avec des tests pour évaluer la clairance urinaire de la créatinine. La clairance urinaire de la cystatine C, un autre produit du métabolisme cellulaire, est aussi utilisée afin d'évaluer le taux de filtration glomérulaire, une composante clé dans la fonction rénale<sup>216,365</sup>. Dès les premières manifestations de néphrite lupique, la biopsie rénale est prescrite<sup>363</sup>. Elle consiste à prélever par ponction un échantillon de rein pour en faire l'analyse. Elle est essentielle pour confirmer le diagnostic clinique et établir la classe de néphrite lupique<sup>216</sup>. En fonction de l'histopathologie, elle permet de guider le traitement. Puisque la seule façon de détecter la néphrite lupique silencieuse est par biopsie rénale, certains patients qui ne présentent pas de manifestations cliniques ne recevront jamais de diagnostic<sup>214</sup>.

### **3.4.2 Classes de néphrite lupique**

Suivant l'introduction de la biopsie rénale dans la pratique médicale au milieu du 20<sup>e</sup> siècle, une première classification des néphrites lupiques dans le contexte du LED a été établie par l'Organisation mondiale de Santé en 1974<sup>255</sup>. Les atteintes glomérulaires étant les plus fréquentes, la classification se concentre sur cette zone du rein. Avec l'acquisition de nouvelles connaissances quant aux mécanismes menant aux dommages rénaux, des modifications y ont été apportées en 1982 et 1995. Finalement, une révision en 2004 par les groupes *International Society of Nephrology* et *Renal Pathology Society* a mené à la version de classification qui est à ce jour utilisée. Le système de classification de 2004 se divise en six classes de glomérulonéphrites, chacune traduisant une histopathologie différente. Les lésions glomérulaires sont évaluées par microscopie optique avec une coloration à l'hématoxyline et l'éosine, au trichrome de Masson, à l'acide périodique de Schiff et à l'argent<sup>255,363,366,367</sup>. En complément, le dépôt aux reins d'IgG, IgM et IgA et des composantes C3 et C1q du complément est étudié en immunofluorescence<sup>255,363,368</sup>. De plus, l'étude en microscopie électronique des biopsies permet de distinguer les lésions prolifératives et membraneuses. L'attribution d'une classe de néphrite lupique permet de guider le choix du traitement.

#### **3.4.2.1 Classe I : Néphrite lupique mésangiale minimale**

Dans la glomérulonéphrite de classe I, les glomérules apparaissent normaux en microscopie optique et de légers dépôts immuns sont observés au niveau mésangial<sup>255</sup>.

#### **3.4.2.2 Classe II : Néphrite lupique mésangiale proliférative**

La néphrite mésangiale proliférative est associée à une expansion de la matrice mésangiale causée par une prolifération cellulaire et des dépôts immuns<sup>255</sup>. De légers dépôts immuns sous-endothéliaux et sous-épithéliaux peuvent également être observés en immunofluorescence.

#### **3.4.2.3 Classe III : Néphrite lupique focale (proliférative et/ou sclérosante)**

La néphrite lupique est décrite comme focale lorsque les lésions impliquent moins de 50 % des glomérules<sup>255</sup>. Les lésions peuvent être actives, dites prolifératives, et/ou inactive et chronique, dites sclérosantes. Des dépôts immuns sous-endothéliaux focaux peuvent être observables avec présence ou non de manifestations mésangiales.

#### **3.4.2.4 Classe IV : Néphrite lupique diffuse (segmentaire ou globale)**

Lorsque plus de 50 % des glomérules sont affectés, la néphrite lupique est décrite comme diffuse<sup>255</sup>. Elle est segmentaire si moins de la moitié du réseau glomérulaire des glomérules est affectée et de globale si plus de la moitié est touché. La glomérulonéphrite diffuse segmentaire ou globale peut être proliférative et/ou sclérosante.

#### **3.4.2.5 Classe V : Néphrite lupique membraneuse**

La classe V de glomérulonéphrite comprend des dépôts immuns sous-épithéliaux continus segmentaires ou globaux<sup>255</sup>. Les altérations mésangiales peuvent être plus ou moins importants dans cette classe. Des dépôts immuns dispersés peuvent également être présents au niveau sous-endothélial. La néphrite lupique membraneuse comprend un niveau avancé de sclérose et peut être diagnostiqué en parallèle avec les glomérulonéphrites de classes III et IV.

#### **3.4.2.6 Classe VI : Néphrite lupique sclérosante avancée**

Le diagnostic de néphrite lupique sclérosante avancée est établi lorsque plus de 90 % des glomérules sont sclérosés<sup>255</sup>. Elle peut être le résultat de l'évolution des néphrites lupiques de classes III, IV et V.

### **3.4.3 Lésions vasculaires et tubulointerstitielles**

Bien que le système de classification n'inclue que les manifestations glomérulaires de la maladie, les lésions tubulointerstitielles et vasculaires sont des prédicteurs importants de la progression vers l'insuffisance rénale

terminale et guident, conjointement avec les lésions glomérulaires, le choix du traitement<sup>255,369-373</sup>. Par exemple, la présence au niveau histologique de dépôts immuns, la formation de thrombi, le développement de vasculites et de sclérose sont des signes d'atteintes vasculaires<sup>255,371</sup>. Les lésions tubulointerstitielles peuvent se traduire par une infiltration interstitielle de cellules inflammatoires, de la fibrose, le développement de tubulites et une atrophie tubulaire<sup>255,369,372</sup>.

#### **3.4.4 Limites dans le diagnostic de la néphrite lupique**

La biopsie rénale permet le prélèvement de très petites quantités de tissus sur l'un des deux reins<sup>216</sup>. Toutefois, les reins ne sont pas nécessairement affectés uniformément et ce qui peut fausser le diagnostic vers la bonne classe de néphrite lupique<sup>374</sup>. Puisque des risques accrues de complications sont associés au prélèvement des couches plus profondes du rein, les biopsies rénales contiennent essentiellement la zone corticale du rein. Il est donc difficile de détecter des lésions dans les régions plus profondes telles que dans la médulla rénale<sup>375</sup>. D'autre part, l'histopathologie évolue au fil du temps et de multiples biopsies rénales seraient nécessaires afin de bien comprendre les mécanismes sous-tendant les dommages rénaux et pour ajuster le traitement<sup>376</sup>. Chez certains patients, les biopsies répétées ont été associées à une amélioration marquée des manifestations cliniques et histologiques, alors qu'elles n'ont aucun effet voire une réduction de la fonction rénale pour d'autres<sup>377</sup>. Par sa nature non-invasive et la localisation physique de ce liquide biologique près de l'activité de la maladie, l'étude de biomarqueurs dans l'urine traduisant l'histopathologie est une avenue prometteuse comme outil diagnostic et pour suivre l'évolution de la néphrite lupique<sup>378</sup>.

### **3.5 Traitements**

Le traitement de la néphrite lupique a pour but de réduire les phases de poussées, de préserver la fonction rénale, de réduire les risques de mortalité et d'augmenter la qualité de vie des patients<sup>363</sup>. Le choix du traitement est dicté par l'histopathologie identifiée dans la biopsie rénale<sup>216,221,363</sup>. Le traitement de la néphrite lupique se fait en deux phases : une phase d'induction et une phase de maintenance<sup>216,363</sup>. La phase d'induction consiste à limiter l'activité rénale et, une fois prise en charge, les traitements de maintenance visent à prévenir les phases de poussées. Les patients atteints des classes I et II de glomérulonéphrite présentent un bon pronostic et ne nécessitent pas de traitements immunosuppresseurs de façon générale<sup>216,221,363</sup>. Les glomérulonéphrites de classe III, IV et V sont quant à elles traitées majoritairement avec la prise orale de glucocorticoïdes, ainsi qu'avec les agents immunosuppresseurs mycophénolate mofétil ou la cyclophosphamide dans la phase d'induction<sup>221,363</sup>. Une fois l'activité de la maladie contrôlée, les doses de mycophénolate mofétil peuvent être diminuées lors de la phase de maintenance de façon à prévenir les phases de poussées de la maladie<sup>379</sup>. D'autre part, l'hydroxychloroquine est recommandée en tout temps pour tous les patients atteints de néphrite lupique, indépendamment de la classification de la maladie<sup>221,363</sup>. La prise d'hydroxychloroquine a été associée à une diminution de l'apparition des phases de poussées et présente peu

d'effets secondaires chez la majorité des patients<sup>221,363</sup>. D'autre part, l'hypertension et la protéinurie ont été associées avec une perte de la fonction rénale<sup>380</sup>. Les inhibiteurs du système rénine-angiotensine-aldostérone dont les inhibiteurs de l'enzyme de conversion et les inhibiteurs de l'angiotensine II, sont fréquemment utilisés pour diminuer la pression artérielle et la protéinurie chez les patients atteints de néphrite lupique et permettent de ralentir l'évolution de la maladie<sup>221,363,380</sup>. De plus, les atteintes rénales ont été associées à une dyslipidémie et au développement de complications cardiovasculaires<sup>221,380</sup>. Les médicaments de type statine sont utilisés pour contrôler la lipidémie.

### **3.6 Évolution de la maladie**

Les atteintes rénales sont le prédicteur le plus important de morbidités et de mortalité dans le LED. Les patients atteints de néphrite lupique ont six fois plus de risques de mortalité que la population générale<sup>381</sup>. Le diagnostic hâtif et la prise en charge rapide sont les meilleurs moyens de limiter les dommages irréversibles aux reins et de maintenir la fonction rénale<sup>156</sup>. La compliance des patients à leur traitement est également essentielle à un bon pronostic<sup>218</sup>. Les traitements avec l'hydroxychloroquine et l'azathioprine ont été associés avec une meilleure survie chez les patients touchés par la néphrite lupique qu'avec les autres agents immunosuppresseurs<sup>205</sup>. Les patients non-caucasiens sont davantage réfractaires aux traitements et donc plus à risque de développer des formes sévères de néphrite lupique<sup>156,215,220,382</sup>. Les glomérulonéphrites prolifératives de classes III et IV sont celles qui sont associées au moins bon pronostic<sup>215,216,380,382,383</sup>. De plus, les lésions tubulointerstitielles secondaires à la glomérulonéphrite de classe IV sont des facteurs majeurs impliqués dans un mauvais pronostic<sup>372</sup>. Dans 10 à 30 % des cas, la fonction rénale des patients atteints de néphrite lupique décline jusqu'au développement de l'insuffisance rénale terminale<sup>215,383</sup>. Cette perte de la fonction rénale se produit majoritairement dans les 10 ans suivant le début de la maladie<sup>383</sup>. À ce stade avancé, les patients nécessitent une dialyse ou une greffe rénale<sup>215,218,363,383</sup>. Même avec des traitements immunosuppresseurs, certains patients sous dialyse continue à présenter des phases de poussées et ne sont pas des candidats pour une transplantation rénale, diminuant le pronostic et augmentant les risques de mortalité<sup>363</sup>.

Toutefois, le pronostic des patients atteints de néphrite lupique s'est grandement amélioré dans les dernières décennies grâce à l'émergence de nouveaux traitements, une meilleure prise en charge, de meilleures conditions socio-économiques et un diagnostic plus hâtif<sup>82,215,268,381-385</sup>. Entre 1995 et 2014, le taux de mortalité chez les patients atteints de LED et présentant de l'insuffisance rénale terminale est passé de 11,1 à 6,7 sur 100 patients-années et la mortalité associée aux maladies cardiovasculaires et aux infections a respectivement diminué de 44 et 63 %<sup>385</sup>. Malgré les progrès, les atteintes rénales sont toujours la plus grande préoccupation dans le LED et plusieurs mécanismes délétères impliqués dans la pathogenèse de la néphrite lupique restent incompris. Le développement de nouvelles cibles thérapeutiques est crucial pour assurer la

prise en charge des patients, particulièrement ceux qui sont réfractaires aux traitements immunosuppresseurs conventionnels.

## 4 Les plaquettes

Les plaquettes sont de petits fragments cellulaires anucléés de forme discoïde dérivés des mégacaryocytes<sup>386</sup>. Avec plus ou moins un billion de plaquettes en circulation à l'âge adulte, elles sont le deuxième type cellulaire le plus abondant du sang après les érythrocytes<sup>387,388</sup>. Elles ont une durée de vie d'environ 10 jours et sont ensuite éliminées de la circulation sanguine via la rate ou le foie<sup>386,389</sup>. Elles sont avant tout connues pour leur rôle dans l'hémostase avec la formation de thrombi et la réparation tissulaire en cas de lésions vasculaires. Toutefois, les plaquettes sont également munies d'une multitude de récepteurs immunitaires et contiennent des molécules immunomodulatrices leur conférant un rôle dans l'immunité et l'inflammation<sup>387,388,390,391</sup>. Particulièrement, leur contribution dans le développement de la néphrite lupique est de plus en plus appréciée<sup>392-397</sup>.

### 4.1 Origine des plaquettes

Les mégacaryocytes sont des cellules polyploïdes de très grande taille dérivées des cellules souches hématopoïétiques<sup>398</sup>. Dans la moelle osseuse, les mégacaryocytes matures sont localisés au niveau de la paroi des sinusoides<sup>386,398</sup>. Ils forment des protrusions cytoplasmiques, également nommées proplaquettes, qui se déploient dans le compartiment vasculaire<sup>386</sup>. Avec la force de cisaillement du sang, des fragments cellulaires, les plaquettes, sont libérés dans la circulation sanguine à partir de ces protrusions des mégacaryocytes. Chaque mégacaryocyte peut donner naissance à un nombre important de plaquettes, variant entre 100 à 1000<sup>399</sup>. La maturation des mégacaryocytes et, par défaut, la production des plaquettes, sont majoritairement régulées par la thrombopoïétine<sup>386,398,400</sup>. D'autres hormones et certaines cytokines sont également impliquées dans ce processus. Les mégacaryocytes peuvent quitter la moelle osseuse et migrer vers d'autres organes où aura lieu la production de plaquettes<sup>398,401</sup>. Les poumons sont un site majeur de thrombopoïèse en produisant environ 50 % des plaquettes en circulation<sup>401</sup>. La rate a également été identifiée comme un site de biogenèse des plaquettes dans certains contextes inflammatoires<sup>402,403</sup>.

### 4.2 Contenu des plaquettes

Le contenu intracellulaire des plaquettes provient des mégacaryocytes<sup>399,404,405</sup>. Lors de la formation des proplaquettes, les vésicules sécrétoires, les organites, le cytosquelette et le transcriptome des plaquettes en devenir sont transportés par le réseau microtubulaire à l'extrémité des protrusions cytoplasmiques dans les mégacaryocytes<sup>399,405</sup>.

### **4.2.1 Vésicules sécrétoires**

Les plaquettes sont composées de trois types distincts de vésicules sécrétoires, soient les granules  $\alpha$  et denses et les lysosomes<sup>406</sup>. Celles-ci sont formées dans les mégacaryocytes et transférées aux plaquettes au moment de la thrombopoïèse. Les granules  $\alpha$  sont les plus abondantes avec 50 à 80 granules par plaquette, suivies des granules denses avec trois à huit et des lysosomes avec une à deux par cellule. Les granules  $\alpha$  contiennent plus de 300 protéines solubles impliquées dans différentes fonctions effectrices des plaquettes telles que l'hémostase, l'inflammation et la réparation tissulaire. Parmi celles-ci, on retrouve le facteur von Willebrand (vWF), le facteur plaquettaire 4 (PF4), les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire et des fibroblastes, l'intégrine  $\alpha$ Ib $\beta$ 3, la sélectine P et CD40 ligand (CD40L). D'autre part, les granules denses contiennent de l'ADP, de l'ATP, de la sérotonine, de l'histamine et du calcium<sup>406,407</sup>. Finalement, les lysosomes renferment quant à eux des hydrolases acides telles que l'hexosaminidase, des cathepsines, des  $\beta$ -galactosidase et des phosphatases acides<sup>408</sup>. Plus récemment, les granules T contenant TLR9 et la protéine disulfure isomérase ont également été identifiées dans les plaquettes<sup>387</sup>. La majorité des composantes des granules sont fabriquées par les mégacaryocytes, mais d'autres peuvent être internalisées par les plaquettes ou les mégacaryocytes<sup>386</sup>. L'activation des plaquettes conduit à la dégranulation, soit au déversement du contenu de ces vésicules dans le milieu extracellulaire<sup>408</sup>.

### **4.2.2 Transcriptome et traduction**

Bien que anucléées, les plaquettes possèdent un transcriptome rappelant celui des cellules nucléées et lui permettant d'exercer ses fonctions effectrices<sup>409,410</sup>. La majorité de leur transcriptome provient des mégacaryocytes, mais peut également être transféré par contact cellule-cellule ou par l'internalisation de vésicules extracellulaires provenant de cellules environnantes<sup>404</sup>. Les plaquettes possèdent donc la machinerie nécessaire à la traduction des ARNm en protéines incluant les ribosomes<sup>390,405,411</sup>. Puisque les plaquettes possèdent tous les ARN nécessaires à l'exercice de leurs fonctions, les ARNm sont rapidement traduits en protéines en réponse à l'activation plaquettaire.

### **4.2.3 Protéasome**

Les plaquettes contiennent également le protéasome impliqué dans la dégradation des peptides<sup>412</sup>. Ces peptides peuvent ensuite être présentés via des molécules de CMH I à la surface des plaquettes.

### **4.2.4 Mitochondries**

Chaque plaquette contient environ 5 à 8 mitochondries<sup>411</sup>. En plus de leur rôle dans le métabolisme énergétique des plaquettes, les mitochondries régulent leur durée de vie, l'activation plaquettaire en modulant le calcium intracytoplasmique, la production d'ERO et le processus d'apoptose. Les mitochondries contiennent également de l'ADNmt qui peut être transcrits et traduits dans les plaquettes.

#### 4.2.5 Cytosquelette

Le cytoplasme des plaquettes se compose également d'un cytosquelette d'actine et de myosine ce qui leur permet de changer de forme pour exercer leurs fonctions dans l'hémostase<sup>386</sup>. Le transport des vésicules sécrétoires jusqu'à la surface des plaquettes suivant leur activation est aussi assuré par le cytosquelette, processus essentiel à la dégranulation plaquettaire<sup>408</sup>. Le cytosquelette est également le lieu de traduction des ARNm en protéines dans les plaquettes<sup>405</sup>.

### 4.3 Rôle dans l'hémostase

Les plaquettes jouent un rôle essentiel dans l'hémostase en assurant le maintien de l'intégrité des vaisseaux sanguins<sup>413</sup>. Les plaquettes expriment différentes glycoprotéines, I à IX, agissant comme des récepteurs membranaires et permettant la liaison à l'espace sous-endothéliale en cas de lésions vasculaires<sup>386</sup>. Les ligands pour ces récepteurs sont essentiellement des composantes de la matrice extracellulaire telles que le collagène, la laminine et la fibronectine<sup>413</sup>. Lors de dommages vasculaires, les composantes de la matrice sous-endothéliale sont exposées et rapidement détectées par les plaquettes qui patrouillent le sang. D'abord, le vWF présent dans le sang lie le collagène exposé et interagit avec les plaquettes via GPIb favorisant leur ralentissement dans la circulation sanguine. L'expression de la sélectine P par l'endothélium activé favorise également le roulement des plaquettes via une interaction avec le ligand de la sélectine P (PSGL-1) exprimé par ces dernières<sup>414,415</sup>. Puis, les plaquettes adhèrent à l'espace sous-endothélial via une interaction entre GPIV et le collagène exposé. Cela mène à l'activation plaquettaire et à la libération du contenu des granules  $\alpha$  et denses dans le milieu extracellulaire, ainsi qu'à l'activation des intégrines  $\alpha 2\beta 1$  et  $\alpha IIb\beta 3$ . Celles-ci permettent l'adhésion ferme au collagène et au fibrinogène respectivement de la matrice sous-endothéliale au niveau du site de lésion. De plus, les plaquettes activées passent d'une forme discoïde à une forme davantage étoilée facilitant leur adhésion à l'endothélium lésé<sup>386</sup>. Il y a ensuite agrégation plaquettaire, essentiellement médiée par l'interaction entre le fibrinogène et l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$  entre les plaquettes<sup>413,416,417</sup>. Les plaquettes forment également des jonctions serrées entre elles afin de limiter les pertes de sang au niveau de la lésion vasculaire<sup>413</sup>. La libération d'agonistes des plaquettes contenues dans les granules comme l'ADP permet aux plaquettes circulantes d'adhérer aux autres couches de plaquettes et la formation d'un thrombus. De plus, l'activation des plaquettes conduit à l'activation de la cascade de coagulation et le thrombus est consolidé avec de la fibrine<sup>386,413</sup>.

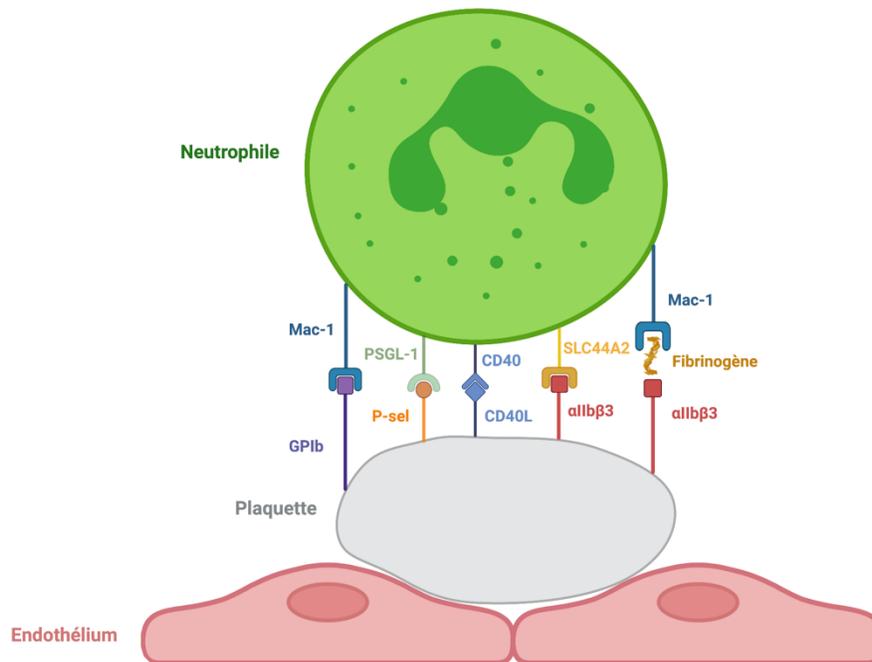
Les plaquettes jouent aussi un rôle essentiel dans la réparation et le remodelage des vaisseaux sanguins endommagés<sup>413,418,419</sup>. Notamment, en réponse à l'engagement de l'intégrine GPIIb, les plaquettes libèrent le facteur  $1\alpha$  dérivé des cellules stromales (SDF-1 $\alpha$ ), chimiokine favorisant le recrutement de cellules progénitrices hématopoïétiques au lieu de la lésion vasculaire<sup>418</sup>. Ces cellules interagissent ensuite avec les

plaquettes activées via une interaction PSGL-1 - sélectine P. Elles pourront ensuite se différencier en cellules endothéliales sous l'action de SDF-1 $\alpha$  et du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) <sup>418,419</sup>.

## 4.4 Rôle dans l'inflammation et l'immunité

### 4.4.1 Recrutement de cellules immunitaires au site inflammatoire

Les plaquettes activées expriment CD40L et interagissent avec les cellules endothéliales via CD40<sup>390</sup>. En réponse, ces dernières augmentent leur expression de molécules d'adhésion et la production de chimiokines favorisant le recrutement de cellules immunitaires au site inflammatoire. Les plaquettes activées peuvent également interagir avec différents leucocytes dans la circulation sanguine<sup>390,420</sup>. Suivant leur activation, elles libèrent différentes chimiokines qui favorisent le recrutement de leucocytes, principalement les neutrophiles, et des cytokines qui permettent l'activation et l'adhésion de ces derniers à l'endothélium. Une interaction efficace plaquette-neutrophile est essentielle en contexte inflammatoire pour permettre l'extravasation des neutrophiles<sup>397,421</sup>. Les principales interactions entre les plaquettes et les neutrophiles en contexte inflammatoire sont entre la glycoprotéine 1b et mac-1, la sélectine P et le PSGL-1,  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 et le *solute carrier family 44 member 2* et entre  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 et mac-1 médiée par le fibrinogène (Figure 1.7)<sup>414,422-424</sup>. De plus, les plaquettes et les neutrophiles interagissent également via une interaction CD40L-CD40 menant à l'activation, au ralentissement et à la migration transendothéliale des neutrophiles au site inflammatoire<sup>425</sup>. D'autre part, la libération de PF4 par les plaquettes favorise l'activation des neutrophiles et les interactions avec l'endothélium<sup>426</sup>. Finalement, les plaquettes régulent la perméabilité vasculaire via l'expression du récepteur



**Figure 1.7 Principales interactions entre les plaquettes et les neutrophiles en contexte inflammatoire.** GPIIb, glycoprotéine Ib; PSGL-1, ligand de la sélectine P; P-sel, p-sélectine; CD40L, CD40 ligand; SLC44A2, *solute carrier family 44 member 2*. La figure a été créée avec BioRender.

de type lectine de type C 2 (CLEC-2) et GPVI<sup>427-429</sup>. Ils favorisent la diapédèse des cellules immunitaires et préviennent les saignements reliés à la diapédèse des leucocytes. Les plaquettes libèrent également la sérotonine contenue dans leurs granules denses suivant leur activation ce qui favorise d'autant plus la perméabilité vasculaire<sup>394,430</sup>. La sérotonine a également été identifiée comme favorisant le recrutement de neutrophiles au foyer inflammatoire<sup>431</sup>.

#### 4.4.2 Amplification de l'inflammation

Les plaquettes sont munies de différents récepteurs immunitaires et molécules immunomodulatrices leur conférant un rôle dans l'inflammation et l'immunité<sup>387,390</sup>. Entre autres, les plaquettes humaines et murines expriment différents PRR dont les TLR1 à 9 et participent donc à la détection des PAMP et des DAMP<sup>387,388,432</sup>. Via les TLR, les plaquettes peuvent détecter la présence d'agents pathogènes et libérer certaines substances anti-microbiennes telles que de la thrombocidine<sup>390</sup>. La liaison des plaquettes aux agents pathogènes via les TLR favorise également la phagocytose subséquente de ceux-ci par les phagocytes. En contexte infectieux, les plaquettes peuvent également libérer des ERO comme du peroxyde d'hydrogène afin de neutraliser les agents pathogènes<sup>388,433</sup>. De plus, suivant l'activation des plaquettes, TLR9 est relocalisé des granules T vers la surface des plaquettes<sup>387</sup>. Pendant le sepsis, l'engagement de TLR4 des plaquettes permet l'activation des neutrophiles et leur libération de pièges extracellulaires<sup>390,434</sup>.

Les plaquettes activées procèdent à la dégranulation et libèrent des substances pro-inflammatoires et chimioattractantes<sup>388,390</sup>. Suivant leur activation, des formes solubles et membranaires de CD40L sont libérées des granules  $\alpha$ <sup>435,436</sup>. CD40L sous sa forme soluble influence les fonctions effectrices des plaquettes et favorise la libération d'ERO<sup>436</sup>. En plus de promouvoir leur recrutement au foyer inflammatoire, les plaquettes activées mènent également à la libération de différentes cytokines inflammatoires et chimiokines par les neutrophiles et les DC permettant le recrutement de davantage de cellules inflammatoires<sup>390,437</sup>. Par exemple, le PF4 favorise l'activation et la dégranulation des neutrophiles<sup>426</sup>. D'autre part, l'interaction entre l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activée des plaquettes et le *solute carrier family 44 member 2* des neutrophiles favorisent la libération de pièges extracellulaires par ces derniers<sup>422</sup>. De plus, les plaquettes activées libèrent des mitochondries seules ou dans des microparticules dans le milieu extracellulaire<sup>341</sup>. Étant d'origine microbienne, les mitochondries ont donc des propriétés inflammatoires<sup>141,341</sup>. Elles peuvent être internalisées localement par d'autres leucocytes et dégradées par la phospholipase A2 de groupe IIA sécrétée (sPLA2-IIA) en acide arachidonique<sup>324</sup>. L'acide arachidonique est le précurseur des eicosanoïdes tels que les leucotriènes impliquées dans l'inflammation<sup>341,438</sup>. De plus, cette enzyme dégrade les mitochondries en ADNmt qui peut également activer les cellules immunitaires via TLR9<sup>140</sup>. Les mitochondries et l'ADNmt libérés par les plaquettes favorisent aussi la libération de pièges extracellulaires par les neutrophiles<sup>341</sup>. De plus, les plaquettes peuvent libérer des microparticules lors de leur activation<sup>412,439</sup>. Les microparticules libérées par les

plaquettes activées sont les plus nombreuses dans le sang et peuvent contenir des mitochondries, des ARN et des facteurs de transcription. Elles peuvent être internalisées par des neutrophiles et peuvent influencer leurs fonctions effectrices<sup>440</sup>. D'autre part, les microparticules de plaquettes peuvent pénétrer et être internalisées par les cellules dans la moelle osseuse<sup>441</sup>. Elles pourraient agir comme messenger entre le sang et la moelle osseuse et influencer l'hématopoïèse.

#### **4.4.3 Régulation de l'immunité adaptative**

Les plaquettes possèdent du protéasome fonctionnel et peuvent apprêter les antigènes en peptides pour la présentation antigénique<sup>412</sup>. Les plaquettes peuvent présenter des antigènes via leur molécule CMH I et fournir les signaux de co-stimulation nécessaire à l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup><sup>412</sup>. Les plaquettes sont également capables de phagocytose et d'internaliser des bactéries et des virus<sup>388,433</sup>. Toutefois, si les plaquettes sont capables de faire la présentation croisée des antigènes provenant des pathogènes internalisés n'est pas connu. De plus, les plaquettes activées expriment CD40L et peuvent ainsi interagir et favoriser l'activation des DC et des monocytes<sup>390,435,436</sup>. Grâce à leur petite taille, certaines microparticules dérivées des plaquettes contenant également un protéasome fonctionnel et fournissant le signal de co-stimulation CD40L peuvent atteindre les organes lymphoïdes secondaires et mener à l'activation de lymphocytes T CD8<sup>+</sup><sup>412</sup>. Les plaquettes peuvent donc promouvoir la présentation d'antigènes aux lymphocytes T et l'activation de la réponse adaptative. De plus, les microparticules exprimant CD40L sont capables de favoriser la différenciation et la commutation isotypique des lymphocytes B<sup>390,442</sup>.

### **4.5 Les plaquettes dans la néphrite lupique**

Les plaquettes ont été associées au développement de la néphrite lupique et identifiées aux reins dans les modèles murins de glomérulonéphrites et dans les biopsies rénales de patients malades<sup>392-396,443-445</sup>. Elles sont activées de façon chronique par les CI via FcγRIIA dans le LED et leur activation corrèle avec les IgG dans le sang<sup>393-395,420,446</sup>. En effet, les plaquettes en circulation expriment davantage la sélectine P à leur surface, un marqueur d'exocytose des granules  $\alpha$ <sup>406,446</sup>. De plus, les niveaux sériques de thromboxane B<sub>2</sub> et les microparticules dérivées des plaquettes sont également augmentés dans le LED, tous deux des indicateurs d'activation plaquettaire<sup>446,447</sup>. En plus de FcγRIIA, les plaquettes peuvent être activées dans le LED via TLR9 par les CI contenant de l'ADN et via les récepteurs du complément<sup>394,397</sup>. D'autre part, différentes molécules inflammatoires libérées par les cellules résidentes rénales ou les cellules inflammatoires infiltrant le rein telles que le PAF et la thromboxane A<sub>2</sub> peuvent conduire à l'activation des plaquettes aux reins<sup>374,394,397</sup>. Par exemple, les neutrophiles, les monocytes et les cellules endothéliales et mésangiales rénales peuvent produire du PAF<sup>374</sup>. Les plaquettes activées peuvent également libérer du PAF et mener à l'activation de davantage de plaquettes<sup>393,448</sup>. Conséquemment aux dommages rénaux, la matrice extracellulaire est exposée dans la néphrite lupique et les plaquettes peuvent être activées par exemple par le collagène via GPVI<sup>393,449</sup>.

Suivant leur activation, les plaquettes libèrent les molécules contenues dans leurs vésicules sécrétoires, des microparticules et des antigènes du soi impactant le développement de la néphrite lupique<sup>396</sup>.

D'une part, le PAF conduit à l'accumulation de plaquettes et leucocytes aux glomérules et favorise l'activation du système du complément contribuant donc aux dommages tissulaires dans la néphrite lupique<sup>393,448</sup>. De plus, ce phospholipide favorise la prolifération des cellules mésangiales et leur production d'ERO<sup>393</sup>. D'autre part, différentes protéines cationiques sont libérées par les plaquettes lors de la dégranulation telles que PF4, neutralisant la charge nette négative de la barrière de filtration glomérulaire et altérant son intégrité<sup>393</sup>. PF4 est également associé à l'activation des neutrophiles et de l'endothélium<sup>426</sup>. Le TGF- $\beta$  libéré par les plaquettes a des propriétés chimioattractantes et favorise le recrutement de leucocytes aux reins dans la néphrite lupique<sup>393</sup>. De plus, le contenu en sérotonine des granules denses dans les plaquettes de patients atteints de LED sont diminués et ce phénomène corrèle avec l'activité de la maladie<sup>450</sup>. En présence de CI, les plaquettes sont activées via Fc $\gamma$ RIIA et libèrent de la sérotonine<sup>430,451</sup>. Celle-ci augmente la perméabilité vasculaire et pourrait favoriser le recrutement de leucocytes, notamment les neutrophiles, aux reins<sup>430,431</sup>. De plus, la sérotonine peut favoriser l'activation des monocytes et des lymphocytes T favorisant l'inflammation chronique aux reins<sup>452,453</sup>. L'histamine a aussi été associée avec une augmentation de la perméabilité vasculaire favorisant la migration des leucocytes aux reins<sup>393</sup>.

De plus, les niveaux sériques de CD40L solubles sont élevés dans le LED et corrélerent avec l'activité de la maladie<sup>394,454</sup>. Avec les lymphocytes T, les plaquettes sont une source majeure de CD40L solubles dans la maladie. CD40 est exprimé aux reins par les cellules endothéliales, les cellules mésangiales et par les cellules épithéliales du tubule distal<sup>455</sup>. De plus, l'interaction CD40-CD40L fournit les signaux nécessaires pour l'activation et la prolifération des lymphocytes T et B autoréactifs, ainsi que la commutation isotypique<sup>390,442</sup>. Pour les mDC, cette interaction mène à leur maturation et à la présentation d'antigènes du soi<sup>394,454</sup>. L'axe CD40-CD40L a été associé avec le développement de la néphrite lupique. L'interaction CD40-CD40L entre les plaquettes et les cellules mésangiales conduit à leur prolifération et leur production de TGF- $\beta$ , cytokine impliquée dans le processus de fibrose<sup>456</sup>. De plus, les plaquettes activées interagissent dans le LED avec les pDC via une interaction CD40L-CD40<sup>392,394</sup>. Cette interaction favorise la maturation des pDC et leur production d'IFN de type I. CD40L à la surface des plaquettes ou CD40L soluble pourraient activer les cellules résidentes rénales, les lymphocytes T et B et les mDC et favoriser la présentation d'antigènes.

Les auto-anticorps dirigés contre l'ADN double brin sont les auto-anticorps les plus étroitement liés au développement de la néphrite lupique<sup>86,108,248</sup>. L'activation des plaquettes par les CI via Fc $\gamma$ RIIA mènent à la libération d'antigènes mitochondriaux sous forme d'ADNmt et de mitochondries entières<sup>396</sup>. Ainsi, bien qu'elles soient anucléées, les plaquettes sont une source d'ADN extracellulaire dans le LED<sup>341,396</sup>. Contrairement aux cellules phagocytaires, TLR9 est exprimé à la surface des plaquettes activées<sup>387</sup>. De plus, la co-stimulation des plaquettes via Fc $\gamma$ RIIA et de TLR9 augmente la libération de mitochondrie<sup>396</sup>. L'ADNmt est hypométhylé et

est reconnue par TLR9 et par STING favorisant donc la libération d'IFN de type I par les phagocytes<sup>123,147</sup>. De plus, par différents mécanismes, les plaquettes favorisent la libération de pièges extracellulaires par les neutrophiles<sup>341,422</sup>. Ainsi, les plaquettes augmentent la charge d'antigènes du soi dans le milieu extracellulaire dans le LED. D'autres part, les antigènes mitochondriaux sont reconnus par différents auto-anticorps dans la maladie et sont associés au développement de la néphrite lupique<sup>123</sup>. Considérant l'abondance des plaquettes dans le sang, celles-ci constituent un réservoir important de mitochondries en circulation<sup>341</sup>. De plus, les mitochondries libérées par les plaquettes peuvent être dégradés par la sPLA2-IIA dans des leucocytes environnants et mener à la formation de différents médiateurs lipidiques hautement pro-inflammatoire dérivés de l'acide arachidonique<sup>341</sup>. Les microparticules de plaquettes sont les principales microparticules dans le sang et leur libération par les plaquettes est augmentée dans le LED<sup>457</sup>. Ces microparticules peuvent contenir des antigènes du soi telles que des antigènes mitochondriaux comme décrit ci-haut et peuvent contenir des IgG à leur surface agissant comme des CI en circulation<sup>458,459</sup>. Ces microparticules se déposent aux reins dans la néphrite lupique où ils peuvent mener à l'activation du système du complément et des FcγR favorisant l'inflammation et les dommages tissulaires aux reins<sup>460</sup>.

D'autre part, les plaquettes ont été associées au processus de fibrose dans la néphrite lupique<sup>393,444</sup>. En effet, les plaquettes libèrent du PDGF et du TGF-β. Le PDGF peut induire la prolifération des cellules mésangiales et favoriser leur production de matrice extracellulaire et de TGF-β. De plus, via une interaction CD40-CD40L avec les cellules mésangiales, les plaquettes peuvent directement promouvoir leur production de TGF-β<sup>394</sup>. Le TGF-β induit la production de matrice extracellulaire telle que des protéoglycanes, du collagène et de la fibronectine menant à de la fibrose glomérulaire et interstitielle aux reins<sup>393</sup>.

## 5 Le modèle murin NZB/WF1.FcγRIIA<sup>TGN</sup> de LED

Il existe une variété de modèles murins de LED permettant de recréer une ou plusieurs manifestations de la maladie humaine dont la néphrite lupique<sup>461</sup>. Elle peut être induite expérimentalement ou encore se développer spontanément chez certaines lignées de souris possédant un fond génétique les prédisposant au développement d'une maladie auto-immune rappelant le LED. Le modèle multigénique NZB/WF1 est un modèle murin spontané de LED généré il y a plus de 60 ans et est l'un des modèles expérimentaux les plus largement utilisés et étudiés<sup>461,462</sup>. Il s'agit de souris issues de la première génération du croisement entre des souris de lignée *New Zealand Black* (NZB) et *New Zealand White* (NZW). Les souris NZB et NZW possèdent toutes deux des caractéristiques légères d'auto-immunité. Lorsque croisées, les souris hybrides NZB/WF1 possèdent plusieurs gènes leur conférant des caractéristiques d'auto-immunité sévères<sup>462</sup>. Le modèle NZB/WF1 est souvent décrit comme le modèle murin de LED qui permet de mimer le plus fidèlement la pathogenèse et les manifestations de la maladie humaine. Notamment, les souris de ce modèle développent des titres élevés d'auto-anticorps dirigés contre l'ADN double brin et la chromatine<sup>461</sup>. Tout comme chez

l'humain, le biais des sexes est présent et les souris femelles développent une maladie beaucoup plus sévère que les souris mâles<sup>462</sup>. De plus, les souris développent progressivement une glomérulonéphrite et des atteintes rénales tubulointerstitielles<sup>462,463</sup>. Elles décèdent des suites d'une néphrite lupique sévère après environ huit à dix mois de vie ce qui en fait est un excellent modèle pour étudier les mécanismes sous-tendant le développement de la néphrite lupique.

## **5.1 Ajout du transgène humain codant pour Fc $\gamma$ RIIA dans le modèle murin NZB/WF1 de LED**

Différents polymorphismes au niveau des gènes codant pour les Fc $\gamma$ R ont été associés au développement de la néphrite lupique chez l'humain suggérant un rôle de ces récepteurs dans la maladie<sup>156,228,231</sup>. De plus, l'ablation de la chaîne FcR $\gamma$  dans le modèle NZB/WF1 protège les souris contre le développement d'une néphrite lupique sévère malgré la formation de CI aux reins et l'activation locale du système du complément<sup>276</sup>. Les trois Fc $\gamma$ R activateurs murins, soient Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIII et Fc $\gamma$ RIV, sont associés à la chaîne FcR $\gamma$  permettant la signalisation ITAM<sup>290</sup>. Cette étude indique donc que les Fc $\gamma$ R activateurs pourraient être délétères dans la néphrite lupique et représenter une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de la maladie<sup>276</sup>. L'équivalent murin du récepteur activateur Fc $\gamma$ RIIA humain est absent chez la souris<sup>290</sup>. Fc $\gamma$ RIIA est le Fc $\gamma$ R le plus important du sang en termes de quantité chez l'humain. Ainsi, afin d'étudier un modèle murin qui mime le plus fidèlement possible la pathogenèse humaine, le transgène humain FCGR2A codant pour le récepteur Fc $\gamma$ RIIA a été ajouté par notre groupe dans le modèle murin NZB/WF1<sup>395</sup>. L'ajout de ce transgène accélère significativement le développement de la néphrite lupique chez les souris NZB/WF1, avec le développement d'atteintes rénales sévères près de dix semaines plus tôt pour les souris transgéniques comparativement aux souris sauvages<sup>395</sup>. Chez ces souris, Fc $\gamma$ RIIA est uniquement exprimé par les cellules myéloïdes et absent des cellules lymphoïdes comme pour l'humain<sup>290,395</sup>. Fc $\gamma$ RIIA est le seul Fc $\gamma$ R exprimé par les plaquettes humaines<sup>290</sup>. En absence du transgène, les plaquettes murines sont dépourvues de tout Fc $\gamma$ R et les réponses résultantes de l'activation des plaquettes par les CI sont donc absentes chez la souris. Considérant l'abondance des plaquettes, celles-ci représentent une source importante de Fc $\gamma$ RIIA dans le sang<sup>387,388</sup>.

Dans le modèle NZB/WF1.Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup>, les plaquettes sont davantage activées et interagissent plus avec les neutrophiles dans la circulation lorsque le transgène est exprimé<sup>395</sup>. De plus, les plaquettes exprimant Fc $\gamma$ RIIA, mais pas celles de souris sauvages, présentent une signature IFN de type I, avec une hausse de l'expression des gènes induits par ces cytokines tel qu'observé chez l'humain<sup>395</sup>. Ainsi, l'ajout du transgène humain codant pour Fc $\gamma$ RIIA récapitule plus fidèlement la pathogenèse humaine et permet d'étudier la contribution des plaquettes activées par les CI dans le développement de la néphrite lupique<sup>395</sup>.

## 6 Problématique, hypothèse de recherche et objectifs expérimentaux

### 6.1 Problématique

Les atteintes rénales sont le prédicteur le plus important de mortalité dans le LED<sup>82,84,212,213</sup>. Elles touchent près de 60 % des patients qui sont atteints du LED et conduit à de l'insuffisance rénale terminale dans 10 à 30 % des cas<sup>195</sup>. La néphrite lupique est donc l'une des complications les plus fréquentes et sérieuses du LED. La pathogenèse est encore à ce jour partiellement comprise et les traitements actuels sont limités et comportent des risques pour la santé<sup>82</sup>. La compréhension des mécanismes délétères mis en place dans la néphrite lupique est essentielle pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques et assurer une prise en charge adéquate et efficace des patients qui en sont atteints.

Le dépôt ou la formation *in situ* de CI de type IgG aux reins est un mécanisme pathogénique commun à tous les patients atteints de néphrite lupique<sup>464</sup>. Via l'activation du système du complément et des cellules résidentes et immunitaires infiltrantes du rein, leur présence mènent à de l'inflammation locale et aux dommages tissulaires. En plus des CI, les plaquettes et les neutrophiles s'accumulent aux reins dans la néphrite lupique et contribuent à la pathogenèse de la maladie<sup>217,393,396,397,445</sup>. Entre autres, les plaquettes et les neutrophiles augmentent la signature IFN de type I et la charge antigénique dans le milieu extracellulaire via la libération d'antigènes mitochondriaux et de pièges extracellulaires respectivement<sup>148,395,396</sup>. Dans le LED, les CI activent les plaquettes via FcγRIIA, l'unique FcγR exprimé par les plaquettes humaines<sup>290,395,397</sup>. Considérant l'abondance des plaquettes, FcγRIIA est le FcγR le plus abondant du sang. Toutefois, la souris n'exprime pas FcγRIIA<sup>290</sup>. Les plaquettes murines étant dépourvues de tout FcγR, les réponses résultantes de l'activation des plaquettes par les CI observées chez l'humain y sont totalement absentes. Dans le laboratoire d'accueil, le transgène humain codant pour FcγRIIA a été ajouté dans le modèle murin NZB/WF1 multigénique de LED<sup>395</sup>. Le développement de la néphrite lupique est accéléré de près de dix semaines chez les souris exprimant le transgène comparativement à leurs homologues sauvages. L'expression de FcγRIIA permet de reproduire encore plus fidèlement la pathogenèse humaine de néphrite lupique avec une activation plaquettaire via FcγRIIA en présence de CI et une signature IFN de type 1 unique aux souris NZB/WF1 transgéniques<sup>395</sup>. De plus, les plaquettes et les neutrophiles interagissent davantage dans la circulation lorsque FcγRIIA est présent. Une interaction efficace plaquette-neutrophile est requise en contexte inflammatoire pour permettre l'adhésion et la migration transendothéliale des neutrophiles<sup>397,421</sup>.

### 6.2 Hypothèse de recherche

En réponse à la présence de CI aux reins, nous émettons l'hypothèse que les plaquettes activées via FcγRIIA interagissent avec les neutrophiles et accélèrent leur recrutement aux reins dans le LED.

## **6.3 Objectifs expérimentaux**

- 6.3.1 Étudier la présence de plaquettes et de neutrophiles aux reins aux différents stades du développement de la néphrite lupique**
- 6.3.2 Localiser les plaquettes et les neutrophiles dans les différentes zones anatomiques rénales pendant la maladie**
- 6.3.3 Étudier la relation entre le recrutement des plaquettes et des neutrophiles aux reins dans la néphrite lupique**
- 6.3.4 Vérifier la contribution de Fc $\gamma$ RIIA dans le recrutement des plaquettes et des neutrophiles aux reins**
- 6.3.5 Caractériser l'expression spatiotemporelle de Fc $\gamma$ RIIA aux reins pendant le développement de la néphrite lupique**

# Chapitre 1 : Méthodes

## 1 Modèle murin NZB/WF1.Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup>

Tous les protocoles impliquant les animaux ont été approuvés par le Comité de protection des animaux de l'Université Laval. Les lignes directrices et les politiques du Conseil canadien de protection des animaux ont été appliquées. Les souris de lignée C57BL/6J (#000664), C57BL/6J.Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> (#003542), NZW/LacJ (#001058) et NZB/BINJ (#100008) utilisées pour générer les souris NZB/WF1.Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> proviennent de chez *Jackson Laboratory*. Les souris étaient hébergées aux animaleries du Centre de recherche du CHU de Québec – Université Laval du bloc T et R du site CHUL. Considérant le biais des sexes dans le LED, seules les souris femelles ont été étudiées dans cette étude.

### 1.1 Génération du modèle murin NZB/WF1.Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> de néphrite lupique

Afin de générer le modèle murin de néphrite lupique exprimant Fc $\gamma$ RIIA, des souris femelles hémizygotés C57BL/6J.Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> ont été croisées avec des mâles NZW/LacJ<sup>395</sup>. Les souris hybrides hémizygotés NZW/LacJ.Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> ont été rétro-croisées avec leur parent NZW/LacJ jusqu'à l'obtention de souris ayant un fond génétique similaire à 99% à celui-ci. Ces souris ont été croisées avec des femelles NZB/BINJ afin d'obtenir des souris de fond génétique NZB/WF1 sujettes à développer le LED, exprimant ou non Fc $\gamma$ RIIA.

### 1.2 Points limites

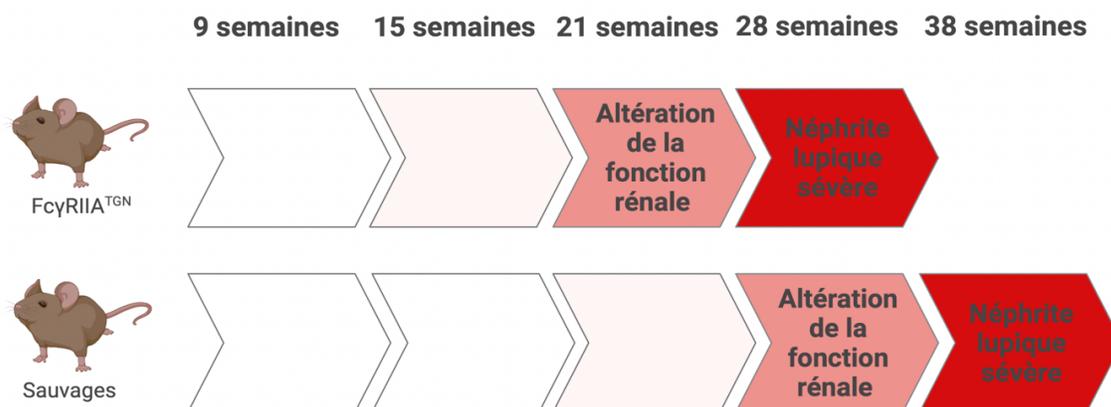
Les points limites ont été fixés pour les souris NZB/WF1 sauvages et NZB/WF1.Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> à une perte de poids de 30 % et la présence d'une albuminurie sévère. Les souris étaient suivies toutes les deux semaines pendant les 24 premières semaines de vie et de façon hebdomadaire par la suite jusqu'au développement de la néphrite lupique sévère.

### 1.3 Mesure de l'albuminurie

La concentration d'albumine dans l'urine des souris a été évaluée avec les bandelettes Albutix (Siemens, 2870U) en se rapportant à la charte de couleur fournit par le fabricant. Une albuminurie de 2000 milligrammes d'albumine par décilitre a été considérée comme sévère.

### 1.4 Critères de sélection pour les groupes d'âges

L'étude d'une cohorte d'une centaine de souris de lignée NZB/WF1 sauvages et Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> dans le laboratoire d'accueil a permis d'établir différents moment-clés dans le développement de la néphrite lupique (Figure 2.1)<sup>395</sup>. Les souris des groupes 9, 15 et 21 semaines ont été sélectionnées sur la base de leur âge.



**Figure 2.1. Les différents moment-clés du développement de la néphrite lupique dans le modèle NZB/WF1.** Quatre groupes d'âge (9, 15, 21 et 28 semaines) pour les souris NZB/WF1.Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> et cinq groupes d'âge (9, 15, 21, 28 et 38 semaines) pour les souris NZB/WF1 sauvages ont été établis. L'évolution de la maladie est présentée par le dégradé de rouge. À 9 semaines, les souris NZB/WF1 ne présentent aucun signe de maladie ; elles ont un niveau basal d'IgG sérique et ne présentent pas d'albuminurie. À 21 semaines, l'albuminurie apparaît pour les souris NZB/WF1.Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> traduisant une altération de la fonction rénale. Le groupe de 15 semaines a été choisi à titre de point milieu entre le stade pré-maladie et le début de l'altération de la fonction rénale. À 28 semaines, 50 % des souris NZB/WF1.Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> développent une néphrite lupique sévère qui se caractérise par une perte de poids de 30 %, de l'albuminurie sévère (2000 mg/dl) et des dommages histologiques rénaux, alors que ce stade de la maladie est seulement atteint à 38 semaines pour les souris NZB/WF1 sauvages. La figure a été créée avec *BioRender*.

Dû à une variabilité dans l'apparition des symptômes cliniques de la maladie pour les deux génotypes, les souris de 9 semaines ne devaient pas présenter d'albuminurie, alors qu'elle devait être présente chez les souris de 21 semaines. Les groupes de 28 semaines pour les souris Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> et 38 semaines pour les souris sauvages correspondent respectivement aux groupes de souris malades, c'est-à-dire ayant développées une néphrite lupique sévère, indépendamment de leur âge. Le développement d'une néphrite lupique sévère était établi par la présence d'albuminurie sévère et une perte de poids de 30 %. Au moment du sacrifice des souris transgéniques malades, des souris sauvages d'âge égal étaient également sacrifiées et composent le groupe de 28 semaines.

## 2 Marquages par immunofluorescence

### 2.1 Perfusion transcardiaque

Les souris ont reçu par voie intra-péritonéale 0,1 ml par 30 g de poids corporel d'une solution de kétamine (90 mg/ml) et de xylazine (10 mg/ml). Sous anesthésie, une aiguille de calibre 20 liée à la pompe à perfusion a été insérée dans la lumière du ventricule gauche des souris via l'apex. L'oreillette droite a été immédiatement sectionnée pour permettre l'écoulement du sang. Les souris ont été perfusées avec 50 ml d'une solution froide de tampon phosphate salin (PBS) pH 7,4 (Hydrogénophosphate de sodium (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 5,6 mM, de chlorure de sodium (NaCl) 1,54 mM, dihydrogénophosphate de potassium (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1,06 mM) afin de retirer le contenu de

la circulation sanguine, suivie de 50 ml d'une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4 % pH 7,4 (PFA 4 %, dihydrogénophosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 23 mM, phosphate disodique ( $\text{Na}_2\text{PO}_4$ ) 77 mM) froide. Les reins ont été récoltés, brièvement lavés avec du PBS froid et fixés dans une solution de PFA 4 % pendant 24 h à 4 °C. Les reins ont ensuite été transférés successivement dans des solutions de sucrose 20 % et de sucrose 30 % jusqu'à ce qu'ils coulent pour éviter la formation de cristaux de glace lors de la congélation. Les solutions de sucrose 20 % et 30 % ont été préparées dans du PBS et ont été filtrées avec un filtre de 0,22  $\mu\text{m}$  (Corning Life Sciences, 431118).

## 2.2 Congélation et coupe des reins

Le fascia de Gerota, la couche de gras et la capsule qui entourent le rein ont été retirés et le rein a été coupé transversalement au niveau de l'hile rénal. Les reins ont été recouverts d'un composé de température de coupe cryo-optique (OCT) (*Tissue-Plus™ O.C.T. Compound*, Sakura Finetek, 4583) dans des moules en plastique (*Tissue-Tek® Cryomold® Molds*, Sakura Finetek, 4557). Les tissus ont ensuite été congelés en déposant le moule dans du 2-méthylbutane (Fischer Scientific, AC126470010) refroidi au préalable avec de la glace sèche. Les tissus congelés ont été conservés à -80 °C, puis coupés avec une épaisseur de 6  $\mu\text{m}$  à -25 °C au cryostat (Leica Biosystems, CM3050 S). Les lames ont été conservées à -20 °C.

## 2.3 Décomptes des plaquettes et des neutrophiles aux reins

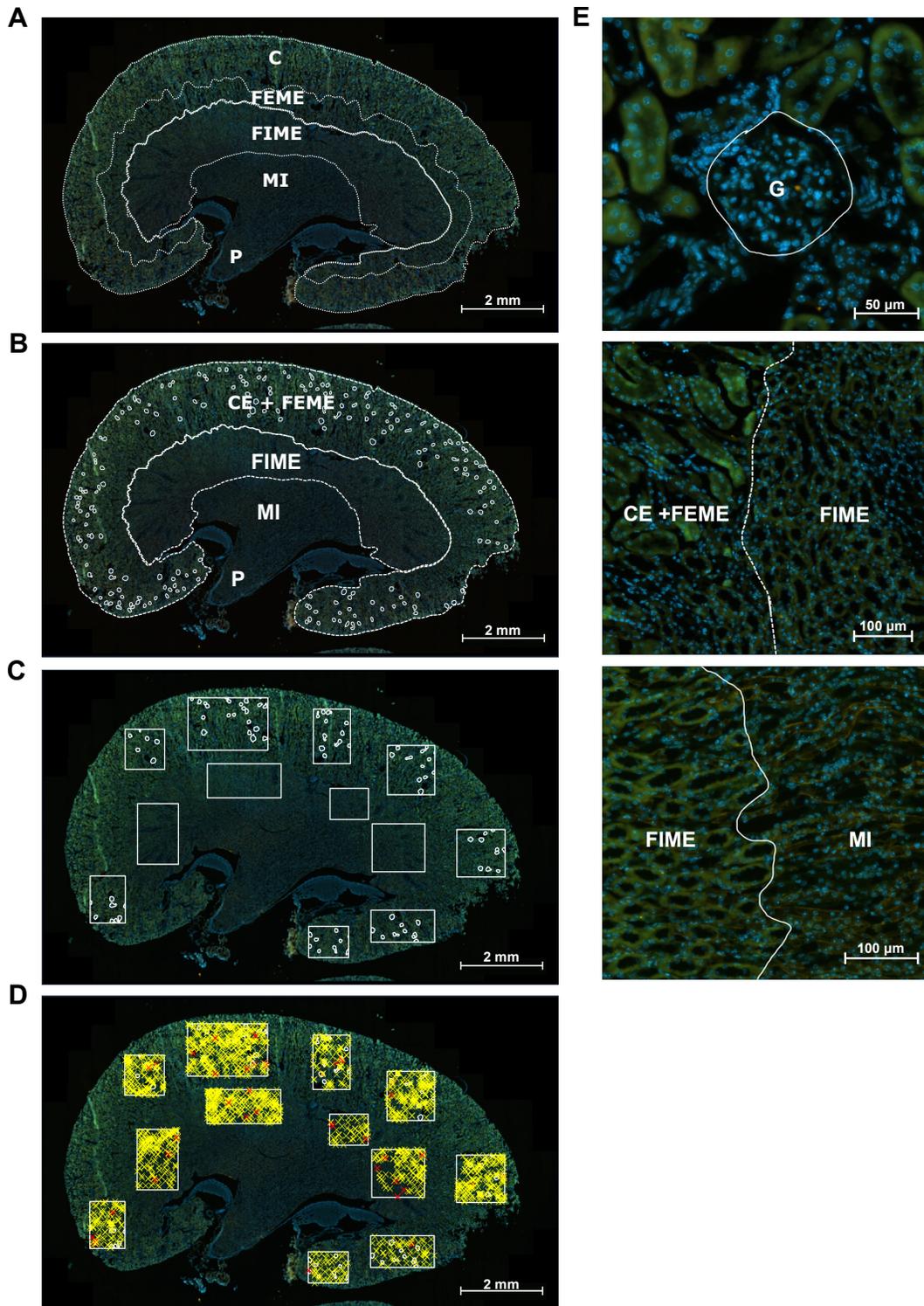
### 2.3.1 Marquage CD41, Ly6G et Fc $\gamma$ RIIA

Les lames ont été décongelées 30 minutes à 4°C, puis 30 minutes à température pièce. Elles ont été lavées trois fois avec une solution de PBS et incubées deux heures avec une solution de blocage (Saponine 0,1 %, sérum normalisé d'âne (NDS) 10 % (*Normal Donkey Serum*, Jackson ImmunoResearch Laboratories, 017-000-121)). Les lames ont ensuite été incubées 15 minutes avec de l'avidine 0,005 % (*Avidin from egg white*, Sigma-Aldrich, A9275), puis de la biotine 0,005 % (Sigma-Aldrich, B4501) et lavées deux fois entre les deux incubations. Les lames ont été lavées trois fois et incubées avec une solution d'anticorps primaire (Saponine 0,1 %, NDS 5 %, anti-souris *lymphocyte antigen 6 complex, locus G* (Ly6G) à 5  $\mu\text{g/ml}$  (*Alexa Fluor® 488 anti-mouse Ly-6G Antibody*, clone 1A8, rat, BioLegend, 127626 ; contrôle isotypique : *Alexa Fluor® 488 Rat IgG2a,  $\kappa$  Isotype Ctrl Antibody*, clone RTK275, rat, BioLegend, 400525), anti-souris glycoprotéine IIb (CD41) couplé à la biotine à 5  $\mu\text{g/ml}$  (*CD41a Monoclonal Antibody (MWRReg30) Biotin*, clone eBioMWRReg30, rat, eBioscience, 13-0411-85 ; contrôle isotypique : *Rat IgG1 kappa Isotype Control (eBRG1) Biotin*, clone eBRG1, eBioscience, 13-4301-82) et anti-humain Fc $\gamma$ RIIA à 0,25  $\mu\text{g/ml}$  (*Anti-FCGR2A Antibody*, lapin, Atlas Antibodies, HPA010718) une nuit à 4°C. Les lames ont été lavées trois fois et incubées deux heures avec une solution d'anticorps secondaires (Saponine 0,1 %, NDS 5 %, Cyanine-3 conjuguée à la streptavidine à 1  $\mu\text{g/ml}$  (*Cy™3 Streptavidin*, Jackson ImmunoResearch Laboratories, 016-160-084) et anti-lapin IgG à 1,9  $\mu\text{g/ml}$

(Alexa Fluor® 647 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), âne, Jackson ImmunoResearch Laboratories, 711-600-152)). Les lames ont été lavées deux fois et l'acide désoxyribonucléique (ADN) a été marqué en incubant les lames pendant cinq minutes avec une solution de 2'-[4-éthoxyphényl]-5-[4-méthyl-1-piperaziny]-2,5'-bi-1H-benzimidazole trihydrochloride trihydrate à 10 µg/ml (Hoechst 33342, Trihydrochloride, Trihydrate, Invitrogen, H3570). Les lames ont été lavées une fois, trempées dans de l'eau distillée pour éliminer les sels et montées avec un milieu de montage (*Fluorescent Mounting Medium*, Argilent Technologies Canada, S3023). Elles ont été séchées à température pièce pendant une heure et conservées à 4°C. Les coupes de reins ont été numérisées en entier avec le numériseur de lames (Axio Scan.Z1, ZEISS) de la plateforme d'analyse d'images à haut débit du Centre de recherche du CHU de Québec - Université Laval. Trois plans ont été imagés sur 4 µm d'épaisseur avec un objectif 20 x (Plan-Apochromat 20x/0.8 M27, ZEISS).

### **2.3.2 Décomptes des plaquettes et des neutrophiles aux reins**

La délimitation des différentes zones anatomiques rénales a été effectuée à l'aide du logiciel d'analyse d'image Zen 3.3 (*Blue edition*) (Figure 2.2). Le rein se compose du cortex, de la médulla externe, incluant le feuillet externe (FEME) et le feuillet interne (FIME), la médulla interne et la papille rénale (Figure 2.2A). Afin d'être consistante dans la délimitation des zones d'un rein à l'autre, le cortex et le FEME ont été regroupés sous une même zone pour les décomptes des plaquettes et des neutrophiles, soit la zone corticale extraglomérulaire + FEME (Figure 2.2B). Trois zones d'intérêt ont été sélectionnées pour les décomptes cellulaires : les glomérules, la zone corticale extraglomérulaire + FEME, ainsi que le FIME. L'aire totale de la zone corticale extra-glomérulaire + FEME et du FIME dans les reins d'une souris NZB/WF1.FcγRIIA<sup>TGN</sup> malade a été déterminée. Pour des questions de faisabilité, les plaquettes et les neutrophiles ont été dénombrés pour chaque souris dans 30 % de l'aire totale de ces zones chez une souris malade, soit 9,1 mm<sup>2</sup> pour la zone corticale extra-glomérulaire + FEME et 4,8 mm<sup>2</sup> pour le FIME (Figure 2.1C). Les zones totalisant 30 % de l'aire totale d'une souris malade ont été délimitées aléatoirement sur le canal du marquage des noyaux avec Hoechst. Les glomérules incluent dans la zone corticale extraglomérulaire + FEME constituent la zone glomérulaire. Les plaquettes et les neutrophiles ont été dénombrés manuellement avec Zen pour chaque zone sur les trois plans de tissus imagés totalisant 4 µm d'épaisseur (Figure 2.1D). Les glomérules rénaux ont été délimités au niveau des cellules épithéliales pariétales de la capsule de Bowman (Figure 2.2E). La zone corticale extraglomérulaire + FEME a été délimitée au niveau du changement dans la composition tubulaire entre le FEME et le FIME, ce qui correspond également à un changement dans la fluorescence intrinsèque du rein. La zone FIME a été délimité au niveau du changement dans la composition tubulaire et dans la fluorescence intrinsèque du tissu entre le FIME et la MI. Les décomptes ont été rapportés en nombre d'évènements par mm<sup>3</sup>. Les graphiques, les figures et les analyses statistiques ont été effectués avec GraphPad Prism 9 (version 9.2.0).



**Figure 2.2 Délimitation des zones anatomiques rénales pour le décompte des plaquettes et des neutrophiles.** Le rein comprend le cortex, la ME qui se compose du FEME et du FIME, la MI et la papille rénale (A). Pour le décompte des plaquettes et des neutrophiles, le cortex et le FEME ont été regroupés pour former la zone corticale extraglomérulaire + FEME (B). Des zones totalisant 30 % de l'aire totale d'un rein d'une souris malade ont été sélectionnées aléatoirement pour chaque zone (C). Les plaquettes (croix jaunes) et les neutrophiles (croix rouges) ont été dénombrés respectivement dans les trois zones d'intérêt (D). Endroit où la délimitation a été effectuée pour chaque zone (E). C, cortex ; FEME, feuillet externe de la médulla externe ; FIME, feuillet interne de la médulla externe ; MI, médulla interne ; P, papille rénale ; CE + FEME, zone corticale extraglomérulaire + FEME ; G, glomérules.

## 2.4 Marquage des capillaires et des plaquettes aux reins

### 2.4.1 Marquage de l'endomucine et de CD42b

Les lames ont été décongelées 30 minutes à 4°C, puis 30 minutes à température pièce. Elles ont été lavées trois fois avec du PBS et incubées dix minutes avec une solution de dodécylsulfate de sodium (SDS) 1 %. Les lames ont été lavées trois fois et incubées deux heures avec la solution de blocage (Saponine 0,1 %, NDS 10 %). Les lames ont été incubées pendant deux heures avec la solution d'anticorps primaires (Saponine 0,1 %, NDS 5 %, anti-souris endomucine à 0,4 µg/ml (Clone V.7C7, rat, Santa Cruz Biotechnology, sc-65495), anti-souris glycoprotéine Ib $\alpha$  (CD42b) à 1,9 µg/ml (Clone SP219, lapin, Abcam, ab183345). Les lames ont été lavées trois fois et incubées avec la solution d'anticorps secondaires (Saponine 0,1 %, NDS 5 %, anti-rat IgG à 2 µg/ml (Goat anti-Rat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568, chèvre, Invitrogen, A-11077), anti-lapin IgG à 1,5 µg/ml (Alexa Fluor® 647 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), âne, Jackson ImmunoResearch Laboratories, 711-600-152)) à 4°C pendant la nuit. Les lames ont été lavées trois fois et l'ADN a été marqué en incubant les lames dix minutes avec une solution à 1 µM du colorant d'acides nucléiques SYTOX (SYTOX Green Nucleic Acid Stain, Invitrogen, S7020). Les lames ont été lavées une fois, trempées dans de l'eau distillée pour éliminer les sels et montées avec un milieu de montage (Fluorescent Mounting Medium, Argilent Technologies Canada, S3023). Elles ont été séchées une heure à température pièce et conservées à 4°C. Ce marquage a été imagé à 40x avec un microscope confocal muni d'un détecteur de haute résolution Airyscan (ZEISS, LSM800).

## 2.5 Caractérisation des cellules exprimant Fc $\gamma$ RIIA aux reins

### 2.5.1 Marquage Fc $\gamma$ RIIA, AIF-1 et F4/80

Les lames ont été décongelées 30 minutes à 4°C, puis 30 minutes à température pièce. Elles ont été lavées trois fois avec du PBS et incubées dix minutes avec du SDS 1 %. Elles ont été lavées trois fois et incubées deux heures avec une solution de blocage (Saponine 0,1 %, NDS 10 %). Les lames ont été lavées trois fois et incubées avec une solution d'anticorps primaire (Saponine 0,1 %, NDS 5 %, anti-souris facteur inflammatoire d'allogreffe 1 (AIF-1) à 1 µg/ml (*AIF-1/Iba1 Antibody*, chèvre, Novus Biologicals, NB100-1028), anti-humain Fc $\gamma$ RIIA à 0,5 µg/ml (*Anti-FCGR2A Antibody*, lapin, Atlas Antibodies, HPA010718) et anti-souris F4/80 à 5 µg/ml (*Alexa Fluor® 647 anti-mouse F4/80 Antibody*, clone BM8, rat, BioLegend, 123122) une nuit à 4°C. Les lames ont été lavées trois fois et incubées deux heures avec une solution d'anticorps secondaires (Saponine 0,1 %, NDS 5 %, anti-lapin IgG à 0,5 µg/ml (*Alexa Fluor® 488 AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)*, âne, Jackson ImmunoResearch Laboratories, 711-600-152), anti-chèvre IgG à 2 µg/ml (*Donkey anti-Goat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568*, âne, Invitrogen, A-11057). Les lames ont été lavées trois fois et l'ADN a été marqué en incubant les lames pendant cinq minutes

avec une solution de 2'-[4-ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperaziny]-2,5'-bi-1H-benzimidazole trihydrochloride trihydrate à 10 µg/ml (*Hoechst 33342, Trihydrochloride, Trihydrate*, Invitrogen, H3570). Les lames ont été lavées une fois, trempées dans l'eau distillée pour éliminer les sels et montées avec un milieu de montage (Fluorescent Mounting Medium, Argilent Technologies Canada, S3023). Elles ont été séchées une heure à température pièce et conservées à 4°C. Le cortex et le FIME ont été imagés à l'aide du microscope Quorum Spinning disk (Wave Fx) de la plateforme de Bio-imagerie du Centre de recherche du CHU de Québec - Université Laval. Les objectifs 20 x (HC PLAN APO 20X/0,70 PH2 ∞/0,17/C, Leica) et 63 x à immersion (HCX PL APO 63X/1,3 Glyc, Leica) ont été utilisés. Les images ont été analysées à l'aide du logiciel d'analyse d'images *Volocity* et ont subi une déconvolution avec une limite d'itération fixée à 30 itérations et 99 % de confiance en utilisant la fonction *Iterative Restoration* de *Volocity*.

### **3 Dosage immuno-enzymatique des Ig**

#### **3.1 Perfusion transcardiaque**

Les souris ont reçu par voie intra-péritonéale 0,1 ml par 30 g de poids corporel d'une solution de kétamine (90 mg/ml) et de xylazine (10 mg/ml). Sous anesthésie, une aiguille de calibre 20 liée à la pompe à perfusion a été insérée dans la lumière du ventricule gauche des souris via l'apex du cœur. L'oreillette droite a immédiatement été sectionnée pour permettre l'écoulement du sang. Les souris ont été perfusées avec 50 ml d'une solution froide de NaCl 0,9 % afin de retirer le contenu de la circulation sanguine. Les reins ont ensuite été prélevés, pesés et gardés sur glace préalablement à la lyse tissulaire.

#### **3.2 Préparation de lysat cellulaire rénal**

Une solution tampon (NaCl 1,5 M, tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris) 0,5 M pH 7,5, Triton 100-X 0,5 %, désoxycolate de sodium 5 %) a été préparée avec de l'eau ultra pure Milli-Q (Millipore Sigma). Un comprimé de cocktail d'inhibiteur de protéase (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Millipore Sigma, 04693159001) a été ajouté pour chaque 10 ml de solution tampon. Les reins ont été homogénéisés sur glace dans 1 ml de solution tampon par 200 mg de tissu. Les membranes cellulaires ont ensuite été lysées sur glace par sonication (Sonic Dismembrator model 500, Fischer Scientific) en insérant la sonde pendant 20 secondes à 30 % de l'amplitude maximale à deux reprises. Les lysats de reins ont ensuite été centrifugés à 12 000 g pendant 20 minutes à 4 °C. Les surnageants contenant les protéines ont été récoltés et conservés à -80°C.

#### **3.3 Dosage des protéines**

La concentration totale en protéines dans les lysats de reins a été déterminée par dosage colorimétrique à l'aide de l'acide bicinchoninique (BCA) en suivant le protocole sur la fiche d'information du fabricant (*Pierce*

*BCA Protein Assay Kit*, Thermo Fisher Scientific, 23225). Le dosage a été fait dans des plaques 96 puits (Greiner Bio-One, 675001). Les standards d'albumine de sérum bovin (BSA) utilisés pour la courbe standard ont été dilués dans la solution tampon utilisée pour la lyse des tissus. Les lysats de reins ont été dilués 1 : 32 et 1 : 64 pour être dans la plage de concentration de la courbe standard. Un coefficient de variation inférieur à 20 % pour les valeurs de densités optiques a été accepté entre les duplicatas. Une régression non linéaire à quatre paramètres a été utilisée pour la courbe standard et la densité optique du blanc a été soustraite à chaque puit. La concentration totale en protéines pour chaque échantillon a été déterminée en calculant la concentration moyenne des duplicatas, puis la concentration moyenne des deux facteurs de dilution pour chaque échantillon.

### **3.4 Dosage des principales classes d'Ig dans les lysats de reins**

Les concentrations d'IgA, d'IgM et d'IgG dans les reins ont été déterminées en utilisant des ensembles commerciaux de dosages immuno-enzymatiques (*ELISA des Ig* (*ELISA IgA Mouse Uncoated Kit* ; *ELISA IgM Mouse Uncoated kit* ; *IgG (Total) Mouse Uncoated ELISA Kit*, Invitrogen, 88-50400 ; 88-50470 ; 88-50450). Les protocoles sur les fiches d'information du fabricant ont été suivis. Des plaques 96 puits (Greiner Bio-one, 675001) ont été utilisés. Pour le dosage des IgA, des facteurs de dilution de 20 et de 100 ont été utilisés pour les lysats de reins des souris de 9 semaines et des souris sauvages de 28 semaines et des facteurs de dilution de 200 et de 1000 ont été utilisés pour les échantillons de reins de souris atteints de néphrite lupique sévère. Pour le dosage des IgM, des facteurs de dilution de 100 et de 500 ont été utilisés pour les lysats de reins des souris de 9 semaines, de 300 et 1200 pour les souris sauvages de 28 semaines et de 1000 et 5000 pour les souris malades. Pour le dosage des IgG, des facteurs de dilution de 40 et de 120 ont été utilisés pour les échantillons de reins de souris de 9 semaines, de 400 et 1200 pour les souris sauvages de 28 semaines et de 1000 et 4000 pour les souris malades. Un coefficient de variation inférieur à 20 % pour les valeurs de densités optiques a été accepté entre les duplicatas. La densité optique du blanc a été soustraite à chaque puit, puis les valeurs d'absorbance à 570 nm ont été soustraites de celles à 450 nm. Des régressions non linéaires à quatre paramètres ont été utilisées pour les courbes standards. La concentration en Ig de chaque échantillon a été déterminée en faisant la moyenne des duplicatas pour chaque facteur de dilution, puis la moyenne entre les deux facteurs de dilution. Les résultats ont été normalisés en exprimant les concentrations d'Ig pour chaque échantillon en nanogramme par milligramme de protéines totales. Les graphiques, les figures et les analyses statistiques pour le dosage des Ig ont été fait à l'aide de GraphPad Prism 9 (version 9.2.0).

## Chapitre 2 : Résultats

### 1 Le recrutement des plaquettes aux reins dans la néphrite lupique

Afin d'étudier leur recrutement aux reins dans la néphrite lupique, les plaquettes ont été marquées en immunofluorescence via l'intégrine de surface CD41 et ont été dénombrées dans les reins de souris NZB/WF1 sauvages et  $Fc\gamma RIIA^{TGN}$  (Figure 3.1). La spécificité du marquage pour CD41 a été vérifiée à l'aide d'un contrôle isotypique et un contrôle d'anticorps secondaire (Figure 3.1 A).

#### 1.1 Les plaquettes sont présentes aux reins en conditions normales et sont majoritairement localisées aux glomérules

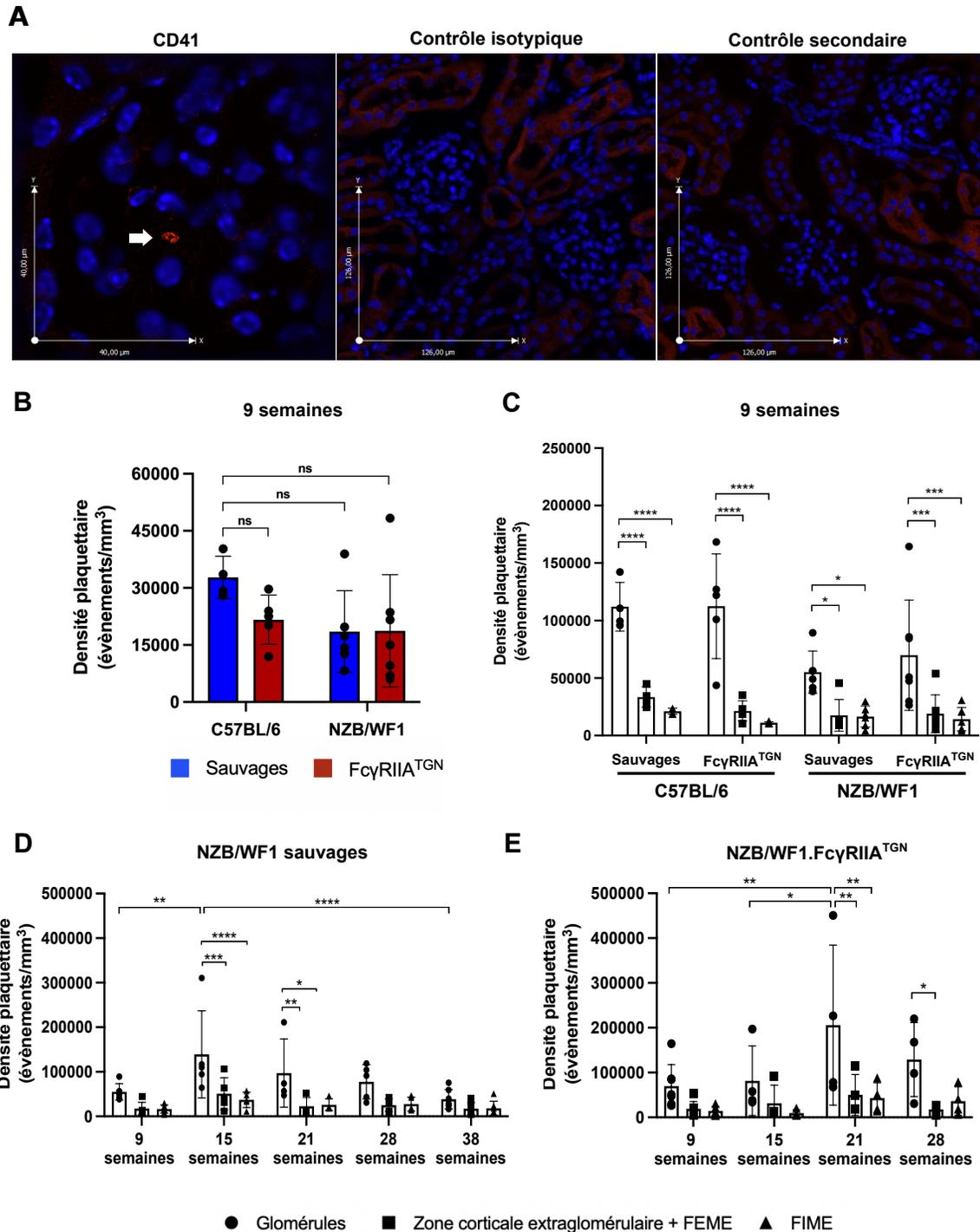
Pour vérifier leur présence aux reins en conditions normales, les plaquettes ont été dénombrées dans les reins de souris NZB/WF1 sauvages et  $Fc\gamma RIIA^{TGN}$  et de souris C57BL/6 de lignée génétique non-inflammatoire pour les deux génotypes à 9 semaines (Figure 3.1B-C). Il n'y a pas de différence significative dans la densité plaquettaire entre les deux lignées de souris et entre les deux génotypes (Figure 3.1B). En comparaison avec les zones corticales extraglomérulaires et médullaires, les plaquettes sont majoritairement localisées dans les glomérules à 9 semaines indépendamment de la lignée et du génotype des souris (Figure 3.1C).

#### 1.2 Les plaquettes sont recrutées aux glomérules pendant le développement de la néphrite lupique

Pendant le développement de la néphrite lupique dans le modèle NZB/WF1, il y a une hausse dans le recrutement des plaquettes aux glomérules entre 9 et 15 semaines chez les souris sauvages (Figure 3.1D). Puis, la densité plaquettaire diminue significativement aux glomérules lorsque les souris développent une néphrite lupique sévère à 38 semaines. Chez les souris exprimant  $Fc\gamma RIIA$ , il y a une augmentation du nombre de plaquettes aux glomérules entre 15 et 21 semaines et cette hausse est maintenue avec le développement de la néphrite lupique sévère à 28 semaines (Figure 3.1E).

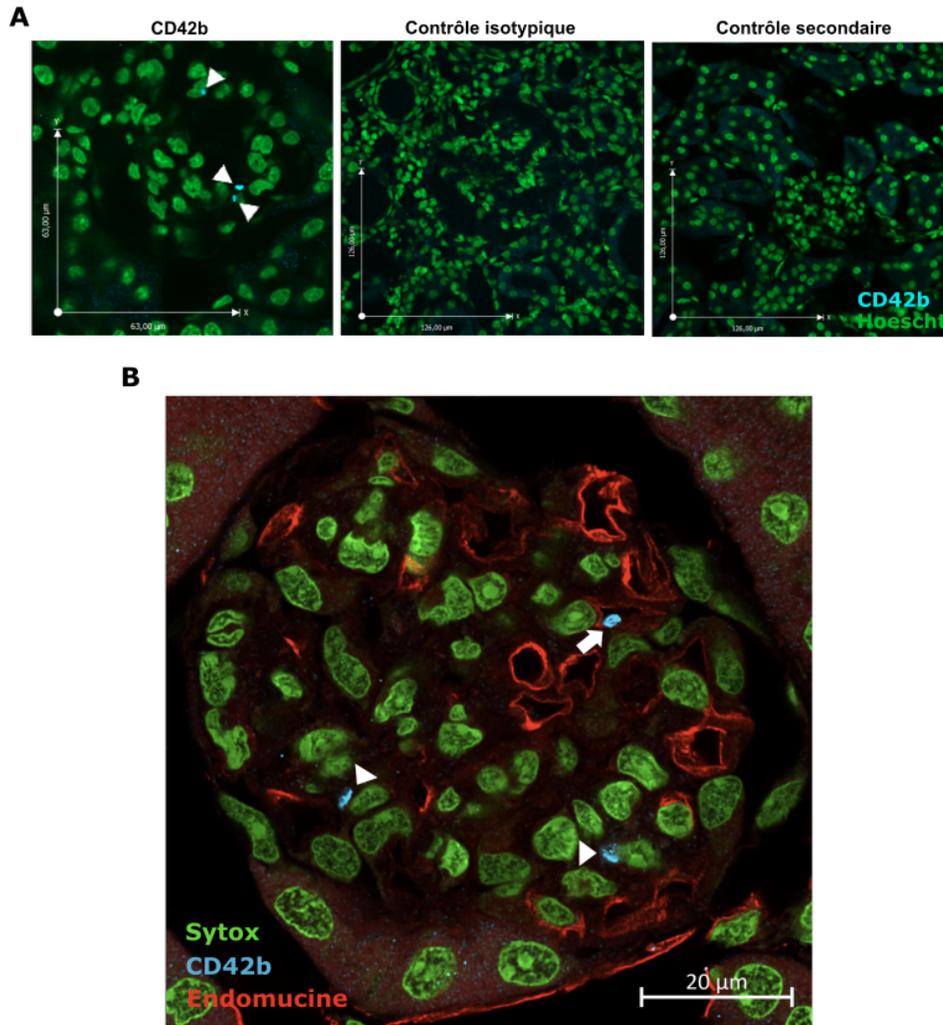
#### 1.3 Les plaquettes sont présentes dans les compartiments vasculaire et extravasculaire dans les glomérules

Préalablement au prélèvement des reins, les souris ont été perfusées avec une solution physiologique pour retirer le contenu des vaisseaux sanguins, puis une solution de PFA afin de fixer les tissus en utilisant l'appareil vasculaire. Puisque les glomérules sont composés essentiellement d'un amas de capillaires glomérulaires, il n'est pas exclu que les plaquettes activées aient pu adhérer aux parois endothéliales. Afin de vérifier si les plaquettes dénombrées sont localisées dans le compartiment vasculaire ou extravasculaire, les capillaires glomérulaires et les plaquettes ont été marquées en immunofluorescence avec des anticorps contre



**Figure 3.1 Les plaquettes sont présentes aux reins en conditions normales et sont recrutées aux glomérules pendant le développement de la néphrite lupique.** Contrôles isotypique et secondaire pour le marquage de CD41 (une plaquette est identifiée avec la flèche) (A). Comparaison de la densité plaquettaire dans le rein en entier (B) et pour chacune des zones rénales d'intérêt (C) entre les souris C57BL/6 et NZB/WF1 sauvages et FcγRIIA<sup>TGN</sup> à 9 semaines. Décompte des plaquettes dans les trois zones rénales pour chaque stade de la néphrite lupique dans les reins de souris NZB/WF1 sauvages (D) et FcγRIIA<sup>TGN</sup> (E). Les résultats sont présentés sous forme de la moyenne ± la déviation standard (SD). Analyse statistique : ANOVA à deux facteurs avec un test de correction de Tukey pour comparaisons multiples (B-E). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ; ns, non significatif; FEME, feuillet externe de la médulla externe; FIME, feuillet interne de la médulla externe.

l'endomucine et CD42b respectivement dans les reins de souris atteintes de néphrite lupique (Figure 3.2). La spécificité du marquage pour CD42b a été validée à l'aide d'un contrôle isotypique et d'anticorps secondaire (Figure 3.2A). Des plaquettes ont été observées à la fois dans le compartiment vasculaire et le parenchyme rénal pendant le développement de la néphrite lupique (Figure 3.2B).



**Figure 3.2** Des plaquettes sont présentes dans les compartiments vasculaire et extravasculaire aux glomérules pendant le développement de la néphrite lupique. Contrôles isotypique et secondaire pour le marquage de CD42b (les plaquettes sont identifiées avec les têtes de flèches) (A). Glomérule d'une souris NZB/WF1.Fc $\gamma$ RIIATGN de 21 semaines présentant une plaquette dans un capillaire glomérulaire (flèche) et deux plaquettes ayant migrées dans le parenchyme rénal (têtes de flèche) (B).

## 2 Le recrutement des neutrophiles aux reins dans la néphrite lupique

Les neutrophiles sont le type de leucocyte majoritaire du sang chez l'humain et les premiers à être recrutés au foyer inflammatoire<sup>31,142</sup>. De plus, les neutrophiles sont impliqués dans l'inflammation et les dommages

tissulaires dans la néphrite lupique notamment par l'exposition d'antigènes du soi via la libération de pièges extracellulaires et la production d'IFN de type I<sup>142,143,148,465</sup>. Nous avons donc voulu étudier le recrutement des neutrophiles aux reins pendant le développement de la néphrite lupique dans le modèle NZB/WF1 (Figure 3.3). Les neutrophiles ont été marqués dans les reins avec des anticorps ciblant Ly6G et la spécificité du marquage a été confirmée avec un contrôle isotypique (Figure 3.3A).

## **2.1 Les neutrophiles sont présents en conditions normales aux reins et sont majoritairement localisés aux glomérules**

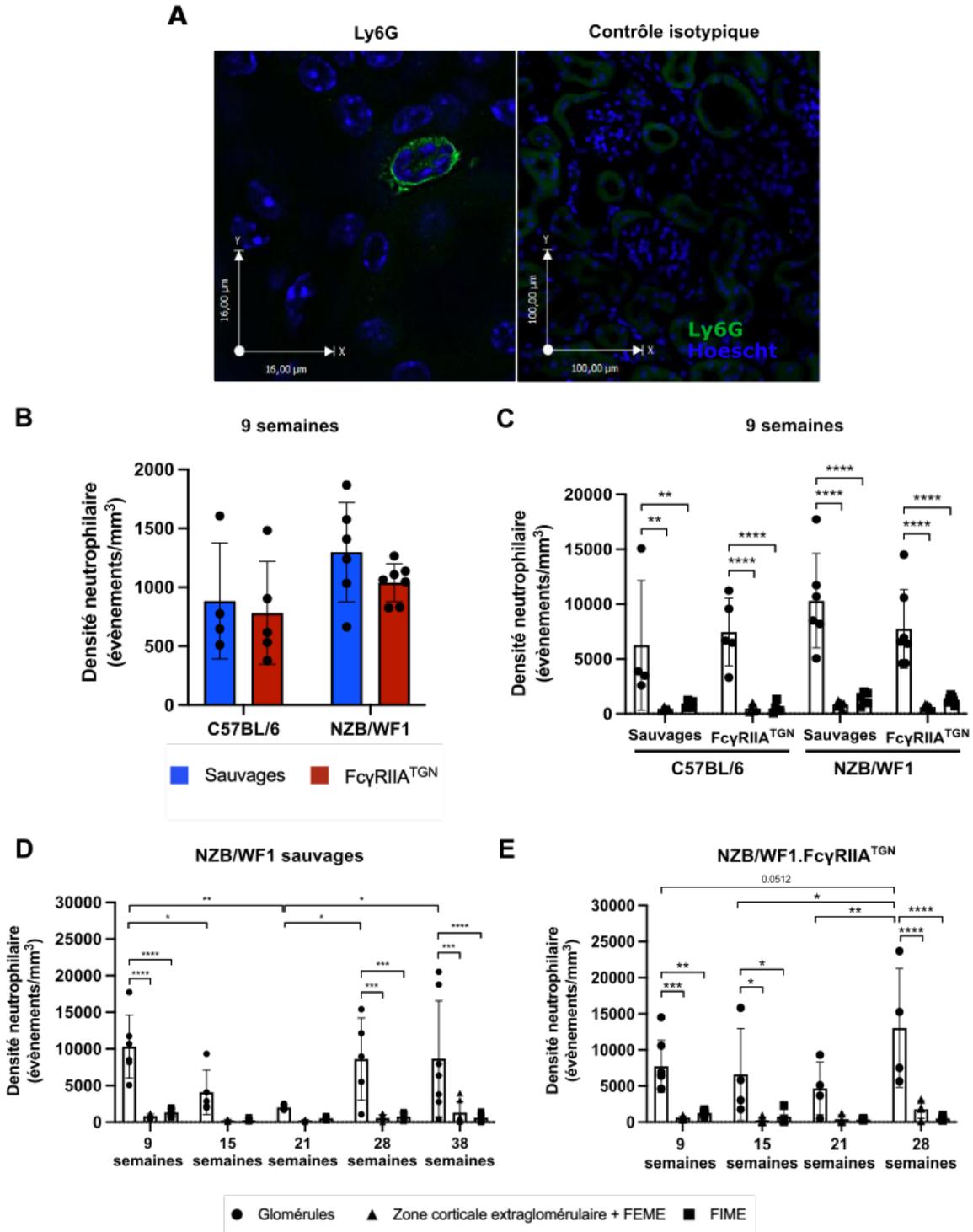
La densité neutrophilaire est semblable aux reins de souris NZB/WF1 et C57BL/6 sauvages et Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> à 9 semaines (Figure 3.3B). Avant le développement de la maladie, les neutrophiles sont majoritairement localisés dans les glomérules aux reins comparativement aux deux autres zones d'intérêt (Figure 3.3C).

## **2.2 La densité neutrophilaire augmente aux glomérules avec le développement de la néphrite lupique sévère**

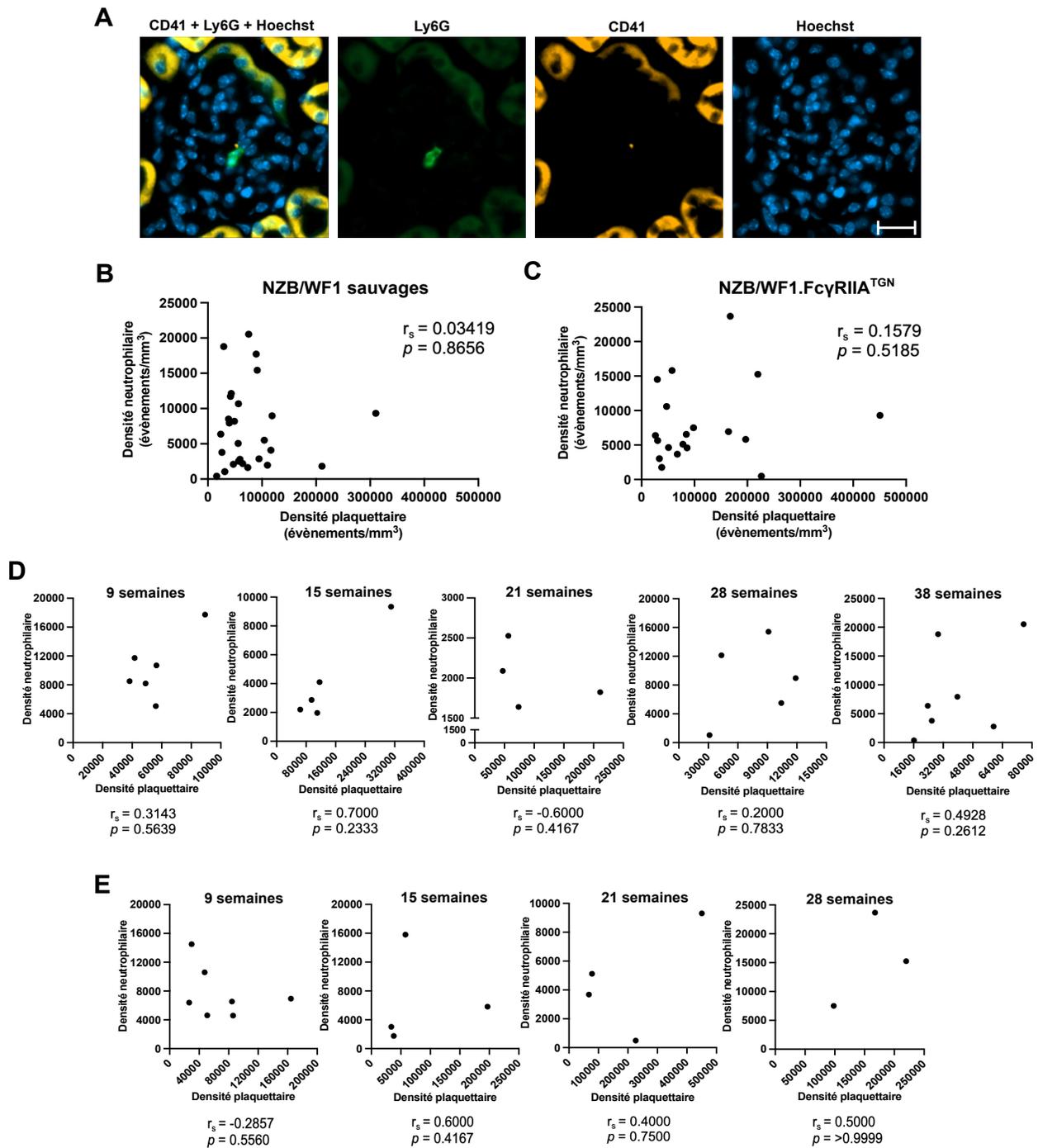
Étonnamment, une baisse significative dans la densité neutrophilaire aux glomérules entre 9 et 15 et entre 9 et 21 semaines a été observée chez les souris sauvages (Figure 3.3D). Puis, le nombre de neutrophiles augmente aux glomérules entre 21 et 28 semaines. Cette hausse des neutrophiles aux glomérules se maintient avec le développement de la néphrite lupique sévère avec une augmentation également entre 21 et 38 semaines. Au contraire, la densité des neutrophiles est maintenue à un niveau basal aux glomérules pendant les stades intermédiaires de néphrite lupique chez les souris Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> (Figure 3.3E). La densité neutrophilaire augmente à 28 semaines aux glomérules, soit au moment où les souris développent une néphrite lupique sévère.

## **3 Corrélation entre le recrutement des plaquettes et des neutrophiles aux reins**

Une interaction efficace plaquette-neutrophile est essentielle en contexte inflammatoire pour permettre l'extravasation de ces derniers<sup>397,421</sup>. Des plaquettes et des neutrophiles ont été identifiés à proximité dans les glomérules rénaux en immunofluorescence, indépendamment du stade de la maladie et du génotype des souris (Figure 3.4A). La corrélation entre le recrutement des plaquettes et des neutrophiles aux glomérules dans la néphrite lupique a été vérifiée à l'aide du test de corrélation de Spearman (Figure 3.4B-E). Il n'y a globalement peu ou pas de relation linéaire entre le recrutement des plaquettes et des neutrophiles aux reins pendant le développement de la néphrite lupique pour les souris sauvages (Figure 3.4B) et Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> (Figure 3.4C). Afin de vérifier si les deux événements pourraient corrélérer à certains stades de la maladie, la corrélation entre le recrutement des plaquettes et des neutrophiles a été étudiée à chacun des moment-clés du développement de la néphrite lupique pour les souris sauvages (Figure 3.4D) et Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> (Figure 3.4E).



**Figure 3.3** La densité neutrophilaire augmente aux glomérules avec le développement de la néphrite lupique sévère. Contrôle isotypique pour le marquage de Ly6G dans le cortex (A). Comparaison de la densité neutrophilaire dans les reins en entier (B) et pour chaque zone rénale (C) entre les souris C57BL/6 et NZB/WF1 sauvages et  $Fc\gamma RIIA^{TGN}$  à 9 semaines. Densité des neutrophiles dans les trois zones rénales d'intérêt aux différents moment-clés du développement de la néphrite lupique pour les souris NZB/WF1 sauvages (D) et  $Fc\gamma RIIA^{TGN}$  (E). Les résultats sont présentés sous forme de la moyenne  $\pm$  SD. Analyse statistique : ANOVA à deux facteurs avec un test de correction de Tukey pour comparaisons multiples (B-E). \*,  $p < 0.05$  ; \*\*,  $p < 0.01$  ; \*\*\*,  $p < 0.001$  ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$  ; FEME, feuillet externe de la médulla externe ; FIME, feuillet interne de la médulla externe.



**Figure 3.4** Corrélation entre le recrutement des plaquettes et des neutrophiles aux glomérules pendant la néphrite lupique. Des neutrophiles (Ly6G) et des plaquettes (CD41) ont été identifiés à proximité dans les glomérules des souris NZB/WF1 (A). Relation entre le recrutement des plaquettes et des neutrophiles aux glomérules des souris sauvages (B) et FcγRIIA<sup>TGN</sup> (C) pendant le développement de la néphrite lupique. Analyse de la corrélation entre les deux évènements pour chaque groupe d'âge pour les souris sauvages (D) et FcγRIIA<sup>TGN</sup> (E). Les densités cellulaires sont exprimées en évènements/mm<sup>3</sup>. Analyse statistique : Test de corrélation de Spearman (B-E).  $r_s$ , coefficient de corrélation de Spearman ;  $p$ , valeur-p. Barre d'erreur = 20 μm.

Pour les deux génotypes, les coefficients de corrélation de Spearman ont une valeur absolue plus élevée

lorsque le recrutement des plaquettes et des neutrophiles est décortiqué pour chaque groupe d'âge. Cela pointe vers une potentielle relation linéaire, positive ou négative, entre la survenue de ces deux événements aux glomérules pendant la néphrite lupique. Toutefois, les valeurs-*p* sont également très élevées et loin de la significativité ne permettant pas de conclure sur la relation entre les deux événements.

## **4 Contribution de Fc $\gamma$ RIIA dans le recrutement des plaquettes et des neutrophiles aux reins dans la néphrite lupique**

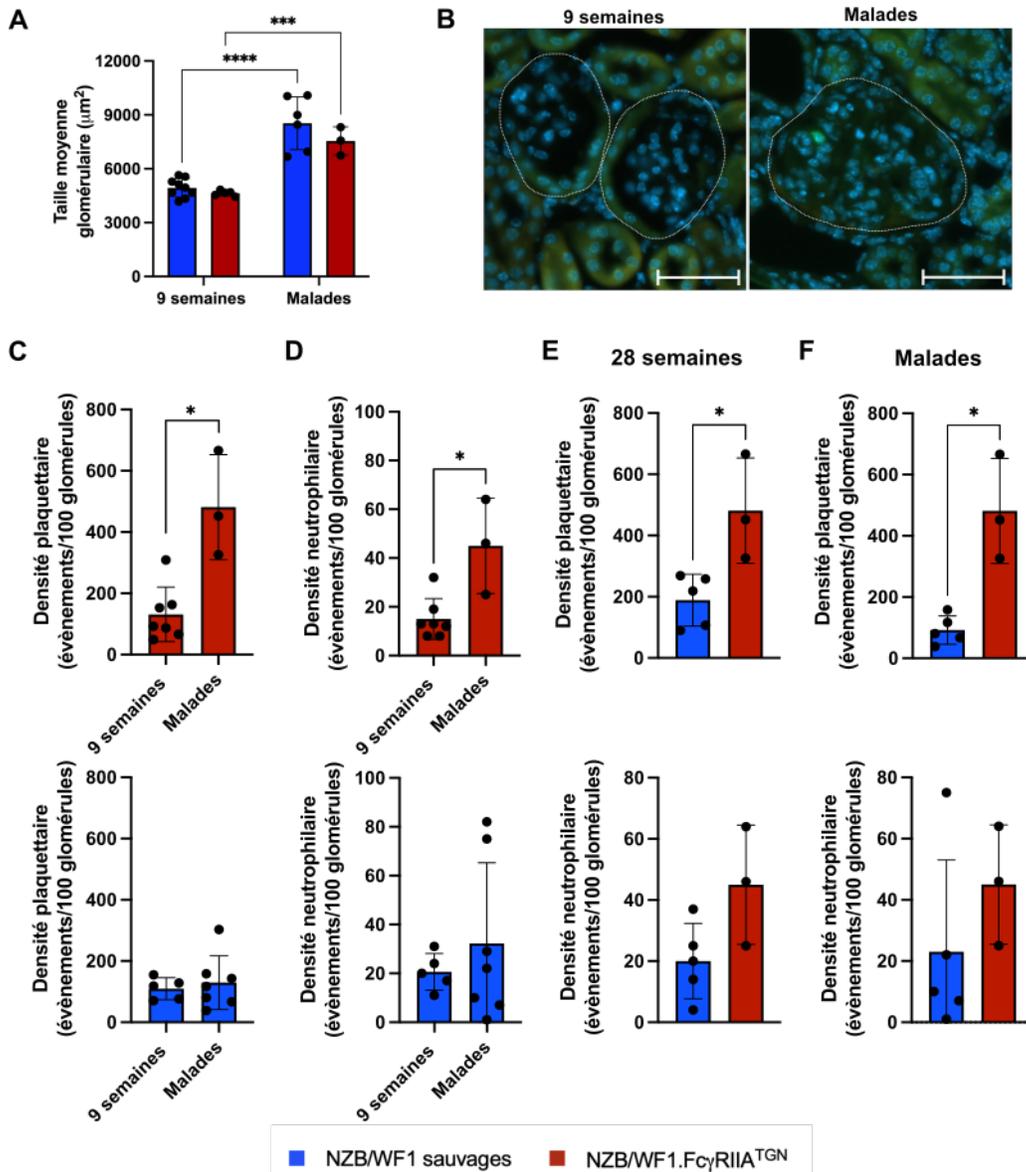
Afin de vérifier la contribution de Fc $\gamma$ RIIA dans le recrutement des plaquettes et des neutrophiles aux reins dans la néphrite lupique, les densités plaquettaires et neutrophilaires ont respectivement été comparées entre les deux génotypes (Figure 3.5). Puisqu'ils sont majoritairement localisés aux glomérules indépendamment du stade de la néphrite lupique, les densités glomérulaires des plaquettes et des neutrophiles ont été spécifiquement étudiées. La taille des glomérules augmente significativement chez les souris malades comparativement aux souris saines âgées de 9 semaines (Figure 3.5A-B). En effet, la taille moyenne des glomérules passe d'environ 4800  $\mu\text{m}^2$  avant la maladie à 8000  $\mu\text{m}^2$  lorsque les souris sont atteintes de néphrite lupique sévère (Figure 3.5A). L'hypertrophie glomérulaire est un phénomène compensatoire qui survient aux reins dans la néphrite lupique et est associée avec le développement de la sclérose glomérulaire<sup>250,466</sup>. Afin d'éliminer le biais de la variation dans la taille des glomérules avec la maladie, les densités cellulaires glomérulaires ont été exprimées en nombre d'évènements par 100 glomérules.

### **4.1 Les plaquettes et les neutrophiles s'accumulent aux reins dans la néphrite lupique seulement lorsque Fc $\gamma$ RIIA est exprimé**

Le nombre de plaquettes aux glomérules est augmenté d'environ 3,5 fois avec le développement de la néphrite lupique sévère chez les souris Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> comparativement aux souris saines (Figure 3.5C). De façon similaire, les neutrophiles sont environ trois fois plus nombreux aux glomérules de souris malades exprimant le transgène comparativement au niveau basal (Figure 3.5D). Il n'y a pas de différence significative dans les densités cellulaires entre les souris sauvages saines et malades (Figure 3.5C-D).

### **4.2 Les plaquettes sont davantage recrutées aux reins lors de la néphrite lupique lorsqu'elles expriment Fc $\gamma$ RIIA**

À âge égal, les plaquettes sont deux fois plus nombreuses aux glomérules de souris Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> que sauvages à 28 semaines (Figure 3.5E). À stade égal de la maladie, les souris Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> atteintes de néphrite lupique sévère présentent près de quatre fois plus de plaquettes aux glomérules que les souris sauvages malades



**Figure 3.5 L'expression de FcγRIIA augmente le recrutement des plaquettes aux reins pendant la néphrite lupique.** La taille moyenne des glomérules augmente avec le développement de la maladie (A). Images représentatives de la taille moyenne des glomérules de souris saines à 9 semaines et atteintes de néphrite lupique sévère (B). Comparaison des densités glomérulaires plaquettaires (C) et neutrophilaires (D) avant la maladie à 9 semaines et lorsque les souris ont développé une néphrite lupique sévère. Comparaison des densités cellulaires entre les deux génotypes à 28 semaines (E) et lorsque les souris sont malades (F). Les résultats sont présentés sous forme de la moyenne ± SD. Analyses statistiques : ANOVA à deux facteurs avec un test de correction Šidák pour comparaisons multiples (A) et test de Mann-Whitney (C-F).\*, p < 0.05 ; \*\*\*, p < 0.001 ; \*\*\*\*, p < 0.0001. Barres d'échelle = 50 μm.

(Figure 3.5F). Il n'y a pas de différence significative entre les deux génotypes dans les densités neutrophilaires glomérulaires à 28 semaines (Figure 3.5E) et lorsque les souris sont atteintes de néphrite lupique sévère (Figure 3.5F).

## 5 Dosage des auto-anticorps aux reins

Les plaquettes sont davantage recrutées aux glomérules de souris  $Fc\gamma RIIA^{TGN}$  que sauvages dans la néphrite lupique. Afin de vérifier si cette différence entre les génotypes pourrait être expliquée par un dépôt différentiel d'auto-anticorps aux reins de souris NZB/WF1 sauvages et  $Fc\gamma RIIA^{TGN}$ , les principales classes d'Ig ont été dosées par ELISA dans des lysats de reins de souris NZB/WF1 (Figure 3.6). Les résultats ont été normalisés en exprimant les concentrations en nanogramme d'Ig par milligramme de protéines totales dosées préalablement avec la méthode BCA.

### 5.1 Les IgM, IgA et IgG s'accumulent aux reins pendant la néphrite lupique

Il y a significativement plus d'IgM, d'IgA et d'IgG dans les reins de souris malades que saines, soulignant une accumulation de ces trois classes d'Ig aux reins de souris NZB/WF1 pendant le développement de la néphrite lupique (Figure 3.6A).

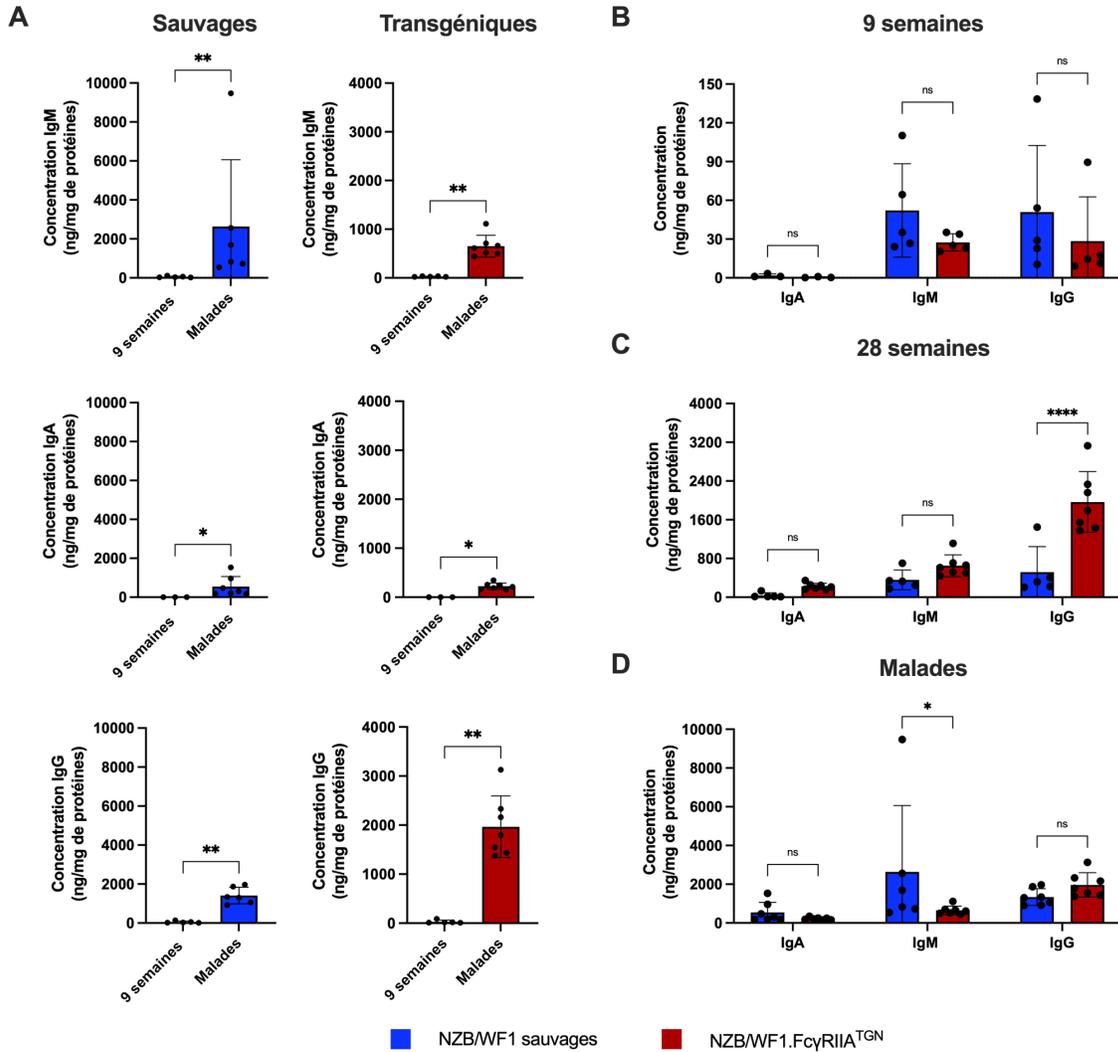
### 5.2 Les IgG se déposent plus hâtivement et les IgM en moins grand nombre aux reins des souris $Fc\gamma RIIA^{TGN}$ que sauvages

Avant la maladie, les concentrations des Ig aux reins sont semblables entre les deux génotypes (Figure 3.6B). À 28 semaines, les souris exprimant le transgène présentent près de quatre fois plus d'IgG aux reins que les souris sauvages, alors que les niveaux d'IgA et d'IgM sont semblables entre les deux génotypes (Figure 3.6C). Toutefois, lorsqu'elles développent une néphrite lupique sévère, les souris sauvages et  $Fc\gamma RIIA^{TGN}$  présentent des niveaux similaires d'IgG aux reins (Figure 3.6D). D'autre part, à stade égal de la maladie, il y a environ 2,5 fois moins d'IgM aux reins de souris malades transgéniques que sauvages. Il n'y a pas de différence significative dans la concentration des IgA aux reins entre les deux génotypes lorsque les souris sont malades.

## 6 Caractérisation de l'expression de $Fc\gamma RIIA$ aux reins pendant la néphrite lupique

### 6.1 Les plaquettes et les neutrophiles ne sont pas responsables de l'expression majoritaire de $Fc\gamma RIIA$ aux reins

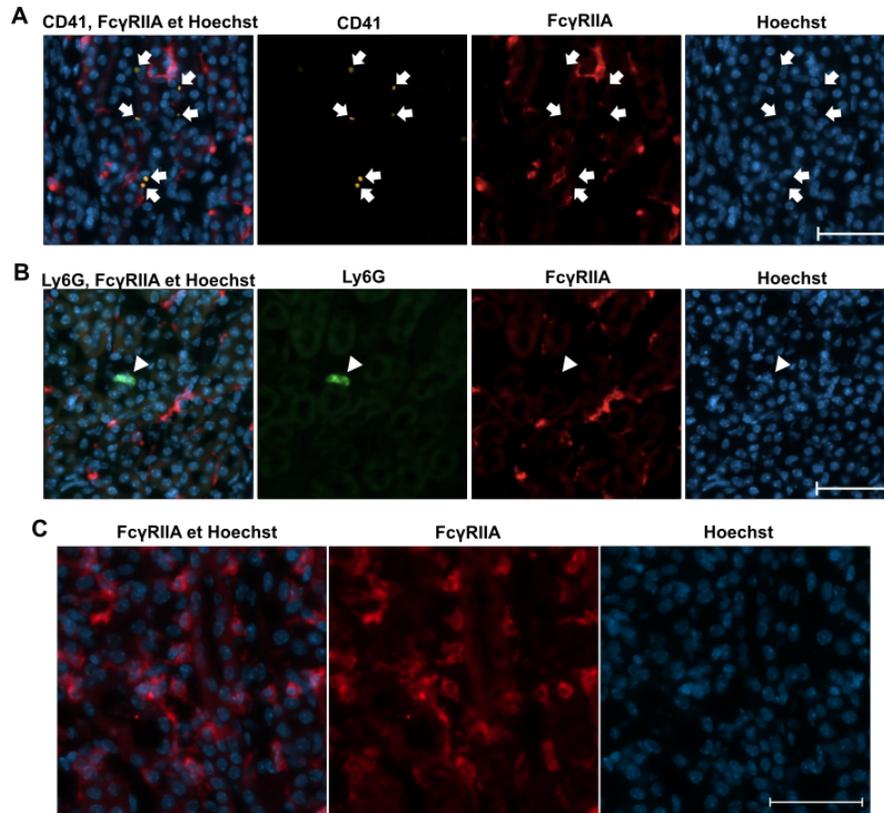
Les plaquettes et les neutrophiles sont responsables d'une grande partie de l'expression de  $Fc\gamma RIIA$  dans le sang des souris NZB/WF1. $Fc\gamma RIIA^{TGN}$  <sup>395</sup>. Nous avons donc voulu vérifier leur expression du récepteur aux reins pendant la néphrite lupique (Figure 3.7). Les plaquettes (Figure 3.7A) et les neutrophiles (Figure 3.7B) expriment peu ou pas  $Fc\gamma RIIA$  aux reins, indépendamment du stade de néphrite lupique et de leur localisation dans le rein.  $Fc\gamma RIIA$  est exprimé par une cellule nucléée aux reins dans la néphrite lupique (Figure 3.7C).



**Figure 3.6 Les IgG se déposent plus hâtivement et les IgM en moins grand nombre aux reins de souris transgéniques que sauvages.** Les IgM, IgA et IgG ont été dosées par ELISA dans les reins de souris NZB/WF1 sauvages et transgéniques saines et malades (A). Comparaison entre les deux génotypes de la concentration des trois classes d'Ig aux reins à 9 semaines (B), 28 semaines (C) et de souris malades (D). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  SD. Analyses statistiques : Tests de Mann-Whitney (A) et ANOVA à deux facteurs avec un test de correction de Šidák pour comparaisons multiples (B-D). \*,  $p < 0.05$  ; \*\*,  $p < 0.01$  ; \*\*\*,  $p < 0.0001$  ; ns, non significatif.

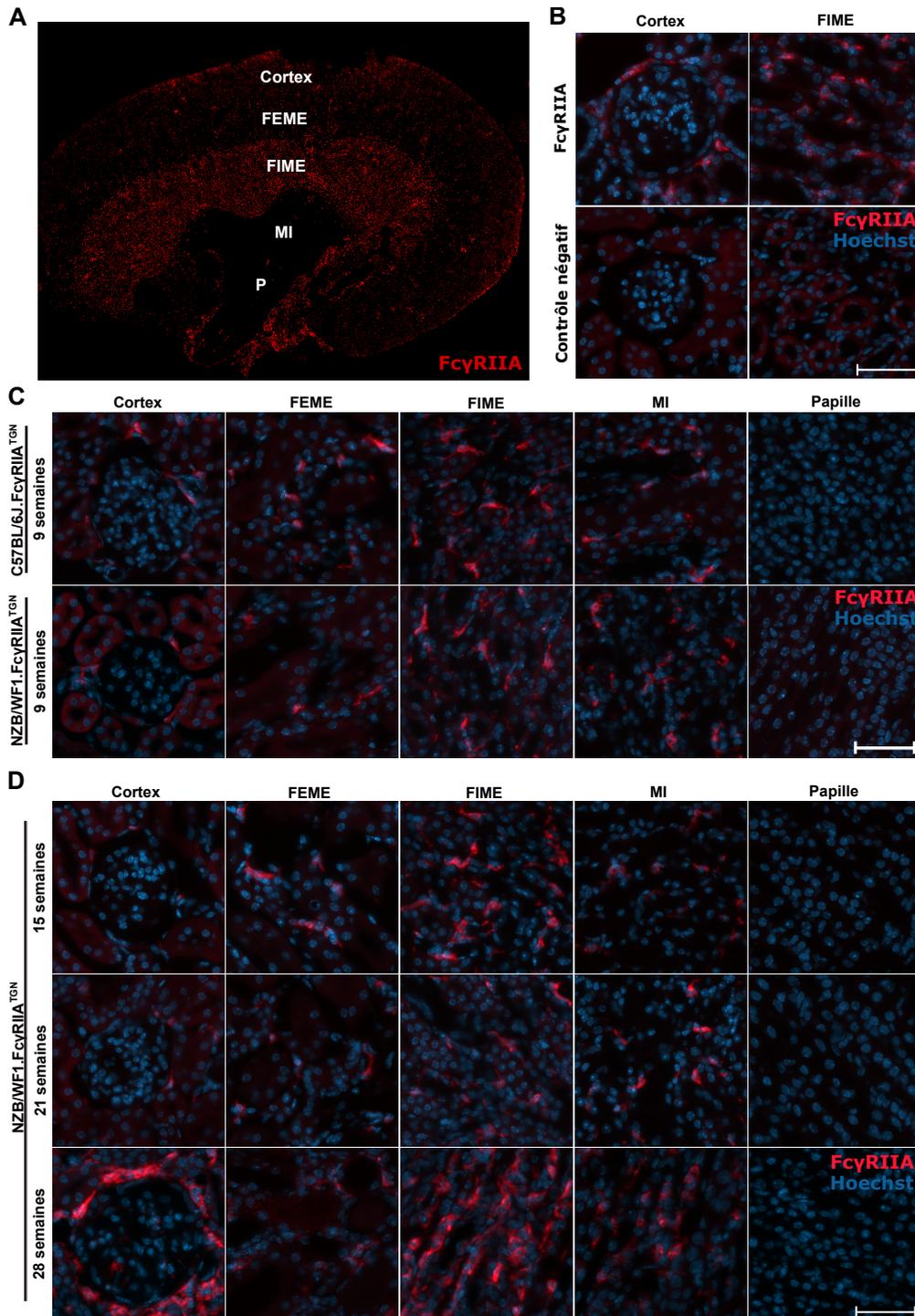
## 6.2 FcγRIIA est majoritairement localisé dans le cortex et le FIME aux reins dans la néphrite lupique

Dans le but de caractériser le modèle murin NZB/WF1.FcγRIIA<sup>TGN</sup> de néphrite lupique, nous avons ensuite voulu étudier en immunofluorescence l'expression de FcγRIIA aux reins pendant le développement de la maladie sur les coupes de reins imagées au numériseur de lames (Figure 3.8A). Afin de vérifier la spécificité du marquage en immunofluorescence de FcγRIIA, les reins des souris NZB/WF1 sauvages ont été utilisés à titre de contrôle négatif (Figure 3.8B). La localisation du récepteur dans les cinq zones histologiques rénales,



**Figure 3.7 Les plaquettes et les neutrophiles ne sont pas responsables de l'expression majoritaire de FcγRIIA aux reins.** Les plaquettes (A) et les neutrophiles (B) expriment peu ou pas FcγRIIA aux reins. FcγRIIA est exprimé par une cellule nucléée (C). Les images sont représentatives des souris NZB/WF1, indépendamment du stade de néphrite lupique (n = 20). Les flèches pointent les plaquettes et la tête de flèche un neutrophile. Barres d'échelle = 50 μm.

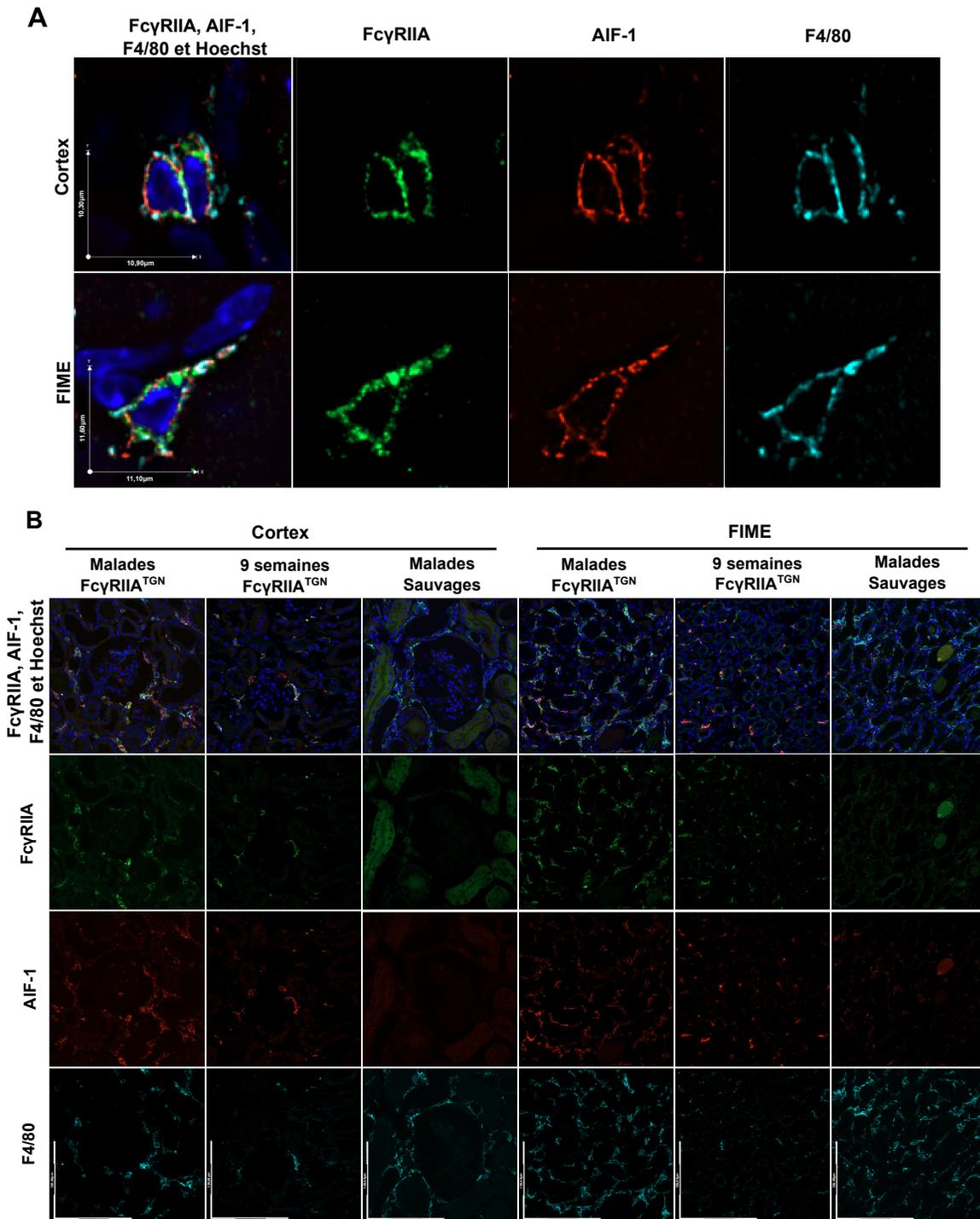
soient le cortex, le FEME, le FIME, la MI et la papille rénale, a été étudiée (Figure 3.8C-D). Puisqu'elles possèdent un fond génétique inflammatoire, l'expression de FcγRIIA dans les reins de souris NZB/WF1.FcγRIIA<sup>TGN</sup> a été comparée avec celle de souris de lignée C57BL/6.FcγRIIA<sup>TGN</sup> possédant un fond génétique non-inflammatoire (Figure 3.8C). Le patron d'expression de FcγRIIA dans les reins de souris FcγRIIA<sup>TGN</sup> âgées de 9 semaines est similaire dans chacune des zones rénales pour les deux génotypes. En conditions normales, FcγRIIA est donc surtout exprimé dans le FIME. Ce patron d'expression est maintenu à 15 et 21 semaines malgré l'évolution de la maladie (Figure 3.8D). Entre 21 et 28 semaines, il y a une hausse de l'expression de FcγRIIA aux reins avec le développement de la néphrite lupique sévère pour toutes les zones rénales à l'exception de la papille rénale. Cette hausse est particulièrement marquée dans le cortex autour de la capsule de Bowman des glomérules et dans le FIME.



**Figure 3.8. Fc $\gamma$ RIIA est essentiellement localisé dans le cortex et le FIME pendant la néphrite lupique.** Expression de Fc $\gamma$ RIIA aux reins d'une souris NZB/WF1 avant le développement de la néphrite lupique (A). Fc $\gamma$ RIIA est absent chez les souris sauvages (contrôle négatif) (B). Des images représentatives de l'expression de Fc $\gamma$ RIIA aux reins de souris saines C57BL/6. Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> et de souris NZB/WF1.Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> aux différents moment-clés du développement de la néphrite lupique sont présentées (C). 9 semaines (C57BL/6), n = 5 ; 9 semaines (NZB/WF1), n = 7 ; 15 semaines, n = 5 ; 21 semaines, n = 5 ; 28 semaines, n = 4. FEME, feuillet externe de la médulla externe ; FIME, feuillet interne de la médulla externe ; MI, médulla interne ; P, papille. Barres d'échelle = 50  $\mu$ m.

### **6.3 Fc $\gamma$ RIIA est majoritairement exprimé aux reins par une cellule AIF-1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>**

Puisque Fc $\gamma$ RIIA est exprimé par des cellules de la lignée myéloïde qui ne sont ni des plaquettes, ni des neutrophiles, nous avons posé l'hypothèse que les macrophages et les DC pourraient être responsables de l'expression de Fc $\gamma$ RIIA aux reins dans la néphrite lupique. L'expression de deux marqueurs conventionnels pour les macrophages, soient AIF-1 et F4/80, par les cellules Fc $\gamma$ RIIA<sup>+</sup> aux reins a été étudiée (Figure 3.9). Puisque Fc $\gamma$ RIIA est essentiellement exprimé dans le cortex et le FIME aux reins de souris NZB/WF1.Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> malades, nous avons décidé d'investiguer la présence de cellules AIF-1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>Fc $\gamma$ RIIA<sup>+</sup> dans ces deux zones rénales. Les cellules Fc $\gamma$ RIIA<sup>+</sup> aux reins de souris transgéniques malades sont positives pour AIF-1 et F4/80 dans le cortex et dans le FIME (Figure 3.9A). Chez les souris Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> à 9 semaines, Fc $\gamma$ RIIA est également exprimé dans le cortex et le FIME par une cellule qui exprime AIF-1 et F4/80 (Figure 3.9B). Afin de vérifier si ce type cellulaire exprimant AIF-1 et F4/80 est également présent en absence de Fc $\gamma$ RIIA, les reins de souris sauvages malades ont été étudiés. Curieusement, bien que F4/80 soit présent, AIF-1 est absent de ces deux zones rénales lorsque Fc $\gamma$ RIIA n'est pas exprimé.



**Figure 3.9 Les cellules exprimant FcγRIIA aux reins sont positives pour AIF-1 et F4/80.** Images représentatives de l'expression de FcγRIIA, AIF-1 et F4/80 aux reins de souris NZB/WF1.FcγRIIA<sup>TGN</sup> (n = 3) dans le cortex et dans le FIME (A). Images représentatives de l'expression de FcγRIIA, AIF-1 et F4/80 dans les reins de souris transgéniques saines à 9 semaines (n = 5) et de souris sauvages (n = 7) et transgéniques malades dans le cortex et le FIME (les barres d'erreur sont de 126,00 µm en x et en y) (B).

## Chapitre 3 : Discussion

La néphrite lupique se caractérise par le dépôt d'auto-anticorps, essentiellement de type IgG, et au recrutement de cellules immunitaires aux reins<sup>217,254</sup>. Vu l'abondance des plaquettes dans le sang, le récepteur à CI FcγRIIA est le récepteur FcγR le plus important du sang<sup>433</sup>. Initialement reconnues pour leur rôle dans l'hémostase, la contribution des plaquettes dans l'inflammation et les maladies immunitaires a longtemps été écartée<sup>391,397</sup>. Les plaquettes sont recrutées aux reins dans les modèles murins de glomérulonéphrites et les biopsies de patients atteints de néphrite lupique<sup>393,445</sup>. Elles participent à l'inflammation et au recrutement de cellules inflammatoires aux reins dans la maladie. Toutefois, puisque FcγRIIA est absent chez la souris, les réponses résultantes de l'activation des plaquettes par les CI dans les modèles murins de néphrite lupique ont été largement sous-étudiées<sup>290</sup>. L'ajout par notre groupe du transgène humain codant pour FcγRIIA dans le modèle murin NZB/WF1 de LED a révélé que l'expression de FcγRIIA par les cellules myéloïdes accélèrent le développement de la néphrite lupique<sup>395</sup>. De plus, les plaquettes sont davantage activées, possèdent une signature IFN de type I, interagissent plus dans la circulation sanguine avec les neutrophiles et libèrent des antigènes mitochondriaux lorsqu'elles expriment le récepteur<sup>395,396</sup>. Ces résultats pointent vers un rôle potentiellement délétère de l'expression de FcγRIIA par les plaquettes dans la progression de la néphrite lupique.

Les plaquettes sont présentes aux reins des souris NZB/WF1 sauvages et transgéniques dès 9 semaines. Leur présence dans les mêmes proportions aux reins des souris C57BL/6 possédant un fond génétique non-inflammatoire nous a permis de conclure que la présence de plaquettes à 9 semaines aux reins de souris NZB/WF1 n'est pas une conséquence de l'expression de FcγRIIA ou le résultat du développement de la néphrite lupique, mais bien un événement qui survient en conditions normales aux reins. La présence et le rôle des plaquettes aux reins dans un contexte physiologique est peu décrit. Les plaquettes expriment à leur surface CLEC-2 et GPVI, deux récepteurs impliqués dans le maintien de l'intégrité des vaisseaux sanguins<sup>467-470</sup>. Les plaquettes pourraient donc jouer un rôle physiologique dans la régulation de la perméabilité et le maintien de l'intégrité des endothéliums aux reins. De plus, les plaquettes sont principalement localisées aux glomérules en conditions normales et pendant le développement de la maladie, comparativement aux zones corticales extraglomérulaires et médullaires. CLEC-2 et GPVI ont pour ligand la podoplanine et le collagène respectivement<sup>449,467</sup>. Aux reins, la podoplanine est exprimée au niveau des podocytes et le collagène est surtout retrouvé au niveau du mésangium et des membranes basales glomérulaires et tubulaires<sup>471,472</sup>. L'expression majoritaire de ces ligands au niveau des glomérules aux reins pourrait expliquer la localisation des plaquettes préférentiellement dans cette zone rénale. De plus, la présence d'un endothélium de type fenestré au niveau des capillaires glomérulaires facilite l'accès aux plaquettes à l'espace sous-endothélial où est exprimé le collagène et la podoplanine comparativement aux capillaires périrubulaires.

Une hausse dans la densité plaquettaire a été observée plus tardivement dans le développement de la néphrite lupique chez les souris transgéniques, soit à 21 semaines comparativement à 15 semaines pour les souris sauvages. Toutefois, seul le recrutement des plaquettes aux reins des souris Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> concorde avec le développement de la néphrite lupique. En effet, le recrutement des plaquettes aux reins des souris transgéniques coïncide avec le moment où elles développent la protéinurie<sup>395</sup>. Au contraire, la protéinurie n'apparaît qu'autour de 28 semaines pour les souris sauvages, soit plus de 3 mois après cette hausse dans le recrutement des plaquettes aux glomérules à 15 semaines. De plus, le recrutement de plaquettes aux reins diminue avec le développement de la néphrite lupique sévère à 38 semaines pour revenir à un niveau basal chez les souris sauvages, alors que la densité plaquettaire est augmentée à 28 semaines aux reins de souris ayant développées une néphrite lupique sévère exprimant le transgène. Les plaquettes s'accumulent significativement plus aux reins de souris malades transgéniques que sauvages indiquant une contribution importante de Fc $\gamma$ RIIA dans l'accumulation de plaquettes aux glomérules dans la néphrite lupique. La concordance entre le recrutement des plaquettes aux reins et les manifestations cliniques de néphrite lupique pourrait suggérer que l'expression de Fc $\gamma$ RIIA induit un phénotype inflammatoire aux plaquettes et les rend délétères dans la maladie. Cette hypothèse est notamment supportée par la signature IFN de type I des plaquettes unique aux souris NZB/WF1.Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup><sup>395</sup>. Toutefois, puisque les plaquettes sont anucléées, les changements dans leur transcriptome sont donc de nature exogène<sup>404</sup>. La majorité de leur transcriptome leur provient des mégacaryocytes lors de la thrombopoïèse. Les mégacaryocytes expriment différents récepteurs immunitaires, tels que des TLR et des Fc $\gamma$ R<sup>398</sup>. Le micro-environnement dans lequel se développe les mégacaryocytes influence leur transcriptome et celui des plaquettes qui en sont dérivées<sup>404,473</sup>. L'expression de Fc $\gamma$ RIIA pourrait induire un changement dans le microenvironnement de la moelle osseuse impactant ainsi le phénotype des mégacaryocytes et conséquemment des plaquettes. En plus de la moelle osseuse, les poumons et la rate ont également été identifiés comme des sites de production de plaquettes<sup>401,402,404</sup>. Il serait intéressant de vérifier si le site de fabrication impacte le phénotype inflammatoire des plaquettes dans la néphrite lupique. D'autre part, le transcriptome des plaquettes peut être modifié via des interactions cellule-cellule ou encore par le transfert d'ARN via des vésicules extracellulaires<sup>404</sup>. Le transcriptome des plaquettes et les fonctions effectrices résultantes pourraient être affectés dans la néphrite lupique par les cellules immunitaires recrutées aux reins et les cellules résidentes rénales comme les cellules mésangiales, endothéliales et tubulaires, ainsi que les podocytes.

Fc $\gamma$ RIIA est donc impliqué dans le recrutement des plaquettes aux reins dans le modèle NZB/WF1. Toutefois, les plaquettes sont également recrutées aux reins des souris sauvages, en absence de Fc $\gamma$ RIIA. Le mécanisme de recrutement des plaquettes aux reins en présence de CI n'est donc pas exclusif à l'expression de ce récepteur. En plus de Fc $\gamma$ RIIA, les plaquettes expriment deux autres récepteurs couplés à un motif ITAM, CLEC-2 et GPVI associé à la chaîne FcR $\gamma$ <sup>427,449</sup>. L'activation de Fc $\gamma$ RIIA, CLEC-2 et GPVI par les CI de

type IgG, la podoplanine et le collagène respectivement mènent à l'activation plaquettaire et à des voies de signalisation et des fonctions effectrices similaires<sup>427,428,474</sup>. Dans un modèle de glomérulonéphrite anti-GBM médiée par les CI, les plaquettes sont recrutées aux glomérules par un mécanisme dépendant de GPVI<sup>445</sup>. L'activation de GPVI et CLEC-2 pourrait être impliquée dans le recrutement des plaquettes aux reins chez les souris sauvages et transgéniques. La co-activation des trois récepteurs ITAM de la plaquette pourrait mener à une activation plus soutenue et expliquer le recrutement plus important des plaquettes aux reins chez les souris transgéniques.

Des plaquettes ont également été identifiées dans le compartiment extravasculaire au niveau des glomérules impliquant une migration transendothéliale des plaquettes. L'extravasation des plaquettes est très peu appréciée dans la littérature et a été brièvement décrite dans les poumons dans des modèles murins d'asthme et d'allergie médiés par les IgE. Une étude a montré que les plaquettes migrent dans le parenchyme pulmonaire via un mécanisme impliquant un récepteur Fc des IgE à la surface des plaquettes, FcεRI<sup>475</sup>. Une autre étude a indiqué que les plaquettes peuvent migrées dans le compartiment extravasculaire des poumons sous forme de complexe leucocyte-plaquette, mais également seules par chimiotactisme via leur expression de CCR3<sup>476</sup>. L'observation de plaquettes dans le compartiment extravasculaire au niveau des glomérules a été faite chez des souris NZB/WF1.FcγRIIA<sup>TGN</sup> à 21 semaines et atteintes de néphrite lupique sévère. Une fois dans le parenchyme rénal, les plaquettes pourraient participer directement à l'inflammation et aux dommages tissulaires dans la néphrite lupique. Toutefois, il s'agit de résultats préliminaires et la fréquence, ainsi que l'importance clinique de ce phénomène devront être déterminées empiriquement. Il serait intéressant de vérifier si l'inflammation et les dommages tissulaires favorisent la migration transendothéliale des plaquettes en comparant la fréquence de ce phénomène entre les souris saines et atteintes de néphrite lupique. La contribution potentielle de FcγRIIA, des autres récepteurs ITAM ou encore des récepteurs à chimiokines des plaquettes dans ce processus reste également à être déterminée<sup>477</sup>.

Les neutrophiles sont le type de leucocyte majoritaire du sang et sont les premiers à être recrutés au foyer inflammatoire<sup>31,142</sup>. Les neutrophiles s'accumulent aux reins dans la néphrite lupique et sont reconnus comme étant des acteurs importants dans l'inflammation et les dommages tissulaires dans la maladie<sup>342</sup>. Notamment, les neutrophiles augmentent la charge d'antigènes du soi dans le milieu extracellulaire via la libération de pièges extracellulaires, produisent des IFN de type I, des ERO et libèrent de la myéloperoxydase impliqués directement dans les dommages tissulaires<sup>142,143,148,342,465</sup>. Étonnamment, une baisse du recrutement des neutrophiles a été observée pour les souris NZB/WF1 sauvages aux stades intermédiaires du développement de la néphrite lupique par rapport à 9 semaines. Les neutrophiles FcγRIIA<sup>-</sup> ne sont donc pas recrutés aux reins pendant le développement de la maladie et sont présents à un niveau basal aux reins des souris malades. Ils ne semblent ainsi pas jouer un rôle crucial dans la pathogenèse de la néphrite lupique des souris sauvages. Il serait intéressant de vérifier si une neutropénie survient chez ces souris pendant le

développement de la maladie et pourrait expliquer la baisse des neutrophiles observée aux reins. Ly6G est couramment utilisé pour marquer les neutrophiles en immunofluorescence. Toutefois, sa fonction sur le neutrophile et si son expression est présente sur tous les neutrophiles sont toujours inconnues<sup>478</sup>. Par méconnaissance du rôle de Ly6G dans un contexte physiologique et pathologique, une altération dans l'expression de ce marqueur dans la néphrite lupique pourrait avoir joué un rôle dans la détection des neutrophiles. Contrairement aux souris sauvages, la densité neutrophilaire aux glomérules est restée constante pendant le développement de la maladie chez les souris transgéniques. Au stade final de néphrite lupique, une hausse a été observée dans le recrutement des neutrophiles Fc $\gamma$ RIIA<sup>+</sup> aux glomérules. L'activation des neutrophiles via Fc $\gamma$ RIIA pourraient jouer un rôle dans l'accélération des dommages rénaux observée avec l'ajout du transgène dans le modèle NZB/WF1<sup>395</sup>. Plusieurs études ont révélé que les neutrophiles sont recrutés aux reins dans la néphrite lupique via un mécanisme dépendant de leur récepteur Fc $\gamma$ R<sup>250,276,277,296,297</sup>. Les densités neutrophilaires aux glomérules dans les reins malades sont similaires entre les deux génotypes et Fc $\gamma$ RIIA ne semblent pas augmenter le recrutement des neutrophiles aux reins. Les neutrophiles murins expriment d'autres Fc $\gamma$ R, soient Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIII et Fc $\gamma$ RIV qui pourraient aussi être impliqués dans leur recrutement aux reins en présence de CI autant pour les souris sauvages que Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN290</sup>.

Via l'expression de CLEC-2 et GPVI, les plaquettes peuvent réguler la perméabilité endothéliale et favoriser le recrutement de cellules immunitaires aux reins<sup>427,428</sup>. Une interaction efficace plaquette-neutrophile est essentielle en contexte inflammatoire pour permettre l'extravasation des neutrophiles<sup>397,421</sup>. Dans un modèle murin de glomérulonéphrite anti-GBM, la déplétion des neutrophiles a été associée à une diminution de l'afflux de plaquettes indiquant qu'une relation bidirectionnelle existe entre les deux évènements<sup>445</sup>. La corrélation entre le recrutement aux glomérules de ces deux acteurs dans la pathogénèse de la néphrite lupique a donc été étudiée. Toutefois, le recrutement des plaquettes et des neutrophiles ne corrèle globalement pas dans le modèle NZB/WF1, autant chez les souris sauvages que Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup>. Dû à un nombre insuffisant de réplicats biologiques dans chaque groupe et des valeurs-p élevées, nous n'avons pas été en mesure de valider si une relation entre le recrutement des plaquettes et des neutrophiles aux reins pendant la néphrite lupique dans ce modèle murin existe à certains stades de la maladie.

Afin de vérifier si un dépôt plus important d'auto-anticorps aux reins des souris NZB/WF1.Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> est lié au recrutement plus important de plaquettes pour ces souris, les Ig ont été dosés dans des lysats de reins de souris sauvages et Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup>. Les IgG sont la principale classe d'Ig à se déposer aux reins dans la néphrite lupique<sup>254</sup>. Les IgM et les IgA sont également retrouvées dans les biopsies rénales de patients atteints de néphrite lupique<sup>255</sup>. Les résultats dans la présente étude ont révélé que les IgG, les IgA et les IgM s'accumulent aux reins dans la maladie pour les deux génotypes. Les IgG s'accumulent plus rapidement aux reins de souris Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> comparativement aux souris sauvages avec des niveaux significativement plus

élevés d'IgG aux reins de souris exprimant le transgène à 28 semaines. Cela suggère donc que les IgG sont produites en plus grand nombre chez les souris Fc $\gamma$ R1IA<sup>TGN</sup> et que leur accumulation plus rapide aux reins pourrait expliquer l'accélération des manifestations cliniques de néphrite lupique avec l'ajout du transgène<sup>395</sup>. En effet, les IgG ont été associées à une contribution plus pathogénique dans la néphrite lupique, alors que les IgM à un rôle davantage protecteur en permettant de limiter l'inflammation médiée par les IgG et en favorisant la clairance des corps apoptiques<sup>194,196,197,368</sup>. Il a été décrit précédemment par notre groupe que l'expression de Fc $\gamma$ R1IA n'a pas d'influence sur les niveaux sériques d'IgG tout au long du développement de la néphrite lupique<sup>395</sup>. De plus, aucune différence dans les niveaux de plasmocytes CD19<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> spléniques entre les deux génotypes à 28 semaines n'a été identifiée. Mis ensembles, ces résultats pourraient suggérer une production locale d'IgG aux reins, consistant avec la formation de structures lymphoïdes tertiaires aux reins qui a été largement décrit dans la néphrite lupique<sup>108,250,267-269</sup>. Une quantité importante de lymphocytes B ont également été observés aux reins de souris NZB/WF1 présentant une néphrite lupique<sup>266</sup>. À stade égal de la maladie, les souris sauvages et transgéniques atteintes de néphrite lupique sévère présentent des niveaux similaires d'IgG aux reins. Malgré les niveaux similaires d'IgG aux reins entre les deux génotypes, les plaquettes sont quatre fois plus nombreuses aux reins de souris malades transgéniques que sauvages. Cette observation supporte l'idée que les plaquettes pourraient être recrutées aux reins majoritairement via un mécanisme dépendant de Fc $\gamma$ R1IA. Puisque Fc $\gamma$ R1IA a une affinité variable pour les différents sous-types d'IgG, il pourrait être intéressant de vérifier si l'ajout du transgène affecte les sous-types d'IgG produits aux reins dans la néphrite lupique et leur rôle respectif dans le développement de la maladie. De plus, il y a moins d'IgM dans les reins des souris malades lorsque le transgène est exprimé comparativement à lorsqu'il est absent. Puisqu'elles survivent en moyenne dix semaines de plus que les souris transgéniques, cela pourrait signifier que davantage d'IgM sont produits pendant cette période et s'accumulent aux reins de souris sauvages. Davantage d'antigènes du soi pourraient également être exposés dans le milieu extracellulaire par des mécanismes de mort cellulaire ou en conséquence aux dommages tissulaires aux reins chez les souris sauvages et pourraient ainsi activer de nouveaux clones de plasmocytes sécrétant des IgM. De plus, cette hausse des IgM entre 28 et 38 semaines chez les souris sauvages pourraient expliquer qu'elles développent plus tardivement la néphrite lupique grâce à une certaine protection médiée par les IgM. D'autre part, la présence conjointement d'IgA et d'IgG dirigés contre l'ADN double brin aux reins est un indicateur d'activité de la maladie<sup>479</sup>. Ici, aucune différence dans les niveaux d'IgA aux reins entre les deux génotypes n'a été identifiée.

Les plaquettes sont la deuxième cellule sanguine la plus importante du sang après les érythrocytes<sup>388</sup>. Vu leur abondance, les plaquettes sont responsables d'une grande proportion de l'expression de Fc $\gamma$ R1IA dans le sang<sup>480</sup>. De plus, les neutrophiles expriment aussi Fc $\gamma$ R1IA et, tout comme les plaquettes, s'accumulent aux reins dans la néphrite lupique. Ces deux types cellulaires pourraient donc contribuer à

l'expression de Fc $\gamma$ RIIA aux reins dans la néphrite lupique. Toutefois, les plaquettes et les neutrophiles ne sont pas responsables de l'expression majoritaire de Fc $\gamma$ RIIA aux reins indépendamment du stade de néphrite lupique. L'expression de Fc $\gamma$ RIIA par les plaquettes et les neutrophiles dans le sang des souris NZB/WF1. Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> a été vérifiée en cytométrie en flux<sup>395</sup>. Les plaquettes et les neutrophiles peuvent cliver Fc $\gamma$ RIIA suivant leur activation et ce phénomène pourrait expliquer la faible expression de Fc $\gamma$ RIIA par ces deux types cellulaires aux reins<sup>346,481</sup>. D'autre part, il est possible que la densité cellulaire de Fc $\gamma$ RIIA soit plus faible pour ces deux types cellulaires et que la calibration des lasers en fonction d'un type cellulaire exprimant abondamment Fc $\gamma$ RIIA au moment d'imager le marquage ait masqué l'expression de Fc $\gamma$ RIIA par les plaquettes et les neutrophiles aux reins.

Fc $\gamma$ RIIA est exprimé aux reins avant le développement de la néphrite lupique chez les souris NZB/WF1, mais aussi aux reins de souris C57BL/6 avec un patron d'expression similaire entre les deux lignées de souris. De plus, l'expression de Fc $\gamma$ RIIA augmente avec le développement de la néphrite lupique dans chacune des zones rénales, à l'exception de la papille rénale où le récepteur est absent. Cependant, cette augmentation est particulièrement marquée dans le cortex autour de la capsule de Bowman et dans le FIME. Différentes cellules immunitaires sont recrutées aux reins dans la néphrite lupique et un recrutement de cellules Fc $\gamma$ RIIA<sup>+</sup> pourrait expliquer cette augmentation de l'expression du récepteur. De plus, une étude a révélé que les macrophages tissulaires peuvent proliférer localement dans les tissus dans un contexte d'inflammation de type Th2, tel que dans la néphrite lupique<sup>482</sup>. Cela permet d'augmenter la densité cellulaire et, puisque les macrophages expriment Fc $\gamma$ RIIA, pourrait être impliqué dans l'augmentation de l'expression de Fc $\gamma$ RIIA aux reins. De plus, le LED est également associé à une activation des plaquettes et des neutrophiles en réponse aux CI dans la circulation sanguine<sup>395,483,484</sup>. Fc $\gamma$ RIIA peut être clivé notamment par les plaquettes et les neutrophiles en présence de CI libérant une forme soluble du récepteur<sup>346,481</sup>. Fc $\gamma$ RIIA pourrait donc s'accumuler au niveau des glomérules des reins par rétention passive ou en se liant aux IgG qui se sont déposés aux reins. L'activation des cellules immunitaires par les CI pourrait également mener au clivage localement de Fc $\gamma$ RIIA et à son accumulation aux reins. Finalement, l'expression de Fc $\gamma$ RIIA peut être modulée par différents stimuli inflammatoires tel que l'IFN $\gamma$ <sup>332,480,485</sup>. Dans la néphrite lupique, certains stimuli pourraient augmenter l'expression et la densité membranaire de Fc $\gamma$ RIIA sur les cellules immunitaires qui l'expriment.

Parmi les cellules hématopoïétiques, l'expression de Fc $\gamma$ RIIA est restreinte aux cellules de lignée myéloïde. Fc $\gamma$ RIIA est donc exprimé majoritairement par une cellule myéloïde qui n'est ni un neutrophile, ni une plaquette. La présence de cellules Fc $\gamma$ RIIA<sup>+</sup> avant le développement de la maladie suggère que le récepteur est exprimé par une cellule immunitaire myéloïde résidente du rein avant la maladie. Ainsi, l'expression de Fc $\gamma$ RIIA par les macrophages et les DC qui constituent le système phagocytaire

mononucléaire du rein a donc été suspectée. Dans la littérature, les phagocytes mononucléaires exprimant F4/80 représentent la majorité des cellules immunitaires CD45<sup>+</sup> exprimés aux reins de souris C57BL/6 en conditions normales<sup>486</sup>. Bien qu'il soit exprimé dans l'ensemble du rein, F4/80 est majoritairement localisé dans la médulla rénale en conditions normales avec un patron d'expression rappelant grandement celui de Fc $\gamma$ RIIA<sup>487</sup>. Dans le modèle NZB/WF1.Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup>, Fc $\gamma$ RIIA est exprimé par une cellule AIF-1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> dans le cortex et le FIME des reins de souris malades et saines. AIF-1 a été largement utilisé pour marquer la microglie<sup>488</sup>. Toutefois, il a été démontré comme étant un bon marqueur pour les macrophages dans des tissus autres que le cerveau tels que le foie, les poumons, la rate et les reins, ainsi que les macrophages circulants<sup>489-492</sup>. F4/80 est également un marqueur conventionnel pour les macrophages chez la souris<sup>490,493</sup>. Toutefois différentes études ont démontré que certaines sous-populations de DC pouvaient également exprimer F4/80 dont certaines ont été identifiées aux reins<sup>487,494,495</sup>. Les différentes sous-populations de macrophages et de DC se chevauchent aux reins tant au niveau de leur morphologie que de leur phénotype et leur fonction<sup>327,496,497</sup>. La nomenclature de ces cellules est un sujet de débat et l'appellation de phagocytes mononucléaires pour les regrouper est donc privilégiée. Des approches de cytométrie de masse à imagerie, de transcriptomique et de protéomique pourraient être utilisées pour davantage caractériser les cellules Fc $\gamma$ RIIA<sup>+</sup>AIF-1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> aux reins. Étonnamment, ce type cellulaire AIF-1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> n'a pas été retrouvé chez les souris sauvages, AIF-1 étant absent dans le cortex et le FIME de ces souris. Une surexpression de AIF-1 a été observée chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde et d'autres maladies auto-immunes, et il a été suggéré que cette cytokine joue un rôle important dans l'auto-immunité<sup>492,498</sup>. Fc $\gamma$ RIIA pourrait moduler à la hausse l'expression de cette cytokine dans les phagocytes mononucléaires F4/80<sup>+</sup> ce qui pourrait impacter le cours de la maladie. D'autre part, l'activité phagocytaire des phagocytes mononucléaires est altérée dans le LED<sup>125,152,153</sup>. Il pourrait être intéressant de vérifier si l'activation de ces cellules via Fc $\gamma$ RIIA puisse modifier leur capacité phagocytaire et ainsi contribuer à l'accélération de l'apparition des symptômes cliniques de néphrite lupique observée chez les souris NZB/WF1.Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> comparativement aux souris sauvages.

Puisque Fc $\gamma$ RIIA est exprimé par des cellules myéloïdes et qu'il accélère le développement de la maladie, la contribution des cellules Fc $\gamma$ RIIA<sup>+</sup> dérivées de la moelle osseuse dans le développement de la néphrite lupique a été étudiée par notre groupe<sup>395</sup>. Dans cette étude, des souris NZB/WF1 sauvages et Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> ont été irradiées afin de dépléter les CSH de la moelle osseuse et ont reçu une greffe de cellules souches de souris sauvages ou transgéniques. Ces travaux ont montré que l'absence de cellules Fc $\gamma$ RIIA<sup>+</sup> dérivées de la moelle osseuse dans les souris irradiées qui ont reçu une greffe de cellules souches de souris sauvages prolonge leur survie et retarde le développement de la néphrite lupique. De plus, la greffe de cellules de la moelle osseuse de souris transgéniques à des souris irradiées sauvages suffit pour l'initiation et le développement de la néphrite lupique. Toutefois, une observation surprenante est que les souris Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup>

irradiées et qui ont reçu la moelle osseuse de souris sauvages sont celles qui présentaient le meilleur taux de survie. Cela indique donc que des cellules Fc $\gamma$ RIIA<sup>+</sup> radio-résistantes et à longue durée de vie présentes aux reins pourraient avoir un effet bénéfique dans la pathogenèse de la néphrite lupique. Des résultats préliminaires qui ne se retrouvent pas dans ce mémoire ont confirmé que les cellules Fc $\gamma$ RIIA<sup>+</sup> aux reins des souris chimères étaient également Fc $\gamma$ RIIA<sup>+</sup>AIF-1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>. Les cellules F4/80<sup>+</sup> aux reins peuvent être dérivées de la moelle osseuse ou d'origine embryonnaire<sup>499,500</sup>. Les cellules d'origine embryonnaire sont des cellules à longue durée de vie, capable de s'auto-renouveler dans les tissus. Par cette capacité d'auto-régénération, ces cellules pourraient posséder une certaine résistance à la radiation et ils pourraient s'agir du type cellulaire Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> identifié comme étant bénéfique dans la néphrite lupique.

## Conclusion

Dans cette étude, une caractérisation spatiotemporelle de l'expression de Fc $\gamma$ RIIA aux reins a été effectuée dans le modèle NZB/WF1.Fc $\gamma$ RIIA<sup>TGN</sup> de LED. D'une part, les plaquettes, responsables d'une majorité de l'expression de Fc $\gamma$ RIIA dans le sang, sont davantage recrutées aux reins lorsqu'elles expriment le récepteur. De plus, leur recrutement aux reins semble concorder avec le développement de la maladie uniquement lorsque Fc $\gamma$ RIIA est présent. Des plaquettes ayant migrées du compartiment vasculaire vers le parenchyme rénal ont été observées. De plus amples études devront être réalisées afin d'identifier le mécanisme sous-tendant la migration transendothéliale des plaquettes aux reins en présence de CI et l'importance clinique de ce phénomène dans la néphrite lupique. Aucune corrélation entre le recrutement des plaquettes et des neutrophiles aux reins n'a pu être établie, mais une relation entre les deux événements n'est pas exclue. Les plaquettes et les neutrophiles sont majoritairement localisés au niveau des glomérules tout au long de la maladie. De plus, nous avons pu mettre en lumière que les plaquettes et les neutrophiles sont présents en conditions normales aux reins de souris NZB/WF1 et C57BL/6 soulignant un rôle de ces types cellulaires aux reins en contexte physiologique.

Bien qu'ils expriment abondamment le récepteur dans le sang, les plaquettes et les neutrophiles ne sont pas responsables de la majeure expression de Fc $\gamma$ RIIA aux reins. Fc $\gamma$ RIIA est majoritairement exprimé aux reins par une cellule AIF-1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> suggérant un rôle des phagocytes mononucléaires dans la pathogenèse de la néphrite lupique. Ces cellules sont présentes aux reins avant la maladie et sont majoritairement localisées au niveau du FIME. L'expression de Fc $\gamma$ RIIA augmente aux reins avec le développement de la néphrite lupique et les cellules Fc $\gamma$ RIIA<sup>+</sup>AIF-1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> sont majoritairement localisées dans le cortex et le FIME dans les reins de souris malades. Puisque son expression est exclusive aux souris transgéniques, il serait intéressant de se pencher sur le rôle de AIF-1 dans la pathogenèse de la néphrite lupique.

Des résultats précédemment publiés par le laboratoire d'accueil suggère un rôle dual de Fc $\gamma$ RIIA aux reins dans la néphrite lupique. D'une part, les cellules myéloïdes Fc $\gamma$ RIIA<sup>+</sup> infiltrant le rein sont délétères dans la maladie. D'autre part, un type cellulaire radio-résistant et à longue durée de vie exprimant Fc $\gamma$ RIIA aux reins a été identifié comme étant bénéfique dans la néphrite lupique. Ces résultats pourraient donc suggérer un rôle bénéfique des phagocytes mononucléaires Fc $\gamma$ RIIA<sup>+</sup>AIF-1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> résidents aux reins dans la néphrite lupique et un rôle davantage délétère de ces cellules lorsqu'elles infiltrent le rein pendant la maladie. Des études supplémentaires seront nécessaires afin de comprendre la contribution respective des cellules Fc $\gamma$ RIIA<sup>+</sup> résidentes et myéloïdes infiltrant le rein dans la néphrite lupique dans la pathogenèse de la maladie chez la souris et chez l'humain.

## Bibliographie

1. Parkin, J. & Cohen, B. An overview of the immune system. *Lancet* **357**, 1777-1789 (2001).
2. Bartl, S., Baish, M., Weissman, I.L. & Diaz, M. Did the molecules of adaptive immunity evolve from the innate immune system? *Integr Comp Biol* **43**, 338-346 (2003).
3. Chaplin, D.D. 1. Overview of the human immune response. *J Allergy Clin Immunol* **117**, S430-435 (2006).
4. Candeias, S.M. & Gaipi, U.S. The Immune System in Cancer Prevention, Development and Therapy. *Anticancer Agents Med Chem* **16**, 101-107 (2016).
5. Sattler, S. The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection. *Adv Exp Med Biol* **1003**, 3-14 (2017).
6. Delves, P.J. & Roitt, I.M. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* **343**, 37-49 (2000).
7. Matsui, T. & Amagai, M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *Int Immunol* **27**, 269-280 (2015).
8. Sperandio, B., Fischer, N. & Sansonetti, P.J. Mucosal physical and chemical innate barriers: Lessons from microbial evasion strategies. *Semin Immunol* **27**, 111-118 (2015).
9. Elias, P.M. The skin barrier as an innate immune element. *Semin Immunopathol* **29**, 3-14 (2007).
10. Marshall, J.S., Warrington, R., Watson, W. & Kim, H.L. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol* **14**, 49 (2018).
11. Şenel, S. An Overview of Physical, Microbiological and Immune Barriers of Oral Mucosa. *Int J Mol Sci* **22**(2021).
12. Bustamante-Marin, X.M. & Ostrowski, L.E. Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**(2017).
13. Aderem, A. & Underhill, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* **17**, 593-623 (1999).
14. Musumeci, A., Lutz, K., Winheim, E. & Krug, A.B. What Makes a pDC: Recent Advances in Understanding Plasmacytoid DC Development and Heterogeneity. *Frontiers in Immunology* **10**(2019).
15. Chen, G.Y. & Nuñez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* **10**, 826-837 (2010).
16. Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* **12**, 991-1045 (1994).
17. Janeway CA Jr, Travers P & Walport M et al. The complement system and innate immunity. in *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (ed. New York : Garland Science) (2001).
18. Dunkelberger, J.R. & Song, W.C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* **20**, 34-50 (2010).
19. Lubbers, R., van Essen, M.F., van Kooten, C. & Trouw, L.A. Production of complement components by cells of the immune system. *Clin Exp Immunol* **188**, 183-194 (2017).
20. Mevorach, D., Mascarenhas, J.O., Gershov, D. & Elkon, K.B. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J Exp Med* **188**, 2313-2320 (1998).
21. Noris, M. & Remuzzi, G. Overview of complement activation and regulation. *Semin Nephrol* **33**, 479-492 (2013).
22. Uribe-Querol, E. & Rosales, C. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Front Immunol* **11**, 1066 (2020).
23. Savill, J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull* **53**, 491-508 (1997).
24. Li, K. & Underhill, D.M. C-Type Lectin Receptors in Phagocytosis. *Curr Top Microbiol Immunol* **429**, 1-18 (2020).

25. Nagata, S., Suzuki, J., Segawa, K. & Fujii, T. Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death Differ* **23**, 952-961 (2016).
26. Zhang, N. & Bevan, M.J. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* **35**, 161-168 (2011).
27. Olson, N.C., Sallam, R., Doyle, M.F., Tracy, R.P. & Huber, S.A. T helper cell polarization in healthy people: implications for cardiovascular disease. *J Cardiovasc Transl Res* **6**, 772-786 (2013).
28. Nalbantian, G. & Kovats, S. Understanding sex biases in immunity: effects of estrogen on the differentiation and function of antigen-presenting cells. *Immunol Res* **31**, 91-106 (2005).
29. Medzhitov, R. & Janeway, C.A., Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* **9**, 4-9 (1997).
30. Freire, M.O. & Van Dyke, T.E. Natural resolution of inflammation. *Periodontol 2000* **63**, 149-164 (2013).
31. Kim, N.D. & Luster, A.D. The role of tissue resident cells in neutrophil recruitment. *Trends Immunol* **36**, 547-555 (2015).
32. Papayannopoulos, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* **18**, 134-147 (2018).
33. Klos, A., *et al.* The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol* **46**, 2753-2766 (2009).
34. Delgado-Rizo, V., *et al.* Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview. *Front Immunol* **8**, 81 (2017).
35. Kanneganti, T.D. The inflammasome: firing up innate immunity. *Immunol Rev* **265**, 1-5 (2015).
36. Moretta, A., *et al.* Major histocompatibility complex class I-specific receptors on human natural killer and T lymphocytes. *Immunol Rev* **155**, 105-117 (1997).
37. Tobón, G.J., Izquierdo, J.H. & Cañas, C.A. B lymphocytes: development, tolerance, and their role in autoimmunity-focus on systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Dis* **2013**, 827254 (2013).
38. LeBien, T.W. & Tedder, T.F. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* **112**, 1570-1580 (2008).
39. Germain, R.N. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* **2**, 309-322 (2002).
40. Parker, M.E. & Ciofani, M. Regulation of  $\gamma\delta$  T Cell Effector Diversification in the Thymus. *Front Immunol* **11**, 42 (2020).
41. Wo, J., *et al.* The Role of Gamma-Delta T Cells in Diseases of the Central Nervous System. *Front Immunol* **11**, 580304 (2020).
42. Shiromizu, C.M. & Jancic, C.C.  $\gamma\delta$  T Lymphocytes: An Effector Cell in Autoimmunity and Infection. *Front Immunol* **9**, 2389 (2018).
43. Lees, R.K., Ferrero, I. & MacDonald, H.R. Tissue-specific segregation of TCR $\gamma$ delta+ NKT cells according to phenotype TCR repertoire and activation status: parallels with TCR alpha $\beta$ +NKT cells. *Eur J Immunol* **31**, 2901-2909 (2001).
44. Shlomchik, M.J. Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation. *Immunity* **28**, 18-28 (2008).
45. Schroeder, H.W., Jr. & Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* **125**, S41-52 (2010).
46. Parish, I.A. & Kaech, S.M. Diversity in CD8(+) T cell differentiation. *Curr Opin Immunol* **21**, 291-297 (2009).
47. Marwaha, A.K., Leung, N.J., McMurphy, A.N. & Levings, M.K. TH17 Cells in Autoimmunity and Immunodeficiency: Protective or Pathogenic? *Front Immunol* **3**, 129 (2012).
48. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. & Ono, M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* **133**, 775-787 (2008).
49. Weigelin, B., Krause, M. & Friedl, P. Cytotoxic T lymphocyte migration and effector function in the tumor microenvironment. *Immunol Lett* **138**, 19-21 (2011).

50. Metelitsa, L.S., *et al.* Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. *J Immunol* **167**, 3114-3122 (2001).
51. Caldwell, S.A., Ryan, M.H., McDuffie, E. & Abrams, S.I. The Fas/Fas ligand pathway is important for optimal tumor regression in a mouse model of CTL adoptive immunotherapy of experimental CMS4 lung metastases. *J Immunol* **171**, 2402-2412 (2003).
52. Shlomchik, M.J. & Weisel, F. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol Rev* **247**, 52-63 (2012).
53. Di Noia, J.M. & Neuberger, M.S. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* **76**, 1-22 (2007).
54. Chaudhuri, J., *et al.* Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism. *Adv Immunol* **94**, 157-214 (2007).
55. Iwata, S. & Tanaka, Y. B-cell subsets, signaling and their roles in secretion of autoantibodies. *Lupus* **25**, 850-856 (2016).
56. Neyt, K., Perros, F., GeurtsvanKessel, C.H., Hammad, H. & Lambrecht, B.N. Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity. *Trends Immunol* **33**, 297-305 (2012).
57. Karsten, C.M. & Köhl, J. The immunoglobulin, IgG Fc receptor and complement triangle in autoimmune diseases. *Immunobiology* **217**, 1067-1079 (2012).
58. Woof, J.M. & Kerr, M.A. The function of immunoglobulin A in immunity. *The Journal of pathology* **208**, 270-282 (2006).
59. Goodnow, C.C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B. & Vinuesa, C.G. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* **435**, 590-597 (2005).
60. Strasser, A., Puthalakath, H., O'Reilly, L.A. & Bouillet, P. What do we know about the mechanisms of elimination of autoreactive T and B cells and what challenges remain. *Immunol Cell Biol* **86**, 57-66 (2008).
61. Xing, Y. & Hogquist, K.A. T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**(2012).
62. Anderson, M.S. & Su, M.A. Aire and T cell development. *Curr Opin Immunol* **23**, 198-206 (2011).
63. McGargill, M.A., Derbinski, J.M. & Hogquist, K.A. Receptor editing in developing T cells. *Nat Immunol* **1**, 336-341 (2000).
64. Santori, F.R., Arsov, I., Lilić, M. & Vukmanović, S. Editing autoreactive TCR enables efficient positive selection. *J Immunol* **169**, 1729-1734 (2002).
65. Melchers, F. Checkpoints that control B cell development. *J Clin Invest* **125**, 2203-2210 (2015).
66. Nemazee, D. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol* **17**, 281-294 (2017).
67. Sandel, P.C. & Monroe, J.G. Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. *Immunity* **10**, 289-299 (1999).
68. Domogalla, M.P., Rostan, P.V., Raker, V.K. & Steinbrink, K. Tolerance through Education: How Tolerogenic Dendritic Cells Shape Immunity. *Front Immunol* **8**, 1764 (2017).
69. Banchereau, J. & Pascual, V. Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity* **25**, 383-392 (2006).
70. Janssen, O., Sanzenbacher, R. & Kabelitz, D. Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations. *Cell Tissue Res* **301**, 85-99 (2000).
71. Brooks, J.F., Murphy, P.R., Barber, J.E.M., Wells, J.W. & Steptoe, R.J. Peripheral Tolerance Checkpoints Imposed by Ubiquitous Antigen Expression Limit Antigen-Specific B Cell Responses under Strongly Immunogenic Conditions. *J Immunol* **205**, 1239-1247 (2020).
72. Pulendran, B., Kannourakis, G., Nouri, S., Smith, K.G. & Nossal, G.J. Soluble antigen can cause enhanced apoptosis of germinal-centre B cells. *Nature* **375**, 331-334 (1995).
73. Shokat, K.M. & Goodnow, C.C. Antigen-induced B-cell death and elimination during germinal-centre immune responses. *Nature* **375**, 334-338 (1995).
74. Cyster, J.G. & Goodnow, C.C. Antigen-induced exclusion from follicles and anergy are separate and complementary processes that influence peripheral B cell fate. *Immunity* **3**, 691-701 (1995).

75. Dörner, T., Giesecke, C. & Lipsky, P.E. Mechanisms of B cell autoimmunity in SLE. *Arthritis Res Ther* **13**, 243 (2011).
76. Möckel, T., Basta, F., Weinmann-Menke, J. & Schwarting, A. B cell activating factor (BAFF): Structure, functions, autoimmunity and clinical implications in Systemic Lupus Erythematosus (SLE). *Autoimmun Rev* **20**, 102736 (2021).
77. Arthritis Society. Systemic Lupus Erythematosus. .
78. 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 (2016).
79. Borchers, A.T., Naguwa, S.M., Shoenfeld, Y. & Gershwin, M.E. The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* **9**, A277-287 (2010).
80. McElhone, K., Abbott, J., Gray, J., Williams, A. & Teh, L.S. Patient perspective of systemic lupus erythematosus in relation to health-related quality of life concepts: a qualitative study. *Lupus* **19**, 1640-1647 (2010).
81. Olesińska, M. & Saletra, A. Quality of life in systemic lupus erythematosus and its measurement. *Reumatologia* **56**, 45-54 (2018).
82. Bernatsky, S., *et al.* Mortality in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **54**, 2550-2557 (2006).
83. 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 (2017).
84. Shaikh, M.F., Jordan, N. & D'Cruz, D.P. Systemic lupus erythematosus. *Clin Med (Lond)* **17**, 78-83 (2017).
85. Weckerle, C.E. & Niewold, T.B. The unexplained female predominance of systemic lupus erythematosus: clues from genetic and cytokine studies. *Clin Rev Allergy Immunol* **40**, 42-49 (2011).
86. Mok, C.C. & Lau, C.S. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* **56**, 481-490 (2003).
87. Javierre, B.M., *et al.* Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. *Genome Res* **20**, 170-179 (2010).
88. Invernizzi, P., Pasini, S., Selmi, C., Miozzo, M. & Podda, M. Skewing of X chromosome inactivation in autoimmunity. *Autoimmunity* **41**, 272-277 (2008).
89. Strickland, F.M., *et al.* Environmental exposure, estrogen and two X chromosomes are required for disease development in an epigenetic model of lupus. *J Autoimmun* **38**, J135-143 (2012).
90. Teruel, M. & Alarcón-Riquelme, M.E. The genetic basis of systemic lupus erythematosus: What are the risk factors and what have we learned. *J Autoimmun* **74**, 161-175 (2016).
91. Walport, M.J., Davies, K.A. & Botto, M. C1q and systemic lupus erythematosus. *Immunobiology* **199**, 265-285 (1998).
92. Relle, M. & Schwarting, A. Role of MHC-linked susceptibility genes in the pathogenesis of human and murine lupus. *Clin Dev Immunol* **2012**, 584374 (2012).
93. Farivar, S. & Shaabanpour Aghamaleki, F. Effects of Major Epigenetic Factors on Systemic Lupus Erythematosus. *Iran Biomed J* **22**, 294-302 (2018).
94. Dillon, S., *et al.* Klinefelter's syndrome (47,XXY) among men with systemic lupus erythematosus. *Acta Paediatrica* **100**, 819-823 (2011).
95. McMurray, R.W. & May, W. Sex hormones and systemic lupus erythematosus: review and meta-analysis. *Arthritis Rheum* **48**, 2100-2110 (2003).
96. Barbhaiya, M. & Costenbader, K.H. Environmental exposures and the development of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* **28**, 497-505 (2016).
97. Wolf, S.J., Estadt, S.N., Gudjonsson, J.E. & Kahlenberg, J.M. Human and Murine Evidence for Mechanisms Driving Autoimmune Photosensitivity. *Front Immunol* **9**, 2430 (2018).
98. Barbhaiya, M. & Costenbader, K.H. Ultraviolet radiation and systemic lupus erythematosus. *Lupus* **23**, 588-595 (2014).

99. Agmon-Levin, N., Blank, M., Paz, Z. & Shoenfeld, Y. Molecular mimicry in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **18**, 1181-1185 (2009).
100. 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 (2006).
101. He, Y. & Sawalha, A.H. Drug-induced lupus erythematosus: an update on drugs and mechanisms. *Curr Opin Rheumatol* **30**, 490-497 (2018).
102. Quaresma, M.V., *et al.* Anti-TNF- $\alpha$  and hydralazine drug-induced lupus. *An Bras Dermatol* **90**, 125-129 (2015).
103. Zhou, Y. & Lu, Q. DNA methylation in T cells from idiopathic lupus and drug-induced lupus patients. *Autoimmun Rev* **7**, 376-383 (2008).
104. Parks, C.G., Conrad, K. & Cooper, G.S. Occupational exposure to crystalline silica and autoimmune disease. *Environ Health Perspect* **107 Suppl 5**, 793-802 (1999).
105. Bernatsky, S., *et al.* Fine particulate air pollution, nitrogen dioxide, and systemic autoimmune rheumatic disease in Calgary, Alberta. *Environ Res* **140**, 474-478 (2015).
106. Costa-Reis, P. & Sullivan, K.E. Genetics and epigenetics of systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep* **15**, 369 (2013).
107. Suzuki, N., Harada, T., Mihara, S. & Sakane, T. Characterization of a germline Vk gene encoding cationic anti-DNA antibody and role of receptor editing for development of the autoantibody in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* **98**, 1843-1850 (1996).
108. Nashi, E., Wang, Y. & Diamond, B. The role of B cells in lupus pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 543-550 (2010).
109. Rastin, M., *et al.* T lymphocyte apoptosis in systemic lupus erythematosus patients. *Iran J Basic Med Sci* **16**, 936-941 (2013).
110. Moulton, V.R. & Tsokos, G.C. Abnormalities of T cell signaling in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* **13**, 207 (2011).
111. Lee, J., Kuchen, S., Fischer, R., Chang, S. & Lipsky, P.E. Identification and characterization of a human CD5+ pre-naive B cell population. *J Immunol* **182**, 4116-4126 (2009).
112. Liossis, S.N., Kovacs, B., Dennis, G., Kammer, G.M. & Tsokos, G.C. B cells from patients with systemic lupus erythematosus display abnormal antigen receptor-mediated early signal transduction events. *J Clin Invest* **98**, 2549-2557 (1996).
113. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155**, 1151-1164 (1995).
114. Lieberman, L.A. & Tsokos, G.C. The IL-2 defect in systemic lupus erythematosus disease has an expansive effect on host immunity. *J Biomed Biotechnol* **2010**, 740619 (2010).
115. Xu, L., Zhang, L., Yi, Y., Kang, H.K. & Datta, S.K. Human lupus T cells resist inactivation and escape death by upregulating COX-2. *Nat Med* **10**, 411-415 (2004).
116. Tiller, T., *et al.* Autoreactivity in human IgG+ memory B cells. *Immunity* **26**, 205-213 (2007).
117. Guo, W., *et al.* Somatic hypermutation as a generator of antinuclear antibodies in a murine model of systemic autoimmunity. *J Exp Med* **207**, 2225-2237 (2010).
118. Detanico, T., *et al.* Somatic mutagenesis in autoimmunity. *Autoimmunity* **46**, 102-114 (2013).
119. Woods, M., Zou, Y.R. & Davidson, A. Defects in Germinal Center Selection in SLE. *Front Immunol* **6**, 425 (2015).
120. Cappione, A., 3rd, *et al.* Germinal center exclusion of autoreactive B cells is defective in human systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* **115**, 3205-3216 (2005).
121. Sherer, Y., Gorstein, A., Fritzler, M.J. & Shoenfeld, Y. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. *Semin Arthritis Rheum* **34**, 501-537 (2004).
122. Pieterse, E. & van der Vlag, J. Breaking immunological tolerance in systemic lupus erythematosus. *Front Immunol* **5**, 164 (2014).

123. Becker, Y., *et al.* Anti-mitochondrial autoantibodies in systemic lupus erythematosus and their association with disease manifestations. *Sci Rep* **9**, 4530 (2019).
124. Colonna, L., Lood, C. & Elkon, K.B. Beyond apoptosis in lupus. *Curr Opin Rheumatol* **26**, 459-466 (2014).
125. Ren, Y., *et al.* Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **48**, 2888-2897 (2003).
126. Magna, M. & Pisetsky, D.S. The Role of Cell Death in the Pathogenesis of SLE: Is Pyroptosis the Missing Link? *Scand J Immunol* **82**, 218-224 (2015).
127. Yang, F., He, Y., Zhai, Z. & Sun, E. Programmed Cell Death Pathways in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol Res* **2019**, 3638562 (2019).
128. Mistry, P. & Kaplan, M.J. Cell death in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Clin Immunol* **185**, 59-73 (2017).
129. Salmon, M. & Gordon, C. The role of apoptosis in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* **38**, 1177-1183 (1999).
130. 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 (2008).
131. Souliotis, V.L. & Sfrikakis, P.P. Increased DNA double-strand breaks and enhanced apoptosis in patients with lupus nephritis. *Lupus* **24**, 804-815 (2015).
132. Yang, X., *et al.* Increased serum IL-10 in lupus patients promotes apoptosis of T cell subsets via the caspase 8 pathway initiated by Fas signaling. *J Biomed Res* **29**, 232-240 (2015).
133. Wu, H., Fu, S., Zhao, M., Lu, L. & Lu, Q. Dysregulation of Cell Death and Its Epigenetic Mechanisms in Systemic Lupus Erythematosus. *Molecules* **22**(2016).
134. Fava, A. & Petri, M. Systemic lupus erythematosus: Diagnosis and clinical management. *J Autoimmun* **96**, 1-13 (2019).
135. Gaipl, U.S., *et al.* Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *J Autoimmun* **28**, 114-121 (2007).
136. Silvestris, F., *et al.* Serum elevations of soluble Fas (CD95/apo-I) concur in deregulating T cell apoptosis during active lupus disease. *Clin Exp Med* **2**, 13-27 (2002).
137. White, S. & Rosen, A. Apoptosis in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* **15**, 557-562 (2003).
138. Silva, M.T. Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Lett* **584**, 4491-4499 (2010).
139. Meyer, A., *et al.* Mitochondria: An Organelle of Bacterial Origin Controlling Inflammation. *Front Immunol* **9**, 536 (2018).
140. Becker, Y., *et al.* Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus Target Mitochondrial RNA. *Front Immunol* **10**, 1026 (2019).
141. Andersson, S.G.E., *et al.* The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**, 133-140 (1998).
142. Knight, J.S., Carmona-Rivera, C. & Kaplan, M.J. Proteins derived from neutrophil extracellular traps may serve as self-antigens and mediate organ damage in autoimmune diseases. *Front Immunol* **3**, 380 (2012).
143. Martinelli, S., *et al.* Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular trap formation during neutrophil differentiation. *J Biol Chem* **279**, 44123-44132 (2004).
144. Boilard, E. & Fortin, P.R. Connective tissue diseases: Mitochondria drive NETosis and inflammation in SLE. *Nat Rev Rheumatol* **12**, 195-196 (2016).
145. Granger, V., Peyneau, M., Chollet-Martin, S. & de Chaisemartin, L. Neutrophil Extracellular Traps in Autoimmunity and Allergy: Immune Complexes at Work. *Front Immunol* **10**, 2824 (2019).
146. Denny, M.F., *et al.* A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *J Immunol* **184**, 3284-3297 (2010).

147. 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 (2016).
148. Hakkim, A., *et al.* Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 9813-9818 (2010).
149. Kahlenberg, J.M., Carmona-Rivera, C., Smith, C.K. & Kaplan, M.J. Neutrophil extracellular trap-associated protein activation of the NLRP3 inflammasome is enhanced in lupus macrophages. *J Immunol* **190**, 1217-1226 (2013).
150. Truedsson, L., Bengtsson, A.A. & Sturfelt, G. Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* **40**, 560-566 (2007).
151. Farrera, C. & Fadeel, B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J Immunol* **191**, 2647-2656 (2013).
152. 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).
153. Herrmann, M., *et al.* Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **41**, 1241-1250 (1998).
154. Macedo, A.C. & Isaac, L. Systemic Lupus Erythematosus and Deficiencies of Early Components of the Complement Classical Pathway. *Front Immunol* **7**, 55 (2016).
155. Mayilyan, K.R. Complement genetics, deficiencies, and disease associations. *Protein Cell* **3**, 487-496 (2012).
156. Munroe, M.E. & James, J.A. Genetics of Lupus Nephritis: Clinical Implications. *Semin Nephrol* **35**, 396-409 (2015).
157. Glesse, N., *et al.* Association of mannose-binding lectin 2 gene polymorphic variants with susceptibility and clinical progression in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* **29**, 983-990 (2011).
158. Panda, A.K., *et al.* Mannose binding lectin: a biomarker of systemic lupus erythematosus disease activity. *Arthritis Res Ther* **14**, R218 (2012).
159. Sturfelt, G. & Truedsson, L. Complement and its breakdown products in SLE. *Rheumatology (Oxford)* **44**, 1227-1232 (2005).
160. Tenbrock, K., Juang, Y.T., Kyttaris, V.C. & Tsokos, G.C. Altered signal transduction in SLE T cells. *Rheumatology (Oxford)* **46**, 1525-1530 (2007).
161. Jackson, S.W., Kolhatkar, N.S. & Rawlings, D.J. B cells take the front seat: dysregulated B cell signals orchestrate loss of tolerance and autoantibody production. *Curr Opin Immunol* **33**, 70-77 (2015).
162. Fransen, J.H., *et al.* The role of dendritic cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* **12**, 207 (2010).
163. Inaba, K., *et al.* Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J Exp Med* **188**, 2163-2173 (1998).
164. Banchereau, J. & Steinman, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252 (1998).
165. Wilson, N.S., El-Sukkari, D. & Villadangos, J.A. Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis. *Blood* **103**, 2187-2195 (2004).
166. Casciola-Rosen, L., Andrade, F., Ulanet, D., Wong, W.B. & Rosen, A. Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implications for initiation of autoimmunity. *J Exp Med* **190**, 815-826 (1999).
167. Utz, P.J., Gensler, T.J. & Anderson, P. Death, autoantigen modifications, and tolerance. *Arthritis Res* **2**, 101-114 (2000).
168. Dieker, J.W., *et al.* Apoptosis-induced acetylation of histones is pathogenic in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **56**, 1921-1933 (2007).

169. Doyle, H.A. & Mamula, M.J. Posttranslational modifications of self-antigens. *Ann N Y Acad Sci* **1050**, 1-9 (2005).
170. Ryan, B.J., Nissim, A. & Winyard, P.G. Oxidative post-translational modifications and their involvement in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Redox Biol* **2**, 715-724 (2014).
171. Kurien, B.T., Hensley, K., Bachmann, M. & Scofield, R.H. Oxidatively modified autoantigens in autoimmune diseases. *Free Radic Biol Med* **41**, 549-556 (2006).
172. Baechler, E.C., *et al.* Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2610-2615 (2003).
173. Bennett, L., *et al.* Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* **197**, 711-723 (2003).
174. Crow, M.K. & Wohlgemuth, J. Microarray analysis of gene expression in lupus. *Arthritis Res Ther* **5**, 279-287 (2003).
175. Blanco, P., Palucka, A.K., Gill, M., Pascual, V. & Banchereau, J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science* **294**, 1540-1543 (2001).
176. Blanco, P., Palucka, A.K., Pascual, V. & Banchereau, J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* **19**, 41-52 (2008).
177. Rovere, P., *et al.* Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *J Immunol* **161**, 4467-4471 (1998).
178. Blanco, P., *et al.* Increase in activated CD8+ T lymphocytes expressing perforin and granzyme B correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **52**, 201-211 (2005).
179. Kim, S.J., Lee, K. & Diamond, B. Follicular Helper T Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol* **9**, 1793 (2018).
180. Miao, M., *et al.* Therapeutic potential of targeting Tfr/Tfh cell balance by low-dose-IL-2 in active SLE: a post hoc analysis from a double-blind RCT study. *Arthritis Res Ther* **23**, 167 (2021).
181. Muhammad Yusoff, F., Wong, K.K. & Mohd Redzwan, N. Th1, Th2, and Th17 cytokines in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* **53**, 8-20 (2020).
182. Miyake, K., Akahoshi, M. & Nakashima, H. Th subset balance in lupus nephritis. *J Biomed Biotechnol* **2011**, 980286 (2011).
183. Yap, D.Y. & Lai, K.N. Pathogenesis of renal disease in systemic lupus erythematosus--the role of autoantibodies and lymphocytes subset abnormalities. *Int J Mol Sci* **16**, 7917-7931 (2015).
184. Katsuyama, T., Tsokos, G.C. & Moulton, V.R. Aberrant T Cell Signaling and Subsets in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol* **9**, 1088 (2018).
185. Kleczynska, W., *et al.* Imbalance between Th17 and regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus. *Folia Histochem Cytobiol* **49**, 646-653 (2011).
186. Li, W., Deng, C., Yang, H. & Wang, G. The Regulatory T Cell in Active Systemic Lupus Erythematosus Patients: A Systemic Review and Meta-Analysis. *Front Immunol* **10**, 159 (2019).
187. Talaat, R.M., Mohamed, S.F., Bassyouni, I.H. & Raouf, A.A. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. *Cytokine* **72**, 146-153 (2015).
188. Yurasov, S., *et al.* Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* **201**, 703-711 (2005).
189. Monneaux, F. & Muller, S. Epitope spreading in systemic lupus erythematosus: identification of triggering peptide sequences. *Arthritis Rheum* **46**, 1430-1438 (2002).
190. Jacob, N. & Stohl, W. Autoantibody-dependent and autoantibody-independent roles for B cells in systemic lupus erythematosus: past, present, and future. *Autoimmunity* **43**, 84-97 (2010).
191. Zhang, J., *et al.* Polyreactive autoantibodies in systemic lupus erythematosus have pathogenic potential. *J Autoimmun* **33**, 270-274 (2009).
192. Groom, J.R., *et al.* BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *J Exp Med* **204**, 1959-1971 (2007).

193. 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 (2014).
194. Olsen, N.J. & Karp, D.R. Autoantibodies and SLE: the threshold for disease. *Nat Rev Rheumatol* **10**, 181-186 (2014).
195. 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).
196. Grönwall, 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 (2012).
197. Werwitzke, S., *et al.* Inhibition of lupus disease by anti-double-stranded DNA antibodies of the IgM isotype in the (NZB x NZW)F1 mouse. *Arthritis Rheum* **52**, 3629-3638 (2005).
198. Isenberg, D.A., Ravirajan, C.T., Rahman, A. & Kalsi, J. The role of antibodies to DNA in systemic lupus erythematosus--a review and introduction to an international workshop on DNA antibodies held in London, May 1996. *Lupus* **6**, 290-304 (1997).
199. Al Sawah, S., *et al.* SAT042S Understanding Delay in Diagnosis, Access to Care and Satisfaction with Care in Lupus: Findings from a Cross-Sectional Online Survey in the United States. *Annals of the Rheumatic Diseases* **74**, 812 - 812 (2015).
200. Lupus Foundation of America. National Resource Center on Lupus : Lupus symptoms. (2022).
201. Aringer, M., *et al.* 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol* **71**, 1400-1412 (2019).
202. Ostensen, M. & Villiger, P.M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **9**, 566-572 (2000).
203. Doria, A., *et al.* SLE diagnosis and treatment: when early is early. *Autoimmun Rev* **10**, 55-60 (2010).
204. Ruiz-Irastorza, G., Ramos-Casals, M., Brito-Zeron, P. & Khamashta, M.A. Clinical efficacy and side effects of antimalarials in systemic lupus erythematosus: a systematic review. *Ann Rheum Dis* **69**, 20-28 (2010).
205. Mok, C.C., Tse, S.M., Chan, K.L. & Ho, L.Y. Effect of immunosuppressive therapies on survival of systemic lupus erythematosus: a propensity score analysis of a longitudinal cohort. *Lupus* **27**, 722-727 (2018).
206. 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 (2013).
207. Pimentel-Quiroz, V.R., Ugarte-Gil, M.F. & Alarcón, G.S. Abatacept for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Expert Opin Investig Drugs* **25**, 493-499 (2016).
208. Dörner, T., Shock, A., Goldenberg, D.M. & Lipsky, P.E. The mechanistic impact of CD22 engagement with epratuzumab on B cell function: Implications for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* **14**, 1079-1086 (2015).
209. Aytan, J. & Bukhari, M.A.S. Use of biologics in SLE: a review of the evidence from a clinical perspective. *Rheumatology* **55**, 775-779 (2015).
210. Sakthiswary, R. & Suresh, E. Methotrexate in systemic lupus erythematosus: a systematic review of its efficacy. *Lupus* **23**, 225-235 (2014).
211. Keeling, S.O., *et al.* Canadian Rheumatology Association Recommendations for the Assessment and Monitoring of Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol* **45**, 1426-1439 (2018).
212. Maroz, N. & Segal, M.S. Lupus nephritis and end-stage kidney disease. *Am J Med Sci* **346**, 319-323 (2013).
213. Ward, M.M., Pyun, E. & Studenski, S. Mortality risks associated with specific clinical manifestations of systemic lupus erythematosus. *Arch Intern Med* **156**, 1337-1344 (1996).
214. Zabaleta-Lanz, M., *et al.* Silent nephritis in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **12**, 26-30 (2003).
215. Tektonidou, M.G., Dasgupta, A. & Ward, M.M. Risk of End-Stage Renal Disease in Patients With Lupus Nephritis, 1971-2015: A Systematic Review and Bayesian Meta-Analysis. *Arthritis Rheumatol* **68**, 1432-1441 (2016).

216. Cross, J. & Jayne, D. Diagnosis and treatment of kidney disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **19**, 785-798 (2005).
217. Nowling, T.K. & Gilkeson, G.S. Mechanisms of tissue injury in lupus nephritis. *Arthritis research & therapy* **13**, 250 (2011).
218. Adler, M., Chambers, S., Edwards, C., Neild, G. & Isenberg, D. An assessment of renal failure in an SLE cohort with special reference to ethnicity, over a 25-year period. *Rheumatology (Oxford)* **45**, 1144-1147 (2006).
219. Hopkinson, N.D., Jenkinson, C., Muir, K.R., Doherty, M. & Powell, R.J. Racial group, socioeconomic status, and the development of persistent proteinuria in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* **59**, 116-119 (2000).
220. Richman, I.B., *et al.* European genetic ancestry is associated with a decreased risk of lupus nephritis. *Arthritis Rheum* **64**, 3374-3382 (2012).
221. Hoover, P.J. & Costenbader, K.H. Insights into the epidemiology and management of lupus nephritis from the US rheumatologist's perspective. *Kidney Int* **90**, 487-492 (2016).
222. Barr, R.G., *et al.* Prognosis in proliferative lupus nephritis: the role of socio-economic status and race/ethnicity. *Nephrol Dial Transplant* **18**, 2039-2046 (2003).
223. Panneer, D., Antony, P.T. & Negi, V.S. Q222R polymorphism in DNase I gene is a risk factor for nephritis in South Indian SLE patients. *Lupus* **22**, 996-1000 (2013).
224. Martinez-Valle, F., *et al.* DNase 1 activity in patients with systemic lupus erythematosus: relationship with epidemiological, clinical, immunological and therapeutical features. *Lupus* **18**, 418-423 (2009).
225. Bollain, Y.G.J.J., *et al.* Soluble fas and the -670 polymorphism of fas in lupus nephritis. *Int J Nephrol* **2014**, 780406 (2014).
226. Floto, R.A., *et al.* Loss of function of a lupus-associated FcgammaRIIb polymorphism through exclusion from lipid rafts. *Nat Med* **11**, 1056-1058 (2005).
227. Wu, J., *et al.* A novel polymorphism of FcgammaRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest* **100**, 1059-1070 (1997).
228. Karassa, F.B., Trikalinos, T.A. & Ioannidis, J.P. Role of the Fcgamma receptor IIa polymorphism in susceptibility to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a meta-analysis. *Arthritis Rheum* **46**, 1563-1571 (2002).
229. Nossent, J.C., Becker-Merok, A., Rischmueller, M. & Lester, S. Susceptibility for Lupus Nephritis by Low Copy Number of the FCGR3B Gene Is Linked to Increased Levels of Pathogenic Autoantibodies. *Autoimmune Dis* **2013**, 750814 (2013).
230. Salmon, J.E., *et al.* Fc gamma RIIA alleles are heritable risk factors for lupus nephritis in African Americans. *J Clin Invest* **97**, 1348-1354 (1996).
231. Jönsen, A., *et al.* Association between SLE nephritis and polymorphic variants of the CRP and FcgammaRIIIa genes. *Rheumatology (Oxford)* **46**, 1417-1421 (2007).
232. Leffler, J., Bengtsson, A.A. & Blom, A.M. The complement system in systemic lupus erythematosus: an update. *Ann Rheum Dis* **73**, 1601-1606 (2014).
233. Chung, S.A., *et al.* Lupus nephritis susceptibility loci in women with systemic lupus erythematosus. *J Am Soc Nephrol* **25**, 2859-2870 (2014).
234. Chmielewski, C. Renal anatomy and overview of nephron function. *Nephrol Nurs J* **30**, 185-190; quiz 191-182 (2003).
235. Scott, R.P. & Quaggin, S.E. Review series: The cell biology of renal filtration. *J Cell Biol* **209**, 199-210 (2015).
236. López, J.I., Larrinaga, G., Kuroda, N. & Angulo, J.C. The normal and pathologic renal medulla: a comprehensive overview. *Pathol Res Pract* **211**, 271-280 (2015).
237. Preuss, H.G. Basics of renal anatomy and physiology. *Clin Lab Med* **13**, 1-11 (1993).
238. Puelles, V.G., *et al.* Glomerular number and size variability and risk for kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **20**, 7-15 (2011).
239. Kumaran, G.K. & Hanukoglu, I. Identification and classification of epithelial cells in nephron segments by actin cytoskeleton patterns. *Febs j* **287**, 1176-1194 (2020).

240. Jing, J. & Gao, Y. Urine biomarkers in the early stages of diseases: current status and perspective. *Discovery medicine* **25**, 57-65 (2018).
241. Tucker, B.J. & Blantz, R.C. An analysis of the determinants of nephron filtration rate. *Am J Physiol* **232**, F477-483 (1977).
242. Lazzara, M.J. & Deen, W.M. Model of albumin reabsorption in the proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**, F430-439 (2007).
243. Katz, A.I. Renal Na-K-ATPase: its role in tubular sodium and potassium transport. *Am J Physiol* **242**, F207-219 (1982).
244. Azroyan, A., *et al.* Renal intercalated cells sense and mediate inflammation via the P2Y14 receptor. *PLoS One* **10**, e0121419 (2015).
245. Hoening, M.P. & Zeidel, M.L. Homeostasis, the milieu intérieur, and the wisdom of the nephron. *Clin J Am Soc Nephrol* **9**, 1272-1281 (2014).
246. Lacombe, C., *et al.* Erythropoietin: sites of synthesis and regulation of secretion. *Am J Kidney Dis* **18**, 14-19 (1991).
247. Williams, S., Malatesta, K. & Norris, K. Vitamin D and chronic kidney disease. *Ethn Dis* **19**, S5-8-11 (2009).
248. Yung, S. & Chan, T.M. Autoantibodies and resident renal cells in the pathogenesis of lupus nephritis: getting to know the unknown. *Clin Dev Immunol* **2012**, 139365 (2012).
249. Hebert, L.A. & Cosio, G. The erythrocyte-immune complex-glomerulonephritis connection in man. *Kidney Int* **31**, 877-885 (1987).
250. Davidson, A. What is damaging the kidney in lupus nephritis? *Nat Rev Rheumatol* **12**, 143-153 (2016).
251. Vlahakos, D., *et al.* Murine monoclonal anti-DNA antibodies penetrate cells, bind to nuclei, and induce glomerular proliferation and proteinuria in vivo. *J Am Soc Nephrol* **2**, 1345-1354 (1992).
252. Seelen, M.A., Trouw, L.A. & Daha, M.R. Diagnostic and prognostic significance of anti-C1q antibodies in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **12**, 619-624 (2003).
253. Siegert, C., Daha, M., Westedt, M.L., van der Voort, E. & Breedveld, F. IgG autoantibodies against C1q are correlated with nephritis, hypocomplementemia, and dsDNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* **18**, 230-234 (1991).
254. Budhai, L., Oh, K. & Davidson, A. An in vitro assay for detection of glomerular binding IgG autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* **98**, 1585-1593 (1996).
255. Weening, J.J., *et al.* The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J Am Soc Nephrol* **15**, 241-250 (2004).
256. Waldman, M. & Madaio, M.P. Pathogenic autoantibodies in lupus nephritis. *Lupus* **14**, 19-24 (2005).
257. Hahn, B.H. Antibodies to DNA. *N Engl J Med* **338**, 1359-1368 (1998).
258. Witte, T. IgM antibodies against dsDNA in SLE. *Clin Rev Allergy Immunol* **34**, 345-347 (2008).
259. Diamond, B., *et al.* The role of somatic mutation in the pathogenic anti-DNA response. *Annu Rev Immunol* **10**, 731-757 (1992).
260. Williams, R.C., Jr., Malone, C., Blood, B. & Silvestris, F. Anti-DNA and anti-nucleosome antibody affinity--a mirror image of lupus nephritis? *J Rheumatol* **26**, 331-346 (1999).
261. Mannik, M. Mechanisms of tissue deposition of immune complexes. *J Rheumatol Suppl* **14 Suppl 13**, 35-42 (1987).
262. Miner, J.H. The glomerular basement membrane. *Exp Cell Res* **318**, 973-978 (2012).
263. Cabral, A.R. & Alarcón-Segovia, D. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* **9**, 387-392 (1997).
264. Tan, Y., Song, D., Wu, L.H., Yu, F. & Zhao, M.H. Serum levels and renal deposition of C1q complement component and its antibodies reflect disease activity of lupus nephritis. *BMC Nephrol* **14**, 63 (2013).
265. Trouw, L.A., *et al.* Anti-C1q autoantibodies deposit in glomeruli but are only pathogenic in combination with glomerular C1q-containing immune complexes. *J Clin Invest* **114**, 679-688 (2004).

266. Espeli, M., *et al.* Local renal autoantibody production in lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* **22**, 296-305 (2011).
267. Sun, C.Y., *et al.* The Characteristics and Significance of Locally Infiltrating B Cells in Lupus Nephritis and Their Association with Local BAFF Expression. *Int J Rheumatol* **2013**, 954292 (2013).
268. Borchers, A.T., *et al.* Lupus nephritis: a critical review. *Autoimmun Rev* **12**, 174-194 (2012).
269. Steinmetz, O.M., *et al.* Analysis and classification of B-cell infiltrates in lupus and ANCA-associated nephritis. *Kidney Int* **74**, 448-457 (2008).
270. Giannico, G. & Fogo, A.B. Lupus nephritis: is the kidney biopsy currently necessary in the management of lupus nephritis? *Clin J Am Soc Nephrol* **8**, 138-145 (2013).
271. Abrahamson, D.R. & Leardkamolkarn, V. Development of kidney tubular basement membranes. *Kidney Int* **39**, 382-393 (1991).
272. Chan, T.M., Leung, J.K., Ho, S.K. & Yung, S. Mesangial cell-binding anti-DNA antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *J Am Soc Nephrol* **13**, 1219-1229 (2002).
273. Olaru, F., *et al.* Intracapillary immune complexes recruit and activate slan-expressing CD16+ monocytes in human lupus nephritis. *JCI Insight* **3**(2018).
274. Sato, N., *et al.* Significance of glomerular activation of the alternative pathway and lectin pathway in lupus nephritis. *Lupus* **20**, 1378-1386 (2011).
275. Kwok, S.K. & Tsokos, G.C. New insights into the role of renal resident cells in the pathogenesis of lupus nephritis. *Korean J Intern Med* **33**, 284-289 (2018).
276. Clynes, R., Dumitru, C. & Ravetch, J.V. Uncoupling of immune complex formation and kidney damage in autoimmune glomerulonephritis. *Science* **279**, 1052-1054 (1998).
277. Bergtold, A., Gavhane, A., D'Agati, V., Madaio, M. & Clynes, R. FcR-bearing myeloid cells are responsible for triggering murine lupus nephritis. *J Immunol* **177**, 7287-7295 (2006).
278. Peterson, K.S., *et al.* Characterization of heterogeneity in the molecular pathogenesis of lupus nephritis from transcriptional profiles of laser-captured glomeruli. *J Clin Invest* **113**, 1722-1733 (2004).
279. Lewis, E.J. & Schwartz, M.M. Pathology of lupus nephritis. *Lupus* **14**, 31-38 (2005).
280. Bond, A., *et al.* A detailed lectin analysis of IgG glycosylation, demonstrating disease specific changes in terminal galactose and N-acetylglucosamine. *J Autoimmun* **10**, 77-85 (1997).
281. Vorup-Jensen, T. & Jensen, R.K. Structural Immunology of Complement Receptors 3 and 4. *Front Immunol* **9**, 2716 (2018).
282. Khera, R. & Das, N. Complement Receptor 1: disease associations and therapeutic implications. *Mol Immunol* **46**, 761-772 (2009).
283. Ross, G.D., *et al.* Disease-associated loss of erythrocyte complement receptors (CR1, C3b receptors) in patients with systemic lupus erythematosus and other diseases involving autoantibodies and/or complement activation. *J Immunol* **135**, 2005-2014 (1985).
284. Gillis, C., Gouel-Chéron, A., Jönsson, F. & Bruhns, P. Contribution of Human FcγRs to Disease with Evidence from Human Polymorphisms and Transgenic Animal Studies. *Front Immunol* **5**, 254 (2014).
285. Reefman, E., Dijkstra, H.M., Limburg, P.C., Kallenberg, C.G. & Bijl, M. Fcγ receptors in the initiation and progression of systemic lupus erythematosus. *Immunol Cell Biol* **81**, 382-389 (2003).
286. Pradhan, V., Patwardhan, M. & Ghosh, K. Fc gamma receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus and their correlation with the clinical severity of the disease. *Indian J Hum Genet* **14**, 77-81 (2008).
287. Aarli, A., Matre, R. & Thunold, S. IgG Fc receptors on epithelial cells of distal tubuli and on endothelial cells in human kidney. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **95**, 64-69 (1991).
288. Nimmerjahn, F. & Ravetch, J.V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* **8**, 34-47 (2008).
289. Hamdan, T.A., Lang, P.A. & Lang, K.S. The Diverse Functions of the Ubiquitous Fcγ Receptors and Their Unique Constituent, Fcγ Subunit. *Pathogens* **9**(2020).
290. Bruhns, P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* **119**, 5640-5649 (2012).

291. Williams, M., Bruhns, P., Saeys, Y., Hammad, H. & Lambrecht, B.N. The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol* **14**, 94-108 (2014).
292. Davies, K.A., Peters, A.M., Beynon, H.L. & Walport, M.J. Immune complex processing in patients with systemic lupus erythematosus. In vivo imaging and clearance studies. *J Clin Invest* **90**, 2075-2083 (1992).
293. Verma, J., Arora, V., Marwaha, V., Kumar, A. & Das, N. Association of leukocyte CR1 gene transcription with the disease severity and renal involvement in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **14**, 273-279 (2005).
294. Gerard, C. & Gerard, N.P. C5A anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor. *Annu Rev Immunol* **12**, 775-808 (1994).
295. Guo, R.F. & Ward, P.A. Role of C5a in inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* **23**, 821-852 (2005).
296. Mayadas, T.N., Tsokos, G.C. & Tsuboi, N. Mechanisms of immune complex-mediated neutrophil recruitment and tissue injury. *Circulation* **120**, 2012-2024 (2009).
297. Nishi, H., *et al.* Neutrophil FcγRIIA promotes IgG-mediated glomerular neutrophil capture via Abl/Src kinases. *J Clin Invest* **127**, 3810-3826 (2017).
298. Celhar, T., Magalhães, R. & Fairhurst, A.M. TLR7 and TLR9 in SLE: when sensing self goes wrong. *Immunol Res* **53**, 58-77 (2012).
299. Klarquist, J., *et al.* STING-mediated DNA sensing promotes antitumor and autoimmune responses to dying cells. *J Immunol* **193**, 6124-6134 (2014).
300. Ablasser, A., *et al.* cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature* **498**, 380-384 (2013).
301. 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 (2016).
302. Grande, J.P. Mechanisms of progression of renal damage in lupus nephritis: pathogenesis of renal scarring. *Lupus* **7**, 604-610 (1998).
303. Biesecker, G., Katz, S. & Koffler, D. Renal localization of the membrane attack complex in systemic lupus erythematosus nephritis. *J Exp Med* **154**, 1779-1794 (1981).
304. Wilson, H.R., *et al.* Glomerular membrane attack complex is not a reliable marker of ongoing C5 activation in lupus nephritis. *Kidney Int* **95**, 655-665 (2019).
305. Davidson, A. Renal Mononuclear Phagocytes in Lupus Nephritis. *ACR Open Rheumatol* **3**, 442-450 (2021).
306. Wang, L. & Law, H.K.W. Immune Complexes Impaired Glomerular Endothelial Cell Functions in Lupus Nephritis. *Int J Mol Sci* **20**(2019).
307. Hägele, H., *et al.* Double-stranded DNA activates glomerular endothelial cells and enhances albumin permeability via a toll-like receptor-independent cytosolic DNA recognition pathway. *Am J Pathol* **175**, 1896-1904 (2009).
308. Nagao, T., *et al.* Up-regulation of adhesion molecule expression in glomerular endothelial cells by anti-myeloperoxidase antibody. *Nephrol Dial Transplant* **22**, 77-87 (2007).
309. Schlöndorff, D. & Banas, B. The mesangial cell revisited: no cell is an island. *J Am Soc Nephrol* **20**, 1179-1187 (2009).
310. Pieterse, E., *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Drive Endothelial-to-Mesenchymal Transition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **37**, 1371-1379 (2017).
311. Xia, H., Bao, W. & Shi, S. Innate Immune Activity in Glomerular Podocytes. *Front Immunol* **8**, 122 (2017).
312. Goldwich, A., *et al.* Podocytes are nonhematopoietic professional antigen-presenting cells. *J Am Soc Nephrol* **24**, 906-916 (2013).
313. Akilesh, S., *et al.* Podocytes use FcRn to clear IgG from the glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 967-972 (2008).
314. Fu, R., *et al.* Podocyte Activation of NLRP3 Inflammasomes Contributes to the Development of Proteinuria in Lupus Nephritis. *Arthritis Rheumatol* **69**, 1636-1646 (2017).

315. Abbate, M., Zoja, C. & Remuzzi, G. How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol* **17**, 2974-2984 (2006).
316. Kurts, C., Panzer, U., Anders, H.J. & Rees, A.J. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nat Rev Immunol* **13**, 738-753 (2013).
317. Tang, S., *et al.* Albumin stimulates interleukin-8 expression in proximal tubular epithelial cells in vitro and in vivo. *J Clin Invest* **111**, 515-527 (2003).
318. Yuan, M., *et al.* The associations of endothelial and podocyte injury in proliferative lupus nephritis: from observational analysis to in vitro study. *Lupus* **28**, 347-358 (2019).
319. Ding, X., Ren, Y. & He, X. IFN-I Mediates Lupus Nephritis From the Beginning to Renal Fibrosis. *Front Immunol* **12**, 676082 (2021).
320. Seret, G., Le Meur, Y., Renaudineau, Y. & Youinou, P. Mesangial cell-specific antibodies are central to the pathogenesis of lupus nephritis. *Clin Dev Immunol* **2012**, 579670 (2012).
321. Wright, R.D., Dimou, P., Northey, S.J. & Beresford, M.W. Mesangial cells are key contributors to the fibrotic damage seen in the lupus nephritis glomerulus. *J Inflamm (Lond)* **16**, 22 (2019).
322. Hong, S., Healy, H. & Kassianos, A.J. The Emerging Role of Renal Tubular Epithelial Cells in the Immunological Pathophysiology of Lupus Nephritis. *Front Immunol* **11**, 578952 (2020).
323. Benigni, A., *et al.* Involvement of renal tubular Toll-like receptor 9 in the development of tubulointerstitial injury in systemic lupus. *Arthritis Rheum* **56**, 1569-1578 (2007).
324. Leonard, M., Ryan, M.P., Watson, A.J., Schramek, H. & Healy, E. Role of MAP kinase pathways in mediating IL-6 production in human primary mesangial and proximal tubular cells. *Kidney Int* **56**, 1366-1377 (1999).
325. Cantaluppi, V., *et al.* Interaction between systemic inflammation and renal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant* **29**, 2004-2011 (2014).
326. Viehmann, S.F., Böhner, A.M.C., Kurts, C. & Brähler, S. The multifaceted role of the renal mononuclear phagocyte system. *Cell Immunol* **330**, 97-104 (2018).
327. Kurts, C., Ginhoux, F. & Panzer, U. Kidney dendritic cells: fundamental biology and functional roles in health and disease. *Nat Rev Nephrol* **16**, 391-407 (2020).
328. George, J.F., Lever, J.M. & Agarwal, A. Mononuclear phagocyte subpopulations in the mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **312**, F640-f646 (2017).
329. Hill, G.S., *et al.* Predictive power of the second renal biopsy in lupus nephritis: significance of macrophages. *Kidney Int* **59**, 304-316 (2001).
330. Tucci, M., *et al.* Glomerular accumulation of plasmacytoid dendritic cells in active lupus nephritis: role of interleukin-18. *Arthritis Rheum* **58**, 251-262 (2008).
331. Fiore, N., *et al.* Immature myeloid and plasmacytoid dendritic cells infiltrate renal tubulointerstitium in patients with lupus nephritis. *Mol Immunol* **45**, 259-265 (2008).
332. Boruchov, A.M., *et al.* Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J Clin Invest* **115**, 2914-2923 (2005).
333. Banchereau, J., Pascual, V. & Palucka, A.K. Autoimmunity through cytokine-induced dendritic cell activation. *Immunity* **20**, 539-550 (2004).
334. Means, T.K., *et al.* Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest* **115**, 407-417 (2005).
335. Båve, U., *et al.* Fc gamma RIIa is expressed on natural IFN-alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) and is required for the IFN-alpha production induced by apoptotic cells combined with lupus IgG. *J Immunol* **171**, 3296-3302 (2003).
336. Krieg, A.M. & Vollmer, J. Toll-like receptors 7, 8, and 9: linking innate immunity to autoimmunity. *Immunol Rev* **220**, 251-269 (2007).
337. Lande, R., *et al.* Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* **3**, 73ra19 (2011).
338. Olmes, G., *et al.* CD163+ M2c-like macrophages predominate in renal biopsies from patients with lupus nephritis. *Arthritis Res Ther* **18**, 90 (2016).

339. Maria, N.I. & Davidson, A. Renal Macrophages and Dendritic Cells in SLE Nephritis. *Curr Rheumatol Rep* **19**, 81 (2017).
340. Stamatiades, E.G., *et al.* Immune Monitoring of Trans-endothelial Transport by Kidney-Resident Macrophages. *Cell* **166**, 991-1003 (2016).
341. 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 (2014).
342. Nishi, H. & Mayadas, T.N. Neutrophils in lupus nephritis. *Curr Opin Rheumatol* **31**, 193-200 (2019).
343. Villanueva, E., *et al.* Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **187**, 538-552 (2011).
344. Garcia-Romo, G.S., *et al.* Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* **3**, 73ra20 (2011).
345. Bonegio, R.G., *et al.* Lupus-Associated Immune Complexes Activate Human Neutrophils in an FcγRIIA-Dependent but TLR-Independent Response. *J Immunol* **202**, 675-683 (2019).
346. Lood, C., Arve, S., Ledbetter, J. & Elkon, K.B. TLR7/8 activation in neutrophils impairs immune complex phagocytosis through shedding of FcγRIIA. *J Exp Med* **214**, 2103-2119 (2017).
347. Scheffschick, A., Fuchs, S., Malmström, V., Gunnarsson, I. & Brauner, H. Kidney infiltrating NK cells and NK-like T-cells in lupus nephritis: presence, localization, and the effect of immunosuppressive treatment. *Clin Exp Immunol* **207**, 199-204 (2022).
348. Foster, M.H. T cells and B cells in lupus nephritis. *Semin Nephrol* **27**, 47-58 (2007).
349. Couzi, L., *et al.* Predominance of CD8+ T lymphocytes among periglomerular infiltrating cells and link to the prognosis of class III and class IV lupus nephritis. *Arthritis Rheum* **56**, 2362-2370 (2007).
350. Xing, Q., Wang, B., Su, H., Cui, J. & Li, J. Elevated Th17 cells are accompanied by FoxP3+ Treg cells decrease in patients with lupus nephritis. *Rheumatol Int* **32**, 949-958 (2012).
351. Nalbandian, A., Crispín, J.C. & Tsokos, G.C. Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. *Clin Exp Immunol* **157**, 209-215 (2009).
352. Kitching, A.R. & Holdsworth, S.R. The emergence of TH17 cells as effectors of renal injury. *J Am Soc Nephrol* **22**, 235-238 (2011).
353. Apostolidis, S.A., Crispin, J.C. & Tsokos, G.C. IL-17-producing T cells in lupus nephritis. *Lupus* **20**, 120-124 (2011).
354. Major, A.S., Singh, R.R., Joyce, S. & Van Kaer, L. The role of invariant natural killer T cells in lupus and atherogenesis. *Immunol Res* **34**, 49-66 (2006).
355. Godó, M., Sessler, T. & Hamar, P. Role of invariant natural killer T (iNKT) cells in systemic lupus erythematosus. *Curr Med Chem* **15**, 1778-1787 (2008).
356. Morshed, S.R., *et al.* Tissue-specific expansion of NKT and CD5+B cells at the onset of autoimmune disease in (NZBxNZW)F1 mice. *Eur J Immunol* **32**, 2551-2561 (2002).
357. An, J.N., *et al.* NK1.1(-) natural killer T cells upregulate interleukin-17 expression in experimental lupus nephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* **320**, F772-f788 (2021).
358. Viglianti, G.A., *et al.* Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity* **19**, 837-847 (2003).
359. Capolunghi, F., *et al.* Pharmacological inhibition of TLR9 activation blocks autoantibody production in human B cells from SLE patients. *Rheumatology (Oxford)* **49**, 2281-2289 (2010).
360. Anolik, J.H. B cell biology and dysfunction in SLE. *Bull NYU Hosp Jt Dis* **65**, 182-186 (2007).
361. Chang, A., *et al.* In situ B cell-mediated immune responses and tubulointerstitial inflammation in human lupus nephritis. *J Immunol* **186**, 1849-1860 (2011).
362. LeBleu, V.S., *et al.* Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med* **19**, 1047-1053 (2013).
363. Bertias, G.K., *et al.* Joint European League Against Rheumatism and European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (EULAR/ERA-EDTA) recommendations for the management of adult and paediatric lupus nephritis. *Ann Rheum Dis* **71**, 1771-1782 (2012).
364. Cojocaru, M., Cojocaru, I.M., Silosi, I. & Vrabie, C.D. Manifestations of systemic lupus erythematosus. *Maedica (Bucur)* **6**, 330-336 (2011).
365. Grubb, A. Cystatin C is Indispensable for Evaluation of Kidney Disease. *Ejifcc* **28**, 268-276 (2017).

366. Cohen, A.H. Masson's trichrome stain in the evaluation of renal biopsies. An appraisal. *Am J Clin Pathol* **65**, 631-643 (1976).
367. Farris, A.B., *et al.* Morphometric and visual evaluation of fibrosis in renal biopsies. *J Am Soc Nephrol* **22**, 176-186 (2011).
368. Nossent, H., Berden, J. & Swaak, T. Renal immunofluorescence and the prediction of renal outcome in patients with proliferative lupus nephritis. *Lupus* **9**, 504-510 (2000).
369. Pagni, F., *et al.* Tubulointerstitial lesions in lupus nephritis: International multicentre study in a large cohort of patients with repeat biopsy. *Nephrology (Carlton)* **21**, 35-45 (2016).
370. Leatherwood, C., *et al.* Clinical characteristics and renal prognosis associated with interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA) and vascular injury in lupus nephritis biopsies. *Semin Arthritis Rheum* **49**, 396-404 (2019).
371. Wu, L.H., *et al.* Inclusion of renal vascular lesions in the 2003 ISN/RPS system for classifying lupus nephritis improves renal outcome predictions. *Kidney Int* **83**, 715-723 (2013).
372. Dhingra, S., Qureshi, R., Abdellatif, A., Gaber, L.W. & Truong, L.D. Tubulointerstitial nephritis in systemic lupus erythematosus: innocent bystander or ominous presage. *Histol Histopathol* **29**, 553-565 (2014).
373. Moss, K.E., Ioannou, Y., Sultan, S.M., Haq, I. & Isenberg, D.A. Outcome of a cohort of 300 patients with systemic lupus erythematosus attending a dedicated clinic for over two decades. *Ann Rheum Dis* **61**, 409-413 (2002).
374. Corwin, H.L., Schwartz, M.M. & Lewis, E.J. The importance of sample size in the interpretation of the renal biopsy. *Am J Nephrol* **8**, 85-89 (1988).
375. Nankivell, B.J., Renthawa, J., Shingde, M. & Khan, A. The Importance of Kidney Medullary Tissue for the Accurate Diagnosis of BK Virus Allograft Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* **15**, 1015-1023 (2020).
376. Schwartz, N., Goilav, B. & Putterman, C. The pathogenesis, diagnosis and treatment of lupus nephritis. *Curr Opin Rheumatol* **26**, 502-509 (2014).
377. Moroni, G., *et al.* Clinical and prognostic value of serial renal biopsies in lupus nephritis. *Am J Kidney Dis* **34**, 530-539 (1999).
378. Aragón, C.C., *et al.* Urinary biomarkers in lupus nephritis. *J Transl Autoimmun* **3**, 100042 (2020).
379. Dooley, M.A., *et al.* Mycophenolate versus azathioprine as maintenance therapy for lupus nephritis. *N Engl J Med* **365**, 1886-1895 (2011).
380. Clark, W.F. & Moist, L.M. Management of chronic renal insufficiency in lupus nephritis: role of proteinuria, hypertension and dyslipidemia in the progression of renal disease. *Lupus* **7**, 649-653 (1998).
381. Yap, D.Y., Tang, C.S., Ma, M.K., Lam, M.F. & Chan, T.M. Survival analysis and causes of mortality in patients with lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* **27**, 3248-3254 (2012).
382. Mok, C.C. Understanding lupus nephritis: diagnosis, management, and treatment options. *Int J Womens Health* **4**, 213-222 (2012).
383. Croca, S.C., Rodrigues, T. & Isenberg, D.A. Assessment of a lupus nephritis cohort over a 30-year period. *Rheumatology (Oxford)* **50**, 1424-1430 (2011).
384. Mok, C.C., Wong, R.W. & Lai, K.N. Treatment of severe proliferative lupus nephritis: the current state. *Ann Rheum Dis* **62**, 799-804 (2003).
385. Jorge, A., *et al.* All-Cause and Cause-Specific Mortality Trends of End-Stage Renal Disease Due to Lupus Nephritis From 1995 to 2014. *Arthritis Rheumatol* **71**, 403-410 (2019).
386. George, J.N. Platelets. *Lancet* **355**, 1531-1539 (2000).
387. Thon, J.N., *et al.* T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling. *J Cell Biol* **198**, 561-574 (2012).
388. Ali, R.A., Wuescher, L.M. & Worth, R.G. Platelets: essential components of the immune system. *Curr Trends Immunol* **16**, 65-78 (2015).
389. Quach, M.E., Chen, W. & Li, R. Mechanisms of platelet clearance and translation to improve platelet storage. *Blood* **131**, 1512-1521 (2018).

390. Semple, J.W., Italiano, J.E., Jr. & Freedman, J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* **11**, 264-274 (2011).
391. Morrell, C.N., Aggrey, A.A., Chapman, L.M. & Modjeski, K.L. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood* **123**, 2759-2767 (2014).
392. Duffau, P., *et al.* Platelet CD154 potentiates interferon-alpha secretion by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* **2**, 47ra63 (2010).
393. Zoja, C. & Remuzzi, G. Role of platelets in progressive glomerular diseases. *Pediatr Nephrol* **9**, 495-502 (1995).
394. Boilard, E., Blanco, P. & Nigrovic, P.A. Platelets: active players in the pathogenesis of arthritis and SLE. *Nat Rev Rheumatol* **8**, 534-542 (2012).
395. Melki, I., *et al.* FcγRIIA expression accelerates nephritis and increases platelet activation in systemic lupus erythematosus. *Blood* **136**, 2933-2945 (2020).
396. Melki, I., *et al.* Platelets release mitochondrial antigens in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* **13**(2021).
397. Linge, P., Fortin, P.R., Lood, C., Bengtsson, A.A. & Boilard, E. The non-haemostatic role of platelets in systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol* **14**, 195-213 (2018).
398. Cunin, P. & Nigrovic, P.A. Megakaryocytes as immune cells. *J Leukoc Biol* **105**, 1111-1121 (2019).
399. Richardson, J.L., Shivdasani, R.A., Boers, C., Hartwig, J.H. & Italiano, J.E., Jr. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood* **106**, 4066-4075 (2005).
400. Kaushansky, K. Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood* **86**, 419-431 (1995).
401. Lefrançois, E., *et al.* The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature* **544**, 105-109 (2017).
402. Layendecker, S.J. & McDonald, T.P. The relative roles of the spleen and bone marrow in platelet production in mice. *Exp Hematol* **10**, 332-342 (1982).
403. Valet, C., *et al.* Sepsis promotes splenic production of a protective platelet pool with high CD40 ligand expression. *J Clin Invest* **132**(2022).
404. Davizon-Castillo, P., Rowley, J.W. & Rondina, M.T. Megakaryocyte and Platelet Transcriptomics for Discoveries in Human Health and Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **40**, 1432-1440 (2020).
405. Lindemann, S. & Gawaz, M. The active platelet: translation and protein synthesis in an anucleate cell. *Semin Thromb Hemost* **33**, 144-150 (2007).
406. Sharda, A. & Flaumenhaft, R. The life cycle of platelet granules. *F1000Res* **7**, 236 (2018).
407. McNicol, A. & Israels, S.J. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb Res* **95**, 1-18 (1999).
408. Heijnen, H. & van der Sluijs, P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *J Thromb Haemost* **13**, 2141-2151 (2015).
409. Schubert, S., Weyrich, A.S. & Rowley, J.W. A tour through the transcriptional landscape of platelets. *Blood* **124**, 493-502 (2014).
410. Lannan, K.L., *et al.* Breaking the mold: transcription factors in the anucleate platelet and platelet-derived microparticles. *Front Immunol* **6**, 48 (2015).
411. Melchinger, H., Jain, K., Tyagi, T. & Hwa, J. Role of Platelet Mitochondria: Life in a Nucleus-Free Zone. *Front Cardiovasc Med* **6**, 153 (2019).
412. Marcoux, G., *et al.* Platelet EVs contain an active proteasome involved in protein processing for antigen presentation via MHC-I molecules. *Blood* **138**, 2607-2620 (2021).
413. Clemetson, K.J. Platelets and primary haemostasis. *Thromb Res* **129**, 220-224 (2012).
414. Furie, B. & Furie, B.C. The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-selectin and the P-selectin ligand, PSGL-1. *Thromb Haemost* **74**, 224-227 (1995).
415. Frenette, P.S., *et al.* P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med* **191**, 1413-1422 (2000).

416. Ma, Y.Q., Qin, J. & Plow, E.F. Platelet integrin  $\alpha(\text{IIb})\beta(3)$ : activation mechanisms. *J Thromb Haemost* **5**, 1345-1352 (2007).
417. Bennett, J.S. Structure and function of the platelet integrin  $\alpha\text{IIb}\beta(3)$ . *J Clin Invest* **115**, 3363-3369 (2005).
418. Massberg, S., *et al.* Platelets secrete stromal cell-derived factor 1 $\alpha$  and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med* **203**, 1221-1233 (2006).
419. Mazzucco, L., Borzini, P. & Gope, R. Platelet-derived factors involved in tissue repair-from signal to function. *Transfus Med Rev* **24**, 218-234 (2010).
420. Joseph, J.E., Harrison, P., Mackie, I.J., Isenberg, D.A. & Machin, S.J. Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Br J Haematol* **115**, 451-459 (2001).
421. Sreeramkumar, V., *et al.* Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science (New York, N.Y.)* **346**, 1234-1238 (2014).
422. Constantinescu-Bercu, A., *et al.* Activated  $\alpha(\text{IIb})\beta(3)$  on platelets mediates flow-dependent NETosis via SLC44A2. *eLife* **9**(2020).
423. Weber, C. & Springer, T.A. Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to  $\alpha\text{IIb}\beta(3)$  and stimulated by platelet-activating factor. *The Journal of clinical investigation* **100**, 2085-2093 (1997).
424. Ehlers, R., *et al.* Targeting platelet-leukocyte interactions: identification of the integrin Mac-1 binding site for the platelet counter receptor glycoprotein I $\alpha$ . *J Exp Med* **198**, 1077-1088 (2003).
425. Jin, R., *et al.* Soluble CD40 ligand stimulates CD40-dependent activation of the  $\beta(2)$  integrin Mac-1 and protein kinase C  $\zeta$  (PKC $\zeta$ ) in neutrophils: implications for neutrophil-platelet interactions and neutrophil oxidative burst. *PLoS One* **8**, e64631 (2013).
426. Petersen, F., Bock, L., Flad, H.D. & Brandt, E. Platelet factor 4-induced neutrophil-endothelial cell interaction: involvement of mechanisms and functional consequences different from those elicited by interleukin-8. *Blood* **94**, 4020-4028 (1999).
427. Boulaftali, Y., Hess, P.R., Kahn, M.L. & Bergmeier, W. Platelet immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) signaling and vascular integrity. *Circ Res* **114**, 1174-1184 (2014).
428. Lee, R.H. & Bergmeier, W. Platelet immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) and hemITAM signaling and vascular integrity in inflammation and development. *J Thromb Haemost* **14**, 645-654 (2016).
429. Gros, A., *et al.* Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice. *Blood* **126**, 1017-1026 (2015).
430. Cloutier, N., *et al.* Platelets can enhance vascular permeability. *Blood* **120**, 1334-1343 (2012).
431. Duerschmied, D., *et al.* Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood* **121**, 1008-1015 (2013).
432. Kapur, R., Zufferey, A., Boilard, E. & Semple, J.W. Nouvelle cuisine: platelets served with inflammation. *J Immunol* **194**, 5579-5587 (2015).
433. Seyoum, M., Enawgaw, B. & Melku, M. Human blood platelets and viruses: defense mechanism and role in the removal of viral pathogens. *Thromb J* **16**, 16 (2018).
434. Clark, S.R., *et al.* Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* **13**, 463-469 (2007).
435. Aloui, C., *et al.* The signaling role of CD40 ligand in platelet biology and in platelet component transfusion. *Int J Mol Sci* **15**, 22342-22364 (2014).
436. Chakrabarti, S., Varghese, S., Vitseva, O., Tanriverdi, K. & Freedman, J.E. CD40 ligand influences platelet release of reactive oxygen intermediates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 2428-2434 (2005).
437. Phillipson, M. & Kubes, P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med* **17**, 1381-1390 (2011).
438. Funk, C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**, 1871-1875 (2001).

439. Flaumenhaft, R., Mairuhu, A.T. & Italiano, J.E. Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles. *Semin Thromb Hemost* **36**, 881-887 (2010).
440. Ducheze, A.C., *et al.* Platelet microparticles are internalized in neutrophils via the concerted activity of 12-lipoxygenase and secreted phospholipase A2-IIA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E3564-3573 (2015).
441. French, S.L., *et al.* Platelet-derived extracellular vesicles infiltrate and modify the bone marrow during inflammation. *Blood Adv* **4**, 3011-3023 (2020).
442. Sprague, D.L., *et al.* Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles. *Blood* **111**, 5028-5036 (2008).
443. Johnson, R.J., *et al.* Platelets mediate neutrophil-dependent immune complex nephritis in the rat. *J Clin Invest* **82**, 1225-1235 (1988).
444. Yuan, Y., *et al.* Excessive activation of the TLR9/TGF- $\beta$ 1/PDGF-B pathway in the peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* **19**, 70 (2017).
445. Devi, S., *et al.* Platelet recruitment to the inflamed glomerulus occurs via an  $\alpha$ IIb $\beta$ 3/GPVI-dependent pathway. *Am J Pathol* **177**, 1131-1142 (2010).
446. Nagahama, M., *et al.* Platelet activation markers and soluble adhesion molecules in patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* **33**, 85-94 (2001).
447. Ferro, D., *et al.* Determinants of enhanced thromboxane biosynthesis in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **42**, 2689-2697 (1999).
448. Schlondorff, D. & Neuwirth, R. Platelet-activating factor and the kidney. *Am J Physiol* **251**, F1-11 (1986).
449. Jung, S.M. & Moroi, M. Platelet glycoprotein VI. *Adv Exp Med Biol* **640**, 53-63 (2008).
450. Zeller, J., Weissbarth, E., Baruth, B., Mielke, H. & Deicher, H. Serotonin content of platelets in inflammatory rheumatic diseases. Correlation with clinical activity. *Arthritis Rheum* **26**, 532-540 (1983).
451. 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 (2018).
452. Soga, F., Kato, N., Inoue, T. & Kishimoto, S. Serotonin activates human monocytes and prevents apoptosis. *J Invest Dermatol* **127**, 1947-1955 (2007).
453. León-Ponte, M., Ahern, G.P. & O'Connell, P.J. Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT7 receptor. *Blood* **109**, 3139-3146 (2007).
454. Goules, A., *et al.* Elevated levels of soluble CD40 ligand (sCD40L) in serum of patients with systemic autoimmune diseases. *J Autoimmun* **26**, 165-171 (2006).
455. Yellin, M.J., *et al.* Immunohistologic analysis of renal CD40 and CD40L expression in lupus nephritis and other glomerulonephritides. *Arthritis Rheum* **40**, 124-134 (1997).
456. Delmas, Y., *et al.* Activation of mesangial cells by platelets in systemic lupus erythematosus via a CD154-dependent induction of CD40. *Kidney Int* **68**, 2068-2078 (2005).
457. Pereira, J., *et al.* Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state. *Thromb Haemost* **95**, 94-99 (2006).
458. Nielsen, C.T., *et al.* Increased IgG on cell-derived plasma microparticles in systemic lupus erythematosus is associated with autoantibodies and complement activation. *Arthritis Rheum* **64**, 1227-1236 (2012).
459. Fortin, P.R., *et al.* Distinct Subtypes of Microparticle-containing Immune Complexes Are Associated with Disease Activity, Damage, and Carotid Intima-media Thickness in Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol* **43**, 2019-2025 (2016).
460. Nielsen, C.T., Rasmussen, N.S., Heegaard, N.H. & Jacobsen, S. "Kill" the messenger: Targeting of cell-derived microparticles in lupus nephritis. *Autoimmun Rev* **15**, 719-725 (2016).
461. McGaha, T.L. & Madaio, M.P. Lupus Nephritis: Animal Modeling of a Complex Disease Syndrome Pathology. *Drug Discov Today Dis Models* **11**, 13-18 (2014).

462. Dubois, E.L., Horowitz, R.E., Demopoulos, H.B. & Teplitz, R. NZB/NZW mice as a model of systemic lupus erythematosus. *Jama* **195**, 285-289 (1966).
463. Helyer, B.J. & Howie, J.B. Renal disease associated with positive lupus erythematosus tests in a cross-bred strain of mice. *Nature* **197**, 197 (1963).
464. Choi, J., Kim, S.T. & Craft, J. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus-an update. *Current opinion in immunology* **24**, 651-657 (2012).
465. Khandpur, R., *et al.* NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med* **5**, 178ra140 (2013).
466. Fries, J.W., Sandstrom, D.J., Meyer, T.W. & Rennke, H.G. Glomerular hypertrophy and epithelial cell injury modulate progressive glomerulosclerosis in the rat. *Lab Invest* **60**, 205-218 (1989).
467. May, F., *et al.* CLEC-2 is an essential platelet-activating receptor in hemostasis and thrombosis. *Blood* **114**, 3464-3472 (2009).
468. Ho-Tin-Noé, B., Demers, M. & Wagner, D.D. How platelets safeguard vascular integrity. *J Thromb Haemost* **9 Suppl 1**, 56-65 (2011).
469. Gupta, S., *et al.* Hemostasis vs. homeostasis: Platelets are essential for preserving vascular barrier function in the absence of injury or inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 24316-24325 (2020).
470. Lambert, M.P. Platelets in liver and renal disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2016**, 251-255 (2016).
471. Breiteneder-Geleff, S., *et al.* Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol* **151**, 1141-1152 (1997).
472. Huang, A., Guo, G., Yu, Y. & Yao, L. The roles of collagen in chronic kidney disease and vascular calcification. *J Mol Med (Berl)* **99**, 75-92 (2021).
473. Stone, A.P., Nascimento, T.F. & Barrachina, M.N. The bone marrow niche from the inside out: how megakaryocytes are shaped by and shape hematopoiesis. *Blood* **139**, 483-491 (2022).
474. Zhi, H., *et al.* Cooperative integrin/ITAM signaling in platelets enhances thrombus formation in vitro and in vivo. *Blood* **121**, 1858-1867 (2013).
475. Pitchford, S.C., *et al.* Allergen induces the migration of platelets to lung tissue in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **177**, 604-612 (2008).
476. Shah, S.A., *et al.* Platelets Independently Recruit into Asthmatic Lungs and Models of Allergic Inflammation via CCR3. *Am J Respir Cell Mol Biol* **64**, 557-568 (2021).
477. Clemetson, K.J., *et al.* Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4, and CXCR4 chemokine receptors on human platelets. *Blood* **96**, 4046-4054 (2000).
478. Lee, P.Y., Wang, J.X., Parisini, E., Dascher, C.C. & Nigrovic, P.A. Ly6 family proteins in neutrophil biology. *J Leukoc Biol* **94**, 585-594 (2013).
479. Villalta, D., *et al.* Anti-dsDNA antibody isotypes in systemic lupus erythematosus: IgA in addition to IgG anti-dsDNA help to identify glomerulonephritis and active disease. *PLoS One* **8**, e71458 (2013).
480. Anania, J.C., Chenoweth, A.M., Wines, B.D. & Hogarth, P.M. The Human FcγRII (CD32) Family of Leukocyte FcR in Health and Disease. *Front Immunol* **10**, 464 (2019).
481. Gardiner, E.E., *et al.* Dual ITAM-mediated proteolytic pathways for irreversible inactivation of platelet receptors: de-ITAM-izing FcγRIIIa. *Blood* **111**, 165-174 (2008).
482. Jenkins, S.J., *et al.* Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* **332**, 1284-1288 (2011).
483. Rönnefarth, V.M., *et al.* TLR2/TLR4-independent neutrophil activation and recruitment upon endocytosis of nucleosomes reveals a new pathway of innate immunity in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **177**, 7740-7749 (2006).
484. Molad, Y., Buyon, J., Anderson, D.C., Abramson, S.B. & Cronstein, B.N. Intravascular neutrophil activation in systemic lupus erythematosus (SLE): dissociation between increased expression of CD11b/CD18 and diminished expression of L-selectin on neutrophils from patients with active SLE. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **71**, 281-286 (1994).
485. Guyre, P.M., Morganelli, P.M. & Miller, R. Recombinant immune interferon increases immunoglobulin G Fc receptors on cultured human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* **72**, 393-397 (1983).

486. Park, J.G., *et al.* Immune cell composition in normal human kidneys. *Sci Rep* **10**, 15678 (2020).
487. Soos, T.J., *et al.* CX3CR1+ interstitial dendritic cells form a contiguous network throughout the entire kidney. *Kidney Int* **70**, 591-596 (2006).
488. Jurga, A.M., Paleczna, M. & Kuter, K.Z. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci* **14**, 198 (2020).
489. Masum, M.A., *et al.* Overexpression of toll-like receptor 9 correlates with podocyte injury in a murine model of autoimmune membranoproliferative glomerulonephritis. *Autoimmunity* **51**, 386-398 (2018).
490. Donovan, K.M., *et al.* Allograft Inflammatory Factor 1 as an Immunohistochemical Marker for Macrophages in Multiple Tissues and Laboratory Animal Species. *Comp Med* **68**, 341-348 (2018).
491. Li, Y., *et al.* Upregulation of allograft inflammatory factor-1 expression and secretion by macrophages stimulated with aldosterone promotes renal fibroblasts to a profibrotic phenotype. *Int J Mol Med* **42**, 861-872 (2018).
492. Piotrowska, K., *et al.* Over-Expression of Allograft Inflammatory Factor-1 (AIF-1) in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Biomolecules* **10**(2020).
493. Dos Anjos Cassado, A. F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen. *Results Probl Cell Differ* **62**, 161-179 (2017).
494. Kim, M.G., *et al.* Depletion of kidney CD11c+ F4/80+ cells impairs the recovery process in ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* **25**, 2908-2921 (2010).
495. Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J. & Mortha, A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* **31**, 563-604 (2013).
496. Bethunaickan, R., *et al.* A unique hybrid renal mononuclear phagocyte activation phenotype in murine systemic lupus erythematosus nephritis. *J Immunol* **186**, 4994-5003 (2011).
497. Gottschalk, C. & Kurts, C. The Debate about Dendritic Cells and Macrophages in the Kidney. *Front Immunol* **6**, 435 (2015).
498. Liu, G., Ma, H., Jiang, L. & Zhao, Y. Allograft inflammatory factor-1 and its immune regulation. *Autoimmunity* **40**, 95-102 (2007).
499. Liu, F., *et al.* Distinct fate, dynamics and niches of renal macrophages of bone marrow or embryonic origins. *Nat Commun* **11**, 2280 (2020).
500. Ginhoux, F. & Guilliams, M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* **44**, 439-449 (2016).