



**HAL**  
open science

# Unfolded protein response et auto-immunité: focus sur GADD34 et le lupus érythémateux systémique

Giovanna Clavarino

► **To cite this version:**

Giovanna Clavarino. Unfolded protein response et auto-immunité: focus sur GADD34 et le lupus érythémateux systémique. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03690022

**HAL Id: dumas-03690022**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03690022v1>**

Submitted on 7 Jun 2022

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

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

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine Pharmacie de Grenoble :

[bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr)

Année : 2020

**UNFOLDED PROTEIN RESPONSE ET AUTO-IMMUNITÉ :  
FOCUS SUR GADD34 ET LE LUPUS ÉRYTHÉMATEUX SYSTÉMIQUE**

**THÈSE**  
**PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
**DIPLÔME D'ÉTAT**

Giovanna CLAVARINO

*[Données à caractère personnel]*

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le : 23/11/2020

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

Madame le Docteur Raphaële GERMI

Membres :

Monsieur le Professeur Jean-Yves CESBRON (Directeur de thèse)

Monsieur le Professeur Christophe RIBUOT

Madame le Professeur Laurence BOUILLET

Monsieur le Docteur Pierre CAVAILLÈS

*L'UFR de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Michel SEVE**

Vice-doyen et Directrice des Etudes :

**Mme Christine DEMEILLIERS**

**Année 2019 - 2020**

**ENSEIGNANTS – CHERCHEURS**

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCF	ALDEBERT	DELPHINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx
PU-PH	ALLENET	BENOIT	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, ThEMAS
PU	BAKRI	ABDELAZIZ	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MAST	BARDET	JEAN-DIDIER	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, ThEMAS
MCF	BATANDIER	CECILE	LBFA – INSERM U1055
PU-PH	BEDOUC	PIERRICK	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, ThEMAS
MCF	BELAIDI-CORSAT	ELISE	HP2, Inserm U1042
MAST	BELLET	BEATRICE	-
MCF	BOUCHERLE	BENJAMIN	DPM - UMR 5063 CNRS
PU	BOUMENDJEL	AHCENE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	BOURGOIN	SANDRINE	IAB – CRI INSERM U823
MCF	BRETON	JEAN	LCIB – UMR E3 CEA
MCF	BRIANCON-MARJOLLET	ANNE	HP2 – INSERM U1042
PU	BURMEISTER	WIM	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
MCU-PH	BUSSER	BENOIT	Institute for Advanced Biosciences, UGA / Inserm U 1209 / CNRS 5309
Professeur Emerite	CALOP	JEAN	
MCF	CAVAILLES	PIERRE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MCU-PH	CHANOINE	SEBASTIEN	CR UGA - INSERM U1209 - CNRS 5309
MCF	CHOISNARD	LUC	DPM – UMR 5063 CNRS
MCU-PH	CHOVELON	BENOIT	DPM – UMR 5063 CNRS
PU-PH	CORNET	MURIEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx
Professeur Emérite	DANEL	VINCENT	-
PU	DECOUT	JEAN-LUC	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF Emérite	DELETRAZ-DELPORTE	MARTINE	LPSS – EAM 4129 LYON
MCF	DEMEILLIERS	CHRISTINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
PU-PH	DROUET	CHRISTIAN	GREPI EA7408
PU	DROUET	EMMANUEL	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale
MCF	DURMORT	CLAIRE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
PU-PH	FAURE	PATRICE	HP2 – INSERM U1042

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCF	FAURE-JOYEUX	MARIE	HP2 – INSERM U1042
PRCE	FITE	ANDREE	-
MCU-PH	GARNAUD	CECILE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX
PRAG	GAUCHARD	PIERRE-ALEXIS	-
MCU-PH	GERMI	RAPHAELE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale
MCF	GEZE	ANNABELLE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF Emerite	GILLY	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	GODIN-RIBUOT	DIANE	HP2 – INSERM U1042
Professeure Emérite	GRILLOT	RENEE	-
MCF Emérite	GROSSET	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	GUIEU	VALERIE	DPM – UMR 5063 CNRS
AHU	HENNEBIQUE	AURELIE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX
MCF	HININGER-FAVIER	ISABELLE	LBFA – INSERM U1055
MCF	KHALEF	NAWEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MCF	KOTZKI	SYLVAIN	HP2 – UMR S1042
MCF	KRIVOBOK	SERGE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	LENORMAND	JEAN-LUC	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX
PU	MARTIN	DONALD	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
PRCE	MATTHYS	LAURENCE	-
AHU	MAZET	ROSELINE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	MELO DI LIMA	CHRISTELLE	LECA – UMR CNRS 5553
AHU	MINOVES	MELANIE	HP2 – INSERM U1042
PU	MOINARD	CHRISTOPHE	LBFA - INSERM U1055
PU-PH	MOSSUZ	PASCAL	IAB – INSERM U1209
MCF	MOUHAMADOU	BELLO	LECA – UMR 5553 CNRS
MCF	NICOLLE	EDWIGE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	OUKACINE	FARID	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	PERES	BASILE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	PEUCHMAUR	MARINE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	PEYRIN	ERIC	DPM – UMR 5063 CNRS
AHU	PLUCHART	HELENE	TIMC-IMAG – UMR 5525 CNRS, TheMAS
MCF	RACHIDI	WALID	LCIB – UMR E3 CEA
MCF	RAVELET	CORINNE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	RIBUOT	CHRISTOPHE	HP2 – INSERM U1042
PAST	RIEU	ISABELLE	-
Professeure Emérite	ROUSSEL	ANNE-MARIE	
PU-PH	SEVE	MICHEL	LBFA – INSERM U1055
MCF	SOUARD	FLORENCE	DPM – UMR 5063 CNRS

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCF	SPANO	MONIQUE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
MCF	TARBOURIECH	NICOLAS	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
MCF	VANHAVERBEKE	CECILE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	WOUESSIDJEW	DENIS	DPM – UMR 5063 CNRS

AHU : Assistant Hospitalo-Universitaire  
 ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches  
 BCI : Biologie du Cancer et de l'Infection  
 CHU : Centre Hospitalier Universitaire  
 CIB : Centre d'Innovation en Biologie  
 CRI : Centre de Recherche INSERM  
 CNRS : Centre National de Recherche Scientifique  
 DCE : Doctorants Contractuels Enseignement  
 DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire  
 HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire  
 IAB : Institute for Advanced Biosciences  
 IBS : Institut de Biologie Structurale  
 LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogénèse des Microorganismes  
 LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée  
 LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux  
 LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie  
 LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine  
 LPSS : Laboratoire Parcours Santé Systémique  
 LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques  
 MAST : Maître de Conférences Associé à Temps Partiel  
 MCF : Maître de Conférences des Universités  
 MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers  
 PAST : Professeur Associé à Temps Partiel  
 PRAG : Professeur Agrégé  
 PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement

## Remerciements

**Au Président du jury, Monsieur le Docteur Raphaële Germi,**

Je vous remercie d'avoir accepté d'être le Président du jury de ma thèse et de votre soutien tout au long de ce parcours.

**Au Directeur de Thèse, Monsieur le Professeur Jean-Yves Cesbron,**

Je vous remercie de m'avoir donné l'opportunité de pouvoir réaliser mon souhait de faire mes études en Pharmacie ; entre le travail hospitalier et universitaire et la vie de famille cela n'a pas été toujours simple, mais j'ai été toujours soutenue.

**À Monsieur le Professeur Christophe Ribuoit,**

Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail et de participer au jury de ma thèse.

**À Madame le Professeur Laurence Bouillet,**

Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail et de participer au jury de ma thèse. Merci également pour toutes ces années de collaboration.

**À Monsieur le Docteur Pierre Cavallès,**

Je te remercie d'avoir accepté de juger mon travail et de participer au jury de ma thèse. Merci également pour tous ces échanges dans le cadre de la recherche fondamentale.

À mes collègues biologistes Dr. Chantal Dumestre-Pérard, Dr. Federica Defendi, Dr. Marie-Christine Jacob, Dr. Martine Pernollet et Dr. Tatiana Raskovalova, à toutes les techniciennes du laboratoire et à Amandine Lavaitte, je vous remercie pour votre sympathie, votre soutien, votre sourire au quotidien : c'est un vrai plaisir de travailler à vos côtés tous les jours.

Au Dr. Françoise Sarrot-Reynauld et aux autres cliniciens du Service de Médecine Interne du CHUGA, à nos collaborateurs marseillais et des autres centres associés de l'étude GADD34\_LES, je vous remercie pour votre précieuse collaboration sur ce projet.

À Pierre Audoin, je te remercie pour ton implication essentielle dans ce projet.

Merci également aux personnes du CIC et de la DRCI qui m'aident dans la coordination de l'étude.

À ma famille, ma maman Barbara, mon papa Andrea, ma sœur Lodovica, mon frère Giorgio, mes grand-parents Nonna Luisa, Nonna Maria et Nonno Giorgio, qui sont toujours proches malgré la distance et qui suivent avec enthousiasme chaque étape de ma vie étudiante et professionnelle.

À Claas et Luca.

## Sommaire

Liste des Figures.....	8
Liste des Tableaux.....	9
Abréviations.....	10
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>12</b>
<b>1. RAPPEL HISTORIQUE ET BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>14</b>
1.1 L'Unfolded Protein Response.....	14
1.1.1 Les trois voies de signalisation de l'UPR.....	14
1.1.2 UPR, immunité et pathologies.....	17
1.2 GADD34 : une protéine clé pour la régulation de l'UPR.....	18
1.2.1 GADD34 et immunité innée.....	18
1.2.2. GADD34 et auto-immunité.....	20
1.3 Les inhibiteurs de GADD34.....	22
1.3.1 Du salubrinal au guanabenz.....	22
1.3.2 Du guanabenz à sephin1.....	25
1.3.3 GADD34 : une cible thérapeutique potentielle pour des pathologies auto- immunes ?.....	27
<b>2. PHRC « GADD34_LES » : DE LA RECHERCHE FONDAMENTALE A LA RECHERCHE CLINIQUE.....</b>	<b>29</b>
2.1 Physiopathologie du lupus érythémateux systémique.....	29
2.2 Aspects réglementaires.....	33
2.3 Objectifs de l'étude.....	34
2.4 Caractéristiques des sujets.....	35
2.5 Déroulement de l'étude.....	36
2.6 Etude ancillaire du PHRC « GADD34-LES ».....	37



2.6.1 Matériel et méthodes.....	37
2.6.2 Résultats.....	41
<b>3. DISCUSSION .....</b>	<b>45</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>49</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>50</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>56</b>

## Liste des Figures

**Figure 1.** Les trois voies de l'Unfolded Protein Response, initiées par les trois senseurs moléculaires IRE1, PERK et ATF6 (d'après (1))

**Figure 2.** Les sous-unités régulatrices de la phosphatase PP1 : GADD34, sous-unité induite par le stress et CReP, sous-unité exprimée constitutivement

**Figure 3.** Conséquences de la détection d'un virus dans le cytoplasme d'une cellule : inhibition de la synthèse protéique globale et traduction de l'IFN- $\beta$  et de l'IL-6 (adapté de (1))

**Figure 4.** Analyse comparative de l'expression du gène GADD34 dans les PBMC de patients atteints de lupus érythémateux systémique et de sujets sains (d'après (2))

**Figure 5.** Structure du salubrinal (d'après (3))

**Figure 6.** Structure du guanabenz (d'après (3))

**Figure 7.** Le salubrinal inhibe la phosphatase constitutive d'eIF2 $\alpha$  et la phosphatase induite par le stress, alors que le guanabenz inhibe spécifiquement la phosphatase induite par le stress en se liant à la sous-unité régulatrice GADD34 (adapté de (4))

**Figure 8.** Structures du guanabenz et de sephin1 (d'après (5))

**Figure 9.** L'inhibition spécifique de GADD34 pourrait bloquer la synthèse d'autoanticorps et de cytokines pro-inflammatoires tel que les IFNs de type I et l'IL-6.

**Figure 10.** Physiopathologie du lupus systémique (d'après (6))

**Figure 11.** Complexes immuns et inflammation tissulaire dans le lupus systémique (d'après (6))

**Figure 12.** Schéma du déroulement de l'étude « GADD34\_LES ».

**Figure 13.** Schéma général de la procédure expérimentale pour l'étude ancillaire du PHRC « GADD34\_LES ».

**Figure 14.** Évaluation de la pureté des populations leucocytaires par cytométrie en flux.

## Liste des Tableaux

**Tableau I.** Relation entre la surexpression de GADD34 et celle des gènes des IFN de type I et des gènes de réponse à l'IFN de type I (d'après (2))

**Tableau II.** Expression de GADD34 dans les PBMC de patients atteints de LES.

**Table III.** Nombre de patients surexprimant GADD34 dans les différentes populations leucocytaires

**Tableau IV.** Expression de GADD34 dans les différentes populations leucocytaires de patients atteints de LES.

**Tableau V.** Comparaison de la surexpression de GADD34 dans les populations leucocytaires.

## **Abréviations**

ACR : American College of Rheumatology

AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament

ATF4 : Activating Transcription Factor-4

ATF6 : Activating Transcription Factor-6

BiP : Binding immunoglobulin Protein

CCTIRS : Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en matière de Recherche dans le domaine de la Santé

CHOP : C/EBP Homologous Protein

CHUGA : CHU Grenoble Alpes

CIC : Centre d'Investigation Clinique

CNIL : Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés

CPP : Comité de Protection des Personnes

CReP : Constitutive Repressor of eIF2 $\alpha$  Phosphorylation

DRCI : Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation

eIF2 $\alpha$  : Eukaryotic translation Initiation Factor 2 alpha subunit

GADD34 : Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein 34

IFIH1 : Interferon Induced with Helicase C domain 1

IFN : Interferon

IL-6 : Interleukin-6

IRE1 : Inositol-Requiring transmembrane kinase/Endoribonuclease 1

ISG15 : Interferon-Stimulated Gene 15

LES : Lupus Erythémateux Systémique

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells

PERK : double-stranded RNA PKR-activated protein kinase-like Eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  Kinase

PGA : Physician Global Assessment

PHRC : Projet Hospitalier de Recherche Clinique

PKR : Protein Kinase RNA-activated

PP1 : Protein Phosphatase 1

PR : Polyarthrite Rhumatoïde

RIPH : Recherche Impliquant la Personne Humaine

RE : Réticulum Endoplasmique

S1P : Site-1 Protease, S2P: Site-2 Protease

SLEDAI : Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

SLICC : Systemic Lupus International Collaborating Clinics

TLR : Toll-like Receptor

UPR : Unfolded Protein Response

XBP1 : X-box Binding Protein 1

## Introduction

L'accumulation de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique induit une réponse cellulaire au stress nommée Unfolded Protein Response (UPR). L'induction de l'UPR, à travers l'activation des trois senseurs moléculaires IRE1, ATF6 et PERK, permet de rétablir l'homéostasie au sein du réticulum endoplasmique. Au cours des dix dernières années, l'implication de l'UPR dans l'immunité et l'auto-immunité a été montrée ; en particulier, la voie de transduction du signal initiée par IRE1, la plus conservée au cours de l'évolution, a été étudiée.

GADD34 est un cofacteur inductible par le stress de la phosphatase PP1 synthétisé suite à l'activation de la protéine PERK et permettant une boucle de régulation négative de l'UPR. Au cours de ma thèse de doctorat j'ai mis en évidence que GADD34 est également nécessaire pour la production de cytokines pro-inflammatoires dans un modèle murin d'infection virale. Au sein du laboratoire d'immunologie du CHUGA j'ai eu l'opportunité d'explorer l'implication de GADD34 dans les maladies auto-immunes. Chez l'homme, l'expression du gène codant pour GADD34 est augmentée dans les cellules mononucléées sanguines de patients atteints de pathologies auto-immunes, tel que la polyarthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux systémique. Un Projet Hospitalier de Recherche Clinique coordonné par le laboratoire d'immunologie du CHUGA, portant sur l'évaluation de l'augmentation de l'expression du gène codant pour GADD34 chez les patients lupiques comme possible biomarqueur pronostique de poussée, est actuellement en cours. Les résultats d'une étude ancillaire de ce PHRC concernant l'identification de la sous-population leucocytaire surexprimant GADD34 sont ici présentés.

Des inhibiteurs de GADD34 ont été découverts : le salubrinal et les plus spécifiques guanabenz et sephin1. La surexpression de GADD34 dans les cellules mononucléées de patients atteints de maladies auto-immunes pourrait ouvrir de nouvelles possibilités thérapeutiques : les inhibiteurs spécifiques du complexe PP1/GADD34 pourraient être utilisés pour le traitement

d'un état nécessitant une activité d'immunosuppression en ciblant spécifiquement les cellules produisant les auto-anticorps ou des cytokines pro-inflammatoires.

# 1. RAPPEL HISTORIQUE ET BIBLIOGRAPHIQUE

## 1.1 L'Unfolded Protein Response

### 1.1.1 Les trois voies de signalisation de l'UPR

Le réticulum endoplasmique (RE) est l'organite essentiel pour la production des protéines transmembranaires et pour celles destinées à être sécrétées. Ces protéines sont synthétisées par des ribosomes liés au RE et repliées par des molécules chaperonnes présentes dans sa lumière. Les taux de biosynthèse, repliement et trafic des protéines sont précisément coordonnés par un système efficace de contrôle qualité afin d'assurer que seulement les protéines repliées correctement quittent le RE. Dans certaines situations physiologiques ou pathologiques (tel qu'un stress oxydatif ou une infection virale), les protéines se replient de manière incorrecte et la cellule est alors soumise au stress du réticulum endoplasmique (ER stress). Les protéines mal repliées ne peuvent pas quitter le RE et s'y accumulent si les mécanismes de dégradation habituelle, tel que la dégradation par le protéasome ou l'autophagie, sont dépassés (7) (8).

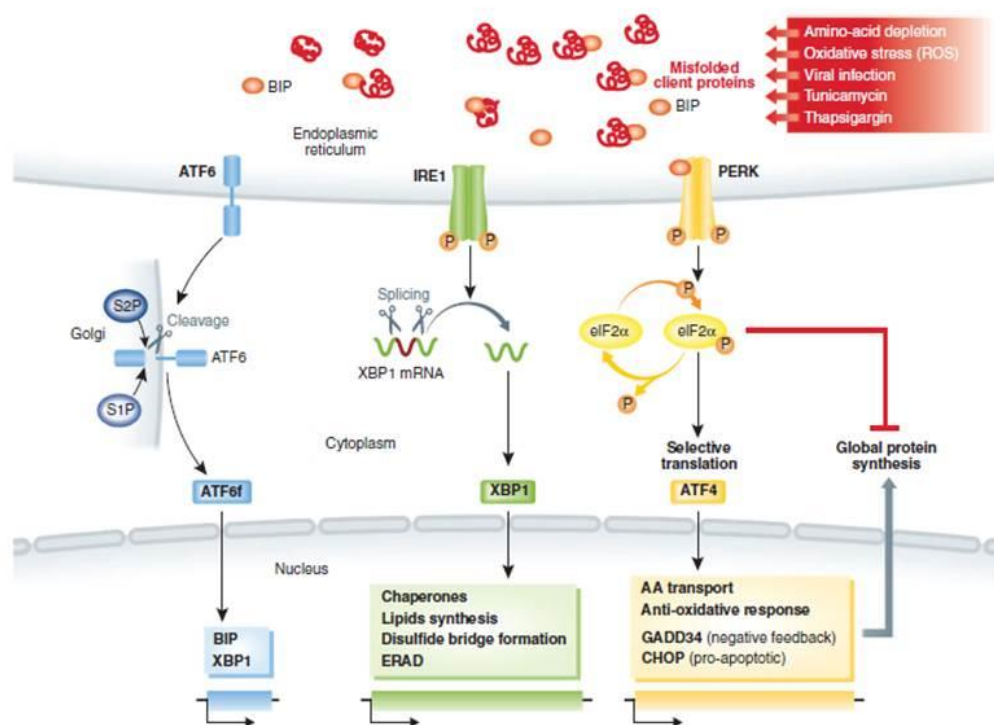
En effet, le RE est un organite dynamique qui répond à des changements dans la concentration protéique à travers un réseau de voies de signalisation qui constituent une réponse cellulaire au stress nommée « Unfolded Protein Response » (UPR). En conditions de stress, l'activation de l'UPR réduit la concentration de protéines mal repliées à travers différents mécanismes : l'atténuation de la néosynthèse des protéines, l'expansion des membranes du RE et la synthèse sélective de facteurs nécessaires au repliement et au contrôle de la qualité des protéines. Si le stress du RE n'est pas atténué et l'homéostasie n'est pas rétablie, l'UPR induit alors la cellule en apoptose.

Chez les mammifères, trois protéines membranaires du RE sont des senseurs du stress du RE (Figure 1) : IRE1 (inositol-requiring transmembrane kinase/endoribonuclease 1), PERK



(double-stranded RNA PKR-activated protein kinase-like eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ -kinase), et ATF6 (activating transcription factor-6). Chaque senseur se lie au chaperon moléculaire BiP dans la partie luminale du RE. En présence de l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE, BiP se lie de préférence à ces protéines, permettant le changement conformationnel nécessaire à l'activation des senseurs (9).

La voie de signalisation initiée par IRE1 est la plus conservée dans l'évolution car présente de la levure jusqu'à l'homme. IRE1 activé coupe un fragment de 26 paires de bases de l'ARN messager codant pour XBP1 (X-box binding protein-1) (10). À la suite de ce splicing, XBP1 est traduit dans le facteur de transcription XBP1s, responsable de l'induction des gènes impliqués dans la biogenèse des membranes du RE, le repliement des protéines et leur sécrétion.



**Figure 1.** Les trois voies de l'Unfolded Protein Response, initiées par les trois senseurs moléculaires IRE1, PERK et ATF6 (d'après (1))

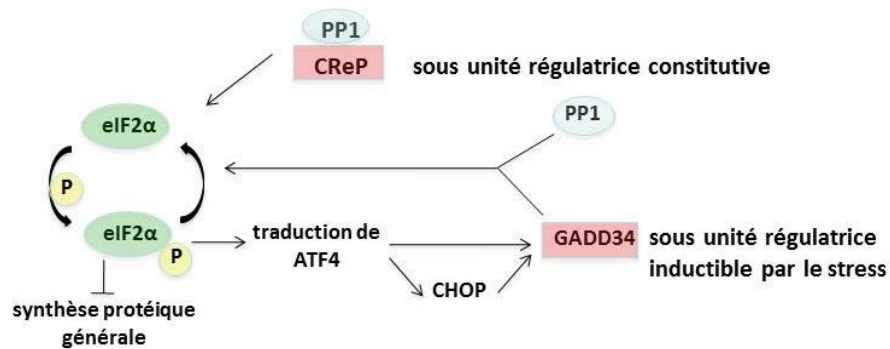
PERK est le senseur responsable de l'activation de la deuxième voie de signalisation de l'UPR. Cette protéine est structurellement similaire à IRE1 avec un domaine de dimérisation dans la lumière du RE et un domaine cytosolique avec une fonction kinase. Suite à son activation, PERK phosphoryle la sous-unité  $\alpha$  du facteur de l'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$  causant la diminution de la synthèse protéique globale afin de limiter l'influx de nouvelles protéines dans le RE (11). Dans le même temps, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  permet la transcription préférentielle du facteur de transcription ATF4 (activating transcription factor 4) (12) qui induit l'expression de gènes impliqués dans la production d'espèces réactives de l'oxygène, dans l'apoptose, et la déphosphorylation d'eIF2 $\alpha$  afin de prévenir une activation excessive de l'UPR (13).

ATF6 représente la troisième voie de signalisation de l'UPR. À la suite du relargage de BiP, ATF6 est transporté dans l'appareil de Golgi où il est coupé par les protéases S1P et S2P. ATF6f qui est la forme active d'ATF6, agit comme facteur de transcription pour l'induction de gènes qui augmentent les capacités de repliement du RE.

Un événement clé dans l'UPR est l'activation de PERK, responsable de l'atténuation de la synthèse protéique globale, parallèlement à l'augmentation de la traduction du facteur de transcription ATF4 (activating transcription factor 4). Le premier objectif de l'atténuation de la synthèse protéique est la diminution de la concentration de protéines dans le RE, afin de permettre à la cellule de gérer le repliement des protéines accumulées. Cependant, en condition de stress chronique, le facteur de transcription ATF4 induit le facteur de transcription CHOP qui active l'expression de gènes proapoptotiques, afin d'éliminer les cellules irréparablement endommagées (14).

ATF4 et CHOP induisent également l'expression de GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible gene 34) qui joue un rôle essentiel dans la restauration de l'homéostasie cellulaire suite à l'induction de l'UPR. GADD34 est une sous-unité régulatrice qui se lie à la sous-unité catalytique de la phosphatase PP1, afin de générer une phosphatase active d'eIF2 $\alpha$

(15) (16). GADD34 est donc responsable d'une boucle de régulation négative de l'UPR, favorisant la reprise de la synthèse protéique, essentielle à la survie cellulaire (17). L'instabilité et le turnover rapide de GADD34 ont un rôle critique dans la décision de la cellule de survivre ou mourir : le transport de GADD34 du cytosol au RE (18) et la poly-ubiquitination à son extrémité N-terminale qui induit sa dégradation par le protéasome (19) sont des exemples de régulation fine de l'activité de GADD34. Une sous-unité de la phosphatase PP1 exprimée de façon constitutive, nommée CReP (constitutive repressor of eIF2 $\alpha$  phosphorylation) existe également (20) (Figure 2).



**Figure 2.** Les sous-unités régulatrices de la phosphatase PP1 : GADD34, sous-unité induite par le stress et CReP, sous-unité exprimée constitutivement

### 1.1.2 UPR, immunité et pathologies

Plusieurs stimuli extracellulaires et fluctuations dans l'homéostasie intracellulaire peuvent perturber le repliement des protéines au sein du RE. L'activation de l'UPR a été observée dans plusieurs maladies humaines et modèles animaux de maladies humaines, et il a été proposé que le stress du RE puisse contribuer à la pathogénie de maladies telles que maladies métaboliques, neurodégénératives, inflammatoires, et néoplasiques (21).

L'activation de l'UPR a été observée dans les maladies cardiovasculaires, métaboliques (22) (23) ou neurodégénératives, telles que la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la maladie d'Alzheimer (24) et la sclérose en plaques (25) (26). Dans le cadre du diabète, la voie de signalisation PERK-eIF2 $\alpha$  est indispensable pour l'adaptation des cellules  $\beta$  du pancréas aux fluctuations dans la synthèse de l'insuline en réponse aux niveaux du glucose (12) (27) (28).

L'UPR est également impliquée dans les réponses immunes. Au niveau de l'immunité innée, la stimulation par TLR2 et TLR4 induit la phosphorylation d'IRE1, et donc le splicing de l'ARNm de XBP1. L'activation de XBP1 est nécessaire pour la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 par les macrophages (29) (30). Le facteur de transcription XBP1 a été aussi montré nécessaire pour le développement et la survie des cellules dendritiques (31). Ces observations montrent que les voies de signalisation de l'UPR et de l'immunité innée sont connectées et qu'elles peuvent se réguler mutuellement (32).

Un lien direct entre UPR et inflammation a été impliqué dans le développement de maladies auto-immunes telles que les maladies inflammatoires chroniques intestinales, ou le rôle protecteur de XBP1 a été mis en évidence (33) (34). XBP1 a été montré aussi nécessaire pour la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes à travers l'expansion du RE afin de permettre la synthèse de quantités importantes d'immunoglobulines (35) (36).

## **1.2 GADD34 : une protéine clé pour la régulation de l'UPR**

### **1.2.1 GADD34 et immunité innée**

La voie de l'UPR qui a été plus explorée dans des situations physiologiques ou pathologiques est la voie médiée par IRE1 et XBP1. Cependant, d'autres voies de l'UPR peuvent

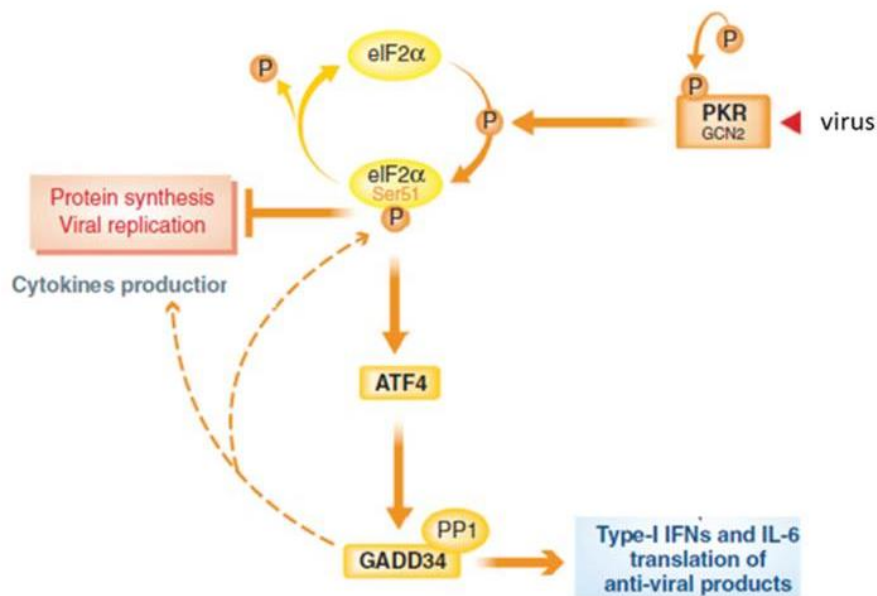
être mises en jeu dans les maladies inflammatoires, et notamment la voie médiée par PERK impliquant la protéine GADD34.

Au cours de ma thèse de doctorat au Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, j'ai pu mettre en évidence que les cellules dendritiques murines stimulées par le poly I:C, (analogue synthétique des ARN double brin), présentent certains transcrits communs avec ceux produits au cours d'UPR induite par des agents pharmacologiques (37). Parmi les transcrits induits par le poly I:C, les facteurs de transcription ATF4 et CHOP ont été retrouvés. La translocation d'ATF4 dans le noyau induit l'expression du gène CHOP, responsable de l'induction de l'apoptose, et d'autres gènes de réponse au stress du RE, tels que GADD34. Également, suite à l'activation par le poly I:C, une augmentation importante de la protéine GADD34 a été observée (37), laissant présager d'un rôle important de GADD34 dans le contrôle de la synthèse protéique dans les cellules dendritiques activées.

De façon intéressante, j'ai montré que GADD34 est nécessaire à la production de cytokines telles que l'IFN- $\beta$  et l'IL-6 dans les cellules dendritiques exposées à l'ARN double brin (37) et j'ai pu étendre ces observations à d'autres types cellulaires comme les fibroblastes embryonnaires murins (38). Dans les fibroblastes, l'expression de GADD34 est dépendante de l'activation de PKR (Protein Kinase RNA-activated), démontrant un lien direct entre la détection des pathogènes et la voie de signalisation par le facteur de transcription ATF4 de la réponse cellulaire au stress du réticulum endoplasmique.

L'importance de ce lien dans l'immunité anti-virale a été mise en évidence par l'extrême susceptibilité à l'infection par le virus Chikungunya des fibroblastes et des souris nouveau-nés déficientes pour GADD34 (38). Ce petit virus enveloppé à ARN a été choisi pour ces capacités d'induction d'IFN de type I, responsable du contrôle de l'infection dans les souris nouveau-nés (39) (40). Cinq jours après l'infection, nous avons trouvé une réduction significative du niveau d'IFN- $\beta$  dans les tissus cibles des souris nouveau-nés déficients en GADD34, qui s'accompagne d'une augmentation du titre viral dans les organes vitaux comme le cœur, causant ainsi des

myocardites, des dilatations ventriculaires et finalement la mort de ces souris (38). Ces résultats suggèrent que l'activation de la voie de la réponse cellulaire au stress ATF4-GADD34 devrait être considérée comme partie intégrale des voies de signalisation de l'immunité innée suite à la détection des virus à ARN (Figure 3) (1). Récemment les mécanismes de régulation de l'expression de l'IFN- $\beta$  par GADD34 ont été mis en évidence (41).



**Figure 3.** Conséquences de la détection d'un virus dans le cytoplasme d'une cellule : inhibition de la synthèse protéique globale et traduction de l'IFN- $\beta$  et de l'IL-6 (adapté de (1)).

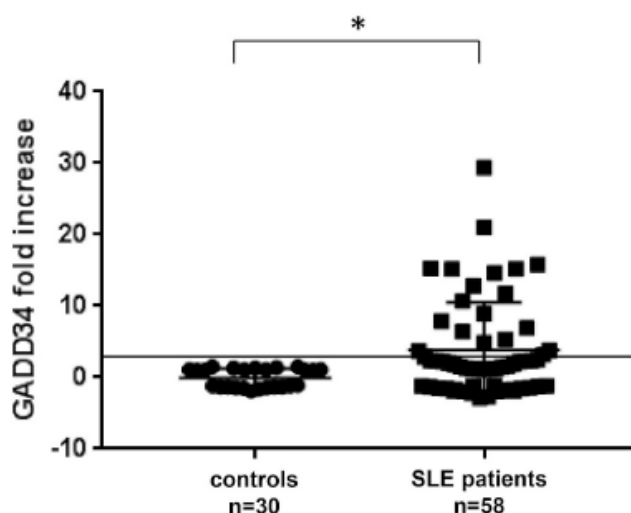
### 1.2.2 GADD34 et auto-immunité

Nous avons formulé l'hypothèse que GADD34, étant nécessaire à la production de cytokines pro-inflammatoires chez la souris, soit une molécule clé de l'inflammation également chez l'homme, notamment dans le cas de pathologies auto-immunes avec une composante inflammatoire.

Nous avons mis en évidence que l'expression du gène codant pour GADD34 est augmentée significativement dans les cellules mononuclées des patients atteints de polyarthrite

rhumatoïde (PR). Aucune relation n'a été trouvée entre l'expression de GADD34 et l'activité de la pathologie ; par contre, de façon intéressante, la surexpression de GADD34 est liée à la présence d'anticorps anti-peptides cycliques citrullinés dans le sérum des patients (42).

Nous avons également montré la surexpression du gène codant pour GADD34 dans les PBMC de patients atteints de lupus érythémateux systémique, associée à la surexpression du gène codant pour CHOP (2) (Figure 4).



**Figure 4.** Analyse comparative de l'expression du gène GADD34 dans les PBMC de patients atteints de lupus érythémateux systémique et de sujets sains (test exact de Fisher, \* $p < 0.001$ ) Les valeurs médianes de l'expression de GADD34 étaient : 1.01 [-1.23 ; 1.36] pour les sujets sains et 1.84 [1.16 ; 5.25] pour les patients lupiques (test de Mann-Whitney, médiane [25th ; 75th] (d'après (2)).

De façon intéressante, la surexpression de GADD34 est corrélée à la surexpression des gènes codants pour l'IFN- $\alpha$ , l'IFN- $\beta$  et certains gènes de la réponse à l'IFN de type I tel que ISG15 et IFIH1 (Tableau I).

		GADD34 non-overexpressing SLE patients	GADD34 overexpressing SLE patients	p value
IFN- $\alpha$ (n = 42)	Overexpressed	7	23	=0.001
	Non overexpressed	10	2	
IFN- $\beta$ (n = 41)	Overexpressed	6	19	0.0086
	Non overexpressed	11	5	
ISG15 (n = 53)	Overexpressed	9	31	< 0.001 (1,14 10 <sup>-5</sup> )
	Non overexpressed	12	1	
IFIH1 (n = 42)	Overexpressed	3	22	< 0.001 (1,06 10 <sup>-5</sup> )
	Non overexpressed	14	3	

**Tableau I.** Relation entre la surexpression de GADD34 et celle des gènes des IFN de type I et des gènes de réponse à l'IFN de type I (test exact de Fisher) (d'après (2)).

La relation entre activation d'UPR et réponse à l'IFN de type 1 chez les patients lupiques est particulièrement intéressante, car un profil d'expression génique nommé « signature interféron » avec surexpression des gènes de l'IFN de type I et des gènes de réponse à l'IFN a été montré chez les patients, avec différents niveaux de surexpression des gènes (43) (44) et une relation avec l'activité de la pathologie (45) (46).

Cependant, l'implication de l'UPR dans la physiopathologie des maladies auto-immunes et notamment du LES, doit être étudiée plus en détail.

### **1.3 Les inhibiteurs de GADD34**

L'augmentation de l'expression de GADD34 dans les cellules mononucléées de patients atteints de pathologies auto-immunes pourrait ouvrir de nouvelles possibilités thérapeutiques grâce à l'existence d'inhibiteurs du complexe PP1/GADD34 qui pourront être utilisés pour le traitement d'un état nécessitant une activité d'immunosuppression.

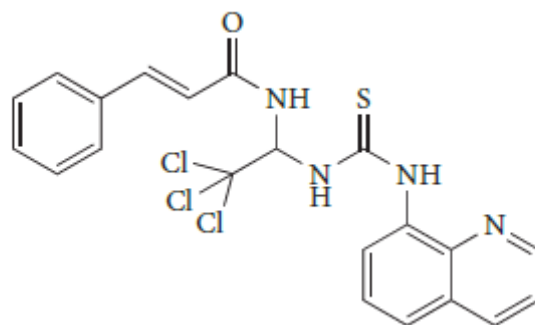
#### **1.3.1 Du salubrinal au guanabenz**

Des avancées récentes dans le design de nouvelles molécules capables d'augmenter la capacité d'adaptation du réticulum endoplasmique des cellules stressées ou de réduire le misfolding des protéines au sein du RE, ont permis de développer des approches pour améliorer les effets nocifs du stress chronique du RE observé dans le cas de plusieurs pathologies humaines (3) (47).

Des essais cellulaires qui visaient à la recherche de molécules capables de prolonger la survie des cellules en conditions de stress ont permis d'identifier des petites molécules



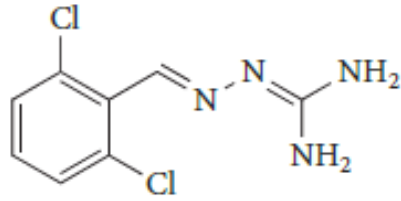
inhibitrices des phosphatases d'eIF2 $\alpha$ . Le salubrinal (Figure 5) inactive les complexes GADD34-PP1 et CReP-PP1 (GADD34 est la sous-unité régulatrice induite en condition de stress alors que CReP est la sous-unité régulatrice exprimée de façon constitutive), probablement causant la séparation des sous-unités régulatrices de la sous-unité catalytique de la phosphatase (48).



**Figure 5.** Structure du salubrinal (d'après (3))

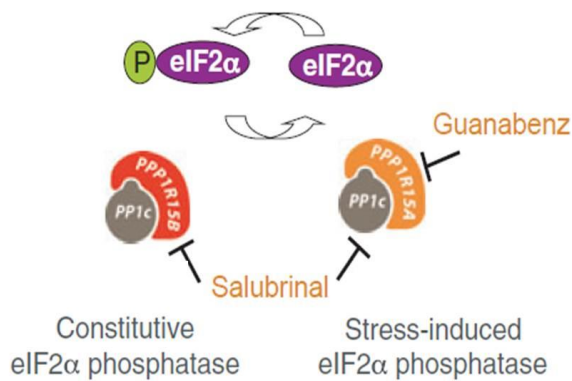
Par conséquent, le niveau de phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  est augmenté, la traduction protéique globale est réduite et la signalisation cellulaire via le facteur de transcription ATF4 est activée (48). De façon intéressante, il a été mis évidence que le salubrinal réduit la mort des neurones due à l'excitotoxicité dans l'hippocampe (49) et diminue la dégénération neuronale dans des modèles animaux de maladie de Parkinson (50) et de sclérose latérale amyotrophique (51).

Récemment, une petite molécule qui inhibe sélectivement la phosphatase d'eIF2 $\alpha$  induite par le stress en ciblant la sous-unité régulatrice GADD34, a été identifiée (52). Cette molécule, nommée guanabenz (Figure 6), était déjà connue comme agoniste du récepteur  $\alpha$ 2-adrénergique et elle est actuellement utilisée pour le traitement de l'hypertension artérielle (53).



**Figure 6.** Structure du guanabenz (d'après(3))

Le guanabenz se lie directement à la sous-unité régulatrice induite par le stress GADD34, et ne se lie pas à la sous-unité régulatrice constitutive CREP ; par conséquent, la liaison avec GADD34 provoque la séparation de GADD34 de la phosphatase, sans modifier la phosphatase constitutive (Figure 7).



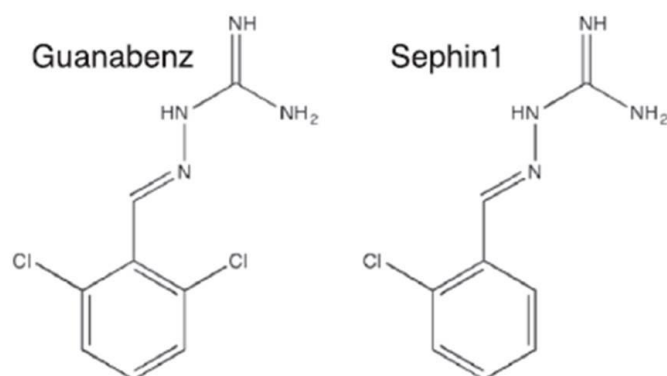
**Figure 7.** Le salubrinal inhibe la phosphatase constitutive d'eIF2 $\alpha$  et la phosphatase induite par le stress, alors que le guanabenz inhibe spécifiquement la phosphatase induite par le stress en se liant à la sous-unité régulatrice GADD34 (adapté de (4))

L'inhibition sélective de GADD34/PP1 prolonge la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  dans les cellules stressées, en adaptant le taux de synthèse protéique à un niveau compatible avec la disponibilité de protéines chaperonnes et donc permettant à la cellule de faire face à la phase

aigüe de stress (52). La sélectivité vis-à-vis de GADD34 est importante, puisque l'inhibition spécifique de PP1/GADD34 protège les cellules de l'accumulation létale de protéines mal repliées, en évitant cependant une phosphorylation persistante d'eIF2 $\alpha$  en condition d'homéostasie cellulaire qui conduirait à des niveaux trop bas de synthèse protéique (4). De nombreuses pathologies, tel que le diabète, les ischémies, les infections virales et les maladies neurodégénératives, sont associées à l'incapacité de mettre en place une réponse adéquate au stress du réticulum endoplasmique (54) qui pourrait être corrigée, en principe, par l'inhibition de PP1/GADD34. L'identification d'inhibiteurs sélectifs de GADD34 a mis en évidence qu'il est possible inhiber une phosphatase spécifique sans pourtant inhiber un enzyme très similaire et que cela est possible grâce au ciblage sélectif d'une sous-unité régulatrice. Cependant, le guanabenz ne peut pas être utilisé *in vivo* pour inhiber PP1/GADD34 à cause de son affinité nanomolaire pour le récepteur  $\alpha$ 2-adrénergique responsable d'un effet hypotenseur central.

### **1.3.2 Du guanabenz à sephin1**

Le laboratoire de Anne Bertolotti à Cambridge, qui avait identifié le guanabenz comme inhibiteur de GADD34, a récemment synthétisé un panel de dérivés du guanabenz à la recherche d'un dérivé actif sur GADD34 mais privé de l'effet anti-hypertenseur : un dérivé, nommé sephin1, avec un atome de chlore en moins par rapport au guanabenz, a été sélectionné (5) (Figure 8).



**Figure 8.** Structures du guanabenz et de sephin1 (d'après (5))

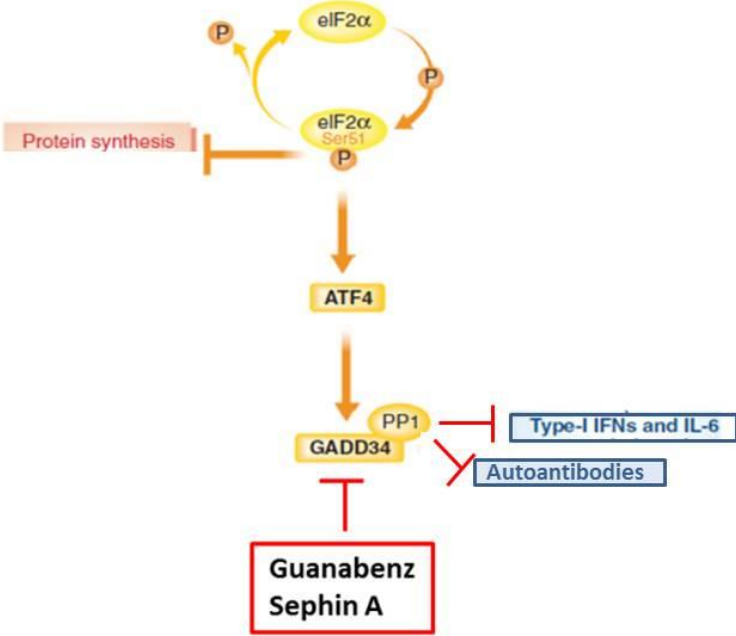
Comme le guanabenz, la sephin1 se lie spécifiquement à GADD34, prolonge l'état de phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  dans les cellules stressées, et retarde la reprise de la traduction protéique, en protégeant donc les cellules de l'effet cytotoxique du stress du réticulum endoplasmique. De façon intéressante, la sephin1 n'interagit pas avec le récepteur  $\alpha$ 2-adrénérique, et les souris traitées oralement pour un mois avec la sephin1 n'ont pas montré les effets indésirables observés avec le guanabenz, tels que somnolence et problèmes d'équilibre (5). Ensuite, les auteurs ont montré que sephin1 peut bloquer le développement de maladies liées au stress du misfolding des protéines, en particulier des modèles murins de maladie de Charcot-Marie-Tooth 1B et de sclérose latérale amyotrophique (5) (55). Récemment, il a été montré que la sephin1 peut également réduire la maladie à prions dans des modèles cellulaires et murins (56).

### **9.3.3 Intérêt de GADD34 comme cible thérapeutique potentielle pour des pathologies auto-immunes**

Les traitements actuellement utilisés pour la polyarthrite rhumatoïde sont principalement les DMARDs (Disease Modifying AntiRheumatic Drugs) tel que le methotrexate ou des biothérapies anti-cytokines tel que les anticorps monoclonaux thérapeutiques anti-TNF $\alpha$ ; dans le cas du lupus érythémateux systémique les patients peuvent être traités par corticothérapie, immunosuppresseurs ou par des biothérapies du type anticorps monoclonaux anti-CD20 ou anti-BLys (B Lymphocytes Stimulator) ; le choix du traitement dépend souvent des facteurs pronostiques. Malgré les progrès obtenus récemment grâce au développement des traitements par biothérapies, ces thérapies se sont démontrées efficaces dans un nombre limité de patients, avec un taux d'échec pouvant atteindre 40% des patients (57). Dans le contexte actuel, où l'optimisation des traitements en tenant compte du phénotype individuel du patient et du contexte de comorbidités est encore un défi, la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques semble être nécessaire.

Les inhibiteurs sélectifs de la phosphatase de eIF2 $\alpha$  ciblant GADD34 ont montré un rôle cytoprotecteur contre des dommages cellulaires dus à un mauvais repliement des protéines qui est d'intérêt particulier pour des pathologies comme le diabète ou les maladies neurodégénératives (58) (59) (60). Puisque les autoanticorps et les cytokines pro-inflammatoires ont un rôle pathogénique dans plusieurs maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux systémique et la polyarthrite rhumatoïde, cibler spécifiquement les cellules produisant des autoanticorps ou des cytokines à des temps précoces au cours de la pathologie pourrait avoir un effet primordial dans la réduction de l'inflammation et de la formation de complexes immuns et donc prévenir des atteintes tissulaires destructives (Figure 9). En perspective, il serait donc intéressant de tester les inhibiteurs de GADD34 et en particulier la sephin1 afin de cibler

spécifiquement les cellules produisant les auto-anticorps ou des cytokines pro-inflammatoires dans le contexte des pathologies auto-immunes.



**Figure 9.** L’inhibition spécifique de GADD34 pourrait bloquer la synthèse d’autoanticorps et de cytokines pro-inflammatoires tel que les IFNs de type I et l’IL-6.

## **2. PHRC « GADD34\_LES » : DE LA RECHERCHE FONDAMENTALE A LA RECHERCHE CLINIQUE**

Au laboratoire d'immunologie du CHU Grenoble Alpes nous avons actuellement en cours un PHRC (Projet Hospitalier de Recherche Clinique), dont je suis responsable scientifique, portant sur l'évaluation de l'augmentation de l'expression du gène codant pour GADD34 dans les cellules mononucléées de patients atteints de lupus érythémateux systémique comme facteur pronostique de poussée (Annexe 3).

### **2.1 Physiopathologie du lupus**

Le Lupus Erythémateux Systémique (LES) est une maladie auto-immune chronique caractérisée par un important polymorphisme clinique et touchant surtout l'adulte jeune, en particulier la femme, avec un ratio de 9 :1, son incidence est maximale entre 15 et 45 ans (61) ; la prévalence de la maladie en France est évaluée de 10 à 60 pour 100 000 personnes. La présentation clinique est très variable avec des symptômes principalement décrits par des atteintes cutanées (notamment sous forme d'érythèmes), articulaires (arthralgies, arthrites), mais aussi rénales, hématologiques ou neurologiques (62). Parmi les signes biologiques on retrouve généralement une cytopénie périphérique, une hypocomplémentémie, une diminution de l'activité de la voie classique du complément (diminution des protéines C3 et C4) et la présence d'anticorps antinucléaires dans le sérum des patients. En particulier, les anticorps anti-ADN natif sont très spécifiques, même s'ils sont retrouvés seulement chez 50-80% des patients (63). Le diagnostic du lupus repose sur un ensemble d'arguments clinico-biologiques (critères de classification du LES : score ACR ou SLICC en Annexe 1) ; le diagnostic du lupus est évoqué quand au moins quatre critères sont réunis.

Le lupus érythémateux systémique est caractérisé par une évolution par poussées alternant avec des phases de rémission. Les poussées sont décrites par l'apparition de nouveaux

symptômes ou l'aggravation de symptômes déjà présents et la perturbation du bilan biologique. Elles sont caractérisées de manière objective par une augmentation de plus de trois points du score SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) (Annexe 2), évaluant l'activité de la pathologie lupique, par rapport au score SLEDAI antérieur.

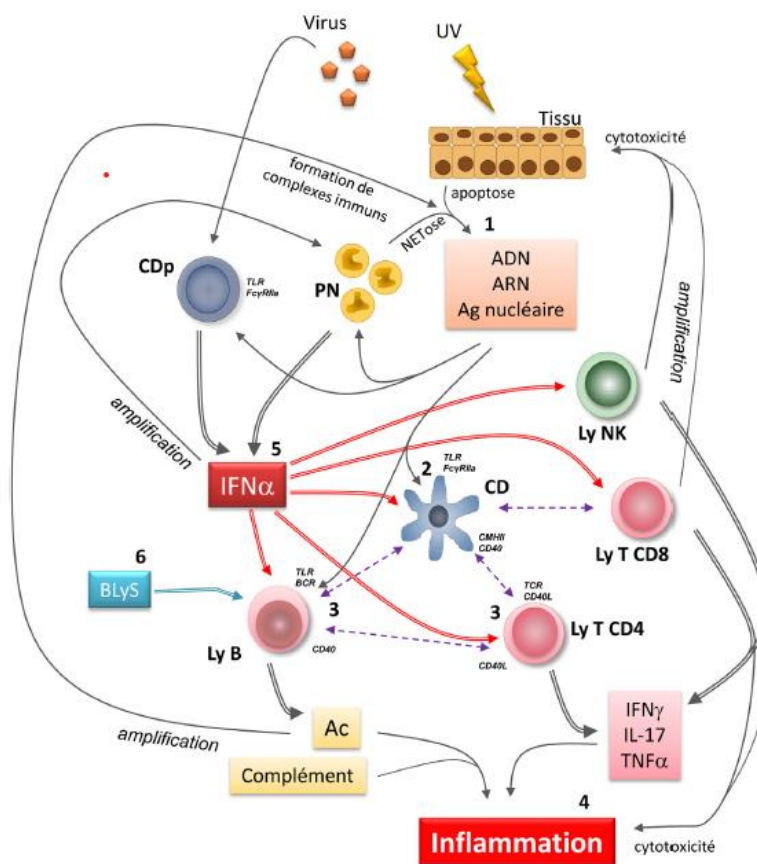
Le LES est une pathologie multifactorielle. Plusieurs facteurs contribuent à son étiologie : facteurs génétiques (en particulier mutations dans les gènes codants pour les protéines du complément C2, C4 ou C1q), facteurs environnementaux (tel que les rayonnements ultraviolets), facteurs hormonaux (la prise d'oestrogènes ou la grossesse peuvent déclencher une poussées de la maladie), et facteurs immunologiques, comme des anomalies de l'apoptose, avec un déficit de clairance des corps apoptotiques (64) et des anomalies de signalisation intracellulaire concernant les cellules T, avec une diminution de l'expression de la chaîne  $\zeta$  du récepteur des cellules T (TCR) et de la protéine kinase C (PKC) (62).

Un défaut de clairance des corps apoptotiques est souvent à l'origine de l'exposition d'auto-antigènes responsables de la stimulation de lymphocytes T et B auto-réactifs (65). L'activation des lymphocytes auto-réactifs nécessite la reconnaissance de ces auto-antigènes par les TLR-7 et TLR-9 par des cellules dendritiques et les macrophages, et la stimulation par des cytokines, notamment l'interféron alpha (IFN- $\alpha$ ). L'activation des lymphocytes B auto-réactifs entraîne la production d'auto-anticorps, dirigés en particulier contre l'ADN double brin et les antigènes nucléaires solubles. Ces auto-anticorps se lient aux antigènes et forment des complexes immuns qui activent le système du complément, avec la production des anaphylatoxines C5a et C5b, responsables du recrutement de macrophages et neutrophiles avec l'initiation d'une inflammation tissulaire (6).

Le rôle majeur des IFN, et en particulier de l'IFN- $\alpha$ , dans la pathogénie du lupus doit être souligné (66) (67). Au cours du lupus, l'IFN- $\alpha$  est produit par des cellules dendritiques plasmacytoïdes tissulaires (notamment cutanées) qui ont été activées par des complexes immuns qui contiennent des débris de nucléosomes et d'anticorps anti-ADN natif. En effet, il a été

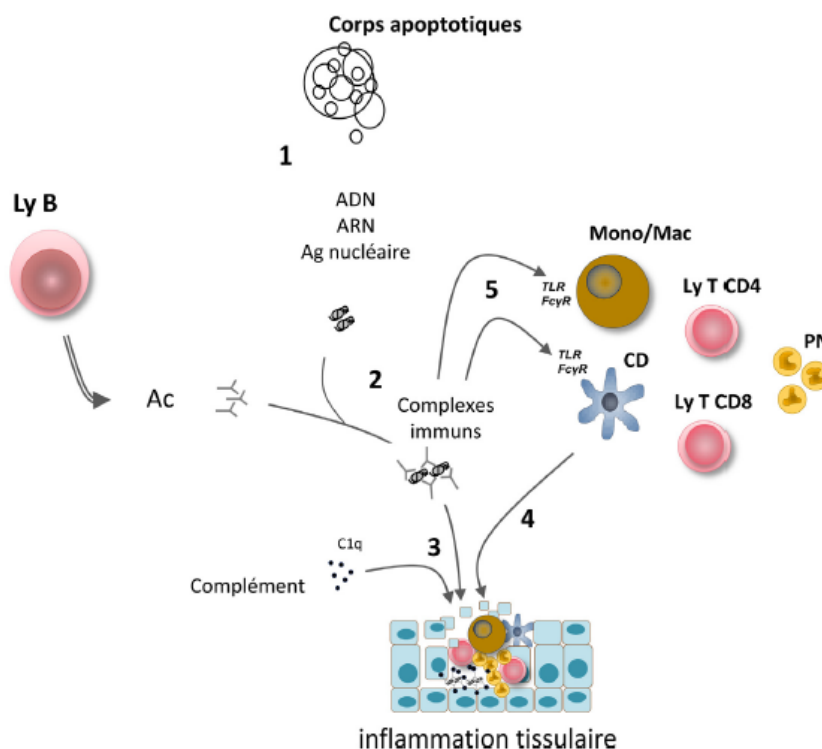


observé que les monocytes circulants peuvent se différencier en cellules dendritiques sous l'effet d'une production excessive d'IFN- $\alpha$  (68). Les cellules dendritiques activées par l'IFN- $\alpha$  se comportent alors comme des cellules présentatrices d'antigènes induisant l'activation de cellules T CD8 cytotoxiques autoréactives (67). Les cellules dendritiques activées par l'IFN- $\alpha$  sont également capables d'induire la prolifération des cellules B et leur différenciation en plasmocytes (69). Des études transcriptomiques confirment l'importance de l'IFN- $\alpha$  dans la maladie lupique. L'expression des gènes contrôlés par l'IFN de type I a été retrouvée dans les leucocytes circulants des patients lupiques (70) (71). Cette expression est corrélée avec l'activité de la pathologie, démontrant l'importance de la signature IFN dans le LES (71) (Figure 10).



**Figure 10.** Physiopathologie du lupus systémique. 1) un excès de production et/ou un défaut de clairance des cellules en apoptose induisent l'accumulation de débris cellulaires, 2) les cellules dendritiques captent les auto-antigènes et activent les lymphocytes T auto-réactifs qui contrôlent la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'auto-anticorps, 3) importance des molécules de co-stimulation pour les interactions entre les différentes cellules, 4) induction de l'inflammation tissulaire, 5) IFN- $\alpha$  cytokine chef d'orchestre de la réaction auto-immune dans le lupus, 6) BlyS augmente la survie et la différenciation des lymphocytes B et des plasmocytes auto-réactifs (d'après (6)).

Les cytokines jouent un rôle important dans l'étiologie et la pathogénie du lupus (72). L'implication des cytokines a été mise en évidence en deux étapes successives au cours de la maladie lupique. La première est caractérisée par la synthèse de cytokines Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ ), suivie par celle de cytokines Th2 (IL-4, IL-10) et la diminution parallèle de la synthèse d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ . Cette induction Th2 pourrait être liée à un excès de complexes immuns capables d'activer les macrophages et de favoriser la synthèse d'IL-10 et d'IL-6 (73). De plus, pendant toute la durée de la maladie il y a une production excessive de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-18), en particulier dans certains organes (rein, peau) (72). L'activation du complément, la production d'auto-anticorps et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires contribuent à l'entretien de l'inflammation tissulaire (Figure 11).



**Figure 11.** Complexes immuns et inflammation tissulaire dans le lupus systémique. 1) accumulation de corps apoptotiques, 2) les auto-anticorps se fixent aux auto-antigènes et forment des complexes immuns, 3) les complexes immuns activent la voie classique du complément, 4) libération de facteurs chimiotactiques et recrutement de macrophages, polynucléaires neutrophiles, cellules dendritiques et lymphocytes qui induisent l'inflammation tissulaire, 5) les complexes immuns activent les macrophages et les cellules dendritiques par les TLRs et les récepteurs pour le fragment Fc des IgG avec la production de cytokines pro-inflammatoires (d'après (6)).

À l'heure actuelle, si le diagnostic du LES est facilité par des marqueurs immunologiques tel que la présence anticorps anti-ADN natif et la diminution de l'activité de la voie classique du complément, aucun biomarqueur pronostique (capable de prédire la survenue de rechutes de la maladie) fiable n'est disponible pour la prise en charge des patients lupiques (74).

Le traitement du LES repose classiquement sur les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les anti-paludéens de synthèse, les corticoïdes, et les immunosuppresseurs tel que l'azathioprine, le cyclophosphamide, le méthotrexate et l'acide mycophénolique. Le choix du traitement dépend essentiellement de la gravité et l'évolutivité de la pathologie (62). Du fait des effets secondaires à court, moyen et long termes de ces traitements non-spécifiques, des biothérapies ciblant en particulier le lymphocyte B (anti-CD20 et anti-BLys), ont été évaluées dans la prise en charge du LES ; les anticorps monoclonaux anti-BLys ont récemment obtenu l'AMM pour le traitement des patients lupiques avec une activité de la maladie élevée en échec des traitements standard.

Dans ce contexte, la découverte de nouveaux biomarqueurs pronostiques pourrait permettre une meilleure surveillance des patients en vue d'un traitement plus précoce et mieux adapté.

## **2.2 Aspects réglementaires**

Le PHRC interrégional « GADD34\_LES » (38RC15.010 ; n° Id-RCB : 2015-A00493-46) est une étude RIPH (Recherche Impliquant la Personne Humaine) de type 2 (interventionnelle, avec risques et contraintes minimales dues aux prises de sang spécifiques à l'étude), prospective, longitudinale et multicentrique.

L'étude a été conduite en accord avec la réglementation française sur la recherche biomédicale, le Code de la santé publique (article L1121-1), la déclaration d'Helsinki et les principes des bonnes pratiques cliniques. Le protocole a reçu un avis favorable du CPP (Ref : 15-CHUG-17), a été approuvé par l'ANSM, et a obtenu les autorisations de la CCTIRS (n°15695) et

de la CNIL (n° 1894314). Les patients et les sujets témoins ont signé un consentement éclairé. Les échantillons sont conservés au sein d'une collection biologique déclarée au Ministère de la Recherche (DC-2014-2268).

Les centres qui participent à cette étude sont : le CHU Grenoble Alpes (Service de Médecine Interne et Service de Néphrologie), CHU de Marseille, CHU de Saint Etienne, CHU de Lyon, CH d'Annecy, CH de Chambéry. Les patients sont recrutés par des médecins spécialistes du LES lors des consultations de suivi habituel dans les services impliqués : l'investigateur informe le patient à l'aide de la notice d'information, s'assure que le sujet a bien compris les implications de la participation à l'étude et recueille son consentement écrit éclairé et signé.

### **2.3 Objectifs de l'étude**

L'objectif principal du PHRC « GADD34\_LES » est l'évaluation de l'expression du gène codant pour GADD34 dans les cellules mononucléées sanguines comme nouveau biomarqueur pronostique de poussée de LES sur 12 mois de suivi. L'expression de GADD34 est mesurée par PCR quantitative.

Le nombre prévu de patients à inclure était de 250, avec visites médicales tous les six mois et prélèvements biologiques tous les trois mois.

Les objectifs secondaires de cette étude sont : 1) l'évaluation de l'apport complémentaire de la mesure du niveau d'expression de GADD34 dans les cellules mononucléées sanguines pour la détection précoce des poussées du LES, comparativement aux paramètres pronostiques utilisés dans la prise en charge habituelle de la pathologie et 2) la quantification des cytokines pro-inflammatoires IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-6 et IL-17 dans le sérum des patients, afin d'évaluer si le niveau d'expression de GADD34 dans les PBMC est corrélé au taux de cytokines pro-inflammatoires dans le plasma des patients.

Une étude ancillaire, conduite sur 30 patients appariés en sexe et âge avec 30 sujets témoins, porte sur l'identification de la/des sous-population(s) leucocytaire(s) surexprimant GADD34, suite à tri magnétique des lymphocytes B, lymphocytes T et monocytes.

## **2.4 Caractéristiques des sujets**

Les critères d'inclusion sont : femme ou homme âgé d'au moins 18 ans, présentant un LES (défini sur les scores ACR 1997 ou SLICC 2012) quiescent depuis au moins 3 mois défini par la présence des trois critères suivants : un SLEDAI clinique à 0, un PGA < 1, l'absence d'augmentation thérapeutique spécifique sur cette période telle que cité en annexe du SLEDAI ; ayant signé un consentement éclairé, et étant affilié à la sécurité sociale.

Les critères de non-inclusion sont : patients ayant présenté un épisode aigu d'infection virale dans les 15 jours précédents (étant donné que la réponse inflammatoire et anti-infectieuse pourrait entraîner une augmentation de l'expression de GADD34), patients avec autres connectivites ou maladies auto-immunes associées (à l'exception de thyroïdite, syndrome des anti-phospholipides et syndrome de Sjögren, maladies auto-immunes fréquemment associées au LES) ; personnes bénéficiant d'une protection particulière (selon la définition des articles L1121-5 et L1121-8 du Code de Santé Publique : mineurs, femmes enceintes ou allaitante, personnes majeures protégées par la loi (sous tutelle, sous curatelle ou privées de liberté) ; personnes hospitalisées sans leur consentement (selon la définition des articles L3212-1 et L3212-3 du Code de Santé Publique).

Les 30 témoins nécessaires pour l'étude ancillaire ont été recrutés au CIC (Centre d'Investigation Clinique) du CHU Grenoble Alpes selon le principe d'appariement en âge et sexe avec les 30 premiers patients grenoblois inclus ; les témoins ont eu une seule visite médicale avec un seul prélèvement biologique.

## 2.5 Déroulement de l'étude

Les patients inclus sont suivis pendant 12 mois, avec une visite médicale tous les 6 mois selon le suivi habituel et des prélèvements biologiques tous les 3 mois. En cas de poussée, les patients ont une visite médicale avec prélèvements biologiques, et une nouvelle visite avec prélèvement à distance d'un mois de la poussée (Figure 12).

Une poussée est définie par : une augmentation supérieure ou égale à 4 points du score SLEDAI et/ou une augmentation de PGA  $\geq 1$  et/ou un changement dans la prise en charge thérapeutique.

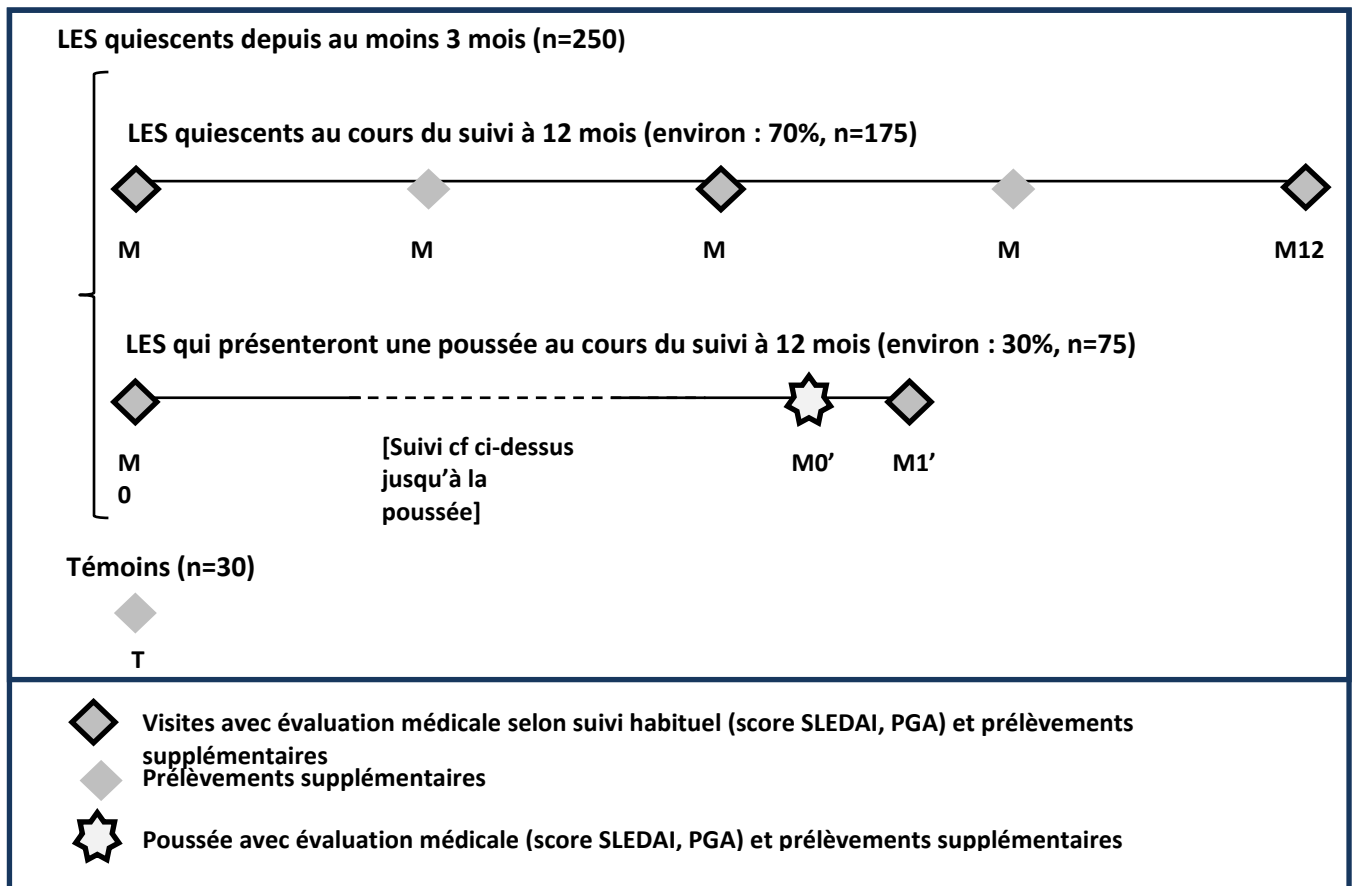


Figure 12. Schéma du déroulement de l'étude « GADD34\_LES ».

Lors des visites M0, M6 et M12 qui ont lieu au cours du suivi habituel du patient, ont été effectuées : une évaluation médicale comprenant au minimum le score SLEDAI avec PGA, la

liste des traitements et le relevé des évènements indésirables ainsi que les critères d'inclusion, les antécédents médicaux et les données ethniques pour la visite M0. Aux temps M0, M3, M6, M9 et M12, les examens biologiques de routine comprenant le dosage des protéines C3 et C4 du complément, le TH50 (mesure de l'activité globale de la voie classique du complément), la recherche d'anticorps anti-nucléaires et anti-ADN si positivité des anti-nucléaires, la NFS plaquettes, la créatininémie et une bandelette urinaire. Les tubes nécessaires à la réalisation des explorations spécifiques à l'étude (PCR quantitative sur PBMC, collection de plasma pour le dosage des cytokines), ont été également prélevés.

Actuellement, les inclusions de l'étude « GADD34\_LES » sont terminées, ainsi que le suivi des patients, à l'exception des patients suivis au CHU de Marseille (fin du suivi en janvier 2021). Au total, 167 patients ont été inclus (au CHU de Marseille, un nombre de patients inférieur par rapport à ce qui était attendu a été inclus). L'analyse des données biologiques concernant l'objectif principal sont actuellement en cours ; l'analyse des données concernant l'étude ancillaire est terminée.

## **2.6 Etude ancillaire du PHRC «GADD34\_LES»**

L'objectif de l'étude ancillaire du PHRC « GADD34\_LES » était l'identification des sous-populations leucocytaires surexprimant le gène codant pour GADD34.

### **2.6.1 Matériel et Méthodes**

#### **Population de l'étude et cellules**

Trente patients atteints de LES ont été inclus dans le Service de Médecine Interne du CHU Grenoble Alpes. Les critères d'inclusions et de non-inclusions ont été détaillées ci-dessus (cf. 2.4). Trente sujets témoins appariés en sexe et âge avec les patients ont été inclus par le

Centre d'Investigation Clinique du CHUGA. Les aspects réglementaires du protocole « GADD34\_LES » ont été détaillés dans le paragraphe 2.2. Sur le total de trente couples patients-témoins, les échantillons de quatre d'entre eux n'ont pas pu être analysés, à cause d'une quantité insuffisante d'ARN. Tous les patients et les sujets témoins étaient des femmes, âgées entre 23 et 63 ans pour les patientes (moyenne =  $42,5 \pm 12,2$ ) et entre 22 et 61 ans pour les sujets témoins (moyenne =  $42,9 \pm 11,2$ ).

Le sang périphérique (28 mL) des patients et sujets témoins a été collecté sur tubes EDTA (Becton Dickinson). Le sang a été dilué avec du PBS (jusqu'à 20 ml pour 7 ml de sang). Ensuite, 10 ml d'un milieu de séparation (Ficoll® Eurobio AbCys), permettant d'isoler les cellules mononuclées (PBMC), ont été déposés au fond du tube. Les PBMC ont été séparées par centrifugation sur gradient de densité (800g, 20 minutes, à TA). L'anneau contenant les cellules d'intérêt a été prélevé. Une étape de lavage avec du PBS a ensuite été réalisée (centrifugation 400g, 10min à 4°C). Une étape de lyse des globules rouges avec du NH<sub>4</sub>Cl 0,8 %, 0.1 mM EDTA, pH 7,2 a été effectuée ; suivie par un deuxième lavage. Enfin pour enlever les plaquettes une centrifugation à basse vitesse (200g, 10min, 4°C) a été réalisée. Le nombre total de leucocytes, ainsi que les pourcentages de lymphocytes, monocytes et granulocytes, ont été obtenus à l'aide d'ABX Micros 60 Horiba Medical.

Les lymphocytes T, les lymphocytes B et les monocytes ont été isolés à partir des PBMC grâce à des méthodes de séparation magnétique par sélection négative (pour les lymphocytes T) ou par sélection positive (pour les lymphocytes B et les monocytes) à l'aide de l'autoMACS Miltenyi (Pan T Cell IsolationKkit ; CD19 Microbeads ; CD14 Microbeads, Miltenyi), en accord avec les instructions du fournisseur. La pureté des sous-populations leucocytaires (98% pour les lymphocytes T et B, environ 80% pour les monocytes, comme annoncé dans les notices fournisseur) a été évaluée par cytométrie en flux après marquage des cellules avec les anticorps suivants : CD45-V500, CD3-FITC, CD14-PerCP (Becton Dickinson) et CD19-PE (Beckman



Coulter). L'acquisition a été réalisée avec le cytomètre FACSCanto II (Becton Dickinson) et l'analyse effectuée avec le logiciel DIVA 6.

### **PCR quantitative**

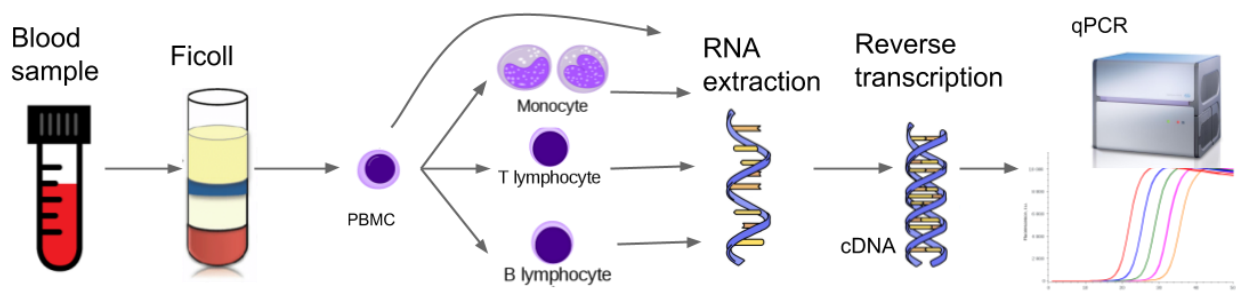
L'ARN total a été extrait, à partir des PBMC, lymphocytes T, lymphocytes B et monocytes, avec le kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN), comprenant une étape de dégradation de l'ADN par la DNase I (RNase-free DNase set, QIAGEN). La quantité, la pureté et la qualité de l'ARN extrait ont été analysées par un dosage spectrophotométrique au NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) ; la concentration de l'ARN a été calculée par la mesure de l'absorbance à 260 nm et la pureté de l'ARN par le ratio de l'absorbance à 260 nm et 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$  compris entre 1,8 et 2,1). La réaction de rétrotranscription a été réalisée à partir de 250 ng d'ARN total avec 200 ng de random primers hexamers, 10 mM de mix de dNTP Set mix, 0.1M de DTT, 40 unités/ $\mu$ L de RNase OUT (inhibiteur de ribonucléases) et 200 unités de la SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies).

La PCR quantitative a été réalisée avec le Light Cycler 480 SYBR green I Master mix (Roche) et 200 nM de chaque primer. 5 $\mu$ l d'ADNc de chaque échantillon (dilué au 1 :20) ont été ajoutés à 15 $\mu$ l de mix PCR préalablement préparé contenant le Master Mix et les primers. Les primers utilisés pour la PCR quantitative, dessinés à l'aide du logiciel Primer3, sont les suivants : GADD34 (S 5'-TCCGAGTGGCCATCTATGTA-3', AS 5'-AGGGTCCGGATCATGAGTAG-3') ; GAPDH (S 5'-TGGTATCGTGGAAGGACTCA-3', AS 5'-CCAGTAGAGGCAGGGATGAT-3').

L'amplification a été réalisée à l'aide du Light Cycler 480 (Roche) selon les conditions suivantes de réalisation : 10min à 95°C, hybridation des amorces à 55°C (20 secondes), et élongation à 72°C (20 secondes), 40 cycles. Chaque échantillon a été analysé en duplicata sur chaque plaque de qPCR et lors de deux expériences de qPCR différentes. La concentration en ADNc de chaque échantillon a été normalisée par rapport à l'expression du gène

« housekeeping » GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase). L'analyse des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel 480 (Roche) ainsi que le logiciel REST-MCS version 2, Relative Expression Software Tool-Multiple Condition Solver (méthode des  $\Delta\Delta Ct$ ). Une courbe de dissociation a été réalisée pour vérifier la spécificité du produit amplifié.

Un schéma général de la procédure expérimentale est représenté en Figure 13.



**Figure 13.** Schéma général de la procédure expérimentale pour l'étude ancillaire du PHRC « GADD34\_LES ».

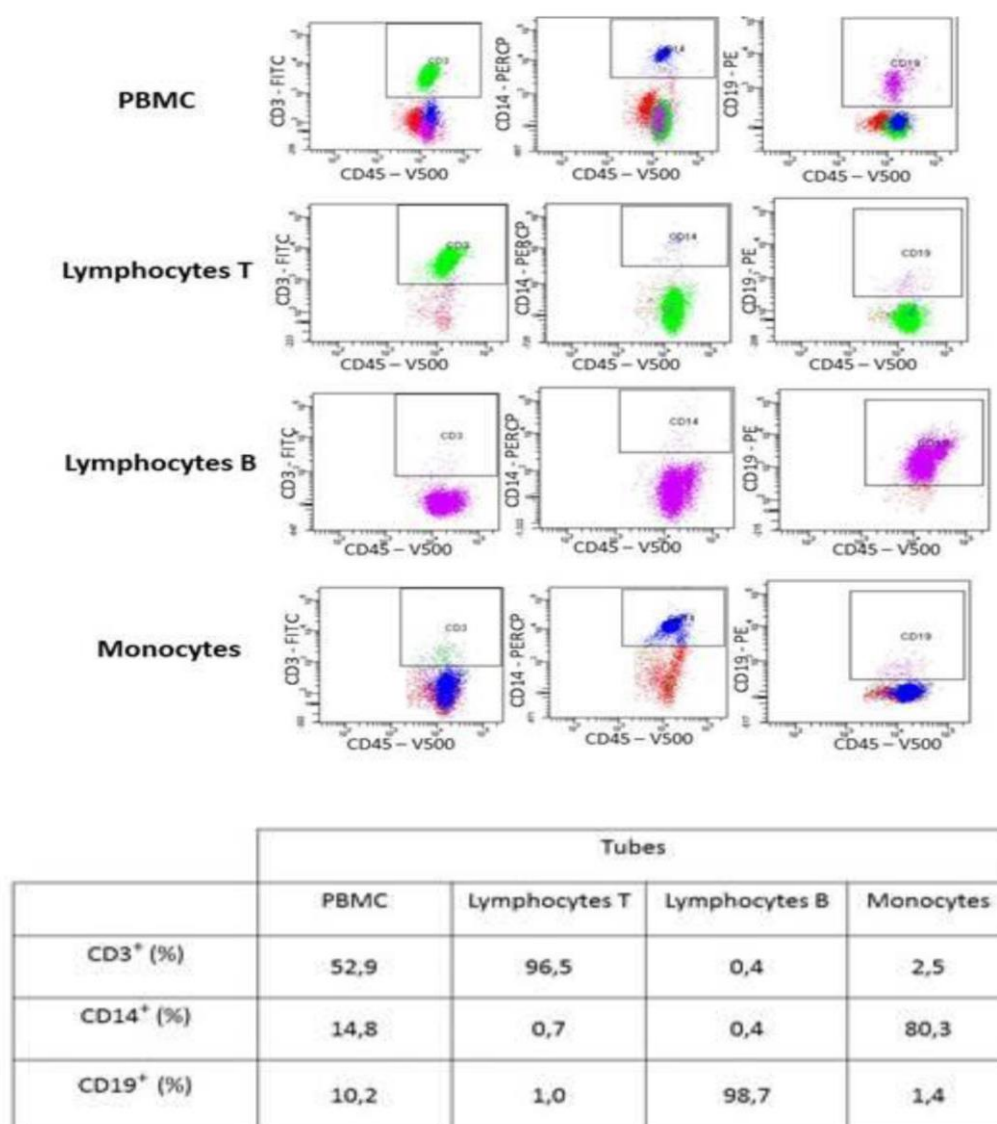
### Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Stata v14.2 (StataCorp, College Station, TX). Les paramètres qualitatifs sont exprimés par leur nombre et pourcentage ; les paramètres quantitatifs sont exprimés par leur médiane [25th ; 75th percentile] et un intervalle de confiance de 95%.

## 2.6.2 Résultats

L'expression du gène codant pour GADD34 a été quantifiée par PCR quantitative dans les PBMC, les lymphocytes T et B et les monocytes de patients atteints de lupus érythémateux systémique (n=26) en comparaison avec des témoins (n=26) appariés par sexe et âge.

La pureté des sous-populations leucocytaires a été évaluée par cytométrie en flux (cf paragraphe 2.6.1). Un exemple d'analyse de la pureté des sous-populations leucocytaires pour un patient est montré en Figure 14.



**Figure 14.** Évaluation de la pureté des populations leucocytaires par cytométrie en flux. Les lymphocytes T, les lymphocytes B et les monocytes ont été isolés à partir des PBMC avec une technique automatisée de séparation magnétique.

GADD34 a été trouvé surexprimé dans les PBMC de 8 patients (32%) (IC 95% = [14,9% ; 53,5%], en comparaison avec les sujets témoins appariés (le seuil de surexpression  $\geq 2$  par rapport aux sujets témoins a été considéré). Les valeurs moyennes et la distribution des données d'expression de GADD34 (25<sup>ème</sup> et 75<sup>ème</sup> percentiles) sont montrées dans le Table II.

	SLE Patients (n= 25)	SLE patients over expressing GADD34 in PBMC (n=8)	SLE patients not overexpressing GADD34 in PBMC (n=17)
<b>GADD34 expression in PBMC</b>	1 [-4.5 ; 5.5]	5.25 [2.9 ; 6.1]	-1.3 [-3.3 ; 1]

**Tableau II.** Expression de GADD34 dans les PBMC de patients atteints de LES. Médiane [25<sup>ème</sup> ; 75<sup>ème</sup> percentiles]. A noter l'effectif des patients atteints de LES de n=25 car une donnée de quantification de l'expression de GADD34 dans les PBMC était manquante pour un patient.

Chez les 8 patients qui surexprimaient GADD34 dans les PBMC, GADD34 était principalement surexprimé dans les lymphocytes B (chez 7 patients, 87,5%, IC 95% = [47,3% ; 99,7%] et dans les monocytes (chez 5 patients, 62%, IC 95% = [24,5% ; 91,5%]. De plus, chez les 17 patients qui ne surexprimaient pas GADD34 dans les PBMC, GADD34 était exprimé surtout dans les lymphocytes B (chez 13 patients, 76,5%, IC 95% = [50,1% ; 93,2%] (Tableau III).

	<b>SLE patients overexpressing GADD34 in PBMC (n=8)</b>	<b>SLE patients not overexpressing GADD34 in PBMC (n=17)</b>
<b>T lymphocytes</b>	n=8 3 (37.5%) [8.5% ; 75.5%]	n=15 1 (6.75%) [0.02% ; 31.9 %]
<b>B lymphocytes</b>	7 (87.5%) [47.3% ; 99.7%]	13 (76.47%) [50.1% ; 93.2%]
<b>Monocytes</b>	5 (62.5%) [24.5% ; 91.5%]	3 (17.65%) [3.8% ; 43.4%]

**Tableau III.** Nombre de patients surexprimant GADD34 dans les différentes populations leucocytaires. [Intervalle de confiance 95%].

La valeur médiane d'expression de GADD34 dans les sous-populations leucocytaires et la distribution des données (25<sup>ème</sup> et 75<sup>ème</sup> percentiles) sont montrées dans le Tableau IV.

	<b>SLE patients overexpressing GADD34 in PBMC (n=8)</b>	<b>SLE patients not overexpressing GADD34 in PBMC (n=17)</b>
<b>T lymphocytes</b>	1,65 [1,45 ; 3,45]	-1,3 [-4,1 ; 1,2]
<b>B lymphocytes</b>	5,8 [3,55 ; 11,7]	2,27 [2,1 ; 4,5]
<b>Monocytes</b>	2,6 [-0,2 ; 5,5]	-1,1 [-2,4 ; 1,3]

**Tableau IV.** Expression de GADD34 dans les différentes populations leucocytaires de patients atteints de LES. Médiane [25<sup>ème</sup> ; 75<sup>ème</sup> percentiles].

Nous avons donc voulu regarder si la surexpression de GADD34 principalement dans les lymphocytes B par rapport aux autres populations cellulaires explorées était statistiquement significative ; pour cela nous avons effectué un test non paramétrique afin de comparer la surexpression de GADD34 dans les populations leucocytaires étudiées.

	<b>T lymphocytes (n= 24)</b>	<b>B lymphocytes (n=26)</b>	<b>Monocytes (n=26)</b>	<b>p value</b>
<b>SLE patients overexpressing GADD34</b>	16.7% (4) [4.7% ; 37.4%]	80.8% (21) [60.6% ; 93.4%]	30.8% (8) [14.3% ; 51.8%]	<b>≤0.0001*</b>

**Tableau V.** Comparaison de la surexpression de GADD34 dans les populations leucocytaires. Pourcentage (Effectif), [Intervalle de confiance 95%]

\*test Q de Cochran

p= 0.0003 pour la comparaison lymphocytes B vs lymphocytes T

p= 0.0009 pour la comparaison lymphocytes B vs monocytes

p= 0.3074 pour la comparaison lymphocytes T vs monocytes

Nous pouvons conclure qu'il existe une différence statistiquement significative de répartition de la surexpression de GADD34 selon le type leucocytaire. Compte tenu des comparaisons multiples, un ajustement du seuil statistique a été réalisé avec la méthode de Bonferroni. On constate une différence statistiquement significative avec un nombre de patients de patients qui surexpriment GADD34 (21 patients parmi les 26 de l'étude) plus élevé pour les lymphocytes B comparativement aux lymphocytes T ( $p \leq 0.001$ ) et monocytes ( $p \leq 0.001$ ).

Ces résultats mettent en évidence l'existence d'une Unfolded Protein Response au cours du lupus érythémateux systémique et en particulier la surexpression de GADD34 par les lymphocytes B et les monocytes des patients lupiques.

### 3. DISCUSSION

L'implication de l'UPR dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la physiopathologie des maladies auto-immunes a été mise en évidence au cours des dernières dix années ; la voie de l'UPR la plus étudiée a été celle initiée par IRE1, la plus conservée au cours de l'évolution, alors que la voie de signalisation médiée par PERK a été jusqu'à présent relativement peu explorée.

GADD34 est une protéine clé dans l'UPR, responsable d'une boucle de régulation négative de la voie médiée par PERK (17), qui a été également montrée être nécessaire pour la production de cytokines pro-inflammatoires dans un modèle murin d'infection virale (37) (38). Récemment, nous avons mis en évidence l'expression du gène codant pour GADD34 chez les patients atteints de lupus érythémateux systémique : une surexpression de GADD34 a été décrite chez 49% des patients explorés, associée à la surexpression de CHOP, permettant de mettre en évidence l'implication de l'UPR et en particulier de la voie de signalisation médiée par PERK chez les patients lupiques (2). Les cytokines pro-inflammatoires et plus particulièrement les interférons de type I jouent un rôle dans la pathogénie du LES (6) (67). De façon intéressante, une relation entre la surexpression de GADD34 et la surexpression des gènes codants pour l'IFN- $\alpha$ , l'IFN- $\beta$  et les gènes de réponse à l'IFN ISG15 et IFIH1 a été mise en évidence (2). Cependant, les mécanismes de l'UPR dans la physiopathologie des maladies auto-immunes et notamment dans le LES, doivent être élucidés.

Le LES est une pathologie chronique dont l'activité varie pendant son évolution. Les poussées peuvent être responsables d'atteintes pouvant mener à des défaillances d'organes. La prédiction de ces poussées et l'adaptation éventuelle des traitements de manière préventive pourrait permettre de limiter la gravité de ces atteintes et d'améliorer la prise en charge des patients lupiques. Dans le cadre du diagnostic du LES, certains marqueurs biologiques sont actuellement utilisés, tel que les anticorps anti-nucléaires, les anticorps anti-ADN natif, les

anticorps anti-ENA (Extractable Nuclear Antigen), la concentration des protéines C3 et C4 du complément (75). Cependant, ces marqueurs ont une valeur pronostique limitée pour la prédiction des poussées. Dans cette perspective, la recherche de nouveaux biomarqueurs pronostiques est nécessaire, afin de permettre une prise en charge des patients précoce et adaptée (76) (77). L'investigation de GADD34 en tant que marqueur pronostique de la survenue de poussée est évaluée dans le PHRC interrégional « GADD34\_LES », coordonné par le laboratoire d'immunologie du CHU Grenoble Alpes et actuellement en cours. L'objectif principal de ce projet de recherche est l'évaluation pronostique de l'augmentation de l'expression du gène codant pour GADD34 dans les cellules mononucléées sanguines de patients atteints de lupus érythémateux systémique, sur 12 mois de suivi. Les inclusions des patients sont terminées, ainsi que le suivi (à l'exception des patients suivis au CHU de Marseille), les analyses biologiques sont en cours.

Une étude ancillaire du PHRC « GADD34\_LES » a pour objectif l'identification des sous-populations leucocytaires surexprimant GADD34. L'expression de GADD34 a été étudiée dans les lymphocytes T, lymphocytes B et les monocytes isolés à partir des PBMC chez vingt-six patients lupiques, en comparaison avec vingt-six sujets sains. Le gène codant pour GADD34 a été trouvé surexprimé principalement dans les lymphocytes B, chez 21 patients parmi les 26 étudiés. Ces résultats permettent une meilleure compréhension des mécanismes d'implication de l'UPR dans la physiopathologie du lupus. Les lymphocytes B jouent un rôle primordial dans la physiopathologie du lupus tant par leur capacité à présenter les auto-antigènes ou à produire des cytokines, que par leur capacité à se différencier en plasmocytes producteur d'auto-anticorps (6) (46). De façon intéressante, dans les lymphocytes B l'UPR est partie du programme de différenciation cellulaire en plasmocytes, avec un rôle essentiel dans la synthèse des immunoglobulines (78). En effet, la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes requiert une importante augmentation des capacités de biosynthèse afin de produire les immunoglobulines dans le réticulum endoplasmique (35). Nous avons observé la surexpression de



GADD34 principalement dans les lymphocytes B, aussi chez les patients dans lesquels GADD34 n'était pas surexprimé au niveau des PBMC. Cela pourrait nous indiquer que nous pourrions sous-estimer la surexpression de GADD34 chez les patients si nous évaluons son expression seulement dans les PBMC ; il faudra prendre en compte l'éventuel manque de puissance pour l'évaluation de l'objectif principal du PHRC, qui est cependant réalisée sur un nombre de patients plus élevé.

Les thérapies du LES reposent sur un traitement de fond par hydroxychloroquine (Plaquenil) et éventuellement par corticothérapie ou AINS au cours des poussées. Pour les formes plus sévères, un traitement immunosuppresseur peut être mis en place, notamment par mycophénolate mofetil (Cellecept). Le méthotrexate est utilisé lorsque les atteintes articulaires sont marquées. Le développement récent des biothérapies a fait évoluer la prise en charge de la pathologie (79). Les biothérapies ciblant les lymphocytes B tel que les anticorps anti-BLyS (bélimumab), qui ont récemment obtenu l'AMM pour le traitement des patients lupiques avec une activité de la maladie élevée en échec des traitements standard, ou les anti-CD20 (rituximab), sont parmi les plus utilisées (80). Cependant ces traitements ne permettent pas d'obtenir une amélioration de l'état clinique chez tous les patients. Ceci est dû à la diversité de la présentation clinique du LES, et l'hétérogénéité des traitements permet la prise en charge de ces différents types d'atteintes.

Dans ce contexte, la recherche de nouvelles cibles d'intérêt pour le développement de thérapies adaptées pourrait être essentielle. Des inhibiteurs spécifiques de GADD34 tels que le guanabenz (52) ou la sephin1 (5) ont été décrits. Ces molécules protègent les cellules contre les effets délétères de l'accumulation de protéines mal repliées au cours de pathologies tel que le diabète et les maladies neurodégénératives (58) (59) (81). En effet, GADD34 pourrait représenter une cible thérapeutique potentielle pour des pathologies inflammatoires et auto-immunes avec une activation de l'UPR : cibler spécifiquement les cellules productrices des auto-anticorps ou des cytokines pro-inflammatoires pourrait contribuer à réduire l'inflammation et les

poussées de la pathologie. En perspective, il serait intéressant d'explorer les effets *in vitro* de ces molécules et en particulier de la sephin1 sur les lymphocytes et monocytes de patients atteints de LES, ainsi que *in vivo* dans des modèles murins de lupus.

**THÈSE SOUTENUE PAR :** Giovanna CLAVARINO

**TITRE :** UNFOLDED PROTEIN RESPONSE ET AUTO-IMMUNITÉ :  
FOCUS SUR GADD34 ET LE LUPUS ÉRYTHÉMATEUX SYSTÉMIQUE

**CONCLUSION :**

L'Unfolded Protein Response (UPR) est un réseau de voies de signalisation qui permet de rétablir l'homéostasie au sein du réticulum endoplasmique suite à l'accumulation de protéines mal repliées. Nous avons étudié la voie de transduction du signal médiée par le facteur de transcription ATF4 ; GADD34, cofacteur de la phosphatase PP1 inductible par le stress, y joue un rôle crucial car il est responsable d'une boucle de régulation négative de l'UPR. Nous rappelons également l'état de la littérature concernant l'implication de l'UPR dans l'immunité innée et adaptative et l'auto-immunité.

Nous avons mis en place le Projet Hospitalier de Recherche Clinique interrégional « GADD34\_LES » qui a pour objectif principal l'évaluation de l'augmentation de l'expression du gène codant pour GADD34 chez les patients lupiques comme possible biomarqueur pronostique de poussée. Dans le cadre d'une étude ancillaire de ce PHRC portant sur 26 patients et 26 sujets sains, nous avons mesuré l'expression du gène codant pour GADD34 par PCR quantitative après séparation magnétique des lymphocytes T, lymphocytes B et monocytes à partir des PBMC. La surexpression de GADD34 principalement dans les lymphocytes B des patients lupiques par rapport aux autres populations cellulaires étudiées était statistiquement significative.

Dans le cadre du PHRC, l'augmentation de l'expression du gène codant pour GADD34 chez les patients lupiques comme marqueur pronostique de poussée reste à évaluer. Par ailleurs, des inhibiteurs spécifiques du complexe PP1/GADD34 existent, et ils pourraient éventuellement être testés *in vitro* pour cibler spécifiquement les cellules productrices d'anticorps ou de cytokines pro-inflammatoires.

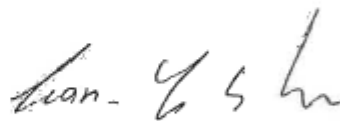
**VU ET PERMIS D'IMPRIMER**

Grenoble, le : 4 nov. 2021

**LE DOYEN**

Michel SEVE

**LE DIRECTEUR DE THÈSE :**

**LE TUTEUR UNIVERSITAIRE :**



## BIBLIOGRAPHIE

1. Cláudio N, Dalet A, Gatti E, Pierre P. Mapping the crossroads of immune activation and cellular stress response pathways. *EMBO J.* 2 mai 2013;32(9):1214-24.
2. Plazy C, Dumestre-Pérard C, Sarrot-Reynauld F, Audoin P, Quesada J-L, Pierre P, et al. Letter to the Editor: Protein phosphatase 1 subunit Ppp1r15a/GADD34 is overexpressed in systemic lupus erythematosus and related to the expression of type I interferon response genes. *Autoimmun Rev.* 2019;18(2):211-3.
3. Hetz C, Chevet E, Harding HP. Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov.* sept 2013;12(9):703-19.
4. Tsaytler P, Bertolotti A. Exploiting the selectivity of protein phosphatase 1 for pharmacological intervention. *FEBS J.* janv 2013;280(2):766-70.
5. Das I, Krzyzosiak A, Schneider K, Wrabetz L, D'Antonio M, Barry N, et al. Preventing proteostasis diseases by selective inhibition of a phosphatase regulatory subunit. *Science.* 10 avr 2015;348(6231):239-42.
6. Mathian A, Arnaud L, Amoura Z. [Physiopathology of systemic lupus erythematosus: a 2014 update]. *Rev Med Interne.* août 2014;35(8):503-11.
7. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 18 janv 2012;13(2):89-102.
8. Schneider K, Nelson GM, Watson JL, Morf J, Dalglisch M, Luh LM, et al. Protein Stability Buffers the Cost of Translation Attenuation following eIF2 $\alpha$  Phosphorylation. *Cell Rep.* 15 sept 2020;32(11):108154.
9. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* juin 2000;2(6):326-32.
10. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* 28 déc 2001;107(7):881-91.
11. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell.* nov 2000;6(5):1099-108.
12. Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell.* mai 2000;5(5):897-904.
13. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell.* mars 2003;11(3):619-33.
14. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 15 déc 2004;18(24):3066-77.

15. Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol.* 28 mai 2001;153(5):1011-22.
16. Ma Y, Hendershot LM. Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem.* 12 sept 2003;278(37):34864-73.
17. Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Jungreis R, Harding HP, Ron D. Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *EMBO J.* 3 mars 2003;22(5):1180-7.
18. Zhou W, Brush MH, Choy MS, Shenolikar S. Association with endoplasmic reticulum promotes proteasomal degradation of GADD34 protein. *J Biol Chem.* 17 juin 2011;286(24):21687-96.
19. Brush MH, Shenolikar S. Control of cellular GADD34 levels by the 26S proteasome. *Mol Cell Biol.* déc 2008;28(23):6989-7000.
20. Jousse C, Oyadomari S, Novoa I, Lu P, Zhang Y, Harding HP, et al. Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CReP, promotes survival of stressed cells. *J Cell Biol.* 24 nov 2003;163(4):767-75.
21. Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest.* nov 2002;110(10):1389-98.
22. Ozcan L. Endoplasmic reticulum stress in cardiometabolic disorders. *Curr Atheroscler Rep.* oct 2012;14(5):469-75.
23. Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol.* 25 juin 2012;197(7):857-67.
24. Matus S, Glimcher LH, Hetz C. Protein folding stress in neurodegenerative diseases: a glimpse into the ER. *Curr Opin Cell Biol.* avr 2011;23(2):239-52.
25. D'Antonio M, Feltri ML, Wrabetz L. Myelin under stress. *J Neurosci Res.* 15 nov 2009;87(15):3241-9.
26. Lin W, Popko B. Endoplasmic reticulum stress in disorders of myelinating cells. *Nat Neurosci.* avr 2009;12(4):379-85.
27. Delépine M, Nicolino M, Barrett T, Golamaully M, Lathrop GM, Julier C. EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat Genet.* août 2000;25(4):406-9.
28. Mallone R, Eizirik DL. Presumption of innocence for beta cells: why are they vulnerable autoimmune targets in type 1 diabetes? *Diabetologia.* oct 2020;63(10):1999-2006.
29. Martinon F, Chen X, Lee A-H, Glimcher LH. TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat Immunol.* mai 2010;11(5):411-8.
30. Martinon F, Glimcher LH. Regulation of innate immunity by signaling pathways emerging from the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Immunol.* févr 2011;23(1):35-40.

31. Iwakoshi NN, Pypaert M, Glimcher LH. The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *J Exp Med*. 1 oct 2007;204(10):2267-75.
32. Metcalf MG, Higuchi-Sanabria R, Garcia G, Tsui CK, Dillin A. Beyond the cell factory: Homeostatic regulation of and by the UPRER. *Sci Adv*. juill 2020;6(29):eabb9614.
33. Bogaert S, De Vos M, Olievier K, Peeters H, Elewaut D, Lambrecht B, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in inflammatory bowel disease: a different implication for colonic and ileal disease? *PLoS One*. 2011;6(10):e25589.
34. Kaser A, Lee A-H, Franke A, Glickman JN, Zeissig S, Tilg H, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell*. 5 sept 2008;134(5):743-56.
35. Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, Vallabhajosyula P, Szomolanyi-Tsuda E, Gravalles EM, et al. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature*. 19 juill 2001;412(6844):300-7.
36. Iwakoshi NN, Lee A-H, Vallabhajosyula P, Otipoby KL, Rajewsky K, Glimcher LH. Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nat Immunol*. avr 2003;4(4):321-9.
37. Clavarino G, Cláudio N, Dalet A, Terawaki S, Couderc T, Chasson L, et al. Protein phosphatase 1 subunit Ppp1r15a/GADD34 regulates cytokine production in polyinosinic:polycytidylic acid-stimulated dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 21 févr 2012;109(8):3006-11.
38. Clavarino G, Cláudio N, Couderc T, Dalet A, Judith D, Camosseto V, et al. Induction of GADD34 is necessary for dsRNA-dependent interferon- $\beta$  production and participates in the control of Chikungunya virus infection. *PLoS Pathog*. 2012;8(5):e1002708.
39. Couderc T, Chrétien F, Schilte C, Disson O, Brigitte M, Guivel-Benhassine F, et al. A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. *PLoS Pathog*. 8 févr 2008;4(2):e29.
40. Schilte C, Couderc T, Chretien F, Sourisseau M, Gangneux N, Guivel-Benhassine F, et al. Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. *J Exp Med*. 15 févr 2010;207(2):429-42.
41. Dalet A, Argüello RJ, Combes A, Spinelli L, Jaeger S, Fallet M, et al. Protein synthesis inhibition and GADD34 control IFN- $\beta$  heterogeneous expression in response to dsRNA. *EMBO J*. 15 2017;36(6):761-82.
42. Clavarino G, Adriouach S, Quesada J-L, Clay M, Chevreau M, Trocmé C, et al. Unfolded protein response gene GADD34 is overexpressed in rheumatoid arthritis and related to the presence of circulating anti-citrullinated protein antibodies. *Autoimmunity*. 2016;49(3):172-8.
43. Kirou KA, Lee C, George S, Louca K, Papagiannis IG, Peterson MGE, et al. Coordinate overexpression of interferon-alpha-induced genes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. déc 2004;50(12):3958-67.
44. Chiche L, Jourde-Chiche N, Whalen E, Presnell S, Gersuk V, Dang K, et al. Modular transcriptional repertoire analyses of adults with systemic lupus erythematosus reveal distinct

- type I and type II interferon signatures. *Arthritis Rheumatol* Hoboken NJ. juin 2014;66(6):1583-95.
45. Rose T, Grützkau A, Hirseland H, Huscher D, Dähnrich C, Dzionek A, et al. IFN $\alpha$  and its response proteins, IP-10 and SIGLEC-1, are biomarkers of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. oct 2013;72(10):1639-45.
  46. Adhya Z, Borozdenkova S, Karim MY. The role of cytokines as biomarkers in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. oct 2011;26(10):3273-80.
  47. Kraskiewicz H, FitzGerald U. InterFERing with endoplasmic reticulum stress. *Trends Pharmacol Sci*. févr 2012;33(2):53-63.
  48. Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, et al. A selective inhibitor of eIF2 $\alpha$  dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science*. 11 févr 2005;307(5711):935-9.
  49. Sokka A-L, Putkonen N, Mudo G, Pryazhnikov E, Reijonen S, Khiroug L, et al. Endoplasmic reticulum stress inhibition protects against excitotoxic neuronal injury in the rat brain. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 24 janv 2007;27(4):901-8.
  50. Colla E, Coune P, Liu Y, Pletnikova O, Troncoso JC, Iwatsubo T, et al. Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of  $\alpha$ -synucleinopathy in vivo. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 7 mars 2012;32(10):3306-20.
  51. Saxena S, Cabuy E, Caroni P. A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat Neurosci*. mai 2009;12(5):627-36.
  52. Tsaytler P, Harding HP, Ron D, Bertolotti A. Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science*. 1 avr 2011;332(6025):91-4.
  53. Holmes B, Brogden RN, Heel RC, Speight TM, Avery GS. Guanabenz. A review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy in hypertension. *Drugs*. sept 1983;26(3):212-29.
  54. Kim I, Xu W, Reed JC. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. déc 2008;7(12):1013-30.
  55. Crunkhorn S. Neurodegenerative disease: Phosphatase inhibitor prevents protein-misfolding diseases. *Nat Rev Drug Discov*. juin 2015;14(6):386.
  56. Thapa S, Abdelaziz DH, Abdulrahman BA, Schatzl HM. Sephin1 Reduces Prion Infection in Prion-Infected Cells and Animal Model. *Mol Neurobiol*. mai 2020;57(5):2206-19.
  57. Burska A, Boissinot M, Ponchel F. Cytokines as biomarkers in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:545493.
  58. Wang L, Popko B, Tixier E, Roos RP. Guanabenz, which enhances the unfolded protein response, ameliorates mutant SOD1-induced amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. nov 2014;71:317-24.
  59. Sibilla C, Bertolotti A. Prion Properties of SOD1 in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Potential Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3 oct 2017;9(10).

60. Grandjean JMD, Wiseman RL. Small molecule strategies to harness the unfolded protein response: where do we go from here? *J Biol Chem*. 04 2020;
61. Pons-Estel GJ, Ugarte-Gil MF, Alarcón GS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Expert Rev Clin Immunol*. 2017;13(8):799-814.
62. Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 1 déc 2011;365(22):2110-21.
63. Isenberg DA, Manson JJ, Ehrenstein MR, Rahman A. Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end? *Rheumatol Oxf Engl*. juill 2007;46(7):1052-6.
64. Bouts YM, Wolthuis DFGJ, Dirx MFM, Pieterse E, Simons EMF, van Boekel AM, et al. Apoptosis and NET formation in the pathogenesis of SLE. *Autoimmunity*. déc 2012;45(8):597-601.
65. Shao W-H, Cohen PL. Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 28 févr 2011;13(1):202.
66. Obermoser G, Pascual V. The interferon-alpha signature of systemic lupus erythematosus. *Lupus*. août 2010;19(9):1012-9.
67. Niewold TB. Interferon alpha as a primary pathogenic factor in human lupus. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res*. déc 2011;31(12):887-92.
68. Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science*. 16 nov 2001;294(5546):1540-3.
69. Jego G, Palucka AK, Blanck J-P, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity*. août 2003;19(2):225-34.
70. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4 mars 2003;100(5):2610-5.
71. Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med*. 17 mars 2003;197(6):711-23.
72. Yap DYH, Lai KN. The role of cytokines in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus - from bench to bedside. *Nephrol Carlton Vic*. avr 2013;18(4):243-55.
73. Rönnelid J, Tejde A, Mathsson L, Nilsson-Ekdahl K, Nilsson B. Immune complexes from SLE sera induce IL10 production from normal peripheral blood mononuclear cells by an FcγRII dependent mechanism: implications for a possible vicious cycle maintaining B cell hyperactivity in SLE. *Ann Rheum Dis*. janv 2003;62(1):37-42.
74. Petri MA, van Vollenhoven RF, Buyon J, Levy RA, Navarra SV, Cervera R, et al. Baseline predictors of systemic lupus erythematosus flares: data from the combined placebo groups in the phase III belimumab trials. *Arthritis Rheum*. août 2013;65(8):2143-53.



75. Pisetsky DS, Lipsky PE. New insights into the role of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. 3 sept 2020;
76. Fu SM, Dai C, Zhao Z, Gaskin F. Anti-dsDNA Antibodies are one of the many autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *F1000Research*. 2015;4(F1000 Faculty Rev):939.
77. Liu C-C, Kao AH, Manzi S, Ahearn JM. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: challenges and prospects for the future. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. août 2013;5(4):210-33.
78. Brewer JW, Hendershot LM. Building an antibody factory: a job for the unfolded protein response. *Nat Immunol*. janv 2005;6(1):23-9.
79. Karim MY, Pisoni CN, Khamashta MA. Update on immunotherapy for systemic lupus erythematosus--what's hot and what's not! *Rheumatol Oxf Engl*. avr 2009;48(4):332-41.
80. Dörner T, Furie R. Novel paradigms in systemic lupus erythematosus. *Lancet Lond Engl*. 8 juin 2019;393(10188):2344-58.
81. Ghemrawi R, Khair M. Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*. 25 août 2020;21(17).
82. Petri M, Orbai A-M, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. août 2012;64(8):2677-86.

## ANNEXES

### Annexe I.

A.Critères ACR (American College of Rheumatology) pour le diagnostic du lupus érythémateux ; critères du 1982, modifiés en 1997.

Criterion	Definition
1. Malar Rash	Fixed erythema, flat or raised, over the malar eminences, tending to spare the nasolabial folds
2. Discoid rash	Erythematous raised patches with adherent keratotic scaling and follicular plugging; atrophic scarring may occur in older lesions
3. Photosensitivity	Skin rash as a result of unusual reaction to sunlight, by patient history or physician observation
4. Oral ulcers	Oral or nasopharyngeal ulceration, usually painless, observed by physician
5. Nonerosive Arthritis	Involving 2 or more peripheral joints, characterized by tenderness, swelling, or effusion
6. Pleuritis or Pericarditis	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pleuritis--convincing history of pleuritic pain or rubbing heard by a physician or evidence of pleural effusion</li> <li>1. OR</li> <li>2. Pericarditis--documented by electrocardiogram or rub or evidence of pericardial effusion</li> </ol>
7. Renal Disorder	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Persistent proteinuria &gt; 0.5 grams per day or &gt; than 3+ if quantitation not performed</li> <li>1. OR</li> <li>2. Cellular casts--may be red cell, hemoglobin, granular, tubular, or mixed</li> </ol>
8. Neurologic Disorder	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Seizures--in the absence of offending drugs or known metabolic derangements; e.g., uremia, ketoacidosis, or electrolyte imbalance</li> <li>1. OR</li> <li>2. Psychosis--in the absence of offending drugs or known metabolic derangements, e.g., uremia, ketoacidosis, or electrolyte imbalance</li> </ol>
9. Hematologic Disorder	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Hemolytic anemia--with reticulocytosis</li> <li>1. OR</li> <li>2. Leukopenia--&lt; 4,000/mm<sup>3</sup> on ≥ 2 occasions</li> <li>1. OR</li> <li>3. Lymphopenia--&lt; 1,500/mm<sup>3</sup> on ≥ 2 occasions</li> <li>1. OR</li> <li>4. Thrombocytopenia--&lt;100,000/mm<sup>3</sup> in the absence of offending drugs</li> </ol>
10. Immunologic Disorder	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Anti-DNA: antibody to native DNA in abnormal titer</li> <li>1. OR</li> <li>2. Anti-Sm: presence of antibody to Sm nuclear antigen</li> <li>1. OR</li> <li>3. Positive finding of antiphospholipid antibodies on: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. an abnormal serum level of IgG or IgM anticardiolipin antibodies,</li> <li>2. a positive test result for lupus anticoagulant using a standard method, or</li> <li>3. a false-positive test result for at least 6 months confirmed by Treponema pallidum immobilization or fluorescent treponemal antibody absorption test</li> </ol> </li> </ol>
11. Positive Antinuclear Antibody	An abnormal titer of antinuclear antibody by immunofluorescence or an equivalent assay at any point in time and in the absence of drugs

B. Critères SLICC (Systemic Lupus International Collaborating Clinics) pour le diagnostic du lupus érythémateux (adapté de (82))

Clinical criteria	Brief definition notes
Acute cutaneous lupus	Lupus malar rash (do not count if malar discoid), bullous lupus, toxic epidermal necrolysis variant of SLE, maculopapular lupus rash, photosensitive lupus rash or subacute cutaneous lupus (nonindurated psoriaform and/or annular polycyclic lesions that resolve without scarring, although occasionally with postinflammatory dyspigmentation or telangiectasias)
Chronic cutaneous lupus	Classical discoid rash [localised – above the neck; generalised – above and below the neck], hypertrophic (verrucous) lupus, lupus panniculitis (profundus), mucosal lupus, lupus erythematosus tumidus, chilblains lupus, discoid lupus/ lichen planus overlap
Oral ulcers	Palate [buccal, tongue] or nasal ulcers (in the absence of other causes)
Nonscarring alopecia	
Synovitis	≥2 joints, characterised by swelling or effusion or tenderness in ≥2 joints and ≥30 minutes of morning stiffness
Serositis	Typical pleurisy for >1 day, or pleural effusions, or pleural rub or typical pericardial pain for >1 day, or pericardial effusion, or pericardial rub, or pericarditis by ECG
Renal	Urine protein:creatinine ratio (or 24-hr urine protein) representing 500 mg protein/24 hr or red blood cell casts
Neurological	Seizures, psychosis, mononeuritis multiplex, myelitis, peripheral or cranial neuropathy, acute confusional state (in the absence of other causes)
Haemolytic anaemia	
Leucopenia	Leucopenia (<4000/mm <sup>3</sup> at least once) or lymphopenia (<1000/mm <sup>3</sup> at least once)
Thrombocytopenia	Platelet (<100,000/mm <sup>3</sup> ) at least once
<b>Immunological criteria</b>	
ANA	Above reference range
Anti-dsDNA	≥x2 above if ELISA
Anti-Smith	
Antiphospholipid	Lupus anticoagulant, false-positive RPR, medium- or high-titre anticardiolipin (IgA, IgG or IgM), anti-β <sub>2</sub> -glycoprotein I (IgA, IgG or IgM)
Low complement	Low C3, C4 or CH50
Positive direct Coombs' test	In the absence of haemolytic anaemia

**Classify a patient as having SLE if:**

- the patient satisfies 4 of the criteria listed in the table including at least 1 clinical criterion and 1 immunological criterion, *OR*
- the patient has biopsy-proven nephritis compatible with SLE and with ANA or anti-dsDNA antibodies.

**Note: criteria are cumulative and need not be present concurrently.**

**Annexe 2.** Score SELENA-SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) pour l'évaluation de l'activité du lupus érythémateux. Le SELENA-SLEDAI est une version modifiée du SLEDAI. La description de certains paramètres est légèrement modifiée, mais les systèmes/organes et les scores pondérés sont les mêmes que pour le SLEDAI. Le SELENA-SLEDAI mesure la présence ou l'absence de signes cliniques, de symptômes ou d'anomalies des examens de laboratoire du lupus.

**SELENA-SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) INSTRUMENT SCORE**

Check box: if descriptor is present at the time of visit or in the preceding 10 days.

Check if			
Wt	Present	Descriptor	Definition
8	<input type="checkbox"/>	Seizure	Recent onset (last 10 days). Exclude metabolic, infectious or drug cause, or seizure due to past irreversible CNS damage.
8	<input type="checkbox"/>	Psychosis	Altered ability to function in normal activity due to severe disturbance in the perception of reality. Include hallucinations; incoherence; marked loose associations; impoverished thought content; marked illogical thinking; bizarre, disorganized or catatonic behavior. Exclude uremia and drug causes.
8	<input type="checkbox"/>	Organic brain syndrome	Altered mental function with impaired orientation, memory or other intellectual function, with rapid onset and fluctuating clinical features. Include clouding of consciousness with reduced capacity to focus, and inability to sustain attention to environment, plus at least 2 of the following: perceptual disturbance, incoherent speech, insomnia or daytime drowsiness, or increased or decreased psychomotor activity. Exclude metabolic, infectious or drug causes.
8	<input type="checkbox"/>	Visual disturbance	Retinal and eye changes of SLE. Include cytoïd bodies, retinal hemorrhages, serous exudate or hemorrhages in the choroid, optic neuritis, scleritis or episcleritis. Exclude hypertension, infection or drug causes.
8	<input type="checkbox"/>	Cranial nerve disorder	New onset of sensory or motor neuropathy involving cranial nerves. Include vertigo due to lupus.
8	<input type="checkbox"/>	Lupus headache	Severe persistent headache: may be migrainous, but must be nonresponsive to narcotic analgesia.
8	<input type="checkbox"/>	CVA	New onset of cerebrovascular accident(s). Exclude arteriosclerosis or hypertensive causes.
8	<input type="checkbox"/>	Vasculitis	Ulceration, gangrene, tender finger nodules, periungual infarction, splinter hemorrhages, or biopsy or angiogram proof of vasculitis.
4	<input type="checkbox"/>	Arthritis	More than 2 joints with pain and signs of inflammation (i.e., tenderness, swelling or effusion).
4	<input type="checkbox"/>	Myositis	Proximal muscle aching/weakness, associated with elevated creatine phosphokinase/aldolase or electromyogram changes or a biopsy showing myositis.
4	<input type="checkbox"/>	Urinary casts	Heme-granular or red blood cell casts.
4	<input type="checkbox"/>	Hematuria	>5 red blood cells/high power field. Exclude stone, infection or other cause.
4	<input type="checkbox"/>	Proteinuria	New onset or recent increase of more than 0.5 gm/24 hours.
4	<input type="checkbox"/>	Pyuria	>5 white blood cells/high power field. Exclude infection.
2	<input type="checkbox"/>	Rash	Ongoing inflammatory lupus rash.
2	<input type="checkbox"/>	Alopecia	Ongoing abnormal, patchy or diffuse loss of hair due to active lupus.
2	<input type="checkbox"/>	Mucosal ulcers	Ongoing oral or nasal ulcerations due to active lupus.
2	<input type="checkbox"/>	Pleurisy	Classic and severe pleuritic chest pain or pleural rub or effusion or new pleural thickening due to lupus.
2	<input type="checkbox"/>	Pericarditis	Classic and severe pericardial pain or rub or effusion, or electrocardiogram confirmation.
2	<input type="checkbox"/>	Low complement	Decrease in CH50, C3 or C4 below the lower limit of normal for testing laboratory.
2	<input type="checkbox"/>	Increased DNA binding	>25% binding by Farr assay or above normal range for testing laboratory.
1	<input type="checkbox"/>	Fever	>38°C. Exclude infectious cause.
1	<input type="checkbox"/>	Thrombocytopenia	<100,000 platelets/mm <sup>3</sup> .
1	<input type="checkbox"/>	Leukopenia	<3,000 white blood cells/mm <sup>3</sup> . Exclude drug causes.
_____ <b>TOTAL SCORE</b> (Sum of weights next to descriptors marked present)			

Annexe 3. Protocole GADD34\_LES (partie résumé)



**PROTOCOLE  
EXPERIMENTAL  
GADD34-LES**



<b>Titre</b>	Évaluation pronostique de l'augmentation de l'expression du gène codant pour GADD34 au cours du lupus érythémateux systémique
<b>Titre court</b>	GADD34-LES
<b>Investigateur coordonnateur autorisé à signer le protocole</b>	Pr Jean-Yves CESBRON Laboratoire d'Immunologie CHU de Grenoble, 38043 Grenoble cedex 09 Tel : 04 76 76 54 16
<b>Responsable scientifique</b>	Dr. Giovanna CLAVARINO Laboratoire d'Immunologie CHU de Grenoble, 38043 Grenoble cedex 09 Tel : 04 76 76 54 16
<b>Promoteur</b>	C.H.U. Grenoble-Alpes
<b>Représentant du promoteur autorisé à signer le protocole</b>	Mme Monique SORRENTINO Directrice Générale Délégation de la Recherche Clinique et de l'Innovation CHU de Grenoble, 38043 Grenoble Cedex 09 Tel : 04 76 76 84 56 Fax : 04 76 76 52 21
<b>Centre coordonnateur de l'étude</b>	Laboratoire d'Immunologie Représenté par le Dr. Giovanna CLAVARINO CHU de Grenoble, 38043 Grenoble cedex 09 Tel : 04 76 76 63 31 Fax : 04 76 76 52 66

<b>Promoteur</b>	CHU de Grenoble-Alpes
<b>Centres d'étude</b>	CHU de Grenoble Centre d'Investigation Clinique de Grenoble Clinique Mutualiste de Grenoble CHU de Lyon CHU de Saint-Etienne CH d'Annecy CHU de Marseille Centre d'Investigation Clinique de Marseille Hôpital Européen de Marseille
<b>Investigateur coordonnateur</b>	Pr Jean-Yves CESBRON, CHU de Grenoble (Investigateur principal et responsable du Laboratoire d'immunologie pour ce centre).
<b>Méthodologie</b>	Évaluation prospective multicentrique d'un biomarqueur pronostique de poussée de lupus érythémateux systémique.
<b>Objectif principal</b>	L'objectif principal de cette étude est de démontrer l'utilité du dosage du taux d'ARN de GADD34 dans les cellules mononucléées sanguines chez les patients lupiques comme nouveau biomarqueur pronostique de poussée qui sera comparé à la survenue d'une poussée sur les 12 mois de suivi.
<b>Critère de jugement principal</b>	CJP - Taux relatif d'ARN cytoplasmique du gène codant pour GADD34 dans les cellules mononucléées sanguines, mesurée par PCR quantitative par rapport à un gène de ménage. En pratique : Ce taux sera analysé par intégration dans un modèle de Cox (prenant en compte des variables pronostiques définies à priori) de l'augmentation supérieure à un facteur 2 (seuil standard utilisé pour étudier la surexpression d'un transcrit par PCR quantitative) en corrélation avec la survenue ultérieure d'une poussée lupique chez le patient au cours de son suivi de 12 mois (cf §6.2).

<p><b>Objectifs secondaires</b></p>	<p>1. Montrer l'apport complémentaire du niveau d'expression du gène codant pour GADD34 dans les cellules mononuclées du sang dans la détection précoce des poussées du LES, comparativement aux paramètres pronostiques utilisés dans la prise en charge habituelle de cette pathologie.</p> <p>CJS1 - Sensibilité et spécificité du modèle pronostic des poussées du LES intégrant la surexpression de GADD34 les cellules mononuclées du sang en comparaison du modèle utilisé dans la pratique habituelle (SLEDAI et PGA, Annexe C).</p> <p>2. Démontrer l'implication de GADD34 dans la physiopathologie du LES par dosage concomitant des cytokines pro-inflammatoires sériques connue pour leur rôle dans la physiopathologie du LES.</p> <p>CJS2 - Corrélation entre le taux d'expression de GADD34 dans les cellules mononuclées du sang et le taux des cytokines IFN<math>\alpha</math>, IL-6 et IL-17 dans le sérum des patients.</p>
<p><b>Objectifs ancillaires CHU de Grenoble</b></p>	<p>1. Identification de la/des sous-population(s) leucocytaire(s) sur-exprimant GADD34.</p> <p>CJA1 - Comparaison des taux relatifs d'expression de GADD34 dans 3 sous-populations leucocytaires : lymphocyte T, lymphocyte B et monocytes et rapportés aux taux retrouvés chez les témoins dans ces même cellules.</p> <p>2. Evaluation de la contribution d'autres populations leucocytaires dans l'expression de GADD34.</p> <p>CJA2 - Calcul de la contribution d'autres populations leucocytaires (hors lymphocytes T, lymphocytes B et monocytes sanguins) via mesure du taux relatif d'ARN cytoplasmique du gène codant pour GADD34 par PCR quantitative (rapporté à un gène de ménage) dans les cellules du sang total.</p> <p>3. Evaluation de l'intérêt du suivi par capillaroscopie dans le lupus.</p> <p>CJA3 - Mesure de la densité capillaire et des anomalies classique observables en capillaroscopie : ramifications, capillaires géants, tortuosité, raréfaction capillaires et micro-hémorragies en zone péri-unguéale selon les</p>

	recommandations de Cutulo.
<b>Critères d'inclusion principaux</b>	Hommes et femmes âgé d'au moins 18 ans, Présentant un LES (Score ACR ou SLICC), LES quiescent depuis au moins 3 mois. Ayant signé un consentement éclairé, Et étant affiliée à la sécurité sociale.
<b>Critères d'exclusion principaux</b>	Patients ayant présenté un épisode aigu d'infection virale dans les 15 jours précédents, Patients avec autres connectivites ou maladies auto-immunes associées, Personnes bénéficiant d'une protection particulière.
<b>Nombre total de sujets</b>	<b>280 sujets</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 250 patients avec LES quiescent.</li> <li>• 30 sujets sains/témoins (étude ancillaire - Grenoble).</li> </ul>
<b>Durée totale de l'étude</b>	43 mois
<b>Durée de l'étude par sujet</b>	12 mois
<b>Critères de sécurité</b>	Recueil clinique des évènements indésirables
<b>Grille Synoptique de suivi patient</b>	Cf page suivante (extrait du §6).



VISITES	V0	V1	V2	V3	V4	P0	P1
Délai en mois	M0	M3	M6	M9	M12	M'0*1	M'1*1
Intervalle autorisé		+/-7j	+/-7j	+/-7j	+/-7j		+/-7j
Critères d'inclusion et non-inclusion	X						
Consentement éclairé	X						
Antécédents -date de diagnostic -nombre de poussée(s) -comorbidités	X						
Ethnie	X*2						
PGA et SLEDAI	X	X	X	X	X	X	X
Traitement initial	X						
Modification de traitement			X		X	X	X
Evènements indésirables		X	X	X	X	X	X
Prélèvement biologique	X	X	X	X	X	X	X
Etude ancillaire biologique *3 Capillaroscopie *4		X*3	X*3	X*3	X*3		
Remplir le CRF	X	X	X	X	X	X	X

\*1 : M'0 et M'1 ne seront réalisés qu'en cas de poussée.

\*2 : L'ethnie ne sera pas relevée avant accord du CCTIRS, de la CNIL et du CPP. Elle sera relevée à V0 (M0) pour les patients inclus après l'obtention de cet accord préalable et elle sera relevée chaque fois que possible à M6, M12 ou M'1 pour les patients qui ont été inclus avant l'accord de la CNIL.

\*3 : Un prélèvement sanguin supplémentaire décrit au §6.2 sera effectué pour les patients de l'étude ancillaire n°1.

\*4 : Une capillaroscopie sera effectuée lors d'une visite 1 à 4 pour les patients de l'étude ancillaire n°2.



# Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

**D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.**

**D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.**

**De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**

**Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».**