

Université de Montréal

**Étude des mécanismes thrombotiques chez les  
patients atteints du lupus érythémateux disséminé**  
Implications des auto-anticorps antilamine B1 et anticellules  
endothéliales

par  
Mélanie Dieudé

Département de Médecine  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Ph. D  
en Sciences Biomédicales

décembre 2003

© Mélanie Dieudé, 2003



W

4

U58

2004

v.043

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Étude des mécanismes thrombotiques chez les patients  
atteints du lupus érythémateux disséminé**  
Implications des auto-anticorps antilamine B1 et anticellules  
endothéliales

présentée par :

Mélanie Dieudé

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Daniel Lajeunesse, président-rapporteur

Yves Raymond, directeur de recherche

Jean-Luc Senécal, co-directeur

Janos Filep, membre du jury

Gilles Boire, examinateur externe

Richard Bertrand, représentant du doyen de la FES

## Résumé

Le syndrome antiphospholipide (SAP) est caractérisé par des événements thrombotiques récurrents associés à la présence d'anticorps antiphospholipides (aPL) comme l'anticoagulant lupique (LAC). Le lupus érythémateux disséminé (LED) est la maladie auto-immune majeure qui y est associée. Paradoxalement, même si les LAC sont de forts prédictors de thromboses, la moitié des patients possédant des LAC ne développeront pas de thromboses. Ceci cause un dilemme clinique important. La pratique courante est de traiter les patients LAC positifs seulement après un premier événement thrombotique majeur, exposant de ce fait les patients non-traités à des risques de dommages tissulaires importants comme les accidents vasculaires cérébraux. Il n'existe, à ce jour, aucune méthode établie qui puisse différencier les patients LAC positifs qui vont développer des thromboses de ceux qui n'en développeront pas. Afin d'évaluer de potentiel de nouveaux marqueurs et de comprendre les conditions requises pour l'apparition de thromboses, nous avons étudié les implications des auto-anticorps antilamine B1 (aLB1) et anticellules endothéliales (AACE) dans les mécanismes thrombotiques chez les patients atteints du LED.

Des études précédentes avaient montré que des titres élevés d'aLB1 étaient restreints à un sous-groupe de patients LED. Nous avons donc tenté de déterminer les implications de la présence d'aLB1 sur la thrombose dans un grand groupe de patients LED. Nous avons découvert que la présence d'aLB1 annule le risque prothrombotique important associé aux LAC. Ainsi, les aLB1 sont associés à la thromboprotection et constituent le premier marqueur pour un meilleur pronostic chez les patients LED LAC-positifs. Nous avons voulu ensuite élucider le mécanisme par lequel les aLB1 protègent de la thrombose. Notre hypothèse était que les aLB1 circulants pouvaient bloquer l'effet procoagulant des blebs apoptotiques en se liant à la lamine B1 exposée à la surface de ces blebs. Nous

avons en effet découvert que la lamine B1 était présente dans les blebs, mais enfouie à l'intérieur de ces structures et inaccessible pour les aLB1 circulants. Ceci exclut donc un rôle direct pour la lamine B1 dans la thromboprotection.

Le fait que la moitié des patients LED LAC positifs ne développent pas de thrombose suggère que la présence de LAC est insuffisante pour générer la thrombose. Un événement primaire qui induirait une perturbation membranaire et, de ce fait, une cible antigénique pour les aPL, semble nécessaire pour déclencher la cascade thrombotique. Nous avons découvert que certains AACE, présents chez les patients LED, reconnaissent spécifiquement la protéine hsp60 et que la liaison des anti-hsp60 à la surface des cellules endothéliales induit l'apoptose chez ces dernières. De plus, les anti-hsp60 sont significativement associés à une fréquence de thrombose accrue, lorsque combinés avec les LAC, chez les patients LED. Nous proposons que l'induction de l'apoptose par les anti-hsp60 constitue l'événement primaire générant une perturbation membranaire, qui initie le recrutement des aPL à la surface endothéliale, enclenchant ainsi la cascade thrombotique.

Cette thèse a identifié deux marqueurs, les aLB1 et les anti-hsp60, pouvant différencier les patients LED LAC positifs qui vont développer des thromboses de ceux qui n'en développeront pas et, ainsi, avoir un impact sur le traitement de ces patients.

**Mots-clés** : auto-immunité, syndrome antiphospholipide, apoptose, cellules endothéliales, anticorps anticoagulant lupique.

## Abstract

The antiphospholipid syndrome (APS) is defined by thrombotic events in association with the presence of antiphospholipid antibodies (aPL) such as lupus anticoagulant antibodies (LAC). Systemic lupus erythematosus (SLE) is the major autoimmune disease associated with APS. Paradoxically, although LAC are strong predictors for thrombosis, one half of the patients expressing LAC may not develop thrombotic episodes. This issue causes a major clinical dilemma. Accepted practice is to treat patients with LAC only after a first thrombotic episode has occurred, thus exposing untreated patients to the risks of organ damage such as stroke. At present, there is no established method to differentiate LAC positive SLE patients who will develop thrombosis from those who will not. To evaluate the potential of new markers and to understand the conditions required for thrombotic events to occur, we have studied the implications of antilamin B1 (aLB1) and anti-endothelial cells (AECA) autoantibodies in thrombotic mechanisms in SLE patients.

Earlier studies had shown that high titers of aLB1 were restricted to a subset of SLE patients. Our goal was to determine the implications of the presence of aLB1 on thrombosis in a large number of SLE patients. We have found that the presence of aLB1 essentially nullifies the strong prothrombotic risk associated with LAC. Hence, aLB1 are associated with thromboprotection. To date, aLB1 appear unique in this regard and provide the first marker for a subset of LAC positive SLE patients with a better prognosis. Furthermore, we aimed to elucidate the mechanism by which aLB1 may cause thromboprotection *in vivo*. Our hypothesis was that aLB1 may block the procoagulant effect of apoptotic blebs by binding to lamin B1 displayed at the external bleb surface. We found that lamin B1 was indeed present in apoptotic blebs. However, in striking contrast with other SLE autoantigens, lamin B1 was entirely concealed within the apoptotic bleb plasma membrane and

inaccessible to aLB1, thereby excluding a direct role for lamin B1 in mediating thromboprotection.

The fact that half of the LAC positive SLE patients may not develop thrombotic manifestations suggests that the mere presence of LAC is insufficient to initiate thrombosis. A first event that would induce cell membrane perturbation and subsequently provide a target for aPL binding, the second event, is suggested to trigger the thrombotic cascade. We found that some AECA, associated with vascular manifestations and present in SLE sera, specifically recognized hsp60 and that binding of these anti-hsp60 to the surface of endothelial cells induced apoptosis. Moreover, anti-hsp60 were found to be significantly associated with an increased frequency of thrombosis when combined with LAC in SLE patients. We propose that induction of apoptosis by anti-hsp60 is the first event in the thrombotic cascade that will generate a membrane perturbation, which initiates the recruitment of pathogenic aPL at the endothelial cell surface, ultimately leading to thrombosis.

This thesis identified two markers, aLB1 and anti-hsp60, that could help differentiate SLE patients with LAC who will develop thrombosis from those who will not, and thus could have an impact on the approach used to treat those patients.

**Keywords :** auto-immunity, antiphospholipid syndrome, apoptosis, endothelial cells, lupus anticoagulant antibodies





2.2.6	Présentation d'antigènes dérivés de cellules apoptotiques	p. 27
3	Lupus érythémateux disséminé (LED)	p. 30
3.1	Définition et généralités	p. 30
3.2	Manifestations cliniques	p. 31
3.3	Diagnostic	p. 32
3.4	Pathogénèse	p. 34
3.4.1	Facteurs génétiques	p. 34
3.4.2	Le sexe	p. 39
3.4.3	Les facteurs environnementaux	p. 40
3.4.3.1	L'exposition aux UV	p. 42
3.4.3.2	Agents infectieux	p. 43
3.4.4	Anomalies au niveau des lymphocytes B	p. 44
3.4.5	Anomalies au niveau des lymphocytes T	p. 45
3.4.6	Anomalies liées au complément	p. 48
3.5	Auto-anticorps	p. 48
3.5.1	Auto-anticorps naturels	p. 49
3.5.2	Auto-anticorps pathogéniques	p. 49
3.5.3	Anticorps anti-nucléaires (AAN)	p. 51
3.5.4	Auto-anticorps antilamine B1 (aLB1)	p. 52
3.5.4.1	Lamine B1	p. 52
3.5.4.2	Antilamine B1	p. 54
3.5.4.3	Implications cliniques associées aux aLB1	p. 55
4	Syndrome antiphospholipide (SAP)	p. 56
4.1	Définition et généralités	p. 57
4.2	SAP primaire ou secondaire	p. 57
4.3	Manifestations cliniques	p. 59
4.3.1	Thromboses artérielles et veineuses dans les SAP	p. 59
4.3.2	Pertes fœtales récurrentes	p. 62

4.3.3	Autres manifestations	p. 62
4.4	Anticorps antiphospholipides (aPL)	p. 63
4.5	Pathogénèse du SAP	p. 64
5	Anticorps anticellules endothéliales (AACE)	p. 68
5.1	Définition et généralités	p. 69
5.2	Tests de détection	p. 72
5.3	Associations cliniques des AACE	p. 75
5.3.1	Vascularites	p. 75
5.3.1.1	Granulomatose de Wegener et polyartérite microscopique	p. 75
5.3.1.2	Maladie de Kawasaki	p. 76
5.3.2	Maladies systémiques auto-immunes	p. 76
5.3.2.1	LED et SAP	p. 77
5.3.2.2	Sclérodermie	p. 78
5.4	Identification des antigènes reconnus par les AACE	p. 78
6	Justifications des projets	p. 80
6.1	Étude de l'effet thromboprotecteur des antilamine B1	p. 80
6.2	Étude de l'implication des AACE dans les mécanismes thrombotiques chez les patients atteints du LED	p. 83

**Article 1 :** Association of autoantibodies to nuclear lamin B1 with thromboprotection in systemic lupus erythematosus; Lack of evidence for a direct role of lamin B1 in apoptotic blebs. Dieudé M et al. 2002 p. 85

**Article 2 :** Anti-endothelial cell autoantibodies from systemic lupus erythematosus patients bind heat shock protein 60 and induce apoptosis in endothelial cells. Dieudé M et al. 2003 p. 136

<b>Discussion</b>	p. 175
1 L'étude des antilamine B1	p. 176
1.1 Auto-immunité protectrice	p. 177
1.1.1 La neuroprotection par les auto-anticorps	p. 177
1.1.2 La protection contre les parasites par les auto-anticorps	p. 178
1.2 La lamine B1 séquestrée à l'intérieur des blebs apoptotiques : un phénomène universel	p. 179
1.3 Les implications de la non-accessibilité de la lamine B1	p. 181
1.4 Prédicibilité de la localisation apoptotique des auto-antigènes	p. 182
1.5 Les antilamine B1 : un épiphénomène?	p. 184
1.6 Immunogénicité versus antigénicité de la lamine B1 dans les blebs apoptotiques	p. 185
1.7 L'origine des antilamine B1	p. 187
2 Anti-cellules endothéliales (AACE)	p. 189
2.1 Cible antigénique des AACE	p. 189
2.2 L'antigène hsp60	p. 192
2.3 Origine des anti-hsp60	p. 193
2.3.1 Hypothèse de l'infection	p. 193
2.3.2 Hypothèse de la réaction auto-immune suite à un stress	p. 194
2.3.3 Hypothèse de diversification antigénique intermoléculaire	p. 194
2.4 Conséquences générales de l'apoptose endothéliale induite par les anti-hsp60	p. 196
2.5 Conséquences spécifiques à la présence d'aPL de l'apoptose endothéliale induite par les anti-hsp60	p. 199
2.6 Les anti-hsp60 ne sont pas spécifiques au LED : conséquences	p. 202
2.7 Maladies vasculaires et anti-hsp60	p. 204

2.8 Hypothèse de la voie pathophysiologique commune entre le LED et l'athérosclérose	p. 207
2.9 Potentiel prédictif des anti-hsp60	p. 209
<b>Conclusion</b>	p. 212
<b>Bibliographie</b>	p. 215

## Liste des tableaux

- Tableau I Les principaux substrats clivés par les caspases au cours de l'apoptose p.13
- Tableau II Critères diagnostiques du LED identifiés par l'American College of Rheumatology en 1997 p.33
- Tableau III Facteurs de risques contribuant à la pathogénèse du LED p.35
- Tableau IV Gènes associés à la prédisposition à développer un LED spontané p.37
- Tableau V Facteurs environnementaux jouant un rôle dans la pathogénèse du LED p.41
- Tableau VI Distinctions entre les auto-anticorps naturels et pathogéniques p.50

- Tableau VII Critères préliminaires pour la classification du p. 58  
syndrome antiphospholipide provenant du consensus  
international
- Tableau VIII Classification et détection des anticorps p. 60  
antiphospholipides
- Tableau IX Effets opposés des anticorps antiphospholipides sur p. 66  
la coagulation
- Tableau X Prévalence des anticorps anticellules endothéliales p. 70  
dans différentes maladies

## Liste des figures

Figure 1	Voie intrinsèque de l'apoptose	p.16
Figure 2	Voie extrinsèque de l'apoptose	p. 19
Figure 3	Interactions entre les voies apoptotiques extrinsèque et intrinsèque	p. 21
Figure 4	Molécules et récepteurs impliqués dans la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques par les phagocytes	p. 28
Figure 5	Localisation de la lamina nucléaire	p. 53
Figure 6	Dilemme clinique chez les patients LED possédant des LAC	p. 81
Figure 7	Changements associés à l'apoptose endothéliale	p.198
Figure 8	La liaison des anti-hsp60 : l'événement primaire 'first hit' menant à la thrombose chez les patients souffrant du LED	p.201
Figure 9	Modèle intégrateur. Apoptose endothéliale induite par les anti-hsp 60 : voie pathophysiologique commune entre le LED et les maladie vasculaires.	p.208
Figure 10	Influence des aLB1 et des anti-hsp60 sur le dilemme clinique chez les patients LED possédant des LAC	p.214



## Liste des abréviations

AACE = anticellules endothéliales

ACL = anticorps anticardioline

ADN = acide désoxyribonucléique

aLB1 = auto-anticorps antilamine B1

ANA = anticorps antinucléaires

aPL = anticorps antiphospholipides

ARNm = acide ribonucléique messenger

$\beta$ 2GPI =  $\beta$ 2-glycoprotéine I

Da = Dalton

DD = domaine de mort cellulaire

DED = domaine effecteur de mort cellulaire

ELISA = enzyme linked immunosorbent assay

Fas L = Fas ligand

hsp60 = heat shock protein 60

HUVEC = 'human umbilical vein endothelial cell'

IFN = interféron

IL = interleukine

LAC = anticorps anticoagulant lupiques 'lupus anticoagulant antibodies'

LED = lupus érythémateux disséminé

LPS = lipopolysaccharide bactérien

LTc = lymphocyte T cytotoxique

MPA = polyartérite microscopique 'microscopic polyangiitis'

NF = nuclear factor

NK = cellules tueuses 'natural killer'

ox-LDL = lipoprotéine de basse densité oxydée 'oxidized low density lipoprotein'

PL = phospholipide

PLbp = protéines liant les phospholipides 'phospholipid binding protein'

PS = phosphatidylsérine

SAP = syndrome antiphospholipide

TCR = récepteur des cellules T

TGF= facteur de croissance tumorale 'tumor growth factor'

TNF-R = récepteur du facteur onconécrosant 'tumor necrosis factor-receptor'

UV = rayons ultra-violet

WG = granulomatose de Wegener 'Wegener's granulomatosis'

*À mon grand-père Gabriel pour m'avoir  
transmis sa curiosité*

*À mon grand-père Georges, pour m'avoir  
dit de toujours garder le focus....*

## Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent à mes parents, Mireille et Charles, qui depuis toute petite m'ont encouragée à me dépasser mais surtout à faire ce qui me passionne, pour être libre!

Un grand merci à mes directeurs, les Drs. Yves Raymond et Jean-Luc Sénécal, pour leur appui, leur confiance et pour m'avoir donné le cadre de laboratoire qu'il me fallait pour faire de fabuleuses découvertes.

A de fidèles collaborateurs que j'estime énormément et qui ont fait évoluer ma pensée scientifique, Dre Joyce Rauch, Dr Pascal Reboul, Dre Tamara Grodzicky, Dr Daniel Lajeunesse et Dre Marie-Josée Hébert, merci!

A mes collègues et amis, qui m'ont aidée, m'ont conseillée, m'ont bien fait rigoler, m'ont écoutée .... que la vie aurait été triste sans vous! Que je suis contente que ces études m'aient donné la chance de vous connaître! Martin Paradis, Jan Kornfeld, Mélanie Arbour, Nathalie Brassard, Monique Bernard, Isabelle Clément, Marie-Soleil Christin-Piché, Lilian Lonzetti, Mélanie Tremblay, Jill Hénault, Frédéric Massicotte, Frédéric Dallaire, Marie-Josée Dicaire, Julie Lajoie, Julie Lacaille, Deborah Braun, Sylvie Lesage, Christelle Boileau; je ne vous oublierai pas.

Un merci particulier à Pascal Amireault . Que je reste toujours une étudiante dans l'âme, puisses-tu toujours être avec moi rigueur...

Finalement, à mon amour, mon meilleur ami; mon mari Robert Béasse  
Pour avoir cru en moi, pour avoir compris ma passion, pour me rendre heureuse...  
Rob, mille mercis.

## Introduction

## **1. Immunité, tolérance et auto-immunité**

Cette thèse avait pour but d'étudier l'implication d'auto-anticorps dans les mécanismes thrombotiques chez les patients atteints du lupus érythémateux disséminé (LED). Comme l'auto-immunité est au coeur de cette étude, les concepts d'immunité, de tolérance et d'auto-immunité seront tout d'abord définis. De plus, les grands facteurs impliqués dans l'apparition de l'auto-immunité en général seront brièvement décrits.

### **1.1 Immunité et tolérance immunologique**

#### **1.1.1 Définitions et concepts généraux**

Le terme immunité est dérivé du latin *immunitas*, qui désigne une exemption de diverses tâches civiques offerte aux sénateurs romains. Une définition plus moderne de l'immunité est une réaction à des substances étrangères, incluant les agents infectieux, dans le but ultime de protéger l'organisme. Les cellules et molécules responsables de l'immunité constituent le système immunitaire et leur réponse collective et coordonnée est la réponse immunitaire.

Une des propriétés remarquables du système immunitaire est son habileté à distinguer les substances étrangères de celles de l'organisme en question,

nommées respectivement le non-soi et le soi. La tolérance immunologique désigne un état dans lequel l'individu est incapable de développer une réponse immunitaire contre un antigène spécifique. Le rôle physiologique majeur de la tolérance est d'empêcher le système immunitaire de détruire les constituants du soi.

Le risque que le système immunitaire se retourne contre le soi est bel et bien existant dans la mesure où sont produits, au hasard, des récepteurs d'antigène très diversifiés, dont certains vont reconnaître des antigènes du soi. Les cellules portant de tels récepteurs, dites autoréactives, doivent être éliminées.

L'élimination de l'autoréactivité n'est pas programmée génétiquement ; elle s'acquiert au cours du développement. Par conséquent, la distinction du soi et du non-soi fait l'objet d'un apprentissage. Plusieurs conditions peuvent influencer la réaction induite par un épitope donné sur un organisme, comme la structure moléculaire de l'épitope mais aussi le moment et le site du premier contact des lymphocytes avec cet épitope. De plus, la nature de la cellule qui présente les épitopes ainsi que son aptitude à transmettre des signaux de costimulation peuvent aussi jouer un rôle dans la réponse induite par un épitope.

L'élimination des lymphocytes autoréactifs s'effectue principalement au niveau central, c'est-à-dire au niveau du thymus. Cependant, il existe aussi des

mécanismes au niveau périphérique pour contrôler ou éliminer les cellules autoréactives ayant échappé au contrôle thymique (Palmer et al 2003).

## **1.2 Auto-immunité**

### **1.2.1 Définitions et généralités**

L'auto-immunité est la réponse immunitaire résultant d'un bris de tolérance aux antigènes du soi. Tous les individus possèdent le potentiel de développer une maladie auto-immune dans la mesure où chaque individu possède des gènes codant pour des récepteurs de lymphocytes qui peuvent reconnaître des antigènes du soi.

Il serait tellement plus simple de pouvoir expliquer toutes les maladies auto-immunes par un seul mécanisme, mais il est maintenant très clair qu'il existe plusieurs voies par lesquelles la tolérance peut être déjouée. Plus d'un 'défaut' peut être présent dans une même maladie et le même défaut peut varier d'une maladie à l'autre. De plus, la pathogénèse de l'auto-immunité implique entre autres des facteurs immunologiques, génétiques et microbiens interagissant par des mécanismes complexes qui sont encore peu connus.



### 1.2.2 Facteurs immunologiques

La perte de tolérance centrale est une cause plausible d'auto-immunité mais peu de données soutiennent cette hypothèse. En revanche, un bris de tolérance périphérique est souvent pointé du doigt. L'auto-immunité peut aussi résulter d'une stimulation de lymphocytes autoréactifs indépendante de l'antigène. Des activateurs polyclonaux, comme le lipopolysaccharide bactérien (LPS), peuvent stimuler plusieurs lymphocytes T ou B et ce, indépendamment de leur spécificité antigénique.

Aussi surprenant que cela puisse paraître, certaines maladies auto-immunes peuvent être initiées par des réponses immunitaires apparemment normales contre des agents infectieux. En effet, lorsque les cellules T ou les anticorps reconnaissent un épitope d'une molécule étrangère mais qui se retrouve aussi dans une molécule du soi, une réponse immunitaire sera engendrée concomitamment contre la molécule étrangère et celle du soi. Cette ressemblance moléculaire responsable du bris de tolérance se nomme mimétisme moléculaire.

Plusieurs anomalies associées à la régulation lymphocytaire ont été détectées. Une production excessive de cytokine peut être impliquée dans la stimulation de lymphocytes incluant les cellules autoréactives. Des déficiences dans le nombre ou les fonctions des cellules Th2 régulatrices, normalement impliquées dans le

contrôle de cellules Th1 autoréactives, peuvent mener à l'apparition de l'auto-immunité. Finalement, dans certaines maladies auto-immunes, des lymphocytes peuvent répondre de façon excessive à certains antigènes ou stimuli, phénomène nommé hypersensibilité.

### **1.2.3 Facteurs génétiques**

L'hérédité semble jouer un rôle important dans le développement des diverses maladies auto-immunes. Cependant, la rareté de certaines maladies ainsi que les patrons de transmission de gènes de susceptibilité souvent extrêmement complexes rendent les études dans ce domaine très ardues chez l'humain. Des études génétiques sur des modèles murins ont par contre aidé à identifier des gènes de susceptibilité chez l'humain. Plusieurs autres gènes peuvent être impliqués dans diverses maladies auto-immunes et nous y reviendrons plus spécifiquement lors de la description du LED.

### **1.2.4 Infections et autres facteurs**

Les infections virales ou bactériennes peuvent être associées à l'auto-immunité et précèdent souvent les manifestations cliniques des maladies auto-immunes. Dans la plupart des cas, les micro-organismes ne sont pas présents dans les lésions et ne sont même plus détectables dans l'organisme. Ainsi, ces lésions ne semblent pas dues directement à ces micro-organismes mais bien à une réponse

immunitaire induite ou dérégulée par ce microbe. Les effets possibles sur le système immunitaire incluent l'activation polyclonale des lymphocytes, le mimétisme moléculaire, l'inflammation locale menant à la surexpression de co-stimulateurs et l'atteinte tissulaire permettant le relâchement d'antigènes normalement séquestrés.

L'auto-immunité possède une composante hormonale encore mal expliquée. Ainsi, plusieurs maladies auto-immunes dont le LED ont une plus forte incidence chez les femmes. Cet élément sera décrit plus en détail dans la section portant sur le LED.

## **2. Auto-immunité et apoptose**

L'apoptose et l'élimination de cellules apoptotiques sont essentielles à l'homéostasie. Au cours de la dernière décennie, un nombre important d'études traitant du rôle de la mort cellulaire dans l'apparition de l'auto-immunité ont été publiées. Cette thèse aborde aussi cette question, plus particulièrement en ce qui a trait à l'exposition de néo-antigènes. Afin de mieux cerner ce phénomène, l'apoptose sera définie tant au niveau morphologique que biochimique. De plus, les différents rôles possibles de l'apoptose dans l'apparition de l'auto-immunité seront décrits.

## 2.1 Apoptose

### 2.1.1 Généralités

On a longtemps pensé que la mort des cellules, qu'elle soit liée au vieillissement, aux maladies ou aux accidents, ne pouvait représenter qu'un phénomène passif, inévitable, dû à des phénomènes d'agression et de destruction ou à une incapacité de la cellule à assurer sa survie au-delà d'une certaine durée. L'étude de la toute première étape de la vie a bouleversé ce dogme en révélant l'existence d'une forme normale, physiologique, de mort cellulaire prématurée, qui survient en l'absence de toute maladie et de tout processus de vieillissement et qui fait partie intégrante du programme de développement de l'embryon et de l'homéostasie : une "mort cellulaire programmée". Kerr, Wyllie et Currie en 1972 ont nommé cette mort cellulaire apoptose, du grec (apo = hors de; ptosis = chute) faisant référence à la chute des feuilles en automne. La perte des feuilles à l'automne répond à des règles bien établies et n'a aucune conséquence néfaste pour la vitalité de l'arbre. Au contraire, cette mort est nécessaire à sa régénération.

La description morphologique de l'apoptose par Kerry et al de 1972 comprenait la condensation cellulaire, la condensation nucléaire et le bourgeonnement membranaire (blebbling) (Kerry et al., 1972). En effet, les cellules en apoptose vont d'abord perdre leurs contacts avec les autres cellules. L'un des éléments morphologiques caractéristiques de l'apoptose est l'importante condensation à la

fois du noyau et du cytoplasme ce qui entraîne une diminution significative du volume cellulaire. Le noyau se condense, puis la chromatine est clivée en fragments réguliers d'environ 180 paires de base (Wyllie 1980; et al., 1984). La membrane plasmique va bourgeonner et conduire à la formation de corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule (blebs). Afin de faciliter la reconnaissance des blebs par les phagocytes, la cellule va signaler son état apoptotique à son environnement notamment grâce au changement de localisation des molécules de phosphatidylsérine (PS) qui passent d'une orientation cytoplasmique à une orientation extracellulaire. La mort cellulaire programmée est un processus rapide qui ne peut durer que quelques heures. Un aspect important et spécifique à la mort cellulaire par apoptose est que l'intégrité de la membrane plasmique n'est jamais altérée au cours du processus, ce qui permet d'éviter tout déversement du contenu cellulaire et ainsi prévenir tout dommage infligé aux tissus environnants. La séquence d'événements biochimiques caractérisant l'apoptose sera décrite dans des sections ultérieures.

### **2.1.2 Nécrose vs apoptose**

La nécrose est considérée comme une mort cellulaire désordonnée, contrairement à l'apoptose. En effet, au cours de la nécrose, les cellules vont se gorger d'eau au point d'entraîner la rupture de leur membrane plasmique. Cette véritable explosion entraîne un relargage dans le milieu environnant du contenu cellulaire. Les

organelles vont, elles aussi, avoir tendance à gonfler. L'acide désoxyribonucléique (ADN) nucléaire va être dégradé de manière aléatoire (Bicknell et Cohen, 1995; Dong et al., 1997) par des endonucléases activées notamment par des sérines protéases (Dong et al., 1997).

À cause du relargage du contenu cellulaire, la nécrose induit une réponse inflammatoire, contrairement à la cellule apoptotique qui maintient l'intégrité de sa membrane plasmique jusqu'à des stades très avancés.

Cependant, la distinction faite entre les cellules apoptotiques et nécrotiques n'est pas absolue. Les mêmes inducteurs, tels l'ischémie et le peroxyde d'hydrogène, peuvent induire de l'apoptose ou de la nécrose, selon la dose et la sévérité de l'atteinte. De plus, l'apoptose initiale peut mener plus tard à de la nécrose secondaire, particulièrement en présence d'une anomalie dans l'élimination des cellules apoptotiques.

### **2.1.3 La biochimie de l'apoptose**

Il est maintenant connu que les cellules de mammifères possèdent deux voies majeures d'apoptose : la voie intrinsèque calquant le modèle décrit chez *Caenorhabditis elegans* et la voie extrinsèque médiée par des récepteurs de

surface. Ces voies aboutissent toutes deux à l'activation des protéases apoptogènes nommées caspases.

### 2.1.3.1 Caspases

Une nouvelle nomenclature proposée regroupe désormais les protéases apoptogènes sous le nom de CASPASE. Le *C* représente la cystéine du site actif (QACxG) et *aspase* définit la spécificité stricte de clivage des substrats de cette famille de protéases au C-terminus d'un acide aspartique. À ce jour 14 caspases ont été identifiées, dont 11 chez l'humain (Yuan et al., 1993) mais cette liste n'est peut-être pas exhaustive.

La conversion de la caspase, de l'état de zymogène à celui d'enzyme mature, nécessite au moins deux clivages. La caspase va alors pouvoir s'assembler sous sa forme active, composée de deux grandes et de deux petites sous-unités (Walker et al., 1994; Wilson et al., 1994; Rotonda et al., 1996). Les caspases vont pouvoir s'auto-activer et/ou être activées par d'autres caspases. Ceci introduit la notion de cascade d'activation. Ainsi, une fois les caspases initiatrices activées, elles vont pouvoir cliver d'autres caspases encore à l'état de zymogène, notamment les caspases effectrices. Ce type d'activation en cascade permet la régulation et l'amplification du signal apoptotique.

Les caspases sont des enzymes extrêmement sélectives. Les protéines cibles doivent impérativement posséder un aspartate en position P1 (Sleath et al., 1990; Howard et al., 1991) niché dans une structure en forme de poche conservée dans la grande majorité des caspases humaines, à l'exception de la caspase 8. Le tableau I (adapté de Earnshaw et al., 1999) indique les principaux substrats clivés par les caspases au cours de l'apoptose. Ces protéines cibles comprennent des protéines cytoplasmiques, nucléaires dont la lamine B1, des protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN et des protéines kinases. De plus, des protéines impliquées dans la transduction du signal, l'expression des gènes, la régulation du cycle cellulaire, la prolifération, les maladies génétiques ou la régulation de l'apoptose sont aussi des substrats des caspases (tableau I).

### **2.1.3.2 La voie intrinsèque**

La voie intrinsèque de l'apoptose ou voie mitochondriale est activée par une variété de stress dont le stress oxydatif. La mitochondrie joue un rôle clé dans la régulation de l'apoptose (Zamzami et al., 1996; Kroemer, 1997; Brenner et al., 1998). En effet, la phase effectrice de cette voie apoptotique comporte l'ouverture des pores de transition de perméabilité de la mitochondrie et la libération de molécules apoptogènes telle que le cytochrome C, les caspases 2,



**Tableau I: Les principaux substrats clivés par les caspases au cours de l'apoptose (adapté de Earnshaw WC et al 1999).**

Polypeptides	Caspase impliquée	Effet supposé du clivage
<b>Protéines Cytoplasmiques</b>		
Gelsoline	3	Clivage Ca <sup>2+</sup> indépendant de l'actine
Gas-2	?	Réarrangement du cytosquelette
Fodrine	3	Bourgeonnement de la membrane plasmique
b-caténine	3	Diminution des interactions cellules-cellules
Cytokératine 18	3,6,7	?
<b>Protéines Nucléaires</b>		
SRF	3	Inactivation du facteur de transcription
Lamine A	6	Désassemblage de la lamina nucléaire
Lamine B1	6,3?	Désassemblage de la lamina nucléaire
NuMA	3,6	Changement de la morphologie nucléaire
Protéine 70kDa de U1 snRNP	3	Diminution du traitement du RNA
Mdm2	3,6,7	?
<b>Protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation d'ADN</b>		
PARP	3,7,9	Diminution de la synthèse de poly (ADP-ribose)
DNA-PKcs	3	Diminution de l'activité
Topoisomérase I	3	?
<b>Protéines kinases</b>		
PKCg	3	Kinase constitutivement active
PKCt	3	Kinase constitutivement active
PKR-related protein kinase 2	3	Kinase constitutivement active?
PKN	3	Kinase constitutivement active
Ca/Cam dependent protein kinase IV	3	?
Pak2	3,8	Kinase constitutivement active
PITSLRE kinase a2-1	3,8	Kinase constitutivement active
Mst 1 kinase	?	Kinase constitutivement active
Mst 2 kinase	?	Kinase constitutivement active
FAK	3,6,7	Perte de liaison à la paxilline, translocation nucléaire, diminution de l'activité
Fyn	3,8?	Activation non-modifiée, désensibilisation du TCR
MEKK-1	3	Diminution de la liaison à la protéine 14-3-3, activation constitutive

Wee-1 kinase	3,7,8	Probablement inactivation, conduit à l'activation de Cdk
--------------	-------	--

---

**Autres protéines impliquées dans la transduction du signal et dans l'expression de gènes**

---

Pro-IL1b	1	Méiateur clé de l'inflammation
Pro- IL16	3	Chimiotactisme du lymphocyte T
Pro-IL18	1	Induit la synthèse de l'IFN $\gamma$
Protéine phosphatase 2A Aa	3	Augmentation de l'activité
Phospholipase A2 cytosolique	3	Activation
Stat 1	3	Diminution de la transcription
NFkb p50, p65	3	Diminution de l'activité transcriptionnelle de NFkb
Ikb	3	Génération d'inhibiteurs constitutifs de NFkb
Calpastatine	1,3,7	Diminution de l'inhibition des calpaines

---



---

**Protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et la prolifération**

---

p21	3,7	Perte du domaine inhibiteur
p27	?	Diminution de p27 dans les complexes cycline E-cdk
Protéine Rb	3	Pas d'opposition à l'actin de E2F-1

---



---

**Protéines impliquées dans les maladies génétiques chez l'humain**

---

Hungtinton	3,7	?
Présélinine-1	?	?
Présélinine-1	3	Génération de fragments anti-apoptotiques

---



---

**Protéines de la régulation de l'apoptose**

---

Bcl-2	?	Génération de fragments pro-apoptotiques
Bcl-XL	1,3	Génération de fragments pro-apoptotiques
FLIPL	3,8,10	?
Bid	8	Génération de fragments pro-apoptotiques
Bax	?	?
ICAD	3	Libère l'endonucléase CAD active

---

3 et 9 ainsi que le facteur AIF. Les facteurs relâchés, l'apoptosome composé du cytochrome C, du facteur Apaf-1 et de la pro-caspase 9 peut se former. La pro-caspase 9 est ensuite clivée et peut activer des caspases effectrices telle la caspase 3, qui pourra cliver ses substrats (Figure 1).

La libération des facteurs de la mitochondrie est sous le contrôle de membres de la famille Bcl-2. En se basant sur leur fonctions biologiques et leurs similarités structurales, on peut classer les membres de la famille Bcl-2 en trois sous-familles. Les membres du groupe I tel Bcl-2 et Mcl-1 possèdent des activité anti-apoptotiques tandis que les membres des groupes II (tels Bax et Bak) et III (tel Bad) respectivement exercent des fonctions pro-apoptotiques. Une caractéristique importante des membres de la famille Bcl-2 est de pouvoir former des homo- ou des hétérodimères. En fait, il semble que l'équilibre entre la vie et la mort cellulaire soit influencé par le type et la proportion de dimères anti- ou pro-apoptotiques formés (Oltvai et al., 1993; Oltvai et Korsmeyer , 1994; Sedlak et al., 1995). De plus, les membres de la famille Bcl-2 peuvent aussi contrôler le relâchement de facteurs pro-apoptotiques tel le cytochrome C du compartiment intermembranaire de la mitochondrie au cytosol. Trois modèles sont proposés pour expliquer ce phénomène. Les membres de la famille Bcl-2 pourraient (1) former des canaux dans la membrane mitochondriale, (2) interagir avec d'autres protéines pour former ces canaux ou (3) induite la rupture de la membrane mitochondriale externe (Hengartner, 2000).



### **2.1.3.3 La voie extrinsèque : Les récepteurs de mort cellulaire**

#### **Généralités**

De nombreux stimuli sont capables d'induire l'apoptose. Toutefois, il existe une famille de récepteurs spécialisés dans l'induction de la mort cellulaire programmée. Une fois stimulés, ces récepteurs induisent l'activation des caspases. Cette voie d'activation est impliquée dans l'élimination des cellules potentiellement dangereuses pour l'organisme, notamment les lymphocytes autoréactifs. Ces récepteurs de mort appartiennent à la famille des récepteurs du 'tumor necrosis factor' (TNF-R) (Nagata , 1997), qui peuvent promouvoir, selon le contexte cellulaire, la survie, la mort ou les deux. Parmi cette famille, il convient de citer Fas (CD95/APO-1), TNF-RI, DR3, /Wsl-1, DR4, et DR5 et DR6. La mort induite par les membres de la famille du TNF-R conduit à l'activation des caspases et en est dépendante (Longthorne et Williams, 1997).

Le récepteur Fas est le récepteur de Fas ligand (FasL). Il représente le prototype des récepteurs de mort. Il est exprimé à la surface de nombreux types cellulaires. La stimulation de Fas par son ligand physiologique, ou par un anticorps anti-Fas, va induire son oligomérisation et le recrutement, par l'intermédiaire de son domaine de mort cellulaire (DD), d'un certain nombre de protéines impliquées dans la transduction du signal apoptotique.

Le couple Fas/FasL, au même titre que le granzyme B et la perforine, joue un rôle prépondérant dans la cytotoxicité des lymphocytes T (LTc). Ces deux mécanismes coopèrent pour permettre l'élimination de la cellule cible par un processus d'apoptose (Cohen, 1991; Golstein et al., 1991). Dans le cas du couple granzyme B/perforine, la perforine libérée à l'interface entre le LTc et la cellule cible forme un canal qui permet au granzyme B, une protéase à sérine possédant une spécificité de clivage identique à celle des caspases, de pénétrer la cellule cible afin d'activer directement les caspases effectrices et, par conséquent, d'induire l'apoptose (Heusel et al., 1994).

### **Des récepteurs à l'apoptose**

Seul le mécanisme d'activation du récepteur Fas sera décrit (Figure 2). Il semble toutefois que, dans l'état actuel des connaissances, ce mécanisme puisse être étendu aux autres récepteurs de mort. Une fois stimulé par son ligand spécifique, Fas se trimérise et recrute une protéine adaptatrice FADD/MORT1 (Chinnaiyan et al., 1995). FADD présente la particularité de posséder, en plus de son DD, un domaine effecteur de mort cellulaire (DED). Le DED est nécessaire et suffisant

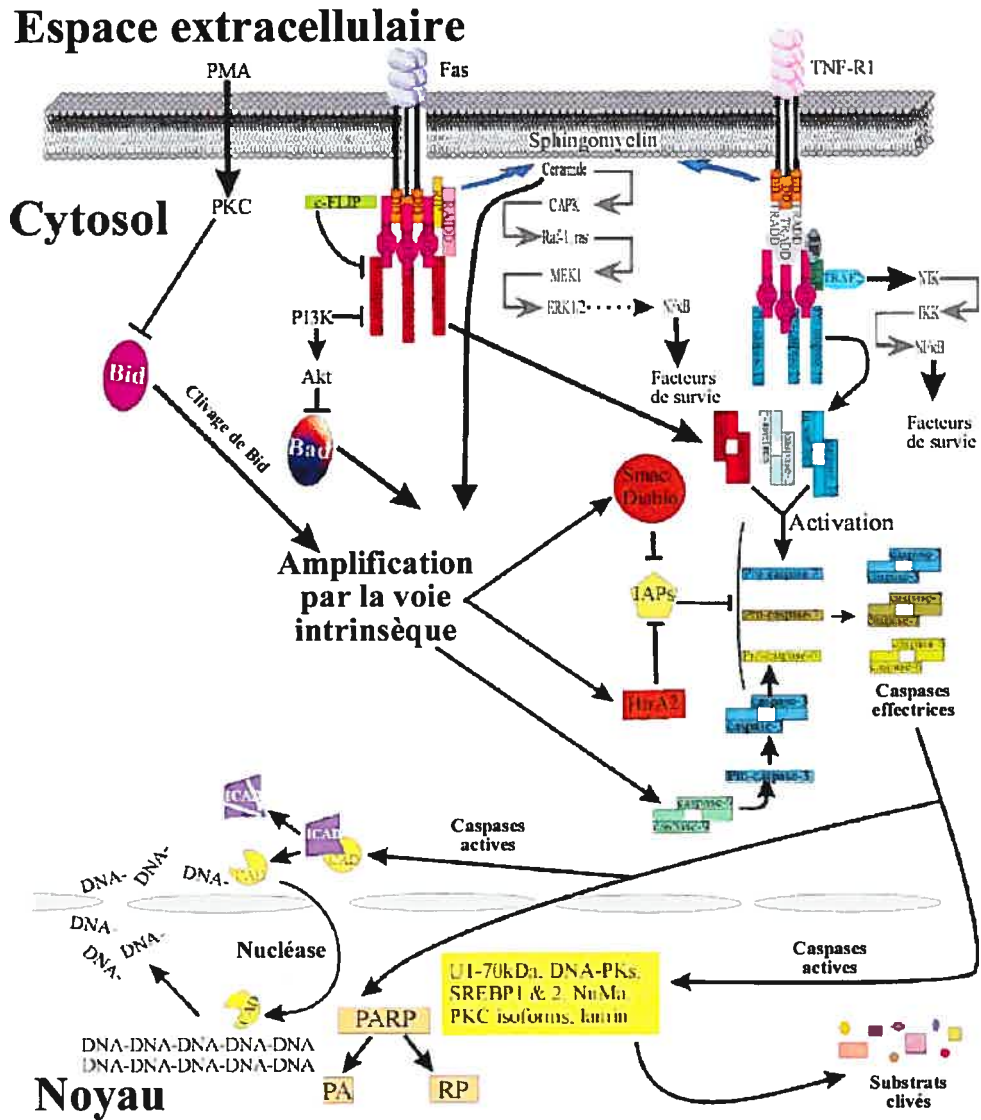


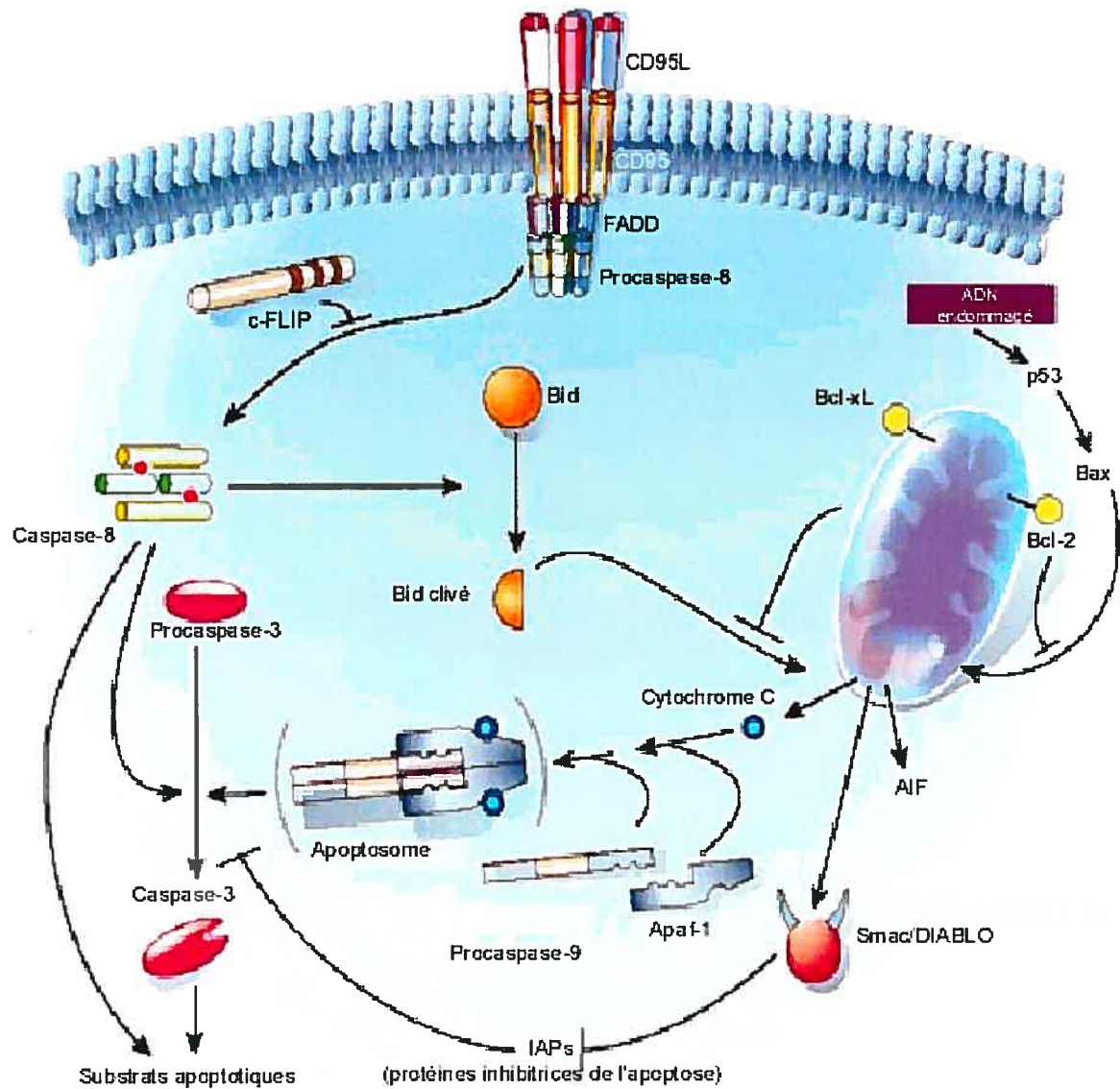
Figure 2: Voie extrinsèque de l'apoptose (adapté de Lawen, 2003)

pour induire l'apoptose. Sous certaines conditions, TNF-RI recrute également FADD. Ce couplage est cependant indirect et se fait par l'intermédiaire d'une protéine comportant un DD : TRADD (Hsu et al., 1995). En définitive FADD représente le point de convergence des voies de signalisation induites par Fas ou TNF-RI. Par la suite, FADD peut recruter la caspase 8 (Boldin et al., 1996; Fernandes-Alnemri et al., 1996; Muzio et al., 1996) ou la caspase 10 (Fernandes-Alnemri et al., 1996; Vincenz et Dixit, 1997), les caspases initiatrices, par l'intermédiaire de ces DEDs et ainsi initier la cascade apoptotique (Hirata H et al., 1998).

#### **2.1.3.4 Voies intrinsèque et extrinsèque**

L'activation des caspases induite par le cytochrome c cytosolique associé à Apaf-1 ou l'apoptose induite par les récepteurs de mort ne sont pas des mécanismes totalement indépendants . En effet, l'identification d'un nouveau membre pro-apoptotique Bid fut une découverte majeure. Bid permet de faire le lien entre les récepteurs de mort et la libération du cytochrome c. Bid est directement clivé par la caspase 8 et le fragment C-terminal permet la libération du cytochrome c (Li et al., 1998; Luo et al., 1998) (Figure 3). Cependant, il est à noter que dans la plupart des cas, les interactions entre les deux voies apoptotiques sont minimales.





**Figure 3: Interactions entre les voies apoptotiques extrinsèques et intrinsèques (adapté de Hengartner, 2000)**

## **2.2 Auto-immunité et apoptose**

L'apoptose est un mécanisme crucial dans l'homéostasie de l'organisme tout entier. Nous nous restreindrons ici à l'étude de ce mécanisme dans l'équilibre immunitaire et, par le fait même, à la participation des anomalies de ce mécanisme dans l'auto-immunité.

### **2.2.1 Maintien de la tolérance**

La tolérance requiert que les cellules T autoréactives soient éliminées. Durant le développement du thymus, la reconnaissance d'un antigène du soi par une cellule T autoréactive entraîne l'apoptose du lymphocyte en question. Par conséquent, un défaut dans cette voie de déletion des cellules T au niveau thymique peut induire l'auto-immunité.

Cependant, ce n'est pas le répertoire complet des auto-antigènes qui est exprimé dans le thymus. Il existe donc d'autres mécanismes au niveau périphérique pour maintenir la tolérance. Ces processus ne sont pas complètement élucidés mais il est fort possible que l'apoptose y soit impliquée. Les cellules de certains organes tels que les yeux et les testicules semblent surexprimer Fas L. De cette manière, une cellule T autoréactive infiltrante reconnaissant un auto-antigène résident activerait concomitamment son récepteur Fas et serait éliminée par apoptose.

### 2.2.2 Régulation de la population de cellules T

L'apoptose joue aussi un rôle très important dans la régulation des populations de cellules T. Ainsi, les populations clonales de cellules T activées qui ont joué leur rôle de défense sont ensuite rapidement éliminées par un mécanisme de mort cellulaire induite par l'activation. Ce processus est dépendant de la liaison du récepteur Fas à la surface cellulaire (Budd et al. 2001). Un scénario communément accepté comprend les étapes suivantes : après la stimulation des cellules T par le complexe CD3/ récepteur des cellules T (TCR) associé avec la phosphorylation et l'activation de facteurs de transcription TCR-sensibles, l'acide ribonucléique messager (ARNm) de FasL est induit et la protéine Fas L produite est rapidement exprimée à la surface cellulaire. Fas L lie les récepteurs Fas de surface exprimés sur la même cellule ou sur des cellules voisines et induit l'apoptose Fas dépendante. (Dhein et al., 1995; Ju et al., 1995). Ainsi, l'interaction Fas/ Fas L résulte en un suicide autocrine ou un fratricide paracrine (Mariani et al., 1996).

Il n'est donc pas surprenant de voir des maladies auto-immunes se développer dans les souris ayant des mutations dans les gènes codant pour Fas ou Fas L. Dépendamment de leur background génétique, ces souris montrent une lymphadénopathie, une splénomégalie, la présence d'auto-anticorps, de

l'inflammation au niveau des articulations ou une maladie systémique ressemblant au LED humain (Singer et al., 1994).

Des mutations dans les gènes codant pour Fas ou Fas L ont été décrites chez l'humain. Ces patients montraient un syndrome lymphoprolifératif ou Canale-Smith caractérisé par une lymphadénopathie, une splénomégalie et la présence d'auto-anticorps dirigés contre des composantes du sang comme les érythrocytes ou les plaquettes (Rieux-Laucal et al., 1995; Fisher et al., 1995; Drappa et al., 1996).

### **2.2.3 Expression d'auto-antigènes à la surface de cellules apoptotiques**

L'origine des auto-anticorps présents dans le sérum des patients souffrant de maladies auto-immunes systémiques, comme le LED, a longtemps été inexplicée, leurs antigènes étant invisibles au système immunitaire à cause de leur localisation intracellulaire. Cependant, à l'aide d'un modèle de kératinocytes exposés aux rayons ultra-violet (UV), Casciola-Rosen et al. ont démontré l'expression d'auto-antigènes, normalement intracellulaires, à la surface de cellules apoptotiques (LeFeber et al., 1984; Golan et al., 1992; Casciola-Rosen et al., 1994). Parmi ces antigènes citons Ro 52 kDa, Ro 60 kDa et La.

La PS, un autre antigène important dans le syndrome antiphospholipide (SAP) et dont il sera question plus bas, se retrouve exprimée à la surface des cellules

apoptotiques. En effet, durant la phase précoce de l'apoptose, la membrane plasmique perd son asymétrie normale et les phospholipides anioniques dont la PS sont externalisés. Cet événement précoce génère une surface cellulaire qui a la capacité de recruter plusieurs protéines liant les phospholipides et qui sont aussi des auto-antigènes importants dans le SAP.

La relocalisation d'auto-antigènes à la surface cellulaire durant l'apoptose transforme ces antigènes normalement séquestrés en cible potentielle pour les auto-anticorps circulants. De plus, l'externalisation de la PS à la surface apoptotique permet aux phagocytes de reconnaître et d'ingérer les cellules apoptotiques ce qui peut mener dans certaines circonstances, comme nous le verrons plus bas, à la production d'auto-anticorps.

#### **2.2.4 Clivage d'auto-antigènes durant l'apoptose**

Le clivage de protéines lors de l'apoptose révèle des épitopes cryptiques qui peuvent contribuer à l'immunogénicité des auto-antigènes (Mamula et al., 1993; Sercarz et al., 1993). Ainsi, plusieurs auto-antigènes, dont PARP et la lamine B1, sont des substrats des caspases lors de l'apoptose (Casciola-Rosen et al., 1994; Casciola-Rosen et al., 1995; Greindinger et al., 1996; Casiano et al., 1996; Utz et al., 1998) Le granzyme B, une sérine protéase présente dans les granules des cellules T cytotoxiques et des cellules tueuses (NK), joue un rôle important dans l'induction de changements apoptotiques dans les cellules cibles (Shil et al., 1992;

Heusel et al., 1994; Shresta et al., 1995). Cette enzyme peut aussi cliver la plupart des auto-antigènes du LED, suggérant ainsi un rôle pour la cytotoxicité induite par les granules lymphocytaires dans l'initiation et la propagation de l'auto-immunité systémique (Casiola-Rosen et al., 1999).

### **2.2.5 Défaut d'élimination des cellules apoptotiques**

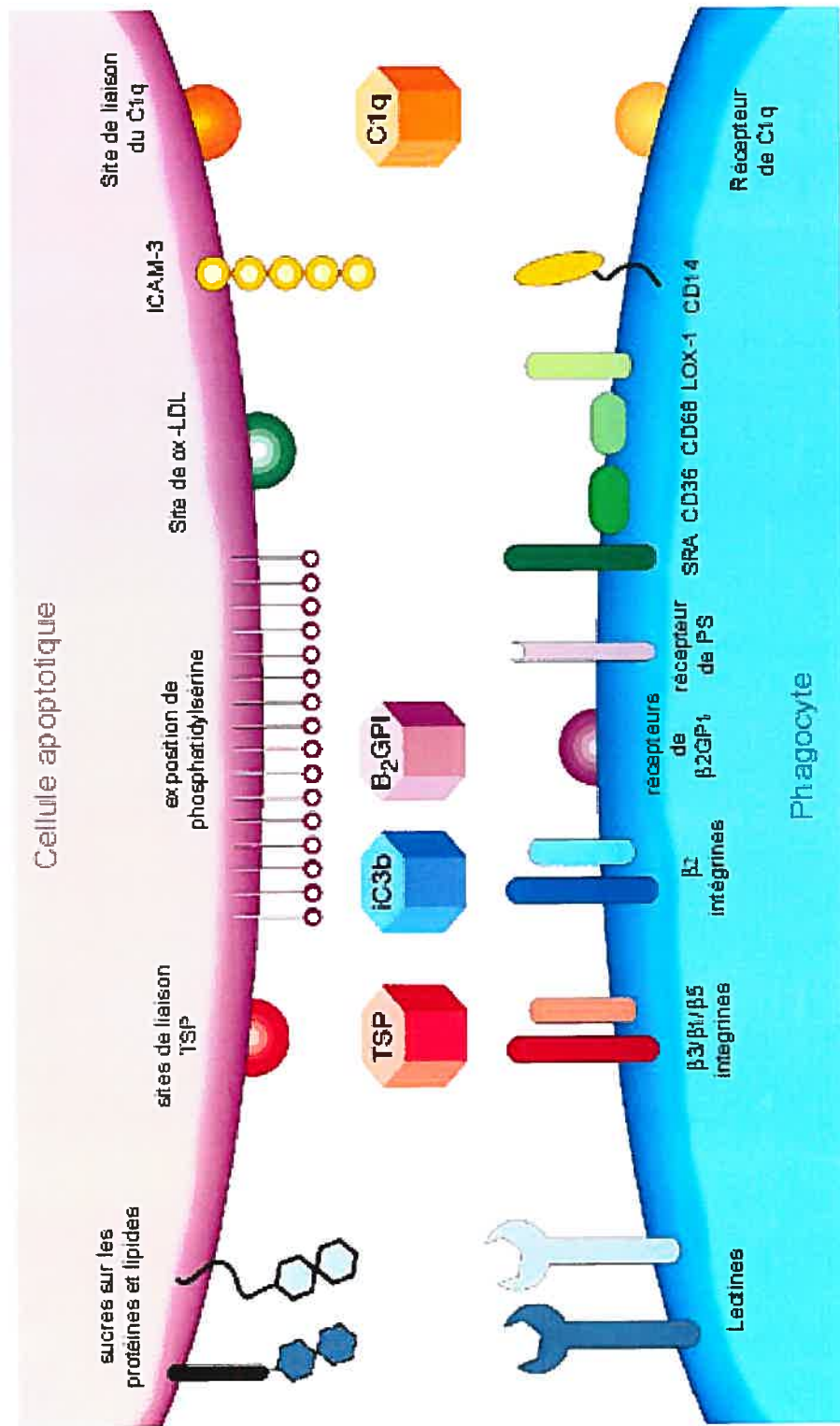
En conditions normales, les cellules apoptotiques sont rapidement ingérées et dégradées par les phagocytes. Les mécanismes permettant aux macrophages de reconnaître, lier, internaliser et dégrader les cellules apoptotiques se font sans activer les réponses inflammatoires. (Savill et al., 1998 ; Platt et al., 1998). Les récepteurs du macrophage doivent détecter un ligand sur les cellules apoptotiques et pas sur les cellules viables. La PS exprimée à la surface externe des cellules apoptotiques est l'un de ces ligands. De plus, certaines protéines de surface ayant subi des modifications posttraductionnelles, comme la glycosylation, peuvent être reconnues par les lectines des macrophages (Savill et al., 1998 ; Platt et al., 1998). D'autres molécules peuvent servir de pont, de lien entre les phagocytes et les cellules apoptotiques. Parmi ces molécules dites 'de pont' citons C1q, la première composante du complément, C3b,  $\beta$ 2-glycoprotéine I ( $\beta$ 2GPI), ICAM-3 et la thrombospondine (Botto et al., 1998 ; Taylor et al., 2000).

Il existe aussi des récepteurs qui médient l'ingestion de cellules apoptotiques au niveau des phagocytes (Figure 4). Les cellules présentatrices d'antigènes, comme les macrophages, font la discrimination entre les antigènes du soi et ceux endommagés ou étrangers à l'aide de la participation différentielles de plusieurs récepteurs spécifiques à la surface des phagocytes. Cependant, le rôle exact de chacune des molécules n'est pas encore élucidé. Il est suggéré que CD14 et les  $\beta_2$ -intégrines ancrent les cellules apoptotiques à la surface des phagocytes avant la participation des récepteurs qui déclenchent la phagocytose proprement dite (Savill et al., 2000) L'exemple le plus connu est l'interaction entre la  $\beta_2$ -intégrine CD11b/CD18 aussi nommé récepteur du complément 3 (CR3) et la molécule pont iC3b qui précède la phagocytose (Mevorach et al. 1998).

La phagocytose des vésicules apoptotiques peut être grandement facilitée par des anticorps tels les anticorps antiphospholipides (aPL) (Reiter et al., 1999) ou le complément via un mécanisme que l'on appelle l'opsonisation (Diez-Roux et al., 1997; Duffield et al., 2000).

### **2.2.6 Présentation d'antigènes dérivés de cellules apoptotiques**

Les cellules dendritiques sont spécialisées dans la présentation aux lymphocytes des antigènes ingérés mais le font de façon plus efficace lorsque l'ingestion est accompagnée d'un signal de 'danger' (Savill et al., 2000). La présentation des



**Figure 4: Molécules apoptotiques dans la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques par les phagocytes (adapté de Savill et al., 2000)**



antigènes apoptotiques par les cellules dendritiques doit être finement régulée pour ne pas engendrer de réponse immune contre des composants du soi (Mevorah et al., 1998). Les mécanismes exacts de cette régulation sont encore méconnus. Cependant, le signal de danger semble être donné lors d'anomalies dans la phagocytose de cellules apoptotiques par les cellules dendritiques. Afin d'illustrer ce phénomène, nous utiliserons l'exemple de la déficience en C1q. Les humains déficients en C1q développent presque invariablement le LED. Les souris knock out C1q développent aussi un syndrome LED-like (Botto et al., 1998). Leurs tissus contiennent un taux anormalement élevé de cellules apoptotiques suggérant un défaut d'élimination de ces cellules (Taylor et al., 2000). Chez ces individus, les cellules apoptotiques tarderaient à être éliminées et passeraient à l'état de nécrose secondaire. Cette nécrose pourrait déclencher le signal de 'danger' chez les cellules dendritiques qui les phagocytent, changeant ainsi la réponse dendritique tolérrogénique en une réponse pro-immune (Steinman et al., 2000; Rovere et al., 1998). Cependant, ce domaine de recherche est encore très controversé, certaines études ayant montré que les cellules dendritiques qui ont ingéré des cellules apoptotiques pourraient, au contraire, jouer un rôle dans le maintien de la tolérance (Stuart et al., 2002).

### **3.Lupus érythémateux disséminé (LED)**

Le LED est la maladie dite aux mille visages et présente donc de multiples facettes, tant au niveau de ses manifestations cliniques qu'au niveau de la pathogénèse et des auto-anticorps retrouvés dans le sérum des patients. Cette thèse a étudié les implications des auto-anticorps antilamine B1 (aLB1) et anticellules endothéliales (AACE) dans les mécanismes thrombotiques chez les patients atteints du LED. Or, même si ces sujets d'étude sont très pointus, une compréhension plus générale de la maladie, de ses manifestations cliniques et sérologiques et des mécanismes pathogéniques potentiels est incontournable.

#### **3.1 Définition et généralités**

Le terme lupus a été utilisé pour décrire des conditions cutanées morbides depuis au moins 7 siècles. Le terme de lupus vient du mot latin signifiant loup et fait référence aux ulcérations du visage en forme de demi-masque de théâtre appelé loup. D'autres pensent que ce terme provient des lésions cutanées graves, comparables à la morsure d'un loup. Le lupus érythémateux disséminé est une maladie multisystémique causée par des dommages tissulaires causés par des auto-anticorps et des dépôts de complexes immuns (Talbot, 1993). Cette maladie possède un large spectre de manifestations cliniques qui sont caractérisées par des rémissions et des exacerbations.

Comme pour la plupart des maladies auto-immunes, le LED est prédominant chez les femmes, avec un ratio femme : homme de 9 :1 et une fréquence chez les femmes en âge de procréer de 1 :700. Le LED est une maladie relativement commune avec une prévalence qui peut être aussi élevée que 1 :2500 (Hochberg , 1993). Il s'agit de la maladie auto-immune la plus commune et sévère chez les femmes afro-américaines (1:245).

### **3.2 Manifestations cliniques**

Le LED est une pathologie chronique hétérogène pouvant s'exprimer par des atteintes multiviscérales diverses évoluant par poussées entrecoupées de rémissions multiples. La maladie peut se révéler par des manifestations spécifiques ou systémiques telles que la fièvre, la fatigue ou la perte de poids. Presque tous les systèmes de l'organisme peuvent être atteints : musculosquelettique, cardiorespiratoire, cutané, vasculaire, neurologique, gastro-intestinal, rénal, ophtalmologique, hémato-lymphatique (Wallace, 1993). De plus, un large spectre d'anomalies sérologiques peuvent être décelées. Ces anomalies incluent une augmentation polyclonale des gamma-globulines, la présence d'anticorps antinucléaires (ANA) et d'auto-anticorps divers, de complexes immuns circulants et des changements au niveau des composantes du complément. La présence de certains de ces facteurs est importante pour corroborer le diagnostic

clinique et pour déterminer le niveau d'activité de la maladie. Dans le cadre de cette thèse, l'emphase sera mise sur la présence d'auto-anticorps.

Il est très important de souligner que, chez une personne lupique donnée, ces manifestations peuvent être présentes en n'importe quel nombre et en n'importe quelle combinaison. Lorsque ces manifestations surviennent, elles ont souvent tendance au début à apparaître l'une après l'autre, le nouveau symptôme s'ajoutant au symptôme précédent. L'apparition des manifestations au début de la maladie peut se faire très rapidement, en quelques jours, ou s'étaler sur plusieurs mois. Durant le cours de la maladie, les manifestations ont tendance à être temporaires, intermittentes, plutôt que prolongées. Elles peuvent à l'occasion apparaître et disparaître indépendamment les unes des autres. Le diagnostic du lupus peut être difficile à établir puisque ses manifestations peuvent apparaître et disparaître spontanément et qu'elles peuvent aussi imiter d'autres maladies.

### **3.3 Diagnostic**

Le diagnostic du lupus est habituellement fait chez un patient se présentant avec un ou plusieurs des symptômes cliniques identifiés par l'American College of Rheumatology (Hochberg, 1997). La présence d'une ou plusieurs anomalies sérologiques associées permet de conforter le diagnostic. Le diagnostic du LED est retenu lorsque au moins quatre des manifestations sont présentes soit

**Tableau II : Critères diagnostiques du LED identifiés par l'American College of Rheumatology (Hochberg, 1997).**

---

**Critères diagnostiques du LED**

---

- 1 Éruption malaire en forme de papillon
  - 2 Éruption de lupus discoïde
  - 3 Photosensibilité
  - 4 Ulcérations buccales ou nasopharyngées
  - 5 Arthrite
  - 6 Sérosite (pleurésie ou péricardite)
  - 7 Atteinte rénale (protéinurie ou albuminurie ou cylindres urinaires )
  - 8 Atteinte du système nerveux central (convulsions ou psychose)
  - 9 Anomalies sanguines (anémie hémolytique ou leucopénie ou lymphopénie ou thrombocytopénie)
  - 10 Anomalies immunitaires (anti-ADN ou anti-Sm ou VDRL faux-positif ou concentration anormale d'IgG ou IgM anti-CL ou LAC)
  - 11 Présence d'anticorps antinucléaires
-

simultanément, soit séquentiellement (Tableau II). La confirmation du diagnostic est généralement obtenue par la détection des AAN.

### **3.4 Pathogénèse**

Le LED résulte probablement de plusieurs événements qui débutent avec l'interaction de facteurs génétiques et environnementaux. Ces interactions peuvent mener à des réponses immunitaires anormales qui produisent des auto-anticorps et des complexes immuns causant des dommages tissulaires (Tableau III).

#### **3.4.1 Facteurs Génétiques**

Les facteurs génétiques sont des éléments essentiels dans la susceptibilité au LED. Cependant, un gène unique ne prédispose pas un humain ou une souris au LED, mais plutôt une combinaison de gènes contribue à certains aspects de la maladie comme montré au Tableau IV (Mageed et al., 2003) Ainsi, la délétion du génome d'une souris normale de gènes sélectionnés pour prédisposer à la maladie, a montré que plus d'un segment est nécessaire pour produire la maladie clinique et que chaque segment avait son activité propre.

Les modèles murins de LED incluent des modèles spontanés et des souris knock-out pour des gènes uniques. Les knock-out et les souris transgéniques ont aidé à identifier les rôles de gènes spécifiques dans l'auto-immunité. Le nombre et la

**Tableau III: Facteurs de risques contribuant à la pathogénèse du LED (adapté de Hahn 1993)**

<b>Facteurs de risque</b>	
1	<p>Suceptibilité génétique</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-gènes HLA de classe I et/ou II</li> <li>-gènes additionnels non-liés au HLA</li> <li>-gènes qui influencent le statut hormonal</li> <li>- ethnicité               <ul style="list-style-type: none"> <li>- sexe féminin</li> <li>-</li> </ul> </li> </ul>
2	<p>Facteurs environnementaux</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-antigènes du soi</li> <li>-antigènes exogènes,</li> <li>-UV</li> <li>-niveau socio-économique</li> </ul>
3	<p>Anomalies des lymphocytes B</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Hyperactivation</li> <li>-Habilité à reconnaître certains auto-antigènes</li> <li>-Clones autoréactifs échappant à la tolérance</li> </ul>
4	<p>Anomalies des lymphocytes T</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Hyperactivation</li> <li>-Habilité à reconnaître certains auto-antigènes</li> <li>-Clones autoréactifs échappant à la tolérance</li> </ul>
5	<p>Anomalies du répertoire d'immunoglobulines</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Répertoire favorisant la production d'IgG</li> <li>-Répertoire favorisant la production d'isotypes liant le complément</li> <li>-Mutations somatiques augmentant l'avidité de la liaison aux auto-antigènes</li> </ul>

- 
- 6 Contrôle déficient du système immunitaire
- Système anormal de suppression des cellules T
  - Fonction anormale des cellules NK
  - Tolérance immunitaire anormale
-



**Tableau IV: Gènes associés à la prédisposition à développer un LED spontané (adapté de Arnett, 1983)**

Loci	Espèce	Effet immunologique
Composantes du complément et récepteurs (C1q, C2, C4, CR1, CR2)	Humain	Élimination inadéquate des complexes immuns et des corps apoptotiques
Cytokines (IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$ )	Humain Souris	Fonctions lymphocytaires perturbées
Récepteurs de cytokines (TNF- $\alpha$ -RII, IL-4R, IFN- $\alpha$ RI et II)	Humain	Fonctions lymphocytaires perturbées
CMH classe II (DR, DQ, I-A, I-E)	Humain Souris	Répertoire de lymphocytes T anormal et production d'auto-anticorps
TCR loçi $\alpha, \beta, \gamma$	Humain	Répertoire de lymphocytes T anormal et production d'auto-anticorps
Loci Ig chaînes lourde et légère	Humain	Répertoire lymphocyte B anormal
Récepteur Fc IgG (Fc $\gamma$ Iia, IIIa, IIIb)	Humain	Liaison des complexes immuns aux macrophages et lymphocytes
Molécules de signalisation associées au TCR (TCR $\xi$ , SHP-1)	Humain souris	Signalisation et fonction des lymphocytes T anormales, lymphoprolifération, production d'auto-anticorps
Molécules de signalisation associées au BCR (Fc $\gamma$ RIIb, SHP-1, Yaa)	Souris	Réponse proliférative des cellules B augmentée, production des auto-anticorps
Apoptose (Fas, FasL)	Souris	Délétion clonale déficiente des cellules T et B, lymphoprolifération, production d'auto-anticorps
Molécules accessoires membranaires sur les lymphocytes (CD40L, CD22, Fc $\gamma$ RIIb)	Humain souris	Lymphoprolifération excessive
Gène du cycle cellulaire (p21)	Humain souris	Accumulation des lymphocytes T en phase G1, apoptose déficiente
Dnase1	Humain	Accumulation de DNA menant au bris

---

Gènes régulant les réponses lymphocytaires et la tolérance vs chromatine (sle1, sle2, sle3)	souris Souris	de tolérance Bris de tolérance vs chromatine, hypersensibilité lymphocytaire , apoptose déficiente
---	------------------	---

---

diversité des gènes qui ont été identifiés dans les modèles murins suggèrent que les anomalies dans un grand nombre de gènes peuvent causer le LED (Thefilopoulos et al., 1999). Cependant, la contribution de ces gènes à la maladie humaine reste à déterminer. Les lignées BWF1, MRL lpr/lpr et BXSB ont été utilisées pour les études portant sur les modèles spontanés de LED. La maladie est multigénique dans ces lignées, certaines possédant des gènes mutants uniques (*fas* et *yaa* respectivement dans les lignées MRL lpr/lpr et BXsB) qui montrent une distribution mendélienne et qui contribuent de façon significative à la maladie. Ainsi, le modèle MRL lpr/lpr démontre qu'un défaut d'apoptose peut mener à l'apparition de LED (Mageed et al., 2003). Cependant, chez l'humain des anomalies au niveau du récepteur Fas ou Fas L causent un syndrome lymphoprolifératif ou Canale-Smith (Grodzicky et al., 2000) mais ne semblent pas être un facteur majeur contribuant à la pathogénèse du LED (Kojima et al., 2000).

### **3.4.2. Le sexe**

Le sexe est, de façon évidente, très important dans la susceptibilité au LED (Lahita et al., 1999). La base de cette prédisposition est encore méconnue. Il semble improbable que le chromosome X soit directement impliqué parce la maladie ne suit pas un modèle de transmission lié au sexe. Des anomalies au niveau du métabolisme hormonal pourraient jouer un rôle dans la prédisposition sexuelle. Les hommes et les femmes qui souffrent du LED possèdent un métabolisme accéléré

de la testostérone (Lahita et al., 1983). Il est possible que les patients atteints du LED aient un surplus d'hormones estrogènes par rapport aux androgènes, exacerbant leur réponse immunitaire (Hahn et al., 2001). Les femmes exposées à des contraceptifs oraux contenant des estrogènes ont un risque plus élevé de développer le LED (Sanchez-Guerrero et al., 1997), ce qui appuie l'hypothèse que les hormones féminines sont permissives pour le développement du LED. De plus, les niveaux de prolactine sont élevés chez certains individus souffrant du LED et peuvent intervenir dans l'activité de la maladie (Walter et al., 1998).

### **3.4.3 Les facteurs environnementaux**

Le fait que la plupart des jumeaux monozygotes soient discordants au niveau du LED clinique suggère que des facteurs environnementaux peuvent jouer un rôle important dans la pathogenèse de la maladie (Arnett et al., 1997; Jarvinen et al., 1992; Deapen et al., 1992; Block et al., 1975). Ces facteurs sont énumérés au tableau V (adapté de Hahn et al., 2001).

**Tableau V : Facteurs environnementaux jouant un rôle dans la pathogénèse du LED ( adapté de Hahn et al., 2001)**

---

<b>Défini</b>	
1	Rayons Ultra-Violets

---

<b>Possible</b>	
1	Facteurs diététiques <ul style="list-style-type: none"><li>-Aliments contenant la L-canavanine</li><li>-Pristane</li><li>-Gras saturés</li></ul>
2	Agents infectieux <ul style="list-style-type: none"><li>-DNA bactérien</li><li>-Rétrovirus humains</li><li>-Endotoxines</li></ul>
3	Exposition à certains médicaments <ul style="list-style-type: none"><li>-Hydralazine</li><li>-Procainamide</li><li>-Isoniazide</li><li>-Hydantoïnes</li><li>-Chlorpromazine</li><li>-Methyldopa</li><li>-d-penicillamine</li><li>-Minocycline</li><li>-Anti-TNF-<math>\alpha</math></li><li>-IFN-<math>\alpha</math></li></ul>

---

### 3.4.3.1 L'exposition aux UV

Chez jusqu'à 70% des patients souffrant du LED on observe une exacerbation de la maladie après une exposition aux UV (Wysenbeck et al., 1989). Plusieurs études ont suggéré des mécanismes par lesquels l'exposition aux UV peut réactiver la maladie. L'exposition de l'ADN aux UV augmente le nombre de dimères de thymidine rendant l'ADN plus immunogène (Natali et al., 1973). Il a été observé que l'exposition de kératinocytes aux UV pouvait induire l'apoptose (Casiola-Rosen et al., 1994; Casciola-Rosen et al., 1997). De plus, tel que vu à la section 3.2.3, il est possible que cette apoptose rend des antigènes intracellulaires plus immunogéniques. Ainsi, les antigènes nucléaires et cytosoliques changent leur localisation intracellulaire pour se retrouver au niveau de structures de surfaces (Casiola-Rosen et al., 1994; Casciola-Rosen et al., 1997). De plus, la perte de l'asymétrie normale des phospholipides membranaires lors de l'apoptose permet l'exposition de phospholipides anioniques à la surface cellulaire. Finalement, la modification par les caspases, entre autres, de protéines intracellulaires peut les rendre antigénique (Casiano et al., 1998). Chacun de ces changements permet la présentation au système immunitaire de nouveaux antigènes et permet ainsi à certains lymphocytes de devenir autoréactifs. Le dommage cellulaire causé aux cellules par les UV permet aussi le relâchement de protéines de stress (heat shock proteins) qui participent à l'activation de cellules T autoréactives (Schultz et al., 1993).

### 3.4.3.2 Agents infectieux

Plusieurs travaux ont tenté d'identifier les agents infectieux causant le LED. L'administration de lipopolysaccharides aux souris lupiques accélère le développement de la maladie (Cavallo et al., 1990). Une étude a détecté des anticorps dirigés contre la protéine gag p24 du virus d'immunodéficience humaine 1 chez un tiers des patients comparés à 1/120 sujets contrôles. L'oncornavirus de type C a été impliqué dans la néphrite des souris de la lignée NZB/B1 (Erasquin et al., 1995). Un groupe a trouvé des virus du polyome BK plus fréquemment chez les patients atteints du LED que chez les sujets contrôles (Sundsfjord et al., 1999). Toutes ces observations demeurent incomplètes et doivent être confirmées par d'autres. Cependant il en ressort que l'infection semble jouer un rôle important dans l'exacerbation des réponses immunitaires indésirables. Il est possible que les agents infectieux et leurs produits puissent activer les monocytes, cellules B et T et augmenter la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ou même induire la maladie chez un individu possédant les gènes le prédisposant à la maladie.

Finalement, les antigènes étrangers d'agents infectieux peuvent mimer les auto-antigènes et créer une réaction contre des antigènes du soi par mimétisme moléculaire. Cette hypothèse a été suggérée et étudiée par nombre de groupes (Wallace, 1983).

### 3.4.4 Anomalies au niveau des lymphocytes B

Une des anomalies prévalente dans le LED est le haut niveau d'auto-anticorps. L'anomalie la plus étudiée en rapport avec la surproduction d'anticorps est l'hyperactivité des lymphocytes B. D'après certaines données, les cellules B pourraient jouer un rôle pathogénique central dans le LED. Par exemple, des maladies ressemblant au LED peuvent être induites avec une contribution minimale ou même nulle des lymphocytes T.

Des études génétiques soutiennent aussi le rôle important des lymphocytes B dans la maladie. Ainsi trois loci nommés *sle1*, *sle2* et *sle3* ont été identifiés chez la souris lupique NZM2410, qui est une lignée dérivée de BWF1. Les loci *sle1* et *sle2* sont associés à une dysfonction intrinsèque des lymphocytes B et résultent en un bris de tolérance pour la chromatine, une hypergammaglobulinémie et des auto-anticorps IgM (Wakeland et al., 2001).

Des lymphocytes B activés de façon polyclonale sont retrouvés dans la circulation des patients atteints du LED de même qu'une activation chronique et soutenue des lymphocytes B chez la souris ont mené au développement de l'auto-immunité (Maggeed et al., 2003).



Chez l'humain, il existe des données corroborant l'hypothèse de l'hyperactivité des cellules B (Mageed et al., 2003). De plus, les lymphocytes B de patients souffrant du LED, tout comme ceux de souris lupiques, présentent des changements phénotypiques comme l'expression aberrante de CD40L, CD80 et CD86 (Folzenlagen et al., 1997). Lorsque mis en culture, les lymphocytes B de patients produisent spontanément de grandes quantités d'immunoglobulines. Il existe aussi des données suggérant des anomalies au niveau de la signalisation intracellulaire. Ainsi, la stimulation des lymphocytes B de patients LED, via leur récepteur B, induit des niveaux de calcium intracellulaire et de phosphorylation protéique plus élevés que chez les lymphocytes B de patients souffrant d'autres maladies rhumatismales systémiques ou de contrôles normaux (Tanaka et al., 1994).

### **3.4.5 Anomalies au niveau des lymphocytes T**

Plusieurs anomalies dans les fonctions des lymphocytes T ont été décrites dans le cadre du LED. Cependant, il n'existe aucun défaut commun à tous les patients. De façon générale, la présence de lymphocytes T autoréactifs ne semble pas refléter un défaut du répertoire central mais plutôt un bris de tolérance au niveau périphérique. Dans le lupus murin, l'hypersensibilité des lymphocytes T à des étapes précoces de la maladie est une anomalie dominante. Suite à cette hypersensibilité, des auto-anticorps sont produits à des niveaux élevés et des sous-groupes de ces auto-anticorps et les complexes immuns qu'ils forment

médient les dommages tissulaires caractéristiques du LED. Chez les patients, une réduction du nombre de cellules T CD8+, des défauts fonctionnels et de l'activation soutenue ont été observés. Dans les modèles murins du lupus, il semble que les défauts intrinsèques soient reliés à l'hypersensibilité des lymphocytes T. Chez les humains, par contre, les facteurs sous-jacents sont moins clairs. Il est possible que l'activation soutenue des lymphocytes et le bris de tolérance soient dus à la persistance des antigènes et à une augmentation générale de l'apoptose dans l'organisme (Walport et al. 2002).

Chez les patients souffrant du LED, une baisse du nombre des cellules T, B et NK est commune. La lymphopénie des cellules T est surtout caractérisée par une baisse des cellules CD8+. Au moins une partie de cette réduction est attribuable à des auto-anticorps antilymphocytes et en partie à une augmentation de l'apoptose (Emlen et al., 1994).

Il existe aussi des défauts fonctionnels au niveau des lymphocytes T. Les cellules CD8+ et NK possèdent une activité cytotoxique diminuée (Goto et al., 1980). De plus, la capacité de ces deux populations à contrôler la production d'auto-anticorps par les cellules B est réduite dans le LED (Linker-Israeli et al., 1990). Cette anomalie a été attribuée au moins partiellement à une production diminuée de tumor growth factor (TGF)-bêta (Ohtsuka et al., 1998).

Des défauts au niveau de la signalisation des lymphocytes T ont aussi été mis à jour. Ces défauts comprennent entre autres des déficiences dans l'expression de la chaîne zeta du CD3 (Tsokos et al., 1999; Liossis et al., 1998), dans la réponse calcique aux anti-CD3 (Sierakowski et al., 1989) et dans l'activation du nuclear factor (NF) kappa B (Wong et al., 1999). Chez les humains et les modèles de lupus murin, il existe aussi des anomalies liées à la production de cytokines par les lymphocytes T. Chez la souris lupique la production d'IL-2 diminue avec l'âge et le début de la maladie et dans la plupart des modèles de grandes quantités d'IL-4 et d'IFN-gamma sont produites. L'IFN induit la production d'auto-anticorps fixant le complément et l'IL-4 promouvoit la prolifération des lymphocytes B et donc augmente la production d'auto-anticorps. Cependant, chez l'humain souffrant du LED, les patrons de cytokines sont moins prévisibles. Chez certains patients, l'activité de la maladie est associée avec des réductions de production d'IL-2 par les lymphocytes et chez plusieurs les taux d'IL-6 sont élevés. Une des observations courante est l'incapacité de produire le TGF- beta. La réduction de la production de cette cytokine peut être en partie responsable de l'hyperactivité des lymphocytes B et T en atténuant l'effet des lymphocytes T régulateurs (Mageed et al., 2003).

Si l'on se base sur ces anomalies, il est possible que la restauration des fonctions normales des cellules T puisse corrélérer avec une rémission de la maladie. Plusieurs études penchent en effet en faveur de cette hypothèse, dont celle de Traynor et al. Dans cette étude, l'emploi de doses immuno-ablatives de cyclophosphamide suivie de la transplantation autologue de cellules souches a résulté en une rémission clinique complète du LED ainsi qu'en une normalisation du phénotype et du répertoire des cellules T (Traynor et al., 2000).

### **3.4.6 Anomalies liées au complément**

Les déficiences du complément ne sont présentes que chez 5% des patients souffrant du LED. Par contre, au moins 50% des patients avec des déficiences homozygotes de la voie précoce du complément développent une maladie ressemblant au LED. La susceptibilité au LED associée notamment avec des déficiences en C1q, C1r, C1s et C2 semble être due à une mauvaise élimination et solubilisation des complexes immuns (Walport et al., 2002 ; Mason et al., 1998).

### **3.5 Auto-anticorps**

Presque tous les patients souffrant du LED développent des auto-anticorps. Certains auto-anticorps ne sont pas associés à des manifestations cliniques alors que d'autres semblent être impliqués dans les dommages tissulaires caractéristiques de la maladie. Ces auto-anticorps ont le plus fréquemment pour

cible des antigènes intracellulaires et, plus particulièrement, nucléaires. Une description des AAN en général précédera une description plus détaillée des aLB1 qui font l'objet d'une partie de mon étude.

### **3.5.1 Auto-anticorps naturels**

Il est maintenant établi que les anticorps autoréactifs font partie du répertoire normal des cellules B. Ils ne sont uniques ni dans le LED ni dans aucune autre maladie auto-immune. En fait, des cellules B produisant des auto-anticorps naturels peuvent être retrouvées chez des individus normaux. Ces auto-anticorps naturels ressemblent aux anticorps produits lors d'une réponse primaire : ils sont d'isotype IgM et de faible affinité pour leur antigène. De plus, ils sont polyréactifs et semblent être produits par la sous-population CD5<sup>+</sup> des cellules B. Ces auto-anticorps naturels ne sont pas pathogéniques et leur rôle physiologique demeure inconnu (Aranow et al., 1983; Senécal et al., 1993).

### **3.5.2 Auto-anticorps pathogéniques**

Les auto-anticorps retrouvés dans le LED diffèrent des auto-anticorps naturels (Tableau VI). Ce sont des IgG qui possèdent une grande affinité pour leur antigène (Senécal et al., 1993). Même s'ils ne sont pas nécessairement monospécifiques, ils réagissent contre des molécules structurellement homologues entre elles.

**Tableau VI: Distinctions entre les auto-anticorps naturels et pathogéniques  
(adapté de Aranow et al., 1983 et Senécal et al. 1993)**

<b>Auto-anticorps naturels</b>	<b>Auto-anticorps pathogéniques</b>
IgM	IgG
Polyréactif	Monospécifique
Faible affinité	Forte affinité
Lignée cellules B CD5+	Lignée cellule B CD5-
Faible titre	Titre élevé
Réponse immunitaire primaire	Réponse immunitaire de type secondaire

Certains IgG anti-ADN, par exemple, peuvent aussi lier d'autres antigènes riches en phosphates tels que la cardiolipine et les phospholipides. La pathogénicité des ces auto-anticorps est déduite de leur association avec des événements pathologiques et/ou par leur présence dans le tissu affecté. Les aPL sont associés à la perte foetale et aux thromboses, les anti-Ro avec le développement du lupus néonatal et de problèmes cardiaques foetaux. Il a aussi été montré que certains anti-ADN possèdent une réactivité croisée avec les récepteurs N-méthyl D-aspartate, ont accès au liquide cébrospinal et peuvent induire des anomalies du système nerveux central (Diamond et al. 2001). De plus, les anti-ADN peuvent contribuer à la glomérulonéphrite et peuvent être retrouvés au niveau des reins, de la peau lésionnelle et du péricarde de patients souffrant du LED (Hahn, 1998).

### 3.5.3 Anticorps anti-nucléaires (AAN)

La majorité des patients possédant des AAN n'ont pas le LED mais la plupart des patients souffrant du LED possèdent des AAN. Tel que vu précédemment, les AAN sont très importants étant donné que la confirmation d'un diagnostic de LED requiert la présence de ces auto-anticorps à titre élevé.

Le test des AAN utilise l'immunofluorescence indirecte, sur un substrat de cellules nucléées ,standardisé notamment avec les cellules HEp-2. Différents types de fluorescence peuvent être détectés et reflètent l'hétérogénéité des auto-anticorps présents dans les sérums lupiques. Les différents auto-anticorps détectés en immunofluorescence peuvent être associés à différentes manifestations cliniques de la maladie (von Muhlen et Tan, 1995).Cependant, un type de fluorescence ne correspond pas nécessairement à un seul auto-anticorps. Par exemple, le type de fluorescence nucléaire périphérique ou « rim pattern », où la périphérie du noyau est marquée, peut refléter la présence auto-anticorps anti-ADNdb, anti-lamine ou même d'anti-pore nucléaire (Senécal et al., 1991). Selon le cas, l'association clinique reliée à l'observation d'un même patron de fluorescence peut être très différente.

### **3.5.4 Auto-anticorps antilamine B1 (aLB1)**

Notre laboratoire a rapporté en 1999 que des auto-anticorps dirigés contre la protéine nucléaire lamine B1 étaient hautement spécifiques chez un sous-groupe de patients atteints du LED. Une brève description de l'antigène lamine B1 précédera la description des aLB1.

#### **3.5.4.1 Lamine B1**

La lamina est un réseau de filaments polymériques à l'intérieur du noyau qui contient des protéines portant le nom de lamines et des protéines liant les lamines (Figure 5). Les lamines sont ancrées au niveau de la membrane interne du noyau (Wilson et al., 2001). Les lamines sont essentielles à la réplication de l'ADN qui est initiée d'une manière organisée dans l'espace et débute au niveau d'un petit nombre de foyers près du nucléole, qui contiennent des lamines. La lamina n'est pas une structure permanente : elle se dépolymérise durant la mitose via un cycle de phosphorylation des lamines. Les lamines font partie des protéines de la famille des filaments intermédiaires et forment des dimères qui interagissent entre eux pour former des polymères et, éventuellement, des filaments de 10 nm de diamètre. Certaines de ces protéines sont aussi modifiées post-traductionnellement par protéolyse et isoprénylation. Finalement, elles peuvent être clivées durant l'apoptose par la caspase-6, entre autres (Wilson et al., 2001).



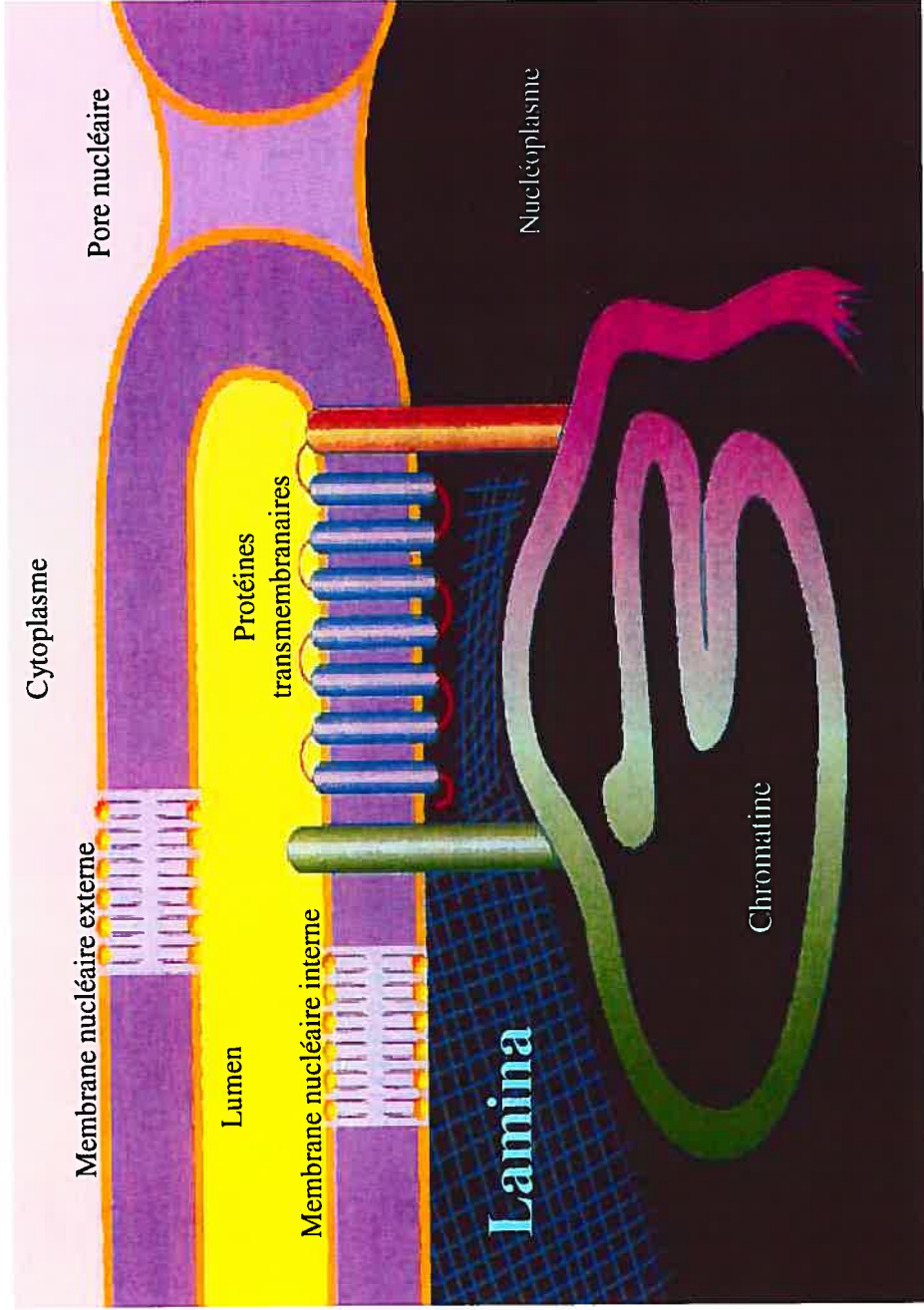


Figure 5: Localisation de la lamina nucléaire (adapté de Hegele 2000)

Les humains possèdent trois gènes codant pour les lamines : LMNA et deux gènes codant pour les lamines B (LMNB1 et LMNB2). Il a été longtemps rapporté que les lamines B étaient ubiquitaires. Cependant, il est maintenant clair que la lamine B2 est exprimée de manière beaucoup plus répandue que la lamine B1. En effet, la lamine B1 possède des niveaux d'expression variables dans les différents types cellulaires humains mais est exprimée notamment par les cellules du système immunitaire, dont les lymphocytes, ainsi que par les cellules endothéliales (Broers et al., 1997).

#### **3.5.4.2. Auto-anticorps antilamine B1 (aLB1)**

Des titres élevés d'aLB1 ont été rapportés d'abord chez un petit nombre de patients avec LED ou des maladies ressemblant au LED (Guilly et al., 1987; Reeves et al., 1987; Lassoued et al., 1988; Reeves et al., 1989; Chou et al., 1991; Senécal et al., 1991; Senécal et al., 1992). Dans ces rapports, les patients étaient sélectionnés sur la base de leur patron de fluorescence en anneau (rim pattern) caractéristique des aLB1 dans les tests de fluorescence pour détection des AAN (Senécal et al., 1991).

Notre laboratoire a donc entrepris une étude sur la fréquence et les associations cliniques de titres élevés d'aLB1 dans une grande cohorte de patients souffrant du LED. Afin de quantifier ces anticorps, un ELISA utilisant la lamine B1 recombinante

pure comme antigène a été effectué sur le premier sérum des patients avec LED, des témoins normaux et des témoins souffrant de maladies rhumatismales ou d'autres maladies auto-immunes. Il a été clairement démontré que les IgG aLB1 à titres élevés sont fortement restreints à un sous-groupe (8,5%) de patients souffrant du LED (Senécal et al., 1999).

#### **3.5.4.3. Implications cliniques associées aux aLB1**

Les titres élevés d'IgG aLB1 sont restreints à un sous-groupe de patients souffrant du LED (Senécal JL et al. 1999). De plus, certaines études ont noté la présence de LAC, thrombocytopenie, aCL, anémie hémolytique auto-immune et de la neutropénie en association avec des titres élevés d'aLB1 (Guilly et al., 1987; Lassoued et al., 1988).

En particulier, une forte association a été trouvée par analyse multivariée entre la présence d'IgG aLB1 et la présence de LAC (Senécal et al., 1999). De plus, la neutropénie, lymphopénie, un test de Coombs positif et les aCL étaient plus communs chez les patients possédant des titres élevés d'IgG aLB1 mais pas de manière significative. Le sous-groupe de patients aLB1 positifs était donc caractérisé par la présence de LAC et, paradoxalement, avec un risque de thrombose faible (Senécal et al. 1999). Or, les LAC sont classiquement et fortement associés avec les manifestations thrombotiques du syndrome

antiphospholipide (SAP) (Levine et al., 2002). De plus, dans la même étude (Senécal et al. 1999), la fréquence des thromboses chez les patients possédant le LAC, mais pas les aLB1, était augmentée significativement par rapport au groupe qui possède les deux marqueurs. Ces résultats suggéraient un rôle thromboprotecteur des aLB1 qui atténueraient l'effet prothrombotique des LAC. De ce fait, la quantification des IgG aLB1 pourrait être très utile pour le pronostic du risque thrombotique chez les patients souffrant du LED et possédant des LAC. Quoique ces résultats aient été significatifs, le sous-groupe de patients LED possédant des aLB1 était peu élevé. Ces résultats devaient donc être confirmés chez un plus grand nombre de patients. De plus, l'étude avait porté uniquement sur des sujets Canadiens français. Parce que l'ethnicité et les facteurs génétiques peuvent modifier les réponses immunitaires, il importait de vérifier cette observation chez des sujets de d'autres origines.

#### **4. Syndrome antiphospholipide (SAP)**

Chez les patients atteints du LED, les thromboses sont fréquemment associées au SAP. En se penchant sur les mécanismes thrombotiques dans le LED, cette thèse s'est donc intéressée aux événements thrombotiques médiés par les anticorps antiphospholipides (aPL). Une description des manifestations cliniques, des anticorps caractéristiques ainsi que de la pathogénèse de ce syndrome est donc utile à ce stade.

## **4.1 Définition et généralités**

Les aPL sont des anticorps dirigés contre des phospholipides ou contre des protéines plasmatiques liées à des phospholipides anioniques. Le terme SAP a été créé pour décrire l'association clinique entre les aPL et un syndrome d'hypercoagulabilité (Hughes GR et al. 1986; Alarcon-Segovia D et al. 1989). Cependant, la terminologie utilisée ainsi que les critères diagnostiques décrivant le syndrome sont en évolution (Wilson et al., 1999), reflétant les percées au niveau des techniques de détection en laboratoire et au niveau de la compréhension de la pathogénèse. Le diagnostic non-équivoque d'un SAP doit comprendre un événement clinique (ex. thrombose ou perte fœtale) et un aPL documenté. Les critères préliminaires de classification pour le SAP sont présentés dans le tableau VII (Levine et al., 2002).

## **4.2 SAP primaire ou secondaire**

Lorsque le SAP survient sans maladie associée, on parle de SAP primaire. Lorsque le SAP est associé à une maladie telle que les LED, il s'agit alors du SAP dit secondaire. Le LED est de loin la maladie la plus fréquemment associée au SAP avec une prévalence d'environ 30% pour les patients souffrant du LED. Le SAP est une cause majeure de morbidité et de mortalité dans le LED. Il n'existe pas de

**Tableau VII: Critères préliminaires pour la classification du syndrome antiphospholipide provenant du consensus international (Levine et al., 2002).**

---

**Critères cliniques**

---

Thrombose vasculaire

Un (ou plusieurs) épisode de thrombose artérielle, veineuse ou microvasculaire dans n'importe quel tissu ou organe

Complications de grossesse

Une (ou plusieurs) mort de foetale de morphologie normale à 10 semaine ou plus de gestation

Une (ou plusieurs) naissance prématurée d'un foetus de morphologie normale à 34 semaine ou plus de gestation

Trois (ou plus) avortements inexplicables consécutifs avant la 10<sup>ième</sup> semaine de gestation

---



---

**Critères de laboratoire**

---

Anticorps anticardiolipine (aCL)

Présence d'IgG ou IgM aCL à niveaux modéré ou élevé dans le sang, à deux occasions et à au moins 6 semaines d'intervalle

Anticoagulant lupique (LAC)

LAC détecté dans le sang à deux occasions à intervalle d'au moins 6 semaines selon les directives de l'International Society on Thrombosis and Hemostasis

---

\*Un diagnostic du syndrome antiphospholipide requiert la présence d'un moins un de critères cliniques et d'au moins un critère de laboratoire. Aucune limite n'a été établie sur l'intervalle entre l'événement clinique et la positivité du test de laboratoire.

différence majeure dans les conséquences cliniques dues aux aPL chez les patients souffrant de SAP primaire ou secondaire (Vianna et al., 1994).

### **4.3 Manifestations cliniques**

Les manifestations cliniques majeures du SAP sont les thromboses artérielles et veineuses ainsi que les pertes fœtales récurrentes.

#### **4.3.1 Thromboses artérielles et veineuses dans le SAP**

Presque tous les organes peuvent être ciblés par les thromboses dans ce syndrome (Levine et al., 2002). Les thromboses veineuses (thrombophlébites) sont plus fréquentes que les thromboses artérielles (Asherson et al., 1989; Alarcon-Segovia et al., 1992; Vianna et al., 1994). Les thrombophlébites sont le plus souvent profondes au niveau des jambes (29-55% des patients) (Asherson et al., 1989; Alarcon-Segovia et al., 1992; Vianna et al., 1994) mais peuvent atteindre les territoires rénaux, hépatiques ou rétiniens. L'atteinte thrombotique artérielle la plus fréquente est cérébrale (Asherson et al., 1989) mais les territoires coronaires, rénaux et mésentériques peuvent également être touchés. En l'absence d'anticoagulothérapie, les récurrences sont fréquentes et sont estimées à environ 10 % en 4 ans. L'incidence des récurrences est plus fréquente chez les patients ayant les taux les plus élevés d'anticorps aPL de type IgG.

**Tableau VIII: Classification et détection des anticorps antiphospholipides (adapté de Levine et al., 2002).**

Anticorps	Méthodes de détection
Anticoagulant lupique (LAC)	<p data-bbox="651 558 1446 684"><u>Première étape</u> : prolongation du temps de coagulation dans au moins un des tests de coagulation in vitro qui utilisent du plasma appauvri en plaquettes</p> <p data-bbox="906 695 1446 772"><u>Voie extrinsèque de la coagulation</u> (temps de la prothrombine diluée)</p> <p data-bbox="906 783 1446 957"><u>Voie intrinsèque de la coagulation</u> (temps de thromboplastine partielle activée et/ou diluée, temps de coagulation du silice colloïdal, temps de coagulation de la kaoline)</p> <p data-bbox="906 968 1446 1142"><u>Voie de coagulation finale commune</u> (le test de venin de vipère Russell, le temps du venin de Taipan, temps de textarine et d'Ecarine)</p> <p data-bbox="651 1152 1446 1278"><u>Deuxième étape</u>: incapacité de corriger le temps prolongé de coagulation en mélangeant le plasma du patient avec du plasma normal</p> <p data-bbox="651 1289 1446 1415"><u>Troisième étape</u>: confirmation de la présence de LAC en diminuant ou en corrigeant le temps de coagulation prolongé après addition de phospholipides ou de plaquettes</p> <p data-bbox="651 1425 1446 1598"><u>Quatrième étape</u>: éliminer la possibilité d'autre coagulopathies en utilisant des tests avec des facteurs spécifiques si le test de confirmation est négatif ou si un inhibiteur spécifique est soupçonné</p>



---

Anti-cardiolipine (aCL)	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) utilisant la CL comme antigène, normalement en présence de $\beta_2$ -GPI. Les aCL de patients souffrant du SAP sont dépendants de la $\beta_2$ -GPI; aCL de patients souffrant de maladies infectieuses sont indépendants de la présence de $\beta_2$ -GPI.
Anti- $\beta_2$ -GPI	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) utilisant la $\beta_2$ -GPI comme antigène

---

### **4.3.2 Pertes fœtales récurrentes**

Les avortements spontanés récurrents sont une manifestation du SAP. La présence d'anticorps le risque associé. Ce risque est augmenté qu'il y ait ou non un LED associé. La perte fœtale survient le plus fréquemment au cours du deuxième trimestre (Locksin et al., 1985 ; Oshiro et al., 1996). Les aPL sont également associés à un risque important de retard de croissance intra-utérin.

### **4.3.3 Autres manifestations**

Les autres manifestations cliniques du SAP comprennent la thrombocytopénie (40-50% des patients), l'anémie hémolytique auto-immune (14-23% des patients) et le livedo réticulaire (11-22% des patients) (Asherson et al., 1989 ; Alarcon-Segovia et al., 1992 ; Vianna et al., 1994). Malgré que les manifestations rénales soient très communes dans le LED, elles n'ont été que très récemment reconnues comme faisant partie des manifestations du SAP (Levine et al., 2002). L'atteinte rénale survient chez 25 % des patients avec un SAP primaire et l'hypertension est presque toujours présente (Nochy et al., 1999). L'absence de dépôts immuns permet notamment de distinguer les atteintes due au SAP des lésions de néphrite lupique parfois associées.

#### 4.4 Anticorps antiphospholipides (aPL)

Les aPL sont une famille d'auto-anticorps avec un large spectre de spécificité antigénique, puisqu'ils reconnaissent des combinaisons variées de phospholipides (PL) et/ou de protéines liant les phospholipides (PLbp).

Les trois sous-groupes d'aPL les plus détectés sont les LAC, les aCL et les  $\alpha\beta_2\text{GP1}$ . La division de ces groupes est basée sur la méthode de détection (Tableau VIII).

Les LAC sont identifiés par des tests de coagulation dans lesquels ils prolongent le temps de coagulation. Les différents tests de coagulation sont subdivisés selon la portion de la cascade de coagulation qu'ils évaluent (Tableau VIII). Le critère actuel pour la détection des LAC requiert la prolongation du temps de coagulation d'au moins un des tests de coagulation dépendant des phospholipides. Pour exclure la présence de LAC, au moins deux différents tests de coagulation doivent être normaux (Wilson et al., 1992; Brandt et al., 1995; Triplett et al., 1999).

Les essais immunoenzymatiques (ELISA) pour aCL mesurent la réactivité des anticorps à la cardiolipine seule ou en complexe (ou non) avec la  $\beta_2\text{GPI}$ . Les critères courants pour la classification du SAP recommandent la mesure des IgM

et IgG aCL dépendants de la  $\beta_2$ GPI. L'observation que plusieurs aCL sont dirigés contre un épitope de la  $\beta_2$ GPI a mené au développement d'un ELISA anti- $\beta_2$ GPI (Roubey et al., 1996; Galli et al., 1990; McNeil et al., 1990; Arvieux et al., 1991). Cependant, la présence des anti- $\beta_2$ GPI n'est actuellement pas incluse dans les critères de classification du SAP. Malgré tout, ces derniers sont fortement associés à la thrombose et autres manifestations du SAP (Viard et al., 1992; Cabral et al., 1996; Carreras et al., 2000).

Malgré la concordance fréquente entre LAC et aCL (Galli et al., 1992) ou  $\beta_2$ GPI (Viard et al., 1992) ces anticorps ne sont pas identiques. En général, les LAC sont plus spécifiques au SAP tandis que les aCL sont plus sensibles (de Groot et al., 1995). Il n'existe cependant pas d'association définitive entre des manifestations cliniques spécifiques et un sous-groupe particulier d'aPL. Comme les patients peuvent s'avérer négatifs pour un anticorps et positifs pour un autre, de multiples tests pour la détection des aPL doivent être effectués

#### **4.5 Pathogénèse du SAP**

Les aPL peuvent interférer avec les voies anti- et procoagulantes (Tableau IX). Les deux facteurs majeurs qui peuvent moduler l'équilibre entre les voies pro et anti-coagulantes sont la surface de phospholipide sur laquelle la réaction se produit et la spécificité antigénique de l'aPL. Ainsi, pour certains aPL, la surface de

phospholipide utilisée dans les tests de coagulation *in vitro* favorise l'inhibition des voies procoagulantes phospholipide dépendante et donc augmente le temps de coagulation, ces aPL sont appelés anticoagulant lupique (LAC). Cependant, *in vivo*, le micro-environnement des membranes cellulaires promouvoit une plus grande inhibition des voies anticoagulantes et, de ce fait, promouvoir la thrombose (Esmon et al., 2000).

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels les aPL induisent la thrombose (tableau IX). Une première implique l'activation des cellules endothéliales. La liaison des aPL induit l'activation des cellules endothéliales, comme le montrent l'augmentation de l'expression de surface de molécules d'adhésion (E-selectine, ICAM-1, VCAM-1), la sécrétion de cytokines et chemokines pro-inflammatoires (IL-1 beta, IL-6, IL-8, MCP-1) et la réduction du métabolisme de la prostacycline vasculaire PGI<sub>2</sub> (Meroni et al., 2000). Les aPL semblent reconnaître la  $\beta_2$ GPI liée à la surface des cellules endothéliales quiescentes. Cependant, la base moléculaire de cette interaction de la  $\beta_2$ GPI avec des cellules viables reste obscure (Meroni et al., 1994).

Une seconde théorie repose sur la blessure de l'endothélium vasculaire médiée par les oxydants. « Oxidized low density lipoprotein » (ox-LDL), un contribuant

**Tableau IX: Effets opposés des anticorps antiphospholipides sur la coagulation (Adapté de Levine et al., 2002)**

<b>Effet procoagulant</b>	<b>Effet anticoagulant</b>
Inhibition de la voie de la protéine C activée	Inhibition de l'activation du facteur IX
Activation de la voie du facteur tissulaire	Inhibition de l'activation du facteur X
Inhibition de l'activité de l'antithrombine III	Inhibition de l'activation de la prothrombine en thrombine
Bris de la couche d'Annexin V à la surface membranaire	
Inhibition de l'activité anticoagulante de $\beta_2$ -GPI Inhibition de la fibrinolyse	
Activation des cellules endothéliales	
Augmentation de l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales, et adhérence des neutrophiles et leucocytes aux cellules endothéliales	
Activation et dégranulation des neutrophiles	
Potentialisation de l'activation plaquettaire	
Augmentation de la liaison de $\beta_2$ -GPI aux membranes	
Augmentation de la liaison de la prothrombine aux membranes	

majeur de l'athérosclérose, est ingéré par les macrophages, menant à leur activation et au dommage endothélial subséquent (Ames et al., 1994). Les auto-anticorps anti-oxLDL se présentent en association avec les aCL. De plus certains aCL possèdent une réaction croisée avec ox-LDL (Vaarala et al., 1993). Les aCL lient la cardiolipine oxydée et non réduite ce qui suggère que les aCL peuvent reconnaître les phospholipides ou PLbp oxydés ou les deux (Hörkkö et al., 1996).

Une troisième théorie veut que les aPL puissent interférer ou moduler la fonction des PLbp. La  $\beta_2$ GPI étant un anticoagulant naturel, la liaison d'anticorps à cette molécule pourrait interférer avec cette fonction (Kandiah et al., 1994). Plusieurs mécanismes par lesquels les aPL peuvent interférer avec les fonctions régulatrices de la prothrombine, la protéine C, l'annexine V et le facteur tissulaire ont aussi été proposés (; Worm et al., 1984; Tincani et al., 2000; Roubey et al., 2000; Rand et al., 1997). Par exemple, certaines sous-populations d'aPL semblent être dirigées contre des complexes de PL et de différentes protéines plasmatiques. Ainsi, il a été montré que certains aPL pouvaient bloquer l'inactivation du facteur Va dépendante de la protéine C activée (Oosting et al., 1993).

Dans toutes ces théories, il est crucial de se rappeler que, paradoxalement, même si la présence des aPL est un prédicteur puissant de la thrombose, 50% des patients possédant des aPL ne font pas de thromboses. Ceci indique que la seule

présence des aPL serait insuffisante pour induire la thrombose chez les sujets aPL positifs. Il a donc été suggéré qu'un autre événement comme la blessure vasculaire pourrait être nécessaire pour que la thrombose ait lieu chez ces patients (Levine et al., 2002). La cible exacte des aPL *in vivo* (type exact de PL et/ou PLbp) reste encore incertaine. De plus l'absence de phospholipides anioniques à la surface cellulaire ainsi que l'absence de réactivité des aPL avec les cellules intactes suggèrent qu'une perturbation de la membrane cellulaire peut être nécessaire pour que ces anticorps lient les cellules. En effet, certains aPL peuvent réagir avec les plaquettes activées (Shi et al., 1993) et les cellules apoptotiques (Price et al., 1996). Ces cellules apoptotiques ont perdu l'asymétrie normale des phospholipides membranaires et exposent des phospholipides anioniques sur leur surface. La liaison des aPL à la surface des cellules apoptotiques est dépendante de la  $\beta 2\text{gp}1$  (Price et al., 1996; Levine et al., 1999). Nous proposons que d'autres facteurs occasionnant une perturbation membranaire pourraient précéder le recrutement des aPL dans la physiopathologie du SAP. L'étude de facteurs pouvant causer de tels changements est donc cruciale.

## **5. Anticorps anticellules endothéliales (AACE)**

Les AACE ont été rapportés chez des patients souffrant de maladies associées à des vascularites et des thromboses. Ils se retrouvent aussi dans le sérum de certains patients lupiques. Comme nous le verrons plus en détail ci-après, nous



avons émis l'hypothèse que ces anticorps jouent un rôle dans les mécanismes thrombotiques chez les patients atteints du LED. Une description de la littérature portant sur ces anticorps s'impose donc.

### **5.1. Définition et généralités**

Des études d'immunohistochimie sur des biopsies de reins dans les années 1970 ont rapporté pour la première fois la présence d'AACE. Les sérums utilisés dans cette étude provenaient de patients atteints de plusieurs maladies rhumatologiques dont le LED et la sclérodermie (Lindquist et al., 1971; Tan et al., 1972). Depuis, plusieurs approches méthodologiques ont démontré la présence des AACE et leur rôle potentiellement pathogénique dans une grande variété de maladies inflammatoires dont l'athérosclérose, la maladie coronarienne (CAD) et l'hypertension essentielle (Tableau X).

Les isotypes IgG, IgM et IgA de ces AACE ont été détectés. Les antigènes des AACE n'ont pas encore été identifiés mais il semble clair qu'il y aurait plusieurs cibles (Lindquist et al., 1971; Tan et al., 1972; Meroni et al., 1996; Li et al., 1996; Del Papa et al., 1994; Hill et al., 1996a; Hill et al., 1996b). De plus, les sérums positifs pour les AACE possèdent une réactivité diversifiée contre les cellules endothéliales provenant de différentes sources anatomiques (Del Papa et al., 1994; Meroni et al., 1996; Cervera et al., 1994).

**Tableau X: Prévalence des anticorps anticellules endothéliales dans différentes maladies (adapté de Praprotnik et al. 2001)**

<b>Maladie</b>	<b>Prévalence (%)</b>
<b>Vascularites auto-immunes primaires</b>	
Wegener	55-80
Kawasaki	Jusqu'à 72
Takayasu	95
Cellules géantes	Jusqu'à 50
Vascularite idiopathique de la rétine	35
Behcet	Jusqu'à 50
Thromboangiitis obliterans	25-36
Churg-Strauss	50
<b>Maladies auto-immunes systémiques</b>	
Lupus érythémateux disséminé	Jusqu'à 80
Syndrome antiphospholipide	64
Arthrite rhumatoïde avec vascularite	Jusqu'à 65
Arthrite rhumatoïde sans vascularite	Jusqu'à 30
Sclérose systémique	20-80
Connectivites	45
Polymyosite	44
<b>Transplantation</b>	
Allogreffe de coeur et de rein	Jusqu'à 71
<b>Diverses atteintes</b>	
Maladie inflammatoire de l'intestin	Jusqu'à 55
Hyperprolactinémie	76
Syndrome hémolytique urémique	93
Purpura thrombocytopénique thrombotique	100
Thrombocytopénie induite par l'héparine	100

---

Sclérose en plaques	23-75
Néphropathie IgA	32
Diabète mellitus	26-75
Hypoparathyroïdisme	100
Prééclampsie aïgue	50
Infection virale	Jusqu'à 18
Cryoglobulinémie associée au virus de l'hépatite C	41
Hypertension essentielle	Non-rapportée

---

Les AACE ne sont spécifiques à aucune espèce puisque qu'ils possèdent des réactivités croisées avec les cellules endothéliales d'origine humaine, bovine et murine (Meroni et al., 1996). Ceci suggère que les antigènes ciblés par les AACE possèdent de fortes homologies et sont fortement conservés parmi ces différentes espèces.

## **5.2. Tests de détection**

Le recherche sur les AACE est aujourd'hui encore handicapée par des méthodes de détection hétérogènes et non-standardisées. La technique d'immunohistochimie indirecte a permis la toute première description de ces anticorps (Lindquist et al., 1971; Tan et al., 1972). Malgré une grande spécificité cette méthode est limitée par une très faible sensibilité (Meroni et al., 1996a).

L'ELISA est la méthode la plus couramment employée pour l'étude des AACE, où des cellules endothéliales (le plus souvent des cellules HUVEC (human umbilical vein endothelial cell)) ou des extraits membranaires de cellules endothéliales sont utilisés comme source d'antigènes (Praprotnik et al., 2001).

L'ELISA utilisant les extraits membranaires est un test très facile à mettre au point mais donne lieu à des faux-positifs, probablement à cause de la réactivité des auto-anticorps contre des composantes cytoplasmiques ou nucléaires qui peuvent

contaminer la préparation membranaire (Meroni et al., 1996a). De plus, dans ce test, les antigènes membranaires eux-mêmes peuvent présenter des épitopes normalement dissimulés dans la membrane ou même cytoplasmiques, ce qui pourrait aussi contribuer à l'apparition de faux-positifs.

L'ELISA utilisant les cellules complètes comme antigène ou cyto-ELISA, possède aussi ses points faibles pouvant mener à l'insertion de faux-positifs dans les résultats. La fixation des cellules dans les puits, à l'aide le plus souvent de glutaraldéhyde, est utilisée pour empêcher le détachement des cellules lors du test (Youinou et al., 1995; Faulk et al., 1999). Cependant, la fixation cellulaire peut provoquer une perte de l'intégrité membranaire et permettre la réactivité des anticorps contre des composantes intracellulaires. Ainsi, différentes études comparant la détection des AACE sur des cellules fixées ou non ont mis à jour plusieurs différences majeures dans les résultats obtenus avec les mêmes sérums (Wangel et al., 1992; Westphal et al., 1994; Revelen et al., 2000).

Les AACE peuvent être aussi détectés par immunocytofluorométrie en flux (Faulk et al., 1999). Il est vrai que le détachement des cellules endothéliales pour obtenir une suspension cellulaire peut provoquer une perte de l'intégrité cellulaire dans une certaine proportion des cellules, surtout lorsque le détachement est effectué à l'aide d'une digestion enzymatique, par exemple avec la trypsine. Cependant

l'exclusion de l'analyse des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire, par marquage à l'iodure de propidium , permet d'exclure les faux positifs générés par marquage intracellulaire. Le second avantage de cette technique est que chacune des cellules de l'échantillon est évaluée de façon individuelle et un résultat pour un même échantillon peut fournir de l'information sur 10 000 à 20000 cellules viables. Ainsi, cette méthode de détection possède une grande spécificité conjuguée à une grande sensibilité.

L'immunoblot peut aussi être utilisé pour la détection des AACE (Faulk et al., 1999). Cependant, cette technique requiert de grandes quantités de préparation membranaire. Une limite de cette technique est que les antigènes sont réduits et que les épitopes conformationnels peuvent ne pas être identifiés, ce qui provoque une baisse de sensibilité. Dans cette technique, les antigènes peuvent présenter des épitopes cryptiques dus à leur dénaturation ou à la présentation d'épitopes normalement cachés au niveau membranaire ou cytosolique due à la désintégration de la membrane, ce qui provoque une baisse de la spécificité. Par contre, l'avantage majeur de cette méthode est de pouvoir définir le poids moléculaire de certaines cibles antigéniques des AACE et, ainsi, faire un pas vers leur identification.

Il est évident que ces différentes méthodes montrent des différences majeures au niveau des résultats, rendant la comparaison inter-étude très difficile (Praprotnik et al., 2001). Par conséquent, de larges études comparant les résultats obtenus à l'aide de plusieurs techniques avec les même sérums sont nécessaires à la bonne interprétation de la détection d'AACE.

### **5.3. Associations cliniques des AACE**

Comme le montre le tableau X, les AACE peuvent être détectés dans des maladies bien distinctes. Leur point commun semble être qu'elles impliquent une composante immuno/inflammatoire causant un dommage à l'endothélium vasculaire.

#### **5.3.1 Vascularites**

Le plus grand groupe de maladies dans lesquelles sont détectés les AACE sont les vascularites.

##### **5.3.1.1 Granulomatose de Wegener et polyartérite microscopique**

Plusieurs études ont rapporté la présence d'AACE dans les 'Wegener's granulomatosis (WG) et le 'microscopic polyangiitis' (MPA) et de manière distincte des anticorps cytoplasmiques antineutrophiles, un autre marqueur sérologique présent chez la majorité de ces patients (Del Papa et al., 1994; Meroni et al.,

1996b, Westphal et al., 1994; Ferraro et al., 1990; Savage et al., 1991). La présence d'AACE dans le WG pourrait même servir de facteur indépendant de risque pour une rechute (Gobel et al., 1996). Des études *in vitro* ont démontré que les sérums de patients WG avec AACE pouvaient activer les cellules endothéliales et que l'augmentation d'expression de molécules d'adhésion en surface était suivie d'une augmentation de l'adhésion leucocytaire (Del Papa et al., 1996; Carvalho et al., 1999; Muller-Kobold et al., 1999). Finalement, dans un modèle murin expérimental de WG, une relation directe a été établie entre l'apparition d'AACE et celle de lésions vasculaires histologiques (Damianovich et al., 1996).

### **5.3.1.2 Maladie de Kawasaki**

Les AACE détectés dans la maladie de Kawasaki quant à eux sont cytotoxiques sur les HUVEC préstimulés avec de l'IFN-gamma, de l'IL-1 et du TNF-alpha (Kanekok et al. 1994). Une autre étude a montré que même les HUVEC n'ayant pas subi de préstimulation étaient susceptibles aux AACE (Fujieda et al., 1997).

### **5.3.2 Maladies systémiques auto-immunes**

Comme le montre le tableau X, les AACE sont aussi associés avec les complications vasculaires dans plusieurs maladies auto-immunes systémiques telles que le LED, le SAP, l'arthrite rhumatoïde et la sclérodermie.



### 5.3.2.1 LED et SAP

Une prévalence des AACE a été décrite dans le LED (jusqu'à 80% des patients) (Perry et al., 1991; Chan et al., 1995). De plus, une association entre la présence d'AACE et le niveau d'activité du LED (Perry et al., 1991; Chan et al., 1995) a été établie. Cependant, la liaison des AACE sur les cellules endothéliales ne semble pas être corrélée à la présence de complexes immuns et d'AAN dans le sérum, deux marqueurs de l'activité de la maladie (Del Papa et al., 1994; Meroni et al., 1996b; Van der Zee et al., 1994).

Les AACE produits par les patients lupiques peuvent induire un état pro-inflammatoire chez les cellules endothéliales, révélé par l'augmentation de l'expression de surface des molécules d'adhésion et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Carvalho et al., 1999; Del Papa et al., 1999; McCrae et al., 1991; Hill et al., 1998). Il faut souligner que cette activation endothéliale induit un état pro-adhésif pour les cellules et molécules circulantes (Nawroth et al., 1987). Les leucocytes adhérant à l'endothélium activé peuvent être activés par les cytokines pro-inflammatoires et induire un phénotype pro-coagulant contribuant à l'hypercoaguabilité caractéristique du SAP. De plus, il a été montré que les AACE provenant du sérum de patients lupiques peuvent induire la sécrétion d'endothéline-1 pouvant jouer un rôle important dans l'initiation et le développement de problèmes vasculaires (Yoshio T et al. 1995).

### **5.3.2.2 Sclérodermie**

Plusieurs groupes ont montré une prévalence des AACE dans la sclérodermie, variant de 20 à 80% selon la forme limitée ou diffuse de la maladie (Hill et al., 1996; Rosenbaum et al., 1988; Salojin et al., 1997). Une plus grande incidence de manifestations vasculaires (Salojin et al., 1997) et de fibrose pulmonaire (Ihn et al., 2000) était observée chez les patients sclérodermiques possédant des AACE. Un autre groupe a rapporté une association entre les AACE et d'autres paramètres du dommage vasculaire, comme l'augmentation de la pression pulmonaire, les ulcères digitaux, les anomalies capillaroscopiques et les dysfonctions alvéolaires et capillaires (Pignone et al., 1998).

Il a été montré que les fractions IgG AACE positives de patients sclérodermiques réagissaient avec les cellules endothéliales et induisaient la production de cytokines pro-inflammatoires, la sécrétion d'endothéline-1 et un phénotype pro-coagulant (Carvalho et al., 1996). De plus, les AACE de sclérodermiques peuvent induire l'apoptose endothéliale (Bordron et al., 1998).

## **5.4 Identification des antigènes reconnus par les AACE**

Les AACE reconnaissent un grand spectre d'antigènes, ce qui peut expliquer l'hétérogénéité des effets générés par la liaison des AACE sur l'endothélium. Les

antigènes reconnus par les AACE dans les sérums lupiques ont été partiellement caractérisés par des techniques d'immunoblot qui ont montré un grand nombre de bandes (Li et al., 1996; VanderZee et al., 1994). De plus, l'analyse d'antigènes immunoprécipités par des sérums LED positifs pour les AACE ont identifié plusieurs cibles potentielles, leur poids moléculaire variant entre 25 et 200 kD (Del Papa et al., 1994).

Certains antigènes peuvent être exprimés ou induits après que l'endothélium ait été activé ou soumis à un stress (Savage et al., 1991; Leung et al., 1993; Van der Zee et al., 1994). De plus, les déterminants antigéniques des AACE peuvent être des molécules adhérentes à la surface endothéliale (Chan et al., 1995). En 2000, un groupe a utilisé une stratégie de clonage moléculaire afin d'isoler les antigènes candidats chez les patients souffrant du LED (Frampton et al., 2000). Les antigènes identifiés incluaient, entre autres, l'inhibiteur du plasminogène spécifique aux cellules endothéliales, la protéine ribosomale P, la protéine ribosomale L6 ainsi que la profiline II. Le poids moléculaire et la diversité des protéines reconnues par les AACE provenant de deux patients étaient très différents, suggérant que les AACE de chaque patient peuvent reconnaître un patron limité et distinct d'auto-antigènes (Frampton et al., 2000).

## **6. Justifications des projets**

De tous les aPL observés dans le LED, la présence de LAC est le facteur de risque le plus prédictif pour la thrombose (Horbach et al., 1996). Paradoxalement, la moitié des patients possédant des LAC ne développent pas de thrombose. Dans la pratique clinique, cela cause un dilemme au niveau du traitement des patients positifs pour les LAC : doivent-ils être traités de manière préventive avec un anticoagulant oral, vu les effets secondaires hémorragiques pouvant en découler, ou doivent-ils être traités seulement après un premier événement thrombotique, exposant de ce fait le patient aux risques de tels événements? Jusqu'à présent, il n'existe aucune méthode permettant de différencier les patients LAC positifs qui vont développer une thrombose de ceux qui en seront exempts (Figure 6).

### **6.1 Étude de l'effet thromboprotecteur des antilamine B1**

Tel que décrit précédemment, il a été montré, dans notre laboratoire, que le risque de manifestations thrombotiques dans une cohorte canadienne française de patients atteints du LED possédant des LAC était réduit en présence d'aLB1. Un premier objectif de mon projet de thèse était de démontrer l'association entre la présence d'aLB1 et la protection contre la thrombose, que nous appellerons thromboprotection, dans une grande cohorte multicentrique de patients souffrant du LED.

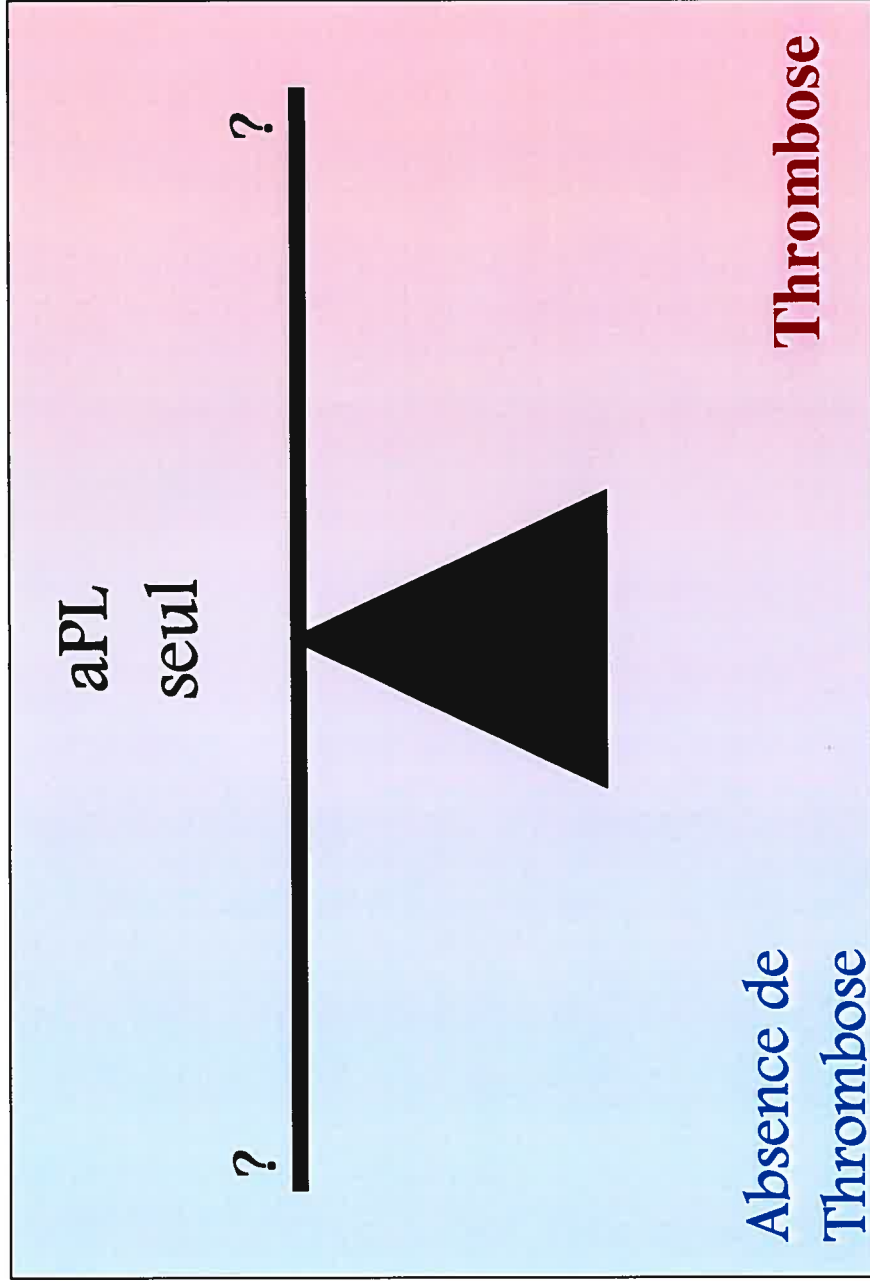


Figure 6: Dilemme clinique chez les patients LES possédant des LAC

Dans un second temps, nous avons voulu élucider le mécanisme par lequel les aLB1 causent la thromboprotection *in vivo*. Nous avons émis l'hypothèse que la lamine B1 était exprimée à la surface des cellules apoptotiques et ainsi devenait disponible pour la liaison des aLB1 circulants. Cette liaison bloquerait l'effet procoagulant des blebs apoptotiques et expliquerait l'effet thromboprotecteur des aLB1. Cette hypothèse est basée sur 3 observations décrites précédemment.

Premièrement, la caractérisation des mécanismes apoptotiques a montré que les auto-antigènes du LED pouvaient être exprimés à la surface des blebs apoptotiques, les rendant disponibles au système immunitaire en général et aux anticorps circulants (Casciola-Rosen et al., 1994). Deuxièmement, la lamine B1 est un substrat bien caractérisé de la caspase-6 durant l'apoptose (Wilson et al., 2001). Finalement, les blebs de cellules apoptotiques sont des sites connus d'activité procoagulante et pourraient être impliqués dans la pathogénèse de la thrombose chez les patients atteints du SAP (Casciola-Rosen et al., 1996 ; Levine et al., 1999 ; Rosen et al., 1999). Nous avons donc centré nos efforts sur la démonstration de la présence de la lamine B1 à la surface des blebs apoptotiques.

## **6.2. Étude de l'implication des AACE dans les mécanismes thrombotiques chez les patients atteints du LED.**

Le fait que la moitié des patients possédant des LAC ne développent pas de thrombose suggère que la seule présence des LAC ou aPL est insuffisante pour générer la thrombose. Tel que décrit précédemment, plusieurs mécanismes pathogéniques ont été suggérés pour expliquer les manifestations thrombotiques du SAP. Certains d'entre eux impliquent la liaison des aPL à la surface endothéliale. Cependant, il est connu que les aPL se lient de façon préférentielle aux cellules exprimant les phospholipides anioniques à leur surface, telles les cellules apoptotiques. Nous suggérons qu'un événement primaire est nécessaire pour induire une perturbation membranaire, par exemple l'apoptose, qui fournit ainsi une cible antigénique aux aPL et qui peut induire en un second temps la cascade thrombotique.

Les AACE ont été détectés dans plusieurs conditions cliniques associées avec des implications vasculaires, telles que le LED. De plus, certains AACE sont capables d'induire des mécanismes impliquant des perturbations membranaires, tels que l'activation endothéliale et l'apoptose. Cependant, leurs antigènes dans le LED ne sont pas définis.

Un des objectifs de ma thèse était donc de déterminer si les AACE provenant de patients souffrant du LED pouvaient être impliqués dans la perturbation membranaire à l'origine de la cascade thrombotique dans le SAP.



**Article 1**

**Association of autoantibodies to nuclear lamin B1 with  
thromboprotection in systemic lupus erythematosus;**

Lack of evidence for a direct role of lamin B1 in apoptotic blebs.

*Arthritis Rheum.* 2002; 46: 2695-2707.

**Mélanie Dieudé, Jean-Luc Senécal, Joyce Rauch,  
John G. Hanly, Paul Fortin, Nathalie Brassard and Yves Raymond**

Supported by grants MOP-36436 (YR, JLS) and MT-42391 (JR)  
from the Canadian Institutes of Health Research.

Authors Dieudé and Senécal contributed equally to the manuscript.

Running head: Autoantibodies to lamin B1 are associated with thromboprotection in SLE

Address correspondence and reprint requests to :

Yves Raymond, PhD  
Autoimmunity Research Laboratory  
Notre-Dame Hospital, CHUM  
1560 Sherbrooke Street East  
Montreal, QC H2L 4M1, Canada  
Phone : 514-890-8000 extension 25481  
Fax : 514-412-7661



## ABSTRACT

**Objectives.** We have previously reported that the risk of thrombotic manifestations in French Canadian SLE patients with lupus anticoagulant antibodies (LAC) was reduced in the presence of autoantibodies to nuclear lamin B1 (aLB1). In the current study, our objective was to demonstrate the association between aLB1 and protection against thrombosis (« thromboprotection ») in a large and multicenter SLE cohort. Furthermore, we aimed to elucidate the mechanism by which aLB1 cause thromboprotection *in vivo*. Since a number of autoantigens in SLE have been localized specifically to the external surface of apoptotic blebs, we hypothesized that circulating aLB1 may block the procoagulant effect of apoptotic blebs by binding to lamin B1 displayed at the external bleb surface.

**Methods.** A cross-sectional study of aLB1 was performed on serum samples obtained at first evaluation of 259 consecutive English Canadian and French Canadian patients from SLE registries at three different university hospitals. A case-control study was performed to analyze the relationship between aLB1 and LAC status, and thrombotic manifestations, between onset of disease and last followup. Reactivity of aLB1 with Jurkat or endothelial cells, which had been induced to undergo apoptosis by treatment with anti-Fas antibody or staurosporine, was determined by indirect immunofluorescence. Localization of lamin B1 in

apoptotic cells and blebs was analyzed by confocal microscopy and by surface labelling of cell membrane proteins.

**Results.** High titers of aLB1 were restricted to a subset of SLE patients (n = 46), with a mean frequency in the three centers of 17.7% (range 11.6-24%). aLB1 were significantly associated with LAC (OR 1.95, 95% CI 1.024-3.73) but not with antibodies to cardiolipin (aCL) or  $\beta$ 2-glycoprotein I (anti- $\beta$ 2GPI). The frequency of thrombosis differed markedly depending on aLB1 and LAC status, as follows : presence of LAC and absence of aLB1, 50%; presence of both LAC and aLB1, 22.7%; absence of both LAC and aLB1, 25.5%; absence of LAC and presence of aLB1, 20.8% (P = 0.0004 by chi-squared test for trend). Further subsetting of patients based on aCL and anti- $\beta$ 2GPI status revealed that, in the presence of LAC, but in the absence of aCL, anti- $\beta$ 2GPI and aLB1, the frequency of thrombosis was 40%, whereas in the presence of aLB1, it strikingly decreased to 9.1%. Lamin B1 was found to be translocated into surface membrane blebs during apoptosis. By both morphological and biochemical criteria, lamin B1 was found to be entirely enclosed within the apoptotic bleb plasma membrane of Jurkat and endothelial cells.

**Conclusion.** The presence of aLB1 in SLE patients with LAC essentially nullifies the strong prothrombotic risk associated with LAC. Hence, aLB1 are associated

with thromboprotection. Reactivity of aLB1 with apoptotic blebs does not seem to play a direct role in mediating this protection, as lamin B1 is buried within apoptotic blebs and inaccessible to circulating aLB1. The mechanism by which aLB1 confer thromboprotection in patients with SLE remains to be elucidated.

The antiphospholipid syndrome is defined by recurrent thrombotic events and pregnancy morbidity in association with the presence of antiphospholipid antibodies (aPL) such as lupus anticoagulant antibodies (LAC) (1). Systemic lupus erythematosus (SLE) is the major autoimmune disease associated with the antiphospholipid syndrome. Of the various aPL observed in SLE, the presence of LAC may be the strongest risk factor for both arterial and venous thrombosis (2). LAC are present in approximately one third of SLE patients and about half of these LAC-positive patients will develop arterial or venous thrombosis over prolonged follow-up (3,4). Thus, paradoxically, although LAC are strong predictors for thrombosis, half of patients expressing LAC may not develop thrombotic episodes. In clinical practice, this issue causes a major management dilemma. Accepted practice is to treat patients with LAC only when a first major thrombotic episode occurs, thus exposing untreated patients to the risks of major end organ damage such as stroke. This begs the question of whether long-term prophylactic treatment such as oral anticoagulation, with accompanying side effects and costs, should be instituted as soon as the presence of LAC is documented, in the absence of a first thrombotic event. The pressing need to resolve this issue has been recently emphasized (5). At present, there is no established method to differentiate SLE patients with LAC who will develop thrombotic episodes from those who will not.

The nuclear autoantigen (aAg), lamin B1, is a polypeptide forming part of the polymeric lamina meshwork located between chromatin and the inner nuclear

membrane (reviewed in 6). Our earlier studies have shown that high titers of autoantibodies to lamin B1 (aLB1) were restricted to a subset of SLE patients in a cohort of French Canadians (7). Intriguingly, despite a strong association of aLB1 with LAC, SLE patients with LAC and aLB1 had a lesser risk of thrombotic manifestations than those with LAC but without aLB1 (7). However, that study was restricted to a single center and the number of patients with aLB1 was small. Therefore, in the present study, our goal was to determine whether the correlation between the presence of aLB1 and an apparent lowered risk of thrombosis could be demonstrated in a large number of SLE patients from multiple centers. As shown herein, we found that aLB1 were indeed associated with a striking thromboprotective effect in SLE patients with LAC.

Furthermore, we aimed to elucidate the mechanism by which aLB1 may cause thromboprotection *in vivo*. Our mechanistic hypothesis was that circulating aLB1 may block the procoagulant effect of apoptotic blebs by binding to lamin B1 displayed at the external bleb surface. The rationale for this hypothesis stemmed from 4 observations. First, surface blebs of apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity, and this may be fundamental to the pathogenesis of thrombotic events in patients with aPL (8-10). Second, apoptotic cells and their resulting blebs are known sources of antigens that are targeted by autoantibodies (aAbs) (9-13). Third, major autoantigens (aAgs) of nuclear origin (e.g. La), of

cytoplasmic origin (e.g. Ro) and of granular origin (e.g. myeloperoxidase) have been localized specifically to the external surface of apoptotic blebs, where their accessibility to circulating aAbs may form the molecular basis of their pathogenic effects (14,15). Finally, lamin B1 is a well-characterized and early substrate of caspase-6 during apoptosis (16,17), suggesting that lamin B1 might be present in apoptotic blebs.

Thus, we determined whether lamin B1 was present in apoptotic blebs. We found that lamin B1 was indeed present in apoptotic blebs. However, in striking contrast with other SLE aAbs, lamin B1 was entirely concealed within the apoptotic bleb plasma membrane and inaccessible to aLB1, therefore excluding a direct role for lamin B1 in mediating thromboprotection.

## **PATIENTS AND METHODS**

**Patients and controls.** A cross-sectional study of IgG anti-lamin B1 was performed on coded serum samples consecutively and unselectively obtained at the time of first patient evaluation by the authors (JLS, JH, PF) at their respective Lupus Clinics (Notre-Dame Hospital [NDH], Centre Hospitalier de l'Université de Montréal; Montreal General Hospital [MGH], McGill University Health Center; and Queen Elizabeth II Health Sciences Centre [QEIIHSC]). Serum samples were frozen at -70°C or -80°C. The adult study population consisted of 259 SLE patients

and 45 normal controls. The NDH cohort consisted of the original 94 patients which formed the basis for initiating the present multicenter study (7), plus 18 additional patients. All SLE patients fulfilled at least four American College of Rheumatology SLE criteria (18). Inclusion criteria in the normal group were previously described (7,19). A higher proportion of normal women were included because of the higher female prevalence of SLE.

**Thrombosis.** A case-control design was used. Identification of arterial and venous thrombotic events was as previously reported (7). Briefly, the charts of the 259 SLE patients were reviewed retrospectively, using a standardized vascular protocol for thrombotic and embolic manifestations at any time between disease onset and last followup. Patients were categorized as having a history of thrombosis in the presence of at least one definite thrombotic event; other SLE patients were categorized as thrombosis-free. Among patients with thrombosis, 33 had deep vein thrombosis, 29 had cerebral infarction, 19 had myocardial infarction, 23 had other thrombotic events, and 13 had embolic events. One or more of these events were present in 81 patients. Patients with LAC but without a thrombotic event were not treated prophylactically with aspirin or anticoagulants.

**Antiphospholipid antibodies.** Plasma samples from the patients (seen between 1979 and 1998) were considered to have LAC activity if the activated partial



thromboplastin time was prolonged by at least 8 seconds (compared with the normal plasma control), and the prolongation was not corrected by a 1:1 dilution with normal plasma. LAC was considered positive if present on at least 2 occasions at a minimum of 3 months apart. Antibodies to cardiolipin (aCL) and to  $\beta_2$ -glycoprotein I (anti- $\beta_2$ GPI) were determined by ELISA using IgG and IgM-specific conjugates as previously described (7).

**Anti-lamin B1 ELISA.** Immulon-2 high binding ELISA plates (Dynatech, Alexandria, Virginia) were coated for 16 h at 4°C with 4  $\mu$ g/ml of purified lamin B1 (7) in PBS (pH 7.4, unless stated otherwise) or with PBS containing 0.2% normal goat serum (Gibco BRL, Grand Island, New York) and 0.04% casein to determine the non-specific binding (no antigen) of each serum. All other incubations were done at 25°C. After 4 washes with PBS containing 0.5% Tween 20 (wash buffer), the plates were blocked for 2 h with PBS containing 2% casein and 10% normal goat serum (blocking buffer). After 4 washes, normal sera (for cut-off value calculation) and SLE sera diluted 1/500 in blocking buffer were added to duplicate wells and incubated for 1 h. The plates were washed 4 times and peroxidase-conjugated goat anti-human IgG ( $\gamma$ -chain specific, Jackson ImmunoResearch, Baltimore, Maryland) diluted 1/5000 in blocking buffer was added and incubated for 1 h. Finally, after 4 washes, 0.4 mg/ml of o-phenylenediamine (Sigma) in 0.1 M citrate buffer pH 6.0 containing 0.003% of hydrogen peroxide were added and the

plates incubated for 10 min. The reaction was stopped by addition of 2 M sulfuric acid and the plates were read at 490 nm on an MRX ELISA reader (Dynex, Chantilly, Virginia). Each plate included the same negative control (normal subject) and the same positive control (SLE patient); the coefficient of variation was 17.1% over 37 plates. For each serum, the OD values of control wells (no antigen) were subtracted from the OD values obtained on the antigen-coated wells. The OD values of the control wells were very low in all cases. Results shown are the means of duplicate values for each serum. The cut-off value for aLB1 IgG antibody positivity, based on the mean (M) and SD of the values for 45 normal subjects, was  $M + 4 SD$  (OD = 0.370).

**Preparation and purification of lamin B1.** In order to increase the yield of lamin B1, the full length coding DNA for human lamin B1 was synthesized and optimized for *E. coli* codon preferences by Operon Technologies (Alameda, California), and inserted into the T7 polymerase-based pET19b expression vector (Novagen; Madison, Wisconsin). Transformation was done into *E. coli* BL21 (DE3) bacteria (Stratagene, La Jolla, California) for protein expression. Production of lamin B1 was induced by addition of isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (Sigma). Inclusion bodies were extracted with B-PER reagent (Pierce, Rockford, Illinois). Lamin B1 was purified by electroelution after SDS-PAGE. The overall yield of purified lamin

B1 was approximately 5 mg per liter of original bacterial culture, which is 5 to 10 times the yield obtained with the wild type lamin B1 DNA sequence (7).

**Cell culture, apoptosis induction and cell fractionation.** Jurkat cells (E6-1; ATCC, Manassas, Virginia) were grown in RPMI 1640 medium (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada) supplemented with 20% FBS (Wisent) and 100 µg/ml gentamycin (Wisent) in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC; Clonetics, Maryland) were grown in EGM 2MV medium (Clonetics), and were used at confluence and at not more than the fourth passage. Cells were washed and resuspended in RPMI 1640 without serum. Apoptosis was induced either with anti-Fas antibody (50 µg/ml; CH-11, Upstate Biotech, Lake Placid, New York) or staurosporine (25 µg/ml; Sigma). After 16 h of anti-Fas treatment, cells were pelleted at 1500 x g and the supernatant was centrifuged at 16,000 x g to pellet the blebs.

**DNA fragmentation assay.** DNA fragmentation was analyzed with the Cellular DNA Fragmentation ELISA (Roche, Laval, Québec, Canada). Jurkat cells were incubated with the thymidine analogue, 5'-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU), which was incorporated into genomic DNA. This labeling allows for the identification of BrdU-labeled DNA fragments that are released into the cytoplasm during apoptosis.

**Gel electrophoresis and immunoblotting.** Jurkat cells and blebs were washed once in PBS, resuspended in SDS sample buffer (250 mM Tris buffer pH 6.8, containing 8% SDS, 40% glycerol, 20%  $\beta$ -mercaptoethanol, and 0.005% bromophenol blue) and separated on 10% polyacrylamide gels. Samples were transferred onto nitrocellulose membranes (BioRad, Hercules, California) using semi-dry transfer or stained with Coomassie blue (20). Immunoblots were blocked overnight with TBS-T (50 mM Tris, 150 mM NaCl, buffer pH 7.4, with 0.5% Tween 20) containing 5% nonfat dry milk and exposed to a guinea pig antiserum (GP5) raised against recombinant human lamin B1, or a human SLE serum monospecific for La, followed by peroxidase-conjugated anti-guinea pig IgG (Zymed, Oxnard, California) or peroxidase-conjugated anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch), respectively. Between incubations, the blots were washed 3 times with TBS-T. Antibody binding was revealed using a chemiluminescence kit (SuperSignal West Pico, Pierce).

**Immunofluorescence and confocal microscopy.** Jurkat or HUVEC cells were washed twice in PBS and cytopun at 1500 x g for 2 min onto glass slides. Blebs were washed once, resuspended in PBS and dried onto glass slides. Samples were fixed for 5 min in 1% paraformaldehyde at 4°C and permeabilized for 30 sec in ice-cold acetone. Samples were rehydrated with ice-cold PBS for 10 min before

incubation at room temperature with either GP5, a human aLB1 positive SLE serum, affinity-purified human aLB1 antibodies (see below), or FITC-annexin V (BD PharMingen, San Diego, California). Detection of antibodies was performed by incubation with FITC- or rhodamine TRITC-conjugated anti-guinea-pig IgG (Fc specific; Jackson ImmunoResearch) or FITC- or rhodamine TRITC-conjugated anti-human IgG (Fc specific; Jackson ImmunoResearch). Slides were mounted with Vectashield (Vector, Burlingame, California, USA) and examined with a Zeiss lsm 510 (Zeiss, Thorwood, New York) confocal microscope. For each sample, a minimum of 200-250 blebs were examined and blebs representative of the entire population were photographed. Due to the high magnification required for viewing and photographing apoptotic blebs, only one or a few blebs can be shown in each photograph.

**Biotinylation of cell surface protein and pure lamin B1.** Jurkat cells and blebs were washed three times, and resuspended in PBS adjusted to pH 8 in the presence of a biotinylating reagent (Sulfo-NHS-LC-biotin, 0.5 mg/ml; Pierce) for 30 min at room temperature. Samples were washed three times with PBS pH 8, resuspended in lysis buffer (PBS pH 8, containing 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 1 µg/ml pepstatin, 2 µg/ml leupeptin, and 2 µg/ml aprotinin) and incubated on ice for 30 min. Lysates were centrifuged at 20,000 x g and the supernatants were incubated with streptavidin-coated beads (Immunopure immobilized Streptavidin;

Pierce) overnight at 4°C. Beads were washed three times with lysis buffer, and resuspended in SDS sample buffer. The beads were boiled for 5 min, pelleted (600 x g, 5 min) and the supernatant containing the biotinylated proteins was stored at -20°C.

Pure lamin B1 (55 µg) was incubated with caspase-6 (25 µg; BD Pharmingen) in 20 mM PIPES, 1 mM EDTA, 0.1% 3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propane-sulfonate (CHAPS), 10% sucrose, 10 mM NaCl, pH 7.2 for 3 h at 37°C. Biotinylating reagent (2 µg) was added (molar ratio of biotinylating reagent to lamin B1, 44:1) for 30 min at room temperature followed by incubation with streptavidin-coated beads overnight at 4°C. The beads were processed as above.

**Affinity purification of human aLB1.** Pure lamin B1 (75 µg) was dried onto a 1 cm<sup>2</sup> nitrocellulose membrane, and the membrane was washed with water and blocked overnight with TBS-T. The blocked membrane was incubated with aLB1 positive SLE patient serum (1:100) for 2 h and washed 3 times with TBS-T. aLB1 were eluted by overnight incubation of the membrane in 6 M guanidine-HCl in 0.5 mM Tris-HCl, pH 7.5 (21). The eluate was renatured by dialysis against 0.5 mM Tris-HCl, pH 7.5 with 5 changes over a 48 h period. The sample was concentrated in PBS with an Ultrafree centrifugal filter device (Biomax-30K; Millipore, Bedford,

Massachusetts) and stored at 4°C. The monospecificity of each sample for LB1 was assayed by immunoblotting on Jurkat cell lysates.

**Statistical analysis.** Chi-square analysis was performed for frequency comparison among groups (using for 2 X 2 comparisons Fisher's 2-tailed exact test and for larger contingency tables the chi-square test for trend) (InStat3, GraphPad Software, San Diego, CA). The t-test was used for comparison of group means. P values less than or equal to 0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

### **Frequency of IgG anti-lamin B1 autoantibodies and association with LAC.**

The demographic characteristics of the patients from the three centers and in the cohort are shown in Table 1. Figure 1 shows the distribution of aLB1 in the complete cohort, in each of the 3 participating centers, and in normal controls. Using a cut-off point that identified previously described SLE patients with high titers of aLB1 (7) (OD = 0.370, corresponding to M + 4 SD of the normal controls), high titers of aLB1 were observed in SLE patients, but not in normal or disease controls (7 and data not shown). The mean frequency of aLB1 in SLE patients was 17.7% (NDH 11.6%, VGH 16.6%, MGH 24.3%) and the mean aLB1 levels (OD values) for the positive patients from each center were similar (Kruskal-Wallis statistic 0.39, P = 0.9). aLB1 were found to be associated with LAC. Twenty-two (47.8%) of 46 patients with aLB1 were positive for LAC, whereas 68 (31.9%) of 213

patients without aLB1 were LAC positive (OR 1.95, 95% CI 1.024-3.73,  $P = 0.04$  by chi-square analysis).

However there was no association between aLB1 and aCL or anti- $\beta_2$ GPI. Sixteen (34.8%) of 46 patients with aLB1 were positive for any aCL (i.e. of IgG and/or IgM isotypes), whereas 87 (41.8%) of 208 patients without aLB1 were aCL positive (OR 0.7, 95% CI 0.4-1.4,  $P = 0.3$ ). Similarly, 6 (13%) of 46 patients with aLB1 were positive for any anti- $\beta_2$ GPI, whereas 38 (18%) of 211 patients without aLB1 were anti- $\beta_2$ GPI positive (OR 0.7, 95% CI 0.3-1.7,  $P = 0.4$ ).

**Influence of IgG anti-lamin B1 and LAC on the frequency of thrombotic manifestations.** To determine whether higher levels of aLB1 were more strongly associated with protection against thrombosis, we compared the mean OD370 values for aLB1 in patients with thrombosis ( $n=81$ ) versus those without thrombosis ( $n = 178$ ). No significant difference was found (mean OD370 value 0.193, SD 0.259 in patients with thrombosis versus 0.228, SD 0.271 in those without thrombosis,  $P = 0.3$  by two-tailed t-test). We then compared the mean OD370 values among patients with high titers of aLB1 and thrombosis ( $n = 10$ ) versus those with aLB1 without thrombosis ( $n = 36$ ). Again, no significant difference was found (mean OD370 value 0.786, SD 0.316 in patients with thrombosis versus 0.675, SD 0.305 in those without thrombosis,  $P = 0.3$  by two-tailed t-test).



As LAC is known to be associated with the thrombotic manifestations of the antiphospholipid syndrome in SLE (2), we first determined whether this association also occurred in the cohort. The presence of LAC at first evaluation was indeed associated with thrombosis during the disease course: LAC occurred in 39 (48.1%) of 81 patients with thrombosis, and in 51 (28.6%) of 178 patients without thrombosis (OR 2.24, 95% CI 1.3-3.85,  $P = 0.004$ ). Since LAC were also associated with aLB1, as discussed above, we then determined whether aLB1 were themselves associated with thrombosis. In contrast to LAC, this was not the case. Thrombosis occurred in 10 (21.7%) of 46 aLB1 positive patients versus 71 (33.3%) of 213 aLB1 negative patients (OR 0.555, 95% CI 0.26-1.18,  $P = 0.16$ ). Finally, we examined the relationship between the presence of aLB1 and the frequency of thrombosis in patients with LAC. As shown in Table 2, the frequency of thrombosis was not significantly different in patients with both LAC and aLB1 in comparison with all other SLE patients in the cohort (OR 0.62, 95% CI 0.22-1.75,  $P = 0.47$ ). In striking contrast, the frequency of thrombosis in patients who were LAC positive, but aLB1 negative, was significantly greater than in other SLE patients (OR 3.06, 95% CI 1.71-5.46,  $P = 0.0002$ ) (Table 2). Similar results were obtained when each of the three participating centers was analyzed separately (data not shown). In patients with aLB1 and thrombosis, thrombotic events occurred in both arterial and/or venous beds.

The relationship between thrombosis, LAC and aLB1 was further explored, as shown in Table 3. In the presence of LAC and absence of aLB1 at first evaluation, the frequency of thrombosis during the disease course was 50%. However, when both LAC and aLB1 were present simultaneously, the frequency of thrombosis decreased to 22.7%. The latter frequency was similar to patients expressing neither autoantibody (25.5%) or aLB1 only (20.8%). The frequency of thrombosis among these four groups of patients was significantly different ( $P = 0.0004$  by chi-squared test for trend) (Table 3). To determine if the lower frequency of thrombosis in patients with aLB1 could be related to a shorter duration of followup in these patients, we compared the duration of followup in patients with and without aLB1 by t test. The mean followup period was not significantly different in aLB1 positive versus negative patients for each center (NDH 8.46 years versus 8.01 years,  $P = 0.7$ ; QEIIHSC 6.62 years versus 5.99 years,  $P = 0.7$ ; MGH 16.92 years versus 15.79 years,  $P = 0.3$ ). For the cohort, the duration of followup was actually longer for aLB1 positive patients, but this was not statistically significant (13.19 versus 10.79 years,  $P = 0.065$ ).

**Interrelationships between IgG anti-lamin B1, LAC, aCL, anti- $\beta_2$ GPI and the frequency of thrombotic manifestations.** Because aCL and anti- $\beta_2$ GPI may occur with LAC and are associated with the thrombotic manifestations of the

antiphospholipid syndrome in SLE (3), we wished to determine if the frequency of thrombosis was influenced by these antibodies in relationship to aLB1 status. First, we found that the presence of any aCL (i.e. of IgG and/or IgM isotypes) or any anti- $\beta_2$ GPI was indeed strongly associated with thrombosis in our cohort. aCL were positive in 42 (53.8%) of 78 patients with thrombosis, and in 61 (34.6%) of 176 patients without thrombosis (OR 2.2, 95% CI 1.28-3.8,  $P = 0.004$ ). Similarly, anti- $\beta_2$ GPI were positive in 24 (30%) of 80 patients with thrombosis, versus 20 (11.3%) of 177 patients without thrombosis (OR 3.3, 95% CI 1.7-6.5,  $P = 0.0002$ ). Second, we determined if aLB1 were associated with aCL or anti- $\beta_2$ GPI. In contrast with LAC, no such association was found. aCL were present in 16 (34.8%) of 46 patients with aLB1 versus 87 (41.8%) of 208 patients without aLB1 (OR 0.7, 95% CI 0.4-1.4,  $P = 0.3$ ). Similarly, anti- $\beta_2$ GPI were present in 6 (13%) of 46 patients with aLB1 versus 38 (18%) of 211 patients without these antibodies (OR 0.7, 95% CI 0.3-1.7,  $P = 0.4$ ).

Lastly, we determined whether aCL and anti- $\beta_2$ GPI status modified the impact of aLB1 and LAC on thrombosis (Table 4). It is clear from Table 4 that the impact of aLB1 on thrombosis is specifically linked to the presence of LAC. In the absence of LAC, the frequency of thrombosis is similar in all aCL/anti- $\beta_2$ GPI subsets, regardless of aLB1 status, whereas, in the presence of LAC, the frequency between subsets differed significantly. Specifically, in the presence of both LAC

and aCL/anti- $\beta_2$ GPI, but in the absence of aLB1, the frequency of thrombosis was 62.5%. This frequency decreased to 36.4% in the presence of aLB1 (Table 4). In the presence of LAC, but in the absence of both aCL/anti- $\beta_2$ GPI and aLB1, the frequency of thrombosis was 40%. Again, in the presence of aLB1, the frequency of thrombosis strikingly decreased to 9.1%. In contrast, in the absence of LAC, but in the presence of aCL/anti- $\beta_2$ GPI, the frequency of thrombosis was similar in patients without aLB1 (32.6%) and in patients with aLB1 (25%). Finally, in the absence of all four antibodies, the frequency of thrombosis was 22.3%, similar to the 18.8% observed in patients with aLB1 only. Thus, the frequencies of thrombotic episodes were significantly different across LAC-positive subsets ( $P = 0.007$ ), but they were not significantly different in LAC-negative subsets ( $P > 0.1$ , chi-squared test for trend, Table 4 ).

**Cleavage of lamin B1 and DNA fragmentation occur in close synchrony during apoptosis in Jurkat cells.** During apoptosis, a series of nuclear modifications occurs, including DNA fragmentation and cleavage of specific proteins by proteases of the caspase family. Cleavage of lamin B1 by caspase-6 generates two fragments (47 and 25 kDa; reviewed in 16) and this event is commonly used as a marker for apoptosis. Apoptosis was induced in Jurkat cells, the prototypical cell line used for apoptosis studies, with anti-Fas antibody, via the death receptor pathway, or with staurosporine, via the mitochondrial pathway, for

varying periods of time. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with an antiserum directed against lamin B1 (GP5). Lamin B1 apoptotic fragments were first detected after 3 h of treatment with anti-Fas (Fig. 2a, left panel) and after only 1 h of treatment with staurosporine (Fig. 2a, right panel), thus confirming the occurrence of lamin B1 cleavage under the two principal pathways of apoptosis.

DNA fragmentation in Jurkat cells treated with anti-Fas or staurosporine for different periods of time was then studied. Using an ELISA to quantitate BrdU-labeled DNA fragments, DNA fragmentation in Jurkat cells was first detected after 4 h of treatment with anti-Fas antibody (Fig. 2b, left panel) and after 2 h with staurosporine (Fig. 2b, right panel). Hence, lamin B1 cleavage and DNA fragmentation occur in close synchrony in Jurkat cells during apoptosis, with lamin B1 cleavage preceding that of DNA, as expected (22).

**Lamin B1 is present in blebs of apoptotic Jurkat cells.** In order to localize lamin B1 during apoptosis, Jurkat cells were treated with staurosporine for varying periods of time, stained with GP5 or aLB1 positive SLE serum #9176, and examined by confocal microscopy. Figure 3 shows the results of a time course study during staurosporine treatment. The fluorescence pattern observed with GP5 in untreated Jurkat cells (0 h) was an almost continuous rim pattern at the nuclear periphery, representing the nuclear lamina that is exclusively located at the inner

face of the nuclear envelope (6). After 4 h of treatment there was no evident change in the fluorescence pattern observed. However, after 8 h of treatment important changes were detected: gaps appeared in the fluorescence pattern, presumably due to localized disorganization of the lamina meshwork. After 12 h, some lamin B1 fluorescence was located at the periphery of the original nucleus, while a circular fluorescence pattern appeared in a vesicle budding from the main body of the cell. Thus, at least part of lamin B1 appeared to be redistributed from the lamina network to vesicles representing apoptotic blebs. After 16 h, the original lamina became undetectable and lamin B1 was completely redistributed in blebs with a circular pattern. The SLE patient aLB1 serum #9176 and GP5 showed complete colocalization at all time points with the exception of, at the 12 and 16h time points, a circular area of fluorescence at the center of the blebs that was detected only by the SLE serum (Fig. 3, GP5, SLE serum #9176, and Merge). Similar patterns of lamin B1 redistribution in late apoptotic blebs were observed in Jurkat cells treated with anti-Fas antibody (data not shown).

**Lamin B1 is sequestered inside apoptotic blebs.** To determine the accessibility of lamin B1 at the surface of apoptotic Jurkat cells or blebs, surface proteins of untreated cells and of apoptotic cells and blebs were biotinylated and purified. As a positive control for GP5 reactivity, purified lamin B1 was digested with caspase-6, biotinylated and analyzed in parallel with the purified biotinylated surface proteins.

Unlabeled and biotinylated lamin B1 and its apoptotic fragments were detected by GP5 (Fig. 4, upper panel, lanes 1 and 2, respectively), but neither lamin B1 nor its fragments were detected in the purified surface proteins of untreated cells, apoptotic cells or isolated blebs (Fig. 4, upper panel, lanes 3-5, respectively). As a positive control for the efficiency of the surface biotinylation technique, a similar immunoblot of Jurkat cell surface proteins was probed with an SLE patient serum monospecific for the La autoantigen, which has previously been shown to be accessible at apoptotic cell and bleb surfaces (14). As expected, La was detected in the biotinylated surface proteins of apoptotic cells and blebs (Fig. 4, lower panel, lanes 4 and 5, respectively), but not at the surface of intact untreated cells (Fig. 4, lower panel, lane 3). Lamin B1 was detected in the unlabeled whole cell lysate of apoptotic Jurkat cells (Fig. 4, lane 1). The difference in mobility between unlabeled and biotinylated lamin B1 fragments is due to the added biotin moieties. Taken together, these results show that, unlike other autoantigens such as La, lamin B1 was not found at the surface of apoptotic cells or blebs.

To demonstrate these results microscopically, isolated and fixed Jurkat blebs were examined by confocal microscopy. A representative example is shown in Fig. 5a where fluorescence due to GP5 detection of lamin B1 was completely enclosed within the bleb plasma membrane visualized by phase contrast, as evidenced by the merged images. This finding was confirmed by performing horizontal optical

sections of a typical bleb, double-stained for lamin B1 and anionic phospholipids by GP5 and annexin V, respectively (Fig. 5b). GP5 detection showed a circular pattern smaller in the first and last sections and larger in the middle sections, showing that lamin B1 is associated with a continuous peripherally stained structure within the blebs, as clearly evidenced by merging with the phase contrast images. Annexin V, in these blebs permeabilized to allow for GP5 penetration, did not only stain the external bleb surface but also the inner face of their plasma membrane. Nevertheless, staining by GP5 was clearly enclosed within the bulk of annexin V staining, with only minimal overlap at the interface of both due to their proximity and to the resolution of these optical microscopy images. The results of Figure 5 are representative of 8 independent experiments, using either staurosporine or anti-Fas antibody as inducers of apoptosis. Blebs containing lamin B1 were approximately 2  $\mu\text{m}$  in diameter, while smaller blebs of less than 1.5  $\mu\text{m}$  were stained by annexin V, but not by GP5.

Since the most likely *in vivo* target for circulating aLB1 would be endothelial cells, it was important to determine whether lamin B1 was localized in HUVEC apoptotic blebs in a fashion similar to that of Jurkat blebs. Hence, HUVEC were induced into apoptosis, blebs collected and examined by phase contrast microscopy. Representative examples are shown in Figure 6. Blebs from HUVEC were clearly larger than those from Jurkat cells, due to their larger cytoplasmic compartment. Again however, it could clearly be seen that lamin B1 was restricted to a circular



structure completely enclosed within the bleb plasma membrane as evidenced by the merging of GP5 and phase contrast images, either in tangential sections (Fig.6, top row) or in middle sections (Fig.6, bottom row). Membrane staining by annexin V in these permeabilized blebs was also shown to enclose completely the lamin B1 pattern. These results confirm that lamin B1 is enclosed within apoptotic blebs.

**Lamin B1 is not accessible to human aLB1 at the surface of apoptotic blebs.**

aLB1 immunoglobulins were affinity-purified from the high titered sera of four SLE patients. Double staining of isolated Jurkat blebs with annexin V and purified aLB1 was performed and analyzed by confocal microscopy. Figure 7 is representative of results obtained with these antibodies. aLB1 showed a circular pattern enclosed within the annexin V membrane staining profile, similar to the pattern observed with GP5 (Fig. 5). Purified aLB1 did not recognize any other target at the surface of blebs. Thus, lamin B1 is sequestered and is unlikely to be accessible to circulating human aLB1 in apoptotic blebs. The purified aLB1 used in Figure 7 were isolated from SLE patient serum #9176 (Fig. 3). The apparent discrepancy observed between the staining patterns of SLE serum #9176 and GP5 (Fig. 3), 12 and 16h time points, was not observed with aLB1 affinity purified from the same serum (Fig. 7), suggesting that the additional staining was due to antibodies directed against a target other than lamin B1.

## Discussion

We have demonstrated the association between the presence of aLB1 in SLE patients and protection against thrombosis (« thromboprotection ») in a large, multicenter study. Previous work from our group supported such an association, but the cohort of patients was small and of limited ethnic diversity. In contrast, the power of the present study was greatly increased, since the total number of SLE patients studied increased from 94 to 259 and the number of patients expressing aLB1 was raised from 8 to 46. Furthermore, the present multicenter study encompassed three Lupus Clinic populations including English Canadian and French Canadian SLE patients from three different university hospitals in two geographical locations (Montreal, QC and Halifax, NS). The observed frequency of thrombosis in the presence of LAC without aLB1 was 50%, in-keeping with other studies (reviewed in 3,4). However, when both LAC and aLB1 were present, there was a marked and highly significant reduction in the frequency of thrombosis to 22.7%. This frequency was similar to that of patients with neither autoantibody (25.5%) or aLB1 only (20.8%). We further defined the relationship between aLB1, antiphospholipid antibodies and thrombosis, by subsetting patients according to their aCL/anti- $\beta_2$ GPI status. This approach further unveiled the link between aLB1 and LAC, by showing that the protective role of aLB1 on thrombosis is specifically linked to the presence of LAC. In particular, in the presence of LAC, but in the absence of both aCL/anti- $\beta_2$ GPI and aLB1, the frequency of thrombosis was 40%,

whereas in the presence of aLB1, it strikingly decreased to 9.1%. The latter frequency of thrombosis was the lowest observed in the various patient subsets. In contrast, in the absence of LAC, the frequency of thrombosis was similar in all aCL/anti- $\beta_2$ GPI subsets, regardless of aLB1 status. Thus, the presence of aLB1 at first patient evaluation essentially nullifies the strong prothrombotic risk associated with LAC. Hence, aLB1 are associated with thromboprotection.

Could confounding factors account for these results? This question was previously addressed in detail in our earlier publication reporting the association between aLB1 and LAC in 94 SLE patients (7). We used stepwise multiple logistic regression to identify the variables best associated with aLB1. No potentially confounding variable emerged as associated with aLB1, including age, gender, disease duration, treatment with prednisone and other immunosuppressive medications, or prednisone dose (7). Therefore it appears unlikely that confounding variables would explain the lower risk of thrombosis in patients with aLB1 and LAC.

To our knowledge, there has been no other example of aAbs in systemic autoimmune diseases that are associated with a “thromboprotective” role in the host, although other aAbs with protective effects have been described (23). To date, aLB1 appear unique in this regard. aLB1 also provide the first marker for a subset of LAC positive SLE patients with a better prognosis, and their presence

may explain why some patients with LAC do not develop thrombosis (3). Thus, this finding could have therapeutic implications. It may be of value to determine the aLB1 and aCL/anti- $\beta_2$ GPI status of newly evaluated patients with SLE and LAC, who have not had a first thrombotic episode (5). Given that the risk of thrombosis in aLB1-positive, aCL/anti- $\beta_2$ GPI-negative, patients is low, prophylactic anticoagulation of these patients may not be warranted. Conversely, patients who produce LAC and aCL/anti- $\beta_2$ GPI in the absence of aLB1 are at high risk for thrombosis and prophylactic anticoagulation may be warranted. This approach should be formally studied in a randomized controlled trial.

We next investigated the mechanism by which aLB1 may cause thromboprotection *in vivo*. Because surface blebs on apoptotic cells are procoagulant (8), which may be fundamental to the pathogenesis of thrombotic events in patients with aPL (8-10), and because major SLE aAgs are displayed at the external surface of these blebs, where their accessibility to circulating aAbs may form the molecular basis of their pathogenic effects (14,15), our mechanistic hypothesis was that circulating aLB1 may block the procoagulant effect of apoptotic blebs by binding to lamin B1 displayed at the external bleb surface. This hypothesis was also warranted since lamin B1 is an early substrate of caspase-6 during apoptosis (16,17), suggesting that lamin B1 epitopes might be present in apoptotic blebs.

Therefore, we evaluated whether lamin B1 is expressed in Jurkat and endothelial cells that have undergone apoptosis. Lamin B1 cleavage products were detected in cells induced to undergo apoptosis by either treatment with anti-Fas antibody or staurosporine. Cleavage of lamin B1 preceded DNA fragmentation, a characteristic feature of cells undergoing apoptosis. Confocal microscopy, using anti-lamin antibodies and SLE patient-derived aLB1, demonstrated that lamin B1 redistributed from the nuclear lamina to apoptotic blebs during the process of apoptosis. Finally, we evaluated whether lamin B1 was present on the surface of apoptotic blebs, using biotinylation of surface proteins on apoptotic cells and blebs. We found that lamin B1 was not present on the surface of the blebs, although other aAg, such as La, were present. Confocal microscopy confirmed that lamin B1 was buried within apoptotic blebs and inaccessible to circulating aLB1. These results disprove our hypothesis and suggest that a direct role for lamin B1 in mediating thromboprotection is unlikely. The mechanism by which aLB1 confer thromboprotection in patients with SLE remains to be elucidated. Studies are now in progress in our laboratory to determine whether aLB1 may exert a thromboprotective effect by interacting with soluble coagulation factors or by modulating cells involved in coagulation.

The novel finding that lamin B1, either complete or as caspase-cleaved fragments, was indeed present within apoptotic blebs provides insights into the mechanisms by which a nuclear envelope protein, such as lamin B1, could become

immunogenic. As for several other aAgs accumulated in apoptotic blebs, processing of lamin B1 by antigen-presenting cells may give rise to aLB1 in susceptible hosts (i.e. patients with abnormalities in the recognition, uptake, processing and presentation of antigen, or with defects in the mechanism for apoptotic bleb clearance) (reviewed in 11,24,25). Direct experimental evidence for the production of aAbs following immunization with apoptotic cells has been obtained (26-28).

Our finding that, by both biochemical and morphological criteria, lamin B1 was not detected at the surface of apoptotic blebs is in striking contrast with the finding that cytoplasmic aAgs targeted by anti-Ro and ANCA (10,15), and nuclear aAg La (14), have been localized to the external surface of apoptotic blebs. In the latter cases, accessibility to circulating aAbs may explain the pathogenic effects of these aAbs. In contrast, our findings suggest that, although apoptotic blebs may serve as an important physiological target for some aAbs (9-13), this cannot be generalized to all aAgs. Even in the case of the nuclear aAg La, localization of this aAg within the cell changes from nuclear to cytoplasmic as caspase cleavage proceeds during apoptosis (29). Hence, our data raise the question whether any aAg of strict nuclear origin may be translocated to the external surface of apoptotic blebs.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Dr. Lisa R. Sammaritano for providing patient sera and data in the preliminary phase of this study. We thank Mrs. Pierrette Rego for typing the manuscript.

## REFERENCES

1. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, Brey R, Derksen R, Harris EN, Hughes GRV, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999;42:1309-11.
2. Horbach DA, von Oort E, Donders RCJM, Derksan RHWM, de Groot PG. Lupus anticoagulant is the strongest risk factor for both venous and arterial thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Thromb Haemost* 1996;76:916-24.
3. Asherson RA, Cervera R, Lie JT. The antiphospholipid syndromes. In *Systemic Lupus Erythematosus*. Lahita RG editor. New York: Academic Press 1999;829-70.
4. Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *J Autoimmunity* 2000;14:145-51.
5. Ruis-Irastorza G, Khamashta MA, Castellini G, Hughes GRV. Systemic lupus erythematosus. *Lancet* 2001;357:1027-32.



6. Hutchison CJ, Alvarez-Reyes M, Vaughan OA. Lamins in disease : why do ubiquitously expressed nuclear envelope proteins give rise to tissue-specific disease phenotypes? *J Cell Sci* 2001;114:9-19.
7. Senécal JL, Rauch J, Grodzicky T, Raynauld JP, Uthman I, Nava A, Guimond M, Raymond Y. Strong association of autoantibodies to human nuclear lamin B1 with lupus anticoagulant antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999;42:1347-53.
8. Casciola-Rosen L, Rosen A, Petri M, Schlissel M. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity : implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1624-29.
9. Levine JS, Koh JS, Subang R, Rauch J. Apoptotic cells as immunogen and antigen in the antiphospholipid syndrome. *Exp Mol Pathol* 1999;66:82-98.
10. Rosen A, Casciola-Rosen L. Autoantigens as substrates for apoptotic proteases : implications for the pathogenesis of systemic autoimmune disease. *Cell Death Differ* 1999;6:6-12.

11. Grodzicky T, Elkon KB. Apoptosis in rheumatic diseases. *Am J Med* 2000;108:73-82.
12. Navratil JS, Ahearn JM. Apoptosis and autoimmunity: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *Curr Rheum Rep* 2000;2:32-8.
13. Rovere P, Sabbadini MG, Fazzini F, Bondanza A, Zimmermann VS, Rugarli C, Manfredi AA. Remnants of suicidal cells fostering systemic autoaggregation. *Arthritis Rheum* 2000;43:1663-72.
14. Miranda-Carus ME, Askanase AD, Clancy RM, Di Donato F, Chou TM, Libera MR, Chan EKL, Buyon JP. Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La autoantibodies bind the surface of apoptotic fetal cardiocytes and promote secretion of TNF-alpha by macrophages. *J Immunol* 2000;165:5345-51.
15. Gilligan HM, Bredy B, Brady HR, Hébert MJ, Slayter HS, Xu Y, Rauch J, Shia MA, Koh JS, Levine JS. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies interact with primary granule constituents on the surface of apoptotic

- neutrophils in the absence of neutrophil priming. *J Exp Med* 1996;184:2231-41.
16. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases : structure, substrates, and functions during apoptosis. *Ann Rev Biochem* 1999;68:383-424.
  17. Cohen M, Lee KK, Wilson KL, Gruenbaum Y. Transcriptional repression, apoptosis, human disease and the functional evolution of the nuclear lamina. *Trends Biochem Sci* 2001;26:41-7.
  18. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-7.
  19. Senécal JL, Raymond Y. Autoantibodies to major and minor lamins are not restricted to autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopathol* 1992;63:115-25.
  20. Wong C, Sridhara S, Bardwell JC, Jakob U. Heating greatly speeds Coomassie blue staining and destaining. *Biotech* 2000;28:426-8.

21. Mayer JL, Beardsley DS. Varicella-associated thrombocytopenia: autoantibodies against platelet surface glycoprotein V. *Pediatr Res* 1996;40:615-9.
22. Rao L, Perez D, White E. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 1996;135:1441-55.
23. Sharp GC, Irvin WS, May CM, Holman HR, McDuffie FC, Hess EV, Schmid FR. Association of antibodies to ribonucleoprotein and Sm antigens with mixed connective tissue disease, systemic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. *New Eng J Med* 1976;295:1149-54.
24. Lipsky PE. Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nature Immunol* 2001;2:764-6.
25. Marrack P, Kappler J, Kotzin BL. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nature Med* 2001;7:899-905.
26. Mevorach D, Zhou JL, Song X, Elkou KB. Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. *J Exp Med* 1998;188:387-92.

27. Levine JS, Subang R, Koh JS, Rauch J. Induction of anti-phospholipid autoantibodies by  $\beta$ -2-glycoprotein I bound to apoptotic thymocytes. *J Autoimmunity* 1998;11:413-24.
28. Gensler TJ, Hottelet M, Zhang C, Schlossman S, Anderson P, Utz PJ. Monoclonal antibodies from BALB/c mice immunized with apoptotic Jurkat cells recognize known autoantigens. *J Autoimmunity* 2001;16:59-69.
29. Ayukawa K, Taniguchi S, Masumoto J, Hashimoto S, Sarvotham H, Hara A, Toshifumi A, Sagara J. La antigen is cleaved in the COOH terminus and loses the nuclear localisation signal during apoptosis. *J Biol Chem* 2000;275:34465-70.

**Table 1. Demographic characteristics of 304 adults studied.**

	<b>Number (%)</b>	<b>Age Mean SD years</b>	
<b>Normal controls (n=45)</b>			
Female	29 (64.4)	46.9	16.1
Male	16 (35.6)	46.3	14.1
<b>SLE, NDH (n=112)</b>			
Female	105 (93.7)	37.0	14.9
Male	7 (6.3)	40.9	13.1
<b>SLE, QEIIHSC (n=36)</b>			
Female	28 (77.8)	31.9	11
Male	8 (22.2)	40.1	9.8
<b>SLE, MGH (n=111)</b>			
Female	105 (94.6)	43.6	13.1
Male	6 (5.4)	52.3	19.7
<b>SLE, Cohort (n=259)</b>			
Female	238 (91.9)	37.5	3
Male	21 (8.1)	44.4	14.2

**Table 2. Frequency of thrombosis in patients with LAC : Effect of presence of aLB1.**

	<b>Thrombosis</b>	<b>No thrombosis</b>	<b>Odds ratio (95% CI)</b>	<b>P*</b>
Patients with both LAC and aLB1	5	17	0.62 (0.22-1.75)	0.47
All other patients	76	161		
Patients with LAC and absence of aLB1	34	34	3.06 (1.71-5.46)	0.0002
All other patients	47	144		

\* By Fisher's 2-tailed exact test.

**Table 3. Frequency of thrombosis according to LAC and aLB1 status in 259 patients with SLE.**

	Thrombosis*		Frequency of thrombosis %
	Yes N	No N	
Presence of LAC and absence of aLB1	34	34	50
Presence of both LAC and aLB1	5	17	22.7
Absence of both LAC and aLB1	37	108	25.5
Absence of LAC and presence of aLB1	5	19	20.8

\* P = 0.0004 by chi-squared test for trend.



**Table 4. Frequency of thrombosis according to LAC, aCL, anti- $\beta_2$ GPI and aLB1 status in 253 patients with SLE.**

Presence of LAC	Thrombosis*		Frequency of thrombosis
	Yes N	No N	%
Presence of aCL/anti- $\beta_2$ GPI** and absence of aLB1	15	9	62.5
Presence of both aCL/anti- $\beta_2$ GPI and aLB1	4	7	36.4
Absence of both aCL/anti- $\beta_2$ GPI and aLB1	16	24	40.0
Absence of aCL/anti- $\beta_2$ GPI and presence of aLB1	1	10	9.1
Absence of LAC	Thrombosis*		Frequency of thrombosis
	Yes N	No N	%
Presence of aCL/anti- $\beta_2$ GPI and absence of aLB1	16	33	32.6
Presence of both aCL/anti- $\beta_2$ GPI and aLB1	2	6	25.0
Absence of both aCL/anti- $\beta_2$ GPI and aLB1	21	73	22.3
Absence of aCL/anti- $\beta_2$ GPI and presence of aLB1	3	13	18.8

\* By chi-squared test for trend :  $P = 0.0002$  for all 8 subsets,  $P = 0.007$  for LAC-positive subsets,  $P > 0.1$  for LAC-negative subsets.

\*\* aCL and/or anti- $\beta_2$ GPI of IgG and/or IgM isotypes.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Distribution of anti-lamin B1 IgG autoantibodies (aLB1) in systemic lupus erythematosus (SLE) patients versus normal controls by ELISA using recombinant human lamin B1.** Patients were from Notre-Dame Hospital (NDH), Queen Elizabeth II Health Sciences Centre (QEIIHSC) and Montreal General Hospital (MGH). The cut-off point, shown by the dotted line, corresponded to 4 SD above the mean in normal controls. Bars indicate the mean OD value in patients positive for aLB1. By one-way analysis of variance, no significant difference was noted between mean OD values among the SLE populations positive for aLB1 (Kruskal-Wallis statistic 0.39,  $P = 0.9$ ). A highly significant difference was noted between mean OD values among the SLE patients positive for aLB1 versus controls (Kruskal-Wallis statistic 89.5,  $P < 0.0001$ ).

**Figure 2. Cleavage of lamin B1 and DNA fragmentation occur in close synchrony during apoptosis in Jurkat cells.** (a) Detection of lamin B1 fragments in immunoblots of lysates of Jurkat cells treated for the indicated periods of time with anti-Fas antibody (50  $\mu\text{g/ml}$ ) (left panel); or with staurosporine (25  $\mu\text{g/ml}$ ) (right panel) with an antiserum directed against lamin B1 (GP5). Intact lamin B1 migrated as a 67 kDa band, while apoptotic N- and C-terminal fragments migrated as 25 and 47 kDa bands, respectively. (b) Quantification of DNA fragmentation by an ELISA

detecting BrdU-labeled DNA fragments in Jurkat cells treated for the indicated periods of time with anti-Fas antibody (50  $\mu\text{g/ml}$ ) (left panel) or staurosporine (25  $\mu\text{g/ml}$ ) (right panel).

**Figure 3. Lamin B1 is relocated into blebs during late apoptosis in Jurkat cells.** Time course analysis of Jurkat cells treated with staurosporine (25  $\mu\text{g/ml}$ ) for the indicated periods of time. The cells are shown, as visualized by phase contrast or stained with GP5 (green) and an aLB1 positive human SLE serum (red) and examined by confocal microscopy (scale bars = 5  $\mu\text{m}$ ).

**Figure 4. Intact lamin B1 and its apoptotic fragments are not present at the surface of apoptotic cells or blebs.** Immunoblotting of whole lysates of non-biotinylated apoptotic Jurkat cells (lane 1), cleaved and biotinylated lamin B1 (lane 2), purified biotinylated surface proteins from untreated cells (lane 3), apoptotic cells (lane 4), or isolated blebs from apoptotic cells (lane 5) detected with either GP5 (upper panel) or with a serum monospecific for La autoantigen (lower panel).

**Figure 5. Lamin B1 is sequestered inside Jurkat apoptotic blebs.** (a) GP5 (green) staining of a fixed Jurkat bleb examined by confocal microscopy. (b) Horizontal optical sections of a fixed Jurkat bleb stained with GP5 (red) and annexin V (green) and examined by confocal microscopy (scale bars = 2.5  $\mu\text{m}$ ).

**Figure 6. Lamin B1 is sequestered inside HUVEC apoptotic blebs.** Double staining of isolated HUVEC blebs with annexin V (green) and GP5 (red) analyzed by confocal microscopy (scale bars = 2.5  $\mu\text{m}$ ).

**Figure 7. Lamin B1 is not detected by human aLB1 at the surface of apoptotic blebs.** Double staining of isolated Jurkat blebs with annexin V (green) and purified aLB1 (red) analyzed by confocal microscopy (scale bars = 2.5  $\mu\text{m}$ ).

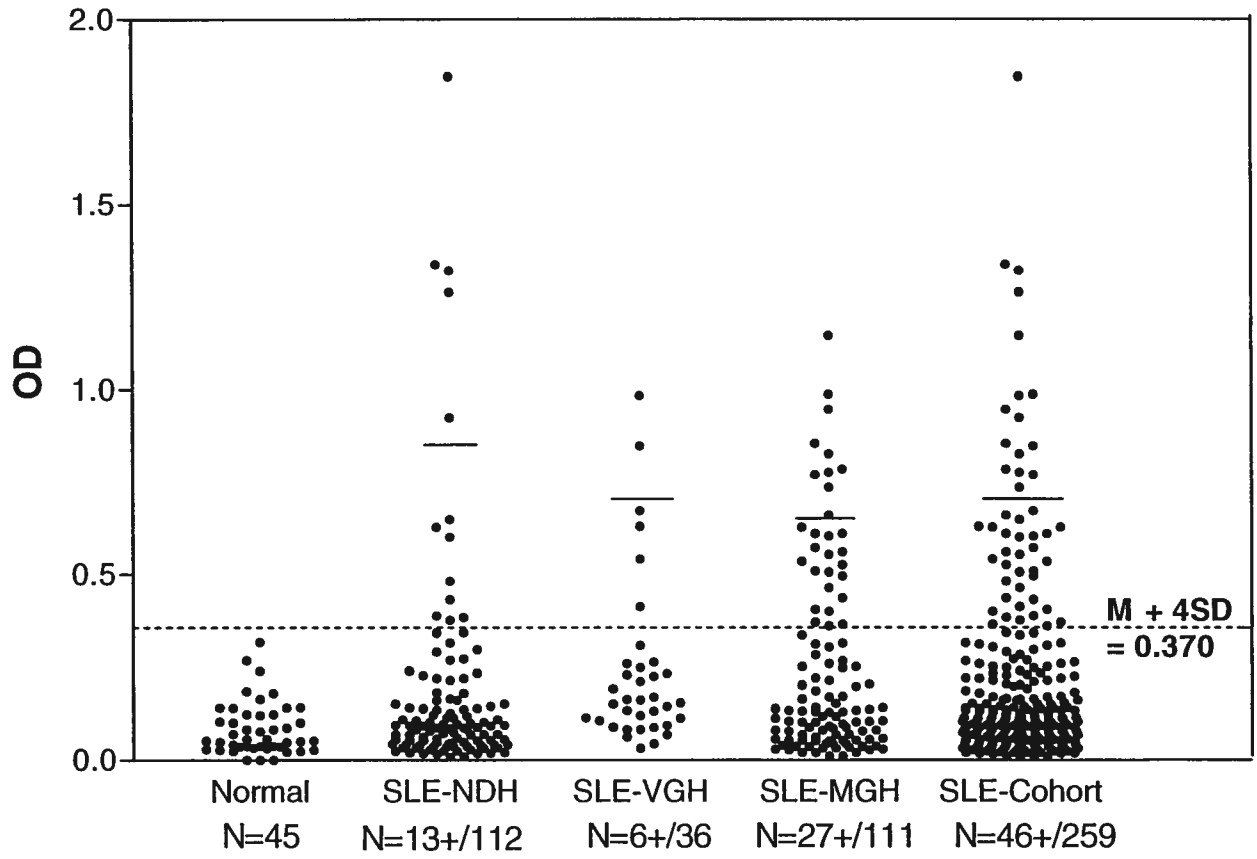


Figure 1

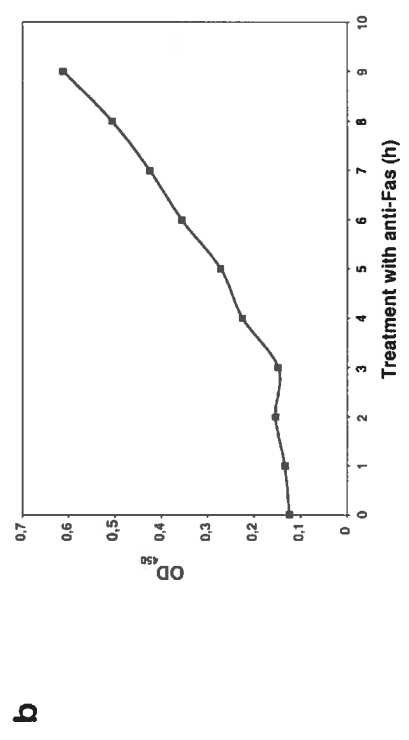
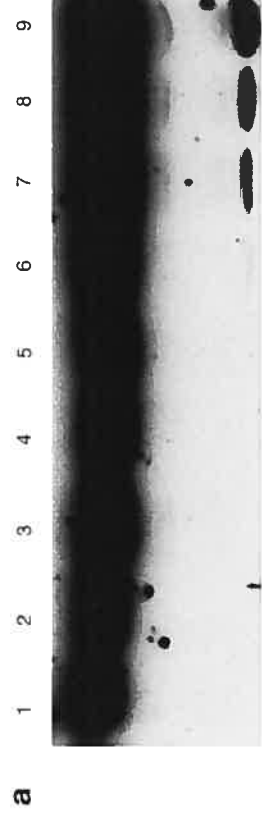
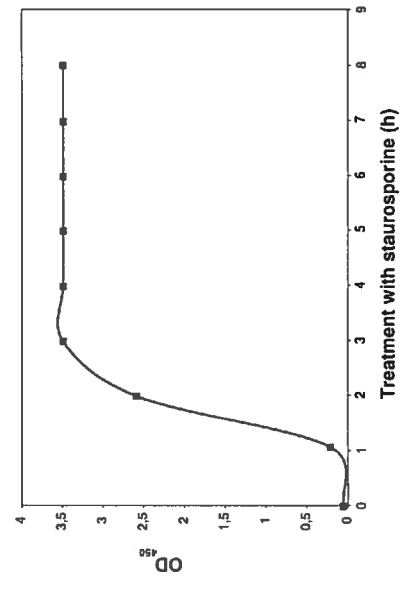
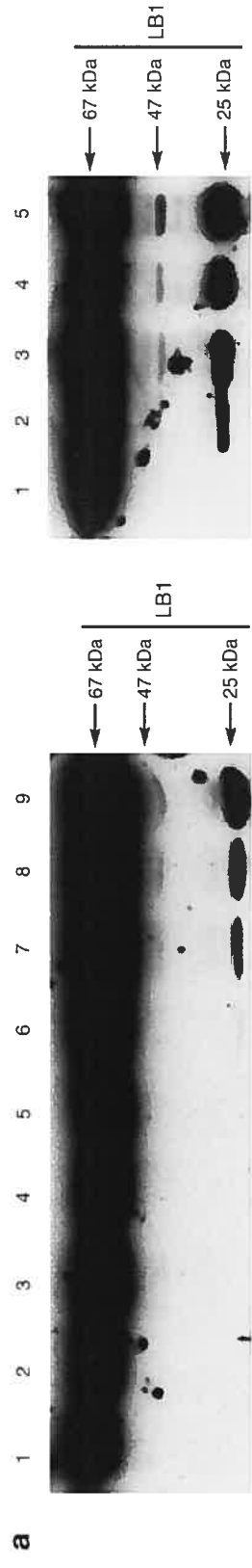


Figure 2

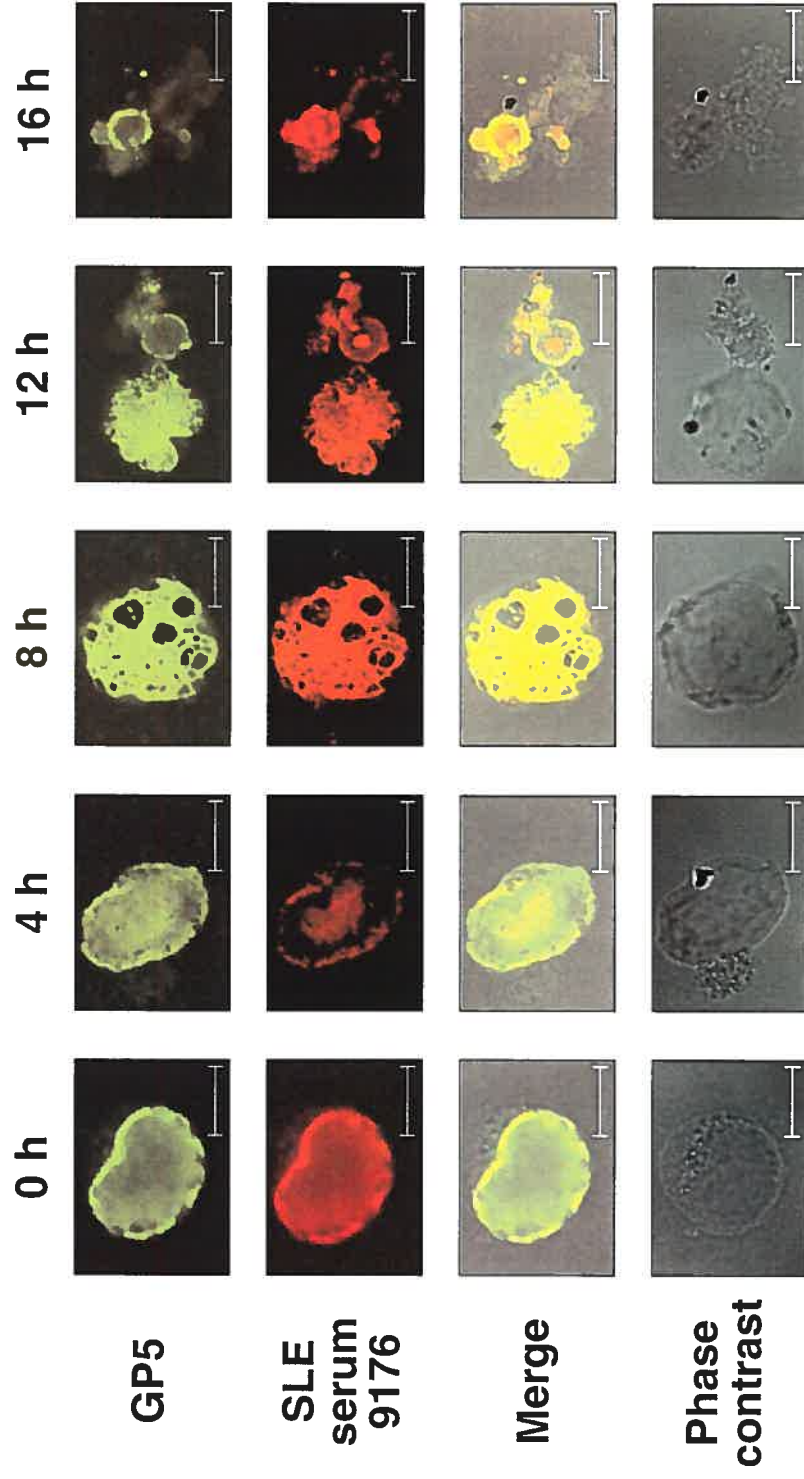
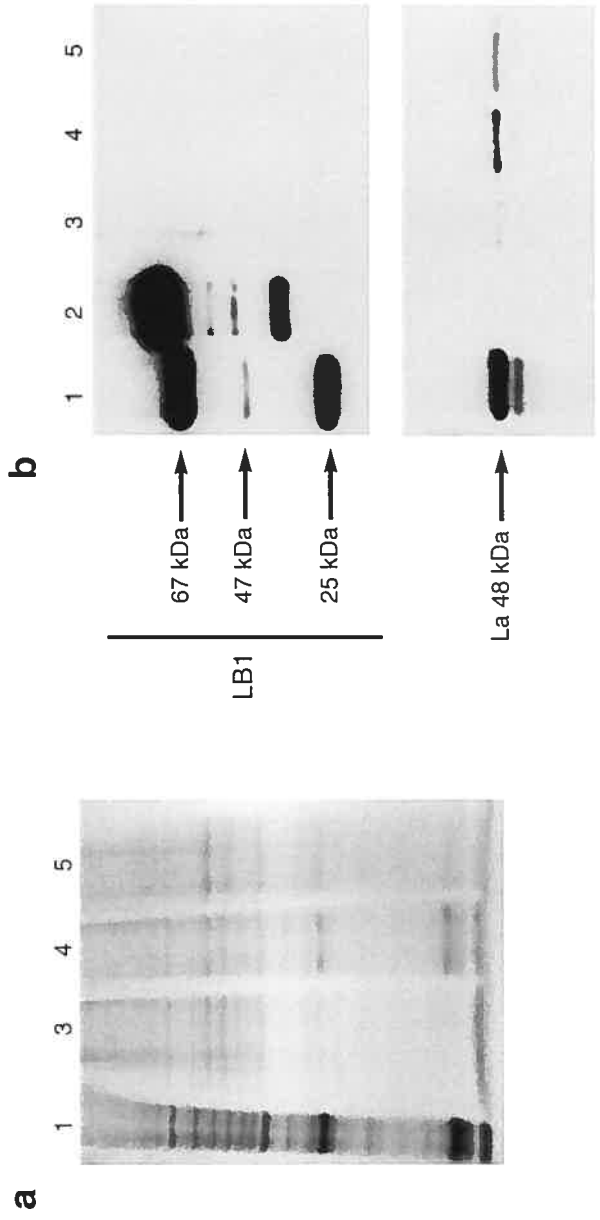
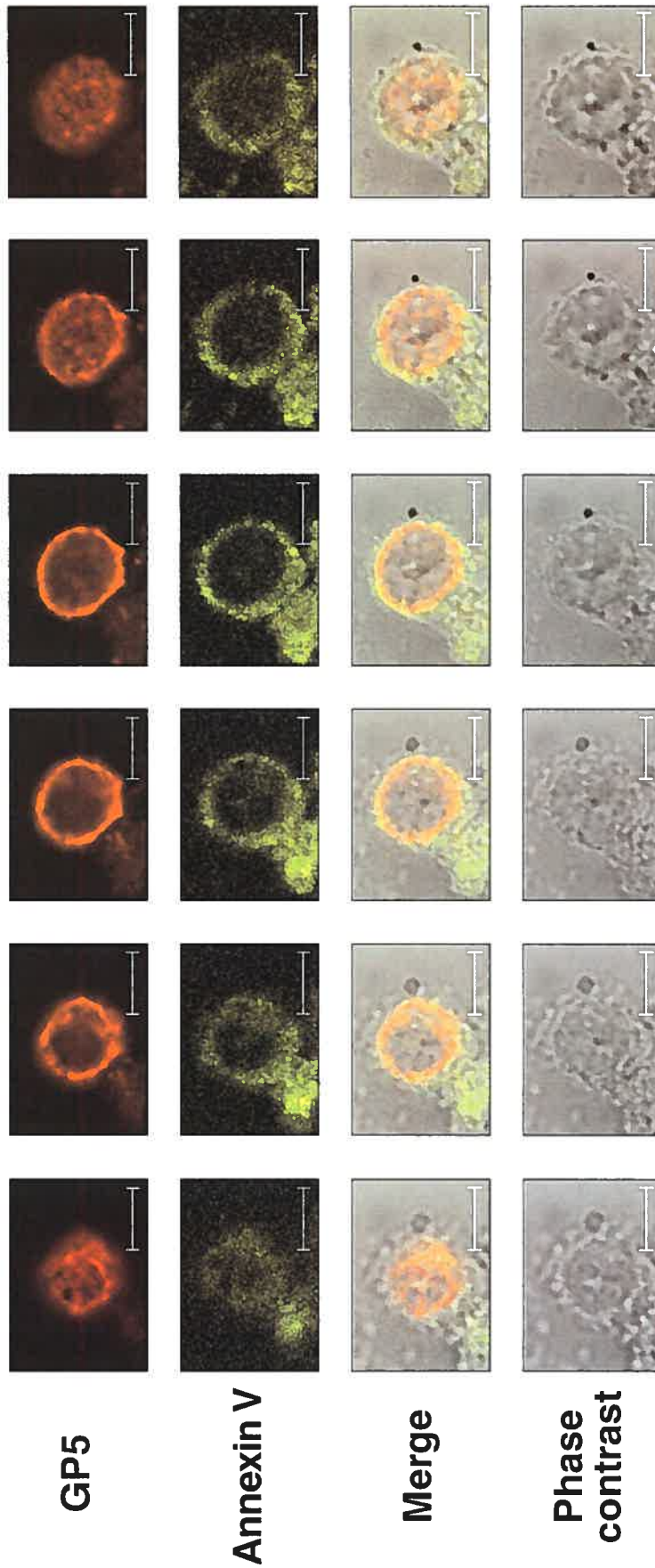


Figure 3



**Figure 4**





**GP5**

**Annexin V**

**Merge**

**Phase  
contrast**

**Figure 5**

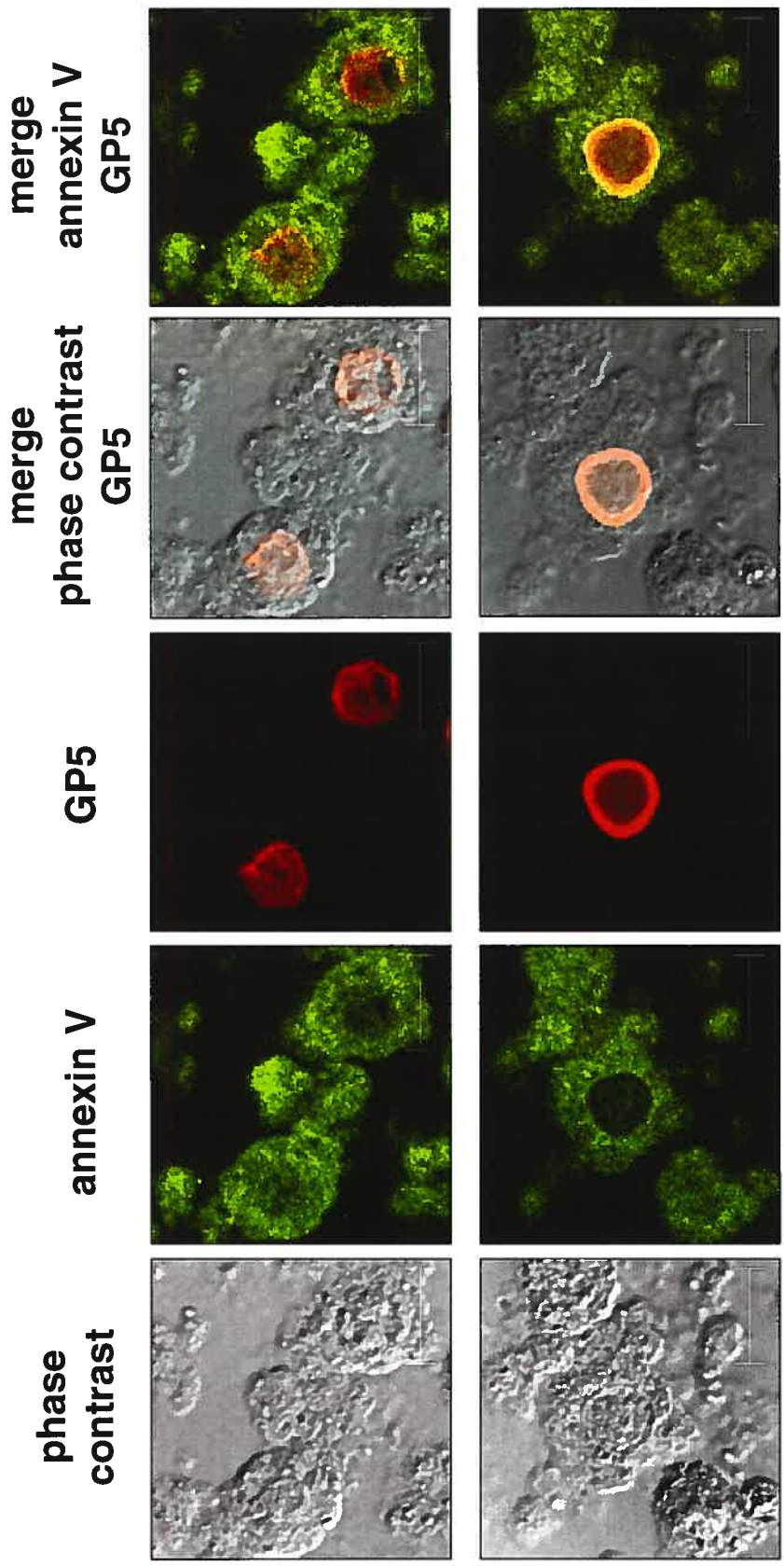


Figure 6

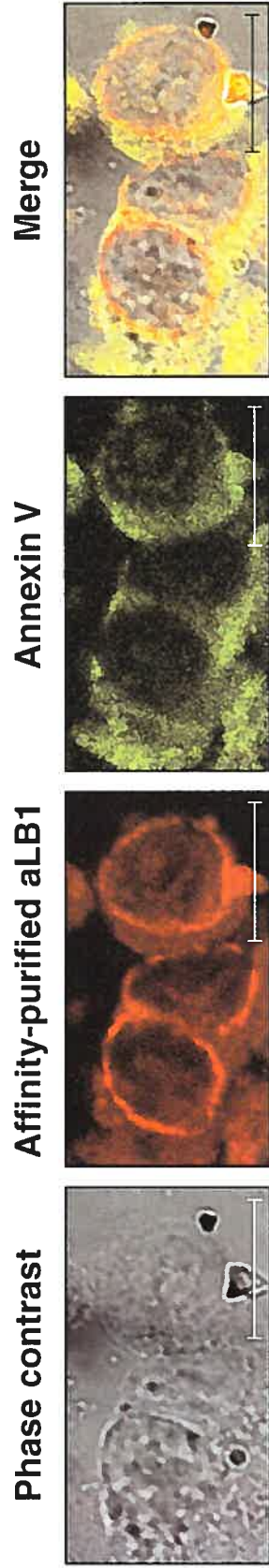


Figure 7

## Article 2

# ANTI-ENDOTHELIAL CELL AUTOANTIBODIES FROM SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS PATIENTS BIND HEAT SHOCK PROTEIN 60 AND INDUCE APOPTOSIS IN ENDOTHELIAL CELLS

Mélanie Dieudé, M.Sc., Ph.D. candidate; Jean-Luc Senécal, M.D., Professor of  
Medicine; Yves Raymond, Ph.D., Associate Professor of Medicine;  
Autoimmunity Research Laboratory, Notre-Dame Hospital,  
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal,  
Montréal, Québec, H2L 4M1, Canada

Supported by grant MOP-36436 (to Drs. Raymond and Senécal) from the  
Canadian Institutes of Health Research and a doctorate studentship (MD) from the  
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.

Running head : Anti-hsp60 induce endothelial apoptosis

Address correspondence and reprint requests to :

Yves Raymond, Ph.D.

Autoimmunity Research Laboratory

Notre-Dame Hospital CHUM


1560 Sherbrooke Street East

Montreal QC, H2L 4M1

Canada

Tel : 514-890-8000 ext. 25481

Fax : 514-412-7661



**Abstract**

**Objective.** To determine whether anti-endothelial cell autoantibodies (AECA), from systemic lupus erythematosus (SLE) patients with antiphospholipid syndrome (APS), can be involved in the initial endothelial cell (EC) membrane perturbation effect that is postulated to provide a target for antiphospholipid antibodies (aPL) binding and, hence, to trigger the thrombotic cascade. To identify the AECA antigenic target on EC and to determine the mechanism whereby EC membrane is disrupted.

**Methods.** AECA from SLE were assayed for binding to EC by flow cytometry. Positive AECA were assayed by immunoblotting and a consensus antigen was identified by mass spectrometry. This candidate antigen was tested in recombinant form for AECA recognition. AECA were affinity-purified on this antigen and incubated with EC to determine their physiological effects. Anti-hsp60 titers were determined by ELISA. The relationships between anti-hsp60 and lupus anticoagulant antibodies (LAC) status, and thrombotic manifestations, were analyzed between onset of disease and last followup.

**Results.** A majority (73%) of SLE sera tested possessed IgGs that bound to the surface of EC. These positive IgGs shared reactivity against a 60 kDa EC surface polypeptide, that was identified as human heat shock protein 60 (hsp60). The

presence of hsp60 at the EC surface was established using anti-hsp60 antibodies from commercial sources or affinity-purified from SLE sera that bound EC. Incubation of EC with these anti-hsp60 antibodies induced apoptosis as determined by Hoechst staining of condensed nuclei, and annexin V binding to surface phosphatidylserine (PS), in a time- and dose-dependent manner. Anti-hsp60 antibodies were not restricted to SLE patients and were found in other patients with autoimmune disease. However, anti-hsp60 antibodies were significantly associated with an increased frequency of thrombosis, when found in combination with LAC in SLE patients. **Conclusion.** The presence of hsp60 at the surface of EC serves as a target for anti-hsp60 antibodies present in SLE sera. These anti-hsp60 antibodies bind to EC and induce apoptosis, particularly PS exposure, thus providing a target for the binding of aPL and inducing the subsequent thrombotic cascade.

## Introduction

The antiphospholipid syndrome (APS) is defined by recurrent thrombotic events and pregnancy morbidity in association with the presence of antiphospholipid autoantibodies (aPL) (1). The predominant autoimmune disease associated with secondary APS is systemic lupus erythematosus (SLE). Although aPL are strong predictors for thrombosis, half of the patients expressing aPL may not develop thrombotic manifestations (2). This suggests that the mere presence of aPL is insufficient to generate thrombosis.

Several pathogenic mechanisms have been proposed for the occurrence of thrombotic manifestations in APS. Most of these involve binding of aPL to the surface of cells that play a role in the coagulation cascade such as endothelial cells (EC) (2). For instance, the binding of aPL to cells that express anionic phospholipids at their external surfaces, an event that is best known to occur during apoptosis (3), is very well supported experimentally. However, this molecular scenario would imply the occurrence of a first event that would induce cell apoptosis, which would subsequently provide a target for aPL binding, the second event, and thus trigger the thrombotic cascade.

Antibodies that react with EC surfaces, known as anti-endothelial cell autoantibodies (AECA), have been detected under clinical conditions associated with systemic vascular involvement such as SLE and primary APS (4,5). In some instances, AECA have been shown to be capable of inducing EC activation (6,7,8) or apoptosis (9,10). However, the endothelial antigen(s) targeted by AECA have generally not been identified.

Here, we show that AECA present in SLE sera specifically recognized hsp60 and that binding of hsp60-reactive AECA to hsp60 on the surface of EC induced apoptosis. Moreover, although they are not specific to SLE, anti-hsp60 antibodies were found to be significantly associated with an increased frequency of thrombosis when combined with lupus anticoagulant antibodies (LAC) in SLE patients. We propose that induction of apoptosis by hsp60-reactive AECA is the first event in the thrombotic cascade. Induction of EC apoptosis generates a membrane perturbation, which initiates the recruitment of coagulation factors and pathogenic aPL at the EC surface, ultimately leading to thrombosis.



## Materials and Methods

### *SLE sera, control sera and IgG purification*

Coded serum samples were obtained from 111 consecutive adult SLE patients at the time of first evaluation at the Lupus Clinic of Notre-Dame Hospital. All patients fulfilled at least 4 American College of Rheumatology SLE criteria (11). The clinical and laboratory features of this SLE cohort were described in detail (12). Sera were also obtained from 45 healthy adult controls, and disease controls (see Fig. 7), as described (12). Serum samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . For IgG purification, sera from 30 consecutive SLE patients were selected on the basis of their thrombosis and LAC status (presence or absence thereof), and sera from 10 healthy donors were randomly selected and used as controls for the SLE sera. IgG were purified using the NAb Protein G spin Chromatography kit (Pierce, Rockford, Illinois). This study was approved by the Institutional Review Board.

### *Cell culture and flow cytometry*

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) (Clonetics, Walskerville, Maryland) were grown in EGM 2MV medium (Clonetics) in 5%  $\text{CO}_2$  at  $37^{\circ}\text{C}$ . Cells were used at confluence and at not more than the fourth passage. Cells were washed 3 times with PBS, detached by a 3 min incubation in PBS containing 13 mM EDTA, and washed in PBS. For AECA detection, cells were blocked 30 min

with goat IgG (30  $\mu$ g/ml; Sigma, St-Louis, Missouri), incubated 30 min with purified human IgG, followed by a 30 min incubation with FITC-conjugated anti-human IgG (Fc fragment; Jackson ImmunoResearch, Baltimore, Maryland). Hsp60 surface expression was detected by a 30 min incubation of the cells with a mouse anti-hsp60 serum (SPA-806; Stressgen, Victoria, British Columbia, Canada) followed by a 30 min incubation with FITC-conjugated anti-mouse IgG (Jackson). Binding of anti-hsp60 antibodies affinity-purified from SLE sera (see below) was detected by a 30 min incubation of the cells with 190 ng of anti-hsp60 or IgG isolated from a control serum, followed by second antibody as above. In order to discriminate between necrotic and permeable cells, propidium iodide (PI; Sigma) was added at 2  $\mu$ g/ml, 5 min prior to flow cytometry. Labeled cells were analyzed using a FACScan cytometer and Cell Quest software (BD Bioscience, San Diego, California).

*Preparation of HUVEC lysates and biotinylation of cell surface proteins*

HUVEC were washed 3 times with PBS and lysed by adding boiling buffer (10 mM Tris pH 7.4, 1 mM sodium orthovanadate, 1% SDS) directly to the cell dish. Lysates were sonicated and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . HUVEC cell surface proteins were purified using a biotinylation technique as described (13). Quantification of protein was performed on nitrocellulose as described (14).

### *SDS-PAGE and immunoblotting*

Proteins, quantitated with the Micro BCA Protein Assay kit (Pierce), were separated on 8% polyacrylamide gels and stained with Coomassie blue (15). Immunoblots were prepared as described (13) and exposed to control or SLE serum; murine monoclonal IgG1 control antibody (29J3-119, kindly provided by Dr. Joyce Rauch) or anti-hsp60 (SPA-805; Stressgen); normal rabbit or anti-hsp60 (SPA-806; Stressgen) serum. Revelation was as described (13).

### *Mass spectrometry analysis of proteins*

Membrane proteins from HUVEC were purified using the MEM-PER Kit (Pierce). Membrane proteins (45  $\mu$ g) were separated by SDS-PAGE and the band corresponding to p60 was identified by Coomassie blue staining. The p60 band was cut out from the gel and analyzed by the Eastern Quebec Proteomics Center (Quebec City, Quebec, Canada). Briefly, tryptic digestion was performed on the acrylamide gel band and tryptic peptides were analyzed by mass spectrometry. A database search was performed to identify candidate polypeptides with the same characteristics as the p60 sample.

*Affinity purification of human anti-hsp60*

Pure recombinant human hsp60 (75 µg; Stressgen) was dried onto a 1 cm<sup>2</sup> nitrocellulose membrane. Incubation with sera, elution, renaturation and concentration of affinity-purified anti-hsp60 were exactly as described (13). The monospecificity of each sample for hsp60 was assayed by immunoblotting on HUVEC lysates. Purification of the control sera and vehicle control were performed on membrane without antigen.

*Treatment of HUVEC with anti-hsp60 and detection of apoptosis*

HUVEC were grown to confluence in 6 well culture dishes and washed twice with complete culture medium. Cells were incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> with antibodies (see Fig. legends) or equivalent vehicle control in 500 µl of complete culture medium. Where specified, affinity-purified anti-hsp60 were preincubated with hsp60 for 2 h at room temperature, or incubated with Polymyxin-B (Sigma) according to manufacturer's instructions. As positive controls, apoptosis was induced by serum deprivation for 24h, and necrosis by incubation at 65°C for 25 min. After treatment, cells were either stained with Hoechst/PI (16) or annexin V to detect apoptotic cells. Cells were directly analyzed with a DM IRB-HC-FLUO fluorescence microscope (Leica, Richmond Hill, Ontario, Canada). For each treatment condition, 3 fields per well and 3 wells per experiment were examined, and results expressed as a percentage of apoptotic over total cells.

Phosphatidylserine exposure was detected by a 30 min incubation of the cells with FITC- labeled annexin V (BD).

#### *ELISA for anti-hsp60 in SLE and control sera*

The ELISA was performed as described (12) except for the following changes. Plates were coated with 500 ng per well of hsp60 (Stressgen). All sera were tested at a dilution of 1/100, and anti-human IgG conjugate was at 1/2500, all in blocking buffer. For each serum, the OD values of control wells (no antigen) were subtracted from the OD values obtained on the antigen-coated wells. The OD values of the control wells were low in all cases. Results shown are the means of duplicate values for each serum.

#### *Thrombosis*

A case-control design was used to compare the IgG anti-hsp60 status in SLE patients with and without thrombosis. Arterial and venous thrombotic events were identified as described (12, 13). One or more of these events had occurred in 37 patients. Patients with and without thrombosis were further subdivided according to the presence of LAC (12, 13), determined on plasma obtained at first visit.

*Statistical analysis*

ANOVA was performed to test for significant differences between means of apoptotic or annexin V positive cells. The homogeneity of variance was verified with the Levene's test and the data fit to normal distribution. Tukey's Honest Significant Difference test was used and *P* values less or equal to 0.05 were considered statistically significant (Statistica 5.0, StatSof Inc., Tulsa, Oklahoma). Mean and median values of anti-hsp60 ELISA results were compared by a Kruskal-Wallis followed by a Dunn's test with InStat software (Graph Pad Software, San Diego, California). The relationship between anti-hsp60 and thrombosis in SLE patients was analyzed using 2X2 contingency tables and chi-square analysis with InStat software. The relationship between anti-hsp60, thrombosis and LAC was analyzed using 2X4 contingency tables and the Fisher's exact test (EXACT2XK, Computer programs for epidemiologic analysis, P.M. Gahlinger & J.H. Abramson, 1994).

## Results

### *IgG from SLE sera bind to the surface of HUVEC*

The presence of AECA in SLE sera was assayed by flow cytometry. IgG purified from a representative SLE serum bound to the surface of intact (PI-negative) HUVEC (Fig. 1, bottom panel), with a 13-fold greater percentage (82.25%) of IgG-positive cells than that observed in the presence of IgG purified from a healthy donor's serum (6.0%) (Fig. 1, middle panel). The control IgG showed little binding compared to cells stained with second antibody alone (Fig. 1, top panel). AECA were present in 22 of 30 SLE sera (73%) and in none (0%) of 10 control sera, selected as described under Materials and Methods, (data not shown). These results demonstrate the presence of AECA in SLE sera.

### *AECA positive sera recognize a 60 kD endothelial surface protein*

To identify the antigenic target of AECA in SLE sera, surface proteins of HUVEC were biotinylated with a cell-impermeable reagent, purified and analyzed by immunoblotting with SLE and control sera. Figure 2 shows that representative AECA positive SLE sera (#1-4) shared reactivity against a 60 kD surface protein, hereafter called p60, whereas an AECA negative serum (#5) or a control serum (C) did not react against p60. All 22 AECA positive sera reacted with varying intensities with p60 (data not shown), whereas none of the AECA negative SLE or control

sera reacted with this protein (Figure 3). These results suggest that p60 is the antigenic target for AECA from SLE sera.

*AECA positive sera react with human hsp60*

In order to identify p60, the antigen targeted by AECA positive SLE sera, the polyacrylamide gel band corresponding to the position of the reactive EC surface antigen was excised, subjected to tryptic digestion, and analyzed by mass spectrometry. The candidate with the highest percentage of peptide coverage was human hsp60. To confirm that human hsp60 was the relevant antigen, immunoblots were performed in parallel on HUVEC lysates and pure recombinant human hsp60. Figure 3 shows that AECA positive SLE sera, anti-hsp60 antibodies affinity-purified from AECA positive SLE sera, and commercially available anti-hsp60 antibodies all reacted with both p60 in HUVEC lysates and pure hsp60, whereas control serum, AECA negative SLE sera and control human IgG did not recognize these proteins. These findings demonstrate that AECA positive SLE sera contain antibodies directed against hsp60 and that these antibodies recognize p60 in HUVEC lysates.

*Hsp60 is present at the surface of HUVEC*

Although hsp60 is generally considered an intracellular chaperone polypeptide, HUVEC in culture have been shown to express hsp60 at their surface (17). This is



attributable to a basal level of stress due to the *in vitro* culture conditions. Expression of surface hsp60 in our HUVEC cultures was confirmed on non-permeabilized (PI-negative) cells by flow cytometry, using a commercially available anti-hsp60 serum. Surface-stained cells increased from 5.17% with control serum to 77.2% with anti-hsp60 serum (Fig. 4a, lower right quadrants), thus confirming the presence of hsp60 at the HUVEC surface. Intracellularly-stained cells increased in parallel from 3.94% to 8.55% (Fig. 4a, upper right quadrants), probably due to penetration of antibodies and their binding to cytoplasmic hsp60. Anti-hsp60 antibodies were affinity-purified from 7 SLE sera that displayed the strongest reactivities against hsp60 on blots. These affinity-purified anti-hsp60 IgGs bound to non-permeabilized (PI-negative) cells, i.e. the HUVEC surface, with a representative sample showing 45% positive cells over control human IgG with 3.46% positive cells (Fig. 4b, lower right quadrants). These results confirm that SLE sera contain hsp60-reactive AECA that can bind to hsp60 on the EC surface.

*Anti-hsp60 affinity-purified from SLE sera induce HUVEC apoptosis*

HUVEC were incubated with anti-hsp60 affinity-purified from SLE sera, to study their cellular effects. Our first experiments were conducted using cell staining with Hoechst/PI, to allow clear discrimination between normal, apoptotic and necrotic cells (16, 18). As shown in Fig. 5a, normal cells exclude PI and their nuclei are stained blue with Hoechst. Early apoptotic cells also exclude PI, but their nuclei

show an intense pycnotic blue-white fluorescence (arrows in Fig. 5a) due to chromatin condensation. Finally, necrotic cells stain red with PI, indicating loss of membrane integrity, with Hoechst-stained nuclei similar to those of normal cells. SLE anti-hsp60 antibodies were able to induce apoptosis, starting at 2h after treatment, in a time and dose-dependent manner (Fig. 5b). The percentage of apoptotic cells increased from 10 to 30% between 2 and 24 h. In contrast, control human IgG did not induce apoptosis under these conditions (data not shown).

To confirm this observation, we evaluated HUVEC for phosphatidylserine exposure, a well described and early marker of apoptosis (19), by staining cells with annexin V, an anionic phospholipid binding protein. Since annexin V will also bind to necrotic cells, as a result of the loss of membrane integrity, early apoptotic cells have to be differentiated from necrotic cells using PI staining. As shown in Fig. 6a, there is a striking increase in annexin V positive/ PI negative cells in the anti-hsp60 treated sample versus the untreated one (6.04 to 26.49%, respectively). Cells eventually become permeable during late apoptosis which can explain the increase in double positive cells (10.72 to 42.36%). Nevertheless, we have considered only annexin V positive / PI negative cells to quantitate apoptosis in Fig. 6b, thus probably underestimating the number of apoptotic cells induced by anti-hsp60 treatment. Annexin V positive cells increased strikingly from 10 to ~35%

after treatment with 100 ng/ml ( $P = 0.0024$ ) or 200 ng/ml ( $P = 0.0017$ ) of anti-hsp60 antibodies in a dose-dependent manner (Fig. 6b).

In order to confirm that apoptosis was due to SLE anti-hsp60, HUVEC were treated with 100 ng/ml of IgG from 4 AECA negative SLE sera for 24 h, a representative example of which is shown in Fig. 6c (bottom left panel). Very few, if any, annexin V positive cells were detected in comparison with SLE anti-hsp60 treated cells (Fig. 6c, upper left panel). Prior treatment of SLE anti-hsp60 with Polymyxin-B did not diminish their ability to induce apoptosis (Fig. 6c, compare upper right and left panels), thereby eliminating the possibility that apoptosis was caused by contaminating endotoxins. Finally, preincubation of affinity-purified anti-hsp60 with 50  $\mu$ g of hsp60 abolished the induction of apoptosis (Fig. 6c, lower right panel), demonstrating the antigen specificity of the induction. A dose-dependent inhibition by hsp60 on the induction of apoptosis by SLE anti-hsp60 is shown in Figure 6d. Together, these results confirm that binding of SLE anti-hsp60 antibodies induces apoptosis in HUVEC, including anionic phospholipid externalization.

### *Frequency of anti-hsp60 in SLE patients, normal and disease controls*

To further explore the distribution of anti-hsp60 in patients with SLE and other autoimmune diseases, we determined by ELISA the titers of anti-hsp60 IgG in sera from SLE patients, normal individuals and disease controls (Fig. 7). Only the SSc cohort showed a significant difference ( $P < 0.05$ ) from the normal population by Dunn's test. The interquartile range in normal controls was 0.045 to 0.669 and the latter OD value, corresponding to the 75<sup>th</sup> percentile, was used to define the cut-off for high titers of IgG anti-hsp60 (19). Using this cut-off value for positivity, high titers of anti-hsp60 were found in 26.1% ( $n=29/111$ ) of SLE patients and 26.6% ( $n=12/45$ ) of normal controls. Thus, the frequency and titers of IgG anti-hsp60 were similar in SLE patients and normal controls.

### *Anti-hsp60 and thrombosis in SLE patients*

We also examined the relationship between IgG anti-hsp60 and thrombosis in SLE patients. By chi-square analysis, the frequency of thrombosis was not significantly greater in patients with high titers versus low titers of IgG anti-hsp60 at diagnosis (Table 1a). To evaluate the potential combined effect of anti-hsp60 and aPL antibodies, the relationship between thrombosis, LAC and anti-hsp60 was analyzed by Fisher's exact test. Occurrence of thrombosis during followup was significantly more frequent in patients with both high titers of IgG anti-hsp60 and

LAC at first visit than in other patients (Table 1b). In contrast, patients with anti-hsp60, but no LAC, had a similar rate of thrombosis as patients with no anti-hsp60. Thus, using SLE serum samples obtained at first visit, a relationship was apparent between a high titer of anti-hsp60 IgG, LAC and occurrence of thrombosis during followup.

## Discussion

The presence of AECA has been correlated with vascular complications in several autoimmune diseases (reviewed in 4,5). Furthermore, there is growing evidence showing that these autoantibodies have profound effects on EC physiology such as apoptosis (6-8) or activation (9, 10). It is therefore important to define the target antigen(s) recognized by AECA positive SLE sera. We found that all SLE sera with AECA shared reactivity against a 60 kD HUVEC surface polypeptide, which was identified as hsp60 by mass spectrometry. Reactivity of SLE with both pure hsp60 and hsp60 in HUVEC lysates was confirmed by immunoblotting. There is ample evidence that hsp60 is expressed on the surface of stressed cells, a phenomenon that has been observed *in vitro* as well as *in vivo* (17, 20, 21). The presence of hsp60 on the surface of our HUVEC was confirmed by flow cytometry with monospecific anti-hsp60 antibodies, and also with affinity-purified SLE anti-hsp60. Thus, SLE anti-hsp60 have the capacity to bind to HUVEC surfaces. This study is the first to identify hsp60 as an antigenic target for AECA.

The next step was to determine the effects of anti-hsp60 binding on EC physiology. We found that incubation of HUVEC, from 2 to 24 h, with affinity-purified SLE anti-hsp60 induced apoptosis. Induction of apoptosis resulted both in phosphatidylserine exposure and chromatin condensation, and was caused by

SLE, but not control IgG. Although AECA induction of EC apoptosis has been reported for antibodies from patients with SSc (9, 10), this is the first study to show an apoptotic effect for AECA from SLE sera. EC apoptosis can have a major impact *in vivo* due to consequences on a complex array of interdependent events (reviewed in 22), such as IL-1 release (23,24), superoxide production (25), and expression of procoagulant properties (26). Moreover, apoptosis induces a cell membrane perturbation that is responsible for the recruitment of aPL at the cell surface. Indeed, aPL bind to apoptotic cells (3) which expose anionic phospholipids on their cell surface. Therefore, EC apoptosis induced by anti-hsp60 binding could be the initial event (i.e. the “first hit”) leading to aPL binding (the “second hit”), which would then trigger the thrombotic cascade characteristic of APS. This hypothesis is supported by our finding that the association of anti-hsp60 and LAC at the first visit significantly predicted an increased frequency of thrombosis during followup of these patients. However, occurrence of thrombosis in APS is characteristically unpredictable. The precise physiopathologic threshold required for anti-hsp60 to lead to thrombosis *in vivo* remains to be determined.

Our data show that anti-hsp60 IgG are not specific to APS or SLE. This is not surprising, given that hsps are highly conserved proteins (27). Indeed, common microbial pathogens can induce the development of anti-bacterial hsp65 antibodies, which may cross-react with the homologous human hsp60 expressed

on ECs (28). Furthermore, elevated levels of anti-hsp60 have been reported in coronary heart disease, myocardial infarction, stroke, hypertension and restenosis after angioplasty (reviewed in 29), suggesting that anti-hsp60 may be a risk factor for atherosclerosis in general. However, the molecular mechanism for the pathogenic role of anti-hsp60 in these events is still unknown. Importantly, there is a substantial increase in coronary heart disease and stroke in SLE patients that is not fully accounted for by traditional Framingham risk factors for atherosclerosis (30). Furthermore, it has been suggested that EC apoptosis could be implicated in a large proportion of cardiovascular diseases overall (22), including APS. It is tempting to speculate that diseases implicating perturbed EC function could share a common physiopathological pathway, which would start with infection, be followed by anti-hsp60 production, and eventually lead to EC apoptosis, thus providing one of the missing links between infection and autoimmunity.

In summary, this is the first study demonstrating that AECA from SLE sera can bind hsp60 at the EC surface and that this binding induces apoptosis. These findings may define a novel paradigm for the role of AECA in the pathophysiology of APS and the role of anti-hsp60 in EC injury.



## **Acknowledgments**

We thank Joyce Rauch, PhD, Marie-Josée Hébert, MD, and Pascal Reboul, PhD for generous contribution to this work through numerous discussions and critical reading of the manuscript, Marie Désy, MSc for assistance with biostatistical analysis; and Pierrette Rego for typing the manuscript. We are grateful to Mr. Fernand Locas and Mrs. Gisèle Sarrazin-Locas and to the Comité Fonds Sainte-Jeanne-d'Arc of the Dollard-Cormier Foundation for their generous donations in support of our laboratory. Special thanks are due to Stressgen Biotechnologies, Victoria, British Columbia, Canada, for providing hsp60 at a cost that enabled us to perform these studies.

## References

1. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite anti-phospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum.* 1999; 42:1309-1311.
2. Levine JS, Branch DW, Rauch J. The anti-phospholipid syndrome. *N Engl J Med.* 2002; 346:752-763.
3. Price BE, Rauch J, Shia MA, et al. Anti-phospholipid autoantibodies bind to apoptotic, but not viable, thymocytes in a  $\beta$ 2-glycoprotein I-dependent manner. *J Immunol.* 1996; 157:2201-2208.
4. Meroni PL, D'Cruz D, Khamashta M, et al. Anti-endothelial cell antibodies: only for scientists or for clinicians too? *Clin Exp Immunol.* 1996; 104:199-202.
5. Meroni PL, Del Papa N, Raschi E, et al. Anti-endothelial cell antibodies (AECA): from laboratory curiosity to another useful autoantibody. In *The decade of Autoimmunity*. Y. Shoenfeld, Ed. Elsevier Science, Amsterdam, Holland. 1998; 227-285.

6. Del Papa N, Guidali L, Sironi M, et al. Anti-endothelial cell IgG antibodies from patients with Wegener's granulomatosis bind to human endothelial cells in vitro and induce adhesion molecule expression and cytokine secretion. *Arthritis Rheum.* 1996; 39:758-766.
7. Blank M, Krause I, Goldkorn T et al. Monoclonal anti-endothelial cell antibodies from a patient with Takayasu arteritis activate endothelial cells from large vessels. *Arthritis Rheum.* 1999; 42:1421-1432.
8. Carvalho D, Savage CO, Black CM, et al. IgG anti-endothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. *J Clin Invest.* 1996; 97:111-119.
9. Bordron A, Dueymes M, Levy Y, et al. Anti-endothelial cell antibody binding makes negatively charged phospholipids accessible to anti-phospholipid antibodies. *Arthritis Rheum.* 1998; 41:1738-1747.

10. Bordron A, Dueymes M, Levy Y, et al. The binding of some human anti-endothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest.* 1998; 101:2029-2035.
11. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982; 25:1271-1277.
12. Senécal JL, Rauch J, Grodzicky T, et al. Strong association of autoantibodies to human nuclear lamin B1 with lupus anti-coagulant antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1999; 42:1347-1353.
13. Dieudé M, Senécal JL, Rauch J, et al. Association of autoantibodies to nuclear lamin B1 with thromboprotection in systemic lupus erythematosus: lack of evidence for a direct role of lamin B1 in apoptotic blebs. *Arthritis Rheum.* 2002; 46:2695-2707.
14. Chapdelaine P, Vignola K, Fortier MA. Protein estimation directly from SDS-PAGE loading buffer for standardization of samples from cell lysates or tissue homogenates before Western blot analysis. *Biotechniques* 2001; 31:478-482.

15. Wong C, Sridhara S, Bardwell JC, et al. Heating greatly speeds Coomassie blue staining and destaining. *Biotechniques* 2000; 28:426-428.
16. Raymond MA, Mollica L, Vigneault N, et al. Blockade of the apoptotic machinery by cyclosporin A redirects cell death toward necrosis in arterial endothelial cells: regulation by reactive oxygen species and cathepsin D. *FASEB J.* 2003; 17:515-517.
17. Schett G, Xu Q, Amberger A, et al. Autoantibodies against heat shock protein 60 mediate endothelial cytotoxicity. *J Clin Invest.* 1995; 96:2569-2577.
18. Tokunou T, Shibata R, Hisashi K, et al. Apoptosis induced by inhibition of cyclic AMP response element-binding protein in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2003; 108:1246-1252
19. Schlegel RA, Williamson P. Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death Differ.* 2001; 8:551-563.
20. Xu Q, Schett G, Seitz CS, et al. Surface staining and cytotoxic activity of heat-shock protein 60 antibody in stressed aortic endothelial cells. *Circ Res* 1994; 75:1078-1085.

21. Hochleitner BW, Hochleitner EO, Obrist P, et al. Fluid shear stress induces heat shock protein 60 expression in endothelial cells in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:617-623.
22. Stefanec T. Endothelial apoptosis: could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease? *Chest* 2000; 117:841-854.
23. Lemaire S, Lizard G, Monier S, et al. Different patterns of IL-1 beta secretion, adhesion molecule expression and apoptosis induction in human endothelial cells treated with 7 alpha- hydroxycholesterol, 7 beta-hydroxycholesterol, or 7-ketocholesterol. *FEBS Lett* 1998; 440:434-439.
24. Hébert MJ, Gullans SR, Mackenzie HS, et al. Apoptosis of endothelial cells is associated with paracrine induction of adhesion molecules: evidence for an interleukin-1 beta-dependent paracrine loop. *Am J Pathol.* 1998; 152:523-532.
25. Cai J, Jones DP. Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome C loss. *J Biol Chem.* 1998; 273:11401-11404.

26. Bombeli T, Karsan A, Tait JF, et al. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* 1997; 89:2429-2442.
27. Morimoto RI. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 1993; 259:1409-1410.
28. Mayr M, Metzler B, Kiechl S, et al. Endothelial cytotoxicity mediated by serum antibodies to heat shock proteins of *Escherichia coli* and *Chlamydia pneumoniae*: immune reactions to heat shock proteins as a possible link between infection and atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99:1560-1566.
29. Xu Q. Role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22:1547-1559.
30. Esdaile JM, Abrahamowicz M, Grodzicky T, et al. Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2001; 44:2331-2337.

### Figure legends

**Figure 1. IgG from SLE sera bind to the surface of HUVEC.** Flow cytometry analysis of the binding of IgG (400 ng/ml) purified from representative control and SLE sera on intact HUVEC stained with propidium iodide (PI) vital dye.

**Figure 2. AECA positive sera recognize a 60kD endothelial surface protein.** Immunoblots of surface proteins (45  $\mu$ g) detected with 4 AECA positive SLE sera (lanes 1-4), an AECA negative SLE serum (lane 5) and a control serum (lane 6). Total (25  $\mu$ g; T) and surface (L) proteins were stained with Coomassie blue.

**Figure 3. Affinity-purified SLE anti-hsp60 recognize hsp60 in HUVEC lysates and pure hsp60.** Immunoblots of HUVEC lysates (45  $\mu$ g) and hsp60 (100 ng) detected with control serum, AECA negative or positive SLE serum, murine monoclonal IgG1 control or anti-hsp60, human IgG control, affinity-purified SLE anti-hsp60, normal rabbit serum or anti-hsp60.

**Figure 4. Affinity-purified SLE anti-hsp60 recognize hsp60 exposed at the HUVEC surface.** Flow cytometry of the binding of rabbit anti-hsp60 (bottom left panel) or SLE anti-hsp60 (bottom right panel), compared to controls (rabbit serum



and human IgG control, upper panels, respectively) on HUVEC stained with PI vital dye.

**Figure 5. SLE anti-hsp60 induce apoptosis in a time and dose dependent manner.** a) Representative examples of Hoechst/PI staining of untreated, apoptotic and necrotic positive controls, and SLE anti-hsp60 treated HUVEC, with arrows pointing to apoptotic cells. b) Apoptotic HUVEC were detected with Hoechst/PI staining after treatment with affinity-purified SLE anti-hsp60 for the indicated times. Bars show percent (%) apoptosis at 20 ng/ml (empty bars) or 200 ng/ml (filled bars) IgG at each time point, with the corresponding vehicle data subtracted from each result. For each result, a P value was computed against untreated cells (\*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ ). (Error bars = SD).

**Figure 6. SLE anti-hsp60 induce phosphatidylserine exposure at the HUVEC surface.** a) Detection of annexin V binding by flow cytometry on HUVEC treated for 16 h with 0-200 ng/ml of affinity-purified SLE anti-hsp60. b) Percentage of annexin V positive cells after treatment with varying concentrations of affinity-purified anti-hsp60. Results are representative of 3 independent experiments. (Error bars = SD). c) Detection of annexin V binding by flow cytometry on HUVEC treated during 24 h with 100 ng/ml of affinity-purified SLE anti-hsp60, polymyxin-B treated anti-hsp60, IgG from AECA negative SLE serum, affinity-purified SLE anti-

hsp60 preincubated with 50 µg of hsp60. d) Percentage of annexin V positive cells after treatment with affinity-purified SLE anti-hsp60 preincubated with varying amounts of hsp60.

**Figure 7. Distribution of anti-hsp60 in SLE patients versus normal and disease controls by ELISA using hsp60.** The median is indicated by bars. The dotted line indicates the cut-off value for high titers of IgG anti-hsp60 and corresponds to the 75<sup>th</sup> percentile (OD=0.669) of the normal group. Disease controls included systemic sclerosis (SSc), rheumatoid arthritis (RA), autoimmune hepatitis (AH), osteoarthritis (OA), and ankylosing spondylitis (AS).

**Table 1. Frequency of thrombosis according to the presence of (a) anti-hsp60 alone or (b) anti-hsp60 in combination with LAC in 111 SLE patients\***

a	Thrombosis** (n)		Frequency of thrombosis (%)
	Yes	No	
Anti-hsp60 +	10	14	41.6
Anti-hsp60 -	27	60	31

b	Thrombosis*** (n)		Frequency of thrombosis (%)
	Yes	No	
Anti-hsp60 +, LAC+	4	1	80
Anti-hsp60 -, LAC+	11	12	47.8
Anti-hsp60 +, LAC-	6	13	31.6
Anti-hsp60 -, LAC-	16	48	25

\*LAC= lupus anticoagulant antibodies; SLE= systemic lupus erythematosus

\*\*P= 0.4632 by chi-square test for independence

\*\*\*P= 0.028 by Fisher's exact test

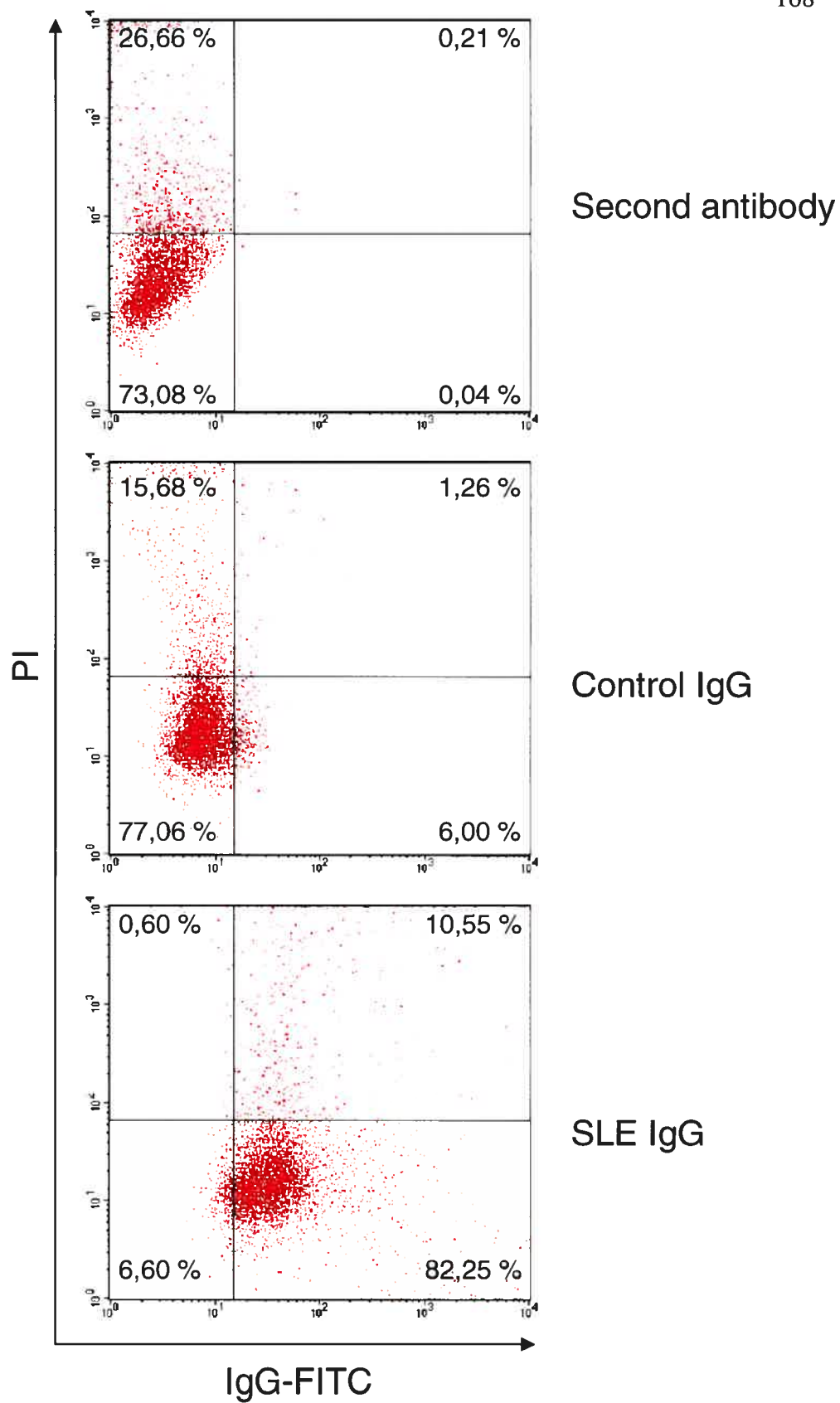


Figure 1

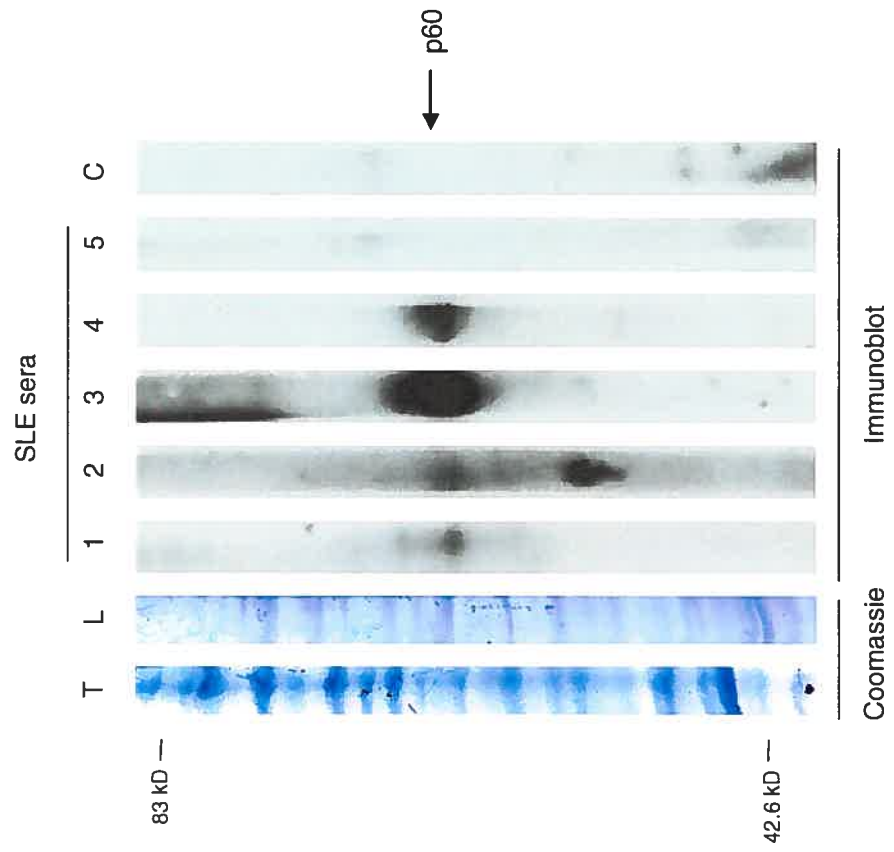


Figure 2

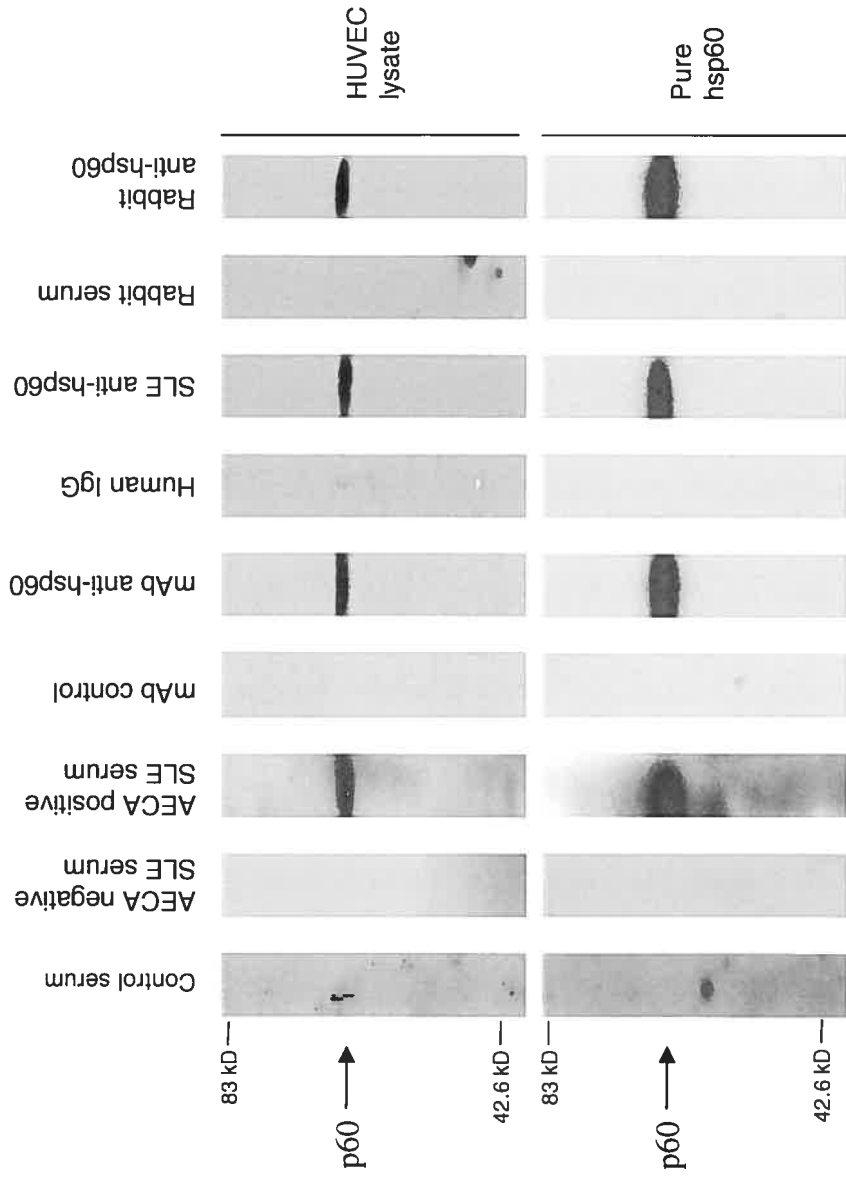


Figure 3

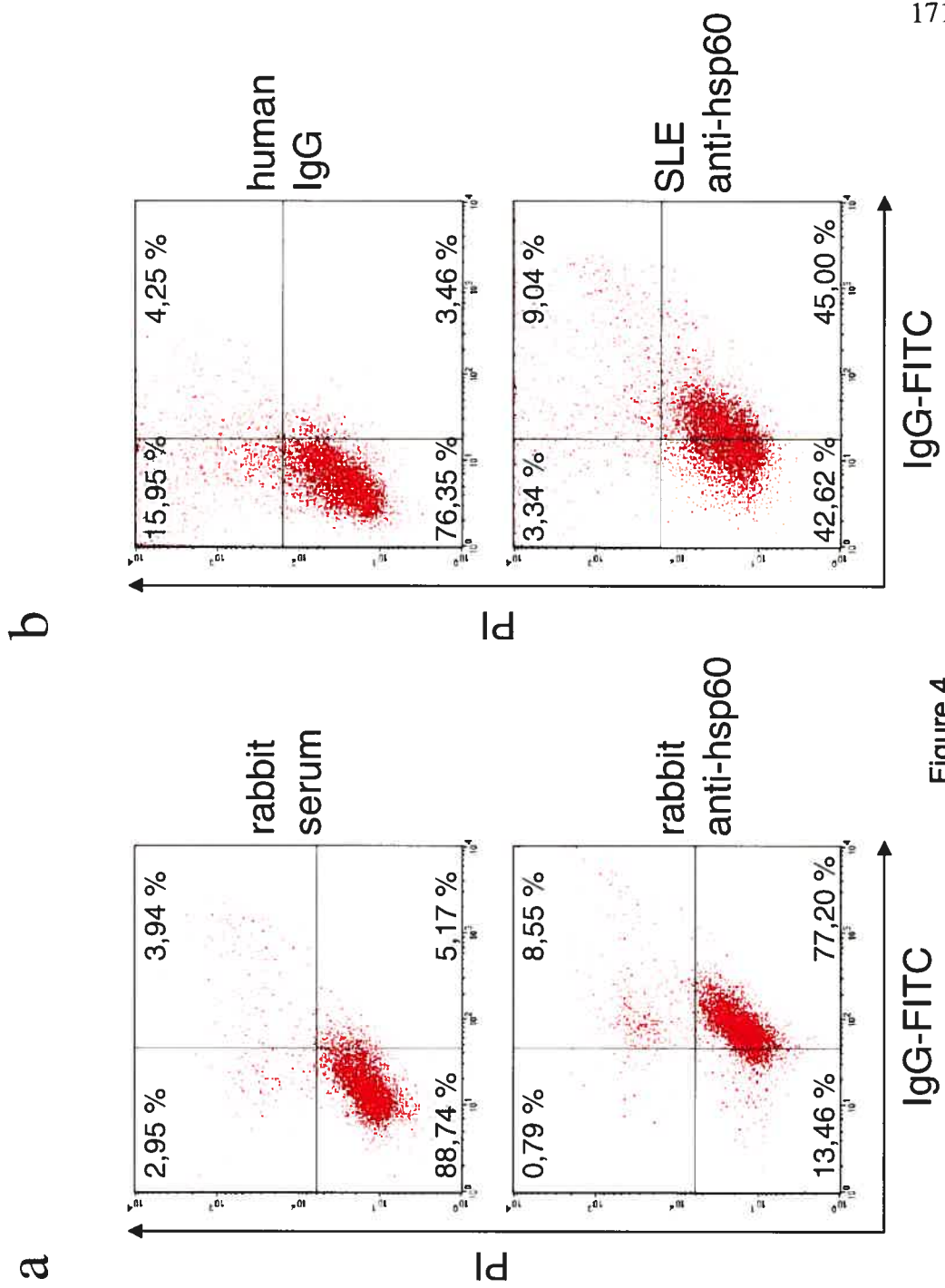
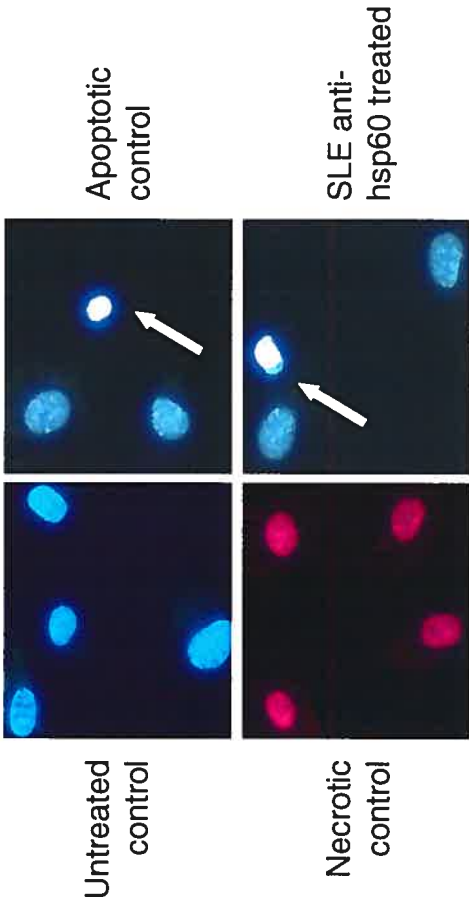
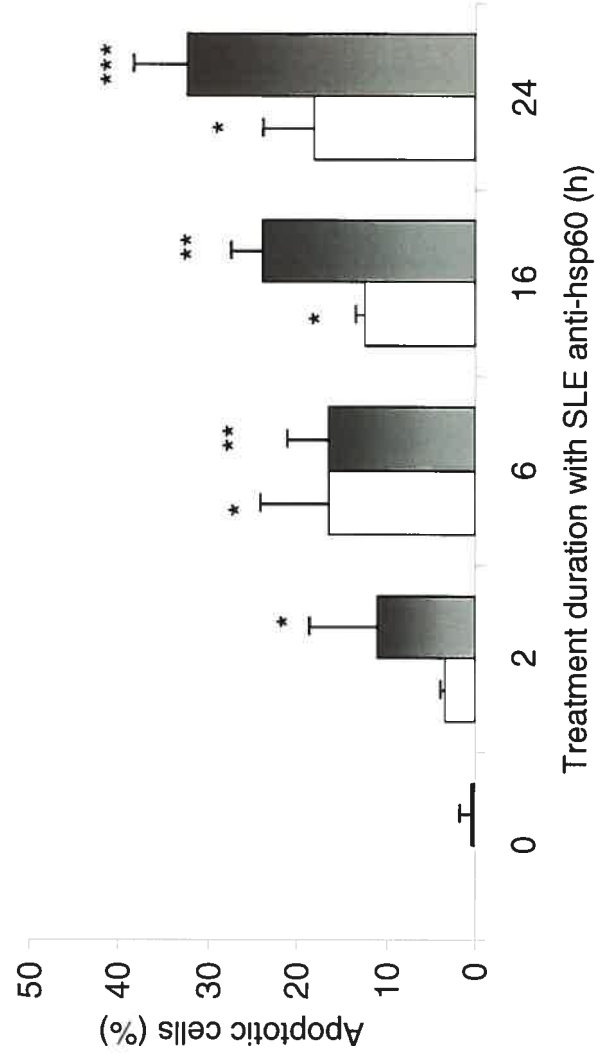


Figure 4



a



b

Figure 5



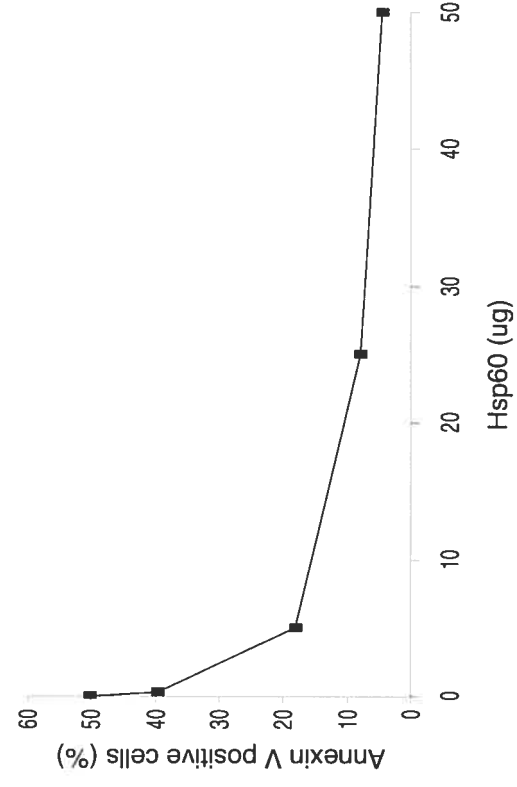
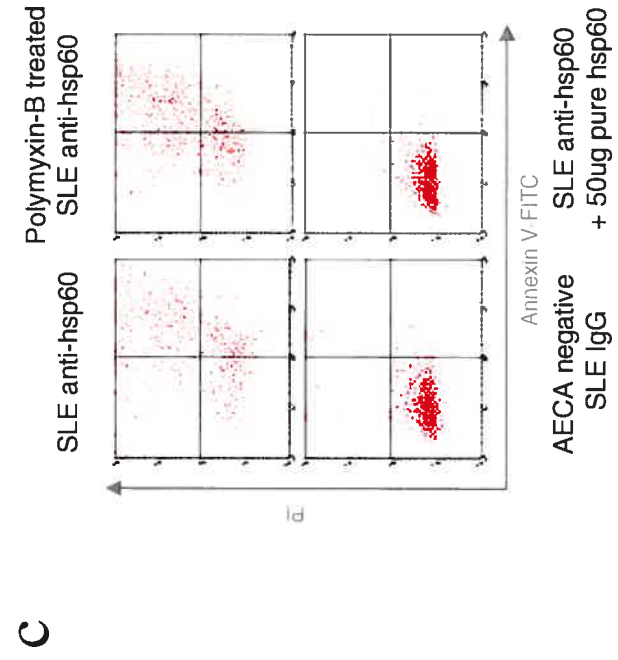
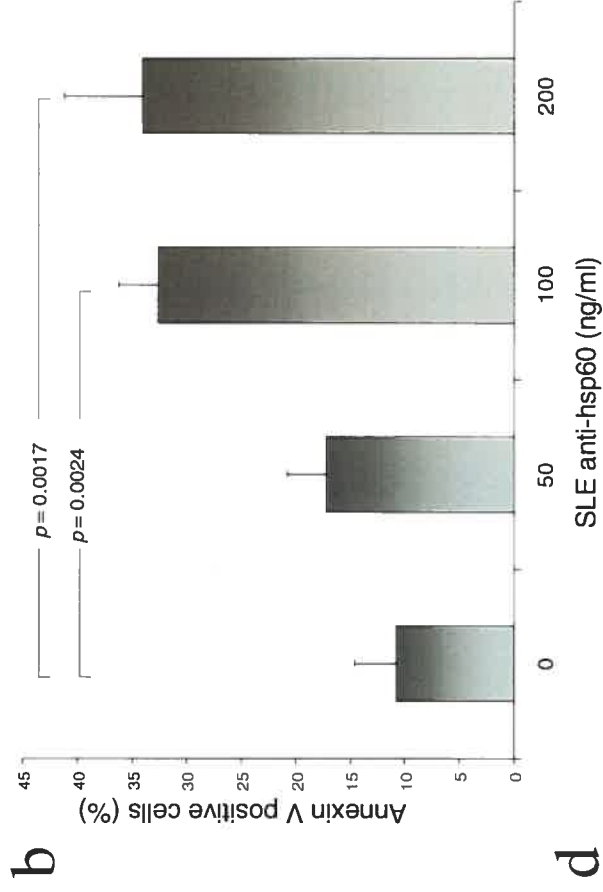
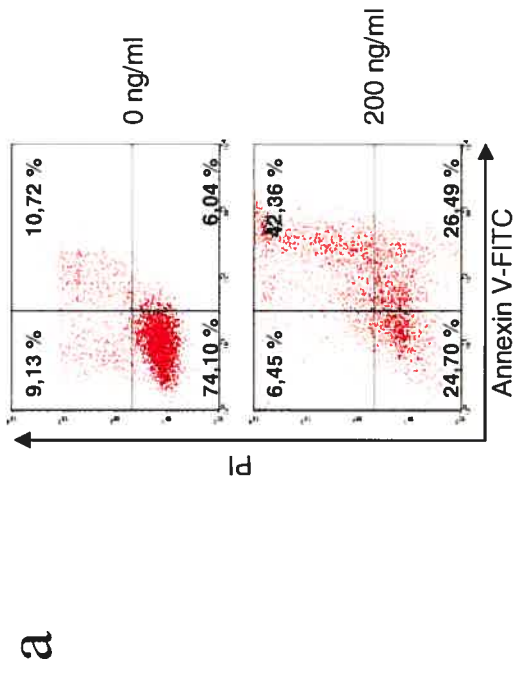


Figure 6

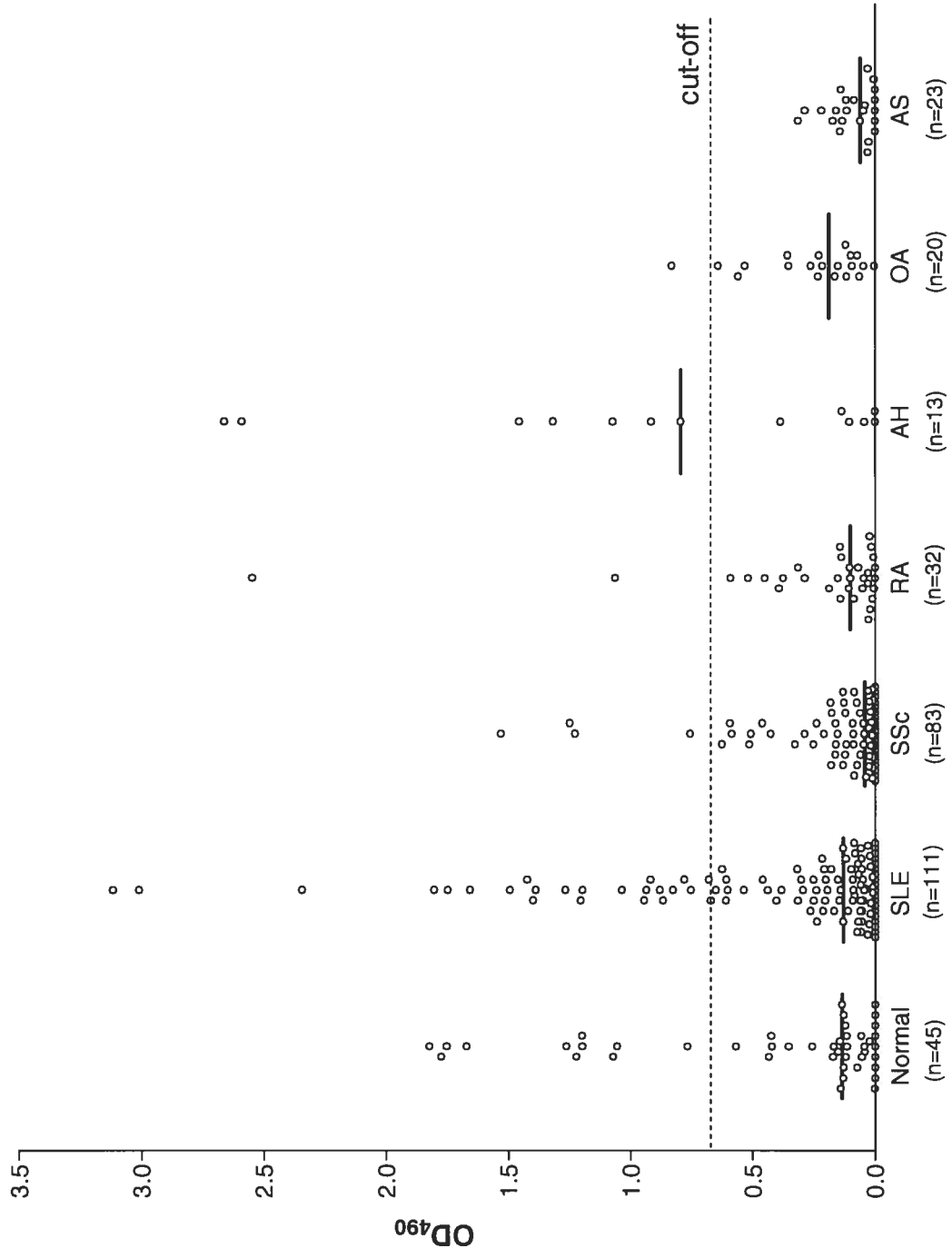


Figure 7

## Discussion

Cette thèse avait pour buts : l'étude des auto-anticorps antilamine B1 (aLB1) et anti-cellules endothéliales (AACE), de leur implication dans les mécanismes thrombogènes chez les patients atteints du LED et de l'identification de marqueurs pouvant faciliter le pronostic. Cette discussion met en perspective les résultats de ces études et propose quelques hypothèses pathophysiologiques. L'étude portant sur les aLB1 sera analysée avant celle s'intéressant aux AACE.

## **1. L'étude des antilamine B1**

Nous avons démontré l'association entre la présence des aLB1 chez les patients souffrant du LED et la protection contre la thrombose ou thromboprotection, dans une grande étude multicentrique. Cette approche a permis de démontrer que le rôle protecteur des aLB1 est lié à la présence de LAC. En effet, la présence des aLB1, à la première évaluation du patient, élimine le risque prothrombotique élevé qui est associé aux LAC. Jusqu'à maintenant l'auto-anticorps aLB1 est le seul marqueur associé à un meilleur pronostic pour les patients souffrant du LED.

Pour expliquer le mécanisme thromboprotecteur associé aux aLB1, nous avons émis l'hypothèse que les aLB1 bloquent l'effet procoagulant des blebs apoptotiques en se liant à la lamine B1 exposée à leur surface externe.

Cependant, nous avons découvert que l'antigène lamine B1 est séquestré à l'intérieur des blebs et n'est pas accessible aux aLB1 circulants.

## **1.1 Auto-immunité protectrice**

A notre connaissance, il n'existe aucun autre exemple d'auto-anticorps associé à une protection contre la thrombose. Cependant, certains auto-anticorps associés à des rôles protecteurs ont été regroupés sous le thème de l'auto-immunité protectrice, dont voici deux exemples.

### **1.1.1 La neuroprotection par les auto-anticorps**

Dans un modèle de blessure du nerf optique chez le rat, accompagnée de contusions à la colonne vertébrale, il a été observé qu'une réponse immunitaire contrôlée et bénéfique ralentissait la propagation du dommage post-traumatique. Cette réponse immunitaire médiée par les cellules T était dirigée contre des protéines du système nerveux central ou des peptides dérivés de ces protéines (Schwartz et al.,2000). Les auto-anticorps produits lors de cette réponse auto-immune étaient associés à un effet protecteur sur les neurones du système nerveux central (Moalem et al., 1999). Cependant, cette réponse est trop faible pour être efficace. La stimulation de cette réponse auto-immune chez les patients

ayant subi un traumatisme au niveau du système nerveux central serait une voie thérapeutique à envisager (Schwartz et al., 2001 ; Hauben et al., 2003).

### **1.1.2 La protection contre les parasites par les auto-anticorps**

La protection contre les parasites ne serait pas possible sans la costimulation d'une réponse immunitaire dirigée contre les érythrocytes ou 'erythrocyte binding proteins' (Daniel-Ribeiro et al., 2000). Le développement intra-érythrocytaire de *Plasmodium* donnerait lieu à l'altération de la membrane des globules rouges ou à la liaison de nouvelles protéines à leur surface. L'expression de néo-antigènes qui en résulterait mènerait au bris de la tolérance et à la production d'auto-anticorps anti-érythrocytes. Ces auto-anticorps détruiraient les érythrocytes parasités ou bloqueraient leur adhésion aux cellules endothéliales, diminuant ainsi les chances de propagation du parasite.

À ce jour, la réaction auto-immune dirigée contre la lamine B1 est la seule à être associée à la thromboprotection mais elle fait partie de la famille grandissante des réactions auto-immunes protectrices.

## **1.2 La lamine B1 séquestrée à l'intérieur des blebs apoptotiques : un phénomène universel**

Notre hypothèse selon laquelle les aLB1 bloqueraient l'effet procoagulant des blebs apoptotiques en se liant à la lamine B1 exposée à leur surface externe n'a pas été confirmée. En effet, en utilisant des critères biochimiques et morphologiques, nous avons montré que la lamine B1, contrairement à la plupart des auto-antigènes étudiés comme SSA/Ro et SSB/La, n'est pas présente à la surface des blebs apoptotiques mais reste enfouie à l'intérieur des blebs. Ainsi, l'antigène lamine B1 n'est pas disponible pour les aLB1 circulants.

La redistribution apoptotique de la lamine B1 a été étudiée dans deux types cellulaires : les cellules lymphocytaires Jurkat et les cellules endothéliales HUVEC. Les cellules Jurkat ont été employées car elles constituent le modèle cellulaire classique pour les études de l'apoptose. Les cellules endothéliales, quant à elles, ont été utilisées pour leur pertinence biologique, puisque elles jouent un rôle de premier plan dans les mécanismes thrombotiques. Dans ces deux types cellulaires, nous avons démontré que la lamine B1 était redistribuée dans les blebs apoptotiques mais qu'elle était séquestrée à l'intérieur de ces structures.

Nous avons aussi étudié l'effet des deux grandes voies apoptotiques sur la localisation de la lamine B1 en apoptose. Ainsi, les Jurkat et les HUVEC ont été induites en apoptose à l'aide d'un anticorps anti-Fas déclenchant la voie des récepteurs de mort cellulaire ou avec la staurosporine, un inhibiteur de la protéine kinase C, qui déclenche la voie apoptotique mitochondriale. Nous avons montré que, peu importe la voie apoptotique, la redistribution de la lamine B1 était la même.

Il est d'intérêt de souligner que récemment, dans un commentaire sur notre article (Clancy et al., 2003), l'équipe de Clancy et Buyon a confirmé notre découverte en l'appliquant à un autre type cellulaire, les cardiomyocytes impliqués dans le bloc cardiaque congénital. En outre, dans ce modèle, l'apoptose a été déclenchée par deux autres inducteurs : la 2,3-diméthoxy-1, 4-naphthoquinone et le poly-(2-hydroxyéthylméthacrylate). Dans les deux cas, la localisation apoptotique de la lamine B1 à l'intérieur des blebs a donc été confirmée.

Tous ces résultats suggèrent que la redistribution apoptotique de la lamine B1 est un phénomène universel et indépendant de la voie apoptotique déclenchée et du type cellulaire étudié.



### **1.3 Les implications de la non-accessibilité de la lamine B1**

Nous avons émis l'hypothèse que les aLB1 bloquaient l'effet procoagulant des blebs en se liant à leur surface. Cette hypothèse impliquait que la lamine B1, comme plusieurs auto-antigènes, doit être exprimée à la surface de ces structures apoptotiques. Or, nous avons démontré que la lamine B1 était séquestrée à l'intérieur des blebs et donc inaccessible pour les aLB1 circulants. Puisque ces résultats ne confirment pas notre hypothèse de départ, ils fournissent des informations très intéressantes.

Les blebs apoptotiques sont une cible importante pour plusieurs auto-anticorps. Étudions par exemple le cas des auto-anticorps anti-SSA/Ro et anti-SSB/La qui sont associés au bloc cardiaque congénital. Il a été montré que les auto-antigènes SSA/Ro et SSB/La étaient exprimés à la surface des cardiomyocytes apoptotiques et que les auto-anticorps correspondants pouvaient lier la surface de leurs blebs apoptotiques (Miranda-Carus et al., 2000). De plus, la liaison des anticorps anti-SSA/Ro et SSB/La résultait en une opsonisation médiant le déclenchement d'une réaction inflammatoire, un phénomène important dans la pathogénèse du bloc cardiaque congénital. Ceci est un exemple convaincant de l'importance pathogénique de l'expression de surface des auto-antigènes.

Dans le cas de la lamine B1, par contre, nous pouvons penser que l'élimination physiologique des cellules apoptotiques se produit sans conséquence inflammatoire en présence des aLB1 circulants, puisque l'antigène est inaccessible. Si le trafic intracellulaire des antigènes durant l'apoptose diffère d'un antigène à l'autre, cela peut aider à expliquer la spécificité d'un anticorps par rapport à un autre dans une pathologie donnée. Ainsi, la localisation des auto-antigènes au niveau apoptotique est cruciale et peut donner des indices importants sur l'implication de certains anticorps dans les processus pathogéniques.

#### **1.4 Prédicibilité de la localisation apoptotique des auto-antigènes**

Ces résultats soulèvent l'importante question de la prédictibilité de l'expression d'auto-antigènes à la surface versus l'intérieur des blebs. Autrement dit, pourquoi certains auto-antigènes sont-ils exprimés à la surface et d'autres pas? Il est possible que la localisation originale des auto-antigènes dans les cellules non-apoptotiques puisse nous fournir des éléments de réponse.

En effet, les auto-antigènes comme SSA/Ro et l'actine (Hansen et al., 2001) qui sont redistribués à la surface externe des blebs sont d'origine cytoplasmique. En outre, l'antigène SSB/La, aussi exprimé à la surface des blebs, possède une localisation nucléaire prédominante dans les cellules viables. Cependant, il fait aussi la navette entre le noyau et le cytoplasme, jouant un rôle dans la biogenèse

de l'ARN polymérase III (Prujin et al., 1997). Il a aussi été montré, par immunofluorescence, que SSB/La est exprimée de façon majoritaire mais non-exclusive dans le noyau des cellules non-apoptotiques (Miranda-Carus et al., 1998). Le peptide signal de SSB/La, qui lui permet de se réintroduire dans le noyau, est clivé durant l'apoptose précoce, causant l'accumulation de SSB/La dans le cytoplasme (Ayukawa et al., 2000). Donc, SSB/La est un auto-antigène d'origine nucléaire non-exclusive qui s'accumule dans le cytoplasme des cellules apoptotiques.

Par contre, la lamine B1 est une composante majeure de la lamina nucléaire qui est ancrée à la membrane nucléaire interne (Gruenbaum et al., 2000). Dans les cellules non-apoptotiques, la lamine B1 est exclusivement nucléaire, contrairement aux autres auto-antigènes mentionnés précédemment. Durant la mitose, le réseau de filaments de la lamine est désassemblé puis ré-assemblé et la lamine B1 reste associée avec des portions de la membrane nucléaire interne durant tout ce processus (Gerace et al., 1988). Durant l'apoptose, la lamine B1 est clivée par la caspase-6 tout en restant accrochée à la membrane nucléaire (Buendia et al., 1999). En immunofluorescence, nous observons que la lamine B1 est colocalisée avec une structure ressemblant à la membrane nucléaire et ce, même en apoptose tardive, dans les blebs s'étant détachés de la cellule. Il est donc possible que, lors du bourgeonnement des blebs, des morceaux de lamina ancrés à des portions de

membrane interne soient engouffrés dans les blebs en formation et se recircularisent lors du détachement final de la cellule originale. À la lumière de ces résultats, il est intéressant de souligner que le seul auto-antigène à être séquestré à l'intérieur des blebs est aussi le seul à être d'origine exclusivement nucléaire.

Nous émettons donc l'hypothèse que les auto-antigènes solubles, dont la localisation originale est cytoplasmique ou non-exclusivement nucléaire, ont le potentiel d'être relocalisés à la surface des blebs apoptotiques. Donc, ces auto-antigènes sont potentiellement accessibles pour la liaison avec leurs auto-anticorps circulants correspondants. Cette interaction pourrait vraisemblablement contribuer à la pathogénèse associée à auto-anticorps. Cependant, il est maintenant clair que ce mécanisme n'est pas universel et ne s'applique pas dans le cas des auto-antigènes insolubles d'origine nucléaire stricte, comme la lamine B1.

### **1.5 Les antilamine B1 : un épiphénomène?**

A l'heure actuelle, nous ne savons pas si les aLB1 sont directement responsables de la thromboprotection auxquels ils sont associés. Il est possible que les aLB1 ne soient pas responsables de la thromboprotection mais seulement associés à une variable thromboprotectrice. Cette question a été étudiée très attentivement dans une publication précédente qui décrivait l'association entre les LAC et les aLB1

chez 94 patients souffrant du LED (Senécal et al., 1999). La régression logistique multiple pas à pas (stepwise multiple logistic regression) a été utilisée afin d'identifier des variables associées à la présence des aLB1. Aucune association autre que le LAC n'a été dévoilée, excluant de ce fait l'âge, le sexe, la durée de la maladie, le traitement avec la prednisone et autres traitements immunosuppresseurs. Il est donc peu probable, mais non impossible, que des variables confondantes soient responsables de l'effet thromboprotecteur. Des recherches sont actuellement en cours dans notre laboratoire afin de trouver la cible antigénique des aLB1 pouvant nous éclairer sur leur mécanisme thromboprotecteur. L'emphase est mise sur l'étude du potentiel antigénique des facteurs solubles et cellulaires impliqués dans la thrombose et particulièrement celle médiée par le LAC, comme les plaquettes et les cellules endothéliales.

### **1.6 Immunogénicité versus antigénicité de la lamine B1 dans les blebs apoptotiques**

Nos résultats suggèrent que la lamine B1 retrouvée dans les blebs n'est pas la cible antigénique des aLB1 circulants. Cependant, ces résultats n'excluent pas le rôle potentiellement immunogénique de la lamine B1 séquestrée dans les blebs.

Il est crucial de faire la distinction entre un immunogène et un antigène. Un immunogène est une substance pouvant provoquer une réponse immunitaire.

Tandis qu'un antigène est une substance à laquelle se lie un anticorps. Dans plusieurs réponses immunitaires, l'immunogène et l'antigène ne font qu'un.

Tel que mentionné dans l'introduction (section 2.2.6), les blebs apoptotiques peuvent être phagocytés par des cellules présentatrices d'antigènes. Leur composantes, particulièrement celles clivées durant l'apoptose, peuvent être ensuite présentées et constituer la source immunogénique pour la production des auto-anticorps correspondants. De plus, les auto-antigènes exprimés à la surface des blebs apoptotiques sont aussi une source antigénique pour les auto-anticorps circulants. Ainsi, un antigène comme SSB/La, exprimé à la surface apoptotique, peut servir à la fois d'immunogène pour la production d'anti-SSB/La et d'antigène pour ces auto-anticorps circulants.

Nos résultats suggèrent que le cas de la lamine B1 est un peu différent. La lamine B1 redistribuée lors de l'apoptose au niveau des blebs apoptotiques est possiblement l'immunogène, la substance qui engendre la production d'aLB1. Cependant, nous avons montré que la lamine B1 est séquestrée à l'intérieur des blebs et est donc inaccessible pour les anticorps circulants. De ce fait, la lamine B1 dans le blebs n'est probablement pas la cible antigénique des aLB1 circulants ou, à tous le moins pas celle expliquant leur effet thromboprotecteur.

### **1.7 L'origine des antilamine B1**

La présentation de la lamine B1 en association avec CMH de classe II approprié pouvant activer une réponse menant à la production d'aLB1 est sans doute le fruit d'une accumulation de critères de susceptibilité. Nous proposons ici quelques mécanismes qui joueraient un rôle dans l'apparition des aLB1 chez les patients souffrant du LED.

Nous avons observé que la lamine B1 est présente au niveau des vésicules apoptotiques. Une apoptose abondante et une élimination inefficace des cellules apoptotiques peuvent faire en sorte que ces blebs apoptotiques persistent anormalement dans la circulation. Cette persistance pourrait donc mener à un bris de tolérance vis-à-vis des constituants de ces structures comme la lamine B1.

Une variante au niveau du traitement des antigènes ou de la lamine B1 en particulier et le fait que cette protéine soit clivée durant l'apoptose pourrait engendrer des déterminants antigéniques cryptiques de la lamine B1. Ces antigènes cryptiques ou néoantigènes, n'ayant pas été identifiés comme antigènes du soi, peuvent déclencher une réaction auto-immune contre l'antigène original.

Une susceptibilité génétique menant à l'expression d'un CMH de classe II particulier, capable de lier intimement la lamine B1 ou ses déterminants, pourrait contribuer à sa présentation par les cellules présentatrices d'antigènes. La surexpression de molécules costimulatrices sur les cellules présentatrices d'antigènes peut être aussi critique pour l'activation des cellules T helper. Finalement, la production de molécules ou d'anticorps opsonisants pourrait aider à la phagocytose efficace des vésicules et provoquer la réponse immunitaire.

Le modèle du 'danger' pourrait aussi expliquer l'origine des antilamine B1. Selon ce modèle, une réponse immunitaire peut être induite par des signaux de 'danger' provenant de cellules lésées. Ces signaux sont des substances produites ou modifiées lors de la lésion cellulaire qui ne peuvent être émises par des cellules saines. Les 'Toll-like récepteurs' TLRs à la surface des cellules présentatrices d'antigènes entre autres peuvent capter ces signaux de danger et déclencher une réponse immunitaire contre ces substances du soi modifiées. Les TLRs ont été tout d'abord décrits comme étant des récepteurs pouvant induire une réponse immunitaire active grâce à la liaison d'un grand spectre de molécules étrangères tel le LPS. Cependant, il est maintenant connu que ces récepteurs peuvent aussi reconnaître des molécules du soi tels l'ADN et un produit de dégradation de l'hyaluron. Il est donc possible que ces TLRs puissent reconnaître la lamine B1



relâchée dans un milieu lésionnel et ainsi déclencher une réponse immunitaire menant à la production d'aLB1.

L'apparition chez un même individu et dans des conditions particulières de plusieurs événements tels que décrits ci dessus pourrait mener à l'apparition d'auto-anticorps tels les aLB1. Il est déjà clair que le LED et le SAP sont des maladies multifactorielles qui rassemblent plusieurs critères pour apparaître. La production d'anticorps aLB1 ne ferait donc pas exception à la règle.

## **2. Anti-cellules endothéliales (AACE)**

Un des objectifs de ma thèse était de déterminer si les AACE provenant du sérum des patients souffrant du LED pourraient être impliqués dans des mécanismes prothrombotiques. Nous avons identifié une des cibles antigéniques des AACE, la heat shock protein 60 (hsp60), et découvert que les anti-hsp60 pouvaient induire l'apoptose endothéliale. Voici une discussion sur les diverses implications de ces découvertes.

### **2.1 Cible antigénique des AACE**

La présence d'AACE a été rapportée dans de multiples maladies auto-immunes donc le LED et le SAP. Selon les études, jusqu'à 80% des patients dont la maladie est active possèdent des AACE. Cependant, les cibles antigéniques de ces

anticorps sont encore inconnues. Quelques antigènes des AACE ont été soupçonnés, dont la vimentine, la tubuline et la collagénase (Yazici et al., 2000) suite à leur isolement d'une librairie de cDNA sondée avec des anticorps monoclonaux humains AACE positifs. Aucun lien n'a cependant pu être établi entre la présence de ces anticorps et les effets pathogéniques reliés au AACE .

Tel que décrit dans l'introduction, la recherche sur les AACE est pénalisée par des méthodes de détection hétérogènes et non standardisées. Nous avons détecté la présence de AACE, dans le sérum des patients de notre cohorte, par l'étude de la liaison des IgG à la surface de HUVEC par cytométrie en flux. Cette technique permet l'exclusion des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire, grâce au marquage par l'iodure de propidium et exclut de ce fait les faux positifs dus au marquage intracellulaire. Le second avantage de cette technique est que chacune des cellules de l'échantillon est évaluée et un résultat provient de 10 000 à 20000 cellules viables. Ainsi, cette détection possède une grande spécificité conjugée à une grande sensibilité. De plus, nous avons vérifié la concordance de nos résultats par immunoblot en utilisant les protéines de surface biotinylées comme antigènes, ce qui réduit la possibilité de faux positifs dus à une réactivité contre un antigène intracellulaire.

Dans un échantillon représentatif de notre cohorte de patients souffrant du LED, 73 % des patients possédaient des AACE dans leur sérum prélevé à la première évaluation. Ces sérums possèdent une réactivité commune contre une protéine de la surface endothéliale de 60 kDa. Cette protéine a été identifiée par spectrométrie de masse comme étant la hsp60. La présence d'anti-hsp60 dans les sérums LED fut confirmée en purifiant les IgG par affinité sur la protéine recombinante pure et en testant la monoréactivité de ces anticorps par immunoblot sur la protéine pure et sur un lysat total de HUVEC. De plus, l'expression de surface de la hsp60 a été confirmée par la liaison à la surface des HUVEC d'un anticorps anti-hsp60 commercial et des anti-hsp60 de LED.

Ainsi, nous avons identifié pour la première fois une cible antigénique pour les AACE, soit la hsp60. Nous sommes conscients qu'il ne s'agit pas de la seule cible ni de la seule réactivité des sérums LED sur la surface endothéliale. Par immunoblot sur les protéines de surface purifiées de HUVEC, nous avons d'ailleurs observé que certains sera lupiques réagissaient contre d'autres protéines que celle à 60kDa (Figure 2, article no2) dont l'identité n'est pas encore connue.

La réactivité contre une protéine autour de 60kDa avait été notée chez certains patients atteints du SAP primaire (3/9 des patients testés) (Hill et al., 1998). Il est plausible qu'il s'agisse de la hsp60 mais l'identité de cette protéine n'avait

cependant pas été établie et ceci, pour plusieurs raisons. Premièrement, la technologie d'identification des protéines par spectrométrie de masse en était encore à ses premiers balbutiements et n'était pas facilement disponible. De plus, la découverte que cet antigène pouvait être exprimé à la surface endothéliale venait à peine d'être publiée (Soltys et al., 1997). Ainsi, la combinaison de l'utilisation d'une nouvelle technologie avec l'avancement des connaissances nous a permis de découvrir que la hsp60 humaine, exprimée à la surface endothéliale, peut constituer une cible antigénique pour les AACE présents dans le sérum de patients souffrant du LED.

## **2.2 L'antigène hsp60**

La hsp60 fait partie de la famille des protéines de stress. Ces protéines exercent plusieurs fonctions dont la cytoprotection, l'assemblage intracellulaire et le repliement protéique (Hightower et al., 1991). Elles sont ubiquitaires et représentent de 5 à 10% du contenu protéique total en conditions normales. Cette proportion peut augmenter jusqu'à 15% en conditions de stress (Pockley et al. 2002).

La hsp60 est, en conditions normales, une protéine intracellulaire. Récemment, il a été découvert que la hsp60 est aussi exprimée à la surface des cellules endothéliales humaines exposées à des stress comme les infections, la fièvre, le

stress oxydatif, l'hypertension ou la contrainte de cisaillement (shear stress)(Lamb et al., 2002). Il a été montré que des pathogènes bactériens peuvent stimuler les cellules hôtes à produire une grande quantité de hsp60 endogène et bactérienne (Kol et al., 1999).

Hsp60 est phylogénétiquement fortement conservée (95% d'homologie entre les bactéries et plus de 55% entre les bactéries et l'humain) (Wick et al., 2000). Ces protéines fortement conservées sont exprimées ou sécrétées par la plupart des bactéries dont *Chlamydia pneumoniae* et *Helicobacter pylori* et mycobactéries mais sont aussi présentes dans toutes les cellules humaines.

## **2.3 Origine des anti-hsp60**

La source immunogénique ainsi que le mécanisme menant à la production des anticorps anti-hsp60 sont encore inconnus. Cependant quelques hypothèses peuvent être soulevées, la plus plausible étant celle impliquant l'infection.

### **2.3 1 Hypothèse de l'infection**

Dans certaines situations, la réponse immunitaire dirigée contre les organismes pathogènes peut créer une réaction croisée contre des protéines humaines homologues de l'hôte. Ce phénomène, nommé mimétisme moléculaire, est possible lorsque qu'un agent infectieux contient un épitope qui ressemble

fortement à un épitope d'une protéine de l'hôte. Lorsqu'une réponse immunitaire est élaborée par l'hôte contre l'épitope étranger, cette réponse est aussi, par ricochet, dirigée contre l'épitope homologue de l'hôte. Les membres de la famille des protéines de stress, dont la hsp60, semblent impliqués dans ce genre de phénomène. Tel que décrit précédemment, hsp60 est très conservée et des protéines bactériennes possèdent de fortes homologues avec la protéine hsp 60 humaine. Ainsi, il est proposé que les anticorps dirigés contre la protéine bactérienne hsp65, produits suite à une infection, peuvent réagir aussi contre la hsp60 humaine par mimétisme moléculaire (Lamb et al., 2003). L'infection serait donc à l'origine de la production d'anti-hsp60.

### **2.3.2 Hypothèse de la réaction auto-immune suite à un stress**

La production d'anticorps anti-hsp60 pourrait aussi découler d'une réaction auto-immune dirigée contre la hsp60 humaine relâchée et/ou altérée lors d'un dommage tissulaire. En effet, le dommage tissulaire causé aux cellules par les UV permet le relâchement de protéines de stress (Schultz et al., 1993). Cependant, même si on ne peut exclure cette possibilité, peu de données appuient, à l'heure actuelle, cette hypothèse.

### **2.3.3 L'hypothèse de diversification antigénique intermoléculaire**

La diversification antigénique intermoléculaire 'intermolecular epitope spreading' de l'auto-immunité humorale contre des auto-antigènes a été décrite en détail pour

les antigènes Ro et La. La colocalisation de ces deux auto-antigènes dans les cellules apoptotiques est cruciale pour ce phénomène (Topler et al., 1995; Reynolds et al., 1996; McCluskey et al., 1998; Farris et al., 1999). Une réciprocity de diversification antigénique intermoléculaire a été récemment montrée entre l'antigène Ro et la protéine de stress Grp78. Ces deux antigènes sont colocalisés dans les cellules apoptotiques ainsi que dans les blebs (Casiola-Rosen et al., 1994). Il est suggéré que la diversification antigénique intermoléculaire entre Ro et la hsp Grp78 découle de leur colocalisation apoptotique. De plus, les protéines de stress dérivées de pathogènes sont des transporteurs efficaces de peptides et d'immunogènes protéiques. Ces complexes protéines de stress/antigènes possèdent le potentiel d'augmenter l'immunité contre l'antigène lié (Szue et al., 1996) de concert avec l'apparition d'une réponse dirigée contre la protéine de stress elle-même. En effet, les antigènes associés aux protéines de stress sont jusqu'à 400 fois plus immunogéniques que l'antigène seul (Suto et al., 1995). L'association potentielle entre Grp78 et Ro peut donner un indice sur l'importante immunogénicité d'un auto-antigène peu abondant tel que Ro.

Ce mécanisme de diversification antigénique intermoléculaire et d'immunogénicité serait applicable à d'autres protéines de stress, dont la hsp60. La localisation apoptotique de hsp60 pourrait nous donner une indication sur la validité de cette

hypothèse. De plus, une association entre les anti-hsp60 et d'autres auto-anticorps, tels les anti-Ro et -La soutiendrait cette théorie.

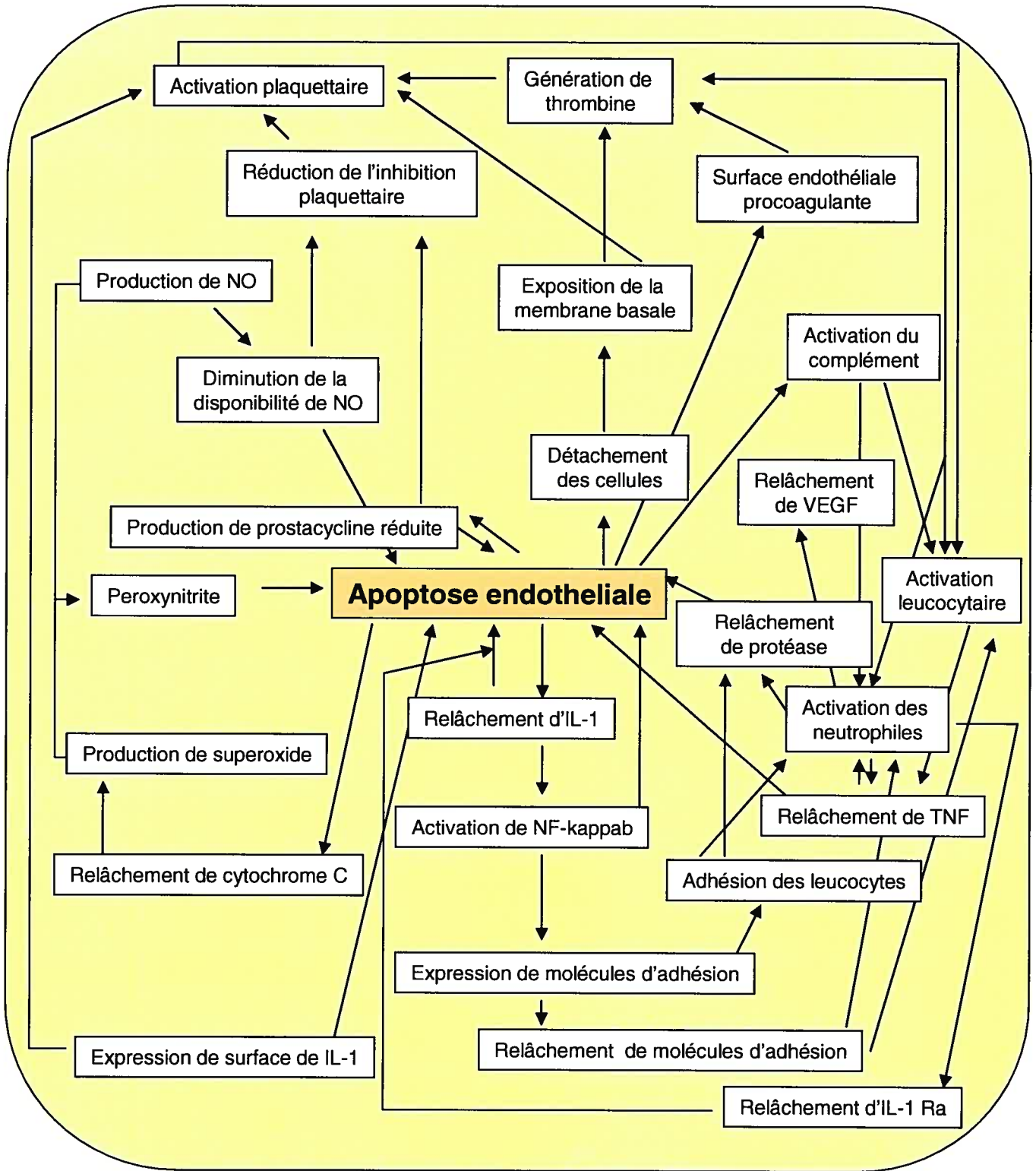
## **2.4 Conséquences générales de l'apoptose endothéliale induite par les anti-hsp60**

Nous avons montré que les anti-hsp60 purifiés par affinité à partir de sérums LED induisaient l'apoptose endothéliale. L'intégrité de l'endothélium et sa bonne fonction sont indispensables pour la préservation de la santé. Les  $1 \text{ à } 6 \times 10^{13}$  cellules de la monocouche endothéliale constituent un 'organe' d'approximativement 1kg chez un humain adulte. Ces cellules jouent un rôle primordial dans le contrôle du tonus vasculaire, de la perméabilité de l'endothélium, du flux sanguin, de la coagulation, de la thrombolyse, de l'inflammation, de la réparation tissulaire et de la croissance (Cines et al., 1998; Griedling et al., 1998). L'apoptose endothéliale induite par les anti-hsp60 pourrait donc entraîner toute une série d'événements pouvant avoir de nombreuses et importantes répercussions sur l'organisme.

Les changements associés à l'apoptose endothéliale sont enchâssés dans un réseau complexe d'événements interdépendants (Figure 7). Ces changements peuvent affecter plusieurs aspects de la fonction endothéliale et peuvent directement participer à certaines manifestations cliniques. Par exemple, les



propriétés normalement anticoagulantes de l'endothélium sont perdues durant l'apoptose, accélérant ainsi l'activation de facteurs de coagulation. La surface des cellules apoptotiques possède une activité procoagulante reliée à l'augmentation de l'expression du facteur tissulaire ainsi qu'une diminution de l'expression de surface de la thrombomoduline et de l'héparan sulfate (Bombeli et al., 1997). Une augmentation de la formation de thrombine par les cellules apoptotiques encore adhérentes ou détachées est observée. Les cellules endothéliales apoptotiques deviennent aussi proadhésives pour les plaquettes non-activées (Bombeli et al. 1999). Suite au détachement des cellules apoptotiques, la matrice sous-endothéliale devient exposée pouvant déclencher la voie de coagulation extrinsèque. De plus, les cellules apoptotiques peuvent activer les cellules endothéliales avoisinantes. Ces cellules activées augmentent l'expression de molécules d'adhésion à leur surface et sécrètent des cytokines qui promouvoient l'inflammation en recrutant des monocytes circulants au site de la dysfonction endothéliale.



**Figure 7: Changements associés à l'apoptose endothéliale (adapté de Stefanec, 2000)**

Le destin des cellules endothéliales apoptotiques est inconnu. Il a été observé, dans un modèle de rat, que des cellules apoptotiques étaient présentes dans le cytoplasme de cellules endothéliales voisines d'une lésion (Shimizu et al., 1997). De plus, il a été montré que certaines cellules endothéliales peuvent phagocyter des cellules apoptotiques mononucléées (Hess et al., 1997). Certaines cellules apoptotiques peuvent rester en circulation et servir ainsi de marqueur de dysfonction endothéliale. Ainsi, de récentes études rapportent qu'un nombre élevé de cellules endothéliales circulantes est associé à une dysfonction endothéliale, à la sévérité de la maladie, à la présence d'aPL et à l'hypocomplémentémie dans le LED (Rajagolapan et al., 2003).

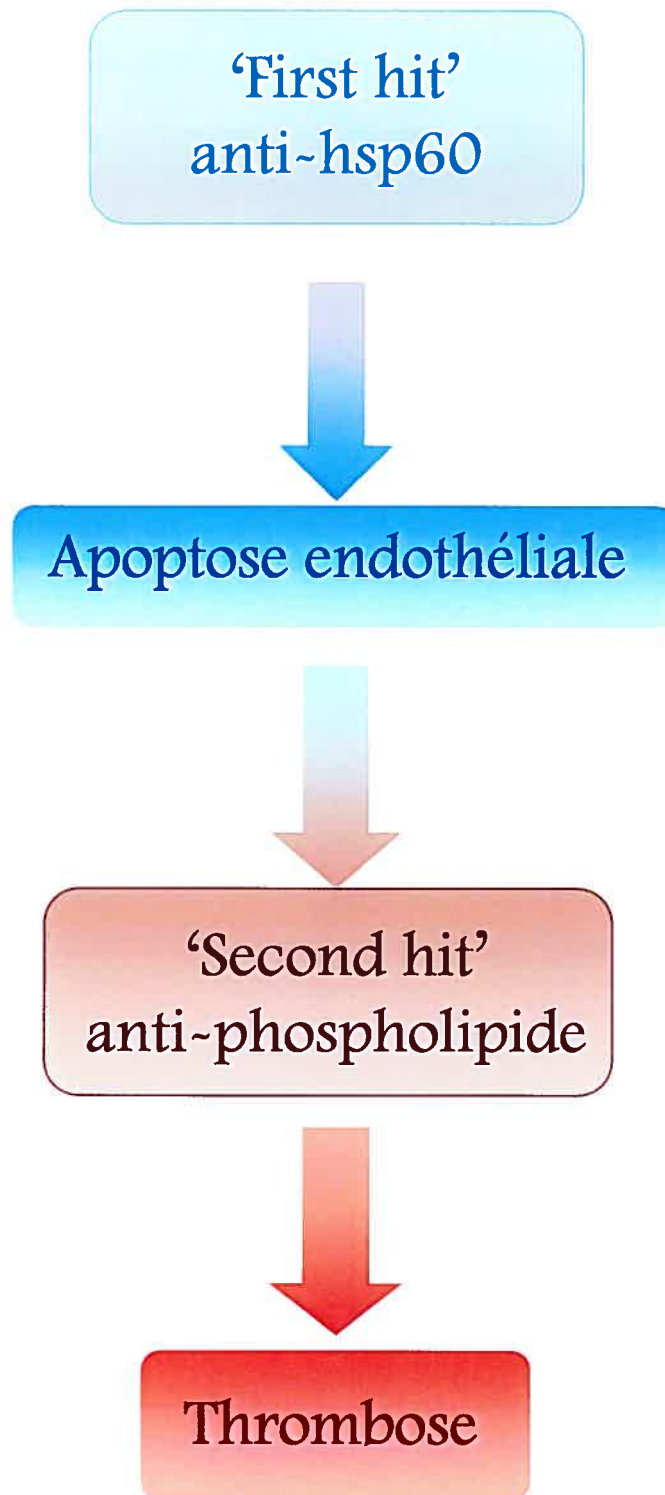
Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'apoptose endothéliale causée par les anti-hsp60 est à l'origine, *in vivo*, d'une dysfonction endothéliale créant un contexte procagulant, qui peut participer directement à des manifestations cliniques comme la thrombose.

## **2.5 Conséquences spécifiques à la présence d'aPL de l'apoptose endothéliale induite par les anti-hsp60**

Tel que décrit précédemment, l'apoptose endothéliale peut donner lieu à certaines manifestations cliniques. Or, pour les patients avec aPL, l'apoptose endothéliale est encore plus lourde de conséquences. L'exposition de PL anioniques à la

surface des cellules apoptotiques entraîne la liaison spécifique de protéines liant les phospholipides comme la  $\beta$ 2GP1 (Price et al., 1996). La liaison de la  $\beta$ 2GP1 génère un épitope reconnu par les aPL, ce qui peut expliquer leur liaison sélective sur la surface des cellules apoptotiques et non sur les cellules viables. Certaines études suggèrent aussi que des changements oxydatifs à la surface apoptotique contribuent à la reconnaissance des cellules apoptotiques par les aPL ainsi qu'à leur immunogénicité. Donc, pour un patient aPL positif, l'apoptose endothéliale induite par les anti-hsp60 provoque l'apparition d'une surface manifestant des propriétés antigéniques permettant le recrutement des aPL pathogéniques. De plus, les cellules apoptotiques ayant recruté les PLbp pourraient constituer une source immunogénique capable d'induire la production d'aPL (Rauch et al., 2000).

Tel que mentionné dans notre introduction, même si les aPL sont de puissants prédicteurs de thrombose, la moitié des patients les possédant ne font pas de thrombose. Ceci indique que la seule présence d'aPL est insuffisante pour induire la thrombose. De plus, une perturbation de la membrane cellulaire semble nécessaire au recrutement des aPL à la surface cellulaire. Nous proposons que l'apoptose endothéliale induite par les anti-hsp60 et la perturbation membranaire en découlant constituent le 'first hit' nécessaire au recrutement des aPL, 'le second hit', qui déclenche la cascade thrombotique (Figure 8).



**Figure 8 : La liaison des anti-hsp60 : l'événement primaire 'first hit' menant à la thrombose chez les patients souffrant du LES**

Nous avons étudié la fréquence de thrombose selon la présence d'anti-hsp60 chez les patients de notre cohorte LED. Nous avons montré que la présence d'anti-hsp60 seul n'était pas associée de façon significative à une augmentation des thromboses. Ainsi, les anti-hsp60 seuls et l'apoptose endothéliale en découlant sont insuffisants pour induire la cascade thrombotique chez les patients LED. Cependant, l'association des anti-hsp60 et des aPL LAC, dès la première visite, prédit de façon significative la fréquence de thrombose au cours du suivi des patients. Ces observations appuient l'hypothèse proposée par notre modèle. Ainsi, les facteurs anti-hsp60 (1<sup>er</sup> hit) ou aPL (2<sup>nd</sup> hit) séparés ne sont pas suffisants pour générer la cascade thrombogène aPL dépendante. Cependant, lorsqu'associés, ces deux facteurs permettent le déclenchement de la cascade pathophysiologique menant à la thrombose (Figure 8). Nous suggérons que l'induction de l'apoptose endothéliale par les anti-hsp60, chez un patient aPL positif, provoque l'apparition d'une surface possédant des propriétés antigéniques et immunogéniques, résultant en événements de coagulation pathologiques pouvant donner lieu à la thrombose et à la génération d'aPL.

## **2.6 Les anti-hsp60 ne sont pas spécifiques au LED : conséquences**

Nous avons montré que la présence des anti-hsp60 n'est pas spécifique aux patients souffrant du LED et que la distribution des titres d'anti-hsp60 est très similaire entre la population souffrant du LED et la population normale. De plus,

nous avons détecté des titres élevés d'anti-hsp60 dans des témoins souffrant de maladies auto-immunes ou inflammatoires.

En se basant sur l'hypothèse du mimétisme moléculaire décrite précédemment, l'observation que les anti-hsp60 ne sont pas spécifiques au LED n'est pas surprenante. En effet, les patients souffrant du LED sont, comme les contrôles normaux, susceptibles d'être infectés par des pathogènes et de développer une réaction immunitaire contre ces pathogènes et leurs constituants comme la hsp60.

Il est plausible que les anti-hsp60 retrouvés dans d'autres maladies et chez les normaux puissent induire l'apoptose endothéliale. Cependant ceci reste encore à être vérifié avec des anticorps anti-hsp60 purifiés à partir de sérums de diverses provenances.

On ne peut exclure, à ce stade, que les 'anti-hsp60 LED' possèdent une spécificité différente de celle des 'anti-hsp60 normaux' ou anti-hsp60 Sclérodermiques'. Il est possible que seul un sous-groupe d'anticorps dirigés contre certains épitopes de la hsp60 soient responsables de l'induction de l'apoptose endothéliale. La cartographie des épitopes reconnus par les anti-hsp60 de LED et d'autres origines pourrait être très informative. En plus de renseigner sur la spécificité des épitopes et des maladies, une telle étude pourrait donner des indices sur la voie d'induction

de l'apoptose par les anti-hsp60. Conjointement à ces expériences, des études *in vitro* utilisant divers inhibiteurs spécifiques de voies apoptotiques seraient intéressantes pour cerner le mécanisme moléculaire d'induction de l'apoptose par les anti-hsp60.

## **2.7 Maladies vasculaires et anti-hsp60**

Une littérature grandissante décrit la présence d'anti-hsp60 chez les patients souffrant de maladies vasculaires. Une association entre l'expression de hsp60, une réaction immunitaire contre la hsp60 humaine et l'induction d'une réponse inflammatoire a émergé de plusieurs études de l'athérosclérose et de ses complications associées, comme la maladie coronarienne, la maladie vasculaire périphérique et l'accident vasculaire cérébral (Pockley et al., 2002).

Un taux élevé d'anti-hsp60 a été associé avec la présence et la progression de maladies vasculaires. Ainsi, des taux élevés d'anti-hsp60 ont été détectés chez les patients souffrant d'athérosclérose carotidienne (Xu Q et al. 1993), de maladies coronariennes (Hoppichler et al., 1996), d'hypertension (Frostegard et al., 1997; Pockley et al., 2000) et de maladie vasculaire périphérique (Wright et al., 2000).



Dans le contexte des maladies vasculaires, la source immunogénique menant à la production des anti-hsp60 est encore inconnue. Cependant, l'infection serait là aussi la source immunogénique des anti-hsp60. A cause de la forte homologie entre les hsp60, une corrélation linéaire fortement significative entre les titres de sérum dirigés contre la hsp60 de source mycobactérienne, bactérienne ou humaine a été observée (Mayr et al., 1999). Cela suggère un dénominateur commun entre les différents agents infectieux qui sont souvent pointés du doigt comme cause possible du développement de l'athérosclérose. L'infection par *Chlamydia* est cependant la plus suspectée à cause du tropisme de cet agent infectieux envers les cellules endothéliales et de sa capacité de faire produire aux cellules infectées de la hsp60 bactérienne et endogène en grande quantité. Tel que discuté précédemment, il est maintenant connu que la hsp60 peut être exprimée à la surface des cellules endothéliales suite au stress oxydatif et à la contrainte de cisaillement. Les facteurs de risque de l'athérosclérose, tels l'hyperlipidémie, le diabète, la cigarette et l'hypertension, peuvent accentuer l'effet de tels stress (Liao et al., 2000). Finalement, l'immunisation avec des hsp exacerbe l'athérosclérose dans des modèles animaux. Par exemple, des lésions athérosclérotiques peuvent être induites par l'immunisation de lapin normocholestérolémique avec de la hsp60 recombinante. Cependant, les lésions induites par immunisation chez lapin normocholestérolémique régressent au cours du temps. Tandis que chez le lapin hypercholestérolémique immunisé avec

hsp60, les plaques athérosclérotiques induites sont persistantes (George et al., 1999). Ceci suggère qu'en l'absence de facteurs de risque additionnels, la réponse immunitaire dirigée contre hsp60 est insuffisante pour créer l'athérosclérose sur une longue période de temps (Hoppichler et al., 1996). Ce mécanisme ressemble au mécanisme de 'first and second hit' que nous proposons ici (Figure 8) où l'anti-hsp60 causant le dommage endothélial initial doit être conjugué à un facteur de risque tel les aPL pour avoir une conséquence clinique.

L'effet pathogénique des anti-hsp60 dans les maladies vasculaires est encore mal compris. Nous avons montré que les anti-hsp60 purifiés à partir de sérum LED pouvaient induire l'apoptose endothéliale. Tel que discuté précédemment, en plus des effets spécifiques au LED ou au SAP, l'apoptose endothéliale peut avoir des effets néfastes causant des blessures vasculaires et un état procoagulant. Finalement, les anticorps ne sont pas spécifiques au LED et sont aussi associés à l'apparition de maladies vasculaires. Il est donc plausible que les anti-hsp60 retrouvés chez les patients atteints de maladies vasculaires causent, comme nous l'avons montré avec les anti-hsp60 des LED, l'apoptose endothéliale. Pour vérifier cette hypothèse, il suffirait de reproduire nos expériences avec les anti-hsp60 purifiés à partir de sera de patients atteints de maladies vasculaires.

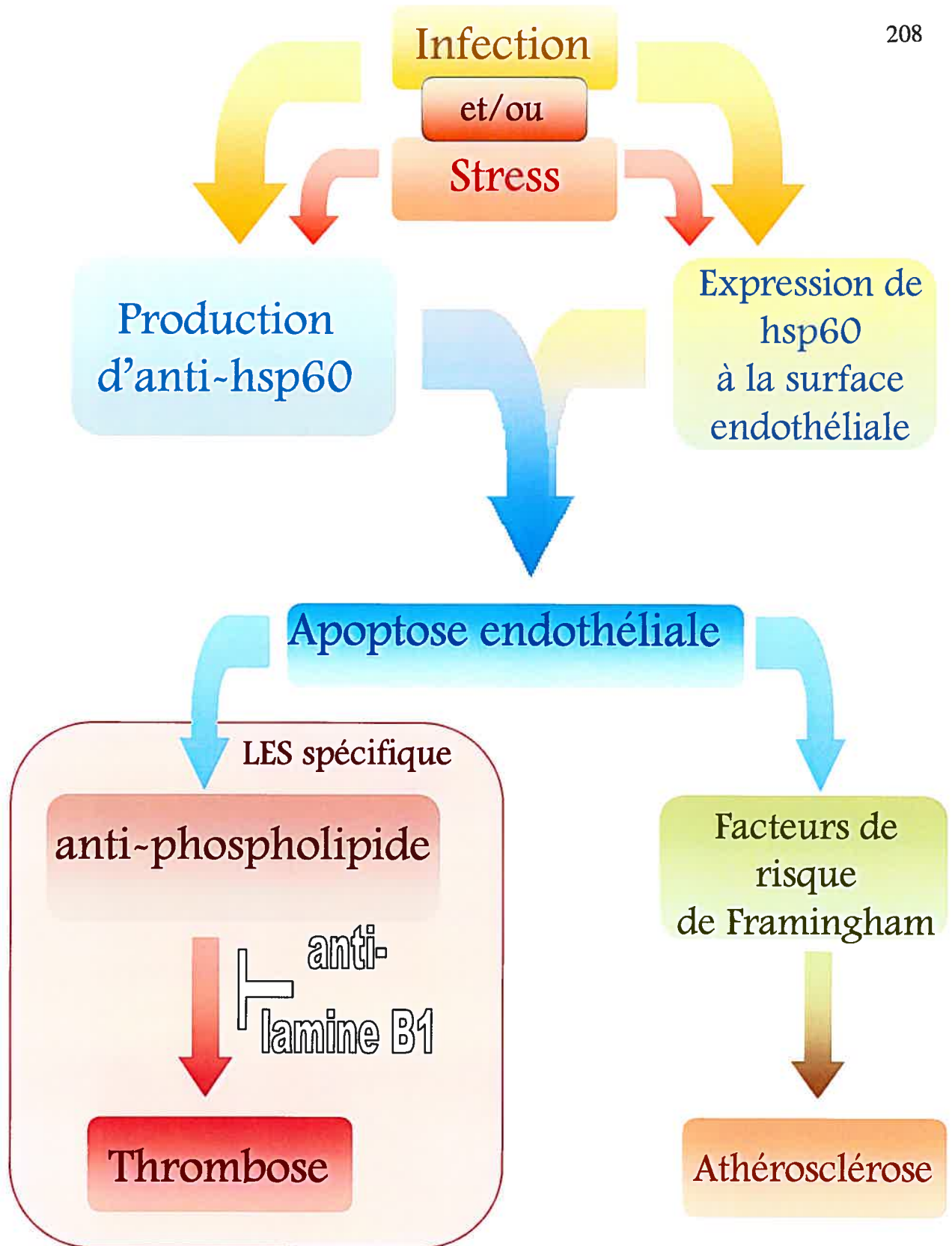
## **2.8 Hypothèse de la voie pathophysiologique commune entre le LED et l'athérosclérose**

A lumière de nos résultats et de la littérature présente, il nous est possible de proposer un modèle qui intègre la présence d'anti-hsp60, l'apoptose endothéliale et certaines manifestations cliniques spécifiques au LED et aux maladies cardiovasculaires (Figure 9).

L'infection et/ou des stress peuvent concomitamment induire l'expression de hsp60 à la surface endothéliale et induire la production d'anti-hsp60. Ces auto-anticorps peuvent ainsi lier la hsp60 disponible à la surface endothéliale et induire l'apoptose. Dans notre modèle, cette partie du mécanisme est commune aux patients souffrant du LED et de maladies cardiovasculaires. Donc, les anti-hsp60 induisent une dysfonction endothéliale initiale commune permettant aux mécanismes spécifiques à la maladie de se produire. Ainsi, au niveau de l'athérosclérose, une apoptose endothéliale conjuguée à d'autres facteurs de risque tel l'hypercholestérolémie permet l'apparition de l'athérosclérose. Du côté LED, l'apoptose endothéliale permet le recrutement des aPL et le déclenchement de la cascade thrombotique. Et, tel que discuté précédemment, nous proposons que cette cascade aPL dépendante pourrait être bloquée par les aLB1.

Figure

9



**Figure 9: Modèle intégrateur.**  
**Apoptose endothéliale induite par les anti-hsp 60 : voie pathophysiologique commune entre le LES et les maladies vasculaires.**

Il est possible que les patients souffrant du LED puissent, en plus de déclencher la cascade spécifique au LED, déclencher la cascade menant à l'athérosclérose. Les jeunes femmes souffrant du LED possèdent, en effet, une incidence d'athérosclérose anormalement élevée comparée à un groupe contrôle. En plus de posséder des anti-hsp60, comme nous l'avons montré, les patients souffrant du LED présentent souvent un ou plusieurs facteurs de risque de Framingham, pouvant ainsi déclencher cette voie pathophysiologique. Une équipe dirigée par le Dr Senécal a récemment montré, à l'aide d'une analyse rétrospective sur deux cohortes LED canadiennes, dont celle étudiée dans cette thèse, que les risques d'événements cardiovasculaires chez les patients souffrant du LED étaient magnifiés de 7 à 17 fois par rapport aux normes de Framingham (Esdaile et al., 2001). Ainsi, les facteurs de risque de Framingham ne peuvent expliquer à eux seuls toutes les implications vasculaires lupiques. Nous suggérons que la présence d'anti-hsp60 pourrait expliquer partiellement ce risque accru, mais cette étude suggère aussi que les aPL eux-mêmes pourraient favoriser le processus athérosclérotique.

## **2.9 Potentiel prédictif des anti-hsp60**

Normalement, les titres d'anticorps dirigés contre un déterminant spécifique fluctuent dramatiquement au cours du temps. Ainsi, de grandes quantités

d'anticorps sont produites suite à l'immunisation ou au contact avec le déterminant. Ces titres élevés d'anticorps ont par contre tendance à diminuer assez rapidement afin d'éviter la perte de contrôle de la réponse immunitaire. Or, les réactions autoimmunes classiques dirigées contre les auto-antigènes induisent des titres élevés d'auto-anticorps qui persistent au cours du temps et qui reflètent la perte de contrôle de la réponse immunitaire. Une explication possible est que les réponses autoimmunes sont continuellement restimulées alors que les réponses normales font suite à des expositions sporadiques à l'antigène.

Afin de définir à quel type de réaction immunitaire appartient la réponse anti-hsp60, les titres d'anti-hsp60 de sérums prélevés à différents temps sur 3 patients souffrant du LED ont été mesurés à l'aide d'un ELISA utilisant la hsp60 recombinante comme antigène. Comme nous pouvons le voir à l'annexe I, les trois patients testés présentent des fluctuations importantes des titres d'anti-hsp60. Ces patrons de fluctuations ressemblent donc à une réponse dite normale, restimulée de façon apparemment aléatoire. Il est tentant de proposer que les titres élevés d'anti-hsp60 font suite à des infections ou des stress subis par ces patients.

Comme les titres d'anti-hsp60 varient au cours du temps, il serait crucial d'étudier le potentiel prédictif des anti-hsp60 au cours du temps. Autrement dit, est-ce que des titres élevés d'anti-hsp60 précèdent et peuvent prédire des événements

thrombotiques? Le potentiel pronostique des anti-hsp60 a déjà été validé dans le cas de l'athérosclérose carotidienne pouvant prédire la mortalité sur 5 ans (Xu et al., 1999). Il serait donc extrêmement important d'étudier la fluctuation des titres d'auto-anticorps de façon prospective chez plusieurs patients et sujets normaux en tenant compte des infections, des différents facteurs de stress incluant les facteurs de Framingham, de la fluctuation de la maladie, des titres de plusieurs auto-anticorps et évidemment d'événements thrombotiques. Si une corrélation longitudinale existe entre les titres élevés d'anti-hsp60 et l'apparition de thrombose, ceci serait un avancement majeur au niveau du pronostic mais surtout au niveau du traitement des patients en resserrant leur fenêtre thérapeutique.



## Conclusion

De tous les aPL observés dans le LED, la présence de LAC est le facteur de risque le plus fort pour la thrombose (Horbach et al., 1996). Paradoxalement, la moitié des patients possédant des LAC ne développent pas de thrombose. Dans la pratique clinique, cela cause un dilemme au niveau du traitement des patients positifs pour les LAC : Doivent-ils être traités par un traitement préventif d'anticoagulant oral avec les effets secondaires potentiels en découlant, ou doivent-ils être traités seulement après un premier événement thrombotique, exposant de ce fait le patient aux risques de tels événements? Jusqu'à présent il n'existe aucune méthode permettant de différencier les patients positifs pour LAC qui vont développer une thrombose de ceux qui en seront exempts.

Au cours de cette thèse, nous avons identifié deux marqueurs potentiels pour les patients avec LED et aPL positifs (Figure 10). Les aLB1 lorsque associés au LAC sont associés à une thromboprotection. Donc, dans la pratique, un patient avec LED possédant des anti-lamine B1 pourrait être moins à risque de faire des thromboses et ne devrait probablement pas être anticoagulé de manière prophylactique. Par contre, les anti-hsp60 lorsque associés aux LAC, accentuent l'effet thrombogène. Dans la pratique, pour un patient avec LED possédant un titre

élevé d'anti-hsp60 conjugué à la présence de LAC, une thérapie anticoagulante pourrait être envisagée à cause du risque élevé de thrombose. Ainsi, la détection des marqueurs étudiés au cours de cette thèse pourra, nous l'espérons, aider les rhumatologues à prodiguer des soins mieux adaptés aux patients souffrant du LED en plus de donner des indices sur la pathophysiologie complexe de cette maladie.

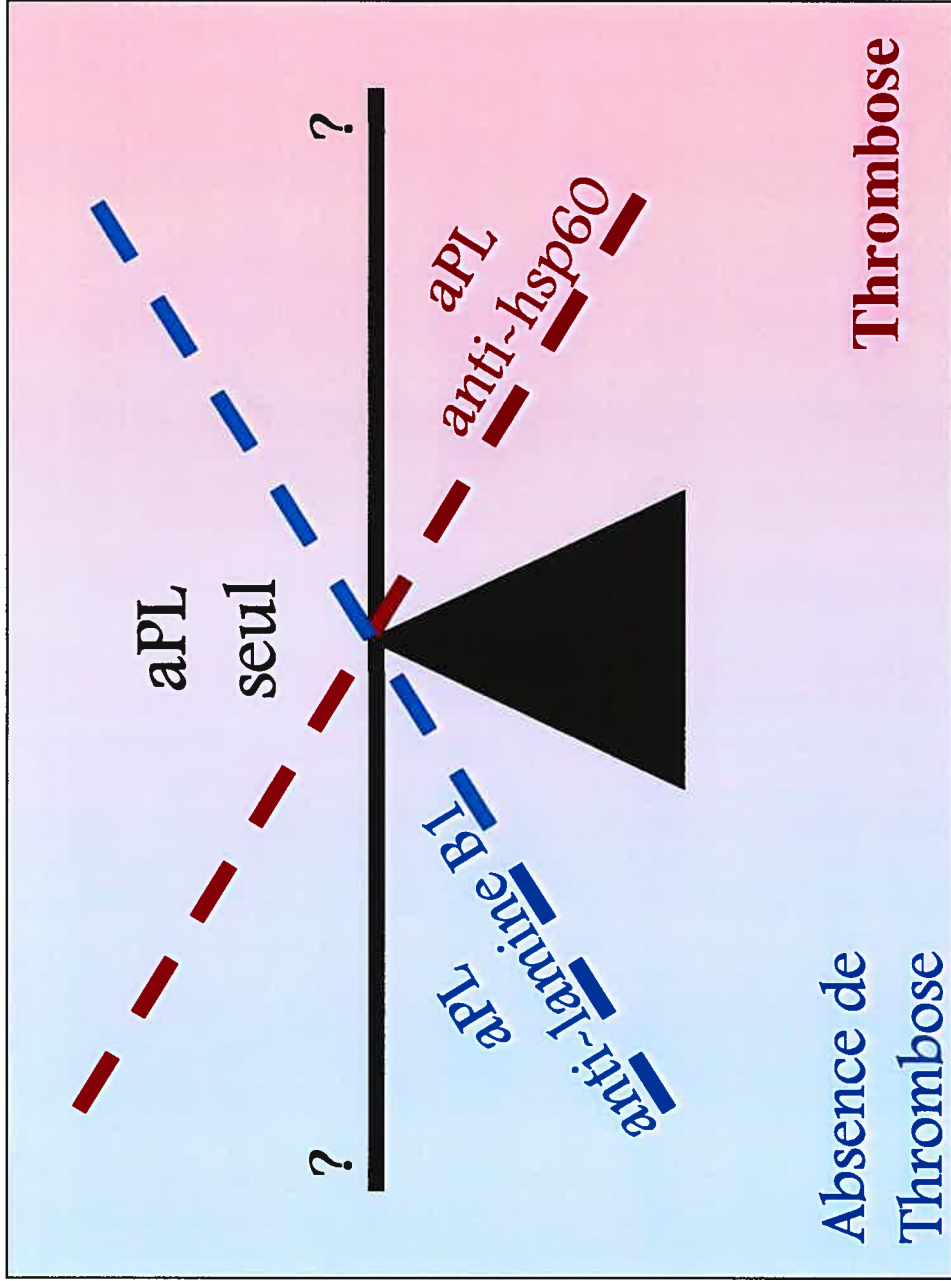


Figure 10 : Influence des aLB1 et des anti-hsp60 sur le dilemme clinique chez les patients LES possédant des LAC

## Bibliographie

Alarcon-Segovia D, Deleze M, Oria CV, Sanchez-Guerrero J, Gomez-Pacheco L, Cabiedes J, Fernandez L, Ponce de Leon S. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. A prospective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine (Baltimore)*. 1989, 68:353-65.

Alarcón-Segovia D, Pérez-Vázquez ME, Villa AR, Drenkard C, Cabiedes J. Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome within systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum*. 1992; 21:275-286.

Ames PRJ. Antiphospholipid antibodies, thrombosis and atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: a unifying 'membrane stress syndrome' hypothesis. *Lupus*. 1994; 3:371-377.

Aranow C, Paul E and Diamond B. The structure and derivation of antibodies and auto-antibodies. *In* Dubois' *Lupus erythematosus*, 4<sup>th</sup> Ed. Lea & Febiger, 1993, p.183.

Arnett FC Jr. The genetic basis of systemic lupus erythematosus. *In* Wallace DJ, Hahn BH (eds): *Dubois' Lupus Erythematosus*, 5th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1997, p 77.

Arvieux J, Roussel B, Jacob MC, Colomb MG. Measurement of anti-phospholipid antibodies by ELISA using beta 2-glycoprotein I as an antigen. *J Immunol Methods*. 1991; 143:223-229.

Asherson RA, Khamashta MA, Ordi-Ros J, et al. The "primary" antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. *Medicine*. 1989; 68:366-374.

Ayukawa K, Taniguchi S, Masumoto J, Hashimoto S, Sarvotham H, Hara A, Toshifumi A, Sagara J. La antigen is cleaved in the COOH terminus and loses the nuclear localisation signal during apoptosis. *J Biol Chem*. 2000; 275:34465-34470.

Bicknell GR, and Cohen GM. Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 207, 40-7.

Block SR, Winfield JB, Lockshin MD, D'Angelo WA, Christian CL. Studies of twins with systemic lupus erythematosus: A review of the literature and presentation of 12 additional sets. *Am J Med.* 1975; 59:533.

Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell.* 1996; 85, 803-15.

Bombelli T, Karsan A, Tait JF. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood.* 1997; 89,2429-2442.

Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets. *Blood.* 1999 ;93:3831-8.

Bordron A, Dueymes M, Levy Y, Jamin C, Leroy JP, Piette JC, Shoenfeld Y, Youinou PY. The binding of some human antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest.* 1998; 101:2029-35.

Botto M, Dell'Agnola C, Bygrave AE, Thompson EM, Cook HT, Petry F, Loos M, Pandolfi PP, Walport MJ. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat Genet.* 1998; 19:56-9.

Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. *Thromb Haemost.* 1995; 74:1185-1190.

Brenner C, Marzo I, Zamzami N, Susin S, Vieira H, and Kroemer G. Coopération mortelle entre la protéine pro-apoptotique Bax et le translocateur à adénine nucléotidique pour le contrôle mitochondriale de l'apoptose. *Med Sci.* 1998; 14, 1399-401.

Broers JL, Machiels BM, Kuijpers HJ, Smedts F, van den Kieboom R, Raymond Y, Ramaekers FC. A- and B-type lamins are differentially expressed in normal human tissues. *Histochem Cell Biol.* 1997;107:505-17.

Budd RC. Activation-induced cell death. *Curr Opin Immunol.* 2001; 13:356-62.

Buendia B, Santa-Maria A, Courvalin JC Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci.* 1999; 112

Cabral AR, Amigo MC, Cabiedes J, Alarcón-Segovia D. The antiphospholipid/cofactor syndromes: a primary variant with antibodies to  $\beta_2$ -

glycoprotein-I but no antibodies detectable in standard antiphospholipid assays. *Am J Med.* 1996; 101:472-481.

Carreras LO, Forastiero RR, Martinuzzo ME. Which are the best biological markers of the antiphospholipid syndrome? *J Autoimmun.* 2000; 15:163-172.

Carvalho D, Savage CO, Black CM, Pearson JD. IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. *J Clin Invest.* 1996; 97:111-9.

Carvalho D, Savage CO, Isenberg D, Pearson JD. IgG anti-endothelial cell autoantibodies from patients with systemic lupus erythematosus or systemic vasculitis stimulate the release of two endothelial cell-derived mediators, which enhance adhesion molecule expression and leukocyte adhesion in an autocrine manner. *Arthritis Rheum.* 1999;42:631-40.



Casciola-Rosen L, Andrade F, Ulanet D, Wong WB, Rosen A. Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implications for initiation of autoimmunity. *J Exp Med.* 1999; 190:815-26.

Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med.* 1994; 179:1317-30.

Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. DNA-dependent protein kinase is one of a subset of autoantigens specifically cleaved early during apoptosis. *J Exp Med.* 1995; 182:1625-34.

Casciola-Rosen LA, Miller DK, Anhalt GJ, Rosen A. Specific cleavage of the 70-kDa protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein is a characteristic biochemical feature of apoptotic cell death. *J Biol Chem.* 1994;269:30757-60.

Casciola-Rosen L, Rosen A. Ultraviolet light-induced keratinocyte apoptosis: A potential mechanism for the induction of skin lesions and autoantibody production in LE. *Lupus.* 1997; 6:175.

Casciola-Rosen L, Rosen A, Petri M, Schlissel M. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity : implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:1624-29.

Casiano CA, Martin SJ, Green DR, Tan EM. Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/APO-1)-mediated T cell apoptosis. *J Exp Med*. 1996; 184:765-70.

Casiano CA, Ochs RL, Tan EM. Distinct cleavage products of nuclear proteins in apoptosis and necrosis revealed by autoantibody probes. *Cell Death Differ*. 1998; 5:183.

Cavallo T, Granholm NA. Bacterial lipopolysaccharide transforms mesangial into proliferative lupus nephritis without interfering with processing of pathogenic immune complexes in NZB/W mice. *Am J Pathol*. 1990; 137:971.

Cervera R, Navarro M, Lopez-Soto A, Cid MC, Font J, Esparza J, Reverter JC, Monteagudo J, Ingelmo M, Urbano-Marquez A. Antibodies to endothelial cells in Behcet's disease: cell-binding heterogeneity and association with clinical activity. *Ann Rheum Dis*. 1994; 53:265-7.

Chan TM, Yu PM, Tsang KL, Cheng IK. Endothelial cell binding by human polyclonal anti-ADN antibodies: relationship to disease activity and endothelial functional alterations. *Clin Exp Immunol.* 1995;100:506-13.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, and Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell.* 1995; 81, 505-12.

Chou CH, Ali SA, Roubey R, Buyon J, Reeves WH. Onset and regulation of anti-lamin B autoantibody production is independent of the level of polyclonal activation. *Autoimmunity.* 1991; 8: 297-305.

Cines DB, Pollak ES, Buck CA. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 1998; 91,3527-3561

Clancy RM, Chan EK, Chandrashekhar S, Buyon JP. Does the cellular localization of antigens in or on apoptotic blebs influence the pathogenicity or benefit of cognate antibodies? Comment on the article by Dieude et al. *Arthritis Rheum.* 2003; 48:2080-2; author reply 2082-3.

Cohen JJ. Programmed cell death in the immune system. *Adv Immunol.* 1991; 50, 55-85.

Damianovich M, Gilburd B, George J, Del Papa N, Afek A, Goldberg I, Kopolovic Y, Roth D, Barkai G, Meroni PL, Shoenfeld Y. Pathogenic role of anti-endothelial cell antibodies in vasculitis. An idiotypic experimental model.. *J Immunol.* 1996; 156:4946-51.

Daniel-Ribeiro CT, Zanini G. Autoimmunity and malaria: what are they doing together? *Acta Trop.* 2000; 76:205-21.

Deapen D, Escalante A, Weinrib L. A revised estimate of twin concordance in SLE. *Arthritis Rheum.* 1992; 35:311.

DeGiorgio LA, Konstantinov KN, Lee SC, Hardin JA, Volpe BT, Diamond B. A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus. *Nat Med.* 2001; 7:1189-93.

de Groot PG, Derksen RHWM. Specificity and clinical relevance of lupus anticoagulant. *Vessels* 1995; 1:22-6.

Del Papa N, Conforti G, Gambini D, La Rosa L, Tincani A, D'Cruz D, Khamashta M, Hughes GR, Balestrieri G, Meroni PL. Characterization of the endothelial surface proteins recognized by anti-endothelial antibodies in primary and secondary autoimmune vasculitis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1994; 70:211-6.

Del Papa N, Gambini D, Meroni PL. Anti-endothelial cell antibodies and autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy.* 1994; 12:275-86.

Del Papa N, Guidali L, Sironi M, Shoenfeld Y, Mantovani A, Tincani A, Balestrieri G, Radice A, Sinico RA, Meroni PL. Anti-endothelial cell IgG antibodies from patients with Wegener's granulomatosis bind to human endothelial cells in vitro and induce adhesion molecule expression and cytokine secretion. *Arthritis Rheum.* 1996; 39:758-66.

Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KM, and Krammer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature.* 1995; 373; 438-41.

Diez-Roux G, Lang RA. Macrophages induce apoptosis in normal cells in vivo. *Development.* 1997;124:3633-8.

Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, and Venkatachalam MA. Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol.* 1997; 151:1205-13.

Drappa J, Vaishnav AK, Sullivan KE, Chu JL, Elkon KB. Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *N Engl J Med.* 1996; 335:1643-9.

Duffield JS, Erwig LP, Wei X, Liew FY, Rees AJ, Savill JS. Activated macrophages direct apoptosis and suppress mitosis of mesangial cells. *J Immunol.* 2000; 164:2110-9.

Earnshaw WC, Martins LM, and Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999; 68:383-424.

Emlen W, Niebur J, Kadera R. Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 1994; 152:3685-92.

Erausquin C, Merino R, Izui S. Therapeutic effect of early thymic irradiation in (NZB × NZW)F1 mice, associated with a selective decrease in the levels of IgG3 and gp70-anti-gp70 immune complexes. *Cell Immunol.* 1995; 161:207.

Esdaile JM, Abrahamowicz M, Grodzicky T, Li Y, Panaritis C, du Berger R, Cote R, Grover SA, Fortin PR, Clarke AE, Senecal JL. Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2001; 44:2331-7.

Esmon NL, Safa O, Smirnov MD, Esmon CT. Antiphospholipid antibodies and the protein C pathway. *J Autoimmun.* 2000; 15:221-225.

Farris AD, Brown L, Reynolds P. Induction of autoimmunity by multivalent immunodominant and subdominant T cell determinants of La (SS-B). *J Immunol.* 1999; 162: 3079-87

Faulk WP, Rose M, Meroni PL, Del Papa N, Torry RJ, Labarrere CA, Busing K, Crisp SJ, Dunn MJ, Nelson DR. Antibodies to endothelial cells identify myocardial damage and predict development of coronary artery disease in patients with transplanted hearts. *Hum Immunol.* 1999; 60:826-32.

Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, and Alnemri ES. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93:7464-9.

Ferraro G, Meroni PL, Tincani A, Sinico A, Barcellini W, Radice A, Gregorini G, Froidi M, Borghi MO, Balestrieri G. Anti-endothelial cell antibodies in patients with Wegener's granulomatosis and micropolyarteritis. *Clin Exp Immunol.* 1990; 79:47-53.

Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, Strober W, Lenardo MJ, Puck JM. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell.* 1995; 81:935-46.

Folzenlogen D, Hofer MF, Leung DY, Freed JH, Newell MK. Analysis of CD80 and CD86 expression on peripheral blood B lymphocytes reveals increased expression of CD86 in lupus patients. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997; 83:199-204.

Frampton G, Moriya S, Pearson JD, Isenberg DA, Ward FJ, Smith TA, Panayiotou A, Staines NA, Murphy JJ. Identification of candidate endothelial cell autoantigens



in systemic lupus erythematosus using a molecular cloning strategy: a role for ribosomal P protein P0 as an endothelial cell autoantigen. *Rheumatology*. 2000; 39:1114-20.

Frostegård J, Lemne C, Andersson B, et al. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with borderline hypertension. *Hypertension*. 1997; 29: 40–44.

Fujieda M, Oishi N, Kurashige T. Antibodies to endothelial cells in Kawasaki disease lyse endothelial cells without cytokine pretreatment. *Clin Exp Immunol*. 1997; 107:120-6.

Galli M, Comfurius P, Barbui T, Zwaal RFA, Bevers EM. Anticoagulant activity of  $\beta$ 2-glycoprotein I is potentiated by a distinct subgroup of anticardiolipin antibodies. *Thromb Haemost*. 1992; 68:297-300.

Galli M, Comfurius P, Maassen C, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet*. 1990; 335:1544-1547.

George J, Shoenfeld Y, Afek A. Enhanced fatty streak formation in C57BL/6J mice by immunization with heat shock protein 65. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 505–510.

Gerace L, Burke B. Functional organization of the nuclear envelope. *Annu Rev Cell Biol.* 1988; 4: 335-374

Gobel U, Eichhorn J, Kettritz R, Briedigkeit L, Sima D, Lindschau C, Haller H, Luft FC. Disease activity and autoantibodies to endothelial cells in patients with Wegener's granulomatosis. *Am J Kidney Dis.* 1996; 28:186-94.

Golan TD, Elkon KB, Gharavi AE, Krueger JG. Enhanced membrane binding of autoantibodies to cultured keratinocytes of systemic lupus erythematosus patients after ultraviolet B/ultraviolet A irradiation. *J Clin Invest.* 1992; 90:1067-76.

Golstein P, Ojcius DM, and Young JD. Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev.* 1991; 121: 29-65.

Goto M, Tanimoto K, Horiuchi Y. Natural cell mediated cytotoxicity in systemic lupus erythematosus: suppression by antilymphocyte antibody. *Arthritis Rheum.* 1980; 23:1274-81.

Greidinger EL, Miller DK, Yamin TT, Casciola-Rosen L, Rosen A. Sequential activation of three distinct ICE-like activities in Fas-ligated Jurkat cells. *FEBS Lett.* 1996; 390:299-303.

Griedling, KK, Alexander, RW. Hurst's the heart, arteries and veins. *In Cellular biology of blood vessels.* 9th ed. Alexander, RW Schlant, RC Fuster, Vet al eds.. 1998,125-141.

Grodzicky T, Elkon KB. Apoptosis in rheumatic diseases. *Am J Med.* 2000; 108:73-82.

Gruenbaum Y, Wilson K., Harel A, Goldberg M, Cohen M. Nuclear lamins-- structural proteins with fundamental functions. *J Struct. Biol.* 2000; 129: 313-23

Guilly MN, Danon F, Brouet JC, Bornens M, Courvalin JC. Autoantibodies to nuclear lamin B in a patient with thrombocytopenia. *Eur J Cell Biol.* 1987; 43: 266-72.

Hahn BH. An overview of the pathogenesis. *In Dubois' Lupus erythematosus*, 4<sup>th</sup> Ed. Lea & Febiger, 1993, p.69.

Hahn BH. Antibodies to DNA. *N Engl J Med.* 1998; 338:1359-68.

Hahn BH. Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *In Kelly's textbook of Rheumatology*, 6<sup>th</sup> ed. B. Saunders Company, 2001, p.1089.

Hansen MH, Nielsen H, Ditzel HJ. The tumor-infiltrating B cell response in medullary breast cancer is oligoclonal and directed against the autoantigen actin exposed on the surface of apoptotic cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98 :12659-12664

Hauben E, Gothilf A, Cohen A, Butovsky O, Nevo U, Smirnov I, Yoles E, Akselrod S, Schwartz M. Vaccination with dendritic cells pulsed with peptides of myelin basic protein promotes functional recovery from spinal cord injury. *J Neurosci.* 2003; 23:8808-19.

Hegele RA. The envelope, please: nuclear lamins and disease. *Nat Med.* 2000; 6:136-7.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000 ; 407:770-776.

Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JH, Ley TJ. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell*. 1994; 76:977-87.

Hightower LE. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell*. 1991; 66:191-7.

Hill MB, Phipps JL, Cartwright RJ, Milford Ward A, Greaves M, Hughes P. Antibodies to membranes of endothelial cells and fibroblasts in scleroderma. *Clin Exp Immunol*. 1996; 106:491-7.

Hill MB, Phipps JL, Hughes P, Greaves M. Anti-endothelial cell antibodies in primary antiphospholipid syndrome and SLE: patterns of reactivity with membrane antigens on microvascular and umbilical venous cell membranes. *Br J Haematol*. 1998; 103:416-21.

Hill MB, Phipps JL, Milford-Ward A, Greaves M, Hughes P. Further characterization of anti-endothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus by controlled immunoblotting. *Br J Rheumatol*. 1996; 35:1231-8.

Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, Yonehara S, Sawai H, Okazaki T, Yamamoto K, Sasada M. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med.* 1998; 187:587-600.

Hochberg MC. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. *In* Dubois' *Lupus erythematosus*, 4<sup>th</sup> Ed. Lea & Febiger, 1993, p.49.

Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1725.

Hoppichler F, Lechleitner M, Traweger C. Changes of serum antibodies to heat-shock protein 65 in coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 1996; 126: 333–338.

Horbach DA, von Oort E, Donders RCJM, Derksan RHWM, de Groot PG. Lupus anticoagulant is the strongest risk factor for both venous and arterial thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Thromb Haemost.* 1996; 76:916-24.

Hörkkö S, Miller E, Dudl E, et al. Antiphospholipid antibodies are directed against epitopes of oxidized phospholipids: recognition of cardiolipin by monoclonal

antibodies to epitopes of oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1996; 98:815-825.

Howard A D, Kostura M J, Thornberry N, Ding G J, Limjuco G, Weidner J, Salley JP, Hogquist KA, Chaplin DD, Mumford RA. IL-1-converting enzyme requires aspartic acid residues for processing of the IL-1 beta precursor at two distinct sites and does not cleave 31-kDa IL-1 alpha. *J Immunol.* 1991; 147: 2964-9.

Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell.* 1995; 81: 495-504.

Hughes GR, Harris NN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol.* 1986; 13:486-9.

Ihn H, Sato S, Fujimoto M, Igarashi A, Yazawa N, Kubo M, Kikuchi K, Takehara K, Tamaki K. Characterization of autoantibodies to endothelial cells in systemic sclerosis (SSc): association with pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol.* 2000; 119:203-9.

Jarvinen P, Kaprio J, Makitalo R, et al: Systemic lupus erythematosus and related systemic diseases in a nationwide twin cohort. An increased prevalence of disease in MZ twins and concordance of disease features. *J Intern Med.* 1992; 231:67.

Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, el-Khatib M, Sherr DH, Stanger BZ, Marshak-Rothstein A. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature.* 1995; 37:444-8.

Kandiah DA, Krilis SA. Beta2-glycoprotein I. *Lupus* 1994;3:207-212.

Kaneko K, Savage CO, Pottinger BE, Shah V, Pearson JD, Dillon MJ. Antiendothelial cell antibodies can be cytotoxic to endothelial cells without cytokine pre-stimulation and correlate with ELISA antibody measurement in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol.* 1994; 98:264-9.

Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S, Yoshino K, Okumura K, Yagita H. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med.* 1995; 182:1777-83.



Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26:239-57.

Kojima T, Horiuchi T, Nishizaka H, Sawabe T, Higuchi M, Harashima SI, Yoshizawa S, Tsukamoto H, Nagasawa K, Niho Y. Analysis of fas ligand gene mutation in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2000 ;43:135-9.

Kol AT, Bourcier A, Lichtman H and Libby P. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest*. 1999; 103 :571–577.

Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med*. 1997; 3:614-20.

Lamb DJ, El-Sankary W and Ferns Gordon GAA. Molecular mimicry in atherosclerosis: a role for heat shock proteins in immunisation, *Atherosc*. 2002; 167:177-185

Lawen A. Apoptosis an introduction. *BioEssays*. 2003; 25: 888-96.

Lahita RG. Emerging concepts for sexual predilection in the disease systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci*. 1999; 876:64.

Lahita RG, Kunkel HG, Bradlow HL. Increased oxidation of testosterone in SLE. *Arthritis Rheum*. 1983; 26:1517.

Lassoued K, Guilly MN, Danon F, André C, Dhumeaux D, Clauvel JP. Antinuclear autoantibodies specific for lamins: characterization and clinical significance. *Ann Intern Med*, 1988; 108: 829-33.

LeFeber WP, Norris DA, Ryan SR, Huff JC, Lee LA, Kubo M, Boyce ST, Kotzin BL, Weston WL. Ultraviolet light induces binding of antibodies to selected nuclear antigens on cultured human keratinocytes. *J Clin Invest* . 1984; 74:1545-51.

Leung DY. Kawasaki disease. *Curr Opin Rheumatol*. 1993; 5:41-50.

Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med*. 2002; 346:752-63.

Levine JS, Koh JS, Subang R, Rauch J. Apoptotic cells as immunogen and antigen in the antiphospholipid syndrome. *Exp Mol Pathol*. 1999;66: 82-98.

Levine JS, Subang R, Koh JS, Rauch J. Induction of anti-phospholipid autoantibodies by  $\beta$ 2-glycoprotein I bound to apoptotic thymocytes. *J Autoimmun*. 1998; 11:413-424.

Li JS, Liu MF, Lei HY. Characterization of anti-endothelial cell antibodies in the patients with systemic lupus erythematosus: a potential marker for disease activity. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996; 79:211-6.

Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 1998; 94:491-501.

Liao DF, Jin ZG, Baas AS. Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2000; 275: 189-196.

Lindqvist KJ, Osterland CK. Human antibodies to vascular endothelium. *Clin Exp Immunol*. 1971; 9:753-60.

Linker-Israeli M, Quismorio FP Jr, Horwitz DA. CD8+ lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus sustain, rather than suppress, spontaneous polyclonal IgG production and synergize with CD4+ cells to support autoantibody synthesis. *Arthritis Rheum.* 1990; 33:1216-25.

Liossis SN, Ding XZ, Dennis GJ, Tsokos GC. Altered pattern of TCR/CD3-mediated protein-tyrosyl phosphorylation in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Deficient expression of the T cell receptor zeta chain. *J Clin Invest.* 1998; 101:1448-57.

Lockshin MD, Druzin ML, Goei S. Antibody to cardiolipin as a predictor of fetal distress or death in pregnant patients with systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 1985; 313:152-156.

Longthorne VL, Williams GT. Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *Embo J.* 1997; 16:3805-12.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 1998; 94:481-90.

Mageed RA, Prud'homme GJ. Immunopathology and the gene therapy of lupus. *Gene Ther.* 2003; 10:861-74.

Mamula MJ. The inability to process a self-peptide allows autoreactive T cells to escape tolerance. *J Exp Med.* 1993; 177:567-71.

Mariani SM, Matiba B, Baumler C, Krammer PH. Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases. *Eur J Immunol.* 1995; 25:2303-7.

Mason LJ, Isenberg DA. Immunopathogenesis of SLE. *Baillieres Clin Rheumatol.* 1998; 12:385-403.

Mayr M, Metzler B, Kiechl S, Willeit J, Schett G, Xu Q, Wick G. Endothelial cytotoxicity mediated by serum antibodies to heat shock proteins of *Escherichia coli* and *Chlamydia pneumoniae*: immune reactions to heat shock proteins as a possible link between infection and atherosclerosis. *Circulation.* 1999; 99:1560-6.

McCluskey J, Farris AD, Keech CL. Determinant spreading. lessons from animal models and human disease. *Immunol Rev.* 1998; 164: 209-29.

McCrae KR, DeMichele A, Samuels P, Roth D, Kuo A, Meng QH, Rauch J, Cines DB. Detection of endothelial cell-reactive immunoglobulin in patients with anti-phospholipid antibodies. *Br J Haematol.* 1991; 79:595-605.

McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation:  $\beta$ 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:4120-4124.

Meroni PL, D'Cruz D, Khamashta M, Youinou P, Hughes GR. Anti-endothelial cell antibodies: only for scientists or for clinicians too? *Clin Exp Immunol.* 1996; 104:199-202.

Meroni PL, Del Papa N, Raschi E, et al.  $\beta$ 2-Glycoprotein I as a 'cofactor' for anti-phospholipid reactivity with endothelial cells. *Lupus.* 1998; 7:Suppl 2: S44-S47.

Meroni PL, Raschi E, Camera M, et al. Endothelial activation by aPL: a potential pathogenetic mechanism for the clinical manifestations of the syndrome. *J Autoimmun.* 2000; 15:237-240.

Mevorach D, Zhou JL, Song X, Elkon KB. Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. *J Exp Med.* 1998; 188:387-92.

Miranda-Carus ME, Boutjdir M, Tseng CE, DiDonato F, Chan EK, Buyon JP. Induction of antibodies reactive with SSA/Ro-SSB/La and development of congenital heart block in a murine model. *J Immunol.* 1998; 61:5886-92

Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med.* 1999; 5:49-55.

Muller Kobold AC, van Wijk RT, Franssen CF, Molema G, Kallenberg CG, Tervaert JW. In vitro up-regulation of E-selectin and induction of interleukin-6 in endothelial cells by autoantibodies in Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. *Clin Exp Rheumatol.* 1999; 17:433-40.

Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell*. 1996; 85: 817-27.

Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997; 88:355-65.

Natali PG, Tan EM. Experimental skin lesions in mice resembling SLE. *Arthritis Rheum*. 1973; 16:579.

Nawroth PP, Stern DM. Endothelial cell procoagulant properties and the host response. *Semin Thromb Hemost*. 1987; 13:391-7.

Nelson JL. Microchimerism and autoimmune disease. *N Engl J Med*. 1998; 338:1224.

Nochy D, Daugas E, Droz D. The intrarenal vascular lesions associated with primary antiphospholipid syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10:507-518.



Ohtsuka K, Gray JD, Stimmler MM, Toro B, Horwitz DA. Decreased production of TGF-beta by lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 1998; 160:2539-45.

Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell.* 1994; 79:189-92.

Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993; 74: 609-19.

Oosting JD, Derksen RHWM, Bobbink IWG, Hackeng TM, Bouma BN, de Groot PG. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? *Blood.* 1993; 81:2618-2625.

Oshiro BT, Silver RM, Scott JR, Yu H, Branch DW. Antiphospholipid antibodies and fetal death. *Obstet Gynecol.* 1996; 87:489-493.

Palmer E. Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3:383-91.

Papa ND, Raschi E, Moroni G, Panzeri P, Borghi MO, Ponticelli C, Tincani A, Balestrieri G, Meroni PL. Anti-endothelial cell IgG fractions from systemic lupus erythematosus patients bind to human endothelial cells and induce a pro-adhesive and a pro-inflammatory phenotype in vitro. *Lupus*. 1999; 8:423-9.

Perry GJ, Elston T, Khouri NA, Chan TM, Cameron JS, Frampton G. Antiendothelial cell antibodies in lupus: correlations with renal injury and circulating markers of endothelial damage. *Q J Med*. 1993; 86:727-34.

Pignone A, Scaletti C, Matucci-Cerinic M, Vazquez-Abad D, Meroni PL, Del Papa N, Falcini F, Generini S, Rothfield N, Cagnoni M. Anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis: significant association with vascular involvement and alveolo-capillary impairment. *Clin Exp Rheumatol*. 1998; 16:527-32.

Platt N, da Silva RP, Gordon S. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol*. 1998; 8:365-72.

Pockley AG. Heat shock proteins, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation*. 2002; 105:1012-7.

Pockley AG, Wu R, Lemne C. Circulating heat shock protein 60 is associated with early cardiovascular disease. *Hypertension*. 2000; 36: 303–307.

Price BE, Rauch J, Shia MA, Walsh MT, Lieberthal W, Gilligan HM, O'Laughlin T, Koh JS, Levine JS. Anti-phospholipid autoantibodies bind to apoptotic, but not viable, thymocytes in a beta 2-glycoprotein I-dependent manner. *J Immunol*. 1996; 157:2201-8.

Pruijn GJ, Simons FH, van Venrooij WJ. Intracellular localization and nucleocytoplasmic transport of Ro RNP components. *Eur. J. Cell. Biol.* 1997; 74: 123-132

Rand JH, Wu XX, Andree HAM. Pregnancy loss in the antiphospholipid-antibody syndrome - a possible thrombogenic mechanism. *N Engl J Med*. 1997; 337:154-160.

Rauch J, Subang R, D'Agnillo P, Koh JS, Levine JS. Apoptosis and the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun*. 2000; 15:231-5.

Reeves WH, Ali SA. Preferential use of  $\lambda$ L chain in lamin B autoantibodies. *J Immunol* 1989; 143: 3614-18.

Reeves WH, Chaudhary N, Salerno A, Blobel G. Lamin B autoantibodies in sera of certain patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* 1987; 165: 750-62

Reichlin M and Harley JB: Anti nuclear antibodies: An overview. *In* Dubois' Lupus erythematosus, 4<sup>th</sup> Ed. Lea & Febiger, 1993, p.190.

Reiter I, Krammer B, Schwamberger G. Cutting edge: differential effect of apoptotic versus necrotic tumor cells on macrophage antitumor activities. *J Immunol.* 1999; 163:1730-2.

Revelen R, Bordron A, Dueymes M, Youinou P, Arvieux J. False positivity in a cyto-ELISA for anti-endothelial cell antibodies caused by heterophile antibodies to bovine serum proteins. *Clin Chem.* 2000; 46:273-8.

Reynolds P, Gordon TP, Purcell AW, Jackson DC, McCluskey J. Hierarchical self-tolerance to T cell determinants within the nuclear self-antigen La (SS-B) permits induction of systemic autoimmunity in normal mice. *J Exp Med.* 1996; 184: 1857-70.

Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, de Villartay JP. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science*. 1995; 268:1347-9.

Rosen A, Casciola-Rosen L. Autoantigens as substrates for apoptotic proteases: implications for the pathogenesis of systemic autoimmune disease. *Cell Death Differ*. 1999; 6:6-12.

Rosenbaum J, Pottinger BE, Woo P, Black CM, Loizou S, Byron MA, Pearson JD. Measurement and characterisation of circulating anti-endothelial cell IgG in connective tissue diseases. *Clin Exp Immunol*. 1988; 72:450-6.

Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, Peterson EP, Rasper DM, Ruel R, Vaillancourt JP, Thornberry NA, Becker JW. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol*. 1996; 3:619-25.

Roubey RAS. Immunology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Arthritis Rheum*. 1996; 39:1444-1454.

Roubey RAS. Tissue factor pathway and the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun.* 2000; 15:217-220.

Rovere P, Vallinoto C, Bondanza A, Crosti MC, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P, Rugarli C, Manfredi AA. Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *J Immunol.* 1998; 161:4467-71.

Salojin KV, Le Tonqueze M, Saraux A, Nassonov EL, Dueymes M, Piette JC, Youinou PY. Antiendothelial cell antibodies: useful markers of systemic sclerosis. *Am J Med.* 1997; 102:178-85.

Sanchez-Guerrero J, Karlson EW, Liang MH. Past use of oral contraceptives and the risk of developing systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997; 40:804.

Savage CO, Pottinger BE, Gaskin G, Lockwood CM, Pusey CD, Pearson JD. Vascular damage in Wegener's granulomatosis and microscopic polyarteritis: presence of anti-endothelial cell antibodies and their relation to anti-neutrophil cytoplasm antibodies. *Clin Exp Immunol.* 1991; 85:14-9.

Savill J. Apoptosis. Phagocytic docking without shocking. *Nature*. 1998; 392:442-3

Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. 2000; 407:784-8. .

Schultz DR, Arnold PI. Heat shock (stress) proteins and autoimmunity in rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum*. 1993; 22:357.

Schwartz M. Beneficial autoimmune T cells and posttraumatic neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 917:341-7.

Schwartz M. Immunological approaches to the treatment of spinal cord injury. *BioDrugs*. 2001; 15:585-93.

Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 7834-8.

Senécal JL, Ichiki S, Girard D, Raymond Y. Autoantibodies to nuclear lamins and to intermediate filament proteins: natural, pathologic or pathogenic? *J Rheumatol.* 1993; 20: 211-219.

Senécal JL, Rauch J, Grodzicky T, Raynauld JP, Uthman I, Nava A, Guimond M, Raymond Y. Strong association of autoantibodies to human nuclear lamin B1 with lupus anticoagulant antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1999; 42:1347-53.

Senécal JL, Raymond Y. Autoantibodies to DNA, lamins, and pore complex proteins produce distinct peripheral fluorescent antinuclear antibody patterns on the HEp-2 substrate. *Arthritis Rheum.* 1991; 34: 249-51.

Senécal JL, Raymond Y. Autoantibodies to major and minor nuclear lamins are not restricted to autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopathol.* 1992; 2: 115-25.

Sercarz EE, Lehmann PV, Ametani A, Benichou G, Miller A, Moudgil K. Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. *Annu Rev Immunol.* 1993; 11:729-66.



Shi L, Kam CM, Powers JC, Aebersold R, Greenberg AH. Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. *J Exp Med.* 1992 ; 176:1521-9.

Shi W, Chong BH, Chesterman CN.  $\beta$ 2-Glycoprotein I is a requirement for anticardiolipin antibodies binding to activated platelets: differences with lupus anticoagulants. *Blood.* 1993; 81:1255-1262.

Sierakowski S, Kucharz EJ, Lightfoot RW, Goodwin JS. Impaired T-cell activation in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol.* 1989 ;9 :469-76.

Singer GG, Carrera AC, Marshak-Rothstein A, Martinez C, Abbas AK. Apoptosis, Fas and systemic autoimmunity: the MRL-lpr/lpr model. *Curr Opin Immunol.* 1994; 6:913-20.

Sleath PR, Hendrickson RC, Kronheim SR, March CJ, Black RA. Substrate specificity of the protease that processes human interleukin-1 beta. *J Biol Chem* 1990; 265:14526-8.

Soltys BJ, Gupta RS. Cell surface localization of the 60 kDa heat shock chaperonin protein (hsp60) in mammalian cells. *Cell Biol Int.* 1997; 21:315-20.

Stefanec T. Endothelial apoptosis: could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease? *Chest.* 2000; 117:841-54.

Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med.* 2000; 191:411-6.

Stuart LM, Lucas M, Simpson C, Lamb J, Savill J, Lacy-Hulbert A. Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. *J Immunol.* 2002; 168:1627-35.

Sundsford A, Osei A, Rosenqvist H. BK and JC viruses in patients with systemic lupus erythematosus: Prevalent and persistent BK viremia, sequence stability of the viral regulatory regions, and nondetectable viremia. *J Infect Dis.* 1999; 180:1

Suto R, Srivastava PK. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science.* 1995; 269: 1585-8.

Suzue K, Young RA. Heat shock proteins as immunological carriers and vaccines. *In*. Stress-inducible cellular responses. Birkhauser-Verlag, 1996.

Takata M, Sabe H, Hata A, Inazu T, Homma Y, Nukada T, Yamamura H, Kurosaki T. Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca<sup>2+</sup> mobilization through distinct pathways. *EMBO J*. 1994; 13:1341-9.

Talbott JH. The history of Lupus erythematosus. *In* Dubois' Lupus erythematosus, 4<sup>th</sup> Ed. Lea & Febiger, 1993, p.3.

Tan EM, Pearson CM. Rheumatic disease sera reactive with capillaries in the mouse kidney. *Arthritis Rheum*. 1972; 15:23-8.

Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J*. 1995; 14:1129-35.

Taylor PR, Carugati A, Fadok VA, Cook HT, Andrews M, Carroll MC, Savill JS, Henson PM, Botto M, Walport MJ. A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. *J Exp Med*. 2000; 192:359-66.

Theofilopoulos AN, Kono DH. The genes of systemic autoimmunity. *Proc Assoc Am Physicians*. 1999; 111:228-40.

Tincani A, Balestrieri G, Allegri F. Overview on anticardiolipin ELISA standardization. *J Autoimmun*. 2000; 15:195-197.

Topfer F, Gordon T, McCluskey J. Intra- and inter-molecular spreading of autoimmunity involving the nuclear self-antigens La (SS-B) and Ro (SS-A). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 875-9.

Traynor AE, Schroeder J, Rosa RM, Cheng D, Stefka J, Mujais S, Baker S, Burt RK. Treatment of severe systemic lupus erythematosus with high-dose chemotherapy and haemopoietic stem-cell transplantation: a phase I study. *Lancet*. 2000; 356:701-7.

Triplett DA. Lupus anticoagulant. *In* Laboratory techniques in thrombosis — a manual: 2nd revised edition of the ECAT assay procedures. Jespersen J, Bertina RM, Haverkate F, eds. 1999:183-7.

Tsokos GC, Liou SH. Immune cell signaling defects in lupus: activation, anergy and death. *Immunol Today*. 1999; 20:119-24.

Utz PJ, Hottel M, Le TM, Kim SJ, Geiger ME, van Venrooij WJ, Anderson P. The 72-kDa component of signal recognition particle is cleaved during apoptosis. *J Biol Chem*. 1998; 273:35362-70.

Vaarala O, Alfthan G, Jauhainen M, Leirisalo-Repo M, Aho K, Palosuo T. Crossreaction between antibodies to oxidised low-density lipoprotein and to cardiolipin in systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 1993; 341:923-925.

van der Zee JM, Miltenburg AM, Siebert CE, Daha MR, Breedveld FC. Antiendothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus: enhanced antibody binding to interleukin-1-stimulated endothelium. *Int Arch Allergy Immunol*. 1994; 104:131-6.

van der Zee JM, Siegert CE, de Vreede TA, Daha MR, Breedveld FC. Characterization of anti-endothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol.* 1991; 84:238-44.

Vianna JL, Khamashta MA, Ordi-Ros J. Comparison of the primary and secondary antiphospholipid syndrome: a European multicenter study of 114 patients. *Am J Med.* 1994; 96:3-9.

Viard J-P, Amoura Z, Bach J-F. Association of anti- $\beta_2$  glycoprotein I antibodies with lupus-type circulating anticoagulant and thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Am J Med.* 1992; 93:181-186.

Vincenz C, Dixit VM. Fas-associated death domain protein interleukin-1beta-converting enzyme 2 (FLICE2), an ICE/Ced-3 homologue, is proximally involved in CD95- and p55-mediated death signaling. *J Biol Chem.* 1997; 272:6578-83.

von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum.* 1995; 24:323-58.

Walker SE, McMurray RW, Hourii JM. Effects of prolactin in stimulating disease activity in systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 840:762.

Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferenz CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)<sub>2</sub> homodimer. *Cell.* 1994; 78: 343-52.

Wallace DJ. The clinical presentations of systemic lupus erythematosus. *In* Dubois' *Lupus erythematosus*, 4<sup>th</sup> Ed. Lea & Febiger, 1993, p.317.

Wallace DJ. Infection in systemic lupus erythematosus. *In* Dubois' *Lupus erythematosus*, 4<sup>th</sup> Ed. Lea & Febiger, 1993, p.454.

Walport MJ. Complement and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res.* 2002; 4 Suppl 3:S279-93.

Wangel AG, Kontiainen S, Scheinin T, Schlenzka A, Wangel D, Maenpaa J. Anti-endothelial cell antibodies in insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Exp Immunol.* 1992 ; 88:410-3.

Westphal JR, Boerbooms AM, Schalwijk CJ, Kwast H, De Weijert M, Jacobs C, Vierwinden G, Ruitter DJ, Van de Putte LB, De Waal RM. Anti-endothelial cell antibodies in sera of patients with autoimmune diseases: comparison between ELISA and FACS analysis. *Clin Exp Immunol.* 1994 ; 96:444-9.

Wick G. Atherosclerosis-an autoimmune disease due to an immune reaction against heat-shock protein 60. *Herz.* 2000 ; 25:87-90.

Wilson KL, Zastrow MS, Lee KK. Lamins and disease: insights into nuclear infrastructure. *Cell.* 2001 ; 104:647-50.

Wilson WA, Gharavi AE, Koike T. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum.* 1999; 42:1309-1311.

Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature.* 1994; 370: 270-5.



Wong HK, Kammer GM, Dennis G, Tsokos GC. Abnormal NF-kappa B activity in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus is associated with decreased p65-RelA protein expression. *J Immunol.* 1999; 163:1682-9.

Wright BH, Corton J, El-Nahas AM. Elevated levels of circulating heat shock protein 70 (Hsp70) in peripheral and renal vascular disease. *Heart Vessels.* 2000; 15: 18-22.

Wurm H.  $\beta$ 2-Glycoprotein-I (apolipoprotein H) interactions with phospholipid vesicles. *Int J Biochem.* 1984; 16:511-515.

Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 1980; 284: 555-6.

Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol.* 1984; 142: 67-77.

Wysenbeck AJ, Block DA, Fries JF. Prevalence and expression of photosensitivity in SLE. *Rheum Dis.* 1989; 48:461.

Xu Q, Kiechl S, Mayr M. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis: clinical significance determined in a follow-up study. *Circulation*. 1999; 100: 1169–1174.

Xu Q, Willeit J, Marosi M. Association of serum antibodies to heat shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet*. 1993; 341: 255–259.

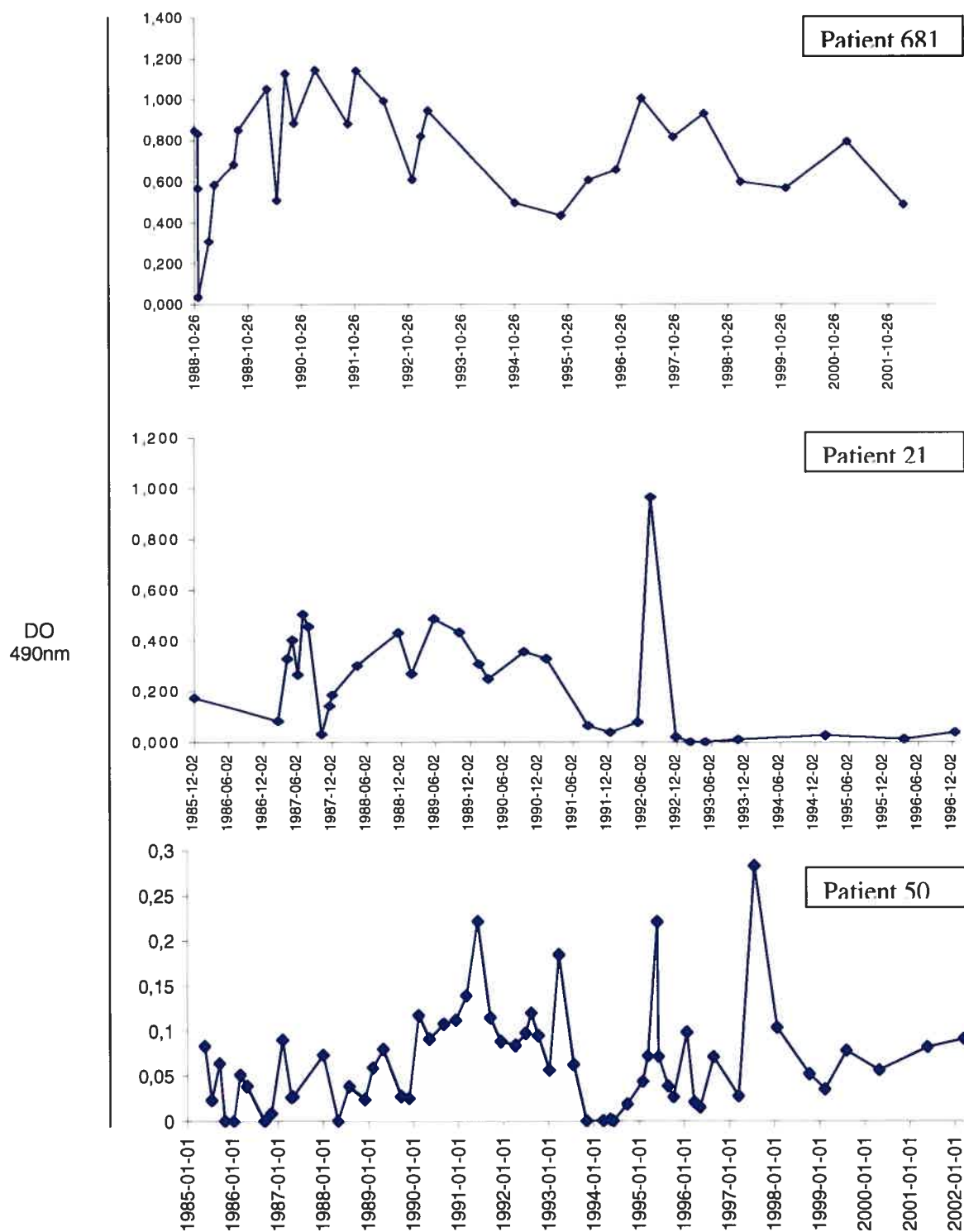
Yazici ZA, Behrendt M, Cooper D, Goodfield M, Partridge L, Lindsey NJ. The identification of endothelial cell autoantigens. *J Autoimmun*. 2000; 15:41-9.

Yoshio T, Masuyama J, Mimori A, Takeda A, Minota S, Kano S. Endothelin-1 release from cultured endothelial cells induced by sera from patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 1995; 54:361-5.

Youinou P, Meroni PL, Khamashta MA, Shoenfeld Y. A need for standardization of the anti-endothelial-cell antibody test. *Immunol Today*. 1995; 16:363-4.

Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*. 1993; 75: 641-52.

Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 1996; 183:1533-44.



**Annexe I : Étude longitudinale des titres d'anti-hsp60 des séras de 3 patients souffrant du LES (ELISA utilisant la hsp60 recombinante pure comme antigène)**

