



Causes et conséquences de l'activation de l'interféron de type I dans les maladies auto-immunes. Étude dans le modèle du syndrome de Sjögren

Nicolas Gestermann

► To cite this version:

Nicolas Gestermann. Causes et conséquences de l'activation de l'interféron de type I dans les maladies auto-immunes. Étude dans le modèle du syndrome de Sjögren. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT: 2012PA114802 . tel-00675029

HAL Id: tel-00675029

<https://theses.hal.science/tel-00675029>

Submitted on 28 Feb 2012

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

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

Ecole Doctorale 425: Innovation Thérapeutique, du fondamental à l'appliqué

Spécialité :
IMMUNOLOGIE

Année 2011-2012

SERIE DOCTORAT N°1158

THÈSE DE DOCTORAT

Le 13 janvier 2012

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS XI

par

Nicolas GESTERMANN

**Causes et conséquences de l'activation de l'interféron de type I dans
les maladies auto-immunes.**

Étude dans le modèle du syndrome de Sjögren.

Directeurs de Thèse : Pr. Corinne MICELI-RICHARD
Pr. Xavier MARIETTE

Composition du jury :

Président de jury : Pr. Marc PALLARDY
Rapporteurs : Pr. Philippe DIEUDE
: Dr. Géraldine FALGARONE
Examineurs : Dr. Lars ROGGE
: Dr. Vassili SOUMELIS

Ecole Doctorale 425: Innovation Thérapeutique, du fondamental à l'appliqué

Spécialité :
IMMUNOLOGIE

ANNÉE 2011 - 2012

SÉRIE DOCTORAT N°1158

THÈSE DE DOCTORAT

Le 13 janvier 2012

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS XI

par

Nicolas GESTERMANN**Causes et conséquences de l'activation de l'interféron de type I dans
les maladies auto-immunes.****Étude dans le modèle du syndrome de Sjögren.****Directeurs de Thèse** : Pr. Corinne MICELI-RICHARD
Pr. Xavier MARIETTE**Composition du jury :***Président de jury* : Pr. Marc PALLARDY
Rapporteurs : Pr. Philippe DIEUDE
: Dr. Géraldine FALGARONE
Examineurs : Dr. Lars ROGGE
: Dr. Vassili SOUMELIS

REMERCIEMENTS

Au terme de ce Doctorat, je dédie ce mémoire et ce travail de Thèse à la mémoire de mon père.

Mes plus vifs remerciements s'adressent au Professeur Corinne Miceli-Richard et au Professeur Xavier Mariette qui ont dirigé ce travail et sans qui ce travail n'aurait pu être réalisé. Je les remercie de m'avoir fait confiance et d'avoir forgé mon esprit scientifique. Un grand merci à Corinne, pour son soutien et son amitié sincère.

Je remercie le Professeur Marc Pallardy de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse ainsi que le Docteur Géraldine Falgarone et le Professeur Philippe Dieudé d'avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que Rapporteurs.

J'adresse également mes remerciements au Docteur Lars Rogge et au Docteur Vassili Soumelis qui ont bien voulu être Examineur de ma thèse.

Je tiens à remercier le Professeur Marc Tardieu pour m'avoir accueilli dans son laboratoire durant toutes ces années.

Je remercie Jörg Tost pour notre enrichissante collaboration scientifique.

Je remercie Marc, Rakiba, Arsène, Gaétane et Saïda, membres de l'équipe Rhumato.

Je remercie également le Docteur Christine Bourgeois pour sa profonde gentillesse, sa disponibilité et ses précieux conseils.

Une spéciale dédicace à Federico Simonetta, Abdel Kiathi, Anne Carrioux, Bamory Delembe, Michele Boniotto, Kim Martinet, Stéphane Hua pour ces belles années.

Remerciements également à Sylvie et Nadine pour les bonnes parties de rigolades ainsi que les membres du laboratoire de l'INSERM U1012

Je remercie également Larbi Amazit, Junaid A. Khan, Catherine Bellance, Julien Auffret et Audrey Roseau de l'INSERM U693.

Je remercie aussi Sean Akil Wingate qui a su m'écouter, me réconforter, me conseiller et canaliser mes angoisses.

Je remercie toute ma famille et mes amis proches pour leur soutien constant tout au long de mes études et de mon Doctorat. A ma mère, pour son écoute et son soutien, à ma tante Nicole et à ma grand-mère Ludmilla.

Enfin merci à toutes les personnes que je n'ai pas citées ici et qui se reconnaîtront dans ces quelques lignes.

Résumé

Le syndrome de Sjögren primitif (SSp) est une maladie auto-immune (MAI) systémique ayant des caractéristiques communes avec le lupus érythémateux. Ces caractéristiques incluent des mécanismes physiopathologiques et des facteurs de prédispositions génétiques. Notre équipe et d'autres groupes ont pu mettre en évidence une signature interféron (IFN) dans les glandes salivaires et les PBMCs de patients ayant un SSp. Cette découverte a permis de mettre en évidence de nouvelles voies à explorer dans la pathogénie du SLE et SSp en permettant la focalisation des recherches sur le rôle de l'immunité innée et de la voie IFN.

Nous avons confirmé le rôle de 2 gènes importants dans le SSp, impliqués dans les voies des IFN. Le premier est *IRF5* sur la voie IFN de type I et *STAT4* sur la voie IFN de type II. Nous avons pu mettre en évidence une fonctionnalité de l'allèle à risque d'*IRF5* (Polymorphisme Indel situé dans le promoteur). Concernant *STAT4*, son expression n'était pas altérée par le SNP associé à la maladie. Toutefois, l'ARNm de *STAT4* était corrélé à l'expression des gènes IFN de type I.

Les dérégulations épigénétique pourraient jouer un rôle important dans la pathogénie de nombreuses MAI, en particulier la méthylation de l'ADN qui est hautement liée à l'extinction de l'expression des gènes. Nous avons étudié la méthylation du promoteur d'*IRF5* et nous n'avons pas trouvé de régulation de ce promoteur par la méthylation. Une analyse de la méthylation avec une approche globale du méthylome est en cours dans notre équipe et permettra d'identifier de gènes cibles d'une dérégulation épigénétique pouvant être impliqués dans les MAI.

Nous avons essayé de comprendre la relation entre *STAT4* et gènes IFN de type I. Ainsi, nous rapportons que l'IL-12 induit spécifiquement l'IFN de type I par interaction entre deux partenaires cellulaires, les lymphocytes T $CD4^+$ et les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Ces résultats pourraient expliquer l'implication des polymorphismes de *STAT4* dans les MAI dépendantes de l'IFN de type I. Ces résultats suggèrent également que les MAI dépendantes des IFN de type I et II ne s'opposent pas. Elles seraient seulement le Yin et le Yang d'un facteur d'activation commun, *STAT4*, capable d'induire les IFNs de type I et II.

Abstract :

Primary Sjögren's syndrome (pSS) is a systemic autoimmune disease (AID) that presents similar characteristics to systemic lupus erythematosus. These characteristics include pathophysiology and genetic factors. Our team and other groups have highlighted an interferon (IFN) signature in salivary glands and PBMCs from patients with Sjögren syndrome. This signature demonstrates new pathways in pSS and lupus, focusing research on innate immunity and in the IFN pathway.

We have confirmed the implication of 2 genes in the pSS, and these genes are involved in the IFN pathway. The first gene is *IRF5* which is in the type I IFN pathway and the second is *STAT4* which is in the type II IFN pathway. We have shown a functional consequence of *IRF5* at-risk allele. Regarding *STAT4*, the associated SNP did not alter *STAT4* mRNA expression but was highly correlated with type I IFN genes expression.

The epigenetic deregulation could play a triggering role in autoimmune diseases, particularly through DNA methylation which is highly implicated in the suppression of gene expression. We studied the methylation of *IRF5* promoter and found no methylation. Our team is currently undertaking a global approach with methylome analysis. This methylome study will assess specific gene methylation patterns and will allow a better understanding of the role of these genes in autoimmune diseases.

We further demonstrated that IL-12 specifically induces a type I IFN signature through a CD4⁺ T cells and pDCs crosstalk. These results could explain the implication of *STAT4* polymorphism not only in type II IFN-dependent AIDs but also in type I IFN-dependent AIDs. Our data confirm that type I IFN- and type II IFN-mediated AIDs do not have to be opposed. They are only the yin and the yang of a common *STAT4* activation which may induce secretion of both cytokines.

Sommaire

1.	INTRODUCTION	15
1.1.	IMMUNITE INNEE	15
1.1.1.	Les différents types d'interférons.....	15
1.1.2.	L'interféron de type I	16
1.1.3.	La reconnaissance des agents pathogènes	17
1.1.3.1.	TLRs membranaires	18
1.1.3.2.	TLRs intracellulaires	21
1.1.4.	Voie de signalisation de l'IFN de type I.....	25
1.2.	LE SYNDROME DE SJOGREN PRIMITIF.....	26
1.2.1.	Généralités.....	26
1.2.2.	Le syndrome de Sjögren primitif	29
1.2.2.1.	La cellule épithéliale salivaire : cellule cible de l'auto-immunité.....	34
1.2.2.1.1.	L'activation in situ des cellules épithéliales au cours du SSp.....	34
1.2.2.1.2.	Fonction immunologique de la cellule épithéliale salivaire	36
1.2.2.2.	Facteurs infectieux	37
1.2.2.3.	Facteurs hormonaux	41
1.2.2.4.	Vieillessement.....	42
1.3.	LA SIGNATURE INTERFERON	43
1.4.	MALADIES AUTO-IMMUNES ET GENETIQUE	47
1.4.1.	Rôle des facteurs génétiques de prédisposition.....	47

1.4.2.	Le syndrome de Sjögren et le facteur de régulation de l'IFN 5 (IRF5)	47
1.4.3.	Maladies auto-immunes et STAT4	53
1.4.4.	Epistasie entre IRF5 et STAT4	56
1.5.	EPIGENETIQUE	58
1.5.1.	Historique de l'épigénétique	58
1.5.2.	Définition de l'épigénétique	58
1.5.3.	Modification et mécanismes épigénétique	59
1.5.3.1.	Méthylation de l'ADN	59
1.5.3.2.	Modifications des histones	61
1.5.3.3.	Micro-ARN	63
1.5.4.	Epigénétique et Maladies auto-immunes	66
1.6.	LIEN ENTRE L'IMMUNITE INNEE ET L'IMMUNITE ADAPTATIVE	68
1.6.1.	STAT4 et voie TH1	68
1.6.1.1.	Les STATs.....	68
1.6.1.2.	Signal de transduction et d'activation de la transcription 4 (STAT4).....	70
1.6.1.3.	L'interleukine 12	72
1.6.1.4.	Le récepteur à l'interleukine 12.....	74
1.6.1.5.	Voie de signalisation de l'interleukine 12 et STAT4	75
1.6.2.	STAT4 et voie interféron de type I	76
2.	OBJECTIFS	81
3.	RESULTATS	84

3.1.	ARTICLE 1	84
3.2.	ARTICLE 2	93
3.3.	ARTICLE 3	103
3.4.	ARTICLE 4	128
4.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	161
5.	BIBLIOGRAPHIE	189

Liste des abréviations

5-AzaC	:	5-Aza Cytidine
ADN	:	A cide D eoxyribo N ucléique
ARN	:	A cide R ibo N ucléique
ARN simple brin	:	ARN ss
ARN double brin	:	ARN ds
BAFF	:	F acteur d' A ctivation des lymphocytes B
CD	:	C luster de D ifférenciation
CMH	:	C omplexe M ajeur d' H istocompatibilité
CpG	:	2'-deoxyribo (C ytidine- P hosphate- G uanosine)
DC	:	C ellules D endritiques
DNMT	:	ADN M éthyl T ransférase
EBV	:	E pstein B arr V irus
GWAS	:	G enetic W ide A ssociation
HAT	:	H istones A cétyl T ransférase
HDAC	:	H istones D é A cétylase
HSV-1	:	H erpes S implex V irus type I
HTLV-1	:	H uman T cell L eukemia V irus type 1
R-848	:	R esiquimod
IFIT1	:	I nter F eron- I nduced protein with T etratricopeptide repeats 1
IFITM1	:	I nter F eron I nduced T rans M embrane protein 1
IFN	:	I nter F é R o N
IFNAR	:	I FN- A lpha R écepteur
IFNGR	:	I FN- G amma R écepteur
IL	:	I nter L eukine
InDel	:	I nsertion D élétion
IPCs	:	C ellules D endritiques I mmatures
IRF	:	F acteur de R égulation de l' I nterféron
ISGF3	:	F acteur de S timulation du G ène de l' I FN 3
ISRE	:	E léments de R éponse à la S timulation de l' I nterféron
JAK	:	J A N us K inase
KO	:	K nock- O ut
LES	:	L upus E rythémateux S ystémique
LPS	:	L ipo P oly S accharide
MIP-1	:	P rotéines I nflammatoire de M acrophages
MiARNs	:	M icro- ARN s
Mx1	:	M y X ovirus (virus influenza) resistance 1
NDV	:	N ewcatle D isease V irus (paramixovirus)
NES	:	S ignal d' E xportation N ucléaire
NK	:	C ellules N atural K iller

NLR	:	R écepteurs N OD
NLS	:	S ignal de L ocalisation N ucléaire
NOD	:	N on O bèse D iabète
PAMPs	:	P athogen- A ssociated M olecular P atterns
PBMCs	:	C ellules M ononuclées du S ang P ériphérique
pDCs	:	C ellules D endritiques P lasma cy toïdes
PKR	:	R NA-activated P rotein K inase
Poly (I:C)	:	Acide P oly I nosinic-poly C ytidylic
PR	:	P olyarthrite R humatoïde
PRR	:	P attern R ecognition R eceptor
RANTES	:	R égulation sous A ctivation des lymphocytes T N ormal E xprimés et S écrétés
RIG-I	:	R etinoic-acid- I nducible protein 1
RISC	:	C omplexe I nduisant l'inhibition des A RNs)
RLR	:	R écepteurs R IG-I
SAPS	:	S yndrome A sthénie, P olyalgies, S icca
SEP	:	S clérose E n P laque
SGECs	:	C ellules de G landes E pithéliales S alivaires
SH2	:	Domaine d' H omologie S RC 2
SNP	:	S ingle N ucleotide P olymorphism
SOCS	:	M embres S uppressif de la S ignalisation des C ytokines
SSp	:	S yndrome de S jögren P rimitif
STAT	:	S ignals de T ransduction et d' A ctivation de la T ranscription
T _H 1	:	Lymphocyte T H elper 1
TH17	:	Lymphocyte T H elper produisant de l' I L- 17
TLR	:	R écepteurs T oll-like
TNF	:	T umor N ecrosis F actor A lpha
TYK2	:	T Y rosine K inase 2
VHC	:	V irus de l' H épatite C
VIH	:	V irus de l' I mmunodéfici en ce H umaine
LINE	:	L ong I nterspersed N uclear E lement 1

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

1.1. IMMUNITE INNEE

1.1.1. Les différents types d'interférons

Tous les interférons (IFN) sont nommés d'après leur capacité à stimuler l'activation d'un large panel de gènes antiviraux et également par leur efficacité à interférer avec la propagation et la réplication virale (Katze, He et al. 2002). Il y a 2 catégories d'interférons, l'IFN de type I et l'IFN de type II. Ces 2 classes d'interférons correspondent à leur capacité à se fixer sur 2 récepteurs de surface cellulaire distincts. Il y a le récepteur de l'IFN- α (IFNAR), qui possède 2 sous unités (IFNAR1 et IFNAR2) et il y a le récepteur de l'IFN type II (IFN- γ) qui est composé de 2 chaînes IFN gamma récepteur (IFNGR): IFNGR1 et IFNGR2 (Stark, Kerr et al. 1998) . Les récepteurs de l'IFN ont en commun l'activation des Janus Kinases (JAK) et des signaux de transduction et d'activation de la transcription (STAT) qui leur permettent de réguler l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire (Levy and Darnell 2002).

Comme énoncé avant, tous les interférons induisent des mécanismes de défense antivirale quand ils sont ajoutés dans le milieu de culture. Néanmoins ces 2 types d'IFNs ont des rôles bien distincts dans la réponse immunologique. L'activité prédominante de l'IFN de type I est d'induire les cellules de l'immunité antivirale. A l'opposé, l'IFN- γ a des fonctions prédominantes sur les macrophages pour induire l'activation des cellules qui permettent un état microbicide contre les pathogènes non viraux et contre les éléments intracellulaires du non soi.

En accord avec leurs activités anti-pathogène intracellulaire, à la fois l'IFN de type I et de type II sont capables de participer à la polarisation des cellules T helper (T_H1).

De toutes les cytokines membres de la famille des IFN type I de classe II α -hélicoïdale aussi bien chez l'homme que chez la souris, l'IFN- α et l'IFN- β sont les mieux caractérisés et les plus fréquemment exprimés (Decker, Muller et al. 2005). D'autres types d'IFN ont été moins bien caractérisés, car ils pourraient être tissus spécifiques et ne pas être représentés dans toutes les espèces.

1.1.2. L'interféron de type I

L'IFN de type I a été décrit maintenant il y a plus de 50 ans comme facteur responsable du phénomène de l'interférence virale¹.

Les IFNs de type I font partie d'une famille de gènes qui compte environ 20 membres, avec des variations en fonction des espèces de mammifères. Le génome des mammifères contient les gènes de l'IFN- α , l'IFN- β , l'IFN- ω , l'IFN- κ et l'IFN- ϵ . De plus, l'IFN- ζ (aussi connu sous le nom de limitin) est un IFN de type I qui jusqu'à maintenant n'a été décrit que chez la souris, tandis que l'IFN- τ et l'IFN- δ sont retrouvés respectivement chez les ongulés et le porc (Hardy, Owczarek et al. 2004; Pestka, Krause et al. 2004; van Pesch, Lanaya et al. 2004).

L'IFN- β ne possède qu'un seul gène chez les mammifères alors que la famille de l'IFN- α est formée de 13 gènes fonctionnels chez l'homme et de 14 gènes chez la souris. L'impact biologique de beaucoup de ces gènes reste encore inconnu. L'activité des protéines de l'IFN- α diffère mais une bonne corrélation est habituellement trouvée entre leurs activités antivirales et antiprolifératives (van Pesch, Lanaya et al. 2004). En contraste, il y a une importante différence dans la capacité des différentes protéines de l'IFN- α à activer les cellules « natural killer » (NK). En effet, le cas de l'IFN- α 7 humain est le plus marquant car il perd complètement cette capacité d'activation (Pestka, Krause et al. 2004). En prenant en compte que tous les différents types d'IFN- α ont la capacité de se fixer sur le même

récepteur, il n'est pas encore bien compris pourquoi ces différents types d'IFN- α ont des effets différents.

Une importante conséquence de ces différents IFN de type I pourrait être liée à la régulation de leur expression. Les cellules épithéliales et fibroblastes produisent de l'IFN de type I en réponse à une infection virale (Bogdan, Mattner et al. 2004). En contraste, l'IFN- γ est produit principalement par les lymphocytes T et les cellules NK, ces derniers types cellulaires n'étant pas connus pour produire de l'IFN de type I.

1.1.3. La reconnaissance des agents pathogènes

Il est important de noter à ce stade de la Thèse que les 3 lauréats de l'année 2011 pour le prix Nobel de médecine ont permis de progresser de façon majeure dans la compréhension des mécanismes de reconnaissance des agents pathogènes par l'immunité innée : Bruce Beutler et Jules Hoffmann qui ont découvert les protéines réceptrices qui reconnaissent les micro-organismes et activent le système immunitaire, première étape de la réponse immunitaire de l'organisme. Ralph Steinman a découvert les cellules dendritiques du système immunitaire et leur capacité unique à activer et réguler l'immunité adaptative, dernière étape de la réponse immunitaire.

Les mammifères ont mis en place au cours de leur évolution des stratégies très perfectionnées afin de se protéger en détectant des pathogènes étrangers. La découverte des récepteurs Toll-like (TLRs) a pu montrer que la reconnaissance de ces pathogènes par l'immunité innée était hautement spécifique, reposant sur l'identification de motifs par des récepteurs putatifs nommé PRR (Pattern recognition receptor). Les PRR ont évolué afin de détecter les composants de pathogènes étrangers liée à la présence de ces motifs conservés à leur surface que l'on appelle les PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) (Akira, Takeda et al. 2001; Janeway and Medzhitov 2002). Les TLRs sont des protéines transmembranaires de type I possédant des répétitions d'ectodomains, des leucines qui

médient la reconnaissance des PAMPs, des domaines transmembranaires et un domaine récepteur intracellulaire Toll-interleukine (IL) 1 requis pour une répression de la transduction du signal. Actuellement, il y a 10 et 12 TLRs fonctionnels qui ont été identifiés chez l'homme et la souris respectivement, avec TLR1 à TLR9 commun pour les 2 espèces. Après la découverte des TLRs, plusieurs classes de PRRs cytosoliques, incluant des récepteurs RIG-I (RLRs) et les récepteurs NOD (NLR), ont été mis en évidence. La famille des RLR est représentée par 3 membres – RIG-I, Mda5 et LGP2 – qui ont la propriété de détecter les virus à ARNm (Yoneyama and Fujita 2009). La famille des NLR est composée de plus de 20 membres dont plusieurs répondent à de nombreux PAMPs, des particules non-PAMPs et de stress cellulaires qui ciblent la réponse proinflammatoire, incluant la sécrétion d'IL-1 β (Stetson and Medzhitov 2006; Yoneyama and Fujita 2009). Ces PRRs sont exprimés par beaucoup de types cellulaires.

Les TLRs sont divisés en 2 sous groupes dépendant de leurs localisations cellulaires et de leurs ligands respectifs. Le premier groupe est composé de TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR11, lesquels sont exprimés sur la surface des cellules et reconnaissent principalement des composants de membranes microbiennes comme les lipides, les lipoprotéines et les protéines. Le second groupe est composé de TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9, lesquels sont exprimés exclusivement dans des vésicules intracellulaires comme le réticulum endoplasmique, les endosomes, les lysosomes et les endolysosomes, où ils reconnaissent les acides nucléiques microbiens.

1.1.3.1. TLRs membranaires

Certains TLRs membranaires peuvent jouer un rôle dans l'induction d'IFN de type I.

TLR4 a été identifié comme le récepteur qui répond au lipopolysaccharide (LPS) des bactéries qui est un composant des bactéries à Gram négatif et qui peut causer un choc septique (Figure 1) (Akira, Uematsu et al. 2006). TLR4 forme un complexe avec MD2 sur la

surface de la cellule et en association ils permettent la liaison au LPS. La formation de ce récepteur multimérique est composée de 2 complexes TLR4-MD2-LPS qui permettent l'initiation de la phase précoce de l'activation de la voie IFN de type I en recrutant des molécules adaptatrices intracellulaires comme TRAM et TRIF une fois que le complexe est internalisé. Vient ensuite une dimérisation du facteur de régulation de l'interféron (IRF) 3 qui transloquera dans le noyau et activera la transcription de l'IFN de type I.

TLR2 est lui impliqué dans une large reconnaissance de PAMPs dérivés des bactéries, champignons, parasites et virus (Figure 1) (Coban, Igari et al.). Ceci inclut les lipopeptides de bactéries, le peptidoglycane et l'acide lipotechoïque des bactéries à Gram positif, lipoarabinomannose de mycobactéries, zymosan de champignons, tGPI-mucin de *Trypanosoma cruzi* et la protéine hémagglutinine du virus measles. TLR2 forme généralement un hétérodimère avec TLR1 ou TLR6. Spécifiquement, l'hétérodimère TLR1-TLR2 reconnaît les lipopeptides des bactéries à Gram négatif et mycoplasmes ; tandis que l'hétérodimère TLR6-TLR2 reconnaît des lipopeptides de bactéries à Gram positif et mycoplasmes. D'autre part, TLR2 possède la capacité d'agir avec d'autres corécepteurs sur la surface cellulaire assistant la reconnaissance des PAMPs. Ces corécepteurs incluent CD36, lesquels agissent ensemble avec l'hétérodimère TLR2-TLR6 pour permettre la détection de quelques-uns des agonistes de TLR2, et la dectine-1, un type-C de lectine qui lie de β -glucan fongique ayant pour conséquence l'induction de son internalisation (Hoebe, Georgel et al. 2005). Longtemps les agonistes de TLR2 ont été considérés comme induisant directement la production de cytokines inflammatoires et non de l'interféron type I dans les macrophages et DCs. Il a été montré ultérieurement que TLR2 avait la capacité de pouvoir déclencher la production d'interféron de type I dans des monocytes durant la réponse à une infection virale du type Vaccina virus (Barbalat, Lau et al. 2009). Ceci suggère que TLR2 a un rôle différent selon le type cellulaire pendant une infection virale. Il semble que les acides nucléiques, lesquels sont

habituellement responsable de la production d'IFN de type I, ne participent pas à l'activation de TLR2.

TLR5 a la propriété de reconnaître la protéine de la flagelline composant des bactéries à flagelle (Figure 1) (Akira, Uematsu et al. 2006). Les cellules dendritiques CD11c⁺CD11b⁺ de la lamina propria du petit intestin expriment fortement le TLR5 (Jin, Kim et al. 2007). Les cellules dendritiques de la lamina propria sont uniques pour promouvoir l'induction des lymphocytes T helper produisant de l'IL-17 (T_H17), ainsi que la différenciation de lymphocytes B naïfs en cellules plasmiques productrices immunoglobulines (Ig) A en réponse à la flagelline (Uematsu, Fujimoto et al. 2008). De plus, les cellules dendritiques de la lamina propria sont capables de produire des acides rétinoïques, lesquels facilitent la réponse humorale et la réponse immunitaire cellulaire. Le rein et la vésicule biliaire possède une forte expression de TLR11 chez la souris, lequel est l'équivalent à TLR5 chez l'homme. TLR11 permet la reconnaissance des composants bactériens uropathogéniques du fait que les souris TLR11 knock-out sont susceptibles aux infections avec ces bactéries (Zhang, Zhang et al. 2004).

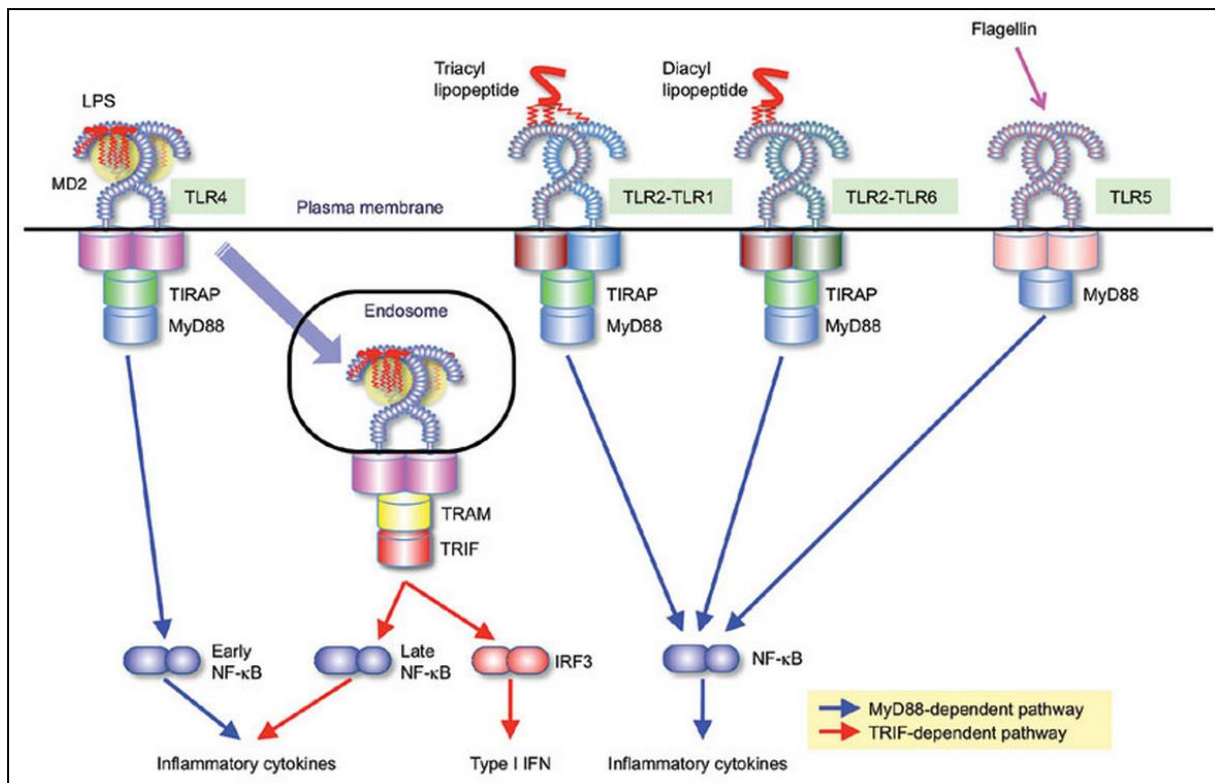


Figure 1. Représentation des TLRs membranaire : TLR4 et TLR2 sont retrouvés sur les monocytes et macrophages. Les cellules dendritiques de la lamina propria $CD11c^{+}$ $CD11b^{+}$ dans le petit intestin exprime fortement TLR5. Kawai & Akira. Nat Immunol, Vol 11 (5) 373-384. 2010

1.1.3.2. TLRs intracellulaires

TLR3 était originellement identifié comme reconnaissant un analogue synthétique de l'ARN double brin comme l'acide polyinosinic-polycytidylic (poly (I:C)), lequel mime l'infection virale et est capable d'induire une réponse immunitaire anti-virale par la production à la fois d'interféron de type I et de cytokines inflammatoires (Figure 2). Les mécanismes de reconnaissance de TLR3 ont été élucidés par une analyse structurale de l'ectodomaine de TLR3, partie capable de fixer l'ARN double brin. L'ectodomaine de TLR3 est formé d'un large « fer à cheval » qui a la particularité d'augmenter sa surface de détection et faciliter la reconnaissance des ARN doubles brins. Les ARN doubles brins se lient à 2 sites différents au niveau des régions N et C sur la face latérale de la surface convexe de l'ectodomaine de TLR3, lequel fournit assez de stabilité pour permettre au TLR3 de former

un homodimère via sa région C-terminale. En plus de pouvoir reconnaître le poly (I:C), TLR3 reconnaît l'ARN génomique de Reovirus, l'ARN double brin produit durant la réplication virale ainsi que l'ARN simple brin, le virus responsable de l'encéphalomyocardite, le virus West Nile ainsi que certains petits ARN interférants (Akira, Uematsu et al. 2006; Kawai and Akira 2008). TLR3 déclenche la réponse immunitaire antivirale à travers la production d'IFN de type I et de cytokines inflammatoires, suggérant que TLR3 a un rôle essentiel dans la prévention des infections virales. D'autre part, les souris knock-out pour TLR3 sont susceptibles aux infections létales associées au Cytomegalovirus murin (Tabeta, Georgel et al. 2004) et la déficience de TLR3 chez l'homme est associée à une susceptibilité à l'Herpes simplex virus type I (HSV-1) (Zhang, Jouanguy et al. 2007).

TLR7 a quant à lui été identifié comme reconnaissant les dérivés imidazoquinolines comme l'imiquimod et le resiquimod (R-848) ainsi que les analogues de guanine comme la loxoribine (laquelle possède des propriétés antivirales et antitumorales), reconnaissant également les ARN doubles brins de virus à ARN comme le virus influenza A et le virus de l'immunodéficience humaine (Figure 2) (Akira, Uematsu et al. 2006; Kawai and Akira 2006). TLR7 a donc la faculté de pouvoir reconnaître les poly U d'ARN synthétiques et ainsi que certains petits ARN interférants (Hornung, Guenther-Biller et al. 2005). Une très forte expression de TLR7 est retrouvée dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs), lesquelles sont capables de produire de très grandes quantités d'interféron de type I en réponse à une infection virale. Cette induction de cytokines par les pDCs en réponse aux infections virales est totalement dépendante de TLR7 (Janeway and Medzhitov 2002; Akira, Uematsu et al. 2006), ce qui suggère que TLR7 agit comme détecteur des infections par des virus à ARN simple brin. De plus, TLR7 est exprimé sur les cellules dendritiques conventionnelles (cDCs) leur permettant de détecter des ARN provenant de bactéries appartenant par exemple au groupe des Streptococcus et donc de produire de l'interféron de

type I (Mancuso, Gambuzza et al. 2009). La reconnaissance de virus à travers TLR7 dans les pDCs se produit de manière indépendante de la réplication virale. Les virus sont internalisés et recrutés au niveau des endolysosomes, puis la reconnaissance des simples brins ARN par TLR7 et l'initiation de la réponse antivirale peut s'enclencher. D'autre part, TLR7 peut détecter la réplication de virus qui entrent dans le cytoplasme par autophagie. Ce procédé implique la formation de vésicules à double membrane appelé autophagosomes. Les pDCs qui ont une perte de capacité de la formation d'autophagie, liés à une mise en défaut de la protéine Atg5, ont une incapacité à former des autophagosomes et montrent un défaut de production d'IFN- α après infection virale (Lee, Lund et al. 2007). La formation d'autophagosomes dans la pDCs a été montrée comme constitutive. Ces découvertes suggèrent que l'autophagie des pDCs est intimement liée à sa capacité de détecter les ARN en cours de réplifications dans le cytosol afin d'amener l'ARN viral au lysosome, où TLR7 participe à leur reconnaissance et permet l'initiation de la réponse antivirale.

TLR8 est phylogénétiquement plus similaire à TLR7. Chez l'homme, le TLR8 permet la reconnaissance de R-848 et de l'ARN viral simple brin. En contraste avec les souris TLR7^{-/-}, les souris TLR8^{-/-} répondent normalement à leurs agonistes (Akira, Uematsu et al. 2006; Kawai and Akira 2006). TLR8 est exprimé dans de nombreux tissus, avec sa plus importante expression dans les monocytes. Son expression est fortement induite après infection bactérienne.

TLR9 permet la reconnaissance de motif tel que le 2'-deoxyribo (cytidine-phosphate-guanosine) (CpG) non méthylé qui est fréquemment présent dans les bactéries et les virus mais peu présent chez les cellules de mammifères (Figure 2). Le CpG synthétique fonctionne comme ligand du TLR9 et active directement les cellules dendritiques, les monocytes, les lymphocytes B, et conduit ainsi à une forte réponse T_H1 (Akira, Uematsu et al. 2006). La structure glucosidique de l'ADN, 2'-desoxyribose, est importante dans la reconnaissance par le

TLR9 quand les oligonucleotides de l'ADN ont une structure phosphodiester (Haas, Metzger et al. 2008). Les cellules exprimant fortement TLR9 sont les pDCs leur permettant de détecter des infections de virus à ADN dans les lysosomes (murine cytomegalovirus, HSV1 et HSV2) (Akira, Uematsu et al. 2006; Kawai and Akira 2006). En addition à la reconnaissance de l'ADN, TLR9 reconnaît directement le crystal non soluble de l'hémozoïne, lequel est généré par un produit dérivé du procédé de détoxification après digestion de l'hémoglobine infectée par *Plasmodium falciparum* (Coban, Igari et al.).

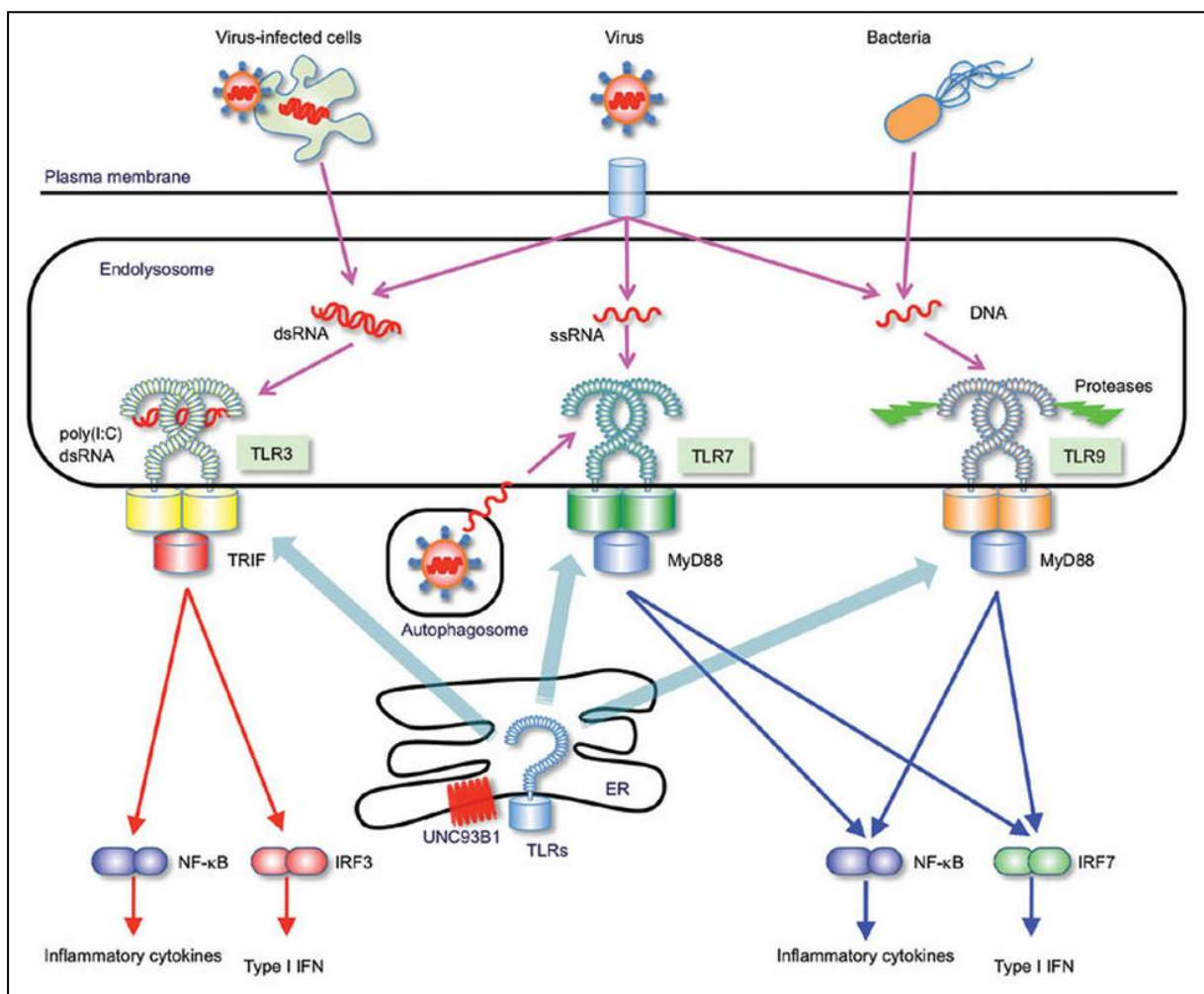


Figure 2. Représentation des TLRs intracellulaires : TLR9 et TLR7 sont retrouvés fortement exprimés dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Kawai & Akira. Nat Immunol, Vol 11 (5) 373-384, 2010.

1.1.4. Voie de signalisation de l'IFN de type I

La transduction du signal de l'IFN de type I passe par le récepteur à l'interféron alpha (IFNAR). Ce récepteur se compose de deux chaînes – IFNAR1 et IFNAR2 – qui sont en permanence associés respectivement avec les membres de la famille des protéines Janus tyrosine kinase 2 (TYK2) et JAK1 (Figure 3). La liaison du ligand sur IFNAR stimule l'activation des Janus kinases et entraîne la phosphorylation du complexe/récepteur dans sa partie cytoplasmique. Ainsi, le motif de phospho-tyrosine va permettre le recrutement de STAT1 et STAT2. Les Janus kinases vont ensuite permettre la tyrosine phosphorylation des protéines STATs qui ont été mobilisées. Le facteur de stimulation du gène de l'IFN 3 (ISGF3) est un hétérodimère STAT1-STAT2 qui est complexé avec le facteur de régulation de l'IFN (IRF) 9. L'ISGF3 s'associe à une séquence d'ADN qui est connue comme un élément de réponses à la stimulation de l'IFN (ISRE) trouvée dans le promoteur de beaucoup de gènes qui répondent à la stimulation de l'IFN de type I (ISGs). L'ISGF3 est donc directement impliqué dans l'expression des ISGs (Pestka, Krause et al. 2004). Parmi les ISGs induit par l'IFN de type I on peut citer : Myxovirus (virus influenza) resistance 1 (Mx1), RNA-activated Protein Kinase (PKR), InterFeron Induced TransMembrane protein 1 (IFITM1), InterFeron-Induced protein with Tetratricopeptide repeats 1 (IFIT-1). Ces gènes sont le reflet de l'activation de l'IFN de type I et sont souvent utilisés comme témoin de la signature IFN de type I (Kariuki, Kirou et al. 2009).

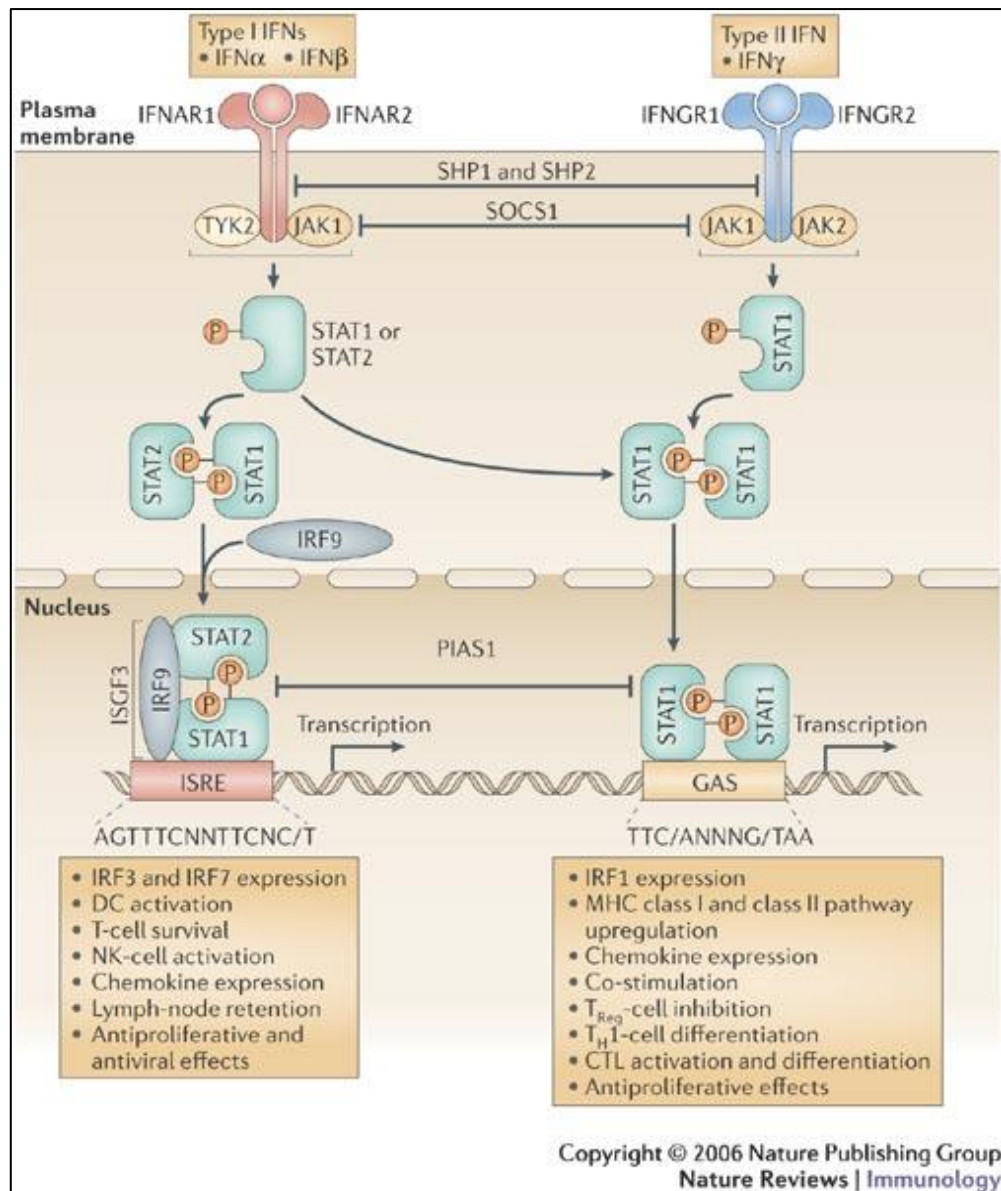


Figure 3. Activation de la voie IFN de type I : De la fixation de l'IFN- α/β à l'induction de ses gènes cibles via le complexe ISGF3. Dunn et al. Nat Rev Immunol. 6, 836–848, 2006.

1.2. LE SYNDROME DE SJOGREN PRIMITIF

1.2.1. Généralités

Les maladies auto-immunes, spécifiques d'organes et systémiques réunies, sont peu connues du grand public et constituent pourtant la 3ème cause de morbidité en Europe Occidentale. A ce jour plus de 80 maladies auto-immunes ont été individualisées. Les maladies auto-immunes d'organe les plus courantes sont le diabète de type I, la thyroïdite

d'Hashimoto (hypothyroïdie), la maladie de Basedow (hyperthyroïdie), la sclérose en plaques et le syndrome de Guillain Barré. Les pathologies auto-immunes systémiques les plus communes sont le lupus érythémateux disséminé, la polyarthrite rhumatoïde et le syndrome de Sjögren.

Les maladies auto-immunes sont des pathologies touchant 4 à 5% de la population occidentale. Ce sont principalement des atteintes chroniques qui résultent d'une rupture de tolérance des lymphocytes B et des lymphocytes T vis-à-vis des antigènes du soi.

On considère les maladies auto-immunes comme étant des affections multifactorielles complexes impliquant des facteurs génétiques et environnementaux. Plusieurs facteurs peuvent favoriser l'émergence de pathologies auto-immunes. Bien que plusieurs éléments suggèrent un rôle important de la composante génétique dans la prédisposition aux maladies auto-immunes comme par exemple, une taux de concordance de ces maladies entre jumeaux monozygotes plus élevé qu'entre jumeaux dizygotes ou qu'entre membre d'une même fratrie, les facteurs environnementaux semblent jouer un rôle non négligeable dans la survenue des maladies auto-immunes. Ils ont pu être mis en évidence grâce à des études de populations génétiquement homogènes mais vivant dans des conditions environnementales différentes. En effet, il existe ce que l'on appelle un gradient Nord-Sud de répartition de certaines maladies auto-immunes.

C'est le cas par exemple, du diabète de type I et de la sclérose en plaque (SEP) dont l'incidence diminue du Nord au Sud dans l'hémisphère Nord et du Sud au Nord dans l'hémisphère Sud (Kurtzke 2000; Green and Patterson 2001). L'importance des facteurs environnementaux est confirmée par le taux de concordance des maladies auto-immunes chez les jumeaux monozygotes, qui n'est que de 15 à 40% (Barnett, Eff et al. 1981; Deapen, Escalante et al. 1992; Kaprio, Tuomilehto et al. 1992). Les gènes ne sont donc pas à eux seuls responsables du développement de ces maladies. On suppose en effet que les maladies auto-

immunes trouvent leur origine dans l'association d'un terrain génétique favorable et d'éléments déclencheurs extérieurs.

Ces dernières années, de nouveaux concepts ont été élaborés permettant une meilleure compréhension de la physiopathologie des maladies auto-immunes qui, schématiquement, se déroule en deux temps. Tout d'abord, il existe une rupture de tolérance du système immunitaire vis-à-vis des antigènes du soi, secondaire à un facteur déclenchant environnemental notamment infectieux sur un terrain génétique prédisposé mettant ainsi en jeu l'immunité innée. Ensuite, la réponse auto-immune se pérennise avec mise en jeu des cellules de l'immunité adaptative, en particulier les lymphocytes T et B. Les cytokines et chimiokines interviennent, quant à elles, à chacune de ces étapes. Par ailleurs, le rôle de la cellule cible de l'auto-immunité (appelée également cellule résidente) a récemment été mis en avant, parce qu'elle présenterait un dysfonctionnement primitif responsable de l'activation du système immunitaire aboutissant à sa destruction.

Les travaux de recherche d'interface en lien direct avec les services cliniques prenant en charge les maladies auto-immunes abordent ces différents domaines par des études génomiques, cellulaires (lymphocytes ou cellules cibles) ou cytokiniques en utilisant donc du matériel humain provenant des patients. Ce type de travaux, associés aux travaux de recherche plus fondamentaux, ont permis de décrypter certains mécanismes immunopathologiques aboutissant rapidement à l'identification de cibles thérapeutiques et à des traitements spécifiques appartenant à la famille des biothérapies.

Dans ce travail, nous nous sommes focalisés sur une maladie auto-immune, le syndrome de Sjögren primitif (SSp) qui constitue un modèle d'étude intéressant et par lequel il est possible d'aborder de nombreux aspects physiopathologiques des maladies auto-immunes.

1.2.2. Le syndrome de Sjögren primitif

Le SSp est une maladie auto-immune systémique qui se caractérise par une sécheresse oculaire et buccale, une infiltration lymphocytaire des glandes salivaires et lacrymales ainsi que par la production d'auto-anticorps. La triade symptomatique comporte : la sécheresse, la fatigue et les polyarthralgies.

Avec une prévalence de 0,1 à 0,4% de la population (Bowman, Ibrahim et al. 2004) et un pic de fréquence de début vers l'âge de 50 ans, le SSp à la deuxième maladie auto-immune après la polyarthrite rhumatoïde. L'incidence est évaluée à 4 à 5 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants. Le SSp touche préférentiellement les femmes (sexe ratio de neuf femmes pour un homme).

Le SSp peut exister de manière isolée ou être associé à d'autres maladies auto-immunes (SS secondaire ou associé). Cette maladie, qui se caractérise par une sécheresse oculaire et buccale très invalidante, peut affecter l'ensemble des glandes exocrines. Il s'agit d'une véritable maladie systémique puisque les atteintes ne se restreignent pas à un seul tissu : le rein, les poumons ainsi que le système nerveux peuvent être touchés.

Au plan biologique, on observe une augmentation sérique de la cytokine BAFF ainsi qu'une activation lymphocytaire B importante se traduisant par une hypergammaglobulinémie, une augmentation des IgG sériques, la présence d'auto-anticorps tels que les anticorps anti-SSA et anti-SSB ainsi que la positivité du facteur rhumatoïde. Le SSp est par ailleurs au confluent de l'auto-immunité et des lymphoproliférations B malignes puisque 5% des patients développent un lymphome avec un risque relatif de 15 à 40 (Royer, Cazals-Hatem et al. 1997; Ioannidis, Vassiliou et al. 2002; Zintzaras, Voulgarelis et al. 2005; Ekstrom Smedby, Vajdic et al. 2008) correspondant à l'association la plus élevée des maladies auto-immunes avec le lymphome.

Les chaînes libres et la bêta-2-microglobuline sériques, deux marqueurs biologiques de l'activation du lymphocyte B, sont augmentées avec une association entre un taux de bêta-2-microglobuline élevé et la présence de complications systémiques correspondant aux SSp les plus graves (Gottenberg, Busson et al. 2005 ; Gottenberg, Aucouturier et al. 2007).

Parmi les maladies auto-immunes, le SSp constitue un modèle d'étude particulièrement intéressant par plusieurs aspects :

- au plan clinique, cette maladie est à la croisée des maladies auto-immunes spécifiques d'organe et des maladies systémiques.
- au plan épidémiologique, c'est la deuxième maladie auto-immune systémique par ordre de fréquence derrière la polyarthrite rhumatoïde
- au plan physiopathologique, tous les mécanismes immunopathologiques des maladies auto-immunes sont rencontrés dans le SSp. L'immunité innée et l'immunité adaptative sont donc impliquées.
- cette maladie est au croisement de l'auto-immunité et du lymphome.
- au plan pratique, l'accès au tissu cible est aisé et peu invasif car nécessaire au diagnostic

Ces arguments font du SSp un excellent modèle d'étude des maladies auto-immunes.

Le service de Rhumatologie de l'hôpital Bicêtre est un centre de référence pour le SSp avec une consultation pluridisciplinaire impliquant tous les praticiens concernés (rhumatologues, psychiatres, ophtalmologues, ORL, stomatologie) et la réalisation d'examens biologiques permettant le diagnostic de SSp. Au terme de ces investigations, le diagnostic de SSp peut être porté. Enfin, les patients peuvent participer avec leur accord à des études de recherche translationnelle comme celle qui sera présentée dans ce travail. Peuvent alors être prélevés des échantillons de sérums, d'ADN et de salive de patients.

Le diagnostic de la maladie est porté selon les critères du groupe de consensus Européen-Américain (Vitali, Bombardieri et al. 2002). Un syndrome appelée « Syndrome asthénie, polyalgies, sicca » (SAPS) proche de la fibromyalgie est caractérisé par la présence d'un syndrome sec subjectif mais aussi parfois objectif sans signes d'auto-immunité sérique ou histologique (Mariette, Caudmont et al. 2003). Les diagnostics sont validés selon une procédure impliquant les praticiens seniors du service de rhumatologie de l'hôpital Bicêtre. On précise pour chaque patient s'il s'agit d'un SSp strictement glandulaire ou d'un SSp avec atteinte systémique (forme extra-glandulaire), plus grave.

La définition du SS primitif a longtemps souffert de l'absence de critères diagnostiques précis et reconnu par tous. Ceci est important car les symptômes présentées par les malades – la sécheresse, la fatigue et les douleurs – sont fréquents dans la population générales et peuvent être présents en dehors de toute maladie auto-immune du fait de la prise de nombreux médicaments, d'un syndrome anxio-dépressif ou même tout simplement du vieillissement. Récemment, la plupart des experts de la maladie se sont mis d'accord pour utiliser les dits critères « du groupe de consensus Européano-américain » qui exigent la présence d'une anomalie immunologique objective : la présence d'un infiltrat inflammatoire nodulaire, c'est à dire de grade supérieur ou égal à 3 de Chisholm sur la biopsie de glandes salivaires accessoires ou présence d'auto-anticorps anti-SSA ou anti-SSB. Les différents critères consensuels « Européano- américains » qui entrent en compte dans le diagnostic du syndrome de Sjögren sont référencés dans le tableau ci-après (Figure 4).

1. Symptômes oculaires	Au moins un des 3 critères ci-dessous : - sensation quotidienne, persistante et gênante d'yeux secs depuis plus de 3 mois - sensation fréquente de "sable dans les yeux" - utilisation de larmes artificielles plus de 3 fois par jour
2. Symptômes buccaux	Au moins un des 3 critères ci-dessous : - sensation quotidienne de bouche sèche depuis plus de 3 mois - à l'âge adulte, épisodes récidivants ou permanents de gonflement parotidien - consommation fréquente de liquides pour avaler les aliments secs
3. Signes objectifs d'atteinte oculaire	Au moins un des 2 tests ci-dessous positifs : - test de Schirmer ≤ 5 mm/5 minutes - Score de Van Bijsterveld ≥ 4 (après examen au vert de Lissamine)
4. Signes objectifs d'atteinte salivaire	Au moins un des 3 tests ci-dessous positifs : - scintigraphie salivaire - scintigraphie parotidienne - flux salivaire sans stimulation ≤ 1.5 ml/15 minutes (0,1 ml/mn)
5. Signes histologiques	Sialadénite avec focus score ≥ 1 sur la biopsie de glandes salivaires accessoires (focus score = nombre de foyers par 4 mm² de tissu glandulaire, un foyer étant défini par l'agglomérat d'au moins 50 cellules mononucléées)
6. Autoanticorps	- Présence d'Anticorps anti-SS-A (Ro) ou anti-SS-B (La) Le diagnostic de syndrome de Sjögren primitif est porté devant : - la présence de 4 sur 6 items avec présence obligatoire de l'item 5 (histologie) ou de l'item 6 (sérologie) - ou la présence de 3 des 4 items objectifs (items 3 à 6). Le diagnostic de syndrome de Sjögren secondaire est porté devant la présence de l'item 1 ou 2 associé à 2 des items 3, 4,
5.	Il existe des critères d'exclusion qui sont les suivants : - Antécédents d'irradiation cervicale - Infection par le VHC ou le VIH - Lymphome pré-existant - Sarcoidose - Réaction du greffon contre l'hôte - Utilisation de médicaments anti-cholinergiques (après une période dépassant de 4 fois la demi-vie).

Figure 4. Critères consensuels “Européano-américains” des signes cliniques pour les patients présentant un syndrome de Sjögren. Vitali C, et al Ann Rheum Dis, 61(6):554-8. 2002.

Au jour d’aujourd’hui, aucun traitement de fond n’a fait la preuve de son efficacité pour diminuer la sévérité des signes cliniques de la maladie. Cependant l’hydroxychloroquine (Plaquenil®) est souvent utilisé car il a montré une efficacité dans deux études ouvertes comprenant respectivement 10 et 50 malades. La seule étude randomisée contre placebo a été effectuée en « crossover » sur seulement 19 malades (Kruize, Hene et al. 1993). Cette étude a

mis en évidence une diminution de l'hypergammaglobulinémie polyclonale mais n'a pas démontré d'effets cliniques du Plaquenil®. Une grande étude randomisée multicentrique était donc souhaitable et a été réalisée sous l'impulsion du Pr Mariette. Les résultats sont en cours d'analyse. En pratique quotidienne, en attendant les résultats de cette étude, le Plaquenil® (à la dose max de 6,5 mg/kg/jour) doit être proposé en cas de purpura vasculaire associé à une hypergammaglobulinémie et il peut être donné en cas de polyarthrite ou de polyarthralgies invalidantes. Par contre, ce médicament n'a pas d'effet démontré sur le syndrome sec.

Le Methotrexate a été proposé dans une étude ouverte sur 17 patients avec quelques résultats encourageants. Cependant une étude contrôlée serait nécessaire. En pratique quotidienne, le Methotrexate pourrait être proposé devant une polyarthrite vraie (et non des polyarthralgies) invalidante et après échec du Plaquenil®.

L'azathioprine (Imurel) est parfois utilisé en cas de complications viscérales même si aucune étude ne documente son efficacité.

Une étude randomisée portant sur l'efficacité des anti-TNF α utilisant l'infliximab (Remicade®) qui est un anticorps monoclonal chimérique anti-TNF α chez les patients ayant un SS et ayant eu des signes extra-glandulaires a montré l'absence d'efficacité sur la sécheresse buccale, l'asthénie et les douleurs (Mariette TRIPS).

Compte tenu de l'importance des lymphocytes B dans la physiopathologie de la maladie, une approche thérapeutique inhibant les lymphocytes B est très intéressante. Plusieurs observations publiées font état d'une amélioration possible des signes systémiques de la maladie avec le rituximab, un anticorps monoclonal chimérique anti-CD20 (Pijpe, van Imhoff et al. 2005). D'autres approches sont à l'étude avec des inhibiteurs de BAFF.

1.2.2.1. La cellule épithéliale salivaire : cellule cible de l'auto-immunité

Au cours du SSp, la cellule épithéliale salivaire semblerait jouer un rôle actif dans le processus physiopathologique aboutissant à sa propre destruction. Ces dernières années, plusieurs études se sont intéressées aux différentes propriétés que pouvaient acquérir des types cellulaires n'appartenant pas au système immunitaire, comme par exemple la cellule épithéliale (ou encore endothéliale). Ces études suggèrent que ces types cellulaires pourraient jouer un rôle actif en participant à l'installation d'une réponse immunitaire (Knolle and Limmer 2001; Koch, Kohl et al. 2006; Racanelli and Rehermann 2006). En effet, le tissu épithélial semble être impliqué dans les mécanismes d'initiation et de maintenance d'une tolérance immunologique vis-à-vis des antigènes du soi, alors qu'un dysfonctionnement de ces fonctions pourrait aboutir au développement de réactions auto-immunes (MacDermott 1996 ; Marelli-Berg and Lechler 1999). De plus, l'altération des fonctions immunologiques de ce tissu favoriserait le développement de maladies auto-immunes au cours d'infections chroniques par divers micro-organismes (Tomer and Davies 1993; D'Ellos, Appelmelk et al. 2004).

1.2.2.1.1. L'activation in situ des cellules épithéliales au cours du SSp

L'une des principales caractéristiques du SSp est la présence d'un infiltrat lymphocytaire au sein des glandes salivaires et particulièrement autour des cellules épithéliales canalaire. D'autre part, des analyses immunohistochimiques de biopsies de glandes salivaires de patients atteints d'un SSp, ont révélé que les cellules épithéliales canalaire et acineuses exprimaient des quantités non négligeables de molécules immuno-actives, comme, par exemple, des molécules de homing des lymphocytes ou encore de présentation antigénique.

Ainsi, il a été montré que les cellules épithéliales adjacentes au site inflammatoire expriment un niveau élevé de molécules du complexe majeur d'histo-compatibilité (CMH) de classe I (HLA-ABC) et de classe II (HLA-DR) (Lindahl, Hedfors et al. 1985 ; Moutsopoulos, Hooks et al. 1986), des molécules d'adhésion CD45/ICAM1, CD106/VCAM (St Clair, Angellilo et al. 1992; Kapsogeorgou, Moutsopoulos et al. 2001; Tsunawaki, Nakamura et al. 2002) ainsi que des molécules de co-stimulations CD80/B7.1 et CD86/B7.2 (Manoussakis, Dimitriou et al. 1999 ; Matsumura, Umemiya et al. 2001; Tsunawaki, Nakamura et al. 2002).

D'autres études ont montré une augmentation de l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires par les cellules épithéliales salivaires de patients atteints de SSp, comme l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α (Fox, Kang et al. 1994; Boumba, Skopouli et al. 1995). Il a été également rapporté que les cellules épithéliales canalaire de patients exprimaient *in situ* des niveaux élevés d'IL-12 (Horiuchi, Yamano et al. 1999) et d'IL-18 (Bombardieri, Barone et al. 2004). De plus, l'expression de plusieurs molécules chémoattractives a pu être détectée au sein de l'épithélium canalaire, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 α , IL-8 et CCL5/RANTES (Cuello, Palladinetti et al. 1998). Toutes ces anomalies de la cellule épithéliale salivaire justifient le terme d'«épithélite auto-immune», proposé par HM Moutsopoulos (Moutsopoulos and Kordosis 1996).

Notre équipe a pu montrer par un marquage immunohistochimique que la cytokine BAFF n'était pas seulement exprimée par les cellules infiltrant les glandes salivaires mais également par les cellules épithéliales canalaire (Figure 5) (Lavie, Miceli-Richard et al. 2004).

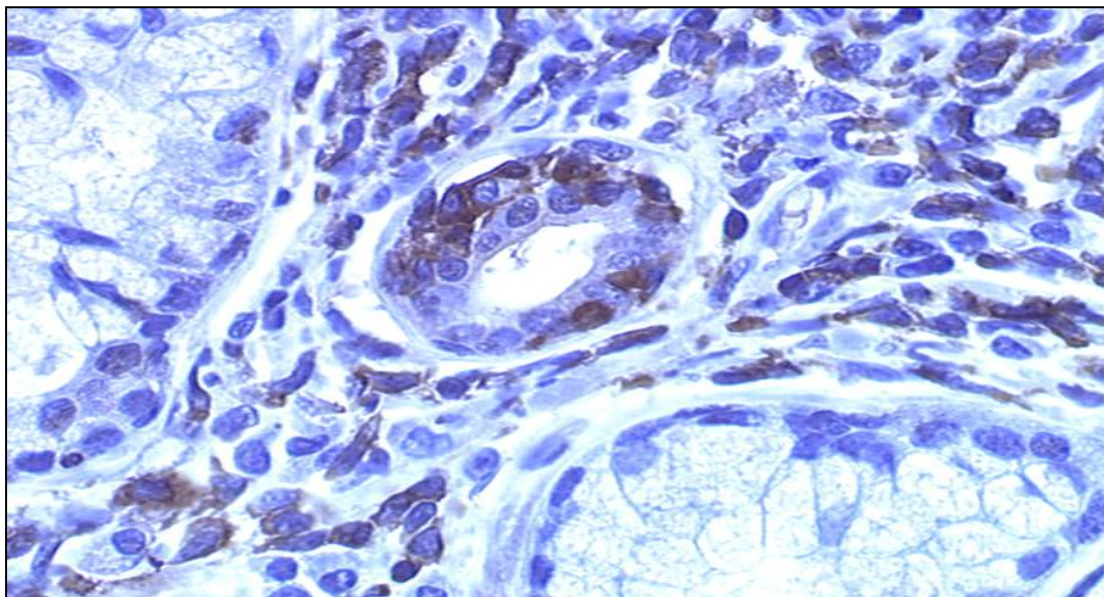


Figure 5. *Expression de la cytokine BAFF par des cellules épithéliales salivaires au sein d'une glande salivaire d'un patient atteint du SSs.* Lavie F et al. *Ann Rheum Dis.* 66(5):700-3. 2006.

1.2.2.1.2. Fonction immunologique de la cellule épithéliale salivaire

Au cours de ces dernières années, la mise au point d'un protocole reproductible de culture de cellules épithéliales salivaires primaires à partir de biopsies de glandes salivaires accessoires humaines (Dimitriou, Kapsogeorgou et al. 2002) a permis de mieux étudier les propriétés intrinsèques de ces cellules. Cette technique permet notamment d'analyser les différents aspects phénotypiques et fonctionnels de ce type cellulaire mais également le caractère constitutif ou inductible de certains de leur constituant.

Ainsi il a été montré que ces cellules, en présence d'IFN- α ou de TNF- α , ont la capacité d'exprimer des molécules pro-apoptotiques (CD95/Fas et CD95L/Fas-ligand), des molécules du CMH de classe I et II, des molécules de co-stimulation (CD80/B7.1 et CD86/B7.2), ainsi que des molécules d'adhésion (CD54/ICAM-1 et CD106/VCAM) et CD40 (Manoussakis, Dimitriou et al. 1999; Kapsogeorgou, Dimitriou et al. 2001; Kapsogeorgou,

Moutsopoulos et al. 2001; Dimitriou, Kapsogeorgou et al. 2002). La cellule épithéliale salivaire semble donc être bien équipée pour se comporter comme une cellule présentatrice d'antigène (CPA). En effet, certaines équipes ont pu démontrer que cette cellule a la capacité d'induire une prolifération lymphocytaire (Tsunawaki, Nakamura et al. 2002 ; Ishimaru, Arakaki et al. 2008). D'autre part, il a été montré que la stimulation d'une lignée de cellules épithéliales salivaires (HSG), transfectée par le gène du rétinoblastome puis stimulée par de l'IL-18, sécrète de l'IFN- α (Ishimaru, Arakaki et al. 2008). Les auteurs suggèrent que cette production d'IFN- α pourrait être la cause d'une expression « aberrante » du CMH de classe II à la surface des cellules épithéliales salivaires.

1.2.2.2. Facteurs infectieux

Les virus ont été incriminés de longue date dans le déclenchement du SSp étant donné l'atteinte des glandes exocrines qui sont, par leur interaction avec le milieu extérieur, particulièrement exposées aux agressions infectieuses. La « signature interféron » les a mis encore récemment au premier plan dans le SSp.

L'EBV a été particulièrement incriminé du fait de sa présence à l'état latent dans l'oropharynx des sujets sains, d'une augmentation de la présence de protéines ou de génome de l'EBV dans les glandes salivaires de patients atteints de SSp (Fox, Pearson et al. 1986; Pflugfelder, Crouse et al. 1990 ; Mariette, Gozlan et al. 1991), et parce qu'il a été rapporté une réactivité croisée entre les anticorps anti-SSB (La) et les antigènes Eber1 et Eber2 propres à l'EBV (Lerner, Andrews et al. 1981). L'EBV pourrait avoir un rôle dans la prolifération lymphoïde salivaire mais il est également possible que sa présence ne soit que consécutive à la destruction de la glande. L'EBV pourrait, par ailleurs, être responsable de la génération d'un produit de dégradation anormal et potentiellement immunogène d'une protéine possiblement impliquée dans la physiopathologie du SSp, la fodrine. La fodrine est un constituant du cytosquelette qui peut se lier à l'actine ou à la calmoduline et comprend une

sous-unité a de 240kDa et une sous-unité b de 235 kDa (Inoue, Tsubota et al. 2001).

L'hypothèse virale est renforcée par le fait que des rétrovirus tels que *le Human T cell Leukemia Virus type 1* (HTLV1) (Nakamura, Eguchi et al. 1997) ou *le Virus de l'Immunodéficience Humaine* (VIH) (Itescu, Brancato et al. 1989) ou *le virus de l'hépatite C* (VHC) (Haddad, Deny et al. 1992) peuvent donner des manifestations proches du SSp avec un syndrome sec et un infiltrat épithélial lymphoïde. L'absence de ces infections est désormais un critère nécessaire pour porter le diagnostic positif de SSp.

L'hypothèse des rétrovirus endogènes, comme le rétrotransposon LINEs (long interspersed nuclear element 1), est considérée actuellement comme particulièrement intéressante. En effet, le génome humain contient plus de 500 000 copies LINEs lesquelles sont des éléments mobiles appartenant à la famille des rétrotransposons (20% du génome humain). Leur duplication requiert une transcription et une intégration de l'ADN complémentaire dans le génome. Les séquences complètes de LINEs se composent de 2 cadres de lectures ouvertes (ORFs) encodant des protéines impliquées dans les mécanismes de rétrotransposition.

Des résultats préliminaires suggèrent l'implication de LINEs dans les maladies auto-immunes. En effet, une étude menée dans la polyarthrite rhumatoïde révèle une expression plus importante des transcrits LINEs dans les tissus issus de biopsies synoviales (Neidhart, Rethage et al. 2000). De récents travaux en cours de soumission décrivent une surexpression de LINEs à la fois dans les glandes salivaires de patients présentant un syndrome de Sjögren ainsi que dans les tissus de rein provenant de patients lupiques (Résumé 1602 – Mavragani et al, American College of Rheumatology – 2007). Les auteurs ont également montré que l'expression de LINEs était associée à l'expression de l'IFN- α . La surexpression des séquences LINEs pourraient être liées à une dérégulation épigénétique par hypométhylation des régions régulatrices de la transcription de LINEs. Ces résultats pourraient suggérer que la

surexpression de ces séquences endogènes serait capable de participer à la signature IFN de type I. Cette hypothèse repose sur le fait qu'un facteur viral déjà préintégré dans le génome serait dé-réprimé suite à des événements intercurrents.

Parmi les autres virus, des séquences d'ARN consensus d'entérovirus et de la protéine VIP du virus cocxsackie ont été identifiées dans les glandes salivaires de patients atteints de SSp et pas chez les témoins (Triantafyllopoulou, Tapinos et al. 2004). Cependant, avec une technique identique de PCR nichée sur des ARN salivaires de très bonne qualité, nous n'avons pas pu reproduire ces résultats (Gottenberg, Pallier et al. 2006).

Ainsi, par leur tropisme pour les muqueuses, on peut considérer que les virus peuvent déréguler la physiologie des cellules épithéliales avec des modifications la rendant cible de l'auto-immunité. Cette hypothèse est bien illustrée par l'exemple des souris B6-lpr/lpr déficientes en Fas, génétiquement prédisposées à faire une maladie auto-immune systémique avec glomérulonéphrite mais sans atteinte salivaire vers l'âge de 6-8 mois. Ces souris développent une maladie inflammatoire des glandes salivaires proche du SSp 3 mois après avoir été infectées par le cytomégalovirus murin mais qui a été pourtant complètement éliminé des glandes salivaires au moment où apparaît la maladie auto-immune (Fleck, Kern et al. 1998).

L'infection virale comme facteur déclenchant a été plus encore mise en exergue depuis la démonstration de la signature « interféron » au cours du SSp évoquée plus haut. Les IFN de type I sont des cytokines clés en réponse à toute infection virale mais il a été montré que les cellules dendritiques plasmacytoïdes, considérées comme les cellules professionnelles de sécrétion d'interféron infiltrent également les glandes salivaires (Bave, Nordmark et al. 2005; Gottenberg, Cagnard et al. 2006). Ces cellules peuvent être stimulées par des infections virales mais aussi par des complexes immuns comme les antigènes SSA et anticorps anti-SSA

ou antigène SSB et anticorps anti-SSB ou des complexes chromatine/IgG via l'activation des TLR (Bave, Nordmark et al. 2005).

Une fois le déclenchement de la réponse auto-immune par les complexes immuns, la synthèse d'interféron pourrait continuer par le biais de complexes immuns agissant sur les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Les complexes immuns peuvent comme les virus stimuler la synthèse d'interféron. Il peut s'agir de complexes immuns contenant de la chromatine et des IgG, activant le TLR-9 exprimé par les cellules dendritiques plasmacytoïdes, ou de complexes immuns contenant des auto-anticorps associés à des ARN simple ou double-brin, activant respectivement TLR-7 ou TLR-8 (TLR-7 : cellules dendritiques plasmacytoïdes, TLR-8 : cellules dendritiques myéloïdes) et TLR-3 (exprimé par les cellules dendritiques myéloïdes) (Figure 6).

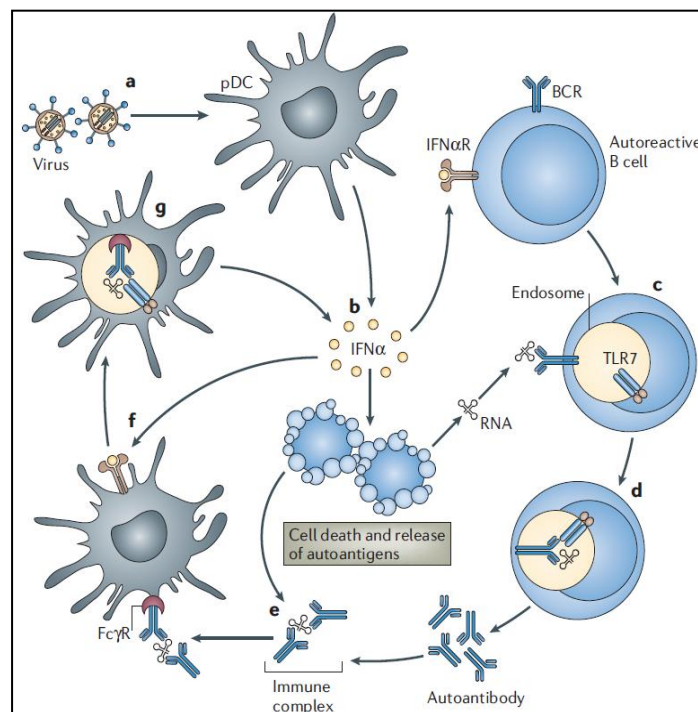


Figure 6 : *IFN-α*, induit par des virus, initie des perturbations du soi et qui conduit par rétrocontrôle à la production d'auto-anticorps. Marshak-Rothstein. Nat Rev Immunol. 6 : 823-835, 2006

1.2.2.3. Facteurs hormonaux

La maladie survient le plus souvent après 50 ans chez la femme, dans une période de déficit en oestrogènes. Le taux sanguin de DHEA serait diminué et le taux de prolactine augmenté chez les patientes ayant un SSp. Le déficit hormonal pourrait favoriser l'apoptose des cellules épithéliales (Hayashi, Arakaki et al. 2004). Les souris ovariectomisées développent un infiltrat salivaire, associé à des auto-anticorps anti-alpha-fodrine ; le clivage anormal de la fodrine est lié à l'activation de la caspase 1. Les souris invalidées pour le gène de l'aromatase développent également un infiltrat salivaire, rénal, une prolifération lymphocytaire B médullaire, et la sécrétion d'anticorps anti-fodrine (Shim, Warner et al. 2004). Un traitement par tamoxifène provoque l'apoptose de lignées épithéliales salivaires, qui expriment de manière prédominante le récepteur bêta de l'oestradiol (Ishimaru, Saegusa et al. 1999; Ishimaru, Arakaki et al. 2003). L'influence des hormones, observée pour de nombreuses maladies auto-immunes, peut s'expliquer par la régulation hormono-dépendante de l'expression de gènes variés, notamment ceux des cytokines (augmentation de l'IFN-gamma, de l'IL-6...). Les oestrogènes ont également un rôle important et complexe de régulation de la maturation des lymphocytes B (Peeva and Zouali 2005). Plus récemment, il a été montré que des souris transgéniques pour la protéine rétinoblastome, dont l'expression est dépendante de la diminution d'oestrogènes, développaient des signes d'auto-immunités proches du SSp (Ishimaru, Arakaki et al. 2008).

Des souris déficientes en œstrogènes ont une induction d'expression d'un facteur de transcription *RbAP48*. La surexpression de ce facteur de transcription induit une sécheresse oculaire et buccale, un infiltrat lymphocytaire dans les glandes exocrines (salivaires et lacrymales) et la production d'autoanticorps anti-SSa et anti-SSb et d'anti-fodrine. Elle entraîne également l'apoptose des cellules épithéliales et la production d'auto-antigènes [38].

Récemment et de manière très intéressante, des récepteurs aux œstrogènes ont été identifiés à la surface des cellules épithéliales de glandes salivaires [39]. L'œstrogène inhiberait l'expression d'une molécule d'adhésion inductible par l'IFN- γ (Interféron gamma), ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1) dont l'expression est augmentée dans le SSp [40]. Néanmoins, l'implication des hormones dans la pathologie du syndrome de Sjögren restent controversée

1.2.2.4. Vieillesse

Le SSp survient dans la deuxième moitié de la vie. Les modèles murins les plus proches de la maladie développent les premiers signes de maladie après 6 à 10 mois. La contribution du vieillissement à la physiopathologie de la maladie a été essentiellement étudiée dans le modèle NFS/sld. Les souris NFS/sld âgées ont une activation lymphocytaire T plus marquée et un titre d'anticorps anti-fodrine plus élevé que les souris NFS/sld plus jeunes. Ces anomalies pourraient résulter d'une diminution de la sensibilité à la mort cellulaire programmée des lymphocytes T auto-réactifs par répression de l'expression de Fas (Ishimaru, Yoneda et al. 2000). La modification liée à l'âge du profil d'expression des cytokines pourrait également contribuer à la physiopathologie de la maladie.

Au terme de cette partie, il en ressort que le SSp semble être une maladie :

- multifactorielle faisant intervenir des facteurs environnementaux et génétiques.
- où la cellule cible de l'auto-immunité, qu'est la cellule épithéliale salivaire, présente des dysfonctionnements phénotypiques et fonctionnels suggérant qu'elle puisse avoir un rôle actif dans la physiopathologie de cette maladie auto-immune.
- qui à l'instar du LED, se caractérise par une signature IFN et une augmentation de la cytokine BAFF

1.3. LA SIGNATURE INTERFERON

Des études transcriptomiques comparant le profil d'expression d'ARNm extraits de glandes salivaires et PBMCs de patients ayant un syndrome de Sjögren et de témoins ont pu mettre en évidence l'expression différentielle de gènes inductibles par l'interféron de type I dans les cellules mononuclées du sang périphériques (PBMCs) et dans les cellules épithéliales de glandes salivaires (SGECs) qui sont le tissu cible du SSp. Cette expression différentielle a été attribuée en partie à la présence d'un sous type particulier de cellules dendritiques qui se trouve être la cellule dendritique plasmacytoïde (pDCs) (Bave, Nordmark et al. 2005; Hjelmervik, Petersen et al. 2005 ; Gottenberg, Cagnard et al. 2006). En effet, la pDCs possède la caractéristique de pouvoir produire à elle seule 1000 fois plus d'IFN de type I que n'importe quelle autre cellule en réponse à l'activation de ses PAMPs ou de ses ligands endogènes. Ces pDCs ont été retrouvées dans l'infiltrat lymphocytaire situé dans l'organe cible du syndrome de Sjögren : les glandes salivaires (figure 7).

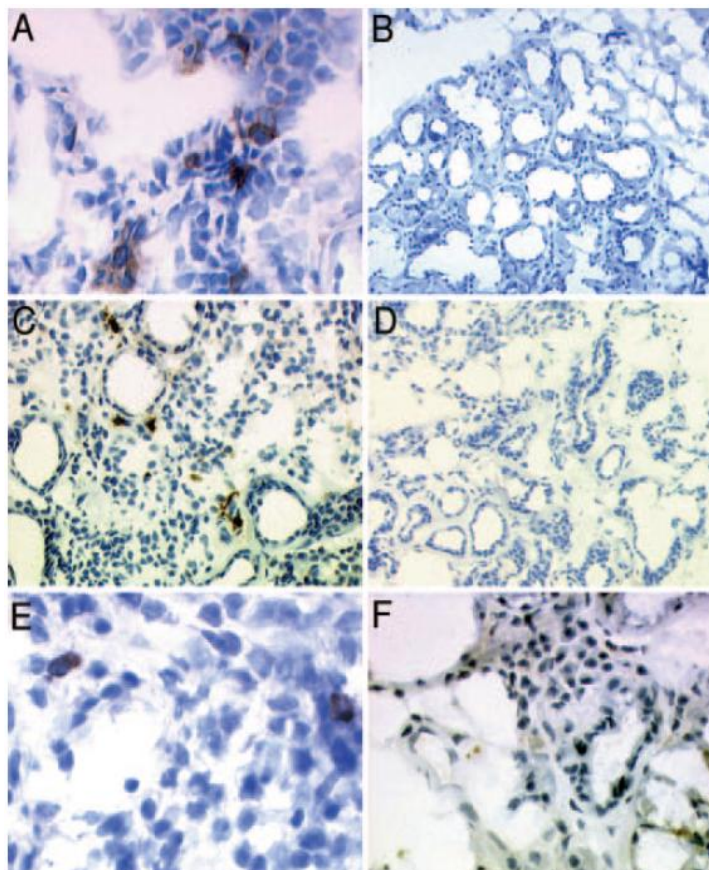


Figure 7: *Identifications de pDCs dans les glandes salivaires de patients (A,C,E) comparé à des glandes salivaires de témoins (B,D,F). Les pDCs sont représentées comme les cellules positives pour CD123 (A), CD303 (BDCA2) comme marqueurs spécifiques des pDCs (C) et positives pour TLR-9 (E). Aucune pDCs n'est observée chez les contrôles. Gottenberg et al. PNAS. 103:2770-2775, 2006.*

D'autres part des cellules dendritiques myéloïdes (mDCs) ont été retrouvées également présentes dans les glandes salivaires de patients ayant un SSs (Aziz, McCluskey et al. 1997).

L'activation de l'infiltrat lymphocytaire et des pDCs à travers les TLRs permet de lier l'immunité innée et adaptative. L'augmentation rapide de la sécrétion de l'IFN de type I (IFN- α/β) par les pDCs/IPCs (cellules produisant de l'IFN de type I, IPCs) s'effectue dans les premières 24H après une infection virale. Dans les 48 à 72H qui suivent, les pDCs/IPCs subissent une différenciation en cellules dendritiques matures lesquelles expriment très fortement le CMH de classe I et de classe II ainsi que des molécules de costimulation telles que CD80 et CD86. Ces DCs matures dérivées de pDCs/IPCs produisent moins d'IFN de type I mais sont capables d'induire des lymphocytes T naïfs allogéniques leur permettant d'initier une forte prolifération et différenciation T_H1 avec production d'IFN de type II (IFN- γ) et IL-12 (Moseman, Liang et al. 2004). Ceci permet de mettre en évidence la coexistence de cellules à profil T_H1 et cellules productrices d'IFN de type I dans l'organe cible du Sjögren (Figure 8) (Liu 2005)

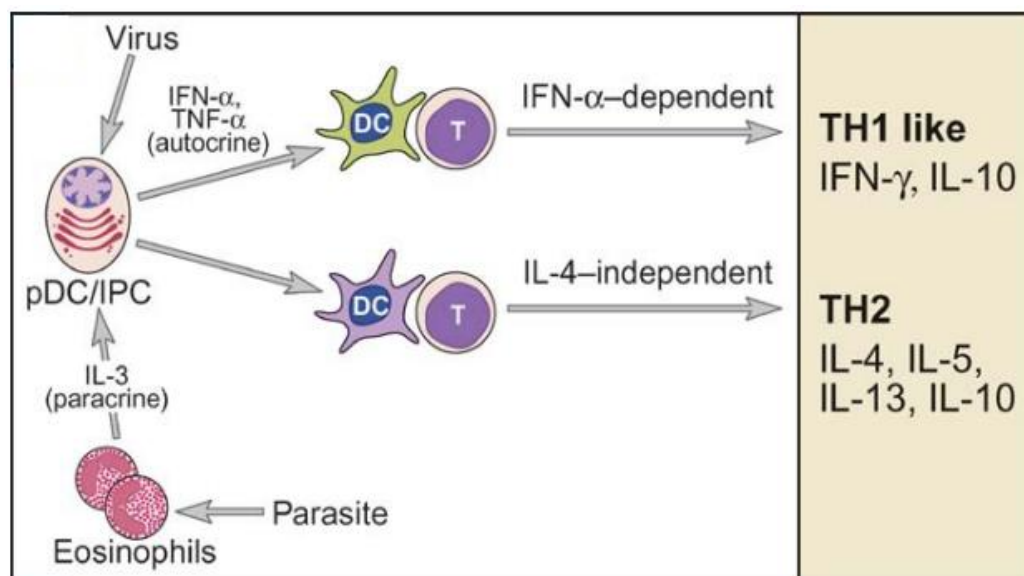


Figure 8 : Fonctionnalité de la plasticité des pDCs sous infection virale et sous infection

parasitaire. Yong-Jun Liu. Annu. Rev. Immunol. 23 :275-306, 2005

De plus, la sécrétion d'IFN- α et d'IL-6 par les pDCs résulte en la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et de la production d'anticorps. D'autre part, l'activation des pDCs augmente leurs capacités à présenter l'antigène mais cette présentation reste beaucoup moins importante que celle des DCs matures.

Le premier suspect responsable de la production et sécrétion d'IFN de type I par la stimulation des TLRs par la pDCs est l'infection virale (Theofilopoulos, Baccala et al. 2005). De manière intéressante, le virus Epstein-Barr, le virus de l'hépatite C, rétrovirus ou entérovirus ont été suggérés comme jouant un rôle dans le syndrome de Sjögren. Cependant, il n'y a pas de ferme association entre une infection virale et le syndrome de Sjögren ayant pu être établie à ce jour (Fox, Pearson et al. 1986; Mariette, Zerbib et al. 1993; Mariette, Agbalika et al. 2000; Triantafyllopoulou, Tapinos et al. 2004). Les composants viraux peuvent être reconnus par de nombreux TLRs, incluant TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 (Akira, Uematsu et al. 2006). L'expression de TLR8 et TLR9 est retrouvée augmentée dans les glandes salivaires de patients avec un syndrome de Sjögren (Gottenberg, Cagnard et al. 2006). Néanmoins, le niveau inchangé de TLR3 et TLR7 ne permet pas d'écarter leur implication dans la pathogénèse du SSp.

De manière intéressante, cette signature reflétant l'expression des gènes induit par l'interféron n'est pas seulement restreinte au syndrome de Sjögren. En effet, une signature IFN a été également mis en évidence dans le lupus érythémateux (Figure 9) (Baechler, Batliwalla et al. 2003). Une analyse de profils d'expression de gènes dans des PBMCs de patients présentant un SLE suggère que plus de 90% des patients sont exposés à une surexpression de gènes induits par l'IFN- α . Cependant, l'activité de l'IFN- α dans le sérum de ces patients n'était présente que pour seulement 40-50% des cas. Ceci suggère qu'il puisse y avoir une augmentation de la sensibilité à l'IFN- α résultant en une augmentation de l'expression des gènes IFN induits sans pour autant avoir des taux anormaux d'IFN- α dans le

sérum des patients lupiques (Bennett, Palucka et al. 2003; Pascual, Banchereau et al. 2003; Kariuki, Kirou et al. 2009; Ronnblom, Alm et al. 2009).

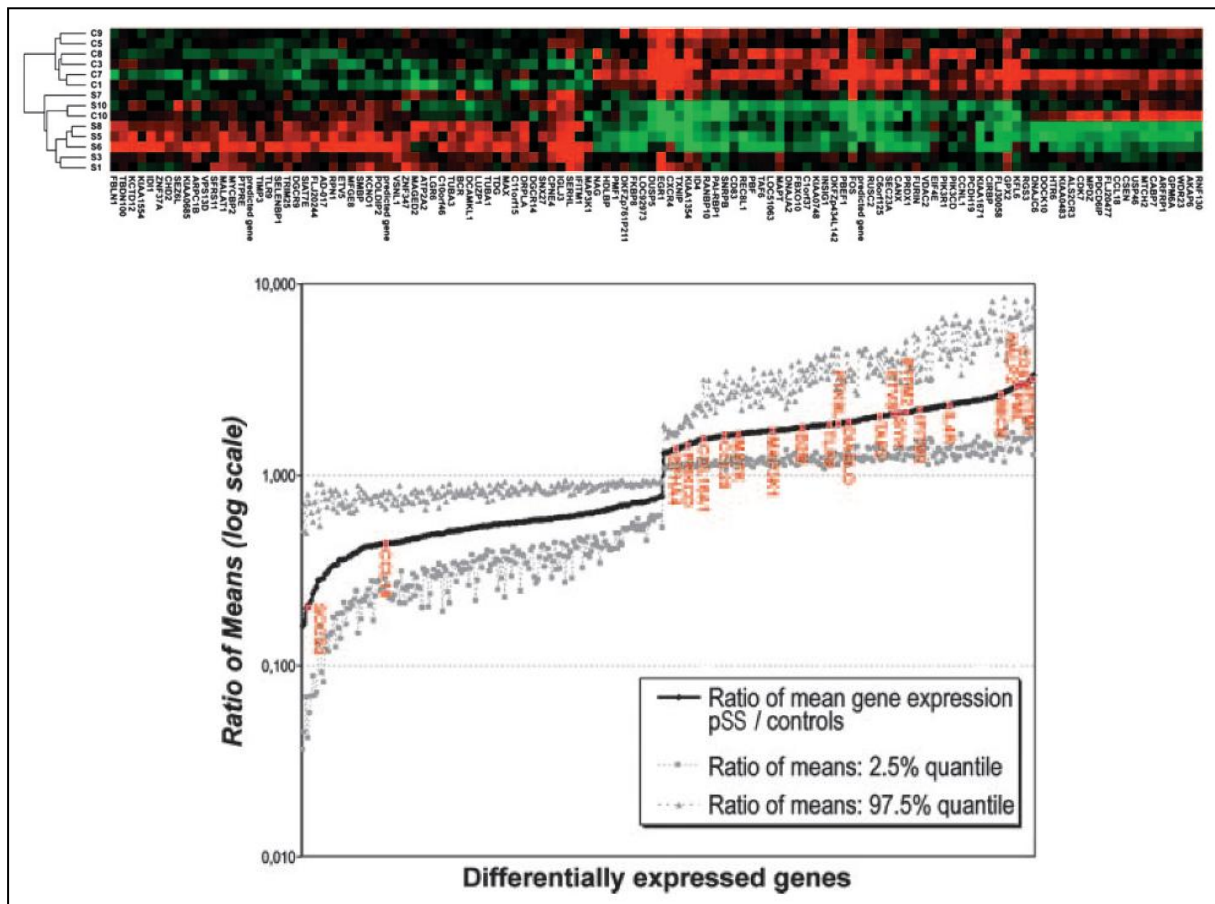


Figure 9 : Expression différentielle de gènes dans les cellules de glandes épithéliales salivaires de malades et contrôles. Haut : Profils d'expression de gènes, rouge = surexprimés ; vert = réprimés. Bas : Ratio >1 = surexpression, Ratio <1 = répression. Gottenberg et al. PNAS.103(8):2770-2775. 2006

La découverte de cette signature interféron a été une avancée importante dans la compréhension de la physiopathologie du SSp et a conduit plusieurs équipes à explorer d'un point de vue génétique l'existence de polymorphismes pouvant être associés au SSp et d'autre part, leur impact fonctionnel, notamment au regard de la production d'IFN de type I.

1.4. MALADIES AUTO-IMMUNES ET GENETIQUE

1.4.1. Rôle des facteurs génétiques de prédisposition

De nombreux faits plaident en faveur d'un terrain génétique particulier au SSp. Les cas familiaux sont certes peu fréquents, mais il n'est pas rare de retrouver une autre pathologie auto-immune parmi les proches d'un sujet atteint d'un SSp (Criswell 2004), suggérant une agrégation familiale de l'autoimmunité.

Dans la population caucasienne, il existe un lien très net entre l'haplotype A1/B8/DR3/DQ2 et le SSp (Chused, Kassan et al. 1977 ; Fye, Terasaki et al. 1978 ; Fei, Kang et al. 1991). En effet, cet haplotype est lié à la présence d'anticorps anti-SS-B et non à la maladie. Ainsi, les SSp sans anticorps anti-SSA ou anti-SSB ne sont pas associés à un antigène d'histocompatibilité, les SSp avec anti-SSA seuls sont associés à DR15, et les SSp avec anti-SSA et anti-SSB sont associés à DR3 (Gottenberg, Busson et al. 2003).

1.4.2. Le syndrome de Sjögren et le facteur de régulation de l'IFN 5 (IRF5)

Les facteurs de régulations de l'interféron (IRFs) appartiennent à la famille de facteurs de transcription ayant la particularité de posséder un motif de liaison à l'ADN N-terminal Helix-Turn-Helix, leur permettant ainsi de se fixer sur le promoteur des gènes IFN de type I (Escalante, Yie et al. 1998). Actuellement, il y a 9 IRFs qui ont été identifiés (IRFs 1 – 9) et il a été correctement établi qu'IRF-1, IRF-2, IRF3, IRF-4, IRF-7 et IRF8 jouent un rôle important dans la régulation du système immunitaire (Taniguchi, Ogasawara et al. 2001). IRF5 participe dans l'induction des gènes de l'IFN- α et l'IFN- β .

L'activation d'IRF5 par la phosphorylation est virus spécifique. En effet, IRF5 est le premier membre de la famille des IRFs à montrer une réponse différentielle en fonction des virus, puisque l'activation d'IRF5 par la phosphorylation et l'induction du gène de l'IFN- α étaient uniquement détectées dans les cellules infectées par le virus NDV (Newcatle disease

virus, paramixovirus) et non dans les cellules infectées par le virus Sendai, bien que Sendai active IRF3 et IRF7 (Barnes, Moore et al. 2001). Le virus NDV est reconnu par RIG-I (retinoic-acid-inducible protein 1) et Sendai est reconnu par TLR7. Les cellules infectées par NDV exprimant IRF5 ou IRF7 ont montré des profils d'expression différents des gènes de l'IFN- α . En effet, les cellules infectées et exprimant IRF7 permettait l'induction du gène de l'IFN- α 1 alors que les cellules infectées et exprimant IRF5 résultait en une induction de l'expression de l'IFN- α 8. Donc IRF5 est un élément important dans les mécanismes de défenses qui engagent l'immunité innée et la réponse cellulaire (Barnes, Moore et al. 2001). Les IRFs apparaissent inductible de différente manière selon le type de stimulations et permettent ainsi une modulation différentielle des gènes de l'IFN de type I.

Les premières études mettant en exergue le rôle d'IRF5 dans une maladie auto-immune se rapporte au lupus érythémateux systémique (SLE) (Sigurdsson, Nordmark et al. 2005). En effet, une approche gène candidat de 13 gènes impliqué dans la voie IFN de type I a été réalisée chez des patients avec SLE afin de comprendre leur liaison avec la susceptibilité de la maladie. Sur les 44 « single nucleotide polymorphism » (SNPs) analysés, un fort signal d'association a été observé pour le SNP rs2004640 (G/T) situé dans le premier intron du gène d'IRF5 et ainsi que 2 autres SNP d'IRF5 (rs759302 & rs752637) (Figure 10) (Sigurdsson, Nordmark et al. 2005).

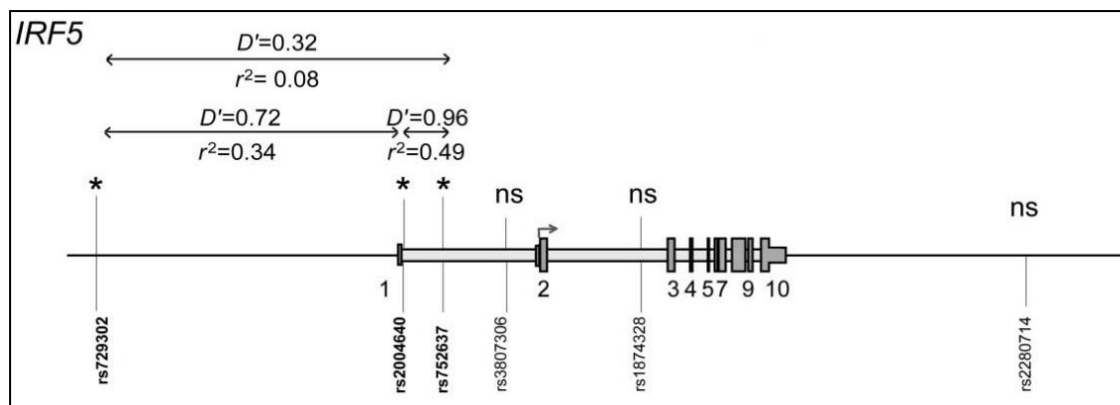


Figure 10 : Représentation schématique du gène d'IRF5. La position des exons est symbolisée par des boîtes grises et le site de début de transcription est représenté par une flèche. Sigurdson et al. *Am. J. hum. Genet.* 765 :528-537, 2005.

L'étude de la séquence génomique d'IRF5 a montré que le rs2004640 est localisé dans la région intronique d'IRF5 à 2 paires de bases de l'exon 1B et permet la création d'un site donneur de splicing correspondant à une séquence consensus GT (Graham, Kozyrev et al. 2006). Le splicing d'IRF5 est connu pour être très complexe. Dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes humaine, IRF5 est transcrit en 4 isoformes distinctes (V1, V2, V3 et V4), alors que 2 isoformes supplémentaires sont retrouvés dans les PBMCs (V5 et V6) (Mancl, Hu et al. 2005). Les isoformes V1, V2 et V3 d'IRF5 possèdent chacun des exons 1 non codant différents et des motifs de délétion bien distincts situés dans l'exon 6. En effet V1 et V3 ont des sites permettant le début de la transcription qui sont différents et sont régulés par 2 promoteurs. Le promoteur de V1 est constitutivement actif, contenant un site de fixation IRF-E (séquence de fixation des IRFs) qui est reconnu par la famille des facteurs de transcription IRFs. A l'opposé, le transcrit V3 est surexprimé lors d'une stimulation par l'IFN de type I et le promoteur de V3 contient un site de fixation du complexe ISGF3 (ISRE). De plus, les transcrit V5 et V6 ont été retrouvés exprimés dans les PBMCs de témoins alors que de manière intéressante l'expression de V7, V8 et V9 a été mis en évidence seulement dans des tissus cancéreux (Figure 11) (Mancl, Hu et al. 2005). IRF5 se révèle donc être un facteur de

transcription important dans la voie de signalisation de l'IFN de type I et l'expression de ses variants de splicing est cellule spécifique.

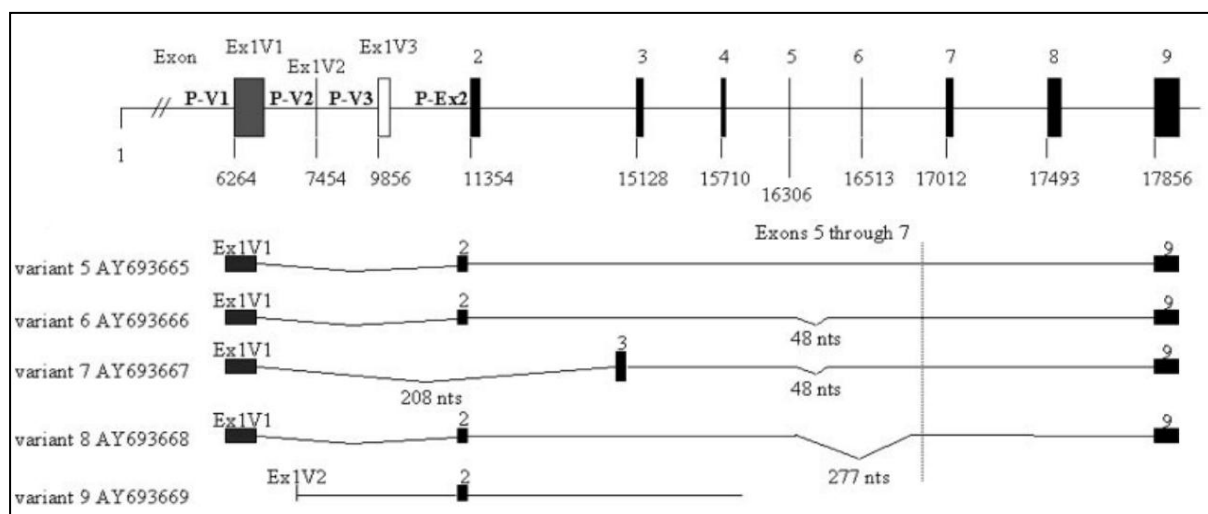


Figure 11 : Schématisation des différents variants de splicing du gène d'IRF5. Les exons sont représentés par des boîtes noires. Les 3 différents exons 1 sont représentés : Exon 1a par une boîte grise, exon 1b par trait fin et exon 1c par une boîte blanche. Mancl et al. JBC. 280, 22 :21078-21090.

2005

Le rs2004640 est donc associé au SLE et a été associé à un groupe d'haplotypes qui contient à la fois le site donneur du splicing alternatif qui permet l'expression de multiple variants d'IRF5 contenant l'exon 1B et un effet génétique séparé associé à une expression plus importante de l'ARNm d'IRF5 dans le SLE (Graham, Kozyrev et al. 2006). IRF5 a été associé également à d'autre maladie auto-immune : polyarthrite rhumatoïde (Sigurdsson, Padyukov et al. 2007), maladie de Crohn (Anderson, Boucher et al.; Dideberg, Kristjansdottir et al. 2007), sclérose en plaque (Kristjansdottir, Sandling et al. 2008) psoriasis (Sanchez, Linga Reddy et al. 2008), syndrome de Sjögren (Nordmark, Kristjansdottir et al.; Miceli-Richard, Comets et al. 2007; Nordmark, Kristjansdottir et al. 2009) et slérodermie (Dieude, Dawidowicz et al.; Kristjansdottir, Sandling et al. 2008; Dieude, Guedj et al. 2009; Dieude, Wipff et al. 2009; Ito, Kawaguchi et al. 2009).

Le rs10954213 est rapporté associé au LES et il se révèle être fonctionnel. En effet, sa localisation au niveau du signal de polyadénilation lui permet d'avoir une forme plus courte, plus stable d'ARNm d'IRF5. Ce SNP est associé à une expression plus importante d'IRF5 (Graham, Kyogoku et al. 2007).

D'autre part un haplotype à risque pour le LES a été montré comme régulant le splicing et l'expression du gène d'IRF5. Cet haplotype est constitué de 3 SNPs qui sont hautement associés au LES :

- rs2004640 : Région intronique situé à 2 pb de l'Exon 1b.
- rs752637 : Région intronique entre Exon 1 et Exon 2.
- rs2280714 : Situé à 5kb de la région 3' d'IRF5

Le rs729302 est localisé en 5' de l'haplotype marqué par le rs2004640, rs752637 et le rs2280714. L'analyse des niveaux d'expressions d'IRF5 permettait de montrer que le rs2280714 T est plus associé à une augmentation de l'ARNm d'IRF5 dans le Lupus que le rs2004640 T (Figure 12). Néanmoins le rs2280714 n'est pas situé dans une région régulatrice et donc il pourrait y avoir une variation génétique additionnelle en déséquilibre de liaison avec ce SNP qui conduirait à modulation de l'expression d'IRF5.

Comment l'isoforme de l'exon 1b d'IRF5 pourrait augmenter le risque aux maladies auto-immunes ? L'IFN de type I et les TLRs sont connus pour induire la phosphorylation d'IRF5, permettant la transactivation de gènes en aval, incluant les gènes IFN de type I eux-mêmes (Barnes, Moore et al. 2001; Barnes, Kellum et al. 2002; Barnes, Field et al. 2003; Barnes, Richards et al. 2004). Les multiples isoformes d'IRF5 sont initiés à partir de l'Exon 1b. Ces isoformes permettent d'avoir des variants d'IRF5 qui sont fonctionnels ou non. Donc les transcripts de l'exon 1b peuvent former différentes protéines d'IRF5 qui peuvent avoir des effets différents sur l'impact biologique dans les voies de signalisation. En effet des études de transfection ont montré que les isoformes d'IRF5 (protéines) ont des effets différents dans

leur capacité à transactiver le gène de l'IFN- α (Mancl, Hu et al. 2005). Par exemple, le variant d'IRF5 exon 1b V2 stimule la production d'IFN- β mais pas celle de l'IFN- α 1, suggérant donc que l'expression différentielle des isoformes d'IRF5 peut influencer directement la réponse IFN de type I (Mancl, Hu et al. 2005).

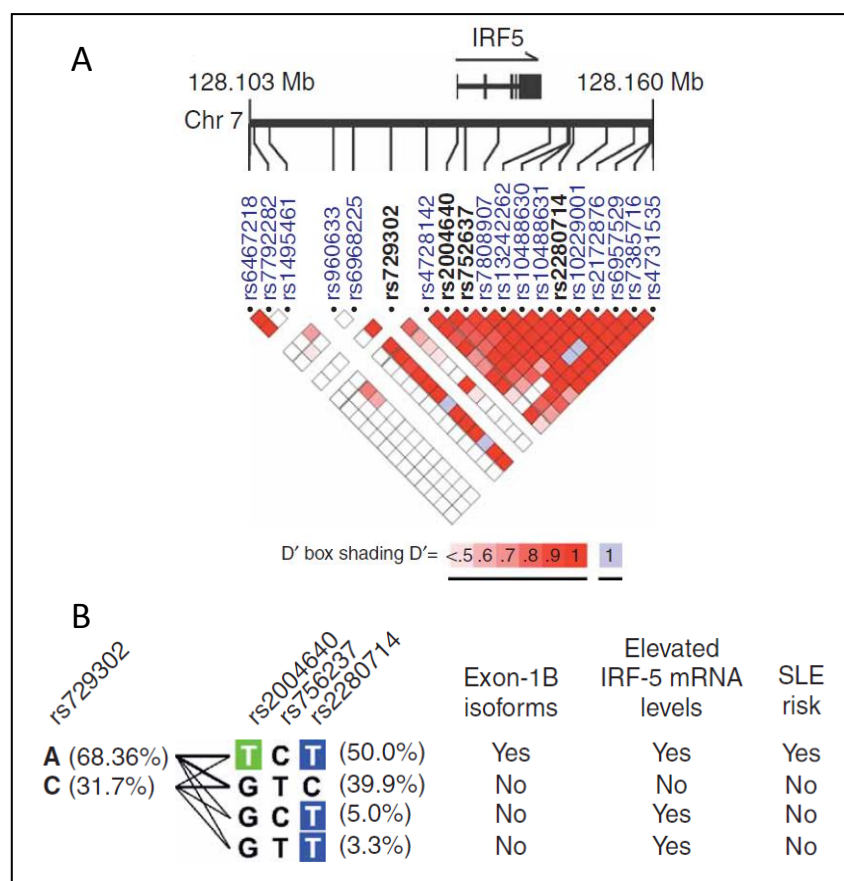


Figure 12 : A. Structure haplotypique de la région d'IRF5 (chromosome 7). B. Risque haplotypique en fonction des fréquences alléliques dans le LES pour 4 SNPs. Graham et al. Nat Genet.

38,5 :550-555. 2006

Récemment un nouveau polymorphisme d'insertion délétion (InDel) a été décrit dans le promoteur d'IRF5 et a été associé à la maladie de Crohn ainsi qu'au Lupus (Dideberg, Kristjansdottir et al. 2007; Sigurdsson, Goring et al. 2008). Il s'agit d'une insertion de 5 paires de bases localisée à 64 paires de bases de l'exon 1A d'IRF5. Ce polymorphisme a la caractéristique de permettre la fixation supplémentaire d'un facteur de transcription protéine spécifique 1 (Sp1) (Sigurdsson, Goring et al. 2008). En effet, l'allèle associé aux maladies

auto-immunes correspond au variant 4R qui possède la particularité de rajouter une séquence CGGGG (4R, 4 répétitions) à 3 séquences CGGGG préexistantes (3R, 3 répétitions). Un motif supplémentaire de fixation de Sp1 (CCGCC) est donc présent sur l'allèle à risque (Dideberg, Kristjansdottir et al. 2007; Sigurdsson, Goring et al. 2008). La quantité de protéine IRF5 dans les PBMCs d'homozygote porteur de l'allèle à risque 4R CGGGG était retrouvée également plus importante que dans les PBMCs d'homozygotes 3R CGGGG. Il en va de même pour l'ARNm d'IRF5 avec une expression d'IRF5 plus importante dans les PBMCs d'homozygotes 4R CGGGG (Dideberg, Kristjansdottir et al. 2007; Sigurdsson, Goring et al. 2008).

IRF5 se révèle donc être un gène essentiel dans la susceptibilité aux maladies auto-immunes permettant d'ouvrir de nouvelles perspectives sur une implication fonctionnelle d'IRF5 au sein des maladies auto-immunes dans la voie IFN de type I.

1.4.3. Maladies auto-immunes et STAT4

Signal Transducer and Activator of the transcription (STAT) 4 est un facteur de transcription qui a un rôle clé dans la polarisation de la voie T_H1 et qui est responsable de l'induction de gènes tel que l'interféron-gamma (IFN- γ), T-bet. STAT4 a été montré directement impliqué dans la voie de signalisation de l'interleukine 12 (Jacobson, Szabo et al. 1995). Son rôle physiologique sera revu en détails dans la partie 7.

Le gène de STAT4 se trouve sur le chromosome 2 (2q32.2) et code pour 2 variants : STAT4- α et STAT4- β (Hoey, Zhang et al. 2003). Les 2 formes de STAT4 semblent avoir des rôles distincts et communs. En effet, STAT4- α induit des gènes qui ont un rôle dans la capacité à faire proliférer la cellule. STAT4- α induit également un facteur de splicing qui a la capacité à augmenter la production du transcrit STAT4- β . STAT4- β active un panel de gènes impliqués dans la formation de vésicules qui peuvent augmenter la sécrétion de cytokines et

d'autres facteurs de régulations. STAT4- β active aussi des protéines de surfaces qui ont un rôle dans l'inflammation et l'adhésion cellulaire (Hoey, Zhang et al. 2003). Biologiquement, il a été montré que STAT4- α est requis pour une réponse maximale à l'IL-12 pour la production d'IFN- γ , alors que STAT4- β est requis pour une réponse proliférative normale sous IL-12 (Hoey, Zhang et al. 2003). Les 2 isoformes de STAT4 sont capables de médier l'induction de gènes sous IL-12. Ces résultats sont encore peu clairs et nécessitent d'être confirmés.

STAT4 est très impliqué sur le plan de la génétique dans plusieurs maladies auto-immunes. En effet, la première étude portait sur une analyse de SNPs de 13 gènes candidats dans la région du chromosome 2q à la susceptibilité à la polyarthrite rhumatoïde (PR) et au LES (Remmers, Plenge et al. 2007). Il en résultait qu'un haplotype dans le 3^{ème} intron de STAT4 était associé à la susceptibilité à faire un LES ou une PR.

Depuis, STAT4 a été confirmé comme gène de susceptibilité dans le LES (Harley, Alarcon-Riquelme et al. 2008; Taylor, Remmers et al. 2008; Abelson, Delgado-Vega et al. 2009) et la PR (Lee, Remmers et al. 2007; Orozco, Alizadeh et al. 2008; Zervou, Sidiropoulos et al. 2008) et jusqu'à maintenant de nombreux SNPs de STAT4 (Figure 13) ont été associés à d'autres maladies auto-immunes : sclérodermie (Dieude, Guedj et al. 2009; Rueda, Broen et al. 2009; Tsuchiya, Kawasaki et al. 2009), syndrome de Sjögren (Korman, Alba et al. 2008; Nordmark, Kristjansdottir et al. 2009), diabète de type I (Lee, Park et al. 2008), psoriasis (Zervou, Goulielmos et al. 2009) et maladie de Crohn (Glas, Seiderer et al.).

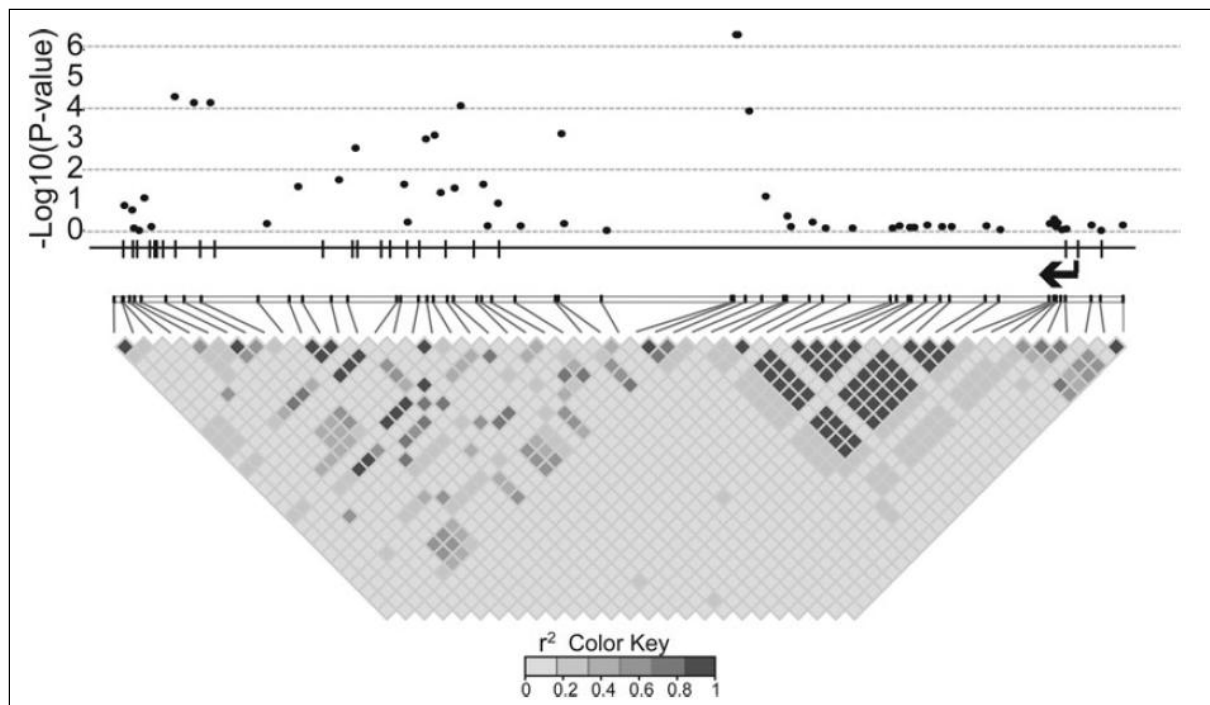


Figure 13 : Vue schématique des variations génétiques de STAT4. Les positions des exons sont notées avec les lignes verticales et le site du début de transcription est représenté par une flèche. Le Log_{10} négatif de la valeur du P pour l'association de chaque SNP avec le SLE déterminée par un test exact de Fischer est montré par un point dans le diagramme. Sigurdsson et al. *Hum Mol Genet*, 17-18 :1868-2876. 2008.

Des associations ont été détectées pour plusieurs SNPs à travers le gène de STAT4 et la région intergénique de STAT1/STAT4, avec une forte association au rs3821236, rs3024866, rs75744865 et rs1467199. La structure de la région en déséquilibre de liaison définit 6 blocks d'haplotypes, dont 2 sont localisés dans le gène de STAT1, 1 dans la région intergénique STAT1/STAT4 et 3 dans le gène de STAT4 (Figure 14). Les résultats montraient qu'il y avait une association de 2 blocks d'haplotypes supplémentaires en plus du block 6 qui contient le rs7574865 : il s'agissait du block 3 contenant le rs1467177 et le block 4 contenant le rs3821236 et rs 3024866. Ces résultats montraient qu'il y avait un effet individuel des SNPs (Abelson, Delgado-Vega et al. 2009).

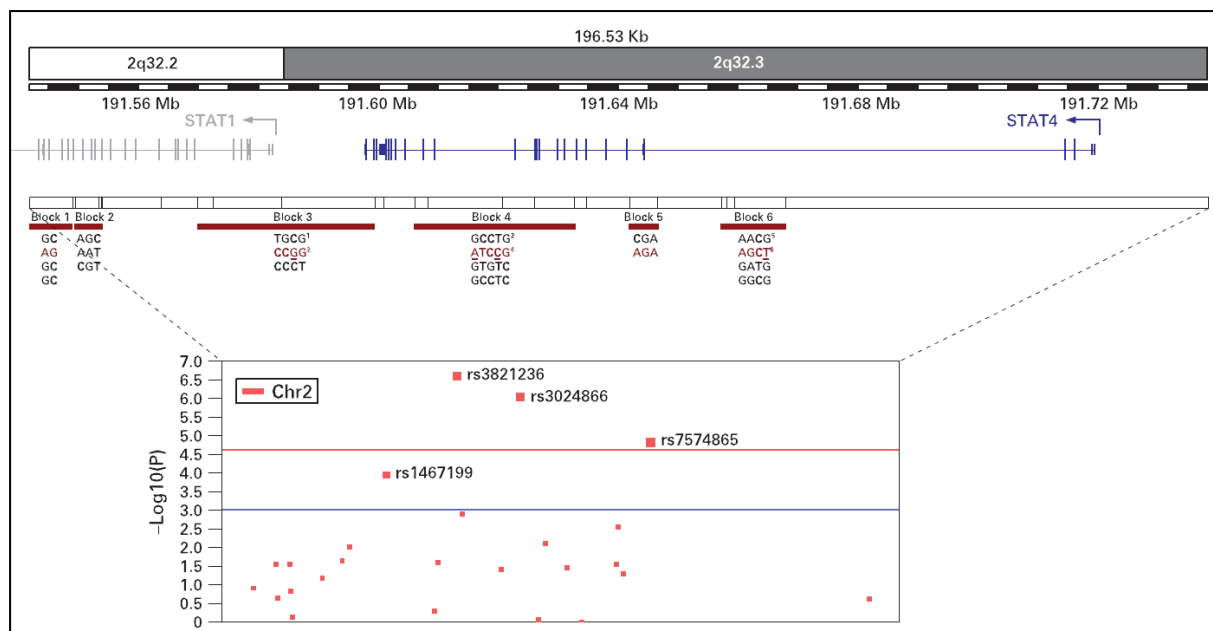


Figure 14 : Localisation de 6 blocks d'haplotypes de 2 gènes juxtaposés sur le chromosome 2 – *STAT1* et *STAT4*. Les blocks d'haplotypes sont représentés par des lignes rouges. Abelson et al.

ARD 68; 11:1746-53, 2009.

1.4.4. Epistasie entre IRF5 et STAT4

Des études dans le LES ont été menées pour étudier si l'effet de *STAT4* était indépendant d'*IRF5* ou s'il y avait un effet épistatique entre les SNPs de ces gènes. L'épistasie désigne l'interaction existant entre deux ou plusieurs gènes. Ainsi, des analyses de régression logistique ont été réalisées et révèlent qu'il n'y avait aucune interaction génétique entre les SNPs d'*IRF5* et *STAT4* (Sigurdsson, Nordmark et al. 2008; Abelson, Delgado-Vega et al. 2009). Néanmoins, il était observé une augmentation significative de la susceptibilité au LES quand les SNPs d'*IRF5* et *STAT4* étaient additionnés (figure 15). Ces résultats ont donc suggérés que les SNPs d'*IRF5* et *STAT4* agissaient de manière additive pour la susceptibilité du LES (Sigurdsson, Nordmark et al. 2008; Abelson, Delgado-Vega et al. 2009). Cet effet additif a été confirmé dans d'autres maladies auto-immunes telles que dans la sclérodermie (Dieude, Guedj et al. 2009), syndrome de Sjögren (Nordmark, Kristjansdottir et al. 2009).

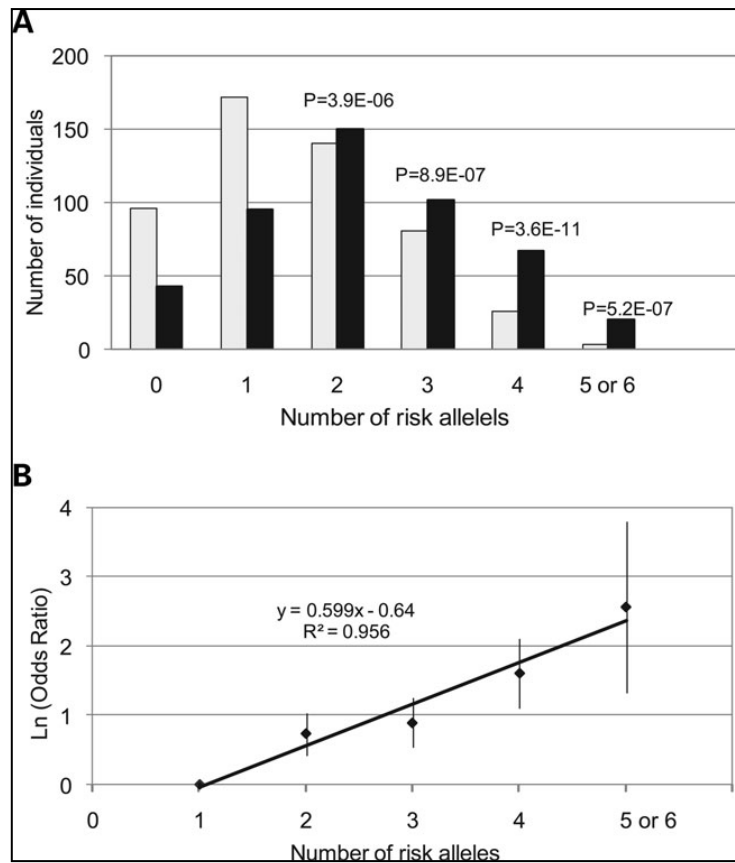


Figure 15 : Effet des allèles à risques de SNPs d'IRF5 et STAT4 : allèle de l'INDEL CGGGG et allèle C du rs10488631 d'IRF5, C allèle du rs7582694 de STAT4. (A) Distribution du nombre de patients et de témoins en fonctions du nombre d'allèles à risques d'IRF5 et STAT4. (B) Analyse par régression linéaire montrant un effet additif des SNPs d'IRF5 et STAT4.

Sigurdsson et al. Hum Mol Genet. 17 ;18 :2868-2876. 2008

1.5. EPIGENETIQUE

1.5.1. Historique de l'épigénétique

C'est souvent à Conrad Waddington (1905-1975) que l'on attribue l'invention du terme « épigénétique », en 1942, pour nommer « la branche de la biologie qui étudie les relations de cause à effet entre les gènes et leurs produits, faisant apparaître le phénotype. La notion de phénotype non porté par des variations de bases nucléotidiques est capitale. La première mention de l'épigénétique dans la littérature est apparue au milieu du XIXème siècle, mais on peut faire remonter l'origine du concept à Aristote (384-322 av. J.-C.). Il croyait en une épigénèse : c'est-à-dire le développement d'une forme organique individuelle dérivée de l'informe. Ce point de vue contesté était le principal argument contre une forme de développement à partir de minuscules corps déjà formés. Encore aujourd'hui, la question de savoir dans quelle mesure nous sommes préprogrammés ou façonnés par l'environnement continue à susciter des controverses. Le domaine de l'épigénétique est apparu pour combler la brèche entre l'inné et l'acquis.

1.5.2. Définition de l'épigénétique

L'épigénétique est l'étude des caractères, tel les changements des états de transcription des gènes, qui sont héréditaires au cours des divisions cellulaires mais qui n'impliquent aucun changement de la séquence d'ADN. Ces caractères sont en général réversibles (« reprogrammables » selon le type cellulaire) et sont portés par des modifications dites épigénétiques. La pollution chimique, les médicaments et les drogues, le vieillissement et l'alimentation sont des facteurs qui peuvent agir sur l'épigénome.

1.5.3. Modification et mécanismes épigénétique

1.5.3.1. Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est la seule modification de l'ADN génétiquement programmée chez les mammifères. Cette modification est presque exclusivement trouvée sur la position 5' de la cytosine dans un contexte de séquence dinucléotidique CpGs (Bird 2002). La méthylation en 5' de la cytosine représente environ 1% de l'ensemble des bases du génome variant en fonction des tissus. La majorité de ces CpGs (75%) du génome des mammifères est méthylée (Ehrlich, Gama-Sosa et al. 1982). D'autres types de méthylation comme la méthylation des cytosines dans un contexte de séquence de trinuécléotides CpNpG (où N est Adénine (A), Cytosine (C), Guanine (G) ou Thymine (T)) (Jackson, Lindroth et al. 2002) ou CpA ont été détectées dans des cellules souches embryonnaires de souris et de plantes, mais sont généralement rares dans les tissus somatiques des mammifères. Les CpGs sont sous représentés dans le génome, probablement parce qu'ils agissent comme des mutations hotspot, c'est-à-dire qu'il y a une déamination des CpGs méthylés en TpGs (T : Thymine). Ce taux de mutation des sites CpGs a été estimé être de 10 à 50 fois plus importants que les mutations 'classiques' de bases qui se produisent de manière naturelle dans l'ADN. Ce taux de mutations élevé est lié à la déplétion des dinucléotides durant l'évolution. Les régions riches en CpGs, qui représentent des clusters de 1 à 4 kilobases (kb), sont appelées des CpG islands. Ces CpG island sont retrouvés au niveau des promoteurs et de l'exon 1 de beaucoup de gènes (Illingworth, Kerr et al. 2008).

Les CpGs non méthylés correspondent à la maintenance à l'état ouvert de la structure de la chromatine et donc potentiellement à l'état activé de la transcription d'un gène. Et donc à l'inverse, l'hyperméthylation des CpG island est habituellement liée à la perte d'expression d'un gène et dans un très faible nombre de cas à une augmentation de l'expression d'un gène (Costello, Fruhwald et al. 2000; Renaud, Loukinov et al. 2007). Il y a environ 30 000 îlots

CpGs dans le génome humain. Comme les CpG islands sont essentiellement non méthylés dans le tissu germinale, ils sont moins sensibles à la déamination et sont donc conservés.

La méthylation de l'ADN est le résultat de l'activité enzymatique des ADN méthyl transférase ADN (DNMT). La méthylation de l'ADN s'opère immédiatement après la réplication par un transfert d'un groupement méthyl provenant du S adénosyl L methyonine (SAM) à la cytosine des CpGs dinucléotide en réaction au DNMTs (Figure 16). Les DNMTs sont une famille de 5 membres. Ils sont répartis en 2 classes : La classe des DNMT3 (a, b, L) et DNMT1. La DNMT2 représente une protéine tronquée et non fonctionnelle. La famille des DNMT3 établie les motifs de méthylation sur les CpGs *de novo* alors que la DNMT1 permet le maintien de l'état méthylé durant la réplication des chromosomes (Chen and Li 2006).

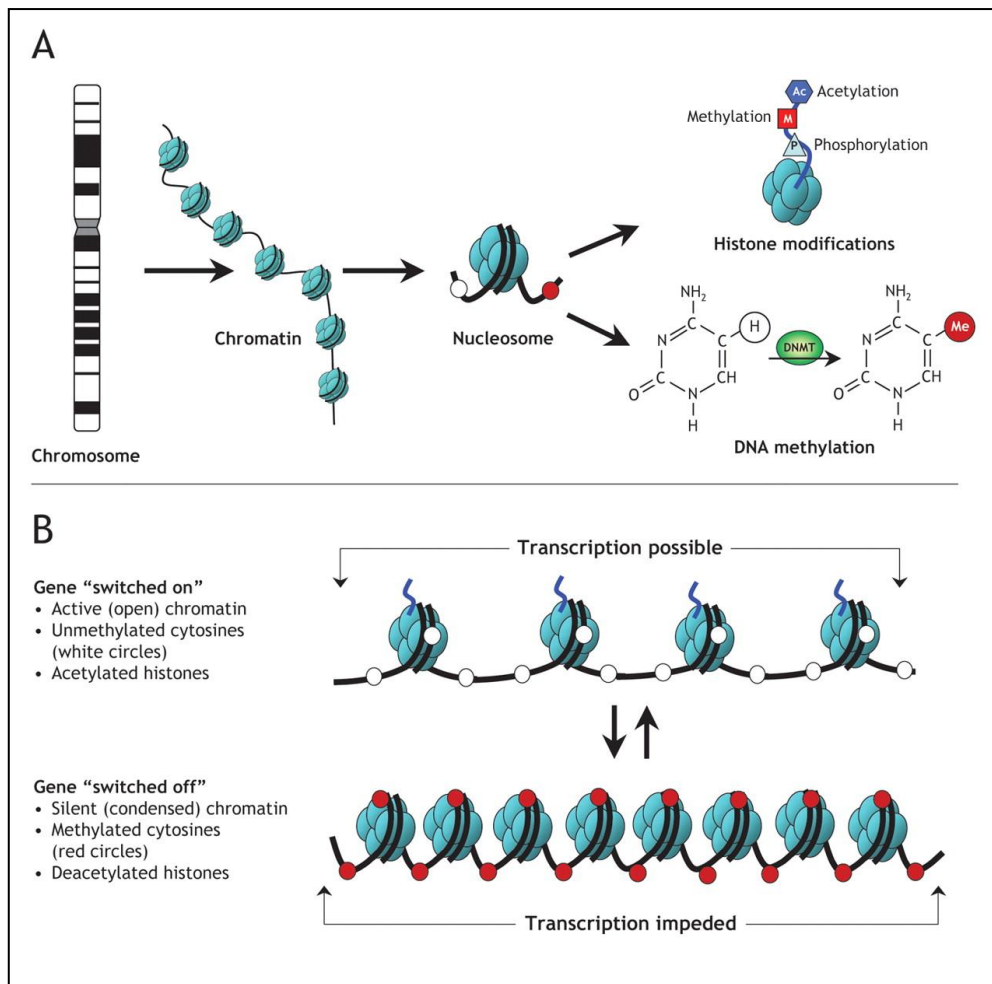


Figure 16 : (A) Schéma des modifications épigénétiques ; (B) Schéma du changement réversible de la conformation de la chromatine qui influence l'expression des gènes. Licensed by Professor Le Dinh Luong under a Creative Commons Attribution License (CC-BY 3.0), and is an Open Educational Resource. Last edited by Vietnam OpenCourseWare on Jul 2, 2009 5:07 am GMT-5.

1.5.3.2. Modifications des histones

La modification des histones a été définie comme une modification épigénétique. La modification postranscriptionnelle des histones, incluant l'acétylation et la méthylation des résidus lysine a été très étudiée ces dernières années.

L'ADN est étroitement lié à des paquets d'octamères de protéines histones, notamment comme H2A, H2B, H3 et H4 qui sont liées entre elles par H1 (Berger 2001). La

méthylation des histones peut être un marqueur à la fois pour une région active et inactive de la chromatine. La méthylation de la lysine 9 sur la région N terminale de l'histone H3 est une marque de l'état silencieux de l'ADN et est globalement distribué tout le long des régions hétérochromatiniques au niveau des centromères et des télomères. Cette méthylation de la lysine 9 est retrouvée sur le chromosome X inactif et sur les régions promotrices non actives. En contraste la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 permet un état actif de la chromatine et est trouvée de façon prédominante dans les promoteurs actifs. Plusieurs études ont montrées que l'activation des gènes était associée avec l'acétylation des histones (Cheung, Briggs et al. 2000). Cette acétylation est catalysée par des enzymes appelées histone acétyltransférase (HAT), comme par exemple CBP/p300, laquelle a pour rôle d'être un co-activateur de la transcription. D'autre part, des facteurs de transcription semblent avoir leurs propres domaines HAT qui donc leur permet d'agir sur l'acétylation des histones. La phosphorylation des histones est aussi généralement associée avec l'augmentation de l'activité de la transcription des gènes (Mahadevan, Willis et al. 1991). Les enzymes histones déacétylases (HDAC) ont un rôle opposé aux HAT et ont pour fonction de réduire l'expression des gènes à travers la déacétylation des histones (Figure 17).

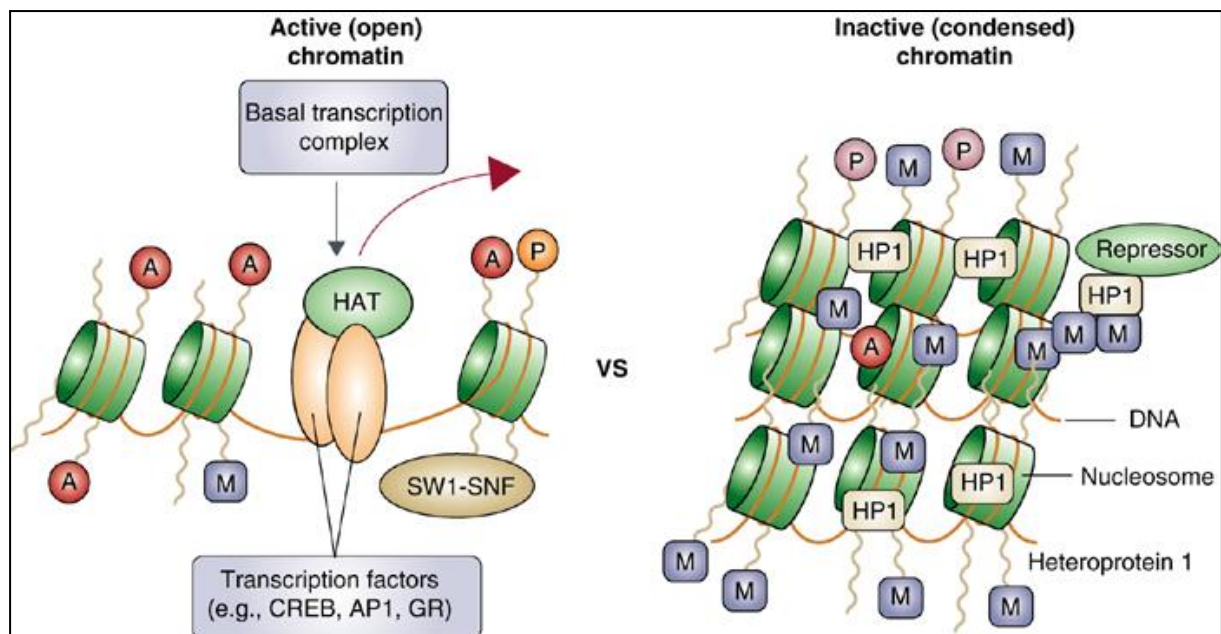


Figure 17 : Schématisation des différents états de la chromatine. Ces changements sont médiés par la modification structurale des histones. Colleen A McClung et al. *Neuropsychopharm* 33, 3–17. 2008

1.5.3.3. Micro-ARN

Les ARNs dit non codants participent de manière surprenante à de nombreux éléments de la régulation, allant du contrôle du nombre de copies dans les bactéries (del Solar and Espinosa 2000) au contrôle de l'expression de gènes chez l'homme. Les Micro-ARN (MiARNs) appartiennent à une famille de petits ARNs de 21 à 25 nucléotides qui, pour ceux qui ont été caractérisés, régulent négativement l'expression des gènes à un niveau post-transcriptionnel (Ambros 2003; Lai 2003; Bartel 2004).

Peu de choses sont encore connues sur la régulation transcriptionnelle des pré-MiARNs. Les MiARNs proviennent de gènes qui leur sont propres et dont ils sont les uniques produits. Néanmoins, certains pré-MiARNs sont localisés dans les introns de gènes contre lesquels ils sont dirigés, leur permettant ainsi d'avoir potentiellement une régulation transcriptionnelle au travers du promoteur du gène cible (Lagos-Quintana, Rauhut et al. 2003).

Les transcrits des MiARNs sont au départ des molécules ARN simple brin de la taille d'environ un millier de nucléotides. Chacun de ces transcrits comporte le long de sa séquence des motifs nucléotidiques intrachâînes partiellement complémentaires ce qui leur permet de former une structure secondaire en forme de longue épingle à cheveux. Cette structure peut être divisée en trois parties : la première représentant le « corps » qui permet de former des séquences plus au moins complémentaires sur le simple brin résultant en un appariement par vis-à-vis ; la seconde se trouve être la tête (en forme de boucle) et la troisième appelée « les jambes » représente les séquences simples brins n'ayant pas trouvé de complémentarités.

A partir de cette forme, une succession d'étapes va permettre la formation du MiARNs en sa forme finale :

- L'enzyme Drosha, une ribonucléase de type III, permet d'apporter la première modification qui a pour but d'effectuer une première série de coupures réduisant considérablement la taille du MiARN en une centaine de nucléotides. La forme du MiARNs est toujours en « épingle à cheveux » (Short hairpin RNA : shRNA) mais sans ses « jambes ». Une exportine-5 va permettre la migration du shRNA dans le cytoplasme.
- Dans le cytoplasme, le shRNA va être soumis à une seconde ribonucléase de type III que l'on appelle Dicer. Cette ribonucléase va achever le travail précédemment commencé par l'enzyme Drosha en infligeant une seconde série de coupures au shRNA (Lee, Jeon et al. 2002; Lee, Ahn et al. 2003). Ces coupures éliminent la partie de la « tête » de l'épingle. Des protéines du type hélicases vont désaparer le petit ARNdb subsistant en deux ARNs simple brin d'une vingtaine de nucléotides.
- Le MiARN néosynthétisé va ensuite s'associer à un complexe protéique appelé RISC (Complexe induisant l'inhibition des ARNs) (Zamore, Tuschl et al. 2000).

C'est sous cette forme que le MiARNs associé à RISC va pouvoir se fixer sur sa séquence cible (Khvorova, Reynolds et al. 2003; Schwarz, Hutvagner et al. 2003). Dans le cas d'un appariement parfait, l'ARNm est éliminé et la traduction ne peut donc plus être réalisée (Figure 18).

Les complexes RISC restent opérationnels après cette destruction de l'ARNm, ce qui leur permet d'opérer sur de nouveaux ou d'autres ARNm de même spécificité. C'est ce « recyclage » qui les rend particulièrement offensifs. Il est à noter que dans le cas d'un appariement imparfait du complexe miARN/RISC, la traduction de l'ARNm est inhibée.

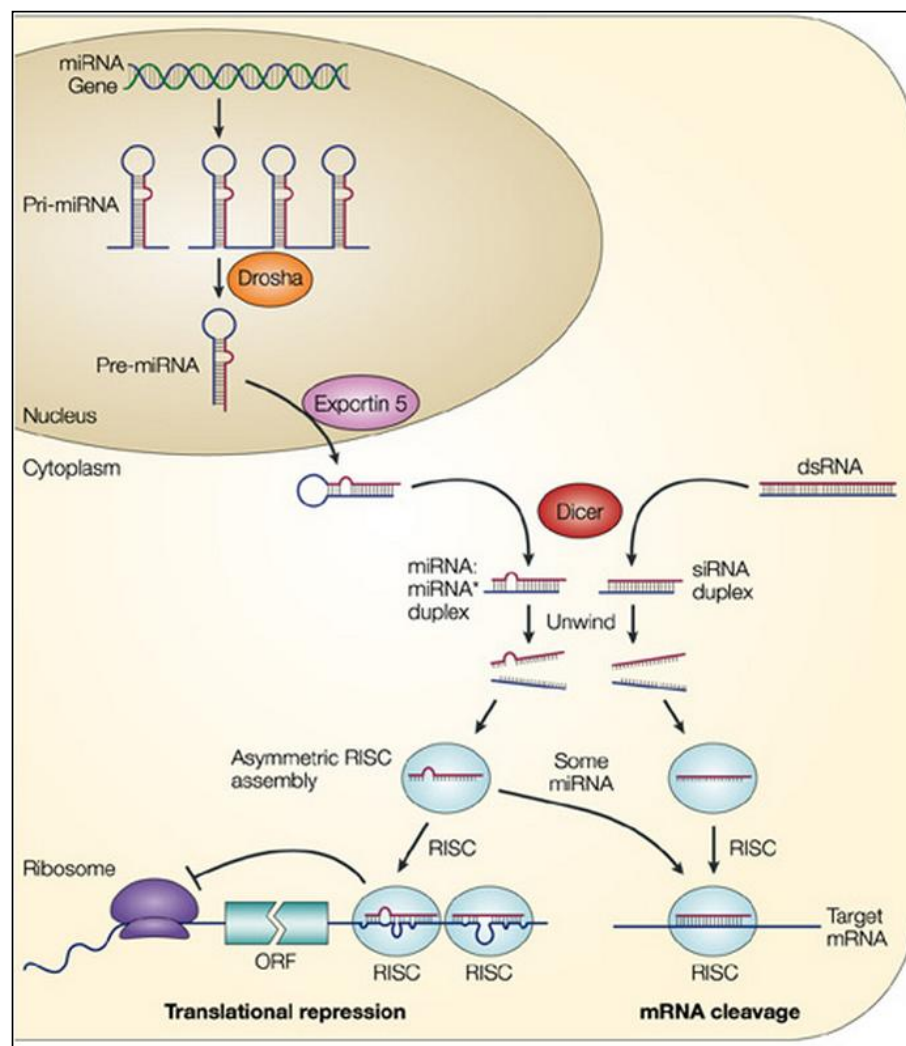


Figure 18: Régulation postranscriptionnelle des genes par les MiARNs. Lin He et al. Nat Rev

1.5.4. Epigénétique et Maladies auto-immunes

Les maladies auto-immunes sont généralement considérées comme des maladies complexes et/ou multi-factorielles. Avec le recul actuel de la génétique qui confère une susceptibilité ou une protection contre les maladies auto-immunes, la génétique ne se retrouve pas seule comme cause du développement de la maladie. Récemment, l'épigénétique s'est superposée à la génétique comme facteur de prédisposition aux maladies auto-immunes.

Comme mentionné précédemment, la méthylation de l'ADN est un acteur fondamental de la structure de la chromatine ayant un rôle primordial sur l'expression des gènes. Des anomalies portées sur les mécanismes de la méthylation de l'ADN résultent en une augmentation aberrante ou inversement une diminution de l'expression du gène, lesquelles peuvent être impliquées dans de nombreuses maladies. La première évidence du rôle de la modification du statut de la méthylation de l'ADN a été mise en évidence dans les lymphocytes T de patients avec un LES actif. En effet, le niveau de méthylation dans les lymphocytes T était retrouvé significativement abaissé (Richardson, Scheinbart et al. 1990). Des études plus récentes ont mis en exergue une association entre l'hypométhylation de l'ADN dans le LES et une baisse de l'activité des DNMTs. Le rôle de la méthylation dans le LES a pu être mis en évidence par des traitements qui ont pour effet de déméthylater l'ADN et qui déclenchaient des LES dits « induits » comme avec le procainamide (anti-arythmique, agent inhibiteur des DNMTs par compétition) et l'hydralazine (anti-hypertenseur, déméthylant) (Scheinbart, Johnson et al. 1991). La procainamide est responsable de l'inhibition de la voie de signalisation ERK qui diminue les niveaux d'activités de la DNMT1 et la DNMT3 durant la mitose cellulaire (Deng, Lu et al. 2003). Le plus courant des traitements ayant un rôle déméthylant et induisant un LES chez la souris est la 5-Azacytidine (5-AzaC). En effet, la 5-AzaC est un analogue structural de la cytosine qui contient un atome azoté en position 5' d'une base de pyrimidine et qui est incorporé au cours des divisions

cellulaires dans le nouveau brin néosynthétisé permettant ainsi d'abroger la méthylation des sites CpG. Cette molécule est utilisée en pratique clinique à visée anticancéreuse dans les syndromes myélodysplasiques par exemple (Vidaza[®]). Le traitement par la 5-AzaC cause donc une hypométhylation générale du génome résultant en une altération de l'expression des gènes. L'exposition des lymphocytes T aux agents déméthylants résultent en une déméthylation du génome de ces cellules et sont responsables de la survenue d'un LES (Cornacchia, Golbus et al. 1988; Quidus, Johnson et al. 1993; Yung, Quidus et al. 1995; Yung, Powers et al. 1996).

Il a été décrit que les lymphocytes T déméthylés de LES présentaient une augmentation de l'expression des récepteurs aux intégrines comme LFA-1 (CD11a/CD18) (Richardson, Strahler et al. 1992; Takeuchi, Amano et al. 1993). La surexpression de LFA-1 a été montrée comme ayant un effet direct sur l'auto-réactivité (Yung, Powers et al. 1996). D'autres gènes ont été montrés impliqués également dans la pathogénèse du LES via une hypométhylation conduisant à leur surexpression : CD40L (Lu, Wu et al. 2007; Zhou, Yuan et al. 2009), CD70 (Lu, Wu et al. 2005; Sawalha and Jeffries 2007). Actuellement, aucune étude épigénétique portant sur l'analyse de la méthylation n'a été réalisée dans le SSp ouvrant ainsi une nouvelle voie à explorer sur la potentialité de son implication dans la pathogénie du Sjögren.

1.6. LIEN ENTRE L'IMMUNITE INNEE ET L'IMMUNITE ADAPTATIVE

1.6.1. STAT4 et voie T_H1

1.6.1.1. Les STATs

Il y a 7 protéines STATs identifiées chez les mammifères qui répondent à des stimuli distincts et induisent la transcription de gènes qui peuvent mener à des états physiologiques différents : STAT1 (Schindler, Fu et al. 1992; Shuai, Schindler et al. 1992), STAT2 (Improta, Schindler et al. 1994), STAT3 (Zhong, Wen et al. 1994), STAT4 (Yamamoto, Quelle et al. 1994; Zhong, Wen et al. 1994), STAT5A, STAT5B (Hou, Schindler et al. 1995) et STAT6 (Hou, Schindler et al. 1994). La caractérisation des STATs implique un arrangement structural de leurs motifs fonctionnels. Ces motifs fonctionnels sont attribués à un domaine N-terminal qui joue un rôle dans la dimérisation des STATs, à une partie coiled-coil (enroulée) qui est souvent impliquée dans l'interaction avec d'autres protéines d'un domaine central de liaison à l'ADN, d'un domaine SRC-homology (SH2) et d'un résidu tyrosine dans la région carboxyle qui selon l'état d'activation des STATs est phosphorylé ou non (Figure 19).

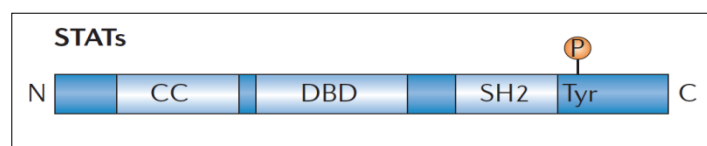


Figure 19 : Représentation linéaire des différents motifs fonctionnels d'une protéine STAT.

DBD = domaine de liaison à l'ADN, CC = coiled-coil (partie enroulée), SH2 = domaine SRC-homologue, Tyr = résidu tyrosine (situé en région carboxyle). Reich NC, Nat Rev Immunol. 2006; 6(8):602-12.

Jusqu'à maintenant les STATs sont les seuls facteurs de transcription qui ont été montrés activés par une phosphorylation de tyrosine. Cette modification permet la formation de dimère à travers l'interaction réciproque de la phosphorylation des tyrosines et des domaines SH2. C'est la conformation de la phosphorylation de la tyrosine qui confère au

STATs leur capacité à se fixer sur leur gène cible (Becker, Groner et al. 1998; Chen, Vinkemeier et al. 1998; Neculai, Neculai et al. 2005).

Il y a de nombreux moyens pour activer la phosphorylation des tyrosines des protéines STATs : les récepteurs de cytokines, les récepteurs couplés à la protéine-G et les récepteurs aux hormones de croissance. Lorsqu'une cytokine se fixe à son récepteur, le récepteur se dimérise permettant la transphosphorylation et l'activation de tyrosines kinases. Les domaines intracellulaires des récepteurs cytokiniques, comme le récepteur à l'IFN (IFNAR), le récepteur à l'IL-12 sont physiquement associés à des tyrosines kinases de la famille des Janus kinase (JAK). Jusqu'à présent, il y a 4 JAK chez les mammifères qui ont été identifiés : Tyrosine kinase 2 (TYK2), JAK1, JAK2 et JAK3 qui sont associées aux récepteurs de cytokines. Suivant la cytokine liant son récepteur, le JAK associé à ce récepteur va s'activer et permettre la phosphorylation de la queue du domaine intra-cytoplasmique du récepteur, lequel est impliqué dans le recrutement et la phosphorylation des protéines STATs (Greenlund, Morales et al. 1995) (Figure 20).

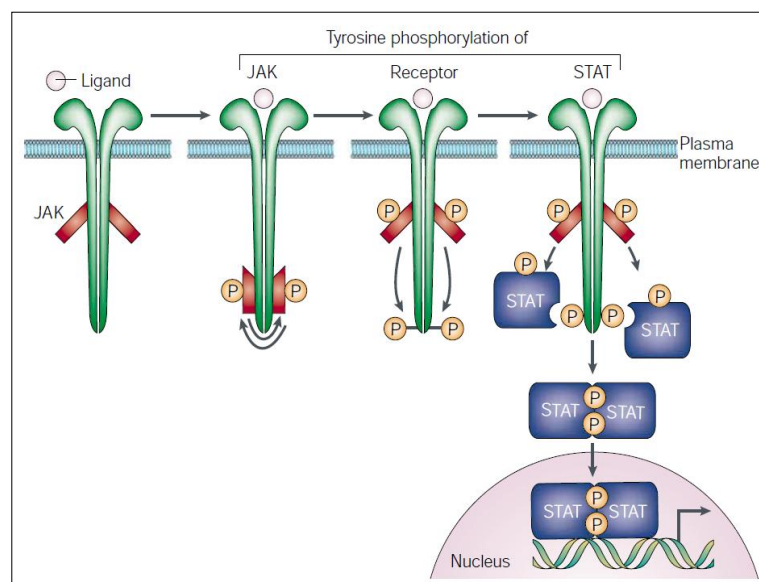


Figure 20 : Voie canonique de la voie JAK-STAT. JAK = Janus kinase, STAT = Signal de transduction et d'activation de la transcription, P = phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002

Sep;3(9):651-62.

Cette voie d'activation est souvent référencée comme la voie JAK/STAT. Les JAKs peuvent donc être activées en réponse à des ligands distincts qui se lient à la protéine G qui est couplé au récepteur et stimule la phosphorylation des résidus tyrosines des STATs. Ces protéines kinases vont permettre le recrutement des molécules STATs. Cette phosphorylation va engendrer une modification de la structure des protéines STATs qui leur permettra d'avoir la capacité de passer de la membrane cytoplasmique au noyau afin de se lier à leur domaine de fixation sur l'ADN.

1.6.1.2. Signal de transduction et d'activation de la transcription 4 (STAT4)

STAT4 est un facteur de transcription qui est directement impliqué dans la voie de signalisation de l'IL-12 et a été montré participer activement à la polarisation T_H1 des lymphocytes et la production d'IFN- γ (Hsieh, Macatonia et al. 1993; Zhong, Wen et al. 1994). STAT4 est positionné sur le chromosome 2 (2q12.33) (Ihle 2001). L'activation des lymphocytes T humains par l'IL-12 permet l'activation de STAT4 par phosphorylation puis fixation sur le promoteur de l'IFN- γ (Barbulescu, Becker et al. 1998).

Les modèles de souris STAT4^{-/-} sont viables et leur phénotype est similaire aux souris IL-12^{-/-} ou IL-12R^{-/-} (Kaplan, Sun et al. 1996; Kaplan, Wurster et al. 1998). Les souris STAT4^{-/-} ont un défaut dans l'engagement de la voie de différenciation T_H1 , dans la production d'IFN- γ , dans l'immunité cellulaire, bien qu'il est à noter que les modèles murins double KO pour le gène de STAT4 et STAT6 présentent une réponse T_H1 résiduelle (Kaplan, Wurster et al. 1998). Les souris STAT4^{-/-} ont donc une augmentation de la susceptibilité aux infections incluant : *Listeria monocytogenes*, *Mycobactérium Tuberculosis*, *Leishmania major*, *Leishmania Mexicana*, *Toxoplasma gondii* et *Trypanosoma cruzi* (Kaplan, Sun et al. 1996; Stamm, Satoskar et al. 1999; Cai, Radzanowski et al. 2000; Tarleton, Grusby et al. 2000; Buxbaum, Uzonna et al. 2002; Aguilar-Delfin, Wettstein et al. 2003; Sugawara, Yamada et al. 2003).

La réponse des souris STAT4^{-/-} aux microorganismes à Gram négatif est complexe et dépend en partie du système employé. Dans les modèles de péritonite septique, l'absence de STAT4 est associée à une réduction de l'inflammation hépatique et de la formation d'abcès ainsi qu'à une amélioration de la survie (Godshall, Lentsch et al. 2001; Matsukawa, Kaplan et al. 2001; Chung, Kasper et al. 2003). Une étude a montré qu'un niveau significativement plus important d'IL-17, cytokine proinflammatoire exclusivement produite par les lymphocytes CD4⁺ activés, était associé à la formation d'abcès dans des systèmes mettant la voie T_H2 en défaut (STAT6^{-/-}) et à l'opposé était retrouvé très diminué dans les souris STAT4^{-/-}. Cependant, les modèles STAT4^{-/-} ont une augmentation de la susceptibilité à la létalité lors de l'administration de LPS (lipopolysaccharide) dans les modèles non infectieux (Lentsch, Kato et al. 2001). Donc STAT4 semble impliqué à la fois au niveau pro-inflammatoire et anti-inflammatoire, dépendant du modèle employé.

L'importance de l'IL-12 et de STAT4 a été examinée dans de nombreux modèles murins développant des maladies auto-immunes et les souris STAT4^{-/-} semblent généralement résistantes aux maladies auto-immunes caractérisées par une réponse T_H1. Ceci inclus les modèles de diabète, l'encéphalite expérimentale auto-immune, myocardite, arthrite (Holz, Bot et al. 1999; Afanasyeva, Wang et al. 2001; Chitnis, Najafian et al. 2001; Finnegan, Grusby et al. 2002; Wang, Ostlie et al. 2004). Inversement, dans un modèle de souris lupique (new Zealand mixed Mice : NZM), l'invalidation de STAT4 accélérail la néphrite et augmentait la mortalité de ces souris (Jacob, Zang et al. 2003; Singh, Saxena et al. 2003).

Jusqu'à maintenant, hormis les associations génétiques, aucun patient avec une mutation invalidante du gène de STAT4 n'a été rapporté dans la littérature. Néanmoins un patient avec une infection récurrente à *Mycobactérium Avium* a été rapporté comme présentant un défaut de la translocation nucléaire de STAT4 (Toyoda, Ido et al. 2004).

1.6.1.3. L'interleukine 12

L'interleukine (IL) 12 est une cytokine hétérodimérique composée de 2 sous unités – p35 et p40 (Gately, Desai et al. 1991; Gubler, Chua et al. 1991; Wolf, Temple et al. 1991; Trinchieri and Scott 1999) – qui sont codées sur 2 chromosomes différents. L'IL-12 a été caractérisée à partir de surnageants provenant de la lignée B-EBV activée avec phorbol-diester. En effet, les surnageants des cultures de ces lignées avaient un effet activateur sur les cellules NK, ce qui lui valut à l'IL-12 d'être nommée initialement Natural Killer Stimulating Factor (NKSF) (Kobayashi, Fitz et al. 1989; Chan, Perussia et al. 1991; Valiante, Rengaraju et al. 1992). La sous-unité p40 est l'homologue du récepteur à la cytokine alors que l'unité p35 possède des homologies avec d'autres cytokines comme l'IL-6 et G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor) (Merberg, Wolf et al. 1992). Quand ces 2 sous-unités sont synthétisées de manière ordonnées dans la cellule, la p70 active est sécrétée (Gubler, Chua et al. 1991). L'IL-12p70 est produite par une variété de cellules incluant les macrophages, cellules dendritiques (Macatonia, Hosken et al. 1995), monocytes et macrophages (D'Andrea, Rengaraju et al. 1992), les lymphocytes B (Airoidi, Guglielmino et al. 2002), les neutrophiles et les kératinocytes (Aragane, Riemann et al. 1994; Cassatella, Meda et al. 1995). L'IL-12p70 est induite par les pathogènes comme les bactéries à GRAM positif et négatif, parasites, virus et champignons. Les produits bactériens induisent une production d'IL-12p70 par les cellules de l'immunité innée via les TLR (Akira, Takeda et al. 2001; Barton and Medzhitov 2002; Scanga, Aliberti et al. 2002). L'IL-12 régule positivement sa propre production via l'IFN- γ qui permet l'activation de l'expression de l'IL-12R β 2. D'autre part, L'IL-12p35 est exprimée de manière ubiquitaire, alors que l'expression de la p40 est restreinte aux cellules productrices d'IL-12 (Trinchieri 1998).

Les membres de la famille de l'interleukine 12 diffèrent des autres membres des familles des cytokines de type I (Figure 21). En effet, en 2000, une nouvelle protéine appelée

p19 a été identifiée sur la base de son homologie avec l'IL-6 et la chaîne p35 de l'IL-12 (Oppmann, Lesley et al. 2000). Cette protéine a été montrée associée avec la chaîne p40 pour former une autre cytokine hétérodimérique connue sous le nom de l'IL-23. Cette découverte est liée à la réévaluation de la fonction de l'IL-12 dans les expériences qui sont basées sur la neutralisation ou la suppression de la chaîne p40 ou de son récepteur, l'IL-12 récepteur $\beta 1$ (IL-12R $\beta 1$). Une approche similaire a permis la découverte de l'interleukine 27, laquelle est formée de la protéine p28 et de la protéine formant une chaîne EBI3 (Epstein-Barr virus-induced gene 3), protéines qui ont respectivement une homologie de séquence avec la chaîne p30 et p40 (Pflanz, Timans et al. 2002). D'autres combinaisons de protéines pourraient donc avoir des rôles physiologiques pertinent, comme EBI3 qui a été rapporté comme étant capable de s'associer avec p35 (Devergne, Birkenbach et al. 1997).

Les membres de la famille de l'IL-12 ont été initialement suggérés comme ayant la capacité à polariser les lymphocytes vers la voie T_H1 . Il est donc maintenant bien établi qu'en dépit de leurs similarités structurales et fonctionnelles, l'IL-12, l'IL-23 et l'IL-27 (IL-35) possèdent des fonctions différentes. L'IL-12 a un rôle central dans l'induction de la différenciation des lymphocytes $CD4^+$ naïfs en cellules effectrices T_H1 et joue un rôle tout aussi important sur les lymphocytes T $CD8^+$ et les cellules NK dans la production d'IFN- γ (Trinchieri 2003).

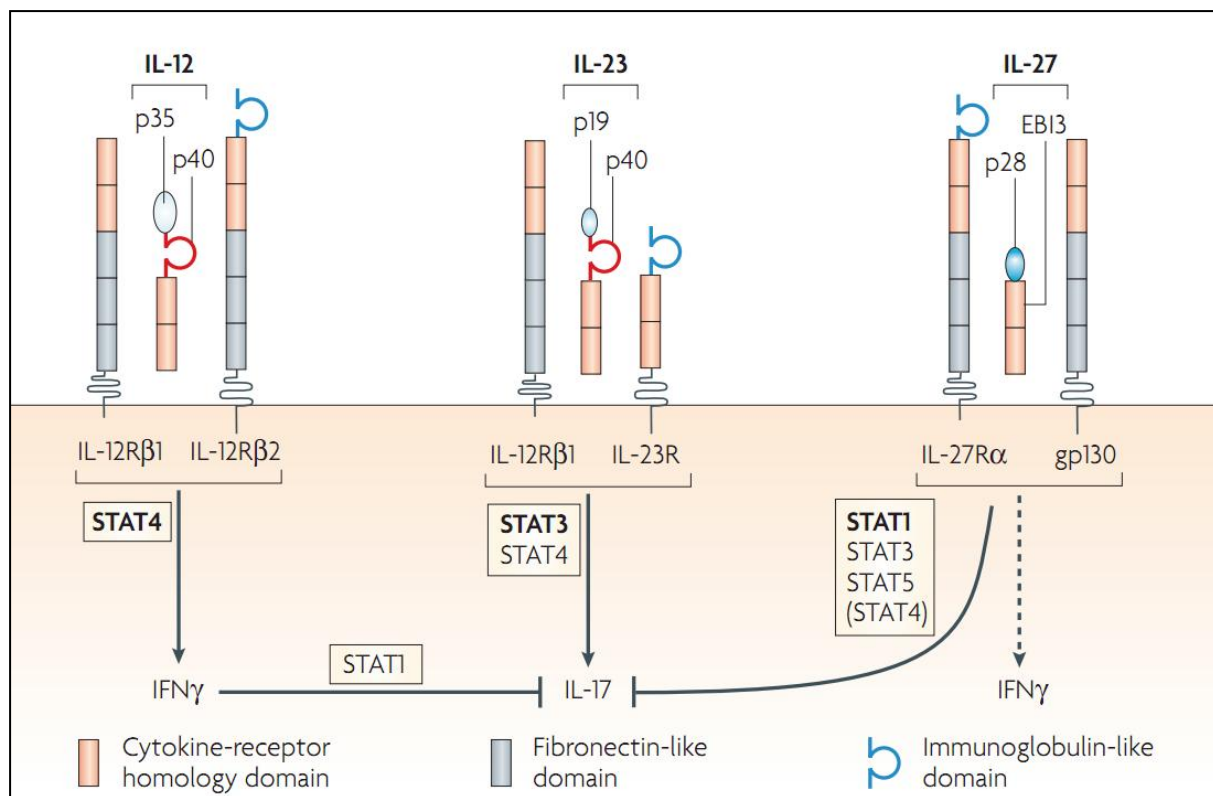


Figure 21 : *Famille des cytokines de l'interleukine 12*. Goriely et al. *Nat Rev Immunol*; 8:81-86. 2008

1.6.1.4. Le récepteur à l'interleukine 12

Le récepteur de l'IL-12 est composé de 2 sous unités – $\beta 1$ & $\beta 2$ (Gubler, Chua et al. 1991; Schoenhaut, Chua et al. 1992; Chua, Chizzonite et al. 1994; Presky, Yang et al. 1996) (Figure 21) – lesquelles sont structurellement liées à la superfamille des cytokines de type I (Chua, Chizzonite et al. 1994; Chua, Wilkinson et al. 1995; Presky, Yang et al. 1996). Les gènes des chaînes $\beta 1$ et $\beta 2$ sont situés respectivement sur le chromosome 19p13.1 et le chromosome 1p31.2. L'affinité de la chaîne $\beta 1$ pour l'IL-12 est faible sans la coexpression de l'IL-12R $\beta 2$, l'expression des 2 chaînes étant requise afin d'avoir une réponse efficace (Presky, Yang et al. 1996). L'IL-12p40 interagit avec la sous-unité $\beta 1$ de l'IL-12R alors que l'IL-12p35 interagit avec l'IL-12R $\beta 2$. La sous-unité $\beta 2$ est la chaîne du récepteur qui transduit le signal. En effet, chez l'homme, la tyrosine 800 est critique pour le recrutement de STAT4 (Naeger, McKinney et al. 1999). En contraste, la chaîne $\beta 1$ ne possède pas de résidu tyrosine

intracellulaire et n'est donc pas capable de transduire le signal. L'IL-12R β 1 est plus impliqué dans la liaison avec l'IL-12 (Wu, Wang et al. 2000). L'IL-12R est exprimé sur les lymphocytes T, les cellules NK et les cellules dendritiques (Grohmann, Belladonna et al. 1998).

La voie de signalisation de l'IL-12 a un rôle important dans la régulation de l'expression de la chaîne de l'IL-12R β 2, laquelle permet exclusivement la polarisation des cellules vers la voie T_H1 (Szabo, Dighe et al. 1997; Szabo, Kim et al. 2000). La voie de signalisation de l'IL-12 a été montrée invalidée dans des lymphocytes T de modèles murins transgéniques pour le gène de SOCS3 (Membres suppressif de la signalisation des cytokines). En effet, la fonction inhibitrice de SOCS3 est basé sur son interaction avec la phosphorylation de la tyrosine de JAK ou du recepteur cytokinique (Sasaki, Yasukawa et al. 2000). L'inhibition de la voie de signalisation de l'IL-12 par SOCS3 réduit la différenciation T_H1 (Seki, Inoue et al. 2003).

1.6.1.5. Voie de signalisation de l'interleukine 12 et STAT4

Les cellules eucaryotes ont évolué avec des informations génétiques séparées du compartiment du cytoplasme par l'intermédiaire de la membrane nucléaire. Cette séparation a co-évolué avec des mécanismes régulateurs qui permettent le contrôle du trafic des protéines et de l'ARNm vers l'intérieur ou l'extérieur du noyau. Ce trafic s'effectue à des endroits précis de la membrane nucléaire. Il se réalise en effet au niveau de pores nucléaires (NPCs) (Davis 1995; Rout, Aitchison et al. 2000; Suntharalingam and Wente 2003). Les petites molécules peuvent diffuser à travers ces NPCs mais les grosses protéines doivent faire appel à des protéines cargo. Ces protéines cargo sont des séquences d'acides aminés qui permettent soit de donner un signal de localisation nucléaire (NLSs) ou soit de donner un signal d'exportation nucléaire (NESs). Ces transporteurs font parties de la famille des karyophérines et ils ont donc habituellement pour fonction de permettre l'export ou l'import de protéines, et

c'est pour cette raison qu'ils sont nommés respectivement importine et exportine (Gorlich and Mattaj 1996; Mattaj and Englmeier 1998; Macara 2001; Pemberton and Paschal 2005).

L'interleukine 12 a la capacité de phosphoryler STAT4 à travers l'IL-12R. En effet, après fixation de l'IL-12, la phosphorylation de la tyrosine 800 de l'IL-12R β 2 va permettre le recrutement de STAT4 qui se trouve à l'état latent dans le cytoplasme. STAT4, une fois phosphorylé, va se dimériser et pouvoir transloquer dans le noyau par l'intermédiaire de kariophérines importine- α 5 et importine- β 1. Le dimère STAT4, une fois dans le noyau, va se fixer dans le promoteur de ses gènes cibles, comme celui de l'IFN- γ (Figure 22) (Jacobson, Szabo et al. 1995).

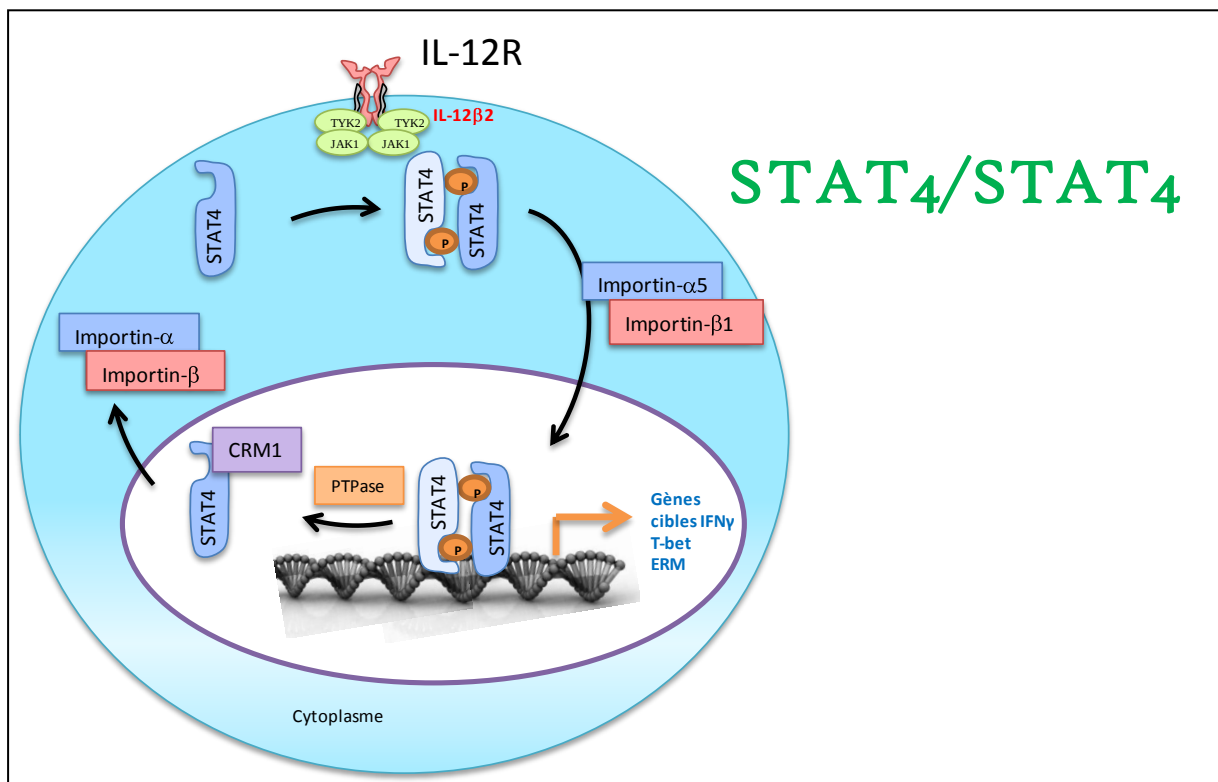


Figure 22 : Signalisation de l'interleukine 12 et STAT4.

1.6.2. STAT4 et voie interféron de type I

Les mécanismes moléculaires permettant la différenciation T_H1 ont été liés à l'identification de 2 majeurs acteurs de cette voie de signalisation. Il s'agit du couple IL-

12/STAT4 (Hsieh, Macatonia et al. 1993; Jacobson, Szabo et al. 1995; Kaplan, Sun et al. 1996; Magram, Connaughton et al. 1996) et de l'IFN- γ /STAT1/T-bet (Szabo, Kim et al. 2000; Lighvani, Frucht et al. 2001; Mullen, High et al. 2001; Szabo, Sullivan et al. 2002). La voie de signalisation de T-bet a été la plus importante car dans des souris T-bet knock-out (KO) la différenciation T_H1 se retrouve être invalidée. Le facteur de transcription T-bet est essentiel pour une activation précoce du promoteur de l'IFN- γ (Szabo, Kim et al. 2000; Mullen, High et al. 2001; Afkarian, Sedy et al. 2002; Szabo, Sullivan et al. 2002).

La fonction de l'IFN- α/β et IFN- γ dans l'induction de la différenciation des lymphocytes T naïfs humains et murins en cellules effectrices de type T_H1 reste très controversée. Néanmoins, il y a maintenant de plus en plus d'arguments dans la littérature montrant l'implication de l'IFN de type I dans la phosphorylation de STAT4 chez l'homme (Cho, Bacon et al. 1996; Rogge, D'Ambrosio et al. 1998; Matikainen, Sareneva et al. 1999). En effet, il a été montré que cet effet sur la phosphorylation de STAT4 est direct sur les lymphocytes T en l'absence de cellules présentatrices d'antigènes ou de facteurs exogènes autres que l'IFN- α/β (Figure 23) (Rogge, D'Ambrosio et al. 1998). L'implication de l'IFN de type I dans l'activation de STAT4, et donc dans la production d'IFN- γ , permet de mettre en évidence que la différenciation cellulaire T_H1 peut se réaliser en l'absence d'IL-12.

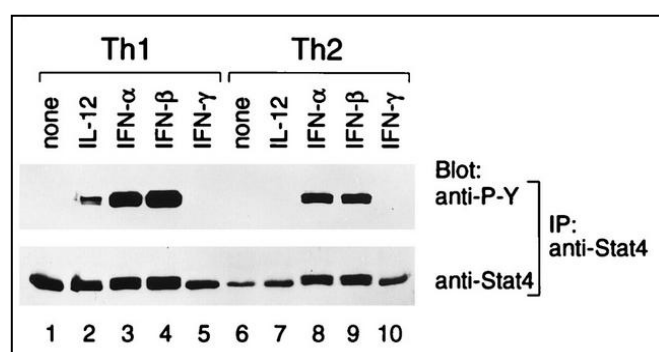


Figure 23 : Induction de la tyrosine phosphorylation de STAT4 par l'IFN de type I dans des cellules T_H1 et T_H2 humaines. Rogge et al. *J Immunol.* 15 ;161(12) :6567-74. 1998

Dans les modèles murins, l'implication de l'IFN- α dans la phosphorylation de STAT4 reste très controversée. En effet, le gène de STAT2 chez la souris présente des insertions de mini-satellites qui altèrent la partie carboxy-terminale de la protéine STAT2 et donc empêche la phosphorylation de STAT4 mais pas des autres STATs. Ce résultat suggère que le STAT2 murin ne permet pas un développement T_H1 des lymphocytes T $CD4^+$ par l'intermédiaire de STAT4 comme cela a pu être montré chez l'homme (Banchereau, Bazan et al. 1994; Rogge, Barberis-Maino et al. 1997; Ozaki, Coren et al. 1999; Ruedl, Kopf et al. 1999). Néanmoins, des études ont montré que l'IFN de type I a la capacité de pouvoir phosphoryler STAT4 pour initier la production d'IFN- γ (Nguyen, Watford et al. 2002; Berenson, Gavrieli et al. 2006). D'autre part des études ont montré que la phosphorylation de STAT4 par l'IFN- α ne permettait pas d'avoir une expression stable de T-bet et donc de permettre une différenciation T_H1 en absence d'IL-12 (Persky, Murphy et al. 2005; Ramos, Davis et al. 2007).

Dans le processus d'activation de STAT4 sur la voie de signalisation de l'IL-12, c'est la protéine STAT4 qui va se fixer à la sous-unité $\beta 2$ de l'IL-12R. Des travaux ont pu mettre en évidence que le mécanisme de recrutement de STAT4 dans la signalisation de l'IFN de type I. Il apparaît que l'activation de STAT4 ne peut se faire directement au niveau du récepteur IFNAR et que cette activation ne peut se faire sans l'implication d'un intermédiaire : STAT2 phosphorylé (Figure 24) (Farrar, Smith et al. 2000).

Si l'IFN de type I peut induire une polarisation T_H1 via STAT4, aucune donnée n'est disponible dans la littérature pour suggérer que l'IL-12 puisse médier l'induction d'IFN α/β ou de protéines de la voie IFN de type I via STAT4.

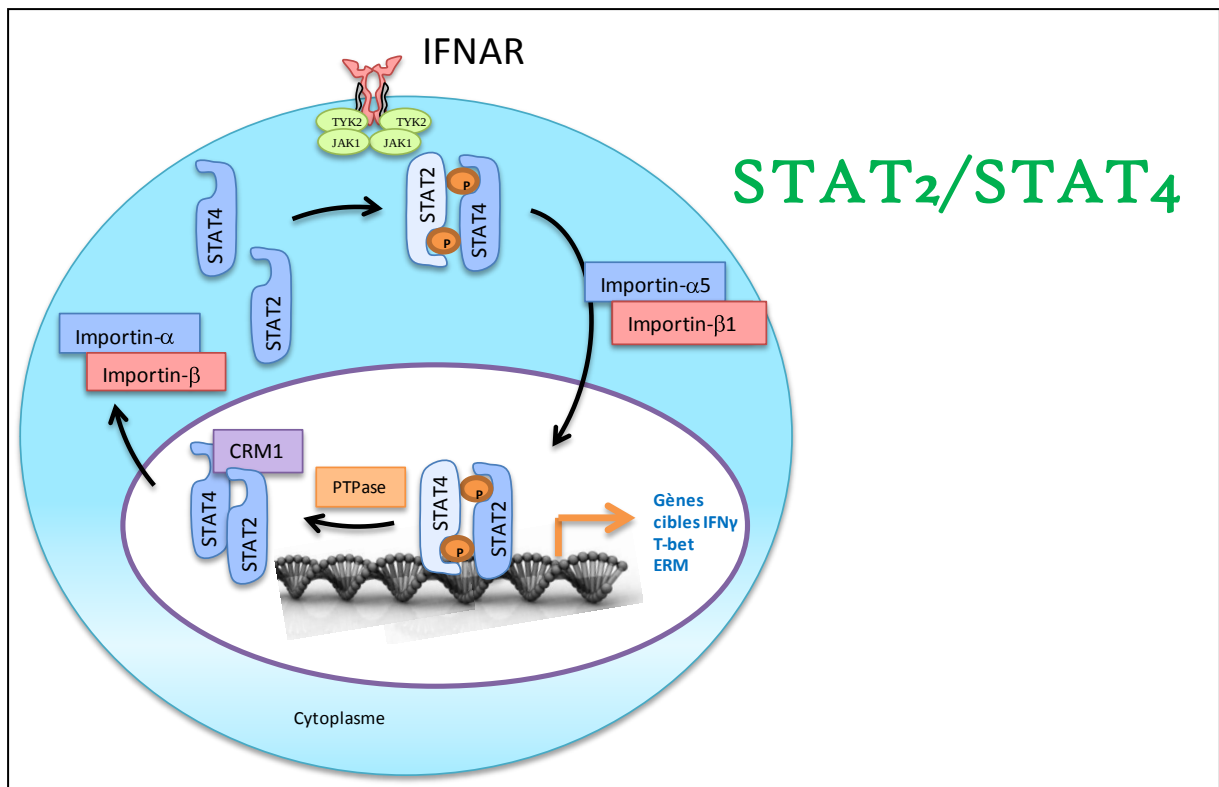


Figure 24 : Signalisation de l'IFN de type I à travers STAT₂/STAT₄

OBJECTIFS

2. OBJECTIFS

Le but de ce travail de thèse de Sciences, effectué sur une période de 3 ans, a été de progresser dans l'identification et la compréhension des conséquences fonctionnelles des facteurs génétiques et épigénétiques impliqués dans la prédisposition au syndrome de Sjögren. L'ensemble de ces facteurs étant impliqués directement ou indirectement dans l'induction d'une signature IFN de type I, ce travail de thèse était ainsi axé sur « *Les causes et conséquences de l'activation de l'IFN de type I dans les maladies auto-immunes. Etude dans le modèle du syndrome de Sjögren* ».

Facteurs génétiques de prédisposition au syndrome de Sjögren :

La génétique joue un rôle important dans la susceptibilité aux maladies auto-immunes. Récemment les gènes IRF5 et STAT4 ont été fortement associés aux maladies auto-immunes. Une partie de ce travail était de démontrer une implication de ces gènes dans le modèle du syndrome de Sjögren ainsi que d'y associer un rôle fonctionnel.

Facteurs épigénétiques de prédisposition au syndrome de Sjögren

IRF5 est un gène qui a pour caractéristique d'avoir dans son promoteur un CpG island. Les CpG island peuvent être soumis à une régulation épigénétique par la méthylation. Le but de cette partie était de rechercher une dérégulation épigénétique d'IRF5 pouvant conduire à une augmentation de l'expression de son ARNm dans le syndrome de Sjögren.

Etude du rôle de STAT4 dans la voie IFN de type I observée au cours du syndrome de Sjögren

STAT4 a été montré associé au syndrome de Sjögren. Il était cependant étonnant de retrouver un gène impliqué dans la voie IFN de type II associé à une maladie ayant une signature IFN de type I tel que le syndrome de Sjögren. D'autre part, nous avons montré que l'ARNm des gènes IFN de type I induit était directement corrélé à l'ARNm de STAT4. Ces

deux observations nous ont amenées à rechercher le rôle potentiel direct de STAT4 dans la signalisation de la voie IFN de type I.

RESULTATS

3. RESULTATS

3.1. ARTICLE 1

The CGGGG insertion/deletion polymorphism of IRF5 promoter is a strong risk factor for primary Sjögren's Syndrome

Précédemment, notre équipe a associé le rs2004640, un polymorphisme d'IRF5, au syndrome de Sjögren (Miceli-Richard, Comets et al. 2007). Ce SNP est localisé dans une région intronique située à 2 paires de bases de l'exon 1B et joue un rôle important dans le splicing d'IRF5 en faveur d'une augmentation des transcrits contenant l'exon 1B. Récemment, un polymorphisme d'insertion/délétion situé dans le promoteur d'IRF5 a été décrit dans les maladies inflammatoires chroniques intestinale (MICI) et dans le LES (Dideberg, Kristjansdottir et al. 2007; Sigurdsson, Goring et al. 2008). La relevance fonctionnelle de ce polymorphisme localisé dans la région promotrice commune à l'ensemble des variants d'IRF5 semble plus importante.

Le but de ce travail a été de démontrer que ce polymorphisme d'insertion/délétion de 5 paires de bases (CGGGG) dans le promoteur d'IRF5 puisse être associé à la susceptibilité au syndrome de Sjögren (SS) primaire et de procéder à une analyse fonctionnelle de ce polymorphisme.

Une cohorte exploratoire était composée de 185 patients avec un SS primitif et de 157 témoins ainsi qu'une cohorte de réplication était composé de 200 patients avec un SS primitif et de 282 controls, tous d'origine Caucasienne. L'expression de l'ARNm d'IRF5 était analysée sur les cellules mononuclées du sang périphériques (PBMCs) de 30 patients avec un SSp et dans des cultures de 4 semaines de cellules de glandes salivaires infectées ou non par

Réovirus provenant de patients avec un SSp ou de témoins présentant des symptômes de sécheresse buccale et/ou oculaire sans maladie auto-immune (syndrome sec idiopathique).

L'allèle à risque du polymorphisme 4R CGGGG d'IRF5 était fortement associé à une augmentation de la susceptibilité au SSp dans les 2 cohortes (odds ratio 2.00 [IC 95% 1.5-2.7], $P = 6.6 \times 10^{-6}$). En plus de cette association génétique avec le SSp primaire, l'expression de l'ARNm d'IRF5 était retrouvée plus élevée en présence de l'allèle à risque 4R CGGGG ($p=0.002$). IRF5 étant impliqué dans la transduction du signal de la voie IFN de type I, nous avons recherché une corrélation avec des l'expression de gènes de cette voie. De fait, l'ARNm d'IRF5 était retrouvé corrélé à l'ARNm de Mx1 et IFITM1 dans les PBMCs de SSp. D'autre part, l'ARNm d'IRF5 dans les cellules de glandes épithéliales salivaires de patients porteurs de l'allèle à risque CGGGG était retrouvé augmenté ($p=0.04$) et cette augmentation était renforcée après infection par Réovirus ($p=0.026$)

Ce travail a permis de mettre en évidence une association génétique du polymorphisme de l'allèle à risque CGGGG d'IRF5 dans le syndrome de Sjögren. L'allèle à risque de ce polymorphisme se révèle être fonctionnel avec une augmentation de l'expression de l'ARNm d'IRF5 dans les PBMCs et cellules de glandes épithéliales salivaires de SSp en particulier en présence d'une stimulation de l'immunité innée via TLR3. Les patients avec une forte expression de l'ARNm d'IRF5 présentaient aussi une forte expression d'ARNm pour les gènes IFN de type I induits dans les PBMCs.

Cette étude montre l'importance de ce gène dans le déterminisme du Sjögren avec une fonctionnalité mettant en exergue le rôle de l'immunité innée et de la cellule résidente dans l'induction de la signature IFN type I.

The CGGGG Insertion/Deletion Polymorphism of the *IRF5* Promoter Is a Strong Risk Factor for Primary Sjögren's Syndrome

Corinne Miceli-Richard,¹ Nicolas Gestermann,¹ Marc Ittah,¹ Emmanuelle Comets,² Pascale Loiseau,³ Xavier Puechal,⁴ Eric Hachulla,⁵ Jacques-Eric Gottenberg,¹ Pierre Lebon,⁶ Laurent Becquemont,⁷ and Xavier Mariette¹

Objective. Interferon regulatory factor 5 is a transcription factor involved in type I interferon (IFN) secretion. This study was undertaken to investigate whether a 5-bp (CGGGG insertion/deletion) promoter polymorphism is involved in genetic predisposition to primary Sjögren's syndrome (SS) and to assess the functional consequences of this polymorphism.

Methods. The exploratory cohort consisted of 185 patients with primary SS and 157 healthy controls, and the replication cohort consisted of 200 patients with primary SS and 282 healthy controls. Levels of *IRF5* messenger RNA (mRNA) were assessed at baseline and after in vitro infection with reovirus in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 30 patients with primary SS and from salivary gland epithelial cells that had been cultured for 4 weeks from patients with primary SS or sicca symptoms.

Results. Carriage of the *IRF5* 4R CGGGG allele

was associated with a greatly increased risk of primary SS in both cohorts (odds ratio 2.00 [95% confidence interval 1.5–2.7], $P = 6.6 \times 10^{-6}$). The CGGGG insertion/deletion polymorphism alone was sufficient to explain the association of primary SS with *IRF5*. The level of *IRF5* mRNA in PBMCs depended significantly on genotype ($P = 0.002$) and was correlated with the levels of mRNA for the IFN-induced genes *MX1* and *IFITM1*. Cultured salivary gland epithelial cells from patients carrying the 4R CGGGG *IRF5* allele showed a high level of *IRF5* mRNA ($P = 0.04$), which was amplified after reovirus infection ($P = 0.026$).

Conclusion. Our findings indicate an association of the CGGGG insertion/deletion polymorphism of the *IRF5* promoter with primary SS. Patients carrying the 4R CGGGG *IRF5* allele had a high level of mRNA for *IRF5* in PBMCs and salivary gland epithelial cells, mainly after in vitro viral infection. Patients with high levels of mRNA for *IRF5* also had high levels of mRNA for type I IFN-induced genes in PBMCs.

Primary Sjögren's syndrome (SS) is characterized by xerostomia and keratoconjunctivitis sicca due to lymphocytic infiltration of salivary and lacrimal glands, with systemic complications involving the joints, skin, lungs, kidneys, and nervous system and an increased risk of lymphoma. The results of recent studies of pathogenic mechanisms in primary SS have supported the notion that the interferon (IFN) pathway plays a role through an IFN signature, both in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and in salivary glands (1,2). Moreover, plasmacytoid dendritic cells, the professional cells that secrete IFN α , are present in salivary glands, the target organ of the autoimmune process (2). Similar findings have been reported in systemic lupus erythematosus,

Supported by the Agence Nationale pour la Recherche.

¹Corinne Miceli-Richard, MD, PhD, Nicolas Gestermann, Marc Ittah, Jacques-Eric Gottenberg, MD, PhD, Xavier Mariette, MD, PhD: INSERM U 802, Université Paris-Sud 11, and Hôpital Bicêtre, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Le Kremlin Bicêtre, France; ²Emmanuelle Comets, PhD: INSERM U 738, Université Paris 7, Paris, France; ³Pascale Loiseau, MD, PhD: INSERM U 396, Hôpital St. Louis, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France; ⁴Xavier Puechal, MD: Hôpital du Mans, Le Mans, France; ⁵Eric Hachulla, MD: Hôpital Claude Huriez, Lille, France; ⁶Pierre Lebon, MD: Hôpital St. Vincent de Paul, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France; ⁷Laurent Becquemont, MD, PhD: Hôpital Bicêtre, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Le Kremlin Bicêtre, France.

Drs. Miceli-Richard and Gestermann contributed equally to this work.

Address correspondence and reprint requests to Xavier Mariette, MD, PhD, Service de Rhumatologie, Hôpital de Bicêtre, 78 Rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin Bicêtre, France. E-mail: xavier.mariette@bct.aphp.fr.

Submitted for publication October 27, 2008; accepted in revised form April 7, 2009.

with the same IFN signature observed in both PBMCs and the kidney (3). These observations have led to a focus on genes involved in innate immunity and the IFN pathway. Such approaches have successfully demonstrated in both diseases a significant association with various polymorphisms of *IRF5*, a gene implicated in IFN secretion after stimulation of innate immunity and in type I IFN signal transduction.

A polymorphism located in the splicing sequence of exon 1B of *IRF5* (rs2004640) is associated with several autoimmune diseases (4–6), including SS (7). Nevertheless, the functional consequences of the *IRF5* rs2004640 T susceptibility allele and/or of the haplotypes carrying this allele remain unclear. Recently, a 5-bp insertion/deletion polymorphism (CGGGG insertion/deletion) located in the promoter region of the *IRF5* transcript containing exon 1A was described, which may resolve this question. The *IRF5* CGGGG insertion/deletion has been associated with ulcerative colitis, Crohn's disease (8), and lupus (6). Two alleles of the *IRF5* CGGGG insertion/deletion polymorphism, consisting of 3 repeats or 4 repeats of the CGGGG sequence, have been identified. This study was undertaken to search for an association of the *IRF5* CGGGG insertion/deletion polymorphism with primary SS and to analyze the functional consequences of this polymorphism in patients, both in PBMCs and salivary gland epithelial cells, the target cells of autoimmunity in primary SS.

PATIENTS AND METHODS

Patients. The exploratory cohort consisted of 185 unrelated patients with primary SS diagnosed according to the American-European Consensus Group criteria (9) and 157 healthy blood donors. Of the 185 patients, 112 (61%) had anti-SSA and/or anti-SSB antibodies. The replication study involved 200 patients with primary SS from the national French prospective cohort ASSESS (Atteinte Systémique et Evolution des patients atteints de Syndrome de Sjögren primitif) and 282 different healthy blood donors. Of the 200 patients, 128 (64%) had anti-SSA and/or anti-SSB autoantibodies. All patients and controls were Caucasian. Informed consent was obtained from all subjects, and the study was approved by the local ethics committee. *IRF5* messenger RNA (mRNA) expression was assessed in PBMCs from 30 patients with primary SS included in the ASSESS prospective cohort, all of whom were positive for anti-SSA antibody.

Genotyping. After genomic DNA was isolated from PBMCs using an EZ1 DNA blood kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), the *IRF5* 5-bp insertion/deletion polymorphism was genotyped by polymerase chain reaction (PCR) and differential capillary migration by use of a GA3730 sequencer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). The primers were 5'-GCA-GCG-GGA-GGT-ACG-GG-3' (forward) and 5'-GCT-CTG-CCC-AGG-CTG-CG-3' (reverse). Four other *IRF5* polymor-

phisms, rs2070197, rs10954213, rs2280714, and rs2004640, were previously genotyped in the exploratory cohort (7).

Culture of salivary gland epithelial cells. Minor salivary gland biopsy is part of the diagnostic procedure for patients presenting with sicca symptoms. We obtained minor salivary gland biopsy specimens from 21 consecutive patients presenting at our center. The same patients were also genotyped for the *IRF5* promoter. After the diagnostic procedure, primary SS was diagnosed in 10 patients. Eleven patients had sicca symptoms but did not fulfill the American-European Consensus Group criteria for primary SS (9).

Salivary gland epithelial cells from biopsy specimens of minor salivary glands were subjected to 4 weeks of primary culture and infected with reovirus 1 as previously described (10). All experiments were performed in duplicate. Cultures were available for 21 subjects at baseline (10 patients with primary SS and 11 with sicca symptoms) and for 17 subjects after reovirus infection (10 patients with primary SS and 7 with sicca symptoms).

Real-time quantitative reverse transcriptase-PCR (RT-PCR). Total RNA was isolated from cells with the use of an RNeasy Mini kit (Qiagen) and digested with DNase I according to the recommendations of the manufacturer (Qiagen). Complementary DNA synthesis involved use of Enhanced Avian HS RT-PCR (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France).

IRF5, myxovirus resistance 1 (*MX1*), RNA-dependent protein kinase (*PKR*), interferon-induced transmembrane protein 1 (*IFITM1*), and β -actin mRNA levels were determined by use of LightCycler-based kinetic quantitative RT-PCR (Roche Diagnostics, Meylan, France). Amplification involved the following primers: for *IRF5*, forward 5'-CAT-TAC-TGT-ACA-GGT-GGT-GC-3' and reverse 5'-AGA-TGT-GAT-GGA-GCT-CCT-TG-3'; for *MX1*, forward 5'-TAC-CAG-GAC-TAC-GAG-ATT-G-3' and reverse 5'-TGC-CAG-GAA-GGT-CTA-TTA-G-3'; for *PKR*, forward 5'-GTT-TCA-AAA-GCA-GTG-TCA-CA-3' and reverse 5'-CGA-TAC-ATG-AGC-CCA-GAA-CA-3'; for *IFITM1*, forward 5'-CCT-GTC-ACT-GGT-ATT-CGG-CTC-T-3' and reverse 5'-CAG-GCT-ATG-GGC-GGC-TAC-3'; and for β -actin, forward 5'-GCT-GTG-CTA-CGT-CGC-CCT-3' and reverse 5'-AAG-GTA-GTT-TGG-TGG-ATG-CC-3'. Primers for *IRF5* were specific to exon 8 and exon 9, which allowed for the amplification of all 6 *IRF5* transcripts containing exon 1A.

Type I IFN functional assay. Active type I IFN levels were measured as previously described (11). Briefly, serum samples were subjected to serial 2-fold dilutions in a 96-microwell plate, and active type I IFN content was determined by cytopathic effect reduction in vesicular stomatitis virus-infected Madin-Darby bovine kidney cells. IFN titers were expressed as international units per milliliter. This test to assess functional type I IFN was validated by the significant correlation we found between active type I IFN and *PKR* mRNA levels ($r = 0.63$, $P = 0.005$). (Additional information is available upon request from the corresponding author.)

Statistical analysis. The allele and genotype frequencies of the *IRF5* 5-bp insertion/deletion promoter polymorphism in patients and controls were compared using the 2-sided chi-square test. Hardy-Weinberg equilibrium was observed in the control population. For expression analyses,

Table 1. Genotype and allele distribution of the *IRF5* 5-bp insertion/deletion polymorphism in patients with primary SS and controls*

	All patients with primary SS	Autoantibody- negative patients with primary SS	Autoantibody- positive patients with primary SS	Healthy controls	OR (95% CI)	<i>P</i> †
Exploratory cohort‡						
Allele frequency						
3R	170 (46)	69 (47)	101 (45)	188 (60)	0.57 (0.42–0.77)	2.7×10^{-4}
4R	200 (54)	77 (53)	123 (55)	126 (40)	1.75 (1.29–2.38)	2.7×10^{-4}
Genotype frequency						
3R/3R	34 (18)	14 (19)	20 (18)	59 (37)	0.37 (0.23–0.61)	7×10^{-5} §
4R/3R	102 (55)	41 (56)	61 (54)	70 (45)		
4R/4R	49 (27)	18 (25)	31 (28)	28 (18)	2.67 (1.64–4.38)	7×10^{-5} ¶
Replication cohort#						
Allele frequency						
3R	209 (52)	84 (58)	125 (49)	344 (61)	0.70 (0.54–0.86)	6.8×10^{-3}
4R	191 (48)	60 (42)	131 (51)	220 (39)	1.43 (1.10–1.85)	6.8×10^{-3}
Genotype frequency						
3R/3R	54 (27)	24 (33)	30 (23)	105 (37)	0.62 (0.42–0.92)	1.8×10^{-2} §
4R/3R	101 (50)	36 (50)	65 (51)	134 (48)		
4R/4R	45 (23)	12 (17)	33 (26)	43 (15)	1.60 (1.08–2.37)	1.8×10^{-2} ¶
Combined cohort**						
Allele frequency						
3R	379 (49)	153 (53)	226 (47)	532 (61)	0.6 (0.5–0.8)	3.6×10^{-6}
4R	391 (51)	137 (47)	254 (53)	346 (39)	1.6 (1.3–1.9)	3.6×10^{-6}
Genotype frequency						
3R/3R	88 (23)	38 (26)	50 (21)	164 (37)	0.5 (0.4–0.7)	6.6×10^{-6} §
4R/3R	203 (53)	77 (53)	126 (53)	204 (47)		
4R/4R	94 (24)	30 (21)	64 (26)	71 (16)	2.00 (1.5–2.7)	6.6×10^{-6} ¶

* Values are the number (%). SS = Sjögren's syndrome; OR = odds ratio; 95% CI = 95% confidence interval; 3R = triple repeat allele.

† All patients with primary SS versus controls.

‡ The exploratory cohort consisted of 185 patients with primary SS (73 who were negative for anti-SSA and anti-SSB antibodies and 112 who were positive for anti-SSA and/or anti-SSB antibodies) and 157 healthy controls. The allele frequency calculation involved 370 chromosomes for patients and 314 chromosomes for controls.

§ 4R/4R carriers versus 3R/3R and 3R/4R carriers.

¶ 3R/3R carriers versus 4R/4R and 3R/4R carriers.

The replication cohort consisted of 200 patients (72 who were negative for anti-SSA and anti-SSB antibodies and 128 who were positive for anti-SSA and/or anti-SSB antibodies) and 282 healthy controls. The allele frequency calculation involved 400 chromosomes for patients and 564 chromosomes for controls.

** The combined cohort consisted of 385 patients (145 who were negative for anti-SSA and anti-SSB antibodies and 240 who were positive for anti-SSA and/or anti-SSB antibodies) and 439 healthy controls. The allele frequency calculation involved 770 chromosomes for patients and 878 chromosomes for controls.

nonparametric tests were used. *IRF5* mRNA levels were compared using the Kruskal-Wallis test or the Mann-Whitney rank sum test, according to the number of study groups. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95% CIs) were calculated. The *r* and *P* values were determined by nonparametric Spearman's correlation analysis. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Association of primary SS with the *IRF5* CGGGG insertion/deletion polymorphism. We found that the *IRF5* CGGGG insertion/deletion polymorphism was significantly associated with primary SS in the exploratory cohort (185 patients and 157 controls), at both the allele and genotype levels (Table 1). Carriage of the *IRF5* 4R CGGGG allele was associated with a

greatly increased risk of developing the disease (OR 2.67 [95% CI 1.64–4.38], $P = 7 \times 10^{-5}$). The association of the *IRF5* CGGGG insertion/deletion polymorphism with primary SS was confirmed in the replication cohort (200 patients and 282 controls) (OR 1.43 [95% CI 1.10–1.85], $P = 6.8 \times 10^{-3}$). The association of the *IRF5* CGGGG insertion/deletion polymorphism was independent of the autoantibody profile of secretion (Table 1). The *IRF5* CGGGG insertion/deletion polymorphism had no influence on the clinical or biologic expression of the disease in terms of systemic involvement ($P = 0.17$), presence of cryoglobulin ($P = 0.36$), or mean value of gammaglobulinemia ($P = 0.63$).

Four other *IRF5* polymorphisms, rs2070197, rs10954213, rs2280714, and rs2004640, were previously

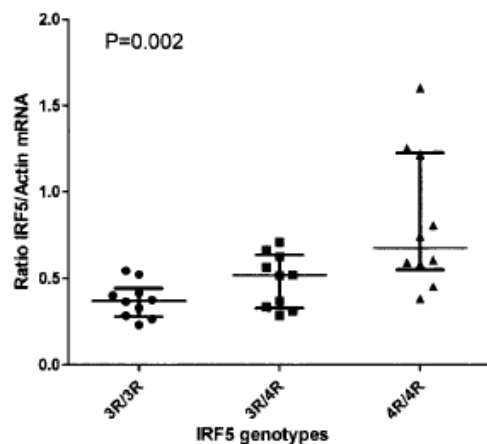


Figure 1. Relative *IRF5* mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with primary Sjögren's syndrome, according to *IRF5* genotype. Values are the median and interquartile range. The *P* value was determined by Kruskal-Wallis nonparametric test. 3R = triple repeat allele.

genotyped in the exploratory cohort (7). Data obtained in this cohort were subjected to univariate and multivariate analyses to assess the respective contributions of the polymorphisms to disease susceptibility. Univariate logistic regression confirmed a significant role of the *IRF5* CGGGG insertion/deletion polymorphism in disease susceptibility ($P = 5 \times 10^{-4}$), a trend effect for the rs2004640 polymorphism (P for trend = 0.07), and no significant effect of rs2070197, rs10954213, or rs2280714. Multivariate logistic regression revealed no additional effect of the combination of *IRF5* CGGGG insertion/deletion polymorphism and each of the 4 other polymorphisms (rs2004640, rs2070197, rs10954213, and rs2280714) on disease susceptibility (data not shown).

Thus, among these 5 genotyped polymorphisms, the *IRF5* CGGGG insertion/deletion was the most strongly associated with primary SS (OR 2.00 [95% CI 1.5–2.7], $P = 6.6 \times 10^{-6}$) (Table 1).

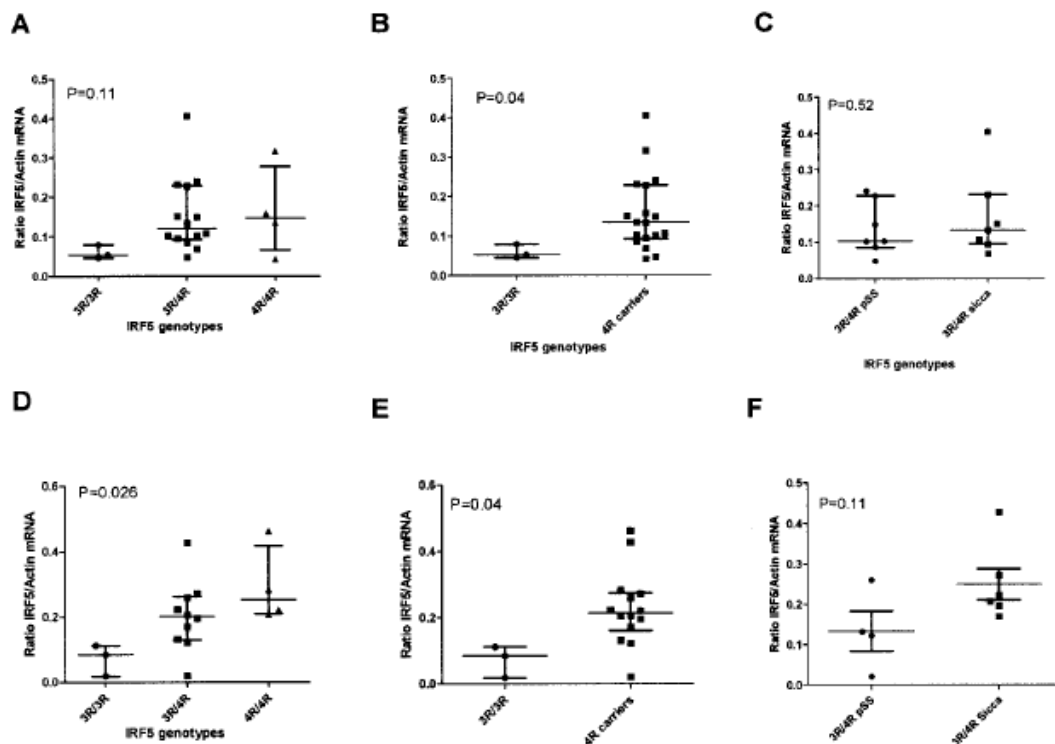


Figure 2. *IRF5* mRNA expression in salivary gland epithelial cells from patients with sicca symptoms or primary Sjögren's syndrome (pSS), at baseline and after reovirus infection, by *IRF5* CGGGG genotype. **A** and **B**, Relative expression of *IRF5* mRNA at baseline in all 3 genotypes (**A**) and in patients who were homozygous for the triple repeat allele (3R) versus patients who were 4R carriers (**B**). **C**, Relative expression of *IRF5* mRNA at baseline in heterozygous patients with primary SS or sicca symptoms. **D** and **E**, Relative expression of *IRF5* mRNA after reovirus infection in all 3 genotypes (**D**) and in patients who were homozygous for 3R versus patients who were 4R carriers (**E**). **F**, Relative expression of *IRF5* mRNA after reovirus infection in heterozygous patients with primary SS or sicca symptoms. Values are the median and interquartile range. *P* values were determined by Kruskal-Wallis nonparametric test (for 3 study groups) or by Mann-Whitney test (for 2 study groups).

Functional consequences of the risk allele (4R CGGGG *IRF5*) for *IRF5* mRNA expression. First, we quantified *IRF5* mRNA level by real-time RT-PCR in PBMCs from 30 patients with primary SS who were positive for anti-SSA and/or anti-SSB antibodies. *IRF5* mRNA level depended significantly on genotype ($P = 0.002$), with patients homozygous for 4R CGGGG *IRF5* showing a higher level of *IRF5* mRNA (mean $\pm$ SD relative ratio for *IRF5* 0.82 ± 0.4) than patients homozygous for 3R CGGGG (relative ratio 0.37 ± 0.1) (Figure 1). Heterozygous patients showed an intermediate level of mRNA for *IRF5* (relative ratio 0.49 ± 0.16).

IRF5 expression was further assessed in salivary gland epithelial cells, the target cells of autoimmunity in SS. Cells were isolated from minor salivary gland biopsy specimens obtained from patients with primary SS ($n = 10$) and patients with sicca symptoms without autoimmune disease ($n = 11$). Cells were cultured for 4 weeks, which led to pure epithelial cells without any contamination by lymphocytes or the cytokine environment from salivary glands. At baseline, cultured salivary gland epithelial cells showed consistent *IRF5* expression, with no significant difference among the 3 genotypes ($P = 0.11$) (Figure 2A). However, the mean $\pm$ SD *IRF5* mRNA relative ratio was 0.17 ± 0.1 in patients carrying the 4R CGGGG *IRF5* allele as compared with 0.06 ± 0.01 in other patients ($P = 0.04$) (Figure 2B). Among subjects with the 3R/4R CGGGG *IRF5* genotype, patients with primary SS and those with sicca symptoms alone did not differ in basal *IRF5* mRNA level ($P = 0.52$) (Figure 2C).

We further assessed whether *IRF5* expression was inducible in salivary gland epithelial cells infected by reovirus, a double-stranded RNA (dsRNA) virus that is a Toll-like receptor 3 (TLR-3) ligand. The differences in *IRF5* mRNA expression by genotype at baseline were much more pronounced after infection of salivary gland epithelial cells with reovirus ($P = 0.026$ between the 3 genotypes and $P = 0.04$ for 4R CGGGG carriers versus other groups) (Figures 2D and E). Again, among subjects with the 3R/4R CGGGG *IRF5* genotype, patients with primary SS and those with sicca symptoms alone did not differ in *IRF5* mRNA level ($P = 0.11$) (Figure 2F).

Because *IRF5* is involved in the type I IFN signaling pathway, we investigated whether *IRF5* risk genotypes were also associated with an increased serum level of active type I IFN. We found no association between *IRF5* genotypes and the serum level of active type I IFN. (Additional information is available upon request from the corresponding author.) Thus, we analyzed the expression of 3 selected genes (*PKR*, *MX1*, and *IFITM1*) that are considered to be good surrogate

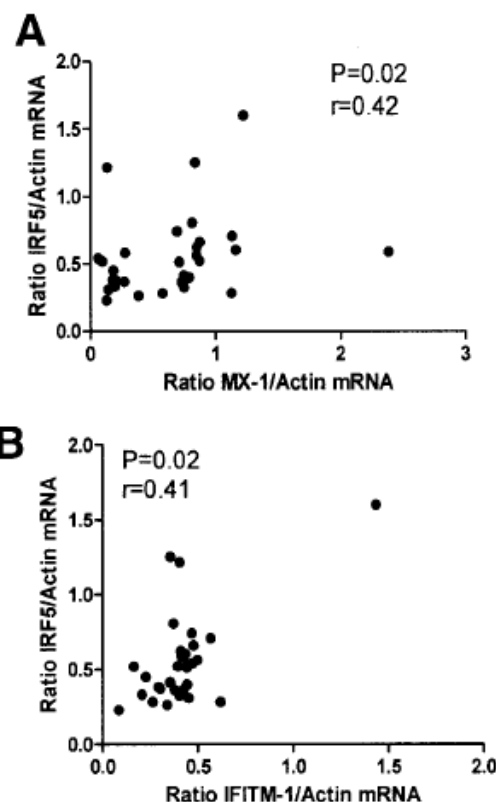


Figure 3. Correlation between levels of mRNA for *IRF5* and levels of mRNA for **A**, *MX1* and **B**, *IFITM1* in peripheral blood mononuclear cells from 30 patients with primary Sjögren's syndrome. The r and P values were determined by nonparametric Spearman's correlation analysis.

markers of activation of the type I IFN pathway. We did not find any significant associations between the levels of mRNA for these genes and *IRF5* genotypes. (Additional information is available upon request from the corresponding author.) Nevertheless, we found a significant correlation between the *IRF5* mRNA level and the levels of *MX1* and *IFITM1* mRNA in PBMCs, which confirmed the functionality of *IRF5* (Figure 3). The *IRF5* mRNA level in salivary gland epithelial cells did not differ between patients with autoantibodies and patients without autoantibodies. Likewise, the *IRF5* mRNA level in PBMCs did not differ between patients who were positive for anti-SSA alone and patients who were positive for both anti-SSA and anti-SSB.

DISCUSSION

Our results demonstrate a replicated association of the CGGGG insertion/deletion polymorphism of the *IRF5* promoter with primary SS. Patients carrying the

4R CGGGG *IRF5* allele had higher levels of mRNA for *IRF5* in PBMCs and in cultured salivary gland epithelial cells.

IRF5 is a gene implicated in type I IFN secretion after stimulation of innate immunity and in type I IFN signal transduction. A polymorphism located in the splicing sequence of exon 1B of *IRF5* (rs2004640) has been found to be associated with several autoimmune diseases (5,6,8), including SS (7). The CGGGG insertion/deletion polymorphism, located in the promoter region of the *IRF5* transcript containing exon 1A, is in linkage disequilibrium with rs2004640. However, as previously demonstrated in lupus, multivariate analysis showed that the genetic association with primary SS was due to the *IRF5* CGGGG insertion/deletion polymorphism and that the presence of each of the 4 other polymorphisms (rs2004640, rs2070197, rs10954213, and rs2280714) had no additional effect on disease susceptibility. When both cohorts were analyzed as a combined group (385 patients with primary SS and 439 healthy controls), the association was pronounced for multifactorial disease (OR 2.00 [95% CI 1.48–2.73], $P = 6.6 \times 10^{-6}$). Recently, Nordmark et al (12) reported an association of the CGGGG insertion/deletion polymorphism of the *IRF5* promoter with primary SS but did not report any functional data. Thus, our study is an important confirmation of the association of primary SS with the *IRF5* CGGGG insertion/deletion polymorphism.

We observed clear functional consequences of the risk allele (4R CGGGG *IRF5*) for *IRF5* mRNA expression. Functional consequences were previously assessed using the relative *IRF5* mRNA level expressed by minigene constructs of promoters cloned from a limited number of individuals homozygous for 4R CGGGG *IRF5* ($n = 4$) or homozygous for 3R CGGGG ($n = 2$) (6), but functional consequences of the CGGGG insertion/deletion polymorphism have never been assessed in a large cohort of genetically susceptible patients. In the present study, the effect of this polymorphism on *IRF5* mRNA expression was demonstrated in PBMCs from patients with primary SS and from resident salivary gland epithelial cells, which are the target of autoimmunity in SS. At baseline, this effect was present in salivary gland epithelial cells only when patients carrying the 4R CGGGG *IRF5* risk allele were pooled. However, after in vitro infection of these cells with reovirus, a dsRNA virus, the effect of the genotype on expression of *IRF5* mRNA in salivary gland epithelial cells was increased, with clear differences among patients with each of the 3 genotypes. Likewise, only patients with the 4R CGGGG *IRF5* risk allele showed a

significant increase in *IRF5* mRNA after reovirus infection (data not shown). Salivary gland epithelial cells from patients with primary SS and those with sicca symptoms alone with the same genotype showed no difference in *IRF5* mRNA level at baseline or after reovirus infection. However, this finding could be due to our use of pure epithelial cells that were cultured for 4 weeks and totally separated from their initial environment.

We could not link the *IRF5* polymorphism to a high serum level of active type I IFN or to a high level of PBMC mRNA for some genes induced by type I IFN. However, we did link the level of mRNA for *IRF5* with that for different type I IFN-induced genes, such as *MX1* and *IFITM1*. These discrepancies could be explained as follows. First, assessing the level of type I IFN in the serum is difficult (13). The lack of a correlation between the *IRF5* polymorphism and the levels of mRNA for *PKR*, *IFIT1*, and *MX1* in PBMCs from the same patients was also demonstrated recently in lupus patients (14). In those patients, however, a correlation was found between the *IRF5* polymorphism and the level of active type I IFN, determined by a complex assay consisting of dosing the levels of mRNA for *PKR*, *IFIT1*, and *MX1* in a cell stimulated with sera from patients. Our assay for assessing type I IFN differed and did not necessarily reflect the same type of active IFN. Second, the increased level of *IRF5* could lead to an increased level of type I IFN mainly in professional cells secreting type I IFN, such as plasmacytoid dendritic cells, and studying such cells is difficult. Third, since type I IFN may be induced by genes other than *IRF5*, we might not have been able to determine the specific effect due to the *IRF5* polymorphism because of a high level of background type I IFN.

Finally, our results demonstrate that the consequence of the genetic polymorphism is increased in resident salivary gland epithelial cells after viral infection, indicating that this polymorphism might be considered a predisposing factor for *IRF5* induction, particularly after viral infection. It would be of interest to investigate whether immune complexes or other viruses triggering other signaling pathways of innate immunity (e.g., TLR-7 or TLR-9) could have the same action as dsRNA viruses.

In conclusion, our work provides evidence of the functional consequences of the *IRF5* polymorphism by demonstrating an association of the *IRF5* genotype with *IRF5* mRNA level in PBMCs from patients with primary SS. The level of *IRF5* mRNA is associated with the levels of *MX1* and *IFITM1* mRNA. Moreover, we demon-

strated the same association between the *IRF5* genotype and *IRF5* mRNA in salivary gland epithelial cells, particularly after viral stimulation. These results shed new light on an interaction between the *IRF5* polymorphism and stimulation of innate immunity by infectious agents in the target organ of primary SS, resident salivary gland epithelial cells, by inducing *IRF5*, a key type I IFN inducer.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr J. Benessiano and all staff members of the Bichat Hospital Biological Resource Center (Paris) for their help in centralizing and managing biologic data collection from the French ASSESS (Atteinte Systémique et Evolution des patients atteints de Syndrome de Sjögren primitive) cohort, a prospective cohort of patients with Sjögren's syndrome, and S. Gaete (Unité de Recherche Clinique Paris Sud) for clinical data collection. We thank the following investigators of the ASSESS cohort (all in France) who recruited the patients and conducted followup: A. L. Fauchais (Limoges), S. Rist (Orleans), D. Sené (La Pitié-Salpêtrière, Paris), V. Le Guern (Cochin, Paris), G. Hayem (Bichat, Paris), J. Sibilia (Strasbourg), J. Morel (Montpellier), E. Hachulla (Lille), A. Saraux (Brest), A. Perdriger (Rennes), X. Puechal (Le Mans), V. Goeb (Rouen), and J. J. Dubost (Clermont-Ferrand). We thank Dr. Patricia Lienard from DNAvision (Belgium) for conducting DNA sample genotyping. We thank Joel Plumas for providing complementary DNA for plasmacytoid dendritic cells, which was serially diluted as quantitative standard for MX-1 quantification.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Dr. Mariette had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study conception and design. Miceli-Richard, Mariette.

Acquisition of data. Miceli-Richard, Gestermann, Ittah, Loiseau, Puechal, Hachulla, Gottenberg, Lebon, Becquemont, Mariette.

Analysis and interpretation of data. Miceli-Richard, Gestermann, Ittah, Comets, Puechal, Gottenberg, Mariette.

REFERENCES

- Hjelmervik TO, Petersen K, Jonassen I, Jonsson R, Bolstad AI. Gene expression profiling of minor salivary glands clearly distinguishes primary Sjögren's syndrome patients from healthy control subjects. *Arthritis Rheum* 2005;52:1534–44.
- Gottenberg JE, Cagnard N, Lucchesi C, Letourneur F, Mistou S, Lazure T, et al. Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:2770–5.
- Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:2610–5.
- Graham RR, Kyogoku C, Sigurdsson S, Vlasova IA, Davies LR, Baechler EC, et al. Three functional variants of IFN regulatory factor 5 (IRF5) define risk and protective haplotypes for human lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:6758–63.
- Rueda B, Reddy MV, Gonzalez-Gay MA, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Petersson IF, et al. Analysis of IRF5 gene functional polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:3815–9.
- Sigurdsson S, Goring HH, Kristjansdottir G, Milani L, Nordmark G, Sandling JK, et al. Comprehensive evaluation of the genetic variants of interferon regulatory factor 5 (IRF5) reveals a novel 5 bp length polymorphism as strong risk factor for systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* 2008;17:872–81.
- Miceli-Richard C, Comets E, Loiseau P, Puechal X, Hachulla E, Mariette X. Association of an IRF5 gene functional polymorphism with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2007;56:3989–94.
- Dideberg V, Kristjansdottir G, Milani L, Libioulle C, Sigurdsson S, Louis E, et al. An insertion-deletion polymorphism in the interferon regulatory factor 5 (IRF5) gene confers risk of inflammatory bowel diseases. *Hum Mol Genet* 2007;16:3008–16.
- Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al, and the European Study Group on Classification Criteria for Sjögren's Syndrome. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002;61:554–8.
- Ittah M, Miceli-Richard C, Gottenberg JE, Sellam J, Eid P, Lebon P, et al. Viruses induce high expression of BAFF by salivary gland epithelial cells through TLR- and type-I IFN-dependent and -independent pathways. *Eur J Immunol* 2008;38:1058–64.
- Ankel H WD, Welling-Wester S, Lebon P. Induction of interferon- α by glycoprotein D of herpes simplex virus: a possible role of chemokine receptors. *Virology* 1998;251:317–326.
- Nordmark G, Kristjansdottir G, Theander E, Eriksson P, Brun JG, Wang C, et al. Additive effects of the major risk alleles of IRF5 and STAT4 in primary Sjögren's syndrome. *Genes Immun* 2009;10:68–76.
- Jabs WJ, Hennig C, Zawatzky R, Kirchner H. Failure to detect antiviral activity in serum and plasma of healthy individuals displaying high activity in ELISA for IFN- α and IFN- β . *J Interferon Cytokine Res* 1999;19:463–9.
- Kariuki SN, Kirou KA, MacDermott EJ, Barillas-Arias L, Crow MK, Niewold TB. Cutting edge: autoimmune disease risk variant of STAT4 confers increased sensitivity to IFN- α in lupus patients in vivo. *J Immunol* 2009;182:34–8.

3.2. ARTICLE 2

STAT4 is a confirmed genetic risk factor for Sjögren's syndrome and could be involved in type I interferon pathway signaling

STAT4 est un facteur de transcription activé par l'IL-12, qui conduit à la sécrétion d'interféron (IFN) de type II. STAT4 est très impliqué sur le plan de la génétique dans plusieurs maladies auto-immunes : polyarthrite rhumatoïde (PR), lupus érythémateux systémique (LES), sclérodermie, diabète de type I, psoriasis et maladie de Crohn. Le polymorphisme rs7582694 (SNP) de STAT4 a été significativement associé au syndrome de Sjögren primitif (SSp) par 2 groupes indépendants.

Toutefois, les conséquences fonctionnelles de ce SNP restent incomprises. Cette étude a pour but de confirmer l'association entre le rs7582694 de STAT4 et le SSp, et d'étudier les conséquences fonctionnelles des génotypes à risque sur le niveau d'expression de l'ARNm de STAT4 (sous-unités α et β). De plus, les gènes de STAT4 et STAT1 sont juxtaposés sur le chromosome 2 permettant de poser l'hypothèse d'un déséquilibre de liaison du rs7582694 avec un SNP fonctionnel de STAT1. Nous avons donc recherché une association entre les génotypes du rs7582694 de STAT4 et l'expression de l'ARNm de STAT1.

De plus, nous avons montré que le polymorphisme CGGGG d'IRF5 et le rs7582694 de STAT4 sont deux facteurs contribuant à la susceptibilité au SSp. Nous avons donc recherché s'il y avait un effet additif ou multiplicatif entre ces 2 gènes.

Nous avons analysé le rs7582694 de STAT4 dans une cohorte exploratoire de 190 patients SSp et 152 contrôles. Cette analyse a été répliquée dans une seconde cohorte indépendante de 192 SSp et 483 témoins. Le niveau d'expression de l'ARNm de STAT4 α et

STAT4 β a été évalué par PCRq dans les PBMCs de 30 patients SSp, et corrélé avec le niveau d'expression en ARNm des gènes PKR, Mx1 et IFITM1 comme marqueurs d'induction de la voie IFN de type I. L'interaction entre l'insertion délétion du CGGGG de l'IRF5 et l'allèle C du rs7582694 de STAT4 a été analysée par régression logistique.

L'allèle à risque C du rs7582694 du gène de STAT4 a été trouvé parmi 28% des patients SSp contre 17% pour les contrôles ($P = 1,6 \cdot 10^{-3}$ - OR 1.81 - 95% IC 1,25 - 2,63). Dans la cohorte de réplification, l'allèle à risque C du rs7582694 de STAT4 avait une fréquence comparable à celle des patients de la cohort exploratoire (30%). L'OR résultant pour les 2 cohortes était de 1,57 (95% IC 1.28 - 1.93 - $P < 1.10^{-4}$). Cet OR était supérieur entre patients SSp et témoins homozygotes pour l'allèle à risque C du rs7582694, suggérant un effet récessif de l'allèle à risque de STAT4 : OR de 2.47 (95% IC 1.46 - 4.15 ; $P = 7.10^{-4}$). Le modèle de régression logistique suggèrait un effet additif entre l'IRF5 et STAT4. L'OR, en choisissant 0 allèle à risque comme référence, était de 1,75 pour les porteurs d'un allèle à risque (95% IC 1,35-2,26), 3,06 pour les porteurs de 2 allèles à risque (95% IC 1,83-5,12) et 5.36 pour les porteurs de 3 ou 4 allèles à risque (95% IC 2,48-11,59). Le niveau d'ARNm de STAT4 α et STAT4 β dans les PBMCs était indépendante du génotype de STAT4 ($P = 0,99$ et $P = 0,17$ respectivement).

De façon non attendue, le niveau d'ARNm de STAT4 α était fortement corrélé avec le niveau d'ARNm des gènes IFN de type I dépendants: PKR ($P = 4.10^{-3}$), MX-1 ($P = 2.10^{-4}$) et IFITM-1 ($P = 8.10^{-3}$).

Ces résultats confirment l'association du SNP rs7582694 de STAT4 avec le SSp. Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'épistasie entre STAT4 et IRF5. Nos résultats ne mettent pas en évidence un rôle fonctionnel du rs7582694 sur le niveau d'expression de l'ARNm de STAT4 α/β ou de STAT1. Toutefois, l'ARNm de STAT4 α était fortement corrélé avec

l'expression de gènes induits par l'IFN de type I. Ceci suggère une implication de STAT4 non seulement dans la voie IFN de type II mais aussi dans la voie IFN de type I. Ce résultat est surprenant dans la mesure où STAT4 est décrit comme impliqué dans la polarisation T_H1. Il paraissait plus « logique » de retrouver STAT4 impliqué dans des maladies auto-immunes associées à l'IFN de type II (IFN- γ) comme la polyarthrite rhumatoïde.

Néanmoins, plusieurs travaux décrivent une activation de la phosphorylation de STAT4 par l'IFN de type I. Si l'IFN de type I peut induire une polarisation T_H1 via STAT4, aucune donnée n'est disponible dans la littérature pour suggérer que l'IL-12 puisse médier l'induction d'IFN- α/β ou de protéines de la voie IFN de type I via STAT4. L'étude du rôle potentiel de STAT4 dans l'induction des gènes de la voie IFN de type I fera ainsi l'objet d'un travail développé ultérieurement dans ce travail de Thèse.

ORIGINAL ARTICLE

STAT4 is a confirmed genetic risk factor for Sjögren's syndrome and could be involved in type 1 interferon pathway signaling

N Gestermann^{1,7}, A Mekinian^{1,7}, E Comets^{2,7}, P Loiseau^{3,7}, X Puechal^{4,7}, E Hachulla^{5,7}, J-E Gottenberg^{6,7}, X Mariette^{1,7,8} and C Miceli-Richard^{1,7,8}

¹Rhumatologie, Institut Pour la Santé et la Recherche Médicale (INSERM) U802, Université Paris-Sud 11, Hôpital Bicêtre, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Le Kremlin Bicêtre, France; ²INSERM U738, Université Paris 7, Paris, France; ³INSERM U396, Immunologie et Histocompatibilité, Hôpital Saint-Louis, AP-HP, Paris, France; ⁴Rhumatologie, Hôpital du Mans, Le Mans, France;

⁵Médecine Interne, Hôpital Claude Huriez, Lille, France; ⁶Rhumatologie, Hôpital De Haute-pierre, Strasbourg, France and

⁷Pharmacologie, Hôpital Bicêtre, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Le Kremlin Bicêtre, France

Signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4) is a transcription factor mainly activated by interleukin 12, which promotes the secretion of type 2 interferon (IFN) by T-helper 1 cells. We assessed the association of STAT4 gene polymorphism and primary Sjögren's syndrome (pSS) and its functional relevance. We analyzed STAT4 rs7582694 polymorphism in an exploratory cohort of 186 pSS patients and 152 controls, and in a replication cohort of 192 pSS patients and 483 controls, all Caucasian. mRNA levels of STAT4 α , STAT4 β , STAT1, and the type 1 IFN-induced genes PKR, MX1 and IFITM1 were assessed in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 30 pSS patients. STAT4 rs7582694 C allele was associated with pSS in both cohorts (odds ratio (OR) 1.57, 95% confidence interval (CI) 1.27–1.93, $P=2.3 \times 10^{-5}$). The association was increased for homozygous subjects, which suggests a recessive effect of the STAT4 at-risk allele. STAT4 α , STAT4 β and STAT1 mRNA levels in PBMCs were not significantly associated with rs7582694 genotypes, however the mRNA levels of STAT4 α and type 1 IFN-induced genes were strongly correlated: PKR ($P=4 \times 10^{-3}$, $r=0.51$), MX1 ($P=2 \times 10^{-4}$, $r=0.63$) and IFITM1 ($P=8 \times 10^{-3}$, $r=0.47$), suggesting that STAT4 might be involved in not only type 2 IFN production but also in type 1 IFN-mediated effects.

Genes and Immunity advance online publication, 10 June 2010; doi:10.1038/gene.2010.29

Keywords: STAT4; Sjögren's syndrome; genetic polymorphism; promoter

Introduction

Primary Sjögren's syndrome (pSS) is a systemic autoimmune disease characterized by xerostomia and keratoconjunctivitis sicca due to lymphocytic infiltration of salivary and lacrimal glands. pSS and systemic lupus erythematosus share number of pathogenic mechanisms. Thus, the role of the interferon (IFN) pathway through an IFN signature, both in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and in salivary glands, has been emphasized in pSS.^{1–3} On the basis of the type of receptor through which they signal, human IFNs have been classified into three major types. Type I IFN bind to a specific cell surface receptor complex known as the IFN α receptor (IFNAR) that consists of IFNAR1 and IFNAR2 chains. The type I IFNs present in humans are IFN α , IFN β and IFN ω . Downstream IFN-signaling pathway

involves Janus kinase, which phosphorylates signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and STAT2. The IFN-stimulated gene factor 3 complex containing STAT1 and STAT2 translocates to the nucleus and induces the transcription of IFN-dependent genes belonging to the IFN pathway. The IFN signature observed in pSS corresponds to increased expression of genes of this IFN pathway. Likewise, plasmacytoid dendritic cells, the professional cells secreting IFN α , are present in salivary glands, the target organ of the autoimmune process. These observations have provided new insights into the genetics of pSS by focusing on genes involved in innate immunity and the IFN pathway; the same interferon regulatory factor 5 (IRF5) polymorphism has been found associated with both pSS and systemic lupus erythematosus.^{4–6}

STAT4 is not classically considered as a factor involved in the type 1 IFN pathway. Conversely, it has a critical role in cellular growth and T-helper 1 differentiation, with interleukin 12 binding to its receptor. STAT4, a major specific factor in interleukin-12 signaling, is recruited and phosphorylated after cytokine stimulation to form homodimers that translocate to the nucleus, bind DNA and modulate gene transcription. STAT4 induces

Correspondence: Professor C Miceli-Richard or Professor X Mariette, Service de Rhumatologie, Hôpital de Bicêtre, 78 rue du Général Leclerc, Le Kremlin Bicêtre 94275, France.

E-mails: corinne.miceli@bct.aphp.fr or xavier.mariette@bct.aphp.fr

⁸These authors contributed equally to this work.

Received 6 January 2010; revised and accepted 06 April 2010

T-helper 1 factors, such as type 2 IFN (IFN γ) and TNF α . Nevertheless, although not typically associated with the type 1 IFN pathway, STAT4 is activated after binding of type 1 IFN to IFNAR. Thus STAT4 could be at the crossroads of the type 1 and 2 IFN pathways. From a transcriptional point of view, STAT4 has alternatively spliced forms lacking the C-terminal amino acids of the transactivation domain. The full-length mRNA is referred to as STAT4 α and the truncated form is designated STAT4 β . Although STAT4 α is functional, the functional role of STAT4 β remains controversial.

Recently, two single nucleotide polymorphisms of STAT4 on chromosome 2q32.3 (rs7582694 and rs7574865, both in complete linkage disequilibrium (LD)), found to be genetic risk factors of systemic lupus erythematosus, were also reported to be associated with pSS.^{6,7} However, the functional consequence of this genetic association has not been studied in patients with pSS or with other autoimmune diseases. In the present study, we aimed to replicate the association between pSS and STAT4 polymorphism in two independent cohorts of patients with pSS. We studied the interaction between IRF5 and STAT4 polymorphism, searched for functional consequences of this genetic association and proposed a new hypothesis concerning the implications of STAT4 in the type 1 IFN response.

Results

STAT4 rs7582694 polymorphism is significantly associated with pSS

In the exploratory cohort, 27% of pSS patients, as compared with 17% of controls, exhibited the STAT4 rs7582694 C allele (odds ratio (OR) 1.81, 95% confidence interval (CI) 1.24–2.62, $P = 2.3 \times 10^{-3}$) (Table 1). In the replication cohort, the frequency of the STAT4 rs7582694 C allele was 30% for pSS patients, which led to a confirmed significant association of STAT4 rs7582694 C allele with pSS (OR 1.56, 95% CI 1.19–2.03, $P = 1.4 \times 10^{-3}$) (Table 1). The overall OR for pSS for the combined cohorts was 1.57 (95% CI 1.27–1.93, $P = 2.3 \times 10^{-5}$) (Table 1). This OR was even higher when pSS patients and controls homozygous for the rs7582694 C allele

were considered, which suggests a recessive effect of the STAT4 at-risk allele: OR 2.47 (95% CI 1.47–4.16, $P = 6 \times 10^{-4}$). The association was true for patients with and without anti-SSA/SSB antibodies, with no significant difference in genotype distribution between the two subgroups ($P = 0.28$) (data not shown).

Additive effects of IRF5 and STAT4 risk allele in pSS susceptibility

The CGGGG insertion in the promoter region of IRF5 was previously associated with pSS. The exploratory cohort was genotyped for this polymorphism,⁴ which allowed for studying the effect of gene–gene interactions on susceptibility for pSS.

We used logistic regression to test different models explaining the risk of pSS as a function of IRF5 and STAT4 polymorphisms. A first set of logistic regression analyses were performed with the observed genotypes for IRF5 and STAT4. IRF5 genotypes were regrouped in three categories: 3R/3R (wild type), 3R/4R (heterozygotes) and 4R/4R (mutants). STAT4 genotypes were also treated as three categories, G/G (wild type), G/C (heterozygotes) and C/C (mutants). IRF5 and STAT4 at-risk genotypes were both strongly linked to the probability of developing pSS. For IRF5, results for the full model with the three categories and for a reduced model with regrouping of heterozygote and mutant subjects (carriers of at least one mutant allele) versus subjects with wild type did not differ significantly, which suggested a dominant effect of the risk allele. For STAT4, results for the full model with the three categories and for a reduced model with regrouping of heterozygote subjects and subjects with wild type (carriers of at least one wild-type allele) versus homozygote mutant subjects suggested a recessive effect of the risk allele. The interaction between IRF5 and STAT4 at-risk genotypes was not significant in the model, which suggested an independent additive effect of IRF5 and STAT4. Nevertheless, the power of detecting an interaction between both the genes was low suggesting that the present study would have only been able to detect an interaction of very high magnitude between both genes. Figure 1a shows the logarithm of the predicted OR in the different groups with the corresponding CI in each group (the

Table 1 Genotype and allele distribution of the STAT4 rs7582694 polymorphism in patients with pSS and control subjects

rs7582694	GG	GC	CC	G	C	P, C vs G	OR (95% CI) C vs G
<i>Exploratory cohort</i>							
Controls (n = 152)	103 (0.68)	45 (0.30)	4 (0.02)	251 (0.83)	53 (0.17)		
pSS patients (n = 186)	102 (0.55)	65 (0.35)	19 (0.10)	269 (0.73)	103 (0.27)	2.3×10^{-3}	1.81 (1.24–2.62)
<i>Replication cohort</i>							
Controls ^a (n = 483)	299 (0.62)	162 (0.34)	22 (0.04)	760 (0.79)	206 (0.21)		
pSS patients (n = 192)	95 (0.49)	80 (0.42)	17 (0.09)	270 (0.70)	114 (0.30)	1.4×10^{-3}	1.56 (1.19–2.03)
<i>Combined cohorts</i>							
Controls (n = 635)	402 (0.63)	207 (0.33)	26 (0.04)	1011 (0.80)	259 (0.20)		
pSS patients (n = 378)	197 (0.52)	145 (0.38)	36 (0.10)	539 (0.71)	217 (0.29)	2.3×10^{-5}	1.57 (1.27–1.93)

Abbreviations: CI, confidence interval; OR, odds ratio; pSS, primary Sjögren's syndrome; SNP, single nucleotide polymorphism; STAT, signal transducer and activator of transcription.

^aGenotype and allele distribution of the STAT4 rs7582694 polymorphism was inferred from the results of STAT4 rs7574865 genotyping performed in a French cohort of patients, owing to the complete linkage disequilibrium between both SNPs.

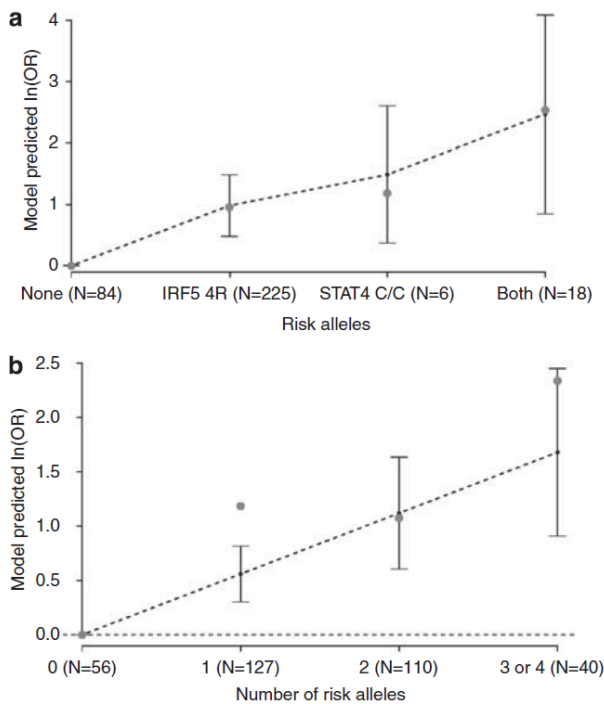


Figure 1 Additive effect of interferon regulatory factor 5 (IRF5) and signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4) polymorphisms. (a) Logarithm of odds ratio (OR) versus genotype group. Subjects were classified into four genotype groups based on (1) no risk allele –IRF5 3R/3R genotype and at least one STAT4 G allele ($N=84$, 31 with pSS); (2) at least one IRF5 4R allele and at least one STAT4 G allele ($N=225$, 135 with pSS); (3) IRF5 3R/3R and STAT4 C/C genotypes ($N=6$, 4 with pSS); and (4) at least one IRF5 4R allele and the STAT4 C/C genotype ($N=18$, 16 with pSS). The dotted lines and black dots show the prediction of a logistic regression model, with the corresponding confidence interval. The gray dots indicate the logarithm of the observed odds-ratio computed from the data in each group, the reference group being the subjects with no risk alleles for both genes. (b) Logarithm of odds ratio versus number of risk alleles. The dotted lines and black dots show the prediction of a logistic regression model, with the corresponding confidence interval. The gray dots correspond to the observed odds-ratio for each number of risk alleles. In total, 56 subjects were without a risk allele (17 with pSS) and 127 had one risk allele (75 with pSS), 110 had two risk alleles (61 with pSS), and 40 had three or four risk alleles (33 with pSS). The gray dots indicate the logarithm of the observed odds-ratio computed from the data for the corresponding number of risk alleles, with 0 being the reference group.

group without risk allele is taken as the reference); the gray dots represent the observed OR in each group. A second set of analyses were performed by entering the number of risk alleles (between 0 and 4) instead of the genotypes in the model and also showed the number of risk alleles significantly associated with the probability of developing pSS. Figure 1b illustrates this model: the dotted line and the black dots represent the logarithm of the OR predicted by the model versus the number of risk alleles, along with the corresponding CI, and the gray dots indicate the observed OR for each number of alleles. Table 2 shows the OR obtained for each of these models.

The first logistic regression with an additive effect of the two genes showed a recessive effect of STAT4 C allele and a dominant effect of IRF5 4R allele. In the second model, we assume that each allele increased the risk by

Table 2 Odds ratios and their confidence intervals (CI) obtained for two logistic regression models

	Odds ratio (CI)
<i>Model with two genes</i>	
STAT4 C/C genotype (recessive model)	4.42 (1.45–13.51)
IRF5 3R/4R or 4R/4R (dominant model)	2.67 (1.61–4.42)
STAT4 C/C and IRF5 4R allele (no interaction)	11.82 (2.32–60.15)
<i>Model with number of risk alleles</i>	
One risk allele	1.75 (1.36–2.25)
Two risk alleles	3.06 (1.83–5.12)
Three or four risk alleles	5.36 (2.48–11.59)

Abbreviations: CI, confidence interval; IRF, interferon regulatory factor; STAT, signal transducer and activator of transcription.

The first model is an additive model accounting for the effect of STAT4 C/C genotype and the effect of carrying a 4R allele. In the second model, the risk increases linearly with the number of risk alleles (C allele for STAT4 and 4R allele for IRF5).

the same amount. When compared with Figure 1a, Figure 1b shows some model misfit for subjects with one risk allele suggesting that a model involving the effect of the two genes separately performs better.

Analysis of STAT4 mRNA expression by STAT4 rs7582694 genotypes

STAT4 α and STAT4 β mRNA levels were assessed in PBMCs from 30 pSS patients. STAT4 β mRNA level was about 10-fold lower than that of STAT4 α , as was previously reported.⁸ STAT4 α and STAT4 β mRNA levels in PBMCs were not associated with rs7582694 genotype ($P=0.99$ and $P=0.17$, respectively) (Figures 2a and b).

Analysis of STAT1 mRNA expression level by STAT4 rs7582694 genotype

We hypothesized that STAT4 rs7582694 polymorphism could be in high LD with a functional polymorphism located in the nearby STAT1 locus. Thus, we assessed STAT1 mRNA level in STAT4 rs7582694 genotype, however, we found no significant association (Figure 2c).

mRNA levels of STAT4 α and type 1 IFN-induced genes are strongly correlated

Because STAT4 could be involved in type 1 IFN signalling,⁹ we aimed to assess the potential correlation between the mRNA level of STAT4 and those of PKR, MX1 and IFITM1 as surrogate markers of the type 1 IFN induction pathway. We focused on the prominently expressed and functional subunit of STAT4, STAT4 α . STAT4 α mRNA expression was strongly correlated with that of type 1 IFN-induced genes: PKR ($P=4.2 \times 10^{-3}$, $r=0.51$), MX1 ($P=2 \times 10^{-4}$, $r=0.63$) and IFITM1 ($P=8.6 \times 10^{-3}$, $r=0.47$) (Figure 3). This correlation was not observed for the mRNA levels of STAT4 β and the type 1 IFN-induced genes (data not shown).

Discussion

In this study, we replicated the association of STAT4 polymorphism with pSS and found no relation with the mRNA level of STAT4 α or STAT4 β in PBMCs. However, we found a strong correlation between the mRNA levels of STAT4 α and type 1 IFN-induced genes, which

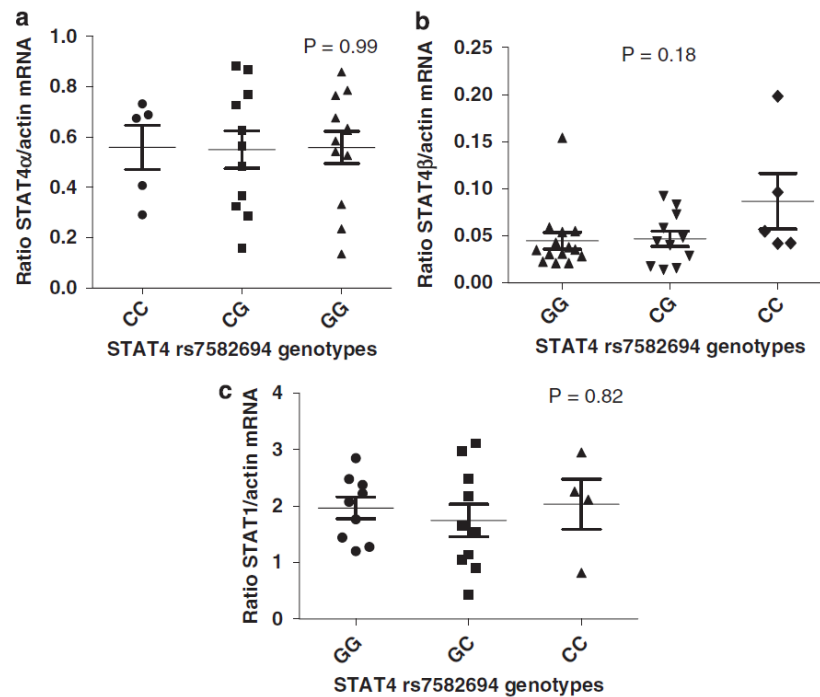


Figure 2 Association of STAT4 genotypes and mRNA expression of STAT4α and STAT4β analysis of variance was used to assess differences in mRNA levels of STAT4α (a), STAT4β (b) and STAT1 (c) for pSS patients (N = 30) carrying various genotypes. Results are expressed as a ratio of gene expression to that of β-actin.

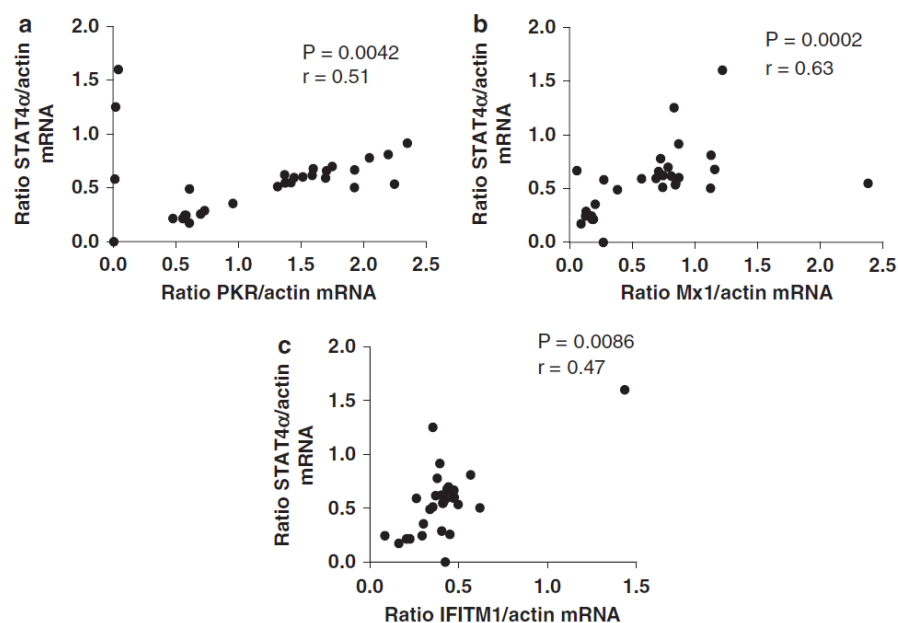


Figure 3 Correlation between mRNA levels of STAT4α and type 1 IFN-induced genes (a–c). Spearman's nonparametric correlation analysis was used to assess the correlation between mRNA levels of STAT4α and type 1 IFN-induced genes.

suggests that STAT4, classically associated with type 2 IFN production, could be also involved in type 1 IFN signaling.

We confirmed, in a French population of pSS patients, a significant association of the *STAT4* rs7582694 C allele

with pSS. Previous significant association of the allele with pSS was reported in populations from Northern Europe (Norway and Sweden)⁶ and from the United States of America.⁷ A thorough examination of previously reported studies of the association of *STAT4* with

various autoimmune diseases concluded that minor allele frequencies among healthy controls vary, to some extent, by the geographic ancestry, even among the European Caucasians: 22% in Sweden and 23% in Norway,⁶ and lower allelic frequencies reported among controls of Spanish (ranging from 19 to 20.8%)^{10,11} or Greek origin (17%).¹² Thus, we considered that a replication study involving pSS patients and controls from the midwest region of Europe was necessary. The significant association of *STAT4* rs7582694 C allele with pSS in the exploratory cohort was confirmed in the replication study, which indicated an overall significant association. The *STAT4* rs7574865 polymorphism, (instead of *STAT4* rs7582694) genotyped in the control group from the replication cohort, is not expected to be a confounding factor because in Caucasian populations, both polymorphisms are in complete LD ($r^2 = 1$).¹³ Minor allele frequencies among controls from the exploratory and the replication cohort were somewhat different (17 and 21%, respectively), suggesting that those Caucasian controls had various European or North African ancestry compounds. Taken together, these data provide a robust replication of the association of *STAT4* rs7582694 polymorphism with pSS among French Caucasian patients. The OR of the results for our combined cohorts of pSS patients and control subjects (OR 1.57, 95% CI 1.27–1.93, $P = 2.3 \times 10^{-5}$) is similar to that reported for North European patients (OR 1.41, 95% CI 1.14–1.73) or for US patients (OR 1.46, 95% CI 1.09–1.97). We also confirmed the lack of specific association among patients with or without any anti-SSA/SSB autoantibodies. Moreover, we showed for the first time a high OR for patients homozygous for the *STAT4* rs7582694 C allele (OR 2.47, 95% CI 1.47–4.16, $P = 6 \times 10^{-4}$), which suggests a recessive effect of the *STAT4* at-risk allele.

To date, two genetic factors are considered as being prominently involved in genetic susceptibility to pSS independent of anti-SSA/SSB antibody status: *STAT4* and *IRF5*. These two genetic associations have been convincingly replicated for Caucasian pSS patients by independent teams. Interestingly, these associations are not limited to patients with specific profiles of autoantibody profiles, in contrast to studies of the human leukocyte antigen class II, which shows significant association of patients with anti-SSA (HLA-DRB1*15) or anti-SSA and anti-SSB (HLA-DRB1*03) antibodies. Moreover, the significant association of both *STAT4* and *IRF5* polymorphisms has been also reported for other autoimmune diseases or inflammatory conditions, such as systemic sclerosis,¹⁴ rheumatoid arthritis,¹⁵ lupus.^{8,11,15–18} Interestingly, all these autoimmune diseases could be, to some extent type 1 IFN driven. This study provides additional data suggesting that *STAT4* and *IRF5* function independently on pSS genetic susceptibility, with an additive effect but with no epistatic interaction between both genes, which confirms the findings from Nordmark *et al.*⁶ in patients of North European ancestry.

However, the remaining question is the functional consequence of *STAT4* rs7582694 polymorphism. This single nucleotide polymorphism is located in the third intron of *STAT4* and is expected to be in LD with the true causative single nucleotide polymorphism. Few functional studies of *STAT4* rs7582694 polymorphism have been performed. Abelson *et al.*⁸ reported a modest but

significant correlation between *STAT4* rs7574865 polymorphism (in complete LD with *STAT4* rs7582694) and *STAT4* mRNA level in PBMCs from 73 healthy volunteers. Sigurdsson *et al.*¹⁷ reported an increased expression of the risk allele of *STAT4*β in primary cells of mesenchymal origin (osteoblasts). None of the previous studies has addressed the functional consequences of *STAT4* rs7582694 or *STAT4* rs7574865 polymorphism among pSS patients. We found no significant association of any genotype with mRNA levels of *STAT4*α and *STAT4*β among 30 pSS patients. A lack of power does not likely explain the discrepancies between our results and those from Abelson *et al.*⁸ because no trend effect was observed. We wondered whether the functional consequences of *STAT4* risk allele might be explained by an environmental upregulation of *STAT4* among pSS patients. Such a hypothesis is unlikely because the mRNA level of *STAT4* was comparable between patients and healthy controls (data not shown). Thus, the functional relevance of *STAT4* rs7582694 is still unclear. The true functional polymorphism is likely to be in high LD with *STAT4* rs7582694 polymorphism, but is still unknown, despite a number of studies of *STAT4* gene polymorphisms.^{13,15,16} We explored whether the putative functional polymorphism, in LD with *STAT4* rs7582694 polymorphism, could lie within *STAT1*, which is located close to *STAT4*. Nevertheless, we found no significant association between *STAT1* mRNA level in PBMCs and *STAT4* polymorphism.

The most interesting finding of this study is the strong and direct correlation between the mRNA levels of *STAT4*α and three type 1 IFN-induced genes, which had never been reported before. Such correlation was not observed with *STAT4*β. Interestingly, a similar functional difference between *STAT4*α and *STAT4*β subunits has been reported in mice, in which *Stat4*β was not as efficient as *Stat4*α in directly inducing *IFN*γ gene expression.¹⁹ Two hypotheses can be drawn from those results: either *STAT4* may be activated after the ligation of type 1 IFN on *IFN*AR in parallel and independently of type 1 IFN-induced genes, as was previously suggested in mice and in humans,^{20,21} or *STAT4* could be an intermediate for induction of type 2 IFN (its classical role) and for inducing the expression of type 1 IFN-induced genes, as was recently suggested by Kariuki *et al.*⁹ This last hypothesis needs further investigation.

In conclusion, our results confirm a replicated association of *STAT4* polymorphism with pSS in patients from the midwest region of Europe, with a potential recessive effect on disease susceptibility. Our results do not support the functional relevance of the at-risk genotypes on the mRNA levels of *STAT4*α, *STAT4*β or *STAT1*. Unexpectedly, the mRNA levels of *STAT4*α and type 1 IFN-induced genes were strongly correlated in pSS patients, which supports a possible direct involvement of *STAT4* in not only the production of type 2 IFN but also in mediating the effects of type 1 IFN.

Patients and methods

Patients

The exploratory cohort consisted of 186 unrelated patients with pSS, diagnosed according to the American–European consensus group criteria²² (114 (61%) with

anti-SSA and/or anti-SSB antibodies) and 152 healthy French blood-donor controls. The replication study involved 192 pSS patients from the national French prospective cohort ASSESS (Atteinte SyStémique et Evolution des patients atteints de Syndrome de Sjögren primitif) (128 (64%) with autoantibodies) and 483 healthy, unrelated French blood donors. All patients and controls were Caucasians and provided their informed consent. The study was approved by the local Ethics Committee.

Genotyping

After isolating genomic DNA from PBMCs using EZ1 DNA blood kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), subjects were genotyped for STAT4 rs7582694 polymorphism using a predesigned TaqMan assay from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA; assay no. 26882391-1) according to the manufacturer's instructions. STAT4 rs7574865 polymorphism genotyping involved the use of a competitive allele-specific PCR system (KASpar genotyping; an improved fluorescence resonance energy transfer method developed by KBiosciences, Hoddeston, UK) (<http://www.kbioscience.co.uk/>) as previously described.¹⁴

Real-time quantitative reverse transcriptase-PCR

STAT4 α , STAT4 β , STAT1, IRF5, MX1, IFITM1, PKR and β -actin mRNA expression was assessed in PBMCs from 30 patients with pSS included in the ASSESS prospective cohort, with all being positive for anti-SSA antibody. Total RNA was isolated from PBMCs using RNeasy Mini kit Qiagen according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA synthesis involved the use of Enhanced Avian HS reverse transcriptase-PCR (Sigma-Aldrich, Saint Quentin, Fallavier, France).

STAT4 α , STAT4 β , STAT1, IRF5, MX1, IFITM1, PKR and β -actin complementary DNA levels were determined by the use of Light Cycler-based kinetic quantitative reverse transcriptase-PCR (Roche Diagnostics, Meylan, France). To correct for variations in mRNA recovery and reverse transcription yield, the level of studied complementary DNAs was normalized to that of β -actin. Amplification involved the following oligonucleotide primers: STAT4 α forward 5'-CATCTCAACAATCCGAAGTGATTCA-3', STAT4 β forward 5'-TGACCTTGTTATCTCTTAAAGCCGA-3' and STAT4 reverse 5'-GTCAGAGTTTATCCTGTCTTACAGCAG-3'; STAT1 forward 5'-CCCAGAATGCCCTGATTAATG-3' and reverse 5'-CTGCAGCTGATCCAAGCAAG-3'; IRF5 forward 5'-CATTACTGTACAGGTGTGTC-3' and reverse 5'-AGATGTGATGGAGCTCCTTG-3'; Mx1 forward 5'-TACCAGGACTACGAGATTG-3' and reverse 5'-TGCCAGGAAGGTCTATTAG-3'; IFITM1 forward 5'-CCTGTCACTGGTATTCGGCTCT-3' and reverse 5'-CAGGCTATGGGCGGCTAC-3'; and PKR forward 5'-CGATACATGAGCCCAGAACA-3' and reverse 5'-GTTTCAAAAGCAGTGTCAACA-3'. Conditions of PCR amplifications and quantification are available on request.

Statistical analysis

Quality of genotype data was verified by testing for Hardy-Weinberg equilibrium in each control sample with the Fisher's exact test at $P < 0.01$. The allele counts in cases and controls were compared by Fisher's exact test to estimate the significance of the association with pSS for the STAT4 rs7582694 polymorphism. Calculation

of OR and 95% CI involved the use of GraphPad software Prism 5.0. The risk alleles of STAT4 (rs7582694 C) and IRF5 (CGGGG insertion in IRF5 promoter region) [22] were determined in the exploratory cohort. Observed OR and CIs were computed by the use of epitools library for epidemiology analyses developed for the R statistical software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Logistic regression analysis was used to determine the association of the disease status with risk alleles. The logarithm of the OR for pSS was modeled as a linear function of the number of risk alleles computed, 0 risk allele being chosen as the reference. Only eight subjects carried four risk alleles, all in the patient group, so data for subjects with three or four risk alleles were pooled for the analysis. Logistic regression models with STAT4 and IRF5 risk alleles, which were entered as two variables, both with and without interaction, were also tested. The analyses involved the use of the R statistical software.

Analysis of variance was used to determine the difference in the mRNA expression level in relation to STAT4 rs7582694 polymorphism, taking the three possible genotypes as factor levels. The correlations between mRNA levels of STAT4 α , STAT4 β , STAT1 and type 1 IFN-induced genes were determined by Spearman's non-parametric correlation analyses.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Dr J Benessiano and all staff members of the Bichat Hospital Biological resource Center (Paris) for their help in centralizing and managing biological data collection from the French ASSESS (Atteinte SyStémique et Evolution des patients atteints de Syndrome de Sjögren primitive), a prospective cohort of patients with Sjögren's syndrome; and S Gaete from the Unité de recherche Clinique Paris Sud for clinical data collection. We thank all the investigators of the ASSESS cohort who recruited and followed the patients: AL Fauchais (Limoges), S Rist (Orleans), D Sené (Paris-La Pitié-Salpêtrière), V Le Guern (Paris-Cochin), G Hayem (Paris-Bichat), J Sibilia (Strasbourg), J Morel (Montpellier), E Hachulla (Lille), A Saraux (Brest), A Perdriger (Rennes), X Puechal (Le Mans), V Goeb (Rouen) and JJ Dubost (Clermont-Ferrand). We thank Dr Patricia Lienard from DNAvision SA (Belgium) for conducting DNA sample genotyping. We thank P Dieudé, Y Allanore and C Boileau, and l'Association des Sclérodermiques de France for their contribution in the collection and genotyping of DNA samples from French controls, supported by a grant from Agence Nationale pour la Recherche (Grant number R07094KS). This work was supported by Agence Nationale pour la Recherche (ANR-06-PHYSIO-033-01), Société Française de Rhumatologie and Program Hospitalier de Recherche Clinique (AOM06133-P060228).

Author contributions: CMR and XM designed and directed the study. NG and AM conducted STAT4 α , STAT4 β , STAT1, MX1, PKR and IFITM1 mRNA expression

experiments. CMR, NG, AM and XM conducted data analysis. EC conducted statistical analysis. PL was involved in control sample data collection. XP, EH and JEG were involved in patient sample data collection.

References

- Emamian ES, Leon JM, Lessard CJ, Grandits M, Baechler EC, Gaffney PM *et al.* Peripheral blood gene expression profiling in Sjögren's syndrome. *Genes Immun* 2009; **10**: 285–296.
- Gottenberg JE, Cagnard N, Lucchesi C, Letourneur F, Mistou S, Lazure T *et al.* Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 2770–2775.
- Hjelmervik TO, Petersen K, Jonassen I, Jonsson R, Bolstad AI. Gene expression profiling of minor salivary glands clearly distinguishes primary Sjögren's syndrome patients from healthy control subjects. *Arthritis Rheum* 2005; **52**: 1534–1544.
- Miceli-Richard C, Gester mann N, Ittah M, Comets E, Loiseau P, Puechal X *et al.* The CGGGG insertion/deletion polymorphism of the IRF5 promoter is a strong risk factor for primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2009; **60**: 1991–1997.
- Sigurdsson S, Goring HH, Kristjansdottir G, Milani L, Nordmark G, Sandling JK *et al.* Comprehensive evaluation of the genetic variants of interferon regulatory factor 5 (IRF5) reveals a novel 5 bp length polymorphism as strong risk factor for systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* 2008; **17**: 872–881.
- Nordmark G, Kristjansdottir G, Theander E, Eriksson P, Brun JG, Wang C *et al.* Additive effects of the major risk alleles of IRF5 and STAT4 in primary Sjögren's syndrome. *Genes Immun* 2009; **10**: 68–76.
- Korman BD, Alba MI, Le JM, Alevizos I, Smith JA, Nikolov NP *et al.* Variant form of STAT4 is associated with primary Sjögren's syndrome. *Genes Immun* 2008; **9**: 267–270.
- Abelson AK, Delgado-Vega AM, Kozyrev SV, Sanchez E, Velazquez-Cruz R, Eriksson N *et al.* STAT4 associates with systemic lupus erythematosus through two independent effects that correlate with gene expression and act additively with IRF5 to increase risk. *Ann Rheum Dis* 2009; **68**: 1746–1753.
- Kariuki SN, Kirou KA, MacDermott EJ, Barillas-Arias L, Crow MK, Niewold TB. Cutting edge: autoimmune disease risk variant of STAT4 confers increased sensitivity to IFN- α in lupus patients *in vivo*. *J Immunol* 2009; **182**: 34–38.
- Orozco G, Alizadeh BZ, Delgado-Vega AM, Gonzalez-Gay MA, Balsa A, Pascual-Salcedo D *et al.* Association of STAT4 with rheumatoid arthritis: a replication study in three European populations. *Arthritis Rheum* 2008; **58**: 1974–1980.
- Martinez A, Varade J, Marquez A, Cenit MC, Espino L, Perdignes N *et al.* Association of the STAT4 gene with increased susceptibility for some immune-mediated diseases. *Arthritis Rheum* 2008; **58**: 2598–2602.
- Zervou MI, Sidiropoulos P, Petraki E, Vazgiourakis V, Krasoudaki E, Raptopoulou A *et al.* Association of a TRAF1 and a STAT4 gene polymorphism with increased risk for rheumatoid arthritis in a genetically homogeneous population. *Hum Immunol* 2008; **69**: 567–571.
- Namjou B, Sestak AL, Armstrong DL, Zidovetzki R, Kelly JA, Jacob N *et al.* High-density genotyping of STAT4 reveals multiple haplotypic associations with systemic lupus erythematosus in different racial groups. *Arthritis Rheum* 2009; **60**: 1085–1095.
- Dieude P, Guedj M, Wipff J, Ruiz B, Hachulla E, Diot E *et al.* STAT4 is a genetic risk factor for systemic sclerosis having additive effects with IRF5 on disease susceptibility and related pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum* 2009; **60**: 2472–2479.
- Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW *et al.* STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2007; **357**: 977–986.
- Sigurdsson S, Nordmark G, Garnier S, Grundberg E, Kwan T, Nilsson O *et al.* A risk haplotype of STAT4 for systemic lupus erythematosus is over-expressed, correlates with anti-dsDNA and shows additive effects with two risk alleles of IRF5. *Hum Mol Genet* 2008; **17**: 2868–2876.
- Yin H, Borghi MO, Delgado-Vega AM, Tincani A, Meroni PL, Alarcon-Riquelme ME. Association of STAT4 and BLK, but not BANK1 or IRF5, with primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2009; **60**: 2468–2471.
- Zervou MI, Goulielmos GN, Castro-Giner F, Tosca AD, Krueger-Krasagakis S. STAT4 gene polymorphism is associated with psoriasis in the genetically homogeneous population of Crete, Greece. *Hum Immunol* 2009; **70**: 738–741.
- Hoey T, Zhang S, Schmidt N, Yu Q, Ramchandani S, Xu X *et al.* Distinct requirements for the naturally occurring splice forms Stat4 α and Stat4 β in IL-12 responses. *EMBO J* 2003; **22**: 4237–4248.
- Farrar JD, Smith JD, Murphy TL, Murphy KM. Recruitment of Stat4 to the human interferon- α /beta receptor requires activated Stat2. *J Biol Chem* 2000; **275**: 2693–2697.
- Nguyen KB, Watford WT, Salomon R, Hofmann SR, Pien GC, Morinobu A *et al.* Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon- γ response to viral infection. *Science* 2002; **297**: 2063–2066.
- Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE *et al.* Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann rheum dis* 2002; **61**: 554–558.

3.3. ARTICLE 3

Methylation profiles study of the promoter region of *IRF5* gene in primary Sjögren's syndrome.

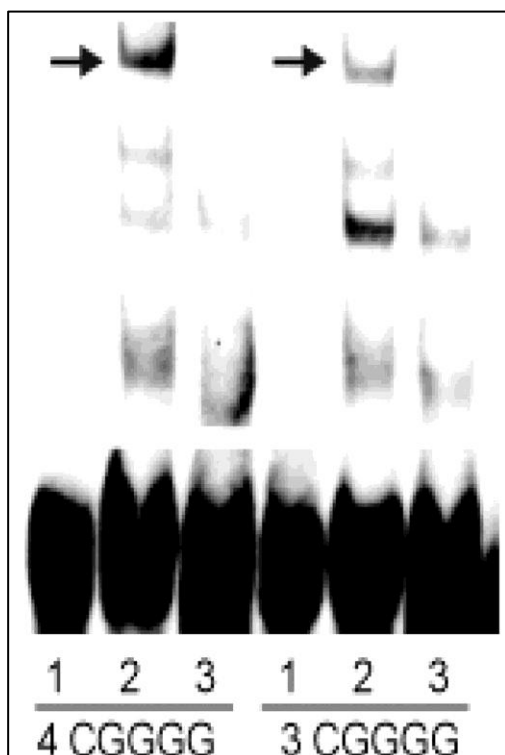
En soumission à Arthritis Research and Therapy (ART)

Le facteur de regulation de l'interféron (IRF) 5 est un facteur de transcription impliqué dans la voie de signalisation de l'IFN de type I. Récemment, au plan génétique, un polymorphisme d'insertion délétion de 5 paires de bases (CGGGG InDel) localisé dans le promoteur d'*IRF5* a été associé à la susceptibilité au syndrome de Sjögren et dans de nombreuses maladies auto-immunes.

Des travaux ont montré que cet allèle à risque 4xCGGGG permettait de donner un site de fixation supplémentaire pour Sp1. En effet, il a été montré que la fixation de sondes comportant ou non l'allèle à risque d'*IRF5* était plus importante pour la condition comportant

l'Indel 4xCGGGG. Ce modèle prédictif de fixation pourrait jouer un rôle important dans l'activation de la transcription du gène d'*IRF5* par l'intermédiaire de Sp1 (Dideberg, Kristjansdottir et al. 2007) (Figure 25).

Figure 25 : 1, *seulement les sondes marquées*. 2, *sondes marqués et extraits nucléaires*. 3, *sondes marqués, extraits nucléaires et sondes non marqués (100 fois plus que les marqués agissant ainsi en compétition avec les marqués)*. Dideberg V et al. Hum. Mol. Genet. 16:3008-3016. 2007



Le rôle de la méthylation dans le LES a été montré pour 2 gènes : CD40L et CD70 qui sont tout deux des molécules de costimulation des lymphocytes T. En effet, CD40L et CD70 ont été montré significativement déméthylés dans le lupus par rapport aux témoins. Cette déméthylation s'accompagnait d'une augmentation de l'expression de l'ARNm de ces 2 gènes. Ces études soutiennent l'importance que peut avoir la régulation épigénétique par la méthylation dans les maladies auto-immunes.

Le CGGGG d'IRF5 répété 3 ou 4 fois est situé dans une région CpG island qui pourrait être régulée par des mécanismes épigénétiques. Le but de ce travail est d'analyser si une dérégulation épigénétique par méthylation dans le promoteur d'*IRF5* est capable de moduler l'expression de l'ARNm d'*IRF5*. Les anomalies épigénétiques en combinaison à celle de la génétique permettraient d'expliquer l'augmentation de l'ARNm d'*IRF5* chez les malades atteints d'un syndrome de Sjögren.

Les PBMCs de 21 patients avec un SS primitif et 15 contrôles étaient isolés par Ficoll. L'ADN était extrait des PBMCs de 4 patients avec un SSp. Les lymphocytes T CD4⁺, les lymphocytes B ainsi que les monocytes étaient isolés. L'ADN des cellules de glandes épithéliales salivaires étaient également extrait après culture cellulaire pour 2 contrôles présentant des symptômes secs sans SSp. Tous les ADN étaient soumis à un traitement par bisulfite. Les régions d'intérêt de l'ADN bisulfité comprenant la région contenant la répétition CGGGG et la région ATG codante d'IRF5 (les deux régions importantes pour la régulation du gène) étaient amplifiées par PCR et soumises à une analyse par pyroséquençage. De plus, l'effet d'un agent déméthylant (5-Azacytidine, 5-AzaC) sur l'expression de l'ARNm d'IRF5 était étudié par PCR quantitative.

Le pourcentage de méthylation dans les différentes sous populations cellulaires étudiées chez les témoins était inférieur à 15%. De la même manière, l'analyse de la méthylation dans les régions d'intérêts du promoteur d'IRF5 au sein des différentes sous

populations cellulaires étudiées dans le SSp était inférieure à 15% et non statistiquement différente des témoins. D'autre part, la 5-AzaC ne permettait pas d'augmenter l'expression de l'ARNm d'IRF5 dans les lymphocytes T CD4⁺ de 6 témoins. Le gène contrôle de déméthylation était CD40L. L'ARNm de CD40L était retrouvé augmenté dans les cultures de lymphocytes T CD4⁺ en présence de 5-AzaC.

L'absence de méthylation dans les régions d'intérêts étudiées dans le promoteur d'IRF5 des différentes sous populations cellulaires isolées ne permet pas d'exclure d'autres mécanismes épigénétiques impliqués dans la modulation du gène d'IRF5 au cours du syndrome de Sjögren. Néanmoins la méthylation du promoteur d'IRF5 ne semble pas impliquée dans la pathogénèse du syndrome de Sjögren.

Les approches gène candidat pour la regulation épigénétique peuvent être décevantes comme ce qui a été le cas dans certaines approches cas-témoins en génétique de susceptibilité aux MAI. Néanmoins, les progrès technologiques permettent maintenant d'analyser le méthylome (méthylation globale du génome) et ces techniques permettront dans un futur proche de mieux cibler les gènes pouvant être soumis à une dérégulation par la méthylation dans les maladies auto-immunes.

**Methylation profiles study of the promoter region of *IRF5* gene
in primary Sjögren's syndrome.**

Nicolas Gestermann^{1†}, Mikael Koutero², Rakiba Belkhir^{1†}, Jörg Tost^{2,3}, Xavier Mariette⁴, Corinne Miceli-Richard⁴.

¹: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1012

²: Laboratory for Epigenetics, Centre National de Génotypage - CEA / Institut de Génomique – Evry, France

³: Laboratory for Functional Genomics, Fondation Jean Dausset – CEPH, Paris, France

⁴: Université Paris-Sud 11, Rhumatologie, Hôpital Bicêtre, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Le Kremlin Bicêtre, France

Supported by the Agence Nationale pour la Recherche (BLAN 2010 R11035LL) and Fondation Arthritis

Address correspondence and reprint requests to Corinne Miceli-Richard, MD, PhD, Service de Rhumatologie, Hôpital de Bicêtre, 78 Rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin Bicêtre, France. E-mail: corinne.miceli@bct.aphp.fr.

Key words: IRF5, Sjögren's syndrome, DNA methylation, epigenetics, autoimmune diseases

ABSTRACT

Background:

The interferon (IFN) regulatory factor 5 (*IRF5*) is a transcription factor of the type I interferon pathway involved in the genetic susceptibility to various autoimmune diseases. A 5-bp insertion/deletion (CGGGG indel) polymorphism located in the promoter region of *IRF5* is associated with primary Sjögren's syndrome (pSS). This sequence is located in a CpG island region and could be epigenetically deregulated in pSS.

Objective:

To investigate whether epigenetic deregulation of *IRF5* could explain the increased expression of *IRF5* mRNA observed in pSS patients, in combination with the risk conferring by genetic polymorphism.

Method:

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 19 pSS patients and 24 controls were isolated by density-gradient centrifugation. DNA was extracted from total PBMCs or from isolated CD4⁺ T cells, B lymphocytes and monocytes. Cultures of salivary gland epithelial cells (SGECs) were established from minor salivary glands. DNA from these various cellular populations was bisulfite treated for DNA methylation analysis. Regions of interest, encompassing respectively the CGGGG repeat and the ATG initiation codon region were amplified by PCR and analysed by pyrosequencing. Further, the effect of the demethylating agent 5-AzaC on *IRF5* mRNA expression was quantified by RT-PCR.

Results:

Among healthy controls, the average methylation of the 9 CpG pairs of the CGGGG repeat region and of the 18 CpG pairs of the initiation codon ATG region in each cell population was lower than 15% in CD4⁺ T cells, B lymphocytes, monocytes and SGECs. Methylation profiles

were not significantly different between patients and controls in CD4⁺ T cells and B lymphocytes.

Conclusion:

The absence of aberrant DNA methylation profiles of the putative regulatory regions of *IRF5* in CD4⁺ T cells, B lymphocytes, and monocytes from patients with pSS do not support the hypothesis that epigenetic deregulation could combine with the genetic polymorphism to explain the increase of *IRF5* mRNA in pSS patients.

INTRODUCTION

Autoimmune diseases (AIDs) affect about 8% of the population (Cooper, Bynum et al. 2009), result from the interaction between genetic and environmental factors, and involve both innate and adaptive immunity. Sjögren's syndrome (SS), which is also referred to as autoimmune epithelitis, is a prototypic systemic autoimmune disease since it can be primary (pSS) or secondary to other systemic connective tissue diseases (e.g., rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus [SLE], scleroderma). pSS is, after rheumatoid arthritis, the most common systemic autoimmune disease with a prevalence of 0.1 to 0.6 % in the general population (Bowman, Ibrahim et al. 2004). Lymphoid infiltration of lacrimal and salivary glands leading to xerophthalmia and xerostomia, as well as dramatic polyclonal B lymphocytes activation, represents the hallmarks of the disease. The disease mainly affects exocrine glands (particularly salivary and lacrimal glands) but can also present as a systemic disease with musculoskeletal (arthralgia, arthritis, myalgia), gastrointestinal, pulmonary, dermatologic, hematologic, neurologic and renal manifestations.

Until 2007, the most important genetic factors associated with pSS were alleles of the major histocompatibility complex (MHC) and more specifically the ancestral haplotype *HLA-A1-B8-DR3-DQ2*, association restricted to pSS patients with autoantibodies (Chused, Kassan et al. 1977; Kang, Fei et al. 1993). More recent data elucidating the pathogenic mechanisms involved in pSS support the role of the interferon (IFN) pathway through an IFN signature, both in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and in salivary glands (Hjelmervik, Petersen et al. 2005; Gottenberg, Cagnard et al. 2006). Following these observations, research has mainly focused on genes involved in innate immunity and on the IFN pathways. These approaches have successfully demonstrated the role of two crucial genes: *STAT4*, a gene involved in T_H1 differentiation (Miceli-Richard, Comets et al. 2007; Miceli-Richard, Gestermann et al. 2009) and interferon regulatory factor 5 (*IRF5*), a gene implicated in type I

IFN secretion after stimulation of innate immunity, and in type I IFN signal transduction (Barnes, Moore et al. 2001). The most strongly associated polymorphism within *IRF5* gene is a 5-bp insertion/deletion (CGGGG indel) polymorphism located 64 bp upstream of the first untranslated exon (exon 1A) within the promoter region of *IRF5* (Miceli-Richard, Gestermann et al. 2009; Nordmark, Kristjansdottir et al. 2009). This 5-bp CGGGG indel polymorphism has been significantly associated with other various AIDs: inflammatory bowel diseases (IBD) (Dideberg, Kristjansdottir et al. 2007), systemic lupus erythematosus (SLE) (Sigurdsson, Goring et al. 2008).

The transcription factor Specificity protein 1 (Sp1) is widely expressed in tissues and binds GC box motifs in promoters. The 3 x CGGGG repeat of the *IRF5* promoter contains two Sp1 binding sites while the 4 x CGGGG repeat, the risk conferring allele for the various associated autoimmune diseases, provides an additional Sp1 binding site and might thus lead to an increased fixation of Sp1 (Sigurdsson, Goring et al. 2008). We recently described functional consequences of the risk allele on *IRF5* mRNA expression in pSS patients (Miceli-Richard, Gestermann et al. 2009).

Epigenetic modifications such as DNA methylation play a crucial role in the regulation of gene transcription. Hypomethylation of gene regulatory sequences usually induces overexpression of the associated genes in AIDs, as demonstrated recently for *CD40L* and *CD70* which are upregulated through DNA hypomethylation in T-cells from SLE patients as compared with healthy controls (Lu, Wu et al. 2005; Lu, Wu et al. 2007). Potential epigenetic deregulation of *IRF5* has not been assessed to date in pSS.

Interestingly, the 5-bp CGGGG indel sequence lies within a GC-rich region (69%) meeting the criteria of a CpG island. This region is susceptible to epigenetic deregulation as recently shown by a microarray analysis of methylated genes in hepatocellular carcinoma, in which *IRF5* was frequently found to be methylated (Shin, Kim et al.). *IRF5* methylation was

correlated with low expression levels or silencing of *IRF5* mRNA. *IRF7*, another IRF family member, is also known to be epigenetically silenced by methylation in Li-Fraumeni fibroblasts (Lu, Au et al. 2000).

We therefore hypothesized that epigenetic deregulation could combine with the genetic polymorphism to explain the increase of *IRF5* mRNA in pSS patients. In this study, we assessed the *IRF5* methylation profile in various cell types in pSS patients and healthy controls: B lymphocytes, T lymphocytes, monocytes, and salivary gland epithelial cells, the target of auto-immunity in pSS.

MATERIELS AND METHODS

Patients

The subjects included in this study consisted of 19 unrelated female patients with pSS (16 positive for anti-SSA and/or anti-SSB antibodies) fulfilling the European American consensus group criteria (Vitali, Bombardieri et al. 2002) (age 57.6 ± 15.2 years) and 24 healthy controls (23 females and 1 male) (age 43.6 ± 13.1 years, mean $\pm$ SD). All patients and controls were Caucasians. Controls had sicca symptoms without any feature of autoimmunity and referred to the Rheumatology Department of the Bicêtre Hospital for a diagnostic procedure. All patients underwent the same clinical, biological and immunological screening. The study received approval from the local ethics committee, and informed consent was obtained from all subjects.

Isolation of cell populations

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 19 pSS patients and 24 healthy subjects were isolated by density-gradient centrifugation. Among these pSS patients and controls, $CD4^+$ T cells, B lymphocytes and monocytes were isolated by positive selection (Miltenyi Biotec, Paris, France). $CD4^+$ T cells were stained with CD3-FITC and CD4-

APCH7, B lymphocytes were stained by CD19-PE and monocytes were stained with CD14-PE (BD Biosciences, France). All cell fractions were analyzed with a BD FACS Canto™. The purity of cell was above 95% for all cell fractions.

Cell culture

Primary cultures of salivary gland epithelial cells (SGEC) were established from minor salivary glands as described (Dimitriou, Kapsogeorgou et al. 2002). Briefly, DMEM, Ham's F-12 and DMEM/F-12 were purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France), penicillin and streptomycin from PAA (France), FBS and 0.125% trypsin-EDTA from Seromed (Berlin, Germany), hydrocortisone from Pharmacia (Guyancourt, France), insulin from Novo Nordisk A/S (Denmark) and EGF from BD Bioscience (Le Pont de Claix, France). Briefly, each lobule was cut into small fragments and set in six 75-cm² flasks with basal epithelial medium (a 3:1 mixture of Ham's F-12 and DMEM) supplemented with 2.5% FBS, EGF (10ng/mL), hydrocortisone (0.4µg/mL), insulin (0.5µg/mL), penicillin (100IU/mL) and streptomycin (100µg/mL) and incubated at 37°C with 5% CO₂. After four to five weeks of culture, cells at 70–80% confluence were dissociated with 0.125% trypsin-EDTA.

CD4⁺ T cells were stimulated respectively with phytohemagglutinin (PHA) (5µg/mL, Sigma-Aldrich Saint Quentin Fallavier, France), interleukin 2 (IL-2) (20U/mL, Roche Diagnostic) for 72h and treated - or not - with 5-azacytidine (5-AzaC) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) at 1µM. Cell division and apoptosis were controlled as successive halving of the fluorescence intensity of 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate *N*-succinimidyl ester (CFSE) (Sigma- Aldrich Saint Quentin Fallavier, France) with 7-aad (eBiosciences, France). As a control, we analyzed the methylation profiles of CD40L, a gene located on the X chromosome and submitted to a random methylation of one allele in healthy women. The mean percentage of methylation of the studied CpG within the promoter region of CD40L was analyzed by pyrosequencing in T-cell cultures from healthy women, with or without 5-

AzaC treatment. Similarly, the level of CD40L mRNA expression with or without 5-AzaC treatment was compared. 5-AzaC significantly reduced the methylation levels of the studied CpG and also significantly increased the level of CD40L mRNA expression (data not shown), thus demonstrating the effectiveness of 5-AzaC as a demethylating agent.

Cell media were RPMI 1640 glutamax Gibco supplemented with 10% SVF (Dutscher), penicillin (100 U/mL), streptomycin(100µg/mL), buffer HEPES 10mM, pyruvate of sodium 1mM and amino acids (Invitrogen).

Real-time PCR and reverse transcriptase RT-PCR

Total RNA was isolated from cells with use of the RNeasy Mini kit (Qiagen,). cDNA synthesis was performed with the Enhanced Avian HS RT-PCR kit (Sigma-Aldrich).

IRF5 and β -actin mRNA levels were detected by the use of LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics) in using Light Cycler based kinetic quantitative RT-PCR (Roche Diagnostics, Meylan, France). Amplification involved the following primers : *IRF5*, (forward) 5'-CAT TAC TGT ACA GGT GGT GC-3' and (reverse) 5'- AGA TGT GAT GGA GCT CCT TG -3'; *β -actin*, (forward) 5'-GCT GTG CTA CGT CGC CCT-3' and (reverse) 5'-AAG GTA GTT TGG TGG ATG CC-3'. Primers for *IRF5* were specific to exon 8 and exon 9, which allowed the amplification of all *IRF5* transcripts containing exon 1A. Each sample was processed in duplicate, with initial incubation at 96°C for 10 minutes, followed by 40 cycles at 95°C for 10 seconds, 63°C for 10 seconds, and 72°C for 10 seconds. Variations in mRNA recovery and reverse transcription yield were normalized to that of β -actin.

DNA analysis

DNA from CD4⁺ T cells, B lymphocytes, monocytes and SGECS was isolated using the QIAamp® DNA Mini Kit, (Qiagen, Courtaboeuf, France) and bisulfite treated with

EpiTect® Bisulfite Kit (Qiagen). Regions of interest, encompassing 66 bp and 132 bp containing respectively the CGGGG repeat and the ATG initiation codon region were amplified with HotStar Taq DNA polymerase (Qiagen). Then, DNA methylation patterns were analyzed by pyrosequencing (Tost and Gut 2007). The following primers were used for amplification and pyrosequencing analysis: IRF5 CGGGG region, (forward) 5'-TTT TGT TAT TTT AGA TTG TTA AAA GAG TTA-3', (reverse) 5'-Biotin-CCA AAC TAA ACT CTA CCC AAA CTA C-3' and (sequencing primer) 5'-GGA TTT GTA GTT GTT AGG TT-3' ; IRF5 ATG region, (forward) 5'-GTT TAG GTT TAG ATT GGG TTT-3', (reverse) 5'-Biotin-CCT AAA TCA CTA AAC TCC CC-3', (sequencing primer 1) 5'-TTC GCG TTT TTT AGG TA-3', (sequencing primer 2) 5'-GGG ATG AAG ATT GGA GTA-3'; (sequencing primer 3) 5'-GGG GGG GTG TTT ATA GTA-3' and (sequencing primer 4) 5'-GGT TTG GGA TTT TTA AAG-3'. PCR protocols were with initial incubation at 96°C for 10 minutes, followed by 50 cycles at 95°C for 10 seconds, Δ °C for 10 seconds, and 72°C for 10 seconds (Δ is 62°C for CGGGG region and 60°C for ATG region). Methylation data were analyzed with Pyro Q-CpG™ software (Qiagen). The degree of methylation at each CpG was expressed as percentage of methylated cytosines over the sum of methylated and unmethylated cytosines at the respective CpG. We used non-CpG cytosines as control to verify completeness of bisulfite conversion. Each sample was processed in duplicate.

Statistical analyses

The statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5. *IRF5* mRNA expression and DNA methylation level were analyzed with the non-parametric Mann Whitney test. $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

DNA methylation patterns of *IRF5*

DNA methylation patterns of 10 CpGs of the region encompassing the 5-bp CGGGG indel polymorphism and the 19 CpGs surrounding the start site (ATG codon) of *IRF5* were assessed (Figure 1). The methylation patterns of these 29 CpGs were studied in PBMCs from 4 pSS patients and in different cell sub-populations isolated from the 24 healthy controls and 19 pSS patients. The mean level of methylation of each studied region is expressed hereafter as a percentage.

We first assessed the global level of DNA methylation within the CGGGG and ATG regions in PBMCs from 4 pSS patients. Both regions were unmethylated among patients: mean 4.8% (range 3.4 – 5.6) within the ATG region and mean 4.6% (range 4.2 – 5.0) within the CGGGG region. Methylation profiles between patients carrying 3 x CGGGG repeat or the 4 x CGGGG repeat were similar (data not shown).

As we hypothesized that *IRF5* could be demethylated among pSS patients as compared with controls, we further aimed to assess whether both regions had higher levels of methylation among controls. These analyses were performed in the various mononuclear cells subpopulations (CD4⁺ T cells, B lymphocytes, monocytes), and in SGEs.

Among controls, methylation profiles were studied on sorted CD4⁺ T cells (n=21), B lymphocytes (n=15), monocytes (n=4) and salivary gland epithelial cells (SGECs) (n=2). The CGGGG repeats region was largely unmethylated in all studied cell populations: CD4⁺ T cells: mean 6.9% (range 2.8 - 11.9; n=9); B lymphocytes: mean 9.9% (range 6.3 – 12.2; n=5), monocytes: mean 4.5%, (range 3.6 – 5.7; n=4), SGEs: mean 6.5% (range 6.2 - 6.9; n=2) (Figure 2A). Within the region surrounding the ATG codon, we again found unmethylated profiles: CD4⁺ T cells: mean 6.1% (range 3.3 - 12.3; n=15); B lymphocytes: mean 5.5%

(range 3.8 – 6.5; n=10), monocytes: mean 5.6%, (range 3.8 – 6.7; n=4), SGEs: mean 5.9% (range 5.7 - 6.2; n=2) (Figure 2B).

Among pSS patients, methylation profiles of both regions were studied on sorted CD4⁺ T cells (n=14), and B lymphocytes (n=11). Within the CGGGG region, we found unmethylated patterns in both CD4⁺ T cells and B lymphocytes. CD4⁺ T cells: mean 7.1% (range 1.5 – 12.2; n=10); B lymphocytes: mean 6.7% (range 3.2 - 11.7; n=7). Within the ATG region, unmethylation profiles were observed in CD4⁺ T cells: mean 8.0% (range 5.7 – 14.3; n=5) and in B lymphocytes: mean 7.1% (range 5.8 – 9.9; n=5).

Taken together, these results demonstrated unmethylated profiles in all studied cell populations, with no significant differences between patients and controls in CD4⁺ T cells or in B lymphocytes either in the CGGGG region (Figure 3A and 3B) or in the ATG region (Figure 4A and 4B).

***IRF5* mRNA expression in culture with 5-AzaC**

IRF5 might be subjected to methylation in alternative regulatory regions among controls, with aberrant demethylation occurring in pSS patients. We thus performed further functional studies in healthy controls to assess whether 5-AzaC, an irreversible DNA methyltransferase inhibitor, would lead to an increased level of *IRF5* expression. In order to maximize the demethylating effect of 5-AzaC requiring cell divisions, T cell were cultivated under stimulating conditions (PHA/IL-2), with or without 5-AzaC (1μM) for 72h. No significant difference in *IRF5* mRNA expression was observed between both conditions, i.e. in presence (0.51 ± 0.6 ; mean $\pm$ SD), or in absence (0.30 ± 0.23 ; mean $\pm$ SD) of 5-AzaC.

DISCUSSION

The present study is the first to investigate the DNA methylation patterns of regulatory regions of *IRF5* in primary Sjogren's syndrome. Our results demonstrate the absence of an aberrantly demethylated profile in the region encompassing the 5-bp CGGGG indel polymorphism and the region surrounding the ATG start site of *IRF5* in patients with pSS. Functional experiments with 5-AzaC do not support the hypothesis of other highly methylated sequences in controls that could be subject to demethylation in pSS patients.

IRF5 is a transcription factor that plays a key role in bridging innate and adaptive immune responses: *IRF5* contributes to B lymphocytes activation (Lien, Fang et al.; Savitsky, Yanai et al.), to dendritic cells differentiation (Yasuda, Richez et al. 2007), to the polarization of T-cells toward a T_H1 phenotype (Krausgruber, Blazek et al.), and participates in the IFN type I signature that characterizes pSS. Beside its involvement in pSS genetic susceptibility, *IRF5* has been associated with a broad spectrum of other autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, inflammatory bowel diseases and rheumatoid arthritis (Jarvinen, Hellquist et al.; Dideberg, Kristjansdottir et al. 2007; Sigurdsson, Padyukov et al. 2007; Kristjansdottir, Sandling et al. 2008). Dissecting sharp mechanisms of *IRF5* mRNA expression is thus a key issue in many AIDs.

One of the most important *IRF5* risk-conferring alleles associated with various AIDs is a CGGGG repeat lying within a CpG rich region and thus possibly associated with differential patterns of DNA methylation. Hypomethylated profiles among pSS patients could have amplified the functional effect of the genetic polymorphism, the latter allowing the addition of a Sp1 binding site. Moreover, the methylation of a Sp1 consensus sequence has been previously demonstrated to alter Sp1 binding (Sigurdsson, Goring et al. 2008), an observation that could support a possible interplay between genetics and epigenetics in the regulation of *IRF5* expression.

Nevertheless, we did not find any evidence for alterations in DNA methylation patterns of the region encompassing the 5-bp CGGGG indel polymorphism in CD4⁺ T cells, B lymphocytes, monocytes or SGEs from healthy controls. The same observation was made in PBMCs from pSS patients, irrespective of the number of CGGGG repeats they carried. In the same manner, no methylation and no difference were found in the ATG region in CD4⁺ T cells and B lymphocytes from healthy controls and pSS patients. Moreover, the functional experiments with 5-AzaC failed to highlight a significant increase of *IRF5* mRNA expression in healthy controls, suggesting that *IRF5* mRNA expression was not methylation sensitive.

Consequently, our results do not support an epigenetic deregulation of *IRF5* in pSS patients by aberrant hypo- or hypermethylation of various CpG dinucleotides located within the most important regulatory regions of the gene. This present work is in concordance with recent data demonstrating that the methylation patterns of the *IRF5* promoter were not affected by the presence of the 5-bp CGGGG insertion in IBD (Balasa, Gathungu et al.). Nevertheless, in this latter work, the region surrounding the start site of *IRF5* was not analysed, and the different cell subtypes in PBMCs were not analyzed separately.

Thus, the trend towards a higher expression of *IRF5* mRNA among pSS patients as compared with healthy controls is probably mainly attributable to the genetic consequences of an overrepresentation of 4 x CGGGG repeats of *IRF5* among pSS patients, as suggested by minigene constructs of promoters cloned from individuals homozygous for the 4 x CGGGG repeat or for the 3 x CGGGG repeat (Sigurdsson, Goring et al. 2008) and by our previous work having demonstrated that carrying the 4 x CGGGG repeat was associated with an increased expression of *IRF5* mRNA in PBMCs from pSS patients (Miceli-Richard, Gestermann et al. 2009).

The current study does not allow excluding any potential epigenetic deregulation of *IRF5* in pSS, as DNA methylation is not the only mechanism of epigenetic regulation. The

main other mechanisms involve histone acetylation and methylation and regulation through micro-RNAs (miRNAs). Recently published data demonstrated an increased expression of miR-21 (Stagakis, Bertias et al.) and a decreased expression of miR-146a in SLE patients (Tang, Luo et al. 2009). Interestingly, transfection of miR-146a into 293T cells consistently reduced the expression of *IRF5* (Tang, Luo et al. 2009). Therefore, miR-146a could be an efficient negative regulator of *IRF5* and its reduced expression in SLE could participate in *IRF5* overexpression. A similar mechanism modulating *IRF5* mRNA expression could be involved in pSS.

New techniques have become available for looking for hundreds or thousand of genes differentially methylated between controls and patients. This analysis of genome-wide DNA methylation patterns in CD4⁺ T cells from SLE patients compared to healthy controls identified numerous hypomethylated or hypermethylated CG sites, confirming widespread DNA methylation changes in SLE T cells (Jeffries, Dozmorov et al.). A similar approach is also a promising strategy to identify novel targets of epigenetic deregulation in patients with pSS.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. The 10 CpG studied dinucleotides from the CGGGG region and the 19 CpG from the ATG region are represented. The numbering of the axis corresponds to the base pairs from the ATG starting site. For A and B, putative Sp1 or alternative transcription factors binding sites (NFkB or AP-2) are also represented by the bent lines. Balloons correspond to the studied CG pairs. The box shows *IRF5* CGGGG repeat. * corresponds to the additional Sp1 binding site in case of 4xCGGGG carriage.

Figure 2. The average methylation (expressed as percentage) for all analyzed CpG in *IRF5* CGGGG and ATG regions in different cells type from healthy controls is represented on the y-axis: CD4⁺ T cells, B lymphocytes, monocytes, and SGEs (n=2).

Figure 3. The average methylation (expressed as percentage) for all analyzed CpG in *IRF5* CGGGG region is represented on the y-axis. The mean percentage of methylation is compared between patients and controls in CD4⁺ T cells (A) and B lymphocytes (B). The P value was determined by a non-parametric Mann-Whitney test.

Figure 4. The average methylation (expressed as percentage) for all analyzed CpG in *IRF5* ATG region is represented on the y-axis. The mean percentage of methylation is compared between patients and controls in CD4⁺ T cells (A) and B lymphocytes (B). The P value was determined by a non-parametric Mann-Whitney test.

REFERENCES

1. Cooper GS, Bynum ML, Somers EC: **Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases.** *Journal of autoimmunity* 2009, **33**(3-4):197-207.
2. Bowman SJ, Ibrahim GH, Holmes G, Hamburger J, Ainsworth JR: **Estimating the prevalence among Caucasian women of primary Sjogren's syndrome in two general practices in Birmingham, UK.** *Scandinavian journal of rheumatology* 2004, **33**(1):39-43.
3. Chused TM, Kassan SS, Opelz G, Moutsopoulos HM, Terasaki PI: **Sjogren's syndrome association with HLA-Dw3.** *The New England journal of medicine* 1977, **296**(16):895-897.
4. Kang HI, Fei HM, Saito I, Sawada S, Chen SL, Yi D, Chan E, Peebles C, Bugawan TL, Erlich HA *et al*: **Comparison of HLA class II genes in Caucasoid, Chinese, and Japanese patients with primary Sjogren's syndrome.** *J Immunol* 1993, **150**(8 Pt 1):3615-3623.
5. Gottenberg JE, Cagnard N, Lucchesi C, Letourneur F, Mistou S, Lazure T, Jacques S, Ba N, Ittah M, Lepajolec C *et al*: **Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjogren's syndrome.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**(8):2770-2775.
6. Hjelmervik TO, Petersen K, Jonassen I, Jonsson R, Bolstad AI: **Gene expression profiling of minor salivary glands clearly distinguishes primary Sjogren's syndrome patients from healthy control subjects.** *Arthritis and rheumatism* 2005, **52**(5):1534-1544.
7. Miceli-Richard C, Comets E, Loiseau P, Puechal X, Hachulla E, Mariette X: **Association of an IRF5 gene functional polymorphism with Sjogren's syndrome.** *Arthritis and rheumatism* 2007, **56**(12):3989-3994.
8. Miceli-Richard C, Gestermann N, Ittah M, Comets E, Loiseau P, Puechal X, Hachulla E, Gottenberg JE, Lebon P, Becquemont L *et al*: **The CGGGG insertion/deletion polymorphism of the IRF5 promoter is a strong risk factor for primary Sjogren's syndrome.** *Arthritis and rheumatism* 2009, **60**(7):1991-1997.
9. Barnes BJ, Moore PA, Pitha PM: **Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon alpha genes.** *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(26):23382-23390.
10. Dideberg V, Kristjansdottir G, Milani L, Libioulle C, Sigurdsson S, Louis E, Wiman AC, Vermeire S, Rutgeerts P, Belaiche J *et al*: **An insertion-deletion polymorphism in the interferon regulatory Factor 5 (IRF5) gene confers risk of inflammatory bowel diseases.** *Human molecular genetics* 2007, **16**(24):3008-3016.
11. Sigurdsson S, Goring HH, Kristjansdottir G, Milani L, Nordmark G, Sandling JK, Eloranta ML, Feng D, Sangster-Guity N, Gunnarsson I *et al*: **Comprehensive evaluation of the genetic variants of interferon regulatory factor 5 (IRF5) reveals a novel 5 bp length polymorphism as strong risk factor for systemic lupus erythematosus.** *Human molecular genetics* 2008, **17**(6):872-881.
12. Nordmark G, Kristjansdottir G, Theander E, Eriksson P, Brun JG, Wang C, Padyukov L, Truedsson L, Alm G, Eloranta ML *et al*: **Additive effects of the major risk alleles**

- of IRF5 and STAT4 in primary Sjogren's syndrome.** *Genes and immunity* 2009, **10**(1):68-76.
13. Lu Q, Wu A, Tesmer L, Ray D, Yousif N, Richardson B: **Demethylation of CD40LG on the inactive X in T cells from women with lupus.** *J Immunol* 2007, **179**(9):6352-6358.
 14. Lu Q, Wu A, Richardson BC: **Demethylation of the same promoter sequence increases CD70 expression in lupus T cells and T cells treated with lupus-inducing drugs.** *J Immunol* 2005, **174**(10):6212-6219.
 15. Shin SH, Kim BH, Jang JJ, Suh KS, Kang GH: **Identification of novel methylation markers in hepatocellular carcinoma using a methylation array.** *Journal of Korean medical science*, **25**(8):1152-1159.
 16. Lu R, Au WC, Yeow WS, Hageman N, Pitha PM: **Regulation of the promoter activity of interferon regulatory factor-7 gene. Activation by interferon and silencing by hypermethylation.** *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(41):31805-31812.
 17. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, Daniels TE, Fox PC, Fox RI, Kassan SS *et al*: **Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group.** *Annals of the rheumatic diseases* 2002, **61**(6):554-558.
 18. Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Abu-Helu RF, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN: **Establishment of a convenient system for the long-term culture and study of non-neoplastic human salivary gland epithelial cells.** *European journal of oral sciences* 2002, **110**(1):21-30.
 19. Tost J, Gut IG: **DNA methylation analysis by pyrosequencing.** *Nature protocols* 2007, **2**(9):2265-2275.
 20. Savitsky DA, Yanai H, Tamura T, Taniguchi T, Honda K: **Contribution of IRF5 in B cells to the development of murine SLE-like disease through its transcriptional control of the IgG2a locus.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**(22):10154-10159.
 21. Lien C, Fang CM, Huso D, Livak F, Lu R, Pitha PM: **Critical role of IRF-5 in regulation of B-cell differentiation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**(10):4664-4668.
 22. Yasuda K, Richez C, Maciaszek JW, Agrawal N, Akira S, Marshak-Rothstein A, Rifkin IR: **Murine dendritic cell type I IFN production induced by human IgG-RNA immune complexes is IFN regulatory factor (IRF)5 and IRF7 dependent and is required for IL-6 production.** *J Immunol* 2007, **178**(11):6876-6885.
 23. Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, Hussell T, Feldmann M, Udalova IA: **IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses.** *Nature immunology*, **12**(3):231-238.
 24. Jarvinen TM, Hellquist A, Koskenmies S, Einarsdottir E, Koskinen LL, Jeskanen L, Berglund L, Panelius J, Hasan T, Ranki A *et al*: **Tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 polymorphisms are associated with discoid and subacute cutaneous lupus erythematosus.** *Experimental dermatology*, **19**(2):123-131.
 25. Kristjansdottir G, Sandling JK, Bonetti A, Roos IM, Milani L, Wang C, Gustafsdottir SM, Sigurdsson S, Lundmark A, Tienari PJ *et al*: **Interferon regulatory factor 5**

- (IRF5) gene variants are associated with multiple sclerosis in three distinct populations.** *Journal of medical genetics* 2008, **45**(6):362-369.
26. Sigurdsson S, Padyukov L, Kurreeman FA, Liljedahl U, Wiman AC, Alfredsson L, Toes R, Ronnelid J, Klareskog L, Huizinga TW *et al*: **Association of a haplotype in the promoter region of the interferon regulatory factor 5 gene with rheumatoid arthritis.** *Arthritis and rheumatism* 2007, **56**(7):2202-2210.
27. Balasa A, Gathungu G, Kisfali P, Smith EO, Cho JH, Melegh B, Kellermayer R: **Assessment of DNA methylation at the interferon regulatory factor 5 (IRF5) promoter region in inflammatory bowel diseases.** *International journal of colorectal disease*, **25**(5):553-556.
28. Stagakis E, Bertisias G, Verginis P, Nakou M, Hatziapostolou M, Kritikos H, Iliopoulos D, Boumpas DT: **Identification of novel microRNA signatures linked to human lupus disease activity and pathogenesis: miR-21 regulates aberrant T cell responses through regulation of PDCD4 expression.** *Annals of the rheumatic diseases*.
29. Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, Yuan M, Guo Y, Huang X, Zhou H, de Vries N, Tak PP *et al*: **MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins.** *Arthritis and rheumatism* 2009, **60**(4):1065-1075.
30. Jeffries M, Dozmorov M, Tang Y, Merrill JT, Wren JD, Sawalha AH: **Genome-wide DNA methylation patterns in CD4+ T cells from patients with systemic lupus erythematosus.** *Epigenetics*, **6**(5):593-601.

Figure 1. Description of the studied CpG dinucleotides within *IRF5* regulatory regions.

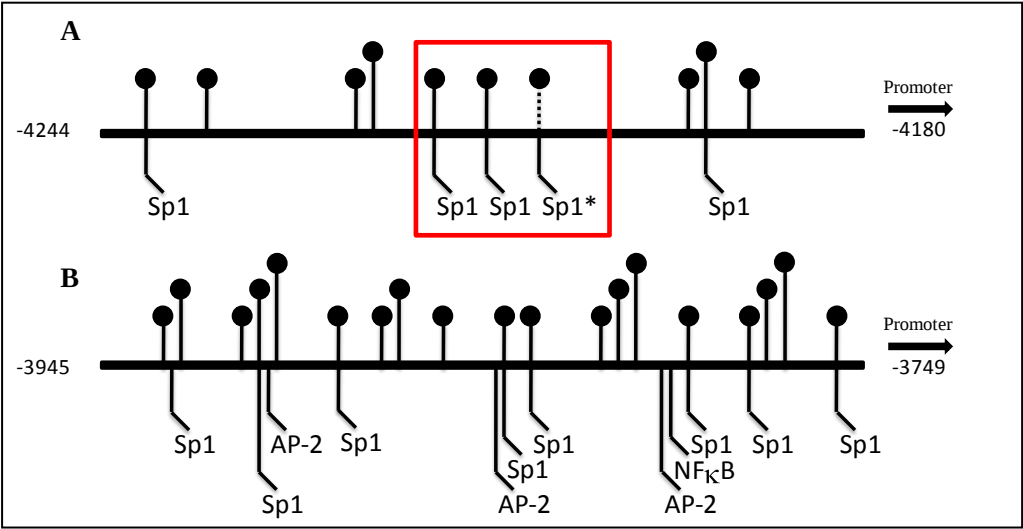


Figure 2. Methylation patterns of *IRF5* CGGGG (A) and ATG (B) regions in different cellular types among healthy controls.

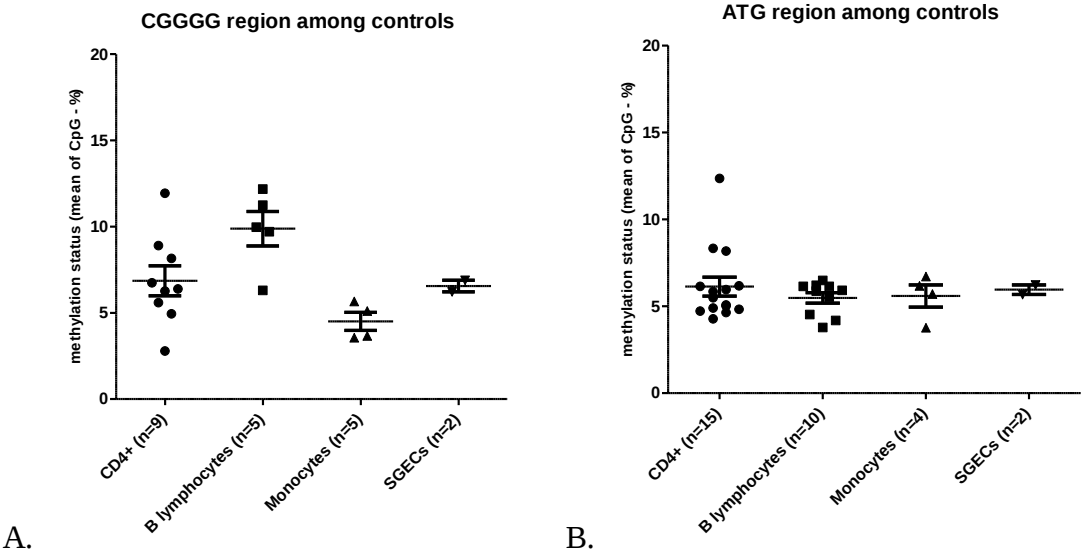


Figure 3. Methylation patterns of *IRF5* CGGGG region in CD4⁺ T cells (A) and B lymphocytes (B) from healthy controls and pSS patients.

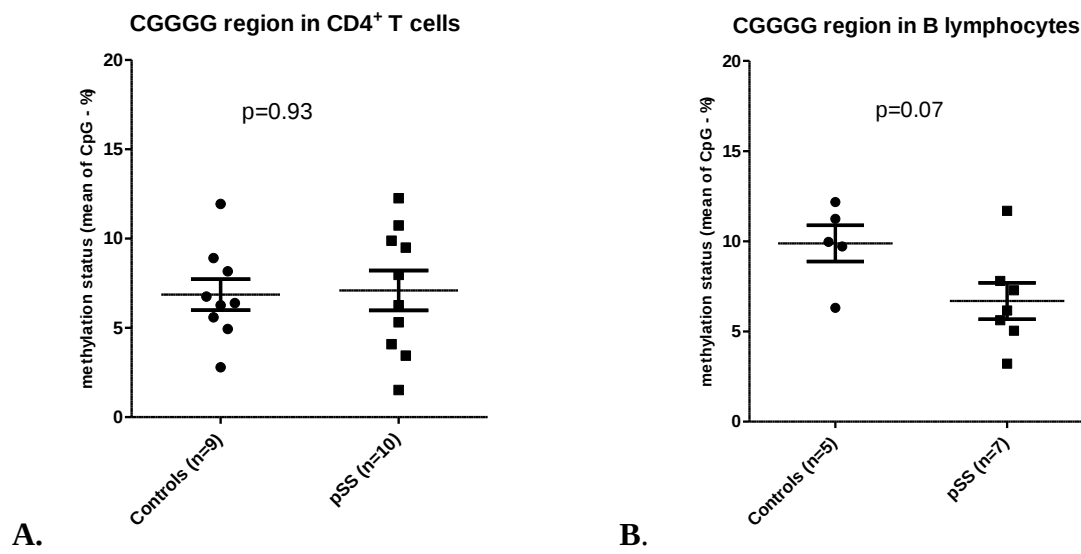
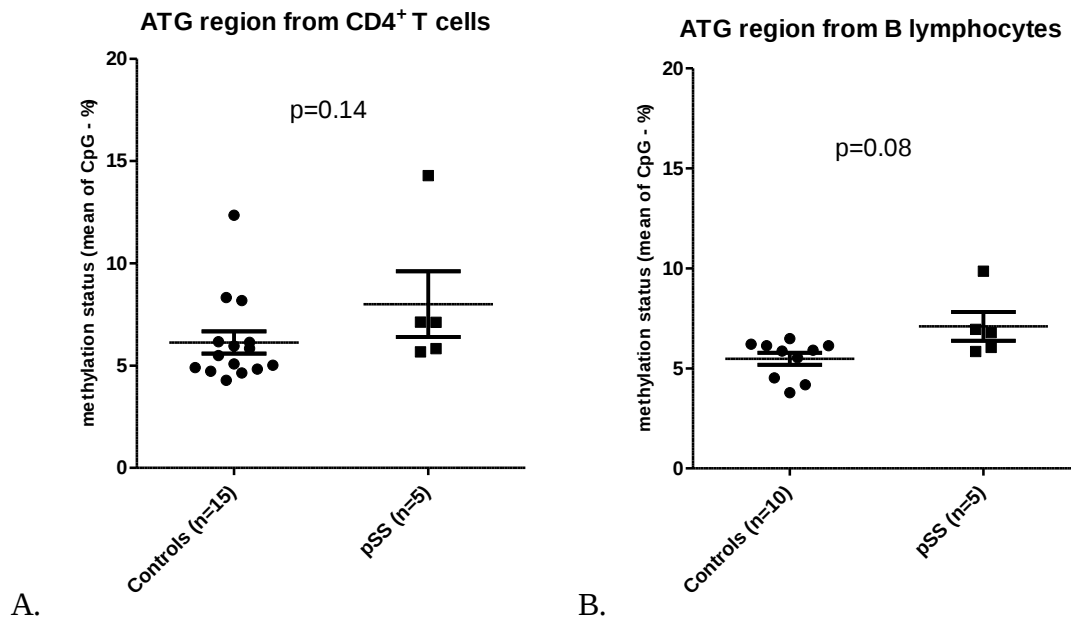


Figure 4. Methylation patterns of *IRF5* ATG region in CD4⁺ T cells (A) and B lymphocytes (B) from healthy controls and pSS patients.



3.4. ARTICLE 4

Interleukin 12 is involved in IFN type I signature through CD4⁺ T cells and plasmacytoid dendritic cells crosstalk

En préparation avant editing

STAT4 est un facteur de transcription impliqué dans la polarisation T_H1 qui se caractérise par la production d'interféron de type II (IFN- γ). Ce facteur de transcription est spécifiquement activé après fixation de l'IL-12 sur son récepteur. Un polymorphisme de STAT4 a été associé à la polyarthrite rhumatoïde où l'INF- γ est décrit comme ayant un rôle clef. De manière surprenante, le même polymorphisme a été associé au syndrome de Sjögren primitif (SSp) et au lupus érythémateux systémique, 2 maladies auto-immunes qui se caractérisent par une signature IFN de type I (IFN- α ou IFN- β). Par ailleurs, il a été mis en évidence par notre groupe une forte corrélation entre d'ARNm de STAT4 et l'ARNm des gènes IFN de type I induit au cours du SSp. Jusqu'à ce jour, des études ont montré l'implication de l'IFN- α dans la phosphorylation de STAT4 conduisant à la transcription de l'IFN- γ mais le rôle de STAT4 dans la signalisation de la voie IFN de type I reste méconnu. Le but de ce travail est d'étudier l'implication de STAT4 dans la voie de signalisation IFN de type I.

Afin d'étudier le rôle de STAT4 dans l'induction de la voie IFN de type I, nous avons travaillé sur un type cellulaire connu pour activer spécifiquement STAT4 après activation par l'IL-12 : le lymphocyte T CD4⁺. L'IL-12R est composé de 2 sous unités – β 1 et β 2. La sous unité β 2 joue un rôle central dans la phosphorylation de STAT4 et n'est pas exprimée à l'état basal dans les lymphocytes T CD4⁺. C'est la raison pour laquelle, les lymphocytes T CD4⁺ étaient préactivés durant 2 jours par anti-CD3/anti-CD28 avant rajout de l'IL-12.

Les lymphocytes T (LyT) $CD4^+$ ont été isolés soit par procédure Miltenyi (billes magnétiques), soit par FACS trieur de sujets sains. Les LyT $CD4^+$ étaient activés par anti-CD3/anti-CD28 durant 96H. A 48H, IL-12 était ajoutée. A la fin de la culture, les surnageants étaient récupérés et les cellules lysées afin de procéder à une extraction d'ARNm. Les LyT $CD4^+$ et pDCs étaient cultivés avec les surnageants provenant de LyT $CD4^+$ cultivés dans différentes conditions. IFIT-1, PKR, IFITM1 reflet de la signature IFN de type I, étaient analysés en RT-QPCR pour chaque condition après normalisation sur l'actine.

Une up-régulation des gènes IFN type I induit après stimulation IL-12 était observée exclusivement dans les LyT $CD4^+$ isolés avec la procédure Miltenyi : IFIT-1 ($n = 13$) ($p = 0.0007$) ; IFITM1 ($n = 6$) ($p = 0.06$), PKR ($n = 6$) ($p = 0.035$). Néanmoins, cette up-régulation n'était pas observée avec les LyT $CD4^+$ hautement purifiés sur Facs trieur suggérant que ce mode de tri cellulaire permettait d'éliminer un partenaire $CD4^+$ important dans l'induction d'une signature IFN de type I après stimulation par l'IL-12. Ce partenaire s'est avéré être la pDCs qui exprime spécifiquement $CD303^{high}$ et de faibles niveaux de CD4 ($CD4^{dim}$) (Figure 26).

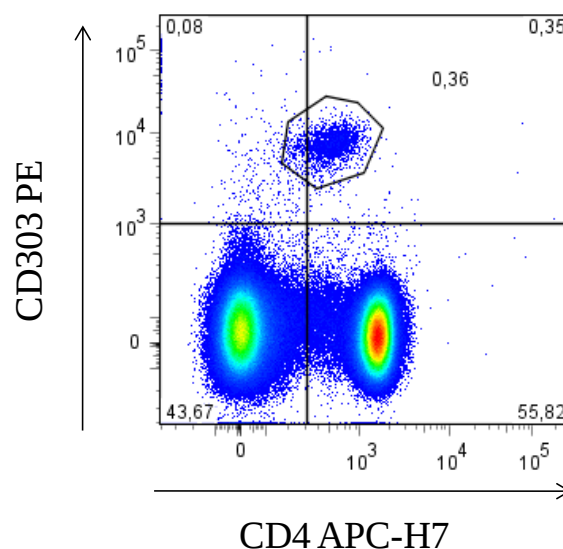


Figure 26 : Marquage des pDCs au sein de PBMCs : $CD303^{high}$ et $CD4^{dim}$

L'IL-12 seule n'induisait pas l'expression des gènes IFN de type I sur les pDCs. Nous montrons donc, sous stimulation IL-12, qu'un crosstalk entre la pDCs et le LyT CD4⁺ est nécessaire afin d'induire les gènes IFN de type I. Cette signature IFN de type I est liée à un facteur soluble présent dans le surnageant de LyT CD4⁺ stimulés par l'IL-12. Cette signature est IFN de type I dépendante car inhibée par l'utilisation d'anti-IFNAR. Afin d'identifier ce facteur soluble, une approche LUMINEX à partir des surnageants de lymphocytes CD4⁺ stimulés ou non par l'IL-12 est en cours.

Cette étude rapporte que l'IL-12 induit spécifiquement l'IFN de type I par interaction entre 2 partenaires cellulaires, les LyT CD4⁺ et pDCs. Ces résultats pourraient expliquer l'implication des polymorphismes de STAT4 dans les maladies auto-immunes (MAI) IFN de type I dépendantes. Ces résultats suggèrent également que les MAI dépendantes des IFN de type I et II ne s'opposent pas. Elles seraient seulement le Yin et le Yang d'un facteur d'activation commun, STAT4, capable d'induire les IFNs de type I et II.

Interleukin 12 is involved in IFN type I signature through CD4⁺ T cells and plasmacytoid dendritic cells crosstalk

Nicolas Gestermann¹, Federico Simoneta¹, Saïda Boudaoud¹, Gaetane Nocturne¹, Yann Lecluse³, Larbi Amazit², Christine Bourgeois¹, Xavier Mariette^{1,4,*} & Corinne Miceli-Richard^{1,4,*}

¹: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1012, Université Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France

²: Institut INSERM U693, Université Paris-Sud 11, Le Kremlin-Bicêtre, France

³: Plate-forme d'imagerie cellulaire et de cytométrie de flux – IRCIV, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, Villejuif, France

⁴: Rhumatologie, Hôpital Bicêtre, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Le Kremlin Bicêtre, France

* The 2 last authors contributed equally to the work

Supported by the Agence Nationale pour la Recherche, la Fondation Arthritis and Société Française de Rhumatologie

Address correspondence and reprint requests to

Corinne Miceli-Richard, MD, PhD, Service de Rhumatologie, Hôpital de Bicêtre, 78 Rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin Bicêtre, France. E-mail: corinne.miceli@bct.aphp.fr or

Xavier Mariette, MD, PhD, Service de Rhumatologie, Hôpital de Bicêtre, 78 Rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin Bicêtre, France. E-mail: xavier.mariette@bct.aphp.fr

Key words: IL-12, type I IFN, STAT4, CD4⁺ T cells, Plasmacytoid dendritic cells

ABSTRACT

Background

STAT4 is a transcription factor (TF) involved in T_H1 polarization characterized by type II interferon (IFN) (or IFN- γ) secretion, specifically activated after interleukin 12 (IL-12) binding on its receptor. Polymorphisms of STAT4 have been associated with rheumatoid arthritis in which IFN- γ is supposed to play a key role. Surprisingly, the same polymorphisms of STAT4 are also associated with primary Sjögren's syndrome (pSS) and systemic lupus erythematosus (SLE), 2 diseases characterized by a type I (or IFN- α and IFN- β) signature. Moreover, a strong correlation between *STAT4* and type I interferon-induced genes mRNA expression levels was found in pSS. The aim of this work was to elucidate the extent to which IL-12, a STAT4 activator, could be involved in the type I IFN signalling pathway.

Subjects and Methods:

CD4⁺ T cells (isolated with magnetic beads (Miltenyi procedure) or cells sorting (MoFlo cytometer) from healthy controls were activated with anti-CD3/anti-CD28 +/- IL-12. At the end of culture, supernatants were collected and CD4⁺ T cells mRNA extractions were performed. CD4⁺ T cells and plasmacytoid dendritic cells (pDCs) were cultured with supernatants from CD4⁺ T cells cultured under various conditions. IFIT-1, IFITM1, PKR mRNA expression, reflecting type I IFN signature, and actin mRNA expression were analysed by qPCR.

Results:

An up-regulation of type I IFN-induced genes after IL-12 stimulation was observed exclusively when CD4⁺T cells were isolated with magnetic beads: IFIT-1 (n=13) (p=0.0007), IFITM1 (n=6) (p=0.06) and PKR (n=6) (p=0.035). Highly purified FACS sorted-CD4⁺T cells

did not show any type I IFN signature in the same culture conditions suggesting that a CD4⁺ cellular partner was excluded by FACS sorting. This cellular partner was demonstrated to be pDCs which express low level of CD4 (CD4^{dim}). IL-12 alone did not induce a type I IFN signature on pDCs. We demonstrated that CD4⁺ T cells/pDCs crosstalk was necessary to induce such type I IFN signature after IL-12 stimulation of CD4⁺ T cells and that this induction was linked to a soluble factor contained in the supernatant of IL12-stimulated CD4⁺ T cells.

Conclusion:

This report demonstrates that IL-12 specifically induces a type I IFN signature through a CD4⁺ T cells and pDCs crosstalk. These results could explain the implication of *STAT4* polymorphisms in type I IFN-dependent AIDs. Our data confirm that type I IFN- and type II IFN-mediated AIDs are not opposed. They may be only the yin and the yang of activation by IL-12 which can stimulate the 2 types of pathway.

INTRODUCTION

Noteworthy progress has been made in the last decade regarding the understanding of auto-immune diseases (AIDs) pathogeny. Systemic lupus erythematosus (SLE) and primary Sjögren's syndrome (pSS), two closely related AIDs, are remarkable by a similar type I interferon (IFN) signature observed either in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (Baechler, Batliwalla et al. 2003) or in the target of auto-immunity, i.e. minor salivary glands (SGs) in pSS (Hjelmervik, Petersen et al. 2005; Gottenberg, Cagnard et al. 2006) or kidney in SLE (Peterson, Huang et al. 2004). Moreover, shared genetic susceptibility factors in the type I IFN pathway have been identified for both diseases, such as interferon regulatory factor 5 (*IRF5*), a gene implicated in type I IFN secretion after stimulation of innate immunity, and in type I IFN signal transduction. Conversely, rheumatoid arthritis (RA) is considered as a T_H1-mediated disease with a strong implication of IFN-gamma (IFN- γ), the type II IFN (Lee, Lund et al. 2007; Remmers, Plenge et al. 2007).

Signal transducer and activation of transcription 4 (*STAT4*) is the cornerstone transcription factor (TF) involved in T_H1 polarization since *STAT4*^{-/-} deficient mice are not able to have T_H1 cell differentiation (Kaplan, Sun et al. 1996; Thierfelder, van Deursen et al. 1996). *STAT4* is the key TF involved in IFN- γ secretion and the main activator of *STAT4* is interleukin (IL)-12 cytokine. IL-12 signal transduction is mediated through IL-12 receptor (IL-12R) which is constituted of two chains – IL-12R β 1 and IL-12R β 2 (Presky, Yang et al. 1996). Action of IL-12 is highly mediated by IL-12 receptor β 2 subunit (Szabo, Dighe et al. 1997). After fixation of IL-12 on its receptor, the activation of Janus kinase induces a tyrosine phosphorylation of *STAT4* and *STAT4*/*STAT4* homodimers formation. These homodimers then translocate from cytoplasm to nucleus and enhance IFN- γ transcription through their DNA binding in the promoter region of the human IFN- γ gene (Xu, Sun et al. 1996). Thus it is not surprising that *STAT4* polymorphism is associated with RA, a classically T_H1-

mediated disease. But unexpectedly, a genetic association with *STAT4* is also found in SLE or pSS, both diseases being not usually considered as T_H1-mediated.

Until now, *STAT4* phosphorylation was known to be mainly induced by IL-12. Nevertheless, some studies have shown that IFN- α/β was also able to induce *STAT4* phosphorylation in T cells (Rogge, D'Ambrosio et al. 1998; Farrar, Smith et al. 2000; Nguyen, Watford et al. 2002) and to further promote a T_H1 phenotype and thus an IFN- γ enhanced transcription. In a previous study demonstrating the association of the *STAT4* rs7582694 polymorphism with pSS, we did not find any correlation between *STAT4* polymorphism and *STAT4* mRNA level but we demonstrated a strong correlation between *STAT4* mRNA level and type I IFN-induced genes (*IFIT1*, *MX1* and *PKR*) mRNA levels which could suggest a possible direct role of *STAT4* not only on type II IFN secretion but also on both type I IFN secretion and type I IFN-induced genes transcription. In order to test this hypothesis, we assessed the effect of IL-12 on CD4⁺ T cells in terms of type I IFN-induced genes. After IL12 stimulation, we observed in CD4⁺ T cells a reproducible IFN- α signature but that necessary involved a second cellular partner, the plasmacytoid dendritic cells (pDCs). This report provides a new insight on the interactions between IL12 and type I IFN, which could explain the implication of *STAT4* in type I IFN-dependent AIDs.

MATERIEL AND METHODS

Cell isolation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy subjects were isolated by density-gradient centrifugation. Non-CD4⁺ T cells were depleted by the immunomagnetic beads technique with Human CD4⁺ T Cell Isolation Kit II (negative and positive selection) (MiltenyiBiotec, Paris, France). Then, the CD4⁺ T cells enriched fraction was isolated with direct magnetic labelling with CD4 Microbeads. pDCs were selected with Diamond Plasmacytoid Dendritic Cell Isolation Kit (MiltenyiBiotec, Paris, France). CD4⁺ T cells were stained with CD3-FITC, CD4-APCH7, and pDCs were stained by HLA-DR-PE-Cy7 and CD303-PE (BD Biosciences, Le pont de Claix, France). Cells were analysed with BD FACSanto™ and data files were analysed using FlowJo software (Tree Star Inc, Ashland, OR). The purity of these cells was always greater than 99%.

A more stringent method of sorting was also used to purify CD4⁺ T cells: CD4⁺ T cells were enriched by negative selection using the Human CD4⁺ T Cell Isolation Kit II (MiltenyiBiotec, Paris, France). Then, cells were stained by lineage-negative (Lin-) after incubation with a cocktail of PE-labeled monoclonal antibody (mAb) against CD303, CD14, CD56, CD19 (BD Biosciences, Le pont de Claix, France) and then analyzed by a fluorescence-activated cell sorting (FACS) with MoFlo® Flow Cytometer. The purity of CD4⁺ T cells was always greater than 99%.

Cell culture

First, isolated CD4⁺ T cells were activated with soluble anti-CD3 pure and soluble anti-CD28 pure (MiltenyiBiotec, Paris, France) at 1µg/mL during 4 days. Recombinant human (rh) IL-12 was added on day 2 during the fast-growth phase at 100ng/mL (PeproTech, Neuilly-sur-Seine, France). Alternative cytokine stimulations were performed with rhIFN-α 2a (1000U/mL)

(Roche, Meylan, France), rhIL-2 (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) 20U and 100U/mL, rhIFN- γ at 10ng/mL (Roche, Meylan, France). In some experiments, were added blocking anti-human IL-12R β 2 at 100 μ g/mL (R&D systems, Lille, France), blocking anti-human IFN- γ at 10 μ g/mL (R&D systems, Lille, France) and blocking anti-human IFN- α receptor 1 (IFNAR1, 64G12 mAb) (25 μ g/mL), a mouse IgG1 that inhibits both binding and biological activity of all type-I IFN tested, as described previously^(Eid, Langer et al. 2000). Cells were cultured at 2×10^5 cells per 200 μ L in 96-wells plate at 37°C and 5% of CO₂. Culture media were RPMI 1640 glutamaxGibco supplemented with 10% SVF (Dutscher, Brumath, France), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 μ g/mL), buffer HEPES 10mM, pyruvate of sodium 1mM and amino acids (Invitrogen, France). Supernatant were collected at the end of culture and frozen at -80°C and cells were lysed for mRNA extraction.

Sorted CD4⁺ T cells were cultivated as described before, supernatants were collected and cells were lysed for mRNA extraction.

Plasmacytoids dendritic cells were cultivated with CD4⁺ T cells supernatant overnight at 3×10^4 cells per 100 μ L in 96-wells plate at 37°C and 5% of CO₂. Then cells were lysed for mRNA expression of IFIT-1, PKR and IFITM1.

Real-time PCR and reverse transcriptase RT-PCR

Total RNA was isolated from cells with use of the RNeasy Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). cDNA synthesis was performed with the Enhanced Avian HS RT-PCR kit (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).

IFIT-1, PKR, IFITM-1, known to be highly and specifically induced by IFN type I (Niewold, Hua et al. 2007), and β -actin cDNA levels were analyzed by the use of LightCyclerFastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics, Meylan, France) in using Light Cycler based kinetic quantitative RT-PCR (Roche Diagnostics, Meylan, France). Amplification

involved the following primers : *IFIT-1*, (forward) 5'- CTC CTT GGG TTC GTC TAC AAA TTG -3' and (reverse) 5'-AGT CAG CAG CCA GTC TCA G -3' ; *PKR*, (forward) 5'- CGA TAC ATG AGC CCA GAA CA -3' and (reverse) 5'- GTT TCA AAA GCA GTG TCA CA -3' ; *IFITM-1*, (forward) 5'- CCT GTC ACT GGT ATT CGG CTC T -3' and (reverse) 5'- CAG GCT ATG GGC GGC TAC -3' ; *β-actin*, (forward) 5'-GCT GTG CTA CGT CGC CCT-3' and (reverse) 5'-AAG GTA GTT TGG TGG ATG CC-3'. Each sample was processed in duplicate, with initial incubation at 96°C for 10 minutes, and thermal conditions followed 40 cycles of 95°C for 10 seconds, adapted TM for 10 seconds, and 72°C for 10 seconds. Variations in mRNA recovery and reverse transcription yield were normalized to that of *β-actin*.

Effects of CD4⁺ T cells supernatant activity on type I IFN-induced genes in CD4⁺ T cells and pDCs

Sorted pure CD4⁺ T cells were activated during 4 days with anti-CD3 and anti-CD28 at 1µg/mL.rhIL-12 (100ng/mL) was added or not at 48H. At the end of culture, supernatants were collected and conserved at -20°C. pDCs from healthy patients were isolated with Diamond Plasmacytoid Dendritic Cell Isolation Kit and incubated overnight at 3 x 10⁵ cells with 100 µL T CD4⁺ cells supernatants stimulated or not with rhIL-12. For each of these conditions, controls were realised: +/- anti-IFNAR1, +/- anti-IFN-γ, +/- IgG1 and medium only. At the end of culture, total RNA was isolated from pDCs and type I IFN-induced genes were analysed by PCR (*IFIT-1*, *IFITM-1*, *PKR*).

Kinetic of STAT phosphorylation and western blots

CD4⁺ T cells were activated with anti-CD3/anti-CD28 during 48H and stimulated or not by IL-12 during 10 minutes. An anti-human IL-12Rβ2 (R&D systems, Lille, France) was used as negative control of STAT4 phosphorylation and was incubated 30 minutes before IL-12

addition. Then, cells were lysed in 50µL of lyses buffer [4% SDS, 20% glycerol, 10% β2-mercaptoethanol and 0.125M TrisHCl] and were heated 5 minutes at 95°C. Cell disruption was obtained by sonication and protein extracts were conserved at -20°C.

Protein extracts were quantified with Bradford dosage. Then, Leammli [4% SDS, 20% glycerol, 10% β2-mercaptoethanol, 0.004% bromphenol blue and 0.125M TrisHCl] was added to each sample, separated by 7.5% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Next, transferred membranes were saturated with 5% non fat milk during 1H.

Anti-phospho STAT4 (cell signalling, Saint Quentin en Yvelines, France) were analysed. Antibody was diluted in Tris-buffered saline and 0.1% Tween 20 buffer supplemented with 5% non fat milk and added to the membranes for 1 h 30 min at room temperature or overnight at 4° C followed by incubation with the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies for 45 min at room temperature. All proteins were detected with ECL Plus detection reagents (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) and visualized by chemiluminescence.

Ethical principles

Human lymphocytes were isolated from anonymous healthy blood donors and provided by the Etablissement Français du Sang (EFS), Hôpital S^t Louis, Paris, France, in the setting of an agreement signed between the EFS, Hôpital S^t Louis and INSERM. Informed consents were obtained from the donors by the EFS, Hôpital S^t Louis.

RESULTS

IL-12 induces a type I IFN signature in CD4⁺ T cells

rhIL-12, introduced after 2 days of stimulation with anti-CD3/anti-CD28 to allow IL-12R β 2 expression to the membrane, induced an increased expression of type I IFN-induced genes mRNA levels in CD4⁺ T cells: *IFIT-1* (n=12) (p=0.0005), *IFITM1* (n=11) (p=0.032) and *PKR* (n=6) (p=0.0038) (Figure 1). Anti-human IFNAR1 addition to the cell culture, before the addition of rhIL-12, blocked *IFIT-1*, *PKR* and *IFITM1* mRNA up-regulation, demonstrating that rhIL-12 was able to induce a characteristic type I IFN signature on CD4⁺ T cells in a type I IFN dependant manner. Anti-IFN- γ antibodies did not have any effect in CD4⁺ T cells culture on the type I IFN signature (data not shown). As expected, rh-IL-12 induced a specific phosphorylation of Stat4 (Figure 2)

Type I IFN signature in CD4⁺ T cells is specifically induced by IL-12

In order to assess the specificity of this type I IFN signature induced by rhIL-12 in CD4⁺ T cells, cells were cultured as described in the previous experiments but rhIL-12 was substituted with other cytokines. Neither rhIL-2 at two different concentrations (20U/mL and 100U/mL), nor rhIFN- γ at 10ng/mL added to CD4⁺ T cells culture was able to up-regulate *IFIT-1*, *IFITM1* and *PKR* mRNA expression (Figure 3). These results suggest that the type I IFN signature in CD4⁺ T cells was specifically induced by IL-12.

IL12 does not induce a type I IFN signature in highly purified sorted CD4⁺ T cells

Due to the Miltenyi procedure using a positive selection with CD4⁺ magnetic microbeads, we could not rule out the presence of another CD4⁺ cell type contributing to the observed results. In this respect, we aimed to replicate the previous results on highly purified CD4⁺ T cells. We thus repeated the previous experiments on FACS sorted CD4⁺ T cells. Similar cell-culture conditions were used. rhIL-12 was no longer able to induce *IFIT-1*, *IFITM1* and *PKR* mRNA

up-regulation on FACS sorted CD4⁺ T cells (Figure 4). Nevertheless, if highly purified sorted CD4⁺ T cells were stimulated with supernatants from magnetic beads-isolated and rhIL12-stimulated CD4⁺ T cells, the type I IFN signature was recovered (Figure 5). Very interestingly, anti-human IFNAR1 was able to suppress this effect of the supernatants suggesting that this effect was type I IFN dependant.

IL-12 induces a cross-talk between CD4⁺ T cells and pDCs

Thus, we made the hypothesis of the presence of contaminating cells in the magnetic beads-isolated CD4⁺ T cells which could be necessary for this action of rhIL-12. As this action is type 1 IFN-dependant and as plasmacytoid dendritic cells (pDCs) express CD4 at a low levels, the first hypothesis was the presence of contaminating pDCs, the professional producer of IFN- α/β (Perussia, Fanning et al. 1985; Siegal, Kadowaki et al. 1999). Miltenyi procedure using CD4⁺ microbeads was thus able to co-select few pDCs together with CD4⁺ T cells. Contrarily, FACS sorting was able to exclude this residual cellular fraction with a specific CD303⁺ Ab (highly expressed on pDC) and permitted to have a very high purified fraction of CD4⁺ T cells.

FACS sorted CD4⁺ T cells were stimulated for 2 days with soluble anti-CD3/anti-CD28 and rhIL-12 was further added – or not – at 48H, as previously described. Supernatants of these cell cultures were harvested and added overnight on isolated pDCs. Noticeably, only conditions using supernatants from rhIL-12 stimulated CD4⁺ T cells were able to induce an up-regulation of *IFIT-1*, *IFITM1* and *PKR* mRNA in pDCs (Figure 6). This up-regulation observed in pDCs was strikingly decreased in presence of anti-human IFNAR1. These data demonstrated that one or more soluble factors, specifically secreted after IL-12 stimulation of CD4⁺ T cells, were able to induce a type I IFN signature on pDCs. IFN- γ was not involved in this process since anti-IFN- γ did not abolish the signature. Conversely, a crucial step of such

induction involved type I IFN itself since anti-human IFNAR1 inhibits *IFIT-1*, *IFITM1* and *PKR* mRNA up-regulation in pDCs.

rhIL-12 has no direct action on pDCs

To assess whether pDCs were able to directly facilitate effective type I IFN response, we evaluated the effect on pDCs of rhIL-12 and other various cytokines potentially induced by IL-12 stimulated CD4⁺ T-cells. Cells were cultured overnight in medium only or with two different concentrations of IL-2 (20U/mL and 100U/mL), IFN γ at 10ng/mL, rhIL-12 at 100ng/mL or IL-12 at 100ng/mL + IFN- γ 10ng/mL. Positive control was performed with CpG-A (specific stimulating of Toll like receptor 9) at 25 μ g/mL. No induction of *IFIT-1*, *IFITM1* and *PKR* transcript was observed with these different stimulations (Figure 7). Thus induction of type I IFN by rhIL12 was not due to a direct effect on pDCs.

DISCUSSION

The data presented in this report demonstrate that rhIL-12 specifically induced a type I IFN signature through a CD4⁺ T cells and pDCs crosstalk.

We observed a reproducible type I IFN signature on magnetic beads-isolated CD4⁺ T cells, specifically induced by rhIL-12. Interestingly, neither IL-2 nor IFN- γ was able to induce a similar signature on CD4⁺ T cells. To confirm this capacity of magnetic beads-isolated CD4⁺ T cells to induce a type I IFN signature, pure CD4⁺ cell lines would have been interesting to study but unfortunately, neither Jurkat nor MOLT-4 express the IL-12R β 2. Thus, we performed further experiments on highly purified FACS sorted CD4⁺ T cells. Fruitless, *IFIT-1*, *IFITM1* and *PKR* transcripts were not induced by IL-12 in these highly purified CD4⁺ T cells. Thus, apart from the CD4⁺ T cells population isolated with magnetic beads, another CD4⁺ cellular partner was suspected to be co-selected. The alternative method of cell sorting allowed excluding CD303⁺ cells and selecting specifically CD4⁺ cells. pDCs were good candidates for two reasons: i. these cells express low levels of membranous CD4, ii. pDCs are the professional producer of IFN- α/β (Perussia, Fanning et al. 1985; Siegal, Kadowaki et al. 1999). Interestingly, neither IL-12, nor IL-12 induced cytokines (IFN- γ or IL-2) lead to the type I IFN signature in pure isolated pDCs. The type I IFN signature was restored by supernatants from highly purified sorted CD4⁺ T cells stimulated by rhIL-12 and further transposed to CD4⁺ T cells isolated with magnetic beads or to isolated pDCs. These latest results suggested that action of IL-12 needs CD4⁺ T cells but also pDCs. It also demonstrated that the crosstalk between CD4⁺ T cells and pDCs went through a soluble factor secreted by CD4⁺ T cells in the presence of IL-12 which in turn was able to induce a type I IFN signature on sorted CD4⁺ T cells and/or pDCs.

Type I IFN is a crucial actor of this crosstalk between CD4⁺ T cells and pDC since anti-IFNAR abolished the phenomenon. Type I IFN is produced by pDCs after priming of this cell by one or more soluble factors secreted by IL-12-stimulated CD4⁺ T cells. The nature of this soluble factor secreted by IL-12-stimulated CD4⁺ T cells remains unknown. IFN- γ is not involved in this process since anti-IFN- γ did not abolish the effect. Likewise, it is not the association of IL-12 and IFN- γ since this association did not induce any type 1 IFN signature on purified pDC.

The proposed mechanism connecting T_H1 stimulation and type 1 IFN production represents a novel example of crosstalk involving pDC. Recently, other types of crosstalks with pDCs resulting in IFN- α production have been described which could play a role in AID. NK cells may activate pDC through both a soluble factor, MIP-1, and direct contact involving LFA-1 (Hagberg, Berggren et al.). Likewise, B lymphocytes may also directly enhance the type 1 IFN production by pDC (Ronnblum, ACR 2011, abstract N°2496). In both conditions, pDC priming by TLR agonists or immune complexes was necessary to observe an IFN- α production after NK cells or B cells crosstalk. Interestingly, in the crosstalk with CD4⁺ T cells described herein, no priming of pDC was necessary.

The observed type I IFN signature resulting from CD4⁺ T cells and pDCs crosstalk was IL-12 dependant. It was tempting to hypothesize that such “specificity” relied on STAT4 which is the sole TF recruited after IL-12 engagement on its receptor. As expected, we confirmed that IL12 stimulation of magnetic bead-isolated or highly purified FACS sorted CD4⁺ T cells induced STAT4 phosphorylation. In this respect, these results shed light on the previously questioning genetic associations between STAT4 polymorphisms and type I IFN dependent AIDs. Indeed, if *STAT4* polymorphisms association with RA, a classically T_H1-mediated disease, is not surprising, it was much more puzzling to understand such association with type 1 IFN-driven AIDs like SLE and pSS. GWAS technology has led to the clear identification of

a type I IFN signature in both SLE and pSS either in PBMCs (Baechler, Batliwalla et al. 2003; Crow, Kirou et al. 2003; Han, Chen et al. 2003; Bave, Nordmark et al. 2005) or in the target organ of autoimmunity, i.e. kidney in SLE (Peterson, Huang et al. 2004) or minor salivary glands (mSGs) in pSS (Hjelmervik, Petersen et al. 2005; Gottenberg, Cagnard et al. 2006) with presence of pDCs within salivary gland biopsy samples from pSS patients but never from controls (Gottenberg, Cagnard et al. 2006)

IL-12 is mainly secreted by monocytes, macrophages and conventional dendritic cells (cDCs). Interestingly, IL-12 transgenic mice develop abnormalities strikingly similar to those found in the salivary glands (McGrath-Morrow, Laube et al. 2006; Vosters, Landek-Salgado et al. 2009) and in the lungs²⁴ from patients with pSS. Monocytes and cDCs from these pSS patients are activated, for example they secrete more BAFF after IFN- γ stimulation (Lavie 2008, Yashimoto 2011). IL-12, secreted by these activated macrophages and cDCs can activate CD4⁺ T cells, which are present in the salivary gland infiltrate, for secreting factors involved in the crosstalk with pDC resulting in type I production.

We can thus propose that in a genetically predisposed subject, functional polymorphisms of STAT4 should induce or amplify the crosstalk between salivary gland infiltrating CD4⁺ T cells and resident pDCs leading to the characteristic type I IFN signature observed in pSS. Interestingly, there are no clear opposition between type I and type II IFN-mediated diseases. In pSS, T cells are majority in the labial salivary gland infiltrate and IFN- γ is also overexpressed. Likewise, a subset of RA patients expresses a type I IFN signature. Unfortunately and despite intensive work in this field, the functional consequences of STAT4-associated polymorphisms are still unresolved in AIDs. If this point becomes elucidated in the future, this would reinforce the crucial role of STAT4 at the crossroad between type I and type II IFN pathways.

In conclusion, our data confirm that type I IFN- and type II IFN-mediated AID do not have to be opposed. They may be only the yin and the yang of activation by IL-12 which can stimulate the 2 types of pathway.

FIGURE LEGENDS

Figure 1.

IL-12 induces type I IFN genes in CD4⁺ T cells: (●) CD4⁺ T cells were activated with anti-CD3 and anti-CD28 during 96H; (■) CD4⁺ T cells were activated with anti-CD3 and anti-CD28 during 48H and rhIL-12 were further added for 48H; (▲) CD4⁺ T cells were activated with anti-CD3 and anti-CD28 during 48H. At 48H, anti-IFNAR1 were incubated 30 minutes before the addition of rhIL-12 for 48H; (△) CD4⁺ T cells were activated with anti-CD3 and anti-CD28 48H and rhIFN- α 2a were added for further 48H; (○) CD4⁺ T cells were activated with anti-CD3 and anti-CD28 during 48H. At 48H, anti-IFNAR1 was incubated 30 minutes before the addition of rhIFN- α 2a for 48H..Data are as show mean $\pm$ SEM of 12 independent experiments.***P < 0.0001, ***P < 0.001 and *P < 0.05.compared with cells treated without IL-12 or without IFN- α 2a, Wilcoxon matched-pairs.

Figure 2.

Effect of rhIL-12 on the STAT4 phosphorylation in CD4⁺ T cells.

Lane 1: CD4⁺ T-cells ex vivo ; Lane 2 : CD4⁺ T-cells activated with anti-CD3/anti-CD28 during 48H ; Lane 3: CD4⁺ T-cells activated with anti-CD3/anti-CD28 during 48H + anti-IL-12R β 2 Ab (30 minutes incubation) + IL-12 (15mn incubation) ; Lane 4: CD4⁺ T-cells activated with anti-CD3/anti-CD28 during 48h + IL-12 (15mn incubation) ; Lane 6: CD4⁺ T-cells activated with anti-CD3/anti-CD28 during 48 + non relevant polyclonal IgG2a

Figure 3.

No effect of others cytokines on type I IFN-induced genes in CD4⁺ T cells. CD4⁺ T cells were activated during 96H with anti-CD3 and anti-CD28 (○). Others cytokines were added at day

2. In presence of rhIL-2 at two different concentrations (20U/mL (●) and 100U/mL (◆)) and rh-IFN- γ at 10ng/mL (■), CD4⁺ T cells were not able to enhance the expression of IFIT-1 mRNA (n=3). IFN- α 2a was used as positive control (▲). Data are expressed as mean $\pm$ SEM of 3 independent experiments.

Figure 4.

No induction of type I IFN genes by IL-12 in CD4⁺ sorted T cells. In presence of rhIL-12, CD4⁺ T cells were not able to enhance the expression of IFIT-1 mRNA. (●) CD4⁺ T cells were activated with anti-CD3 and anti-CD28 during 96H; (■) CD4⁺ T cells were activated with anti-CD3 and anti-CD28 during 48H and rhIL-12 were added for further 48H; (▲) CD4⁺ T cells were activated with anti-CD3 and anti-CD28 during 48H. At 48H, anti-IFNAR1 were incubated 30 minutes before the addition of rhIL-12 for 48H; (Δ) CD4⁺ T cells were activated with anti-CD3 and anti-CD28 48H and rhIFN- α 2a were added for further 48H; (○) CD4⁺ T cells were activated with anti-CD3 and anti-CD28 during 48H. At 48H, anti-IFNAR1 was incubated 30 minutes before the addition of rhIFN- α 2a for 48H. Data are expressed as mean $\pm$ SEM of 3 independent experiments, Wilcoxon matched-pairs.

Figure 5.

Supernatants activity from CD4⁺ Miltenyi isolated T cells on CD4⁺ FACS sorted T cells.

CD4⁺ FACS sorted T cells were incubated with supernatants from CD4⁺ Miltenyi isolated T cells during 4H. Alternatively, anti-human IFNAR1 was incubated 30 minutes with CD4⁺ FACS sorted T cells before any contact with supernatants from CD4⁺ Miltenyi isolated T cells. IFN- α was used as positive control. After 4H, cells were lysed and mRNA expression of

type I IFN induced genes was analysed by qPCR. Data are expressed as mean $\pm$ SEM of 5 independent experiments.*** P < 0.0001. Wilcoxon matched-pairs.

Figure 6.

Dominant type I IFN-induced genes transcription in pDCs after contact with supernatants of $CD4^+$ T cells sorted. $CD4^+$ T cells sorted incubated overnight with supernatant from $CD4^+$ T cells activated; from $CD4^+$ T cells activated and stimulated with rhIL-12; or from $CD4^+$ T cells activated and stimulated with rhIL-12 in presence of anti-IFNAR1. Three independent experiments were performed (n=6).

Figure 7.

Action of different T_H1 cytokines on pDCs.

pDCs were cultured overnight in medium only (○), with IL-2 at 20U/mL (●), with IL-2 at 100U/mL (◆), with IFN γ at 10ng/mL (■), with IL-12 at 100ng/mL (△), with CpG-A at 25 μ g/mL (▲). Data are expressed as mean $\pm$ SEM of 3 independent experiments.

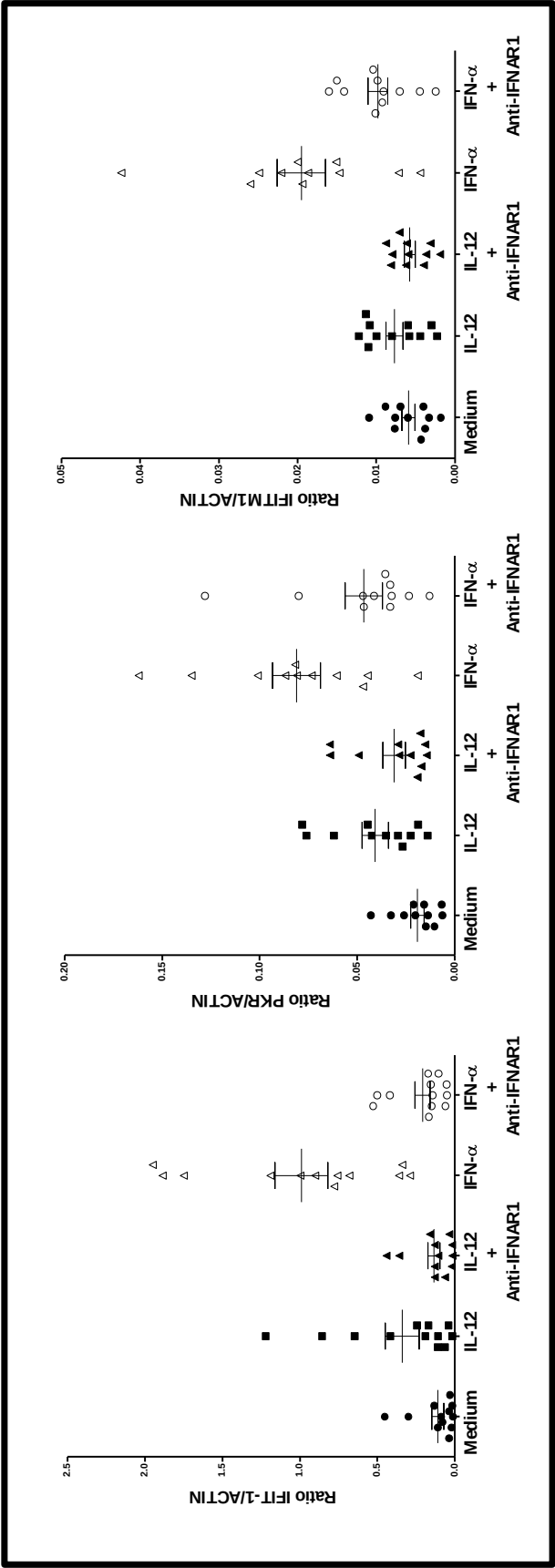


Figure 1.

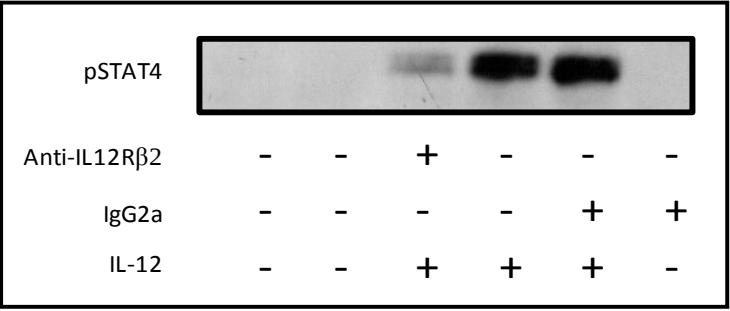


Figure 2.

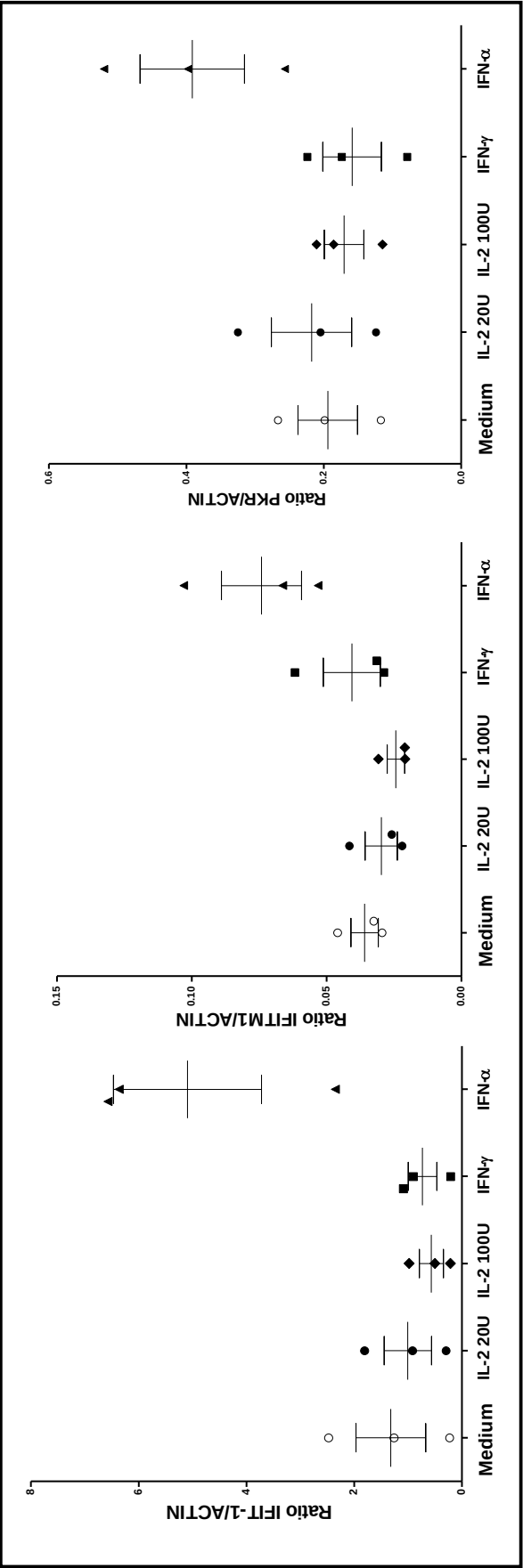


Figure 3.

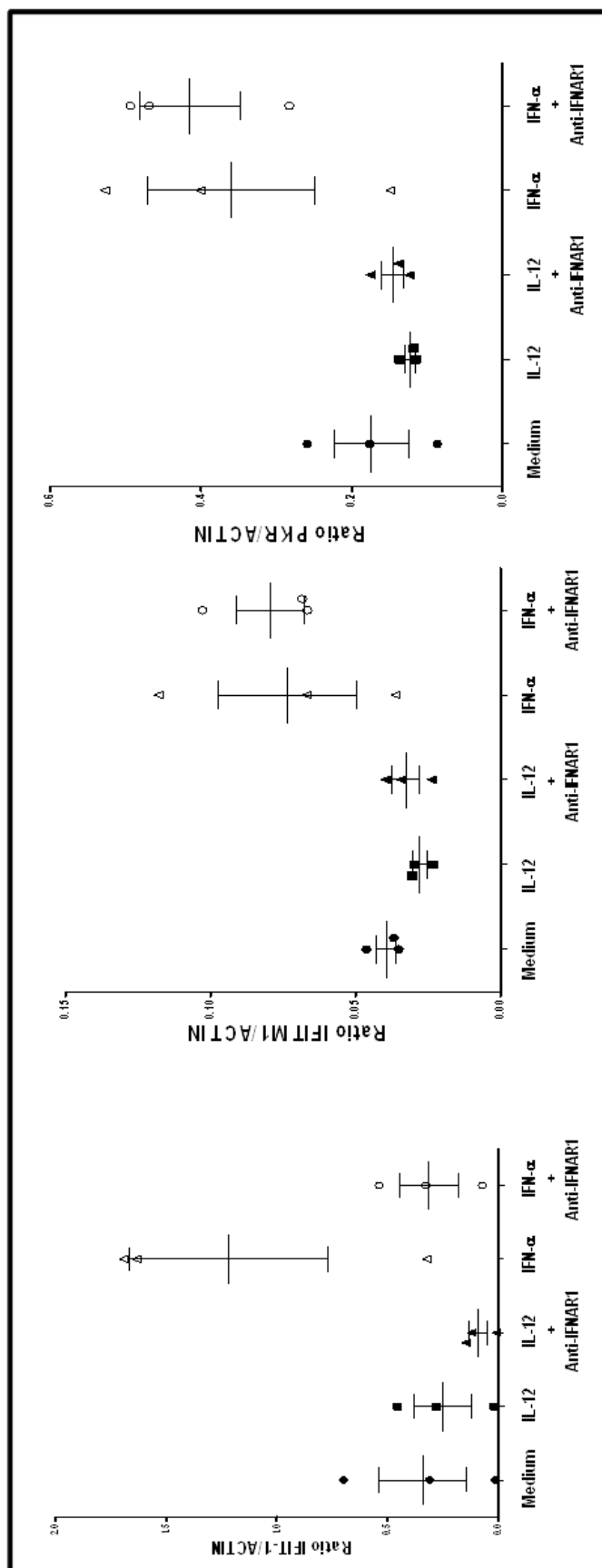


Figure 4.

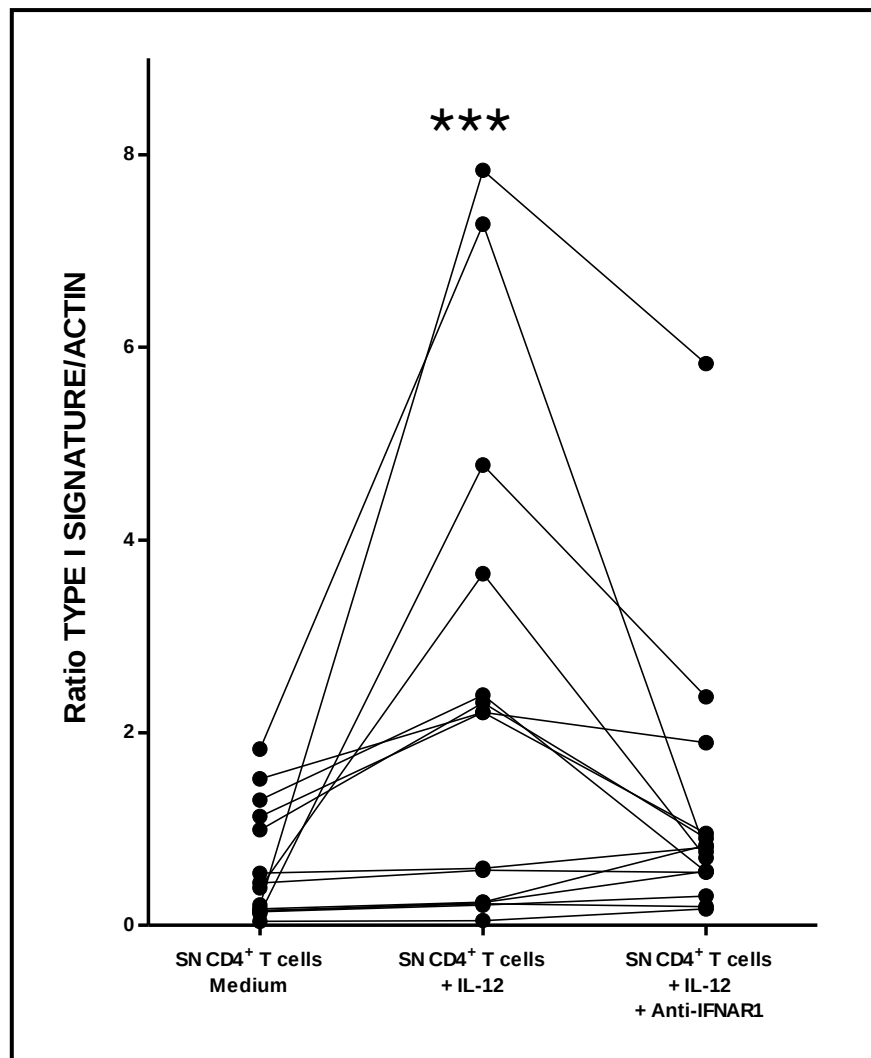


Figure 5.

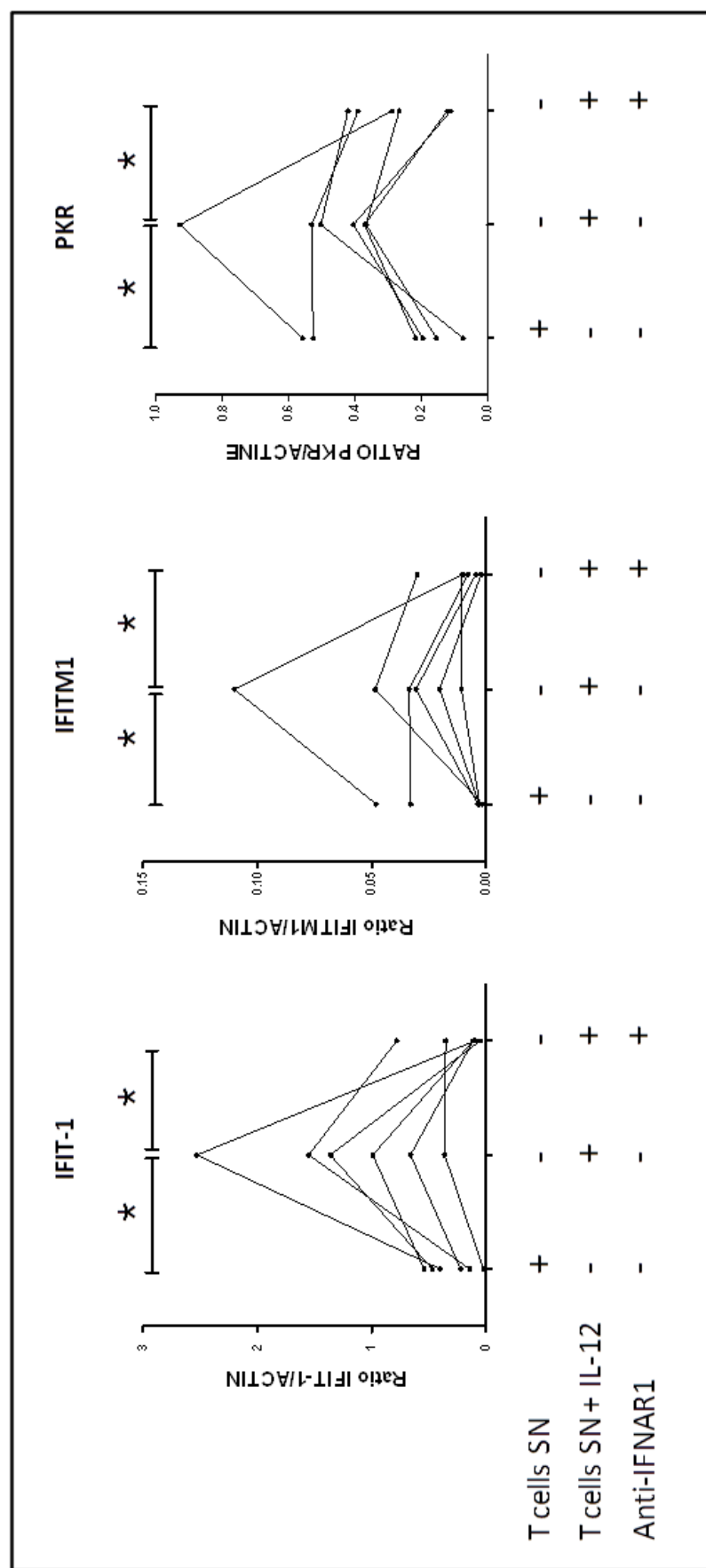


Figure 6.

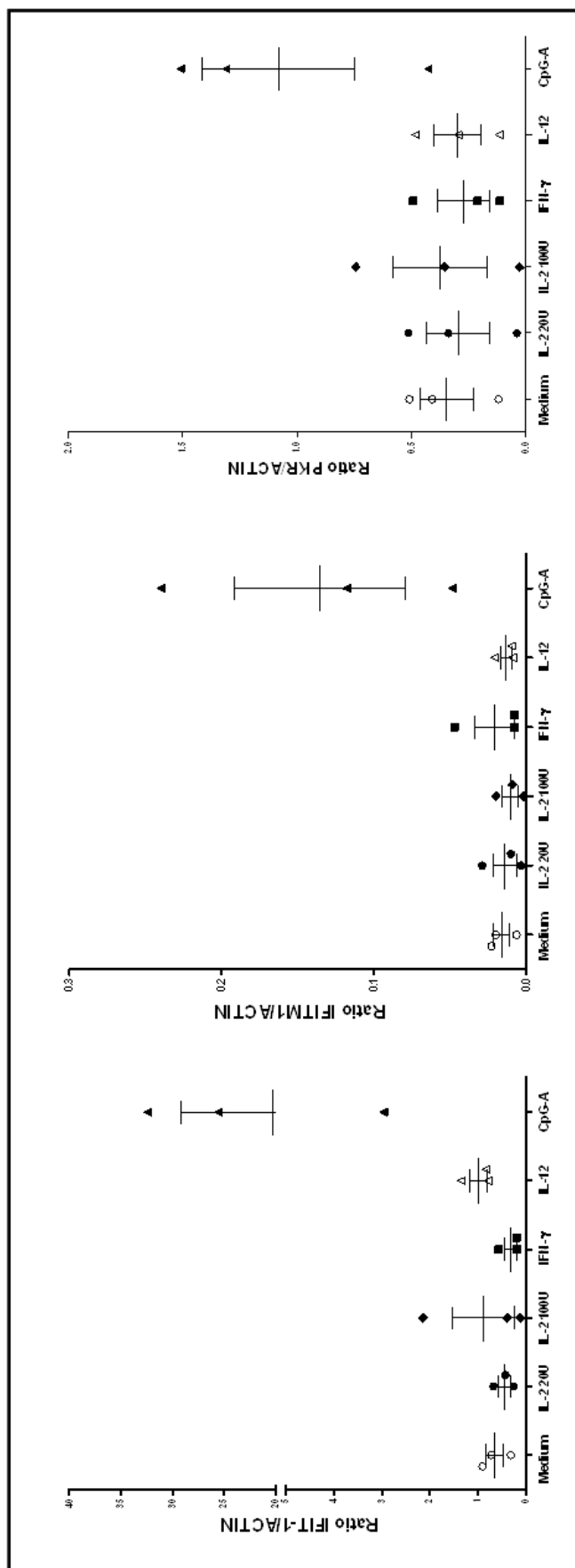


Figure 7.

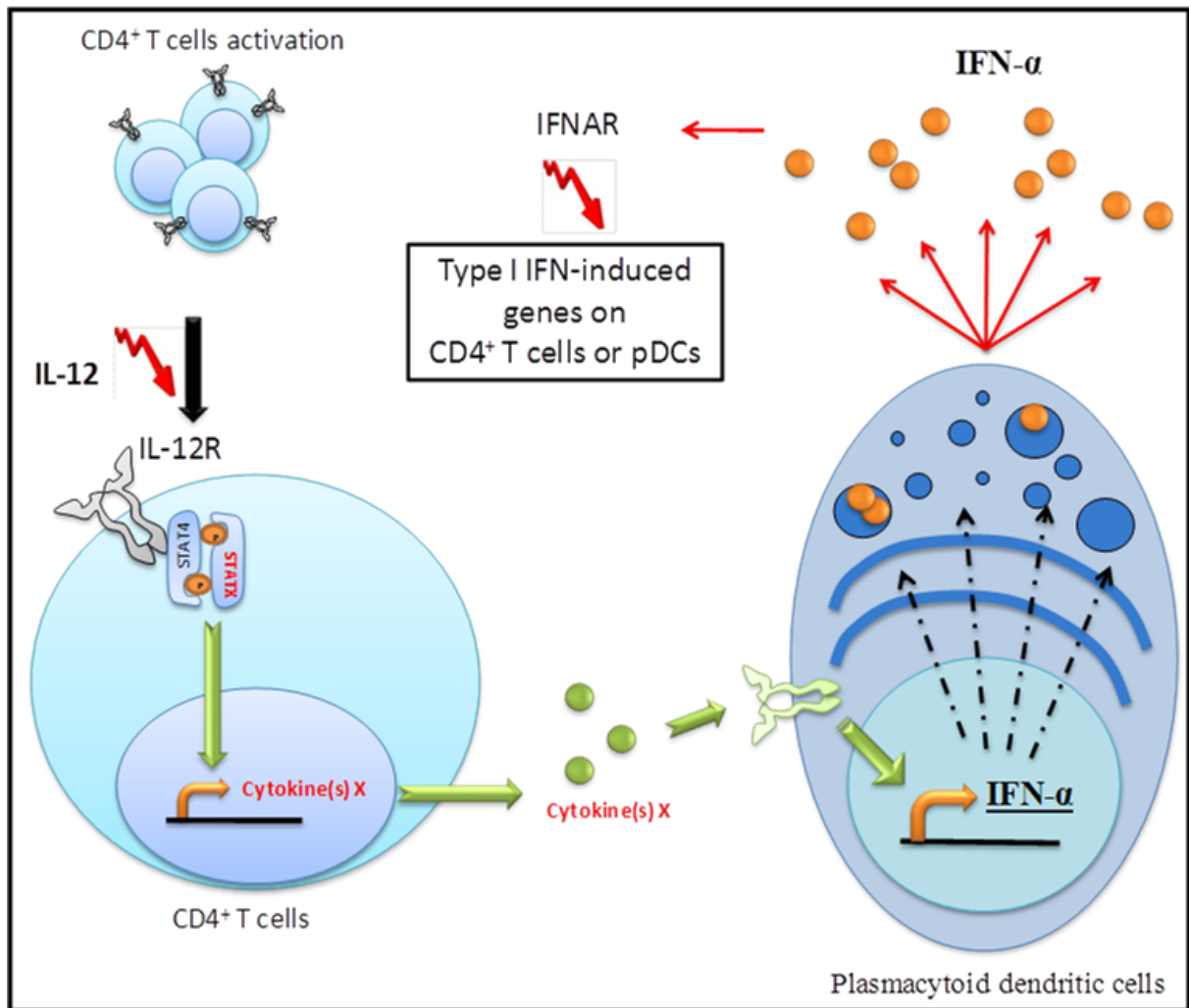


Figure 8. Proposing model of the activation of type I IFN-induced genes by IL-12 toward STAT4 by crosstalk between plasmacytoid dendritic cells and CD4⁺ T cells

REFERENCES

1. Baechler, E.C. *et al.* Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***100**, 2610-2615 (2003).
2. Hjelmervik, T.O., Petersen, K., Jonassen, I., Jonsson, R. & Bolstad, A.I. Gene expression profiling of minor salivary glands clearly distinguishes primary Sjogren's syndrome patients from healthy control subjects. *Arthritis and rheumatism***52**, 1534-1544 (2005).
3. Gottenberg, J.E. *et al.* Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjogren's syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***103**, 2770-2775 (2006).
4. Peterson, K.S. *et al.* Characterization of heterogeneity in the molecular pathogenesis of lupus nephritis from transcriptional profiles of laser-captured glomeruli. *The Journal of clinical investigation***113**, 1722-1733 (2004).
5. Lee, H.S. *et al.* Association of STAT4 with rheumatoid arthritis in the Korean population. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)***13**, 455-460 (2007).
6. Remmers, E.F. *et al.* STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine***357**, 977-986 (2007).
7. Kaplan, M.H., Sun, Y.L., Hoey, T. & Grusby, M.J. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature***382**, 174-177 (1996).
8. Thierfelder, W.E. *et al.* Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature***382**, 171-174 (1996).
9. Presky, D.H. *et al.* A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***93**, 14002-14007 (1996).
10. Szabo, S.J., Dighe, A.S., Gubler, U. & Murphy, K.M. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *The Journal of experimental medicine***185**, 817-824 (1997).
11. Xu, X., Sun, Y.L. & Hoey, T. Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science (New York, N.Y)***273**, 794-797 (1996).
12. Rogge, L. *et al.* The role of Stat4 in species-specific regulation of Th cell development by type I IFNs. *J Immunol***161**, 6567-6574 (1998).
13. Nguyen, K.B. *et al.* Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection. *Science (New York, N.Y)***297**, 2063-2066 (2002).
14. Farrar, J.D., Smith, J.D., Murphy, T.L. & Murphy, K.M. Recruitment of Stat4 to the human interferon-alpha/beta receptor requires activated Stat2. *The Journal of biological chemistry***275**, 2693-2697 (2000).
15. Eid, P. *et al.* Localization of a receptor nonapeptide with a possible role in the binding of the type I interferons. *European cytokine network***11**, 560-573 (2000).

16. Niewold, T.B., Hua, J., Lehman, T.J., Harley, J.B. & Crow, M.K. High serum IFN-alpha activity is a heritable risk factor for systemic lupus erythematosus. *Genes and immunity***8**, 492-502 (2007).
17. Perussia, B., Fanning, V. & Trinchieri, G. A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses. *Natural immunity and cell growth regulation***4**, 120-137 (1985).
18. Siegal, F.P. *et al.* The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science (New York, N.Y)***284**, 1835-1837 (1999).
19. Kohrgruber, N. *et al.* Survival, maturation, and function of CD11c- and CD11c+ peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines. *J Immunol***163**, 3250-3259 (1999).
20. Olweus, J. *et al.* Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***94**, 12551-12556 (1997).
21. Crow, M.K., Kirou, K.A. & Wohlgemuth, J. Microarray analysis of interferon-regulated genes in SLE. *Autoimmunity***36**, 481-490 (2003).
22. Bave, U. *et al.* Activation of the type I interferon system in primary Sjogren's syndrome: a possible etiopathogenic mechanism. *Arthritis and rheumatism***52**, 1185-1195 (2005).
23. Han, G.M. *et al.* Analysis of gene expression profiles in human systemic lupus erythematosus using oligonucleotide microarray. *Genes and immunity***4**, 177-186 (2003).
24. McGrath-Morrow, S. *et al.* IL-12 overexpression in mice as a model for Sjogren lung disease. *American journal of physiology***291**, L837-846 (2006).
25. Vosters, J.L. *et al.* Interleukin-12 induces salivary gland dysfunction in transgenic mice, providing a new model of Sjogren's syndrome. *Arthritis and rheumatism***60**, 3633-3641 (2009).
26. van der Graaff, W.L., Prins, A.P., Niers, T.M., Dijkmans, B.A. & van Lier, R.A. Quantitation of interferon gamma- and interleukin-4-producing T cells in synovial fluid and peripheral blood of arthritis patients. *Rheumatology (Oxford, England)***38**, 214-220 (1999).
27. Hagberg, N. *et al.* IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells stimulated with RNA-containing immune complexes is promoted by NK cells via MIP-1beta and LFA-1. *J Immunol***186**, 5085-5094.
28. Manoussakis, M.N. *et al.* Rates of infiltration by macrophages and dendritic cells and expression of interleukin-18 and interleukin-12 in the chronic inflammatory lesions of Sjogren's syndrome: correlation with certain features of immune hyperactivity and factors associated with high risk of lymphoma development. *Arthritis and rheumatism***56**, 3977-3988 (2007).

DISCUSSION
ET
PERSPECTIVES

4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse avait pour objectif l'identification de facteurs de prédisposition génétique associés au SSp. Après démonstration de ces associations, nous avons mené un travail complémentaire afin de comprendre les conséquences fonctionnelles de ces variants associés au SSp.

Les approches de génétique et les études fonctionnelles ont été possibles grâce à la recherche d'interface menée par le service de Rhumatologie de l'hôpital Bicêtre, centre national de référence du Sjögren qui a permis la mise en place d'une banque de plus de 350 ADN. Parallèlement, sous l'impulsion du Pr Xavier Mariette, une cohorte prospective multicentrique Française (ASSESS) a été établie avec pour objectif de mieux définir les atteintes systémiques du SSp. Une biobanque est également adossée à cette cohorte qui est la plus grande au plan international à ce jour avec plus de 400 ARNm/ADN de patients.

L'ensemble des patients inclus dans les études décrites dans ce travail de thèse ont un syndrome de Sjögren répondant aux critères *“du groupe de consensus Européano-américain”* qui exigent la présence d'une anomalie immunologique objective (Vitali, Bombardieri et al. 2002) (Chapitre 1.1.2, Figure 4). Le phénotype des patients est donc établi de façon précise sur la présence d'un infiltrat inflammatoire nodulaire, c'est à dire de grade supérieur ou égal à 3 de Chisholm sur la biopsie de glandes salivaires accessoires et/ou présence d'auto-anticorps anti-SSA ou ant-SSB.

Ce travail de thèse a permis de confirmer l'association de 2 gènes au SSp – les 2 facteurs génétiques les plus importants après le MHC – et de mieux comprendre les conséquences fonctionnelles des polymorphismes associés. Les liens entre la fonction de ces gènes et la signature IFN de type I ont ainsi été mieux précisés.

Le facteur de régulation de l'IFN 5 (IRF5) est un facteur de transcription impliqué dans l'induction de l'IFN de type I (Barnes, Moore et al. 2001). Le gène d'IRF5 est très associé dans les maladies auto-immunes, tel que le lupus, la sclérodermie, la maladie de Crohn.

Nous avons montré au cours de cette première partie que le polymorphisme d'insertion délétion (Indel) CGGGG d'IRF5 était un facteur de prédisposition au SSp et était fonctionnel. L'association de ce polymorphisme a été confirmée par *Nordmark et al.* à la susceptibilité du SSp mais ces travaux ne rapportaient pas de fonctionnalité de ce polymorphisme (Nordmark, Kristjansdottir et al. 2009).

En effet, l'allèle à risque CGGGG (4 répétitions) était plus fréquent chez les patients (77%) que chez les témoins (63%) ($P = 6.6 \times 10^{-6}$) soit un OR de 2 ce qui est élevé pour un facteur génétique impliqué dans une maladie multifactorielle comme le syndrome de Sjögren. Cette forte association d'IRF5 était indépendante des profils de sécrétion des anticorps anti-SSA et anti-SSB. De même, l'Indel d'IRF5 n'a pas été spécifiquement associé avec les caractéristiques clinico-biologiques de la maladie : signes systémiques ($p=0,17$), présence de cryoglobuline ($p=0,36$) ou quantification des gammaglobulines ($p=0,63$).

Nous avons ensuite cherché à mettre en évidence une relevance fonctionnelle de ce polymorphisme CGGGG localisé dans le promoteur d'IRF5. En effet, lorsque l'expression de l'ARNm d'IRF5 issu de PBMCs de patients était analysée en fonction des génotypes de l'allèle à risque CGGGG d'IRF5, une différence significative entre les différents génotypes de ce polymorphisme était mise en évidence avec une expression plus importante de l'ARNm d'IRF5 pour le génotype à risque homozygote 4R ($p = 0,0004$).

D'autre part, à l'état basal, l'expression de l'ARNm d'IRF5 n'était pas significativement différente dans les cellules épithéliales de glandes salivaires provenant de patients avec SSp en fonction des différents génotypes du polymorphisme CGGGG d'IRF5.

Néanmoins, cette différence d'expression de l'ARNm d'*IRF5* était démasquée après infection des cellules épithéliales de glandes salivaires par *Réovirus*.

L'allèle à risque d'*IRF5* n'était retrouvé ni associé aux taux d'IFN de type I dans le sérum des patients ni à l'expression des gènes IFN de type I. Néanmoins, l'expression de l'ARNm d'*IRF5* était retrouvée corrélée avec l'ARNm des gènes IFN de type I tel qu'*IFITM1* et *Mx1*.

Ces résultats imposent certains commentaires :

La détection des IFNs de type I dans le sérum est difficile. L'utilisation des tests Elisa pour leur détection n'est pas encore très fiable en raison du grand nombre de sous-types d'IFN- α existants et de la possibilité de détecter par ELISA seulement certains d'entre eux. Ce test ELISA manque donc de sensibilité. Cette technique est peu utilisée dans les approches fondamentales. La méthode la plus efficace pour montrer la présence d'IFN- α est indirecte et passe par l'analyse des gènes IFNs de type I induits tels que *Mx1*, *IFIT-1*, *IFITM1*, *PKR*.

L'IFN de type I peut être activé par d'autres voies de signalisation, tel que IRF3 ou IRF7 rendant complexe l'association directe d'IRF5 avec le taux sérique d'IFN de type I chez les patients Sjögren.

Ces résultats mettent en évidence pour la première fois la fonctionnalité de ce polymorphisme dans le syndrome de Sjögren. Ces données fonctionnelles portant sur des patients ayant un SSp pouvaient être expliquées exclusivement par la présence pour l'allèle à risque d'un site supplémentaire de fixation du facteur de transcription Sp1 comme montré par Sidgurson : 3R = 2 sites de fixation pour Sp1 ; 4R = 3 sites de fixation de Sp1.

Cependant, nous avons remarqué au sein des bases de données publiques que la séquence comportant la répétition CGGGG était située dans un îlot CpG. Nous nous sommes

donc demandé si une augmentation d'expression de l'ARNm d'IRF5, expliquée en premier lieu par le site Sp1 additif, ne pouvait pas également s'expliquer par une dérégulation épigénétique dans le SSp au niveau de cette séquence. Des mécanismes similaires de déméthylation de l'ADN conduisant à une surexpression de CD40L et de CD70 ont été démontrés dans le lupus (Lu, Wu et al. 2005; Lu, Wu et al. 2007).

De plus, la fixation de Sp1 est sensible à la méthylation (Sigurdsson, Goring et al. 2008) permettant ainsi d'argumenter la possibilité d'une méthylation spécifique sur le nucléotide C de l'allèle à risque, renforçant l'hypothèse d'une potentielle interaction entre susceptibilité génétique et dérégulation épigénétique. L'Indel CGGGG a la caractéristique d'être une GC box, pouvant rendre cette région tout particulièrement sensible à la méthylation. Le promoteur d'IRF5 était donc un bon candidat pour analyser sa sensibilité à la méthylation d'autant plus que la méthylation pourrait jouer un rôle primordial en modulant la fixation des facteurs de transcription Sp1.

D'autre part, une étude dans les cancers gastriques a récemment mis en évidence que les gènes IRF4, IRF5 et IRF8 étaient sous exprimés dans des lignées cellulaires de cancer gastrique par hyperméthylation. En effet, lorsque ces lignées étaient cultivées en présence d'un agent déméthylant (5-déoxy-Cytidine), une restauration de l'induction d'IRF5 était constatée. De plus, l'analyse de la méthylation du promoteur d'IRF5 permettait de mettre en évidence un fort pourcentage de méthylation (>80%) dans les lignées cancéreuses MKN28 et MKN74 (Yamashita, Toyota et al.).

L'analyse de la méthylation de la région CGGGG et ATG d'IRF5 dans les PBMCs de SSp ainsi que dans différentes sous population de PBMCs de témoins était retrouvée très basse (<15%). Ces résultats ne permettent donc pas d'incriminer une dérégulation épigénétique d'IRF5 dans le SSp. L'augmentation de l'expression de l'ARNm d'IRF5 chez

les malades semble être uniquement attribuable au polymorphisme 4R plus fréquent chez les malades.

Une approche similaire a été proposée dans la maladie de Crohn, maladie inflammatoire pour laquelle ce même polymorphisme CGGGG est associé. En effet, Balasa et al. ont étudié la méthylation de la région CGGGG du promoteur d'IRF5 dans des PBMCs de patients atteints de la maladie de Crohn montrant ainsi que le niveau de méthylation de cette région était similaire à ceux que nous avons trouvé dans différentes sous populations de PBMCs (Balasa, Gathungu et al.). Ainsi il n'existe pas de dérégulation épigénétique d'IRF5 ni dans le SSp ni dans la maladie de Crohn.

Ce résultat négatif n'exclut pas que le gène d'*IRF5* soit régulé par d'autres mécanismes épigénétiques comme les Micro-ARN ou l'acétylation des histones. Récemment, des études ont pu montrer une baisse de l'expression du Micro-ARN 146a (Tang, Luo et al. 2009) dans les PBMCs de patients lupiques. La transfection du Micro-ARN 146a dans des lignées cellulaires 293T permettait de mettre en évidence une réduction importante de l'expression d'*IRF5* (Tang, Luo et al. 2009). Ce Micro-ARN pourrait être un régulateur négatif d'IRF5 mais son rôle dans le SSp n'a jamais été étudié.

Les technologies ayant évolué dans le domaine de l'épigénétique, notre équipe est en train de mener une approche génome entier ou « méthylome » dans des lymphocytes T CD4⁺ et lymphocytes B de patients ayant un syndrome de Sjögren de façon comparative à des témoins. Cette approche devrait ainsi nous permettre d'identifier à grande échelle des gènes candidats sujet à une méthylation différentielle et donc de pouvoir orienter les futures stratégies de recherche dans le domaine de l'épigénétique au cours du SSp.

Nos résultats montrent et confirment une forte association du polymorphisme CGGGG d'IRF5 dans la pathogénèse du syndrome de Sjögren permettant d'ouvrir de nouvelles voies d'investigations. Notamment, une stimulation de l'immunité innée par des agents pathogènes

dans les glandes salivaires de patients Sjögren, *via* l'activation d'IRF5, pourrait être un inducteur important de la production d'IFN de type I.

Récemment, un autre gène a également été très associé aux maladies auto-immunes. Il s'agit du gène de STAT4 (signal de transduction et d'activation de la transcription 4). STAT4 est impliqué dans la production d'IFN de type II et dans la polarisation T_H1 des lymphocytes T.

Une association de STAT4 avec le SSp avait été montrée précédemment dans des populations Nord Européenne (Norvège et Suède) (Nordmark, Kristjansdottir et al. 2009) ainsi que dans une population d'Amérique du Nord (Korman, Alba et al. 2008). Une variation de la fréquence de l'allèle mineur était présente chez les témoins, ceci probablement due à l'ascendance géographique des populations : 22% en Suède, 23% en Norvège, 19 à 21% en Espagne, 17% en Grèce. C'est la raison pour laquelle, du fait de ces variations importantes, il était important que nous confirmions ce résultat dans des populations d'Europe de l'ouest.

Nous montrons que le polymorphisme rs7582694 de STAT4 est très associé au SSp. En effet, la fréquence de l'allèle à risque C du rs7582694 est de 30% chez les SSp contre 20% chez les témoins (OR 1.57, IC 95% 1.27-1.93, $P = 2.3 \times 10^{-5}$). Le risque était plus élevé (OR 2.47 (IC 95% 1.47-4.16, $P = 6 \times 10^{-4}$) lors de l'analyse des porteurs homozygotes de l'allèle à risque, suggérant un effet récessif de cet allèle C du rs7582694.

Nous avons ensuite procédé à une analyse de l'expression de l'ARNm des 2 transcrits de *STAT4* – *STAT- α* et *STAT4- β* – en fonction des différents génotypes du rs7582694 dans les PBMCs de 30 patients. Le transcrit *STAT4- β* est retrouvé 10 fois moins exprimé que le transcrit *STAT4- α* . Aucun des transcrits ne présente de différences significative d'expression en fonction des génotypes de rs7582694.

Le gène de *STAT4* est positionné sur le chromosome 2 (2q32.3) en juxtaposition du gène de *STAT1* (2q32.2). Des blocks d'haplotypes ont récemment été décrits dont 3 se trouvent sur *STAT4*, 1 dans la région intergénique *STAT1/STAT4*, et 2 dans le gène de *STAT1* (Abelson, Delgado-Vega et al. 2009). Ces blocks d'haplotype représentent des groupes de SNPs en déséquilibre de liaison (LD). Nous avons donc analysé l'expression de l'ARNm de *STAT1* en fonction des génotypes du rs7582694 de *STAT4* et mis en évidence que ce SNP n'est pas associé à une expression différentielle de l'ARNm de *STAT1* suggérant que le rs7582694 n'est pas en LD avec un SNP fonctionnel du gène de *STAT1*.

De manière intéressante mais inattendue, nous avons pu corréliser l'expression de l'ARNm des gènes IFN de type I induit avec l'ARNm de *STAT4*. En effet, l'ARNm de *STAT4* est fortement corrélé avec *IFITM1* ($P = 8.6 \times 10^{-3}$, $r = 0.47$), *PKR* ($P = 4.2 \times 10^{-3}$, $r = 0.51$) et *Mx1* ($P = 2 \times 10^{-4}$, $r = 0.63$). Cette corrélation était analysée avec la forme alpha du transcrite de *STAT4* qui se trouve être la forme majoritaire de la protéine. L'expression des gènes de *IFITM1*, *PKR*, *Mx1* et *IFIT-1* a été formellement liée à la présence d'IFN de type I (Kariuki, Kirou et al. 2009). Ce résultat était inattendu de par le fait que le syndrome de Sjögren est caractérisé comme une maladie auto-immune associée à l'IFN de type I. Ce résultat ouvre donc de nouvelles perspectives suggérant l'implication de *STAT4* non seulement dans la production d'IFN de type II mais également dans la voie IFN de type I.

STAT4 est un facteur de transcription impliqué dans la voie de signalisation de l'IFN de type II (IFN- γ) et dans la polarisation T_H1 les lymphocytes T en présence d'IL-12. Retrouver *STAT4* associé à des maladies auto-immunes impliquant l'IFN de type II comme la polyarthrite rhumatoïde ou la sclérose en plaque était dans une certaine mesure logique. Il était par contre beaucoup plus surprenant et intéressant de trouver une association génétique de *STAT4* avec des maladies auto-immunes associés à l'IFN de type I comme dans le LES ou le SSp.

A côté de l'association génétique de STAT4 avec le SSp, nous avons également montré pour la première fois que l'ARNm de STAT4 était fortement corrélé avec l'ARNm de gènes IFN de type I comme PKR, IFITM1 et Mx1 dans des PBMCs de patients présentant un SSp, renforçant l'hypothèse d'une implication potentielle de STAT4 dans l'induction d'une signature IFN- α .

Dans le but de résoudre cette hypothèse, nous avons choisi pour modèle d'étude les lymphocytes T CD4⁺ du fait de phosphorylation spécifique de STAT4 dans ces cellules en réponse à l'IL-12.

Dans une première partie les lymphocytes T CD4⁺ étaient sélectionnés par billes magnétiques. La pureté de ces cellules était de 98-99%. Après une activation de 2 jours par anti-CD3/anti-CD28, permettant l'expression de la sous unité fonctionnelle $\beta 2$ de l'IL-12R (IL-12R $\beta 2$), l'IL-12 était rajoutée ou non à la culture pendant 2 jours supplémentaires. A l'issue de la culture, l'expression des gènes IFN de type I (IFIT-1, IFITM1 et PKR) était analysée. De manière intéressante, les gènes IFN de type I sont retrouvés significativement augmentés dans la culture des lymphocytes T CD4⁺ activés et seulement dans la condition où l'IL-12 était présente.

Des contrôles étaient réalisés au cours de la culture : un contrôle positif avec l'IFN- $\alpha 2a$ permet d'induire spécifiquement les gènes IFN de type I; un contrôle négatif avec un anti-IFNAR1 bloquant permettant de regarder si l'induction des cytokines étaient sous la dépendance de l'IFN- α . Dans la condition où les lymphocytes T CD4⁺ étaient activés en présence d'IL-12, l'anti-IFNAR1 était capable d'inhiber l'induction des gènes IFN de type I. Le contrôle IFN- α permettait bien d'induire les gènes IFN type I et était inhibé en présence d'anti-IFNAR1. Cette expérience permettait d'exclure l'activation directe des gènes IFN de types I par STAT4 puisque l'anti-IFNAR1 est capable d'abroger la réponse d'induction des gènes IFN de type I.

Afin de s'assurer de la spécificité de l'effet de l'IL-12, en suivant le même schéma expérimental de culture, les lymphocytes T CD4⁺ étaient mis en présence de différentes cytokines : IL-2 à 2 concentrations différentes (20 et 100U/mL), et IFN- γ . Aucune de ces cytokines n'étaient capables d'induire une signature IFN de type I. L'effet de l'IL-12 dans les lymphocytes T CD4⁺ semble donc spécifique.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons procédé à un tri cellulaire des lymphocytes T CD4⁺ par FACS. Les conditions expérimentales de culture étaient identiques à l'expérience précédente. Sur 3 expériences indépendantes, il n'a pas été possible de reproduire les résultats obtenus précédemment sur les lymphocytes T CD4⁺ sélectionnés par billes magnétiques. A l'issue de cette expérience, nous avons émis l'hypothèse qu'un contaminant cellulaire (trié avec les T-CD4 avec les billes magnétiques) était responsable de cette signature IFN de type I.

Le meilleur candidat s'est révélé être la cellule dendritique plasmacytoïde (pDCs). En effet, les pDCs sont les cellules professionnelles de la production d'IFN de type I (Liu 2005). Les phénotypes des pDCs humaines sont : CD4^{Dim}, CD45RA⁺, IL-3R α (CD123)⁺, ILT3⁺, ILT1⁻, CD11c⁻, lineage⁻. Deux marqueurs additionnels sont spécifiques des pDCs issues du sang périphérique et de la moelle osseuse : BDCA2 (CD303)⁺ et BDCA4⁺ (Dzionek, Sohma et al. 2001). Le phénotype CD4^{dim} des pDCs permet de mettre en avant l'hypothèse que les pDCs peuvent être capturées avec la méthode de billes magnétiques lors de la sélection des lymphocytes T CD4⁺. Les lymphocytes T CD4⁺ (après un pré-enrichissement) étaient sélectionnés spécifiquement sur FACS trieur en réalisant un Line d'exclusion incorporant un CD303 afin d'éliminer les pDCs résiduelles.

Dans le but de comprendre une possible interaction entre les pDCs et les lymphocytes T CD4⁺, les lymphocytes T CD4⁺ étaient isolés par FACS trieur puis activés pendant 96H. A 48H, l'IL-12 était rajoutée ou non aux cultures. A la fin des cultures, le surnageant était

récolté. Dans un deuxième temps, nous avons procédé à une sélection des pDCs (pureté $CD303^+ > 99\%$). Les pDCs étaient mises en contact avec les surnageants des différentes conditions de culture sur la nuit. A l'issue de la culture, une analyse de l'expression de l'ARNm des gènes IFN de type I était réalisée sur les pDCs. De façon intéressante, seul le surnageant des lymphocytes T $CD4^+$ cultivés en présence d'IL-12 était capable d'induire de manière importante les gènes IFN de type I induits. Cette induction était dramatiquement inhibée sous l'action de l'anti-IFNAR1. Nous avons ensuite testé l'action de plusieurs cytokines afin de voir si elles avaient un effet identique sur la pDCs : IL-2 (20U et 100U/ml), IFN- γ , IL-12, CpG. Aucune de ces cytokines à part le CpG (contrôle positif de la production d'IFN de type I) n'étaient capables d'induire une signature IFN de type I sur les pDCs. Ce résultat suggère que :

les pDCs sont les bonnes candidates dans la production d'IFN de type I mais il faut un crosstalk entre les pDCs et les lymphocytes T $CD4^+$ activés en présence d'IL-12 pour induire cette signature IFN de type I.

il n'y a pas besoin d'un contact cellulaire pour induire une réponse IFN de type I entre les pDCs et les lymphocytes T $CD4^+$ puisque le surnageant seul des lymphocytes activés en présence d'IL-12 est capable d'induire une signature IFN de type I.

l'IL-12 n'est pas capable d'induire directement les gènes IFNs de type I sur les pDCs.

la (ou les) cytokine produite par les lymphocytes après activation par l'IL12 est capable d'activer les pDCs pour induire une signature IFN de type I n'est pas l'IFN- α (résultats préliminaires) et reste encore non identifiée.

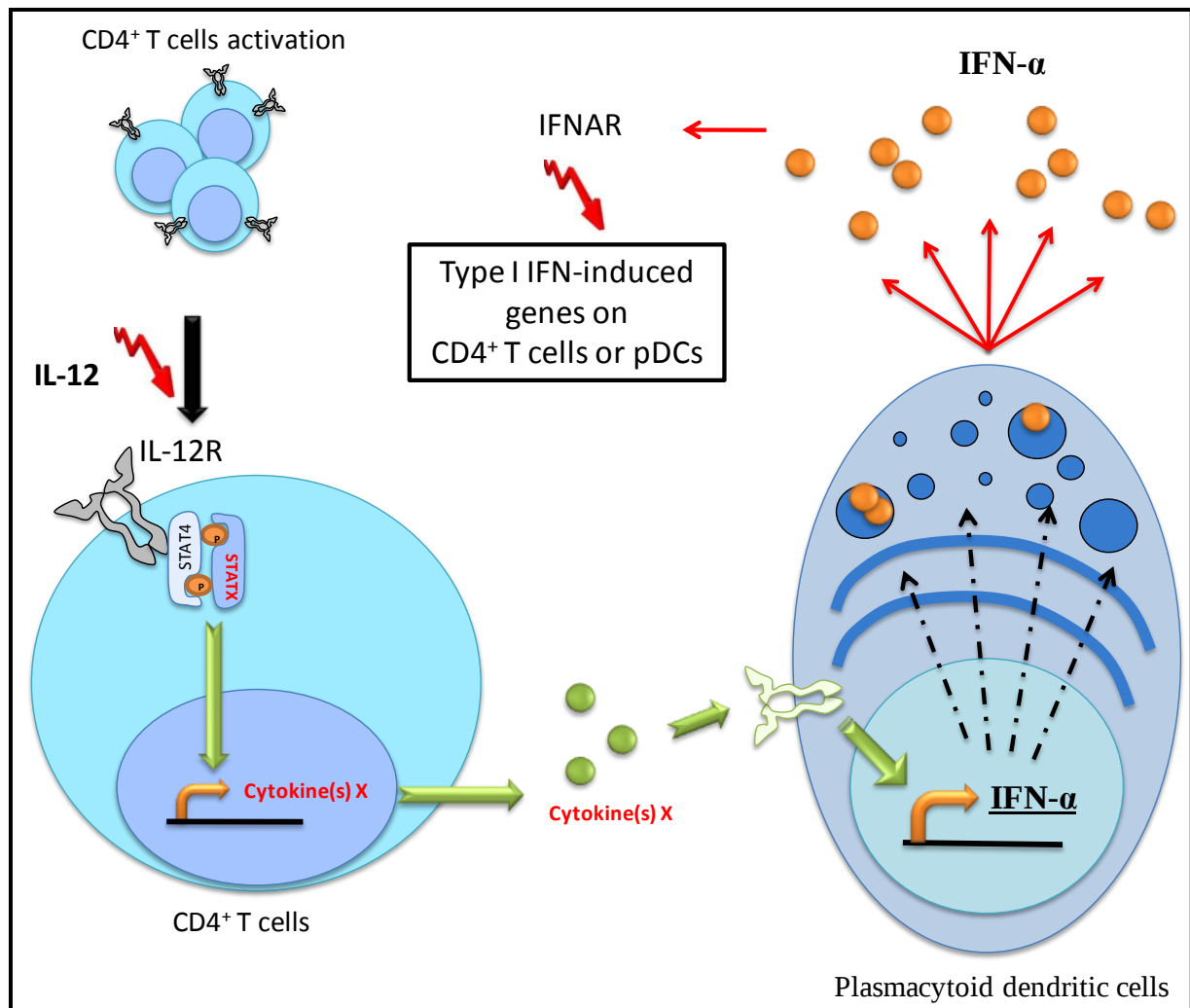


Figure 25 : Proposition de la signalisation de l'induction des gènes IFN de type I par l'IL-12 à travers un crosstalk entre la pDCs et le lymphocyte T CD4⁺.

Comment intégrer l'ensemble de ces résultats avec les données de la littérature sur l'induction d'IRF5 et les données physiopathogéniques connues du SSP ?

Au cours du SSP, l'organe cible de la maladie, la cellule épithéliale salivaire semble jouer un rôle actif dans le processus physiopathologique aboutissant à sa propre destruction. Récemment notre équipe a mis en évidence une signature IFN de type I au sein même de l'organe cible de la maladie. De plus, un infiltrat lymphocytaire et des cellules dendritiques plasmacytoïdes sont présents dans les glandes salivaires de patients SSP (CF Chapitre 3). Une

étude a par ailleurs montré la présence de cellules dendritiques myéloïdes dans les glandes salivaires (Manoussakis, Dimitriou et al. 1999).

Au vue des résultats obtenus pendant ces 3 années de thèse, nous pouvons faire une hypothèse qui relie à la fois les données génétiques et fonctionnelles. Nous trouvons une association entre un polymorphisme d'*IRF5* et le SSp. L'allèle à risque de ce polymorphisme est plus présent chez les patients SSp et est directement lié à une surexpression de l'ARNm d'*IRF5*.

Il a été rapporté par *Akinori Takaoka et al.* (Takaoka, Yanai et al. 2005) que l'ARNm d'*IRF5* est exprimé à de hauts niveaux dans les cellules spléniques de souris. Ils ont montré que la protéine d'*IRF5* se retrouve activée dans les macrophages et les cellules dendritiques à travers la stimulation TLR-9 par du CpG. Cette stimulation par TLR-9 était capable d'induire la production d'IL-12, de TNF- α et d'IL-6 dans les surnageants de culture. D'autre part, l'induction de ces cytokines était également inhibée quand les macrophages spléniques étaient stimulés par d'autre ligands de TLRs ; TLR-3 (poly (I:C)) ; TLR-4 (LPS), TLR-5 (Flagelline) et TLR-7(8) (poly(U)). Cette induction pourrait donc être ligand spécifique.

D'autres études vont dans le même sens en confirmant qu'*IRF5* peut jouer un rôle primordial dans différents types cellulaires, induisant la transcription de gènes de cytokines inflammatoires. En effet, l'équipe de *Krausgruber T et al.* (Krausgruber, Blazek et al.) a montré qu'*IRF5* était présent à de haut taux dans des macrophages M1 et qu'*IRF5*, au sein de ces M1, était surexprimé lors d'une stimulation par du GM-CSF. *IRF5* était rapporté être capable d'induire la production cytokinique d'IL-6, de TNF- α , et notamment d'IL-12 dans des macrophages M1 (Krausgruber, Blazek et al.).

Takaota et al. (Takaoka, Yanai et al. 2005) ont également montré que la translocation d'*IRF5* était dépendante de MyD88, et donc suggéré l'implication de kinases IRAK dans la

voie TLR9-MyD88 puisque celles-ci sont impliquées dans l'activation d'IRF7. Cette même équipe a montré par immunoprécipitation chromatiniennne (ChIP) que le gène de l'IL-12p40 possède un élément ISRE (interferon-stimulated response element) dans son promoteur et qu'IRF5 se lie spécifiquement à celui-ci. Ensemble, ces travaux suggèrent que la voie de signalisation de TLR-9 permet l'activation d'IRF5 via MyD88 lequel à son tour permet la transcription du gène de l'IL-12p40. De plus, *in vivo*, lorsque du CpG-B ODN ou du LPS sont injectés à des souris WT à une dose létale, celles-ci meurent en une dizaine d'heures avec une augmentation marquée d'IL-12 dans leur sérum. Cependant, les souris IRF5^{-/-} survivaient et la présence d'IL-12 était nettement inhibée dans le sérum (Takaoka, Yanai et al. 2005). Sur un terrain de prédisposition génétique favorisant une surexpression d'IRF5, une boucle d'amplification de l'IL12 pourrait exister et augmenter le crosstalk avec les pDC, augmentant à son tour la signature IFN de type I. Notre équipe a montré un différentiel d'expression du gène de SOCS3 dans le SSp en faveur d'une diminution de son expression dans l'organe cible de la maladie (glandes salivaires) (Gottenberg, Cagnard et al. 2006). SOCS3 est impliqué dans l'inhibition de la voie de l'IL-12 (Seki, Inoue et al. 2003). La sous-expression de ce gène ainsi que la surexpression d'IRF5 au cours du syndrome de Sjögren pourrait favoriser une plus forte activation de la voie de signalisation de l'IL-12.

De manière intéressante, une équipe a développé un modèle murin qui surexprime l'IL-12 notamment dans les poumons. Les souris IL-12 transgénique développaient des anomalies bronchiques et alvéolaires. Ces anomalies étaient similaires à celles trouvées dans les poumons de patients présentant un Sjögren (McGrath-Morrow, Laube et al. 2006). Ce travail renforce le rôle potentiel de l'IL-12 dans la pathogénèse du SSp.

D'autre part, il a également été mis en évidence un autre crosstalk : celui entre la pDCs et les cellules NK. Les auteurs ont montré que des cocultures de pDCs présensibilisés avec des complexes immunes à ARNm (IC-ARN) en présence de cellules NK soit CD56⁺ ou

soit $CD56^{dim}$ sont capables d'augmenter la production d'IFN de type I sur les pDCs/IC-ARN. De manière intéressante, les cellules NK $CD56^{bright}$ dans ces conditions n'étaient pas capables de reproduire l'effet observé dans les cellules NK $CD56^{+}$ et $CD56^{dim}$. Cette induction de la production d'IFN de type I sur les pDCs/IC-ARN en présence de cellules NK $CD56^{bright}$ est restaurée en présence d'IL-12 et d'IL-18 (Les auteurs confirment que l'IL-12/IL-18 ne peuvent pas induire directement de l'IFN de type I sur les pDCs).

Cet effet de crosstalk entre les cellules dendritiques plasmacytoïdes et NK pourrait jouer un rôle dans le Sjögren. Manoussakis et al. ont montré que dans les glandes épithéliales salivaires de patients Sjögren, un infiltrat de macrophages et de cellules dendritiques est présent et que ces cellules sont responsables de la présence d'IL-12 et IL-18 dans le tissu inflammatoire. (Manoussakis, Boiu et al. 2007). Néanmoins, la caractérisation des cellules NK dans l'organe cible du SSp est encore peu explorée. D'autre part, le crosstalk entre les cellules NK et pDCs nécessite que les pDCs soient pré-sensibilisées avec des IC-ARNm. Dans notre travail, nous montrons que le crosstalk entre les lymphocytes T $CD4^{+}$ et pDCs ne nécessite aucune stimulation préalable des pDCs.

L'IL-12 semble donc jouer un rôle important dans l'induction des gènes IFN de type I. Cette induction passe par un crosstalk entre les lymphocytes T $CD4^{+}$ et les pDCs. De manière intéressante, ce crosstalk ne demande pas de contact cellulaire suggérant donc que l'IL-12 agit directement sur lymphocytes T $CD4^{+}$, en leur permettant de produire des cytokines capables d'interagir sur la pDCs lui permettant ainsi d'initier la transcription de l'IFN- α/β . L'activation des pDCs par les lymphocytes T $CD4^{+}$ pourrait être aidée par le crosstalk des cellules NK sur la pDCs. Enfin, cette production d'IFN de type I pourrait être drastiquement surexprimée en raison de l'expression d'IRF5 qui a été retrouvée plus importante chez les patients ayant un SSp.

Conclusion

En combinant les facteurs de prédispositions génétiques d'IRF5 et de STAT4 (bien que le rôle fonctionnel de STAT4 ne soit pas encore bien compris) ainsi que l'activation de l'infiltrat lymphocytaire au sein de la glande salivaire, on peut suggérer que tous les éléments sont réunis dans l'organe cible pathologique pour permettre une boucle autocrine de la production d'IFN de type I, installer une inflammation chronique et engendrer la destruction des glandes salivaires résultant en une sécheresse de la bouche. Les monocytes ou mDCs pourraient être stimulés par des complexes immuns ou des particules virales, via une stimulation par le TLR9 et une activation d'IRF5, permettant à ces cellules de produire des quantités importantes d'IL-12. L'IL-12 pourrait ensuite agir sur l'infiltrat lymphocytaire T en lui faisant produire une ou plusieurs cytokines capables d'avoir une action sur la pDCs résultant en une sécrétion d'IFN de type I très rapidement sur le site de l'inflammation. Cet IFN de type I pourrait ainsi agir :

- sur la maturation des lymphocytes B environnant favorisant la surexpression de TLR7 et la production d'auto-anticorps
- sur l'induction de la mort cellulaire favorisant l'augmentation de la production de certains auto-antigènes à ARN/ADN et donc de CI/ARNm ou CI/ADN capables d'entretenir la boucle IFN de type I via TLR9.
- sur la maturation des monocytes en cellules dendritiques hautement actives dans la présentation de l'antigène (Blanco, Palucka et al. 2001).
- sur les pDCs leur permettant de répondre plus efficacement aux IC par une augmentation de l'expression du FcγRIIa

Nos résultats renforcent par ailleurs l'hypothèse du rôle des agents infectieux dans le déterminisme des MAI avec l'existence d'une signature IFN de type 1 comme témoin

potentiel de cette infection. Mais à ce jour, aucun virus n'a pu être incriminé de façon formelle.

Une hypothèse alternative ou complémentaire serait la formation de complexes immuns faisant suite au dommage des cellules épithéliales salivaires. Cet ensemble d'événements, en addition à un terrain génétique de prédisposition à l'auto-immunité, favoriserait une amplification la signature IFN de type I dans le syndrome de Sjögren.

L'étude de l'implication des macrophages, des cellules NK et des cellules dendritiques plasmacytoïdes au sein de l'organe cible de l'auto-immunité, les glandes salivaires épithéliales, constitue une suite logique à ce travail de thèse.

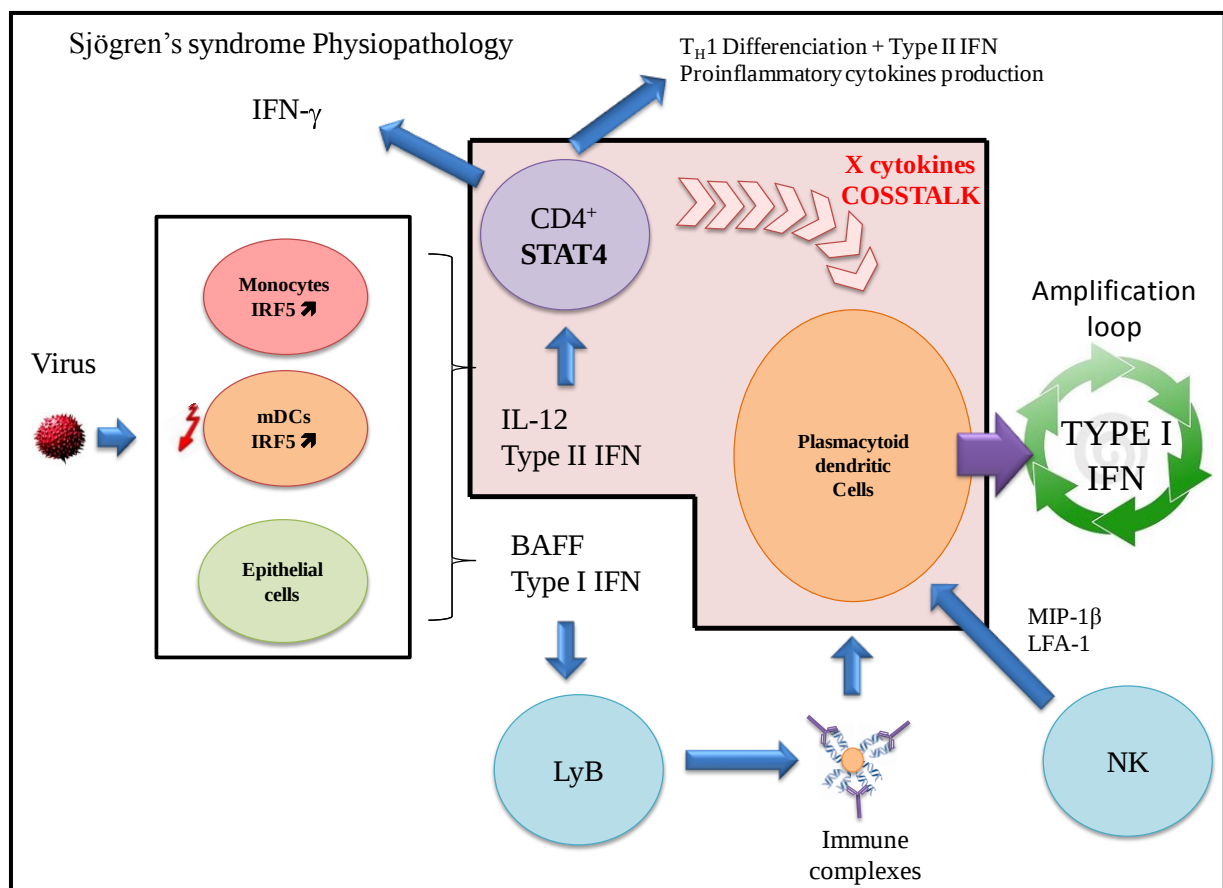


Figure 26. Proposition d'un schéma de la physiopathologie du syndrome de Sjögren.

ANNEXES

5. ANNEXES

Research article

Open Access

Effect of methotrexate and anti-TNF on Epstein-Barr virus T-cell response and viral load in patients with rheumatoid arthritis or spondylarthropathies

Corinne Miceli-Richard^{1,2*}, Nicolas Gestermann^{2*}, Corinne Amiel³, Jérémie Sellam^{1,2}, Marc Ittah², Stephan Pavy¹, Alejandra Urrutia², Isabelle Girauld², Guislaine Carcelain⁴, Alain Venet² and Xavier Mariette^{1,2}

¹Rhumatologie, Hôpital Bicêtre, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), 78 rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin Bicêtre, France

²Institut Pour la Santé et la Recherche Médicale (INSERM) U 802, Université Paris-Sud 11, 64 rue Gabriel Péri, 94275 Le Kremlin Bicêtre, France

³Virologie, Hôpital Tenon, AP-HP, 4 rue de la Chine, 75020 Paris, France

⁴INSERM U543, Hôpital La Pitié Salpêtrière, AP-HP, 47 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

* Contributed equally

Corresponding author: Xavier Mariette, xavier.mariette@bct.aphp.fr

Received: 24 Dec 2008 Revisions requested: 17 Feb 2009 Revisions received: 31 Mar 2009 Accepted: 26 May 2009 Published: 26 May 2009

Arthritis Research & Therapy 2009, **11**:R77 (doi:10.1186/ar2708)

This article is online at: <http://arthritis-research.com/content/11/3/R77>

© 2009 Miceli-Richard et al.; licensee BioMed Central Ltd.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Introduction There is a suspicion of increased risk of Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferations in patients with inflammatory arthritides receiving immunosuppressive drugs. We investigated the EBV load and EBV-specific T-cell response in patients treated with methotrexate (MTX) or anti-TNF therapy.

Methods Data for patients with rheumatoid arthritis (RA) ($n = 58$) or spondylarthropathy (SpA) ($n = 28$) were analyzed at baseline in comparison with controls ($n = 22$) and after 3 months of MTX or anti-TNF therapy for EBV load and EBV-specific IFN γ -producing T cells in response to EBV latent-cycle and lytic-cycle peptides.

Results The EBV load and the number of IFN γ -producing T-cells after peptide stimulation were not significantly different between groups at baseline ($P = 0.61$ and $P = 0.89$, respectively). The EBV load was not significantly modified by treatment, for RA

with MTX ($P = 0.74$) or anti-TNF therapy ($P = 0.94$) or for SpA with anti-TNF therapy ($P = 1.00$). The number of EBV-specific T cells was not significantly modified by treatment, for RA with MTX ($P = 0.58$) or anti-TNF drugs ($P = 0.19$) or for SpA with anti-TNF therapy ($P = 0.39$). For all patients, the EBV load and EBV-specific T cells were significantly correlated ($P = 0.017$; $R = 0.21$). For most patients, short-term exposure (3 months) to MTX or anti-TNF did not alter the EBV load or EBV-specific T-cell response but two patients had discordant evolution.

Conclusions These data are reassuring and suggest there is no short-term defect in EBV-immune surveillance in patients receiving MTX or anti-TNF drugs. However, in these patients, long term follow-up of EBV-specific T-cell response is necessary and the role of non-EBV-related mechanisms of lymphomagenesis is not excluded.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is associated with a twofold increase of non-Hodgkin's lymphoma [1] and a threefold increase of Hodgkin's lymphoma [2]. The effect of immunosuppressive drugs on the risk of lymphoma is debated. Most recent studies did not find an overall increased risk of non-

Hodgkin's lymphoma in RA patients treated with methotrexate (MTX). Several reports, however, showed that MTX can rarely induce Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferation regressive after withdrawal of the drug [3,4].

bp: base pairs; DMARD: disease-modifying anti-rheumatic drug; EBV: Epstein-Barr virus; FCS: fetal calf serum; HLA: human leukocyte antigen; IFN: interferon; MTX: methotrexate; PBMC: peripheral blood mononuclear cell; PCR: polymerase chain reaction; RA: rheumatoid arthritis; SpA: spondylarthropathy; SFC: spot-forming cell; TNF: tumor necrosis factor.

Recent concerns about possible treatment effects and lymphoma have focused on anti-TNF drugs because of their profound immunoregulatory effect. A recent meta-analysis of randomized controlled trials of infliximab and adalimumab identified 10 cases of lymphoma (four cases in the randomized phase of the trials and six cases in the extension phase) in the treated groups (3,493 patient-years) and none in the placebo groups (1,512 patient-years) [5]. Inflammatory activity of the underlying disease is the main risk factor of lymphoma in RA [6], however, and anti-TNF therapy is used for patients with the most active disease. Results for three large cohorts of RA patients did not reveal any increased risk of lymphoma in RA patients receiving anti-TNF drugs versus RA patients receiving classical disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs). In most of these cohorts, however, increased risk of lymphoma persisted as compared with that in the general population [7-9].

Cases of EBV-associated lymphoproliferation that regressed after withdrawal of MTX have been described [3,4]. Case reports of lymphoma associated or not with EBV, treated with anti-TNF drugs and regressing after withdrawal of therapy have also been reported [10,11]. These cases may mimic post-transplant lymphoproliferative disorder, a severe complication of EBV reactivation linked to impaired EBV control by CD8 T cells and arising in allograft recipients receiving immunosuppressive drugs [12].

Taken together, such data provide reliable arguments to investigate a potential EBV reactivation during MTX and/or TNF α antagonist therapy as a possible first step of lymphoma induction. During primary EBV infection, specific cytotoxic CD8⁺ T cells expand and recognize epitopes from lytic-cycle antigens and, to a lesser extent, from latent-cycle antigens. A small population of EBV-specific memory CD8⁺ T cells further persists [13] and plays a crucial role in the control of persistent EBV infection [14]. An impaired EBV-specific T-cell response could constitute one of the first steps of lymphoma induction with immunosuppressive drug therapy.

The present study aimed to determine the EBV viral load and the specific effector CD8⁺ T-cell response against EBV antigens in patients with RA and spondylarthropathy (SpA) receiving MTX or anti-TNF drugs, to shed some light on a possible impaired EBV-specific T-cell response as the triggering mechanism of lymphomagenesis in this population.

Materials and methods

Study population

All studied subjects were seropositive for EBV. The present study consisted of two parts. In the cross-sectional first part of the study we investigated EBV-specific IFN γ -producing T cells at baseline (week 0) in 87 patients: 32 MTX naïve RA patients (mean age 60 ± 16 years, mean duration of disease 4.5 ± 6.6 years), 27 patients with RA receiving MTX who were not

responders to the drug (mean age 53 ± 11 years, mean duration of disease 9.5 ± 10.5 years) and 28 patients with SpA (14 not receiving DMARDs and 14 receiving MTX; mean age 36 ± 11 years, mean duration of disease 9.6 ± 9.7 years). Patients with RA fulfilled the 1987 American College of Rheumatology criteria [15] and those with SpA fulfilled the European Spondylarthropathy Study Group criteria [16]. All RA patients were rheumatoid factor positive and/or anti-cyclic citrullinated peptide positive. The Disease Activity Score for 28 joints was 4.8 ± 1.2 in naïve RA patients and was 5.6 ± 1.2 in RA patients who were nonresponders to MTX. The Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index score [17] was 55 ± 22 in SpA patients. The control group comprised 22 patients with mechanic radiculopathic conditions (mean age 47 ± 15 years).

From the 87 patients included in the cross-sectional part of the study, 62 underwent the second longitudinal part of the study for EBV-specific IFN γ -producing T cells after 3 months (week 12) of MTX or anti-TNF treatment. Forty patients (21 SpA and 19 RA) received anti-TNF drugs. All RA patients and 10/21 SpA patients had anti-TNF + MTX. Twenty-two MTX naïve RA patients received MTX. EBV viral load data were also available for 67 patients and 15 control individuals at week 0, and for 52 patients at week 12.

The present study was performed with approval of the local ethics committee (CPP Ile de France 7), and informed consent was obtained from all study participants.

Isolation of peripheral blood mononuclear cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation using Ficoll-Hypaque 1.107 (Biochrom, Berlin, Germany). The PBMCs were then frozen in FCS containing 10% dimethyl sulfoxide (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) and stored in liquid nitrogen until use.

Epstein-Barr virus peptides

A set of 39 9-mer latent-cycle peptides was used, corresponding to known human leukocyte antigen (HLA) class I-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes. Considering that the HLA status of our study patients and control individuals was unknown, these peptides were chosen as being recognized by a broad range of class I molecules [18]. The latent-cycle peptides used were immunodominant sequences from EBNA1, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C and LMP2 already tested in four different laboratories [18]. Lytic-cycle EBV antigens were represented by a BMLF 9-mer peptide and a collection of 47 overlapping 15-mer lytic-cycle peptides spanning the entire sequence of BZLF1 protein. The BMLF 9-mer is a peptide from the replicative phase of EBV previously reported to be an immunodominant HLA-A2-restricted epitope [19,20] (Table 1). Lyophilized peptides were dissolved in sterile water supplemented with 10% dimethyl sulfoxide at 40 μ g/ml and were stored at -20°C . For peptide pulsing, target cells were incu-

Table 1**Human leukocyte antigen class I-restricted cytotoxic T-lymphocyte Epstein-Barr virus epitopes**

Human leukocyte antigen	Protein	Epitope position	Epitope sequence
A2	EBNA3A	596 to 604	SVRDRLARL
A2.01	EBNA3C	284 to 293	LLDFVRFMGV
A2.01	LMP2	329 to 337	LLWTLVLL
A2.01	LMP2	426 to 434	CLGGLLTMV
A2.01	BMLF1	280 to 288	GLCTLVAML
A2.06	LMP2	453 to 461	LTAGFLIFL
A3	EBNA3A	603 to 611	RLRAEAQVK
A11	EBNA3B	399 to 408	AVFDRKSDAK
A11	EBNA3B	416 to 424	IVTDSVIK
A11	LMP2	340 to 350	SSCSSCPLSKI
A23	LMP2	131 to 139	PYLFWLAAI
A24	EBNA3A	246 to 253	LYSIFFDY
A24	LMP2	419 to 427	TYGPVFMCL
A24.02	EBNA3B	217 to 225	TYSAGIVKI
A25	LMP2	442 to 451	VMSNTLLSAW
A29	EBNA3A	491 to 499	VFSDGRVAC
A30.02	EBNA3A	176 to 184	AYSSWMYSY
B7	EBNA3A	502 to 510	GPAPAGPIV
B7	EBNA3A	379 to 387	RPIFIRRL
B7	EBNA3C	881 to 889	QPRAPIRPI
B8	EBNA3A	158 to 166	OAKWRLQTL
B8	EBNA3A	325 to 333	FLRGRAYGL
B8	BZLF1	190 to 197	RAKFKQLL
B27.02	EBNA3B	244 to 254	RRARLSAERY
B27.02/.04/.05	EBNA3C	258 to 266	RRIYDLIEL
B27.04	LMP2	236 to 244	RRRWRLTV
B27.05	EBNA3B	149 to 157	HRCQAIRKK
B27.05	EBNA3C	249 to 258	LRGKWQRRYR
B27.05	EBNA3C	343 to 351	FRKAQIQGL
B35	EBNA3A	458 to 466	YPLHEQHGM
B35	EBNA3B	488 to 496	AVLLHEESM
B35	BZLF1		EPLPQGQLTAY
B35.01	EBNA1	407 to 417	HPVGEADYFEY
B39	EBNA3C	271 to 278	HHIWQNLL
B44	EBNA3B	567 to 666	VEITPYKPTW
B44.02	EBNA3C	281 to 290	EENLLDFVRF
B44.02	EBNA3C	335 to 343	KEHVQNAF
B44.03	EBNA3C	163 to 171	EGGVGWRHW
B60	LMP2	200 to 208	IEDPPFNSL
B62	EBNA3A	406 to 414	LEKARGSTY
B62	EBNA3B	831 to 839	GQGGSP TAM
B62	EBNA3C	213 to 222	QNGALAINTF

bated with peptides (final concentration 2 µg/ml). Individual responses to latent-cycle peptides and lytic-cycle peptides were summed and analyzed as a whole, and were also analyzed separately.

ELISPOT assay

The ELISPOT-IFN γ assay was used to determine the frequency of T cells that produced IFN γ in response to a brief exposure to EBV antigens, as previously published [21]. Briefly, nitrocellulose ELISPOT plates (Millipore, Guyancourt, France) were coated with anti-IFN γ antibody (1 µg/ml, 100 µl/well in PBS; 1-D1K; Mabtech, Sophia Antipolis, France). PBMCs were added in duplicate wells at 10^5 cells per well with 2 µg/ml peptide. The second biotinylated anti-IFN γ monoclonal antibody was then added (7-B6-biotin; Mabtech) and IFN γ secreting cells were revealed with an enzymatic reaction with streptavidin-conjugated alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

The number of specific T-cell responders per 10^6 PBMCs was calculated after subtraction of the background, which corresponded to the mean value of IFN γ spots associated with non-stimulated PBMCs (PBMCs in the presence of medium alone). Results were expressed as spot-forming cells (SFCs) per 10^6 PBMCs and were calculated for each pool of peptides as follows:

$$\text{SFCs}/10^6 \text{ PBMCs} = 10 \times (\text{mean SFCs}/10^5 \text{ cells from two antigen-stimulated wells} - \text{mean SFC}/10^5 \text{ cells from four unstimulated wells}).$$

Results were presented as the individual response to the set of latent-cycle peptides (9-mer peptides), to the set of lytic-cycle peptides (BMLF 9-mer peptide added with the 15-mer lytic-cycle peptides) or to both sets.

Wells were counted as positive if they contained at least 50 SFCs/ 10^6 PBMCs and exhibited at least twofold the mean value of the background (per million PBMC). The median number of IFN γ -producing PBMCs in the presence of medium alone (background) was zero spots/well (range 0 to 4).

Epstein-Barr virus load in peripheral blood mononuclear cells

The level of EBV DNA copies in PBMCs was measured by Taqman real-time quantitative PCR as previously described [22]. For each quantification, 500,000 to 10^6 PBMCs were thawed and DNA extractions were further performed. The PCR primers were selected to amplify a 121 bp product in the thymidine kinase gene. A pcDNA 3.1 vector (Invitrogen, Groningen, the Netherlands) containing one copy of the EBV target region was used as standard for EBV quantification. The level of albumin DNA copies in PBMC samples estimated by real-time PCR was used as the endogenous reference to normalize the variations in PBMC number or DNA extraction. All standard dilutions, control samples and PBMC samples were run in parallel and in duplicate for EBV and albumin DNA quantifica-

tions. The normalized value of the cell-associated EBV DNA load corresponding to the ratio EBV average copy number/albumin average copy number $\times 2.10^6$ was finally expressed as the number of EBV DNA copies per 10^6 PBMC.

Statistical analysis

Results are given as the percentage of patients with positive EBV T-cell response, as well as the mean response $\pm$ standard deviation. Statistical analyses involved use of StatView 5.0 (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). Nonparametric tests were used. Comparisons between groups involved the Kruskal-Wallis test. Cross-sectional comparison of EBV T spots or the EBV copy number distribution involved the Mann-Whitney rank-sum test. Longitudinal comparison of EBV T spots or the EBV copy number between week 0 and week 12 involved the Wilcoxon test. Correlation studies involved Spearman's correlation. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

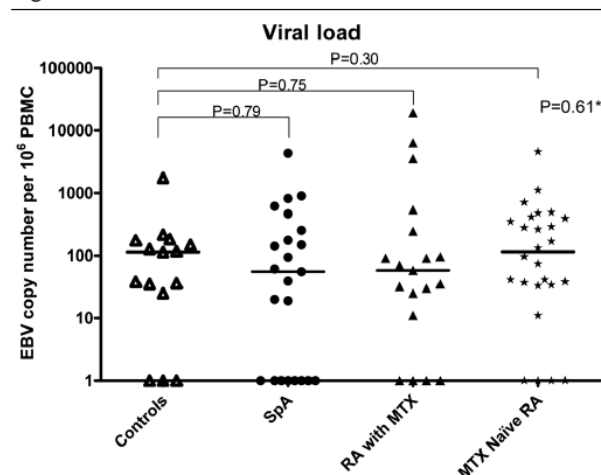
Results

Cross-sectional study

Epstein-Barr virus load in peripheral blood mononuclear cells

The proportion of patients with positive EBV viral load did not differ among groups (control individuals, 80%; SpA patients, 65%; RA patients with MTX, 79%; and RA patients without DMARD treatment, 85% ($P = 0.42$, chi-square test)), nor did they differ when considering the distribution of all viral loads in the four groups of patients ($P = 0.61$, Kruskal-Wallis test) (Fig-

Figure 1



Epstein-Barr virus load in peripheral blood mononuclear cells in the cross-sectional study. Epstein-Barr virus (EBV) load distribution in control individuals ($n = 15$), spondylarthropathy (SpA) patients ($n = 23$), rheumatoid arthritis (RA) patients receiving methotrexate (MTX) ($n = 18$) and RA patients not receiving disease-modifying anti-rheumatic drug therapy ($n = 26$). Mean values of EBV viral load are represented by a black line. *Kruskal-Wallis test. PBMC, peripheral blood mononuclear cell.

ure 1). Likewise, control individuals did not differ from any other group in viral load (Mann-Whitney test). The mean ($\pm$ standard deviation) viral loads in each group were as follows: control individuals, 197 ± 433 copies/ 10^6 cells; SpA patients, 353 ± 905 copies/ 10^6 cells; RA patients with MTX, $1,596 \pm 4,533$ copies/ 10^6 cells; and MTX naïve RA patients, 387 ± 893 copies/ 10^6 cells. The median viral loads were 113 for control individuals, 55 for SpA patients, 58 RA patients with MTX, and 114 for MTX naïve RA patients.

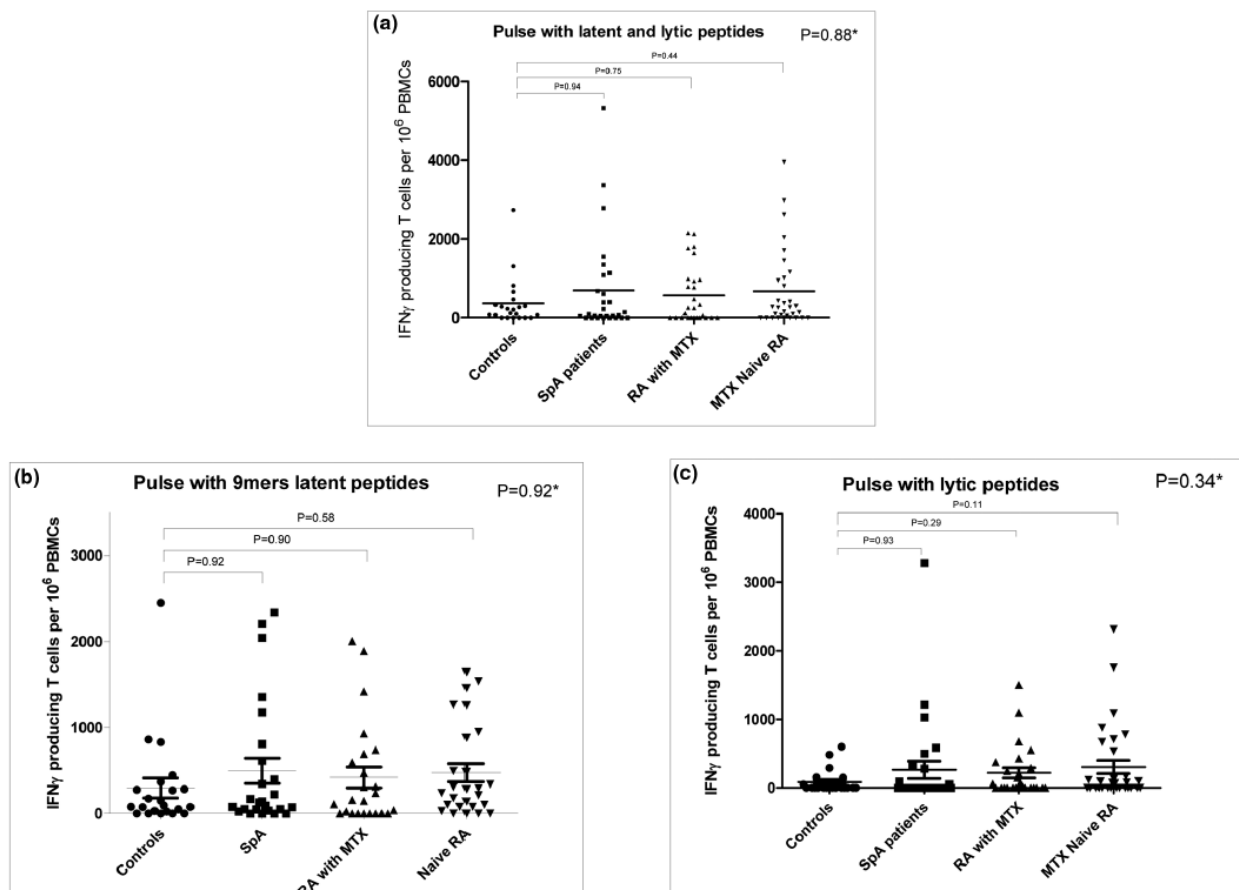
We found no significant correlation between the EBV viral load and disease activity (Disease Activity Score for 28 joints for RA patients, $P = 0.54$; Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index for SpA patients, $P = 0.84$) or disease duration ($P = 0.29$).

Epstein-Barr virus-specific $IFN\gamma$ -producing T cells

The proportion of patients with positive EBV-specific $IFN\gamma$ -producing T cells did not differ among groups (control individuals, 73%; SpA patients, 71%; RA patients with MTX, 59%; and RA patients without DMARD treatment, 72% ($P = 0.68$, chi-square test)) (Figure 2a). No significant differences were observed between groups when considering T-cell responses to the whole set of peptides ($P = 0.86$) or restricted to latent peptides ($P = 0.92$) or lytic peptides ($P = 0.34$) (Kruskal-Wallis test) (Figure 2b, c). The control group did not differ from each other treatment group either when considering pulses with the whole set of peptides, or when considering pulses with latent or lytic peptides (Mann-Whitney test) (Figure 2a to 2c).

We found no significant correlation between the number of EBV-specific $IFN\gamma$ -producing T cells and disease activity (Dis-

Figure 2



Epstein-Barr virus-specific $IFN\gamma$ -producing T cells. Number of $IFN\gamma$ -producing T cells per 10^6 peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). (a) After pulsing with the full set of Epstein-Barr virus peptides. (b) After pulsing with latent-cycle peptides. (c) After pulsing with lytic-cycle peptides. Mean $IFN\gamma$ -producing T cells per 10^6 PBMCs are represented by a black line. *Kruskal-Wallis test. MTX, methotrexate; RA, rheumatoid arthritis; SpA, spondylarthropathy.

ease Activity Score for 28 joints for RA patients ($n = 64$), $P = 0.32$; Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index for SpA patients ($n = 21$), $P = 0.47$ or disease duration ($n = 88$, $P = 0.40$).

Longitudinal study

Epstein-Barr virus load in peripheral blood mononuclear cells

When pooling all treatment groups, longitudinal observation of the EBV viral load showed no significant change between baseline (week 0) and week 12 ($P = 0.33$) (Wilcoxon test) (Figure 3a). Similar results were obtained when analyzing each treatment group longitudinally: SpA patients receiving anti-TNF drugs ($P = 1.00$), RA patients receiving anti-TNF drugs ($P = 0.94$) and RA patients receiving MTX ($P = 0.74$). Patients receiving anti-TNF drugs showed no difference in EBV viral load according to the class of TNF used: monoclonal antibody (infliximab and adalimumab) ($n = 9$, $P = 0.31$) or soluble receptor (etanercept) ($n = 18$, $P = 0.63$).

Epstein-Barr virus-specific IFN γ -producing T cells

In response to the full set of peptides, the number of IFN γ -producing cells was not significantly modified by immunosuppressive treatment (SpA patients receiving anti-TNF drugs ($n = 21$), $P = 0.39$; RA patients receiving anti-TNF drugs ($n = 19$), $P = 0.19$; RA patients receiving MTX ($n = 22$), $P = 0.58$) (Figure 3b), nor was the number of EBV-specific IFN γ -producing T cells modified when considering each set of peptides (latent-cycle peptides or lytic-cycle peptides) (data not shown). Among patients treated with TNF blockers, there was no difference according to the class of molecule used: monoclonal antibody (infliximab and adalimumab) ($n = 16$, $P = 0.74$) or soluble receptor (etanercept) ($n = 24$, $P = 0.92$).

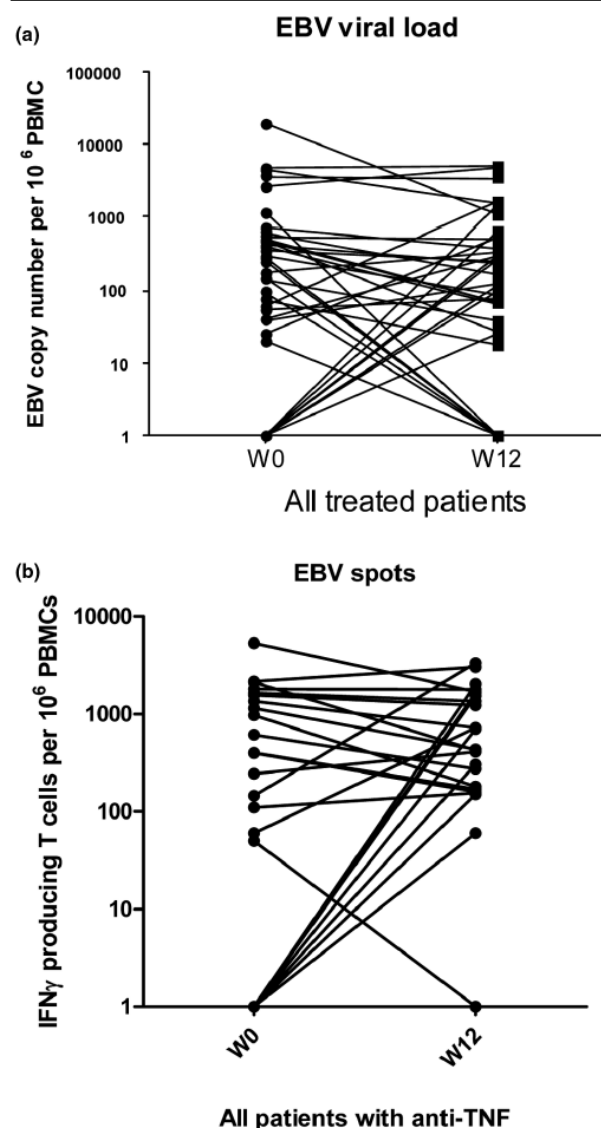
Correlation between Epstein-Barr virus load and T spots

For correlation studies between the EBV viral load and EBV-specific T-cell response, 113 patients were studied (66 at week 0 and 47 at week 12). We found a positive correlation between the EBV viral load and the number of EBV-specific IFN γ -producing T cells in response to the full set of peptides ($n = 113$, $P = 0.017$, $R = 0.21$) (Figure 4), to latent-cycle peptides ($P = 0.035$, $R = 0.16$) and to lytic-cycle peptides ($P = 0.011$, $R = 0.16$) (data not shown).

Unadapted Epstein-Barr virus-specific T-cell IFN γ production under treatment

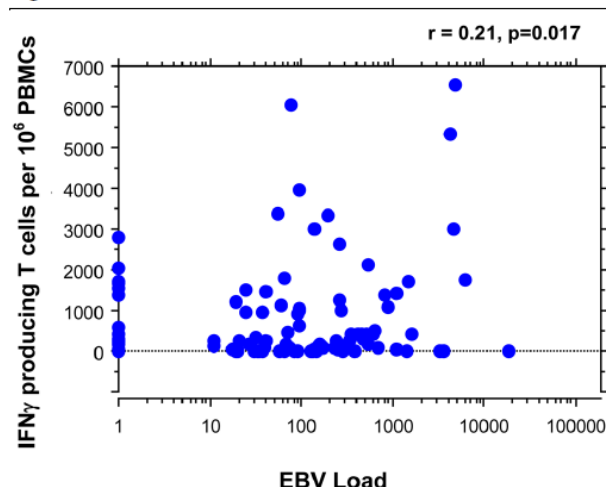
Five patients demonstrated inappropriate EBV-specific T-cell IFN γ production (<100 IFN γ secreted T cells and $>1,000$ EBV copies per 10^6 PBMCs). Three of these patients had no or very low IFN γ secreted T cells at week 0 and week 12. Two other patients had an accurate *in vitro* effector function at week 0 but a large decrease of EBV-specific IFN γ secreted T cell number at week 12 despite a concomitant increased level of EBV copy numbers above 1,000 copies per 10^6 PBMCs (Figure 5a, b). These two patients were treated with anti-TNF

Figure 3



Epstein-Barr virus load in peripheral blood mononuclear cells in the longitudinal study. (a) Epstein-Barr virus (EBV) load between week 0 (W0) and week 12 (W12) for all treated patients ($n = 42$). (b) EBV-specific IFN γ -producing T cells per 10^6 peripheral blood mononuclear cells between W0 and W12 for all patients receiving anti-TNF drugs ($n = 40$). PBMCs, peripheral blood mononuclear cells.

monoclonal antibody associated with MTX: one SpA patient with infliximab, and one RA patient with adalimumab. For both patients, an EBV-specific T-cell response to latent peptides was detectable at baseline but was not detectable at week 12. Nevertheless, the response to lytic peptides was persistent in both cases at week 12.

Figure 4

Correlation between the Epstein-Barr virus viral load and Epstein-Barr virus-specific T-cell response. Correlation between the number of IFN γ -producing T cells and the Epstein-Barr virus (EBV) viral load. EBV-specific IFN γ -producing T cells were pulsed with the full set of peptides (latent-cycle peptides and lytic-cycle peptides). PBMCs, peripheral blood mononuclear cells.

Discussion

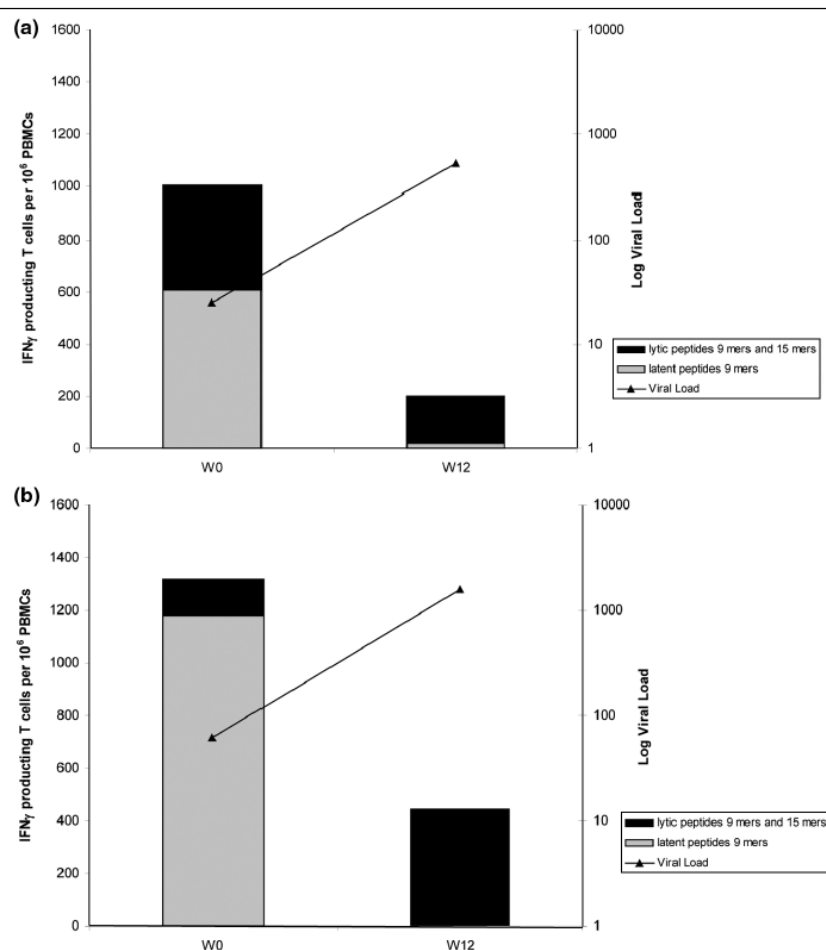
The present large cross-sectional and longitudinal study showed no abnormality in EBV viral load or EBV-specific T-cell response in patients with RA or SpA at baseline or after treatment with MTX or anti-TNF drugs.

In contrast to other studies [23,24], we did not find increased EBV viral load in PBMCs of patients with RA or SpA. A casual high EBV DNA prevalence in our control group (80%) could account for the differing results, and/or the highly sensitive PCR used in our study might explain such differences. Our cross-sectional study revealed no significant differences between patients and control individuals in the proportion of subjects with positive EBV-specific IFN γ -producing T cells in PBMCs, the mean number of SFCs or the SFC distribution. Two studies have assessed the EBV-specific T-cell response in PBMCs of RA patients [25,26]. The first study found no difference between 49 RA patients and 26 control individuals in the frequency of T cells directed against two immunodominant EBV peptides, but did observe a reduced ability to produce IFN γ in RA patients; the effect of immunosuppressive treatment was not assessed [25]. In the second study, EBV-specific effector CD8 T cells were higher in number in RA patients ($n = 25$) than in control individuals ($n = 20$), but this study concerned a low number of patients and was only cross-sectional [26]. Actually, this increase in IFN γ secreted T cells was related to increased viral load, which we did not observe in our study.

Our longitudinal results did not reveal any influence of immunosuppressive treatment on the EBV viral load. These results

are in accordance with several studies on Crohn disease or RA patients assessing the evolution of EBV viral load under immunosuppressive treatment [27-29]. To the best of our knowledge, no published study has specifically evaluated the longitudinal effect of MTX and anti-TNF drug on EBV-specific T-cell effector functions in patients with RA or SpA. At 3-month follow-up, neither MTX treatment in RA patients nor anti-TNF therapy in RA and/or SpA patients modified these effector functions, regardless of the EBV peptide used for pulsing – latent-cycle peptides or lytic-cycle peptides or the full set of peptides. The lack of increase in the EBV viral load during the same period in all groups of patients agrees with the preserved specific T-cell effector function, which was confirmed by a global correlation between EBV viral load and EBV-specific T-cell response.

Interestingly, in five patients treated with anti-TNF, an inadequate *in vitro* EBV-specific IFN γ production was observed after specific pulse with EBV peptides despite an *in vivo* high viral load. Among those patients, two different profiles were observed. The first profile corresponded to patients without any IFN γ production in spite of high EBV viral loads ($>1,000/10^6$ PBMCs), both at week 0 and week 12. In such cases, the lack of adequate HLA for presenting one of the EBV peptides probably accounted for the absence of IFN γ production after specific pulse. The second profile corresponded to two patients having EBV-specific T-cell IFN γ production at baseline but a discordant evolution between an IFN γ secreted T-cell decrease and an EBV viral load increase after 12 weeks of treatment. In these two patients, immunosuppressive therapy might have impaired EBV-specific T-cell effector functions leading to the lack of control of the EBV viral load. These two patients having been treated with the association of anti-TNF antibody and MTX makes it impossible to differentiate a possible effect of one drug individually. Nevertheless, we never saw profound discrepancies, such as those observed in a pediatric sample in whom post-transplant lymphoproliferative disorder developed after liver transplantation [30]. Since we analyzed data only 12 weeks after the introduction of immunosuppressive treatment, however, we cannot exclude that MTX or anti-TNF therapy could induce impaired EBV control after longer-term treatment. This relative short time duration of immunosuppressive treatment exposure might be considered as a limitation of our study. Nevertheless, post-transplant lymphoproliferative diseases occurring in children, for example, have been reported to occur after a short-term exposure to immunosuppressive treatments (median delay of 12 weeks, range 6 to 56 weeks) [30]. Moreover, with the same methodology (ELISPOT assay), we detected a significant decrease of the specific anti-tuberculosis T-cell response in patients after 12 weeks of anti-TNF therapy [31]. Lastly, in the present study, patients treated with MTX were treated for several years on average, and their results were no different from the MTX naïve patients at baseline.

Figure 5


Unadapted Epstein-Barr virus-specific T-cell IFN γ production under treatment. Patients with inappropriate Epstein-Barr virus (EBV)-specific T-cell IFN γ production in response to high EBV viral load under treatment. **(a)** Spondylarthropathy patient with infliximab + methotrexate. **(b)** Rheumatoid arthritis patient with adalimumab + methotrexate. Both responses to latent peptides and lytic peptides are represented. PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; W0, week 0; W12, week 12.

Conclusions

In patients with RA or SpA, short-term (3-month) exposure to MTX or anti-TNF therapy does not alter the EBV viral load or the EBV-specific T-cell response. These findings are rather reassuring in light of a suggested increased risk of EBV-associated lymphoma in patients receiving immunosuppressive therapy. Long-term follow-up of the EBV-specific T-cell response, however, is necessary. Moreover, control of EBV is only one mechanism of control of lymphomagenesis and the different epidemiologic studies currently available do not eliminate the possibility of increased risk of non-EBV-associated lymphoma in patients receiving immunosuppressive therapy.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

XM was responsible for the study design, manuscript preparation and interpretation of the data. CM-R was responsible for sample blood collection, manuscript preparation, interpretation of data and statistical analyses. NG performed the ELISPOT assays and statistical analyses. CA performed the EBV quantitative PCR. JS, MI and SP contributed to the blood sample collection. AU and IG contributed to the ELISPOT assay analyses. GC and AV contributed to interpretation of the data.

Acknowledgements

The set of EBV peptides was kindly provided by Prof. D Olive (INSERM Action-Thématique-Concertée). The authors thank Dr Martine Sinet and Prof. Martine Raphael for helpful discussions. The present work was supported by Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Département de la Recherche Clinique, Paris, France (Contrat d'Initiation à la Recherche Clinique) and by Société Française de Rhumatologie.

References

- Smedby KE, Hjalgrim H, Askling J, Chang ET, Gregersen H, Porwit-MacDonald A, Sundstrom C, Akerman M, Melbye M, Glimelius B, Adami HO: Autoimmune and chronic inflammatory disorders and risk of non-Hodgkin lymphoma by subtype. *J Natl Cancer Inst* 2006, **98**:51-60.
- Landgren O, Engels EA, Pfeiffer RM, Gridley G, Mellemkjaer L, Olsen JH, Kerstann KF, Wheeler W, Hemminki K, Linet MS, Goldin LR: Autoimmunity and susceptibility to Hodgkin lymphoma: a population-based case-control study in Scandinavia. *J Natl Cancer Inst* 2006, **98**:1321-1330.
- Kamel OW, Rijn M van de, Weiss LM, Del Zoppo GJ, Hench PK, Robbins BA, Montgomery PG, Warnke RA, Dorfman RF: Brief report: reversible lymphomas associated with Epstein-Barr virus occurring during methotrexate therapy for rheumatoid arthritis and dermatomyositis. *N Engl J Med* 1993, **328**:1317-1321.
- Salloum E, Cooper DL, Howe G, Lacy J, Tallini G, Crouch J, Schultz M, Murren J: Spontaneous regression of lymphoproliferative disorders in patients treated with methotrexate for rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases. *J Clin Oncol* 1996, **14**:1943-1949.
- Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V: Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA* 2006, **295**:2275-2285.
- Baecklund E, Iliadou A, Askling J, Ekblom A, Backlin C, Granath F, Catrina AI, Rosenquist R, Feltelius N, Sundstrom C, Klareskog L: Association of chronic inflammation, not its treatment, with increased lymphoma risk in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006, **54**:692-701.
- Wolfe F, Michaud K: Lymphoma in rheumatoid arthritis: the effect of methotrexate and anti-tumor necrosis factor therapy in 18,572 patients. *Arthritis Rheum* 2004, **50**:1740-1751.
- Geborek P, Bladstrom A, Turesson C, Gulfe A, Petersson IF, Saxne T, Olsson H, Jacobsson LT: Tumour necrosis factor blockers do not increase overall tumour risk in patients with rheumatoid arthritis, but may be associated with an increased risk of lymphomas. *Ann Rheum Dis* 2005, **64**:699-703.
- Schiff MH, Burmester GR, Kent JD, Pangan AL, Kupper H, Fitzpatrick SB, Donovan C: Safety analyses of adalimumab (HUMIRA) in global clinical trials and US postmarketing surveillance of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006, **65**:889-894.
- Park SH, Kim CG, Kim JY, Choe JY: Spontaneous regression of EBV-associated diffuse lymphoproliferative disease in a patient with rheumatoid arthritis after discontinuation of etanercept treatment. *Rheumatol Int* 2008, **28**:475-477.
- Thonhofer R, Gaugg M, Kriessmayr M, Neumann HJ, Erlacher L: Spontaneous remission of marginal zone B cell lymphoma in a patient with seropositive rheumatoid arthritis after discontinuation of infliximab-methotrexate treatment. *Ann Rheum Dis* 2005, **64**:1098-1099.
- Boubenider S, Hiesse C, Goupy C, Kriaa F, Marchand S, Charpentier B: Incidence and consequences of post-transplantation lymphoproliferative disorders. *J Nephrol* 1997, **10**:136-145.
- Hislop AD, Annels NE, Gudgeon NH, Leese AM, Rickinson AB: Epitope-specific evolution of human CD8(+) T cell responses from primary to persistent phases of Epstein-Barr virus infection. *J Exp Med* 2002, **195**:893-905.
- Dunne PJ, Faint JM, Gudgeon NH, Fletcher JM, Plunkett FJ, Soares MV, Hislop AD, Annels NE, Rickinson AB, Salmon M, Akbar AN: Epstein-Barr virus-specific CD8(+) T cells that re-express CD45RA are apoptosis-resistant memory cells that retain replicative potential. *Blood* 2002, **100**:933-940.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, Medsger TA, Mitchell DM, Neustadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL, Hunder GG: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988, **31**:315-324.
- Dougados M, Linden S van der, Juhlin R, Huitfeldt B, Amor B, Calin A, Cats A, Dijkmans B, Olivieri I, Pasero G, Veys E, Zeidler H: The European Spondylarthropathy Study Group preliminary criteria for the classification of spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 1991, **34**:1218-1227.
- Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A: A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol* 1994, **21**:2286-2291.
- Samri A, Durier C, Urrutia A, Sanchez I, Gahery-Segard H, Imbart S, Sinet M, Tartour E, Aboulker JP, Autran B, Venet A: Evaluation of the interlaboratory concordance in quantification of human immunodeficiency virus-specific T cells with a gamma interferon enzyme-linked immunospot assay. *Clin Vaccine Immunol* 2006, **13**:684-697.
- Yang J, Lemas VM, Flinn IW, Krone C, Ambinder RF: Application of the ELISPOT assay to the characterization of CD8(+) responses to Epstein-Barr virus antigens. *Blood* 2000, **95**:241-248.
- Steven NM, Annels NE, Kumar A, Leese AM, Kurilla MG, Rickinson AB: Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell response. *J Exp Med* 1997, **185**:1605-1617.
- Doisne JM, Urrutia A, Lacabaret-Poret C, Goujard C, Meyer L, Chaix ML, Sinet M, Venet A: CD8+ T cells specific for EBV, cytomegalovirus, and influenza virus are activated during primary HIV infection. *J Immunol* 2004, **173**:2410-2418.
- Besson C, Amiel C, Le-Pendevan C, Brice P, Ferme C, Carde P, Hermine O, Raphael M, Abel L, Nicolas JC: Positive correlation between Epstein-Barr virus viral load and anti-viral capsid immunoglobulin G titers determined for Hodgkin's lymphoma patients and their relatives. *J Clin Microbiol* 2006, **44**:47-50.
- Balandraud N, Meynard JB, Auger I, Sovran H, Mugnier B, Reviron D, Roudier J, Roudier C: Epstein-Barr virus load in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis: accurate quantification using real-time polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum* 2003, **48**:1223-1228.
- Alvarez-Lafuente R, Fernandez-Gutierrez B, de Miguel S, Jover JA, Rollin R, Loza E, Clemente D, Lamas JR: Potential relationship between herpes viruses and rheumatoid arthritis: analysis with quantitative real time polymerase chain reaction. *Ann Rheum Dis* 2005, **64**:1357-1359.
- Klatt T, Ouyang Q, Flad T, Koetter I, Buhning HJ, Kalbacher H, Pawelec G, Muller CA: Expansion of peripheral CD8+ CD28-T cells in response to Epstein-Barr virus in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2005, **32**:239-251.
- Lunemann JD, Frey O, Eidner T, Baier M, Roberts S, Sashihara J, Volkmer R, Cohen JL, Hein G, Kamradt T, Munz C: Increased frequency of EBV-specific effector memory CD8+ T cells correlates with higher viral load in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2008, **181**:991-1000.
- Reijasse D, Le Pendevan C, Cosnes J, Dehee A, Gendre JP, Nicolas JC, Beaugerie L: Epstein-Barr virus viral load in Crohn's disease: effect of immunosuppressive therapy. *Inflamm Bowel Dis* 2004, **10**:85-90.
- Torre-Cisneros J, Del Castillo M, Caston JJ, Castro MC, Perez V, Collantes E: Infliximab does not activate replication of lymphotropic herpesviruses in patients with refractory rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2005, **44**:1132-1135.
- Balandraud N, Guis S, Meynard JB, Auger I, Roudier J, Roudier C: Long-term treatment with methotrexate or tumor necrosis factor alpha inhibitors does not increase Epstein-Barr virus load in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007, **57**:762-767.
- Smets F, Latinne D, Bazin H, Reding R, Otte JB, Buts JP, Sokal EM: Ratio between Epstein-Barr viral load and anti-Epstein-Barr virus specific T-cell response as a predictive marker of posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation* 2002, **73**:1603-1610.
- Hamdi H, Mariette X, Godot V, Weldingh K, Hamid AM, Prejean MV, Baron G, Lemann M, Puechal X, Breban M, Berenbaum F, Delchier JC, Flipo RM, Dautzenberg B, Salmon D, Humbert M, Emilie D: Inhibition of anti-tuberculosis T-lymphocyte function with tumour necrosis factor antagonists. *Arthritis Res Ther* 2006, **8**:R114.

BIBLIOGRAPHIE

6. BIBLIOGRAPHIE

- Abelson, A. K., A. M. Delgado-Vega, et al. (2009). "STAT4 associates with systemic lupus erythematosus through two independent effects that correlate with gene expression and act additively with IRF5 to increase risk." *Ann Rheum Dis* **68**(11): 1746-53.
- Afanasyeva, M., Y. Wang, et al. (2001). "Interleukin-12 receptor/STAT4 signaling is required for the development of autoimmune myocarditis in mice by an interferon-gamma-independent pathway." *Circulation* **104**(25): 3145-51.
- Afkarian, M., J. R. Sedy, et al. (2002). "T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4⁺ T cells." *Nat Immunol* **3**(6): 549-57.
- Aguilar-Delfin, I., P. J. Wettstein, et al. (2003). "Resistance to acute babesiosis is associated with interleukin-12- and gamma interferon-mediated responses and requires macrophages and natural killer cells." *Infect Immun* **71**(4): 2002-8.
- Airoidi, I., R. Guglielmino, et al. (2002). "The interleukin-12 and interleukin-12 receptor system in normal and transformed human B lymphocytes." *Haematologica* **87**(4): 434-42.
- Akira, S., K. Takeda, et al. (2001). "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity." *Nat Immunol* **2**(8): 675-80.
- Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." *Cell* **124**(4): 783-801.
- Ambros, V. (2003). "MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing." *Cell* **113**(6): 673-6.
- Anderson, C. A., G. Boucher, et al. "Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47." *Nat Genet* **43**(3): 246-52.
- Aragane, Y., H. Riemann, et al. (1994). "IL-12 is expressed and released by human keratinocytes and epidermoid carcinoma cell lines." *J Immunol* **153**(12): 5366-72.
- Aziz, K. E., P. J. McCluskey, et al. (1997). "Characterisation of follicular dendritic cells in labial salivary glands of patients with primary Sjogren syndrome: comparison with tonsillar lymphoid follicles." *Ann Rheum Dis* **56**(2): 140-3.
- Baechler, E. C., F. M. Batliwalla, et al. (2003). "Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5): 2610-5.
- Balasa, A., G. Gathungu, et al. "Assessment of DNA methylation at the interferon regulatory factor 5 (IRF5) promoter region in inflammatory bowel diseases." *Int J Colorectal Dis* **25**(5): 553-6.
- Banchereau, J., F. Bazan, et al. (1994). "The CD40 antigen and its ligand." *Annu Rev Immunol* **12**: 881-922.
- Barbalat, R., L. Lau, et al. (2009). "Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands." *Nat Immunol* **10**(11): 1200-7.
- Barbulescu, K., C. Becker, et al. (1998). "IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN-gamma promoter in primary CD4⁺ T lymphocytes." *J Immunol* **160**(8): 3642-7.
- Barnes, B. J., A. E. Field, et al. (2003). "Virus-induced heterodimer formation between IRF-5 and IRF-7 modulates assembly of the IFNA enhanceosome in vivo and transcriptional activity of IFNA genes." *J Biol Chem* **278**(19): 16630-41.

- Barnes, B. J., M. J. Kellum, et al. (2002). "Multiple regulatory domains of IRF-5 control activation, cellular localization, and induction of chemokines that mediate recruitment of T lymphocytes." Mol Cell Biol **22**(16): 5721-40.
- Barnes, B. J., P. A. Moore, et al. (2001). "Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon alpha genes." J Biol Chem **276**(26): 23382-90.
- Barnes, B. J., J. Richards, et al. (2004). "Global and distinct targets of IRF-5 and IRF-7 during innate response to viral infection." J Biol Chem **279**(43): 45194-207.
- Barnett, A. H., C. Eff, et al. (1981). "Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs." Diabetologia **20**(2): 87-93.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-97.
- Barton, G. M. and R. Medzhitov (2002). "Toll-like receptors and their ligands." Curr Top Microbiol Immunol **270**: 81-92.
- Bave, U., G. Nordmark, et al. (2005). "Activation of the type I interferon system in primary Sjogren's syndrome: a possible etiopathogenic mechanism." Arthritis Rheum **52**(4): 1185-95.
- Becker, S., B. Groner, et al. (1998). "Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA." Nature **394**(6689): 145-51.
- Bennett, L., A. K. Palucka, et al. (2003). "Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood." J Exp Med **197**(6): 711-23.
- Berenson, L. S., M. Gavrieli, et al. (2006). "Distinct characteristics of murine STAT4 activation in response to IL-12 and IFN-alpha." J Immunol **177**(8): 5195-203.
- Berger, S. L. (2001). "An embarrassment of niches: the many covalent modifications of histones in transcriptional regulation." Oncogene **20**(24): 3007-13.
- Bird, A. (2002). "DNA methylation patterns and epigenetic memory." Genes Dev **16**(1): 6-21.
- Blanco, P., A. K. Palucka, et al. (2001). "Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus." Science **294**(5546): 1540-3.
- Bogdan, C., J. Mattner, et al. (2004). "The role of type I interferons in non-viral infections." Immunol Rev **202**: 33-48.
- Bombardieri, M., F. Barone, et al. (2004). "Increased circulating levels and salivary gland expression of interleukin-18 in patients with Sjogren's syndrome: relationship with autoantibody production and lymphoid organization of the periductal inflammatory infiltrate." Arthritis Res Ther **6**(5): R447-56.
- Boumba, D., F. N. Skopouli, et al. (1995). "Cytokine mRNA expression in the labial salivary gland tissues from patients with primary Sjogren's syndrome." Br J Rheumatol **34**(4): 326-33.
- Bowman, S. J., G. H. Ibrahim, et al. (2004). "Estimating the prevalence among Caucasian women of primary Sjogren's syndrome in two general practices in Birmingham, UK." Scand J Rheumatol **33**(1): 39-43.
- Buxbaum, L. U., J. E. Uzonna, et al. (2002). "Control of New World cutaneous leishmaniasis is IL-12 independent but STAT4 dependent." Eur J Immunol **32**(11): 3206-15.
- Cai, G., T. Radzanowski, et al. (2000). "Identification of STAT4-dependent and independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*." J Immunol **165**(5): 2619-27.
- Cassatella, M. A., L. Meda, et al. (1995). "Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes." Eur J Immunol **25**(1): 1-5.
- Chan, S. H., B. Perussia, et al. (1991). "Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers." J Exp Med **173**(4): 869-79.

- Chen, T. and E. Li (2006). "Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals." Curr Top Microbiol Immunol **301**: 179-201.
- Chen, X., U. Vinkemeier, et al. (1998). "Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA." Cell **93**(5): 827-39.
- Cheung, W. L., S. D. Briggs, et al. (2000). "Acetylation and chromosomal functions." Curr Opin Cell Biol **12**(3): 326-33.
- Chitnis, T., N. Najafian, et al. (2001). "Effect of targeted disruption of STAT4 and STAT6 on the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Clin Invest **108**(5): 739-47.
- Cho, S. S., C. M. Bacon, et al. (1996). "Activation of STAT4 by IL-12 and IFN-alpha: evidence for the involvement of ligand-induced tyrosine and serine phosphorylation." J Immunol **157**(11): 4781-9.
- Chua, A. O., R. Chizzonite, et al. (1994). "Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130." J Immunol **153**(1): 128-36.
- Chua, A. O., V. L. Wilkinson, et al. (1995). "Cloning and characterization of a mouse IL-12 receptor-beta component." J Immunol **155**(9): 4286-94.
- Chung, D. R., D. L. Kasper, et al. (2003). "CD4+ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism." J Immunol **170**(4): 1958-63.
- Chused, T. M., S. S. Kassan, et al. (1977). "Sjogren's syndrome association with HLA-Dw3." N Engl J Med **296**(16): 895-7.
- Coban, C., Y. Igari, et al. "Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9." Cell Host Microbe **7**(1): 50-61.
- Cooper, G. S., M. L. Bynum, et al. (2009). "Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases." J Autoimmun **33**(3-4): 197-207.
- Cornacchia, E., J. Golbus, et al. (1988). "Hydralazine and procainamide inhibit T cell DNA methylation and induce autoreactivity." J Immunol **140**(7): 2197-200.
- Costello, J. F., M. C. Fruhwald, et al. (2000). "Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns." Nat Genet **24**(2): 132-8.
- Criswell, L. A. (2004). "Familial clustering of disease features: implications for the etiology and investigation of systemic autoimmune disease." Arthritis Rheum **50**(6): 1707-8.
- Crow, M. K., K. A. Kirou, et al. (2003). "Microarray analysis of interferon-regulated genes in SLE." Autoimmunity **36**(8): 481-90.
- Cuello, C., P. Palladinetti, et al. (1998). "Chemokine expression and leucocyte infiltration in Sjogren's syndrome." Br J Rheumatol **37**(7): 779-83.
- D'Andrea, A., M. Rengaraju, et al. (1992). "Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells." J Exp Med **176**(5): 1387-98.
- D'Elios, M. M., B. J. Appelmek, et al. (2004). "Gastric autoimmunity: the role of *Helicobacter pylori* and molecular mimicry." Trends Mol Med **10**(7): 316-23.
- Davis, L. I. (1995). "The nuclear pore complex." Annu Rev Biochem **64**: 865-96.
- Deapen, D., A. Escalante, et al. (1992). "A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **35**(3): 311-8.
- Decker, T., M. Muller, et al. (2005). "The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection." Nat Rev Immunol **5**(9): 675-87.
- del Solar, G. and M. Espinosa (2000). "Plasmid copy number control: an ever-growing story." Mol Microbiol **37**(3): 492-500.

- Deng, C., Q. Lu, et al. (2003). "Hydralazine may induce autoimmunity by inhibiting extracellular signal-regulated kinase pathway signaling." Arthritis Rheum **48**(3): 746-56.
- Devergne, O., M. Birkenbach, et al. (1997). "Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(22): 12041-6.
- Dideberg, V., G. Kristjansdottir, et al. (2007). "An insertion-deletion polymorphism in the interferon regulatory Factor 5 (IRF5) gene confers risk of inflammatory bowel diseases." Hum Mol Genet **16**(24): 3008-16.
- Dieude, P., K. Dawidowicz, et al. "Phenotype-haplotype correlation of IRF5 in systemic sclerosis: role of 2 haplotypes in disease severity." J Rheumatol **37**(5): 987-92.
- Dieude, P., M. Guedj, et al. (2009). "Association between the IRF5 rs2004640 functional polymorphism and systemic sclerosis: a new perspective for pulmonary fibrosis." Arthritis Rheum **60**(1): 225-33.
- Dieude, P., M. Guedj, et al. (2009). "STAT4 is a genetic risk factor for systemic sclerosis having additive effects with IRF5 on disease susceptibility and related pulmonary fibrosis." Arthritis Rheum **60**(8): 2472-9.
- Dieude, P., J. Wipff, et al. (2009). "BANK1 is a genetic risk factor for diffuse cutaneous systemic sclerosis and has additive effects with IRF5 and STAT4." Arthritis Rheum **60**(11): 3447-54.
- Dimitriou, I. D., E. K. Kapsogeorgou, et al. (2002). "Establishment of a convenient system for the long-term culture and study of non-neoplastic human salivary gland epithelial cells." Eur J Oral Sci **110**(1): 21-30.
- Dimitriou, I. D., E. K. Kapsogeorgou, et al. (2002). "CD40 on salivary gland epithelial cells: high constitutive expression by cultured cells from Sjogren's syndrome patients indicating their intrinsic activation." Clin Exp Immunol **127**(2): 386-92.
- Dzionek, A., Y. Sohma, et al. (2001). "BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction." J Exp Med **194**(12): 1823-34.
- Ehrlich, M., M. A. Gama-Sosa, et al. (1982). "Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells." Nucleic Acids Res **10**(8): 2709-21.
- Eid, P., J. A. Langer, et al. (2000). "Localization of a receptor nonapeptide with a possible role in the binding of the type I interferons." Eur Cytokine Netw **11**(4): 560-73.
- Ekstrom Smedby, K., C. M. Vajdic, et al. (2008). "Autoimmune disorders and risk of non-Hodgkin lymphoma subtypes: a pooled analysis within the InterLymph Consortium." Blood **111**(8): 4029-38.
- Escalante, C. R., J. Yie, et al. (1998). "Structure of IRF-1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulation." Nature **391**(6662): 103-6.
- Farrar, J. D., J. D. Smith, et al. (2000). "Recruitment of Stat4 to the human interferon-alpha/beta receptor requires activated Stat2." J Biol Chem **275**(4): 2693-7.
- Fei, H. M., H. Kang, et al. (1991). "Specific HLA-DQA and HLA-DRB1 alleles confer susceptibility to Sjogren's syndrome and autoantibody production." J Clin Lab Anal **5**(6): 382-91.
- Finnegan, A., M. J. Grusby, et al. (2002). "IL-4 and IL-12 regulate proteoglycan-induced arthritis through Stat-dependent mechanisms." J Immunol **169**(6): 3345-52.
- Fleck, M., E. R. Kern, et al. (1998). "Murine cytomegalovirus induces a Sjogren's syndrome-like disease in C57Bl/6-lpr/lpr mice." Arthritis Rheum **41**(12): 2175-84.
- Fox, R. I., H. I. Kang, et al. (1994). "Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjogren's syndrome." J Immunol **152**(11): 5532-9.

- Fox, R. I., G. Pearson, et al. (1986). "Detection of Epstein-Barr virus-associated antigens and DNA in salivary gland biopsies from patients with Sjogren's syndrome." J Immunol **137**(10): 3162-8.
- Fye, K. H., P. I. Terasaki, et al. (1978). "Relationship of HLA-Dw3 and HLA-B8 to Sjogren's syndrome." Arthritis Rheum **21**(3): 337-42.
- Gately, M. K., B. B. Desai, et al. (1991). "Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor)." J Immunol **147**(3): 874-82.
- Glas, J., J. Seiderer, et al. "Evidence for STAT4 as a common autoimmune gene: rs7574865 is associated with colonic Crohn's disease and early disease onset." PLoS One **5**(4): e10373.
- Godshall, C. J., A. B. Lentsch, et al. (2001). "STAT4 is required for antibacterial defense but enhances mortality during polymicrobial sepsis." Clin Diagn Lab Immunol **8**(6): 1044-8.
- Gorlich, D. and I. W. Mattaj (1996). "Nucleocytoplasmic transport." Science **271**(5255): 1513-8.
- Gottenberg, J. E., F. Aucouturier, et al. (2007). "Serum immunoglobulin free light chain assessment in rheumatoid arthritis and primary Sjogren's syndrome." Ann Rheum Dis **66**(1): 23-7.
- Gottenberg, J. E., M. Busson, et al. (2005). "Correlation of serum B lymphocyte stimulator and beta2 microglobulin with autoantibody secretion and systemic involvement in primary Sjogren's syndrome." Ann Rheum Dis **64**(7): 1050-5.
- Gottenberg, J. E., M. Busson, et al. (2003). "In primary Sjogren's syndrome, HLA class II is associated exclusively with autoantibody production and spreading of the autoimmune response." Arthritis Rheum **48**(8): 2240-5.
- Gottenberg, J. E., N. Cagnard, et al. (2006). "Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjogren's syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(8): 2770-5.
- Gottenberg, J. E., C. Pallier, et al. (2006). "Failure to confirm coxsackievirus infection in primary Sjogren's syndrome." Arthritis Rheum **54**(6): 2026-8.
- Graham, R. R., S. V. Kozyrev, et al. (2006). "A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus." Nat Genet **38**(5): 550-5.
- Graham, R. R., C. Kyogoku, et al. (2007). "Three functional variants of IFN regulatory factor 5 (IRF5) define risk and protective haplotypes for human lupus." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(16): 6758-63.
- Green, A. and C. C. Patterson (2001). "Trends in the incidence of childhood-onset diabetes in Europe 1989-1998." Diabetologia **44 Suppl 3**: B3-8.
- Greenlund, A. C., M. O. Morales, et al. (1995). "Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process." Immunity **2**(6): 677-87.
- Grohmann, U., M. L. Belladonna, et al. (1998). "IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF-kappaB and primes DC for IL-12 production." Immunity **9**(3): 315-23.
- Gubler, U., A. O. Chua, et al. (1991). "Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(10): 4143-7.
- Haas, T., J. Metzger, et al. (2008). "The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation." Immunity **28**(3): 315-23.

- Haddad, J., P. Deny, et al. (1992). "Lymphocytic sialadenitis of Sjogren's syndrome associated with chronic hepatitis C virus liver disease." Lancet **339**(8789): 321-3.
- Hagberg, N., O. Berggren, et al. "IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells stimulated with RNA-containing immune complexes is promoted by NK cells via MIP-1beta and LFA-1." J Immunol **186**(9): 5085-94.
- Han, G. M., S. L. Chen, et al. (2003). "Analysis of gene expression profiles in human systemic lupus erythematosus using oligonucleotide microarray." Genes Immun **4**(3): 177-86.
- Hardy, M. P., C. M. Owczarek, et al. (2004). "Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes." Genomics **84**(2): 331-45.
- Harley, J. B., M. E. Alarcon-Riquelme, et al. (2008). "Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXX, KIAA1542 and other loci." Nat Genet **40**(2): 204-10.
- Hayashi, Y., R. Arakaki, et al. (2004). "Apoptosis and estrogen deficiency in primary Sjogren syndrome." Curr Opin Rheumatol **16**(5): 522-6.
- Hjelmervik, T. O., K. Petersen, et al. (2005). "Gene expression profiling of minor salivary glands clearly distinguishes primary Sjogren's syndrome patients from healthy control subjects." Arthritis Rheum **52**(5): 1534-44.
- Hoebe, K., P. Georgel, et al. (2005). "CD36 is a sensor of diacylglycerides." Nature **433**(7025): 523-7.
- Hoey, T., S. Zhang, et al. (2003). "Distinct requirements for the naturally occurring splice forms Stat4alpha and Stat4beta in IL-12 responses." Embo J **22**(16): 4237-48.
- Holz, A., A. Bot, et al. (1999). "Disruption of the STAT4 signaling pathway protects from autoimmune diabetes while retaining antiviral immune competence." J Immunol **163**(10): 5374-82.
- Horiuchi, M., S. Yamano, et al. (1999). "Possible involvement of IL-12 expression by Epstein-Barr virus in Sjogren syndrome." J Clin Pathol **52**(11): 833-7.
- Hornung, V., M. Guenther-Biller, et al. (2005). "Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7." Nat Med **11**(3): 263-70.
- Hou, J., U. Schindler, et al. (1994). "An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat." Science **265**(5179): 1701-6.
- Hou, J., U. Schindler, et al. (1995). "Identification and purification of human Stat proteins activated in response to interleukin-2." Immunity **2**(4): 321-9.
- Hsieh, C. S., S. E. Macatonia, et al. (1993). "Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages." Science **260**(5107): 547-9.
- Ihle, J. N. (2001). "The Stat family in cytokine signaling." Curr Opin Cell Biol **13**(2): 211-7.
- Illingworth, R., A. Kerr, et al. (2008). "A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci." PLoS Biol **6**(1): e22.
- Imprata, T., C. Schindler, et al. (1994). "Transcription factor ISGF-3 formation requires phosphorylated Stat91 protein, but Stat113 protein is phosphorylated independently of Stat91 protein." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 4776-80.
- Inoue, H., K. Tsubota, et al. (2001). "Possible involvement of EBV-mediated alpha-fodrin cleavage for organ-specific autoantigen in Sjogren's syndrome." J Immunol **166**(9): 5801-9.
- Ioannidis, J. P., V. A. Vassiliou, et al. (2002). "Long-term risk of mortality and lymphoproliferative disease and predictive classification of primary Sjogren's syndrome." Arthritis Rheum **46**(3): 741-7.

- Ishimaru, N., R. Arakaki, et al. (2003). "Development of autoimmune exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in estrogen-deficient mice of healthy background." Am J Pathol **163**(4): 1481-90.
- Ishimaru, N., R. Arakaki, et al. (2008). "Expression of the retinoblastoma protein RbAp48 in exocrine glands leads to Sjogren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy." J Exp Med **205**(12): 2915-27.
- Ishimaru, N., K. Saegusa, et al. (1999). "Estrogen deficiency accelerates autoimmune exocrinopathy in murine Sjogren's syndrome through fas-mediated apoptosis." Am J Pathol **155**(1): 173-81.
- Ishimaru, N., T. Yoneda, et al. (2000). "Severe destructive autoimmune lesions with aging in murine Sjogren's syndrome through Fas-mediated apoptosis." Am J Pathol **156**(5): 1557-64.
- Itescu, S., L. J. Brancato, et al. (1989). "A sicca syndrome in HIV infection: association with HLA-DR5 and CD8 lymphocytosis." Lancet **2**(8661): 466-8.
- Ito, I., Y. Kawaguchi, et al. (2009). "Association of a functional polymorphism in the IRF5 region with systemic sclerosis in a Japanese population." Arthritis Rheum **60**(6): 1845-50.
- Jackson, J. P., A. M. Lindroth, et al. (2002). "Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase." Nature **416**(6880): 556-60.
- Jacob, C. O., S. Zang, et al. (2003). "Pivotal role of Stat4 and Stat6 in the pathogenesis of the lupus-like disease in the New Zealand mixed 2328 mice." J Immunol **171**(3): 1564-71.
- Jacobson, N. G., S. J. Szabo, et al. (1995). "Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4." J Exp Med **181**(5): 1755-62.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.
- Jarvinen, T. M., A. Hellquist, et al. "Tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 polymorphisms are associated with discoid and subacute cutaneous lupus erythematosus." Exp Dermatol **19**(2): 123-31.
- Jeffries, M., M. Dozmorov, et al. "Genome-wide DNA methylation patterns in CD4+ T cells from patients with systemic lupus erythematosus." Epigenetics **6**(5): 593-601.
- Jin, M. S., S. E. Kim, et al. (2007). "Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide." Cell **130**(6): 1071-82.
- Kang, H. I., H. M. Fei, et al. (1993). "Comparison of HLA class II genes in Caucasoid, Chinese, and Japanese patients with primary Sjogren's syndrome." J Immunol **150**(8 Pt 1): 3615-23.
- Kaplan, M. H., Y. L. Sun, et al. (1996). "Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice." Nature **382**(6587): 174-7.
- Kaplan, M. H., A. L. Wurster, et al. (1998). "A signal transducer and activator of transcription (Stat)4-independent pathway for the development of T helper type 1 cells." J Exp Med **188**(6): 1191-6.
- Kaprio, J., J. Tuomilehto, et al. (1992). "Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland." Diabetologia **35**(11): 1060-7.
- Kapsogeorgou, E. K., I. D. Dimitriou, et al. (2001). "Activation of epithelial and myoepithelial cells in the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome: high expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM.1) in biopsy specimens and cultured cells." Clin Exp Immunol **124**(1): 126-33.
- Kapsogeorgou, E. K., H. M. Moutsopoulos, et al. (2001). "Functional expression of a costimulatory B7.2 (CD86) protein on human salivary gland epithelial cells that

- interacts with the CD28 receptor, but has reduced binding to CTLA4." *J Immunol* **166**(5): 3107-13.
- Kariuki, S. N., K. A. Kirou, et al. (2009). "Cutting edge: autoimmune disease risk variant of STAT4 confers increased sensitivity to IFN-alpha in lupus patients in vivo." *J Immunol* **182**(1): 34-8.
- Katze, M. G., Y. He, et al. (2002). "Viruses and interferon: a fight for supremacy." *Nat Rev Immunol* **2**(9): 675-87.
- Kawai, T. and S. Akira (2006). "Innate immune recognition of viral infection." *Nat Immunol* **7**(2): 131-7.
- Kawai, T. and S. Akira (2008). "Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling." *Ann N Y Acad Sci* **1143**: 1-20.
- Khvorova, A., A. Reynolds, et al. (2003). "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias." *Cell* **115**(2): 209-16.
- Knolle, P. A. and A. Limmer (2001). "Neighborhood politics: the immunoregulatory function of organ-resident liver endothelial cells." *Trends Immunol* **22**(8): 432-7.
- Kobayashi, M., L. Fitz, et al. (1989). "Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes." *J Exp Med* **170**(3): 827-45.
- Koch, S., K. Kohl, et al. (2006). "Skin homing of Langerhans cell precursors: adhesion, chemotaxis, and migration." *J Allergy Clin Immunol* **117**(1): 163-8.
- Korman, B. D., M. I. Alba, et al. (2008). "Variant form of STAT4 is associated with primary Sjogren's syndrome." *Genes Immun* **9**(3): 267-70.
- Krausgruber, T., K. Blazek, et al. "IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses." *Nat Immunol* **12**(3): 231-8.
- Kristjansdottir, G., J. K. Sandling, et al. (2008). "Interferon regulatory factor 5 (IRF5) gene variants are associated with multiple sclerosis in three distinct populations." *J Med Genet* **45**(6): 362-9.
- Kruize, A. A., R. J. Hene, et al. (1993). "Hydroxychloroquine treatment for primary Sjogren's syndrome: a two year double blind crossover trial." *Ann Rheum Dis* **52**(5): 360-4.
- Kurtzke, J. F. (2000). "Multiple sclerosis in time and space--geographic clues to cause." *J Neurovirol* **6 Suppl 2**: S134-40.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, et al. (2003). "New microRNAs from mouse and human." *Rna* **9**(2): 175-9.
- Lai, E. C. (2003). "microRNAs: runts of the genome assert themselves." *Curr Biol* **13**(23): R925-36.
- Lavie, F., C. Miceli-Richard, et al. (2004). "Expression of BAFF (BLyS) in T cells infiltrating labial salivary glands from patients with Sjogren's syndrome." *J Pathol* **202**(4): 496-502.
- Lee, H. K., J. M. Lund, et al. (2007). "Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells." *Science* **315**(5817): 1398-401.
- Lee, H. S., H. Park, et al. (2008). "STAT4 polymorphism is associated with early-onset type 1 diabetes, but not with late-onset type 1 diabetes." *Ann N Y Acad Sci* **1150**: 93-8.
- Lee, H. S., E. F. Remmers, et al. (2007). "Association of STAT4 with rheumatoid arthritis in the Korean population." *Mol Med* **13**(9-10): 455-60.
- Lee, Y., C. Ahn, et al. (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." *Nature* **425**(6956): 415-9.
- Lee, Y., K. Jeon, et al. (2002). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." *Embo J* **21**(17): 4663-70.
- Lentsch, A. B., A. Kato, et al. (2001). "STAT4 and STAT6 regulate systemic inflammation and protect against lethal endotoxemia." *J Clin Invest* **108**(10): 1475-82.

- Lerner, M. R., N. C. Andrews, et al. (1981). "Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(2): 805-9.
- Levy, D. E. and J. E. Darnell, Jr. (2002). "Stats: transcriptional control and biological impact." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(9): 651-62.
- Lien, C., C. M. Fang, et al. "Critical role of IRF-5 in regulation of B-cell differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(10): 4664-8.
- Lighvani, A. A., D. M. Frucht, et al. (2001). "T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 15137-42.
- Lindahl, G., E. Hedfors, et al. (1985). "Epithelial HLA-DR expression and T lymphocyte subsets in salivary glands in Sjogren's syndrome." Clin Exp Immunol **61**(3): 475-82.
- Liu, Y. J. (2005). "IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors." Annu Rev Immunol **23**: 275-306.
- Lu, Q., A. Wu, et al. (2005). "Demethylation of the same promoter sequence increases CD70 expression in lupus T cells and T cells treated with lupus-inducing drugs." J Immunol **174**(10): 6212-9.
- Lu, Q., A. Wu, et al. (2007). "Demethylation of CD40LG on the inactive X in T cells from women with lupus." J Immunol **179**(9): 6352-8.
- Lu, R., W. C. Au, et al. (2000). "Regulation of the promoter activity of interferon regulatory factor-7 gene. Activation by interferon and silencing by hypermethylation." J Biol Chem **275**(41): 31805-12.
- Macara, I. G. (2001). "Transport into and out of the nucleus." Microbiol Mol Biol Rev **65**(4): 570-94, table of contents.
- Macatonia, S. E., N. A. Hosken, et al. (1995). "Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells." J Immunol **154**(10): 5071-9.
- MacDermott, R. P. (1996). "Alterations of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease." J Gastroenterol **31**(6): 907-16.
- Magram, J., S. E. Connaughton, et al. (1996). "IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses." Immunity **4**(5): 471-81.
- Mahadevan, L. C., A. C. Willis, et al. (1991). "Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors." Cell **65**(5): 775-83.
- Mancl, M. E., G. Hu, et al. (2005). "Two discrete promoters regulate the alternatively spliced human interferon regulatory factor-5 isoforms. Multiple isoforms with distinct cell type-specific expression, localization, regulation, and function." J Biol Chem **280**(22): 21078-90.
- Mancuso, G., M. Gambuzza, et al. (2009). "Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells." Nat Immunol **10**(6): 587-94.
- Manoussakis, M. N., S. Boiu, et al. (2007). "Rates of infiltration by macrophages and dendritic cells and expression of interleukin-18 and interleukin-12 in the chronic inflammatory lesions of Sjogren's syndrome: correlation with certain features of immune hyperactivity and factors associated with high risk of lymphoma development." Arthritis Rheum **56**(12): 3977-88.
- Manoussakis, M. N., I. D. Dimitriou, et al. (1999). "Expression of B7 costimulatory molecules by salivary gland epithelial cells in patients with Sjogren's syndrome." Arthritis Rheum **42**(2): 229-39.
- Marelli-Berg, F. M. and R. I. Lechler (1999). "Antigen presentation by parenchymal cells: a route to peripheral tolerance?" Immunol Rev **172**: 297-314.

- Mariette, X., F. Agbalika, et al. (2000). "Detection of the tax gene of HTLV-I in labial salivary glands from patients with Sjogren's syndrome and other diseases of the oral cavity." Clin Exp Rheumatol **18**(3): 341-7.
- Mariette, X., C. Caudmont, et al. (2003). "Dry eyes and mouth syndrome or sicca, asthenia and polyalgia syndrome?" Rheumatology (Oxford) **42**(7): 914-5; author reply 913-4.
- Mariette, X., J. Gozlan, et al. (1991). "Detection of Epstein-Barr virus DNA by in situ hybridization and polymerase chain reaction in salivary gland biopsy specimens from patients with Sjogren's syndrome." Am J Med **90**(3): 286-94.
- Mariette, X., M. Zerbib, et al. (1993). "Hepatitis C virus and Sjogren's syndrome." Arthritis Rheum **36**(2): 280-1.
- Matikainen, S., T. Sareneva, et al. (1999). "Interferon-alpha activates multiple STAT proteins and upregulates proliferation-associated IL-2Ralpha, c-myc, and pim-1 genes in human T cells." Blood **93**(6): 1980-91.
- Matsukawa, A., M. H. Kaplan, et al. (2001). "Pivotal role of signal transducer and activator of transcription (Stat)4 and Stat6 in the innate immune response during sepsis." J Exp Med **193**(6): 679-88.
- Matsumura, R., K. Umemiya, et al. (2001). "Glandular and extraglandular expression of costimulatory molecules in patients with Sjogren's syndrome." Ann Rheum Dis **60**(5): 473-82.
- Mattaj, I. W. and L. Englmeier (1998). "Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase." Annu Rev Biochem **67**: 265-306.
- McGrath-Morrow, S., B. Laube, et al. (2006). "IL-12 overexpression in mice as a model for Sjogren lung disease." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **291**(4): L837-46.
- Merberg, D. M., S. F. Wolf, et al. (1992). "Sequence similarity between NKSF and the IL-6/G-CSF family." Immunol Today **13**(2): 77-8.
- Miceli-Richard, C., E. Comets, et al. (2007). "Association of an IRF5 gene functional polymorphism with Sjogren's syndrome." Arthritis Rheum **56**(12): 3989-94.
- Miceli-Richard, C., N. Gestermann, et al. (2009). "The CGGGG insertion/deletion polymorphism of the IRF5 promoter is a strong risk factor for primary Sjogren's syndrome." Arthritis Rheum **60**(7): 1991-7.
- Moseman, E. A., X. Liang, et al. (2004). "Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells." J Immunol **173**(7): 4433-42.
- Moutsopoulos, H. M., J. J. Hooks, et al. (1986). "HLA-DR expression by labial minor salivary gland tissues in Sjogren's syndrome." Ann Rheum Dis **45**(8): 677-83.
- Moutsopoulos, H. M. and T. Kordosis (1996). "Sjogren's syndrome revisited: autoimmune epithelitis." Br J Rheumatol **35**(3): 204-6.
- Mullen, A. C., F. A. High, et al. (2001). "Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection." Science **292**(5523): 1907-10.
- Naeger, L. K., J. McKinney, et al. (1999). "Identification of a STAT4 binding site in the interleukin-12 receptor required for signaling." J Biol Chem **274**(4): 1875-8.
- Nakamura, H., K. Eguchi, et al. (1997). "High prevalence of Sjogren's syndrome in patients with HTLV-I associated myelopathy." Ann Rheum Dis **56**(3): 167-72.
- Neculai, D., A. M. Neculai, et al. (2005). "Structure of the unphosphorylated STAT5a dimer." J Biol Chem **280**(49): 40782-7.
- Neidhart, M., J. Rethage, et al. (2000). "Retrotransposable L1 elements expressed in rheumatoid arthritis synovial tissue: association with genomic DNA hypomethylation and influence on gene expression." Arthritis Rheum **43**(12): 2634-47.

- Nguyen, K. B., W. T. Watford, et al. (2002). "Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection." Science **297**(5589): 2063-6.
- Niewold, T. B., J. Hua, et al. (2007). "High serum IFN-alpha activity is a heritable risk factor for systemic lupus erythematosus." Genes Immun **8**(6): 492-502.
- Nordmark, G., G. Kristjansdottir, et al. "Association of EBF1, FAM167A(C8orf13)-BLK and TNFSF4 gene variants with primary Sjogren's syndrome." Genes Immun **12**(2): 100-9.
- Nordmark, G., G. Kristjansdottir, et al. (2009). "Additive effects of the major risk alleles of IRF5 and STAT4 in primary Sjogren's syndrome." Genes Immun **10**(1): 68-76.
- Oppmann, B., R. Lesley, et al. (2000). "Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12." Immunity **13**(5): 715-25.
- Orozco, G., B. Z. Alizadeh, et al. (2008). "Association of STAT4 with rheumatoid arthritis: a replication study in three European populations." Arthritis Rheum **58**(7): 1974-80.
- Ozaki, M. E., B. A. Coren, et al. (1999). "CD4+ T cell responses to CD40-deficient APCs: defects in proliferation and negative selection apply only with B cells as APCs." J Immunol **163**(10): 5250-6.
- Pascual, V., J. Banchereau, et al. (2003). "The central role of dendritic cells and interferon-alpha in SLE." Curr Opin Rheumatol **15**(5): 548-56.
- Peeva, E. and M. Zouali (2005). "Spotlight on the role of hormonal factors in the emergence of autoreactive B-lymphocytes." Immunol Lett **101**(2): 123-43.
- Pemberton, L. F. and B. M. Paschal (2005). "Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export." Traffic **6**(3): 187-98.
- Persky, M. E., K. M. Murphy, et al. (2005). "IL-12, but not IFN-alpha, promotes STAT4 activation and Th1 development in murine CD4+ T cells expressing a chimeric murine/human Stat2 gene." J Immunol **174**(1): 294-301.
- Perussia, B., V. Fanning, et al. (1985). "A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses." Nat Immun Cell Growth Regul **4**(3): 120-37.
- Pestka, S., C. D. Krause, et al. (2004). "Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors." Immunol Rev **202**: 8-32.
- Peterson, K. S., J. F. Huang, et al. (2004). "Characterization of heterogeneity in the molecular pathogenesis of lupus nephritis from transcriptional profiles of laser-captured glomeruli." J Clin Invest **113**(12): 1722-33.
- Pflanz, S., J. C. Timans, et al. (2002). "IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells." Immunity **16**(6): 779-90.
- Pflugfelder, S. C., C. Crouse, et al. (1990). "Amplification of Epstein-Barr virus genomic sequences in blood cells, lacrimal glands, and tears from primary Sjogren's syndrome patients." Ophthalmology **97**(8): 976-84.
- Pijpe, J., G. W. van Imhoff, et al. (2005). "Rituximab treatment in patients with primary Sjogren's syndrome: an open-label phase II study." Arthritis Rheum **52**(9): 2740-50.
- Presky, D. H., H. Yang, et al. (1996). "A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 14002-7.
- Quddus, J., K. J. Johnson, et al. (1993). "Treating activated CD4+ T cells with either of two distinct DNA methyltransferase inhibitors, 5-azacytidine or procainamide, is sufficient to cause a lupus-like disease in syngeneic mice." J Clin Invest **92**(1): 38-53.
- Racanelli, V. and B. Rehermann (2006). "The liver as an immunological organ." Hepatology **43**(2 Suppl 1): S54-62.

- Ramos, H. J., A. M. Davis, et al. (2007). "IFN-alpha is not sufficient to drive Th1 development due to lack of stable T-bet expression." J Immunol **179**(6): 3792-803.
- Remmers, E. F., R. M. Plenge, et al. (2007). "STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus." N Engl J Med **357**(10): 977-86.
- Renaud, S., D. Loukinov, et al. (2007). "Dual role of DNA methylation inside and outside of CTCF-binding regions in the transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene." Nucleic Acids Res **35**(4): 1245-56.
- Richardson, B., L. Scheinbart, et al. (1990). "Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **33**(11): 1665-73.
- Richardson, B. C., J. R. Strahler, et al. (1992). "Phenotypic and functional similarities between 5-azacytidine-treated T cells and a T cell subset in patients with active systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **35**(6): 647-62.
- Rogge, L., L. Barberis-Maino, et al. (1997). "Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells." J Exp Med **185**(5): 825-31.
- Rogge, L., D. D'Ambrosio, et al. (1998). "The role of Stat4 in species-specific regulation of Th cell development by type I IFNs." J Immunol **161**(12): 6567-74.
- Ronnblom, L., G. V. Alm, et al. (2009). "Type I interferon and lupus." Curr Opin Rheumatol **21**(5): 471-7.
- Rout, M. P., J. D. Aitchison, et al. (2000). "The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism." J Cell Biol **148**(4): 635-51.
- Royer, B., D. Cazals-Hatem, et al. (1997). "Lymphomas in patients with Sjogren's syndrome are marginal zone B-cell neoplasms, arise in diverse extranodal and nodal sites, and are not associated with viruses." Blood **90**(2): 766-75.
- Rueda, B., J. Broen, et al. (2009). "The STAT4 gene influences the genetic predisposition to systemic sclerosis phenotype." Hum Mol Genet **18**(11): 2071-7.
- Ruedl, C., M. Kopf, et al. (1999). "CD8(+) T cells mediate CD40-independent maturation of dendritic cells in vivo." J Exp Med **189**(12): 1875-84.
- Sanchez, F. O., M. V. Linga Reddy, et al. (2008). "IFN-regulatory factor 5 gene variants interact with the class I MHC locus in the Swedish psoriasis population." J Invest Dermatol **128**(7): 1704-9.
- Sasaki, A., H. Yasukawa, et al. (2000). "CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2." J Biol Chem **275**(38): 29338-47.
- Savitsky, D. A., H. Yanai, et al. "Contribution of IRF5 in B cells to the development of murine SLE-like disease through its transcriptional control of the IgG2a locus." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(22): 10154-9.
- Sawalha, A. H. and M. Jeffries (2007). "Defective DNA methylation and CD70 overexpression in CD4+ T cells in MRL/lpr lupus-prone mice." Eur J Immunol **37**(5): 1407-13.
- Scanga, C. A., J. Aliberti, et al. (2002). "Cutting edge: MyD88 is required for resistance to Toxoplasma gondii infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells." J Immunol **168**(12): 5997-6001.
- Scheinbart, L. S., M. A. Johnson, et al. (1991). "Procainamide inhibits DNA methyltransferase in a human T cell line." J Rheumatol **18**(4): 530-4.
- Schindler, C., X. Y. Fu, et al. (1992). "Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene encodes the 91-and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon alpha." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(16): 7836-9.
- Schoenhaut, D. S., A. O. Chua, et al. (1992). "Cloning and expression of murine IL-12." J Immunol **148**(11): 3433-40.

- Schwarz, D. S., G. Hutvagner, et al. (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." Cell **115**(2): 199-208.
- Seki, Y., H. Inoue, et al. (2003). "SOCS-3 regulates onset and maintenance of T(H)2-mediated allergic responses." Nat Med **9**(8): 1047-54.
- Shim, G. J., M. Warner, et al. (2004). "Aromatase-deficient mice spontaneously develop a lymphoproliferative autoimmune disease resembling Sjogren's syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(34): 12628-33.
- Shin, S. H., B. H. Kim, et al. "Identification of novel methylation markers in hepatocellular carcinoma using a methylation array." J Korean Med Sci **25**(8): 1152-9.
- Shuai, K., C. Schindler, et al. (1992). "Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein." Science **258**(5089): 1808-12.
- Siegal, F. P., N. Kadowaki, et al. (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." Science **284**(5421): 1835-7.
- Sigurdsson, S., H. H. Goring, et al. (2008). "Comprehensive evaluation of the genetic variants of interferon regulatory factor 5 (IRF5) reveals a novel 5 bp length polymorphism as strong risk factor for systemic lupus erythematosus." Hum Mol Genet **17**(6): 872-81.
- Sigurdsson, S., G. Nordmark, et al. (2008). "A risk haplotype of STAT4 for systemic lupus erythematosus is over-expressed, correlates with anti-dsDNA and shows additive effects with two risk alleles of IRF5." Hum Mol Genet **17**(18): 2868-76.
- Sigurdsson, S., G. Nordmark, et al. (2005). "Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus." Am J Hum Genet **76**(3): 528-37.
- Sigurdsson, S., L. Padyukov, et al. (2007). "Association of a haplotype in the promoter region of the interferon regulatory factor 5 gene with rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **56**(7): 2202-10.
- Singh, R. R., V. Saxena, et al. (2003). "Differential contribution of IL-4 and STAT6 vs STAT4 to the development of lupus nephritis." J Immunol **170**(9): 4818-25.
- St Clair, E. W., J. C. Angellilo, et al. (1992). "Expression of cell-adhesion molecules in the salivary gland microenvironment of Sjogren's syndrome." Arthritis Rheum **35**(1): 62-6.
- Stagakis, E., G. Bertsias, et al. "Identification of novel microRNA signatures linked to human lupus disease activity and pathogenesis: miR-21 regulates aberrant T cell responses through regulation of PDCD4 expression." Ann Rheum Dis.
- Stamm, L. M., A. A. Satoskar, et al. (1999). "STAT-4 mediated IL-12 signaling pathway is critical for the development of protective immunity in cutaneous leishmaniasis." Eur J Immunol **29**(8): 2524-9.
- Stark, G. R., I. M. Kerr, et al. (1998). "How cells respond to interferons." Annu Rev Biochem **67**: 227-64.
- Stetson, D. B. and R. Medzhitov (2006). "Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response." Immunity **24**(1): 93-103.
- Sugawara, I., H. Yamada, et al. (2003). "Relative importance of STAT4 in murine tuberculosis." J Med Microbiol **52**(Pt 1): 29-34.
- Suntharalingam, M. and S. R. Wente (2003). "Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function." Dev Cell **4**(6): 775-89.
- Szabo, S. J., A. S. Dighe, et al. (1997). "Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells." J Exp Med **185**(5): 817-24.
- Szabo, S. J., S. T. Kim, et al. (2000). "A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment." Cell **100**(6): 655-69.
- Szabo, S. J., B. M. Sullivan, et al. (2002). "Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells." Science **295**(5553): 338-42.

- Tabeta, K., P. Georgel, et al. (2004). "Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(10): 3516-21.
- Takaoka, A., H. Yanai, et al. (2005). "Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors." Nature **434**(7030): 243-9.
- Takeuchi, T., K. Amano, et al. (1993). "Upregulated expression and function of integrin adhesive receptors in systemic lupus erythematosus patients with vasculitis." J Clin Invest **92**(6): 3008-16.
- Tang, Y., X. Luo, et al. (2009). "MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins." Arthritis Rheum **60**(4): 1065-75.
- Taniguchi, T., K. Ogasawara, et al. (2001). "IRF family of transcription factors as regulators of host defense." Annu Rev Immunol **19**: 623-55.
- Tarleton, R. L., M. J. Grusby, et al. (2000). "Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*." J Immunol **165**(3): 1520-5.
- Taylor, K. E., E. F. Remmers, et al. (2008). "Specificity of the STAT4 genetic association for severe disease manifestations of systemic lupus erythematosus." PLoS Genet **4**(5): e1000084.
- Theofilopoulos, A. N., R. Baccala, et al. (2005). "Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity." Annu Rev Immunol **23**: 307-36.
- Thierfelder, W. E., J. M. van Deursen, et al. (1996). "Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells." Nature **382**(6587): 171-4.
- Tomer, Y. and T. F. Davies (1993). "Infection, thyroid disease, and autoimmunity." Endocr Rev **14**(1): 107-20.
- Tost, J. and I. G. Gut (2007). "DNA methylation analysis by pyrosequencing." Nat Protoc **2**(9): 2265-75.
- Toyoda, H., M. Ido, et al. (2004). "Impairment of IL-12-dependent STAT4 nuclear translocation in a patient with recurrent *Mycobacterium avium* infection." J Immunol **172**(6): 3905-12.
- Triantafyllopoulou, A., N. Tapinos, et al. (2004). "Evidence for coxsackievirus infection in primary Sjogren's syndrome." Arthritis Rheum **50**(9): 2897-902.
- Trinchieri, G. (1998). "Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity." Adv Immunol **70**: 83-243.
- Trinchieri, G. (2003). "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity." Nat Rev Immunol **3**(2): 133-46.
- Trinchieri, G. and P. Scott (1999). "Interleukin-12: basic principles and clinical applications." Curr Top Microbiol Immunol **238**: 57-78.
- Tsuchiya, N., A. Kawasaki, et al. (2009). "Association of STAT4 polymorphism with systemic sclerosis in a Japanese population." Ann Rheum Dis **68**(8): 1375-6.
- Tsunawaki, S., S. Nakamura, et al. (2002). "Possible function of salivary gland epithelial cells as nonprofessional antigen-presenting cells in the development of Sjogren's syndrome." J Rheumatol **29**(9): 1884-96.
- Uematsu, S., K. Fujimoto, et al. (2008). "Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5." Nat Immunol **9**(7): 769-76.
- Valiante, N. M., M. Rengaraju, et al. (1992). "Role of the production of natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12) in the ability of B cell lines to stimulate T and NK cell proliferation." Cell Immunol **145**(1): 187-98.

- van Pesch, V., H. Lanaya, et al. (2004). "Characterization of the murine alpha interferon gene family." *J Virol* **78**(15): 8219-28.
- Vitali, C., S. Bombardieri, et al. (2002). "Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group." *Ann Rheum Dis* **61**(6): 554-8.
- Vosters, J. L., M. A. Landek-Salgado, et al. (2009). "Interleukin-12 induces salivary gland dysfunction in transgenic mice, providing a new model of Sjogren's syndrome." *Arthritis Rheum* **60**(12): 3633-41.
- Wang, W., N. S. Ostlie, et al. (2004). "The susceptibility to experimental myasthenia gravis of STAT6-/- and STAT4-/- BALB/c mice suggests a pathogenic role of Th1 cells." *J Immunol* **172**(1): 97-103.
- Wolf, S. F., P. A. Temple, et al. (1991). "Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells." *J Immunol* **146**(9): 3074-81.
- Wu, C., X. Wang, et al. (2000). "IL-12 receptor beta 2 (IL-12R beta 2)-deficient mice are defective in IL-12-mediated signaling despite the presence of high affinity IL-12 binding sites." *J Immunol* **165**(11): 6221-8.
- Xu, X., Y. L. Sun, et al. (1996). "Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain." *Science* **273**(5276): 794-7.
- Yamamoto, K., F. W. Quelle, et al. (1994). "Stat4, a novel gamma interferon activation site-binding protein expressed in early myeloid differentiation." *Mol Cell Biol* **14**(7): 4342-9.
- Yamashita, M., M. Toyota, et al. "DNA methylation of interferon regulatory factors in gastric cancer and noncancerous gastric mucosae." *Cancer Sci* **101**(7): 1708-16.
- Yasuda, K., C. Richez, et al. (2007). "Murine dendritic cell type I IFN production induced by human IgG-RNA immune complexes is IFN regulatory factor (IRF)5 and IRF7 dependent and is required for IL-6 production." *J Immunol* **178**(11): 6876-85.
- Yoneyama, M. and T. Fujita (2009). "RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors." *Immunol Rev* **227**(1): 54-65.
- Yung, R., D. Powers, et al. (1996). "Mechanisms of drug-induced lupus. II. T cells overexpressing lymphocyte function-associated antigen 1 become autoreactive and cause a lupuslike disease in syngeneic mice." *J Clin Invest* **97**(12): 2866-71.
- Yung, R. L., J. Quddus, et al. (1995). "Mechanism of drug-induced lupus. I. Cloned Th2 cells modified with DNA methylation inhibitors in vitro cause autoimmunity in vivo." *J Immunol* **154**(6): 3025-35.
- Zamore, P. D., T. Tuschl, et al. (2000). "RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals." *Cell* **101**(1): 25-33.
- Zervou, M. I., G. N. Goulielmos, et al. (2009). "STAT4 gene polymorphism is associated with psoriasis in the genetically homogeneous population of Crete, Greece." *Hum Immunol* **70**(9): 738-41.
- Zervou, M. I., P. Sidiropoulos, et al. (2008). "Association of a TRAF1 and a STAT4 gene polymorphism with increased risk for rheumatoid arthritis in a genetically homogeneous population." *Hum Immunol* **69**(9): 567-71.
- Zhang, D., G. Zhang, et al. (2004). "A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria." *Science* **303**(5663): 1522-6.
- Zhang, S. Y., E. Jouanguy, et al. (2007). "TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis." *Science* **317**(5844): 1522-7.

- Zhong, Z., Z. Wen, et al. (1994). "Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 4806-10.
- Zhou, Y., J. Yuan, et al. (2009). "T cell CD40LG gene expression and the production of IgG by autologous B cells in systemic lupus erythematosus." Clin Immunol **132**(3): 362-70.
- Zintzaras, E., M. Voulgarelis, et al. (2005). "The risk of lymphoma development in autoimmune diseases: a meta-analysis." Arch Intern Med **165**(20): 2337-44.