



HAL
open science

Implication des lymphocytes B et de BAFF dans l'apoptose des cellules épithéliales des glandes salivaires au cours du syndrome de Gougerot-Sjögren

Marie-Michèle Varin

► **To cite this version:**

Marie-Michèle Varin. Implication des lymphocytes B et de BAFF dans l'apoptose des cellules épithéliales des glandes salivaires au cours du syndrome de Gougerot-Sjögren. Médecine humaine et pathologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2012. Français. NNT : 2012BRES0001 . tel-00713910

HAL Id: tel-00713910

<https://theses.hal.science/tel-00713910>

Submitted on 24 Nov 2014

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.



THESE / UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Biologie-Santé

Ecole Doctorale SICMA

présentée par

Marie-Michèle VARIN

Préparée au laboratoire
d'Immunologie-Pathologie EA2216

Implication des lymphocytes B et de BAFF dans l'apoptose des cellules épithéliales des glandes salivaires au cours du syndrome de Gougerot- Sjögren

Thèse soutenue le 27 janvier 2012

devant le jury composé de :

Rizgar MAGEED

Professeur, Queen Mary University of London / Président

Anne-Laure FAUCHAIS

PU-PH, Université de Limoges / *Rapporteur*

Assem SOUEIDAN

PU-PH, Université de Nantes / *Rapporteur*

Yves RENAUDINEAU

PU-PH, Université de Bretagne-Occidentale / *Examineur*

Jacques-Olivier PERS

PU-PH, Université de Bretagne-Occidentale / *Directeur de thèse*

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je vous remercie M. Youinou de m'avoir accueillie dans le laboratoire d'Immunologie et Pathologie EA 2216, de m'avoir conseillée et soutenue tout au long de ma thèse.

Je te remercie beaucoup Jacques-Olivier, pour m'avoir accompagnée tout au long de ce travail, pour ta disponibilité et ton analyse qui m'ont permis d'avancer dans mes expériences, ainsi que pour tes encouragements.

Je vous remercie Madame Fauchais, et Messieurs Mageed, Renaudineau et Soueidan pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je vous remercie par ailleurs Christelle, Sophie, Christophe et Yves pour votre aide et vos conseils notamment en biologie moléculaire et en cytométrie en flux. Je vous remercie aussi pour votre analyse qui m'a aidée, notamment pendant la période de "réflexion" à la fin des séminaires du vendredi soir.

Je te remercie également Ben pour ton aide et tes conseils notamment lors de l'utilisation du BAFF recombinant.

Je vous remercie les techniciennes, Annie, Christine (les deux), Nelly, Sylvie, ainsi que les secrétaires, Geneviève et Simone pour votre aide précieuse dans la mise en page de ce mémoire et votre disponibilité.

Un grand merci à vous les doctorants (et post-doctorants) du laboratoire pour votre aide et vos conseils, surtout quand je découvrais une nouvelle technique : Soizic, Laetitia, Jean-François, Thomas, Gabriel, Sébastien, Ahsen, Mariam, Jean-Eric et les "nouveaux", Tina, Alexandre, Ayan, Yosra, Achouak, Kahina, Pierre, Felipe.

Je tiens à remercier plus particulièrement :

- Gabriel, pour ton aide (dans presque toutes les techniques !), ta disponibilité, tes explications des termes cliniques que je ne connaissais pas et tes nombreux encouragements. J'espère ne pas avoir trop pris de ton temps. Et promis, on pourra discuter en plusieurs langues un jour, quand j'aurai appris suffisamment l'espagnol et que tu auras appris suffisamment l'allemand.

- Sébastien pour ton aide, notamment en cytométrie en flux. Je n'oublie pas non plus ton soutien et tes encouragements dans les périodes difficiles pour moi (professionnelles ou personnelles), tes conseils m'ont permis de relativiser un peu. Une pensée pour Ruby, grâce à toi je ne rate plus mes Ficoll.

- Mariam. Il y a trois ans, tu commençais ta thèse une semaine avant moi, tu l'auras donc terminée un peu avant moi. Nous avons passé beaucoup de temps ensemble, que ce soit à la paillasse ou à l'extérieur et j'en suis très contente. Et pour rebondir sur une de tes remarques, oui, des collègues peuvent être ami(e)s, mais ça je le savais déjà... Et chose promise, chose due, on se retrouvera sans doute un été prochain au Liban.

- Alexandre pour ton sens de l'humour et Tina, pour ta gentillesse, et surtout pour avoir "osé" chercher dans mon portable le numéro sacré pour organiser ma fête d'anniversaire avec Mariam et Sébastien en 2011. J'en garde un excellent souvenir.

Je vous remercie également Dr Bronnec, pour votre soutien et votre intérêt pour mon travail à chaque consultation. Vos anecdotes sur votre soutenance de thèse de médecine et vos travaux de recherche me manqueront.

Je n'oublie pas mes amis du club du kung-fu. Pratiquer cet art martial, vous rencontrer et voyager en Chine en 2009 avec certains d'entre vous m'ont fait très plaisir. A mon grand regret, je n'ai pas été très disponible pour qu'on se retrouve, surtout les dernières années de ma thèse, mais j'espère bien rattraper le temps perdu ! Je ne citerai pas tous les noms ici par peur d'en oublier ("la bande du kung-fu"), vous m'avez tous soutenue à votre manière, mais j'ai une pensée particulière pour Yannick, pour ta grande disponibilité, ta gentillesse et surtout ton soutien moral pendant mon travail, même si tu ne comprenais pas grand-chose à mes expériences.

Je n'oublie pas non plus mes amis d'université, et ceux de Cergy, notamment Haï-Ha et Johan. Un grand merci pour vos encouragements et votre soutien, surtout pendant ces longues heures au téléphone ou sur internet certaines soirées, au lieu de dormir (ou de travailler, au choix).

Enfin, je remercie vivement ma famille proche et plus lointaine, en Métropole et en Guadeloupe, pour votre soutien et vos encouragements continus tout au long de ces longues années. Cela n'a pas toujours été facile de vivre loin de vous, mais comme le dit le proverbe : « loin des yeux, près du cœur ». J'ajouterai une pensée particulière pour mes tantes, Nadine et Aurélie, parties en début et en fin de thèse, bien trop tôt dans tous les cas. Vous vouliez que je m'accroche, j'ai tenu bon grâce à votre souvenir.

RESUME

Le syndrome de Gougerot-Sjögren (SGS) est une maladie auto-immune (MAI) systémique inflammatoire chronique caractérisée principalement par la diminution des sécrétions salivaires et lacrymales, aboutissant à une sécheresse de la bouche et des yeux. Elle affecte principalement les femmes autour de la ménopause. Au niveau physiologique, le tissu épithélial des glandes salivaires (GS) est infiltré par des lymphocytes, ce qui provoque l'apoptose des cellules épithéliales (CE). L'épigénétique pouvant jouer un rôle important dans le développement des MAI comme le SGS, nous avons analysé l'expression d'éléments rétroviraux endogènes humains (HERV) et des microARN. Par ailleurs, afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les interactions lymphocytes-CE au niveau de la GS pathologique, nous avons mis en place un modèle de co-culture *in vitro* entre des CE et des lymphocytes B ou T (LB, LT). Nous avons également étudié le rôle de BAFF sur les CE qui expriment l'un de ses récepteurs, BR3.

Dans un premier temps, nous avons montré que dans les GS des patients, les HERV et les miARN ont un profil d'expression distinct de celui des personnes saines, montrant ainsi une participation de l'épigénétique dans la pathologie. Dans un deuxième temps, nous avons montré que les CE entrent en apoptose suite à l'interaction directe avec les lymphocytes B et T, en faisant intervenir la voie Fas pour les LT et la voie de la PKC δ pour les LB. En lien avec l'apoptose induite par les LB, nous avons démontré que BAFF est impliqué dans la survie des CE, et que le blocage de sa signalisation ou la sous-expression de son récepteur conduit à la mort des CE. Nous pouvons supposer que les LB entrent en compétition avec les CE pour le signal de survie apporté par BAFF, et que les CE qui s'en trouvent privées meurent. Finalement, nous avons montré que plusieurs formes de BAFF sont produites par les CE et reconnues de manière différente par les anticorps anti-BAFF. Il pourrait s'agir d'isoformes plus ou moins glycosylés ou de variants de BAFF. Cependant d'autres études sont nécessaires afin de les identifier.

Mots clés : syndrome de Gougerot-Sjögren, épigénétique, cellules épithéliales, apoptose, lymphocytes, BAFF, BR3, PKC δ

BAFF and B cells implication in salivary gland epithelial cells apoptosis in Sjögren's syndrome

SUMMARY

Sjögren's syndrome (SS) is an inflammatory systemic autoimmune disease (AID), mainly characterized by the decrease of salivary and lachrymal secretions. This leads to dry mouth and dry eyes. This chronic disease principally affects women around menopause. At the physiological level, salivary gland (SG) epithelial tissue is infiltrated by lymphocytes, leading to epithelial cells (EC) apoptosis. As epigenetics can play an important role in AID- such as SS development, we investigated human endogenous retroviral elements (HERV) and microRNA expression. Furthermore, in order to better understand the cellular and molecular mechanisms implied in lymphocyte-EC interactions in pathological SG, we set up an *in vitro* co-culture model between EC and B and T cells. We also studied BAFF role on EC which express one of its receptors, BR3.

First, we demonstrated that in SS SG, HERVs and miRNAs show a distinct profile from healthy controls, indicating that epigenetics is implied in the pathology. Secondly, we showed that EC undergo apoptosis following direct interaction with T and B cells, via two distinct signaling pathways: Fas pathway for T cells and PKC δ pathway for B cells. Linked with B cell-induced apoptosis, we demonstrated that BAFF is implied in EC survival, and that BAFF signaling blocking or BR3 down-regulation leads to EC death. We may suppose that B cells compete with EC for survival signaling from BAFF, and that EC die from lack of it. Finally, we showed that several forms of BAFF are expressed by EC and that they are differentially recognized by anti-BAFF antibodies. These may be more or less glycozylated BAFF isoforms or BAFF variants. Further studies are needed to identify them.

Key words : Sjögren's syndrome, epigenetics, epithelial cells, apoptosis, lymphocytes, BAFF, BR3, PKC δ

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations.....	11
Table des figures et des tableaux.....	18
INTRODUCTION.....	22
1. Aspects cliniques du syndrome de Gougerot-Sjögren (SGS).....	23
1.1. Le SGS primaire (primitif) et secondaire.....	23
1.2. Signes cliniques.....	24
1.2.1 Atteintes glandulaires.....	24
1.2.1.1 Physiologie des glandes salivaires.....	24
1.2.1.2 Signes cliniques glandulaires.....	26
1.2.2 Atteintes extra-glandulaires.....	27
1.3. Signes biologiques.....	29
1.3.1 Signes biologiques non spécifiques.....	29
1.3.2 Signes biologiques immunologiques : les auto-anticorps.....	29
1.3.2.1 Les anticorps anti-antigènes nucléaires (AAN).....	30
1.3.2.2 Les auto-anticorps associés avec des manifestations particulières du SGS 31	
1.3.2.2.1 Les anticorps anti-appareil mitotique.....	31
1.3.2.2.2 Les anticorps anti-anhydrase carbonique II.....	31
1.3.2.2.3 Les anticorps anti-récepteurs muscariniques (cf chapitre 4.4.4, Rôle de l'acétylcholine et des récepteurs muscariniques).....	32
1.3.2.2.4 Les anticorps anti-mitochondriaux (AAM).....	32
1.3.2.3 Les autres auto-anticorps.....	32
1.3.2.3.1 Les anticorps anti-fodrine.....	32
1.3.2.3.2 Les anticorps anti-Golgi.....	33
1.3.2.3.3 Miscellanées.....	33
1.3.3 L'infiltrat glandulaire.....	34

2.	Etiopathologie du syndrome de Gougerot-Sjögren	36
2.1.	Le rôle de la prédisposition génétique	36
2.1.1	L'agrégation familiale	36
2.1.2	Les principaux gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ..	36
2.1.3	Les autres gènes	37
2.1.4	Le polymorphisme des cytokines	37
2.2.	L'épigénétique	38
2.2.1	Méthylation de l'ADN	39
2.2.2	Modifications post-traductionnelles des histones	39
2.2.3	Les micro-ARN	40
2.2.4	L'inactivation du chromosome X	40
2.2.5	Implication de l'épigénétique dans le SGS	40
2.3.	Le rôle des virus	41
2.3.1	Les virus Coxsackies	41
2.3.2	Les rétrovirus	42
2.3.3	Virus EBV, CMV, HCV et HBV	42
2.4.	Le rôle des hormones	43
2.5.	Le microchimérisme	44
2.6.	Le rôle du stress	45
3.	Immunopathologie du SGS	47
3.1.	Le rôle des cellules épithéliales dans le SGS	47
3.1.1	L'activation in situ des CE dans le SGS	47
3.1.2	L'apoptose épithéliale et les exosomes	49
3.1.2.1	La voie Fas/FasL	49
3.1.2.2	La voie de la PKC δ	51

3.1.2.3	La voie TRAIL.....	55
3.1.2.4	Les corps apoptotiques.....	56
3.1.2.5	Les exosomes	56
3.1.3	La production des chemokines et l'attraction des lymphocytes	57
3.2.	Le rôle des lymphocytes T dans le SGS	58
3.3.	Le rôle des cellules dendritiques et des macrophages dans le SGS.....	60
3.3.1	Les cellules dendritiques	60
3.3.2	Les macrophages	62
3.4.	Le rôle des lymphocytes B dans le SGS	62
3.4.1	Les rôles principaux.....	62
3.4.1.1	Les LB circulants	62
3.4.1.2	Les LB dans les glandes salivaires.....	64
3.4.2	SGS et lymphome.....	65
3.5.	Le rôle de BAFF dans le SGS	67
3.5.1	Le gène de BAFF.....	67
3.5.2	Structure du gène de BAFF	68
3.5.3	Les variants de BAFF	69
3.5.3.1	Le transcrit long de BAFF (Ψ BAFF)	69
3.5.3.2	Le transcrit court de BAFF (Δ BAFF).....	69
3.5.3.3	Un nouveau variant de BAFF: Δ 4 BAFF	69
3.5.4	Les protéines de BAFF	70
3.5.4.1	BAFF et ses formes structurales	70
3.5.4.2	BAFF et la glycosylation	70
3.5.5	Les cellules exprimant BAFF	71
3.5.6	Les récepteurs de BAFF.....	71

3.5.7	Cellules exprimant les récepteurs de BAFF.....	73
3.5.7.1	Les LT.....	73
3.5.7.2	Les LB	74
3.5.7.3	Les autres types cellulaires	74
3.5.8	Signalisation de BAFF	74
3.5.8.1	L'action de BAFF sur la maturation et la différenciation des LB	74
3.5.8.2	Signalisation de BAFF au niveau du LB	75
3.5.8.2.1	La voie TRAF	75
3.5.8.2.2	La voie AKT.....	76
3.5.8.2.3	La voie Bim	77
3.5.8.2.4	La voie de la PKCδ.....	77
3.5.8.3	BAFF dans le SGS	78
4.	Pathogénie de la glande salivaire	80
4.1.	Altération de la membrane basale.....	80
4.2.	Rôle des jonctions serrées	80
4.3.	Rôle des aquaporines	82
4.4.	Rôle de l'acétylcholine et des récepteurs muscariniques.....	84
	<i>ARTICLE 1 B-cell tolerance breakdown in Sjögren's syndrome: focus on BAFF...</i>	<i>87</i>
	OBJECTIFS DE LA THESE.....	89
	RESULTATS	91
	<i>ARTICLE 2 Epigenetics and Sjögren's syndrome</i>	<i>92</i>
	<i>ARTICLE 3 In Sjögren's syndrome, B lymphocytes induce epithelial cells of salivary glands into apoptosis through protein kinase C delta activation.</i>	<i>97</i>
	<i>ARTICLE 4 BAFF-récepteur favorise la survie des cellules épithéliales en culture</i>	<i>102</i>
	DISCUSSION	129
	ANNEXES	139
	BIBLIOGRAPHIE.....	145

LISTE DES ABREVIATIONS

AAC : Anticorps Anti-Centromère
AAM : Anticorps Anti-Mitochondrial
AAN : Anticorps Anti-Nucléaire
Ac : Anticorps
Ach : Acétylcholine
ACTH : *Adrenocorticotropic Hormone*
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
Ag : Antigène
Apaf-1 : *Apoptotic Protease Activating Factor-1*
APRIL : *A Proliferation Inducing Ligand*
AQP : Aquaporine
ARN : Acide RiboNucléique
Auto-Ac : Auto-Anticorps
AV/IP : Annexine V / Iodure de Propidium
BAD : *Bcl2-Antagonist of cell Death*
BAFF : *B cell Activating Factor belonging to the TNF Family*
BAFF-R : *BAFF Receptor*
BCMA : *B Cell Maturation Antigen*
BCR : *B Cell Receptor*
BGSA : Biopsie des Glandes Salivaires Accessoires
BID : *Bcl-2 Interacting protein of cell Death*
BIM : Bcl-2 Interacting Mediator of cell death
BLyS : *B Lymphocyte Stimulator*
BR3 : *BLyS Receptor 3*
cADPR : *Cyclic Adenosine Diphosphate Ribose*
CBP : Cirrhose Biliaire Primitive

CD : Cellule Dendritique

CDm : Cellule Dendritique Myéloïde

CDp : Cellule Dendritique Plasmacytoïde

CDtip : *TNF α and iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) Producing Dendritic Cells*

CE : Cellule Epithéliale

CF : *Catalytic Fragment*

c-FLIP : *FLICE-Inhibitory Protein type c*

CG : Centre Germinatif

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : *Cytomegalovirus*

CPA : Cellule Présentatrice de l'Antigène

CRD : *Cystein Rich Domain*

CREB : *Cyclic AMP Responsive Element-Binding protein*

CTLA 4 : *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 4*

DAG : Diacyl Glycerol

DD : *Death Domain*

DED : *Death Effector Domain*

DHEA : Déhydroépiandrostérone

DHEA-S : Déhydroépiandrostérone-sulfate

DISC : Death-Inducing Signaling Complex

DLBCL : *Diffuse Large B Cell Lymphoma*

DNMT : *DNA MethylTransferase*

4EBP1 : *EIF4E (Eukaryotic Initiation Factor 4E) Binding Protein 1*

EBV : *Epstein-Barr Virus*

EIF4E : *Eukaryotic Initiation Factor 4E*

ERM : *Ezrin, Radixin and Myosin*

FADD : *Fas-Associated Death Domain*

FasL : *Fas Ligand*

Flt-3 : *Fms-Like Tyrosine kinase 3*

Flt-3L : *Fms-Like Tyrosine kinase 3-Ligand*

FOXO3A : *Forkhead box O3A*

FR : Facteur Rhumatoïde

GL : Glande Lacrymale

GRM : Globules Rouges de Mouton

GS : Glande Salivaire

GSK3 : *Glycogen Synthase Kinase 3*

GVHD : *Graft Versus Host Disease*

HBV : *Hepatitis B Virus*

HCV : *Hepatitis C Virus*

HERV : *Human Endogenous Retrovirus*

HIAP : *Human Intracisternal A-type retroviral Particle*

HIV : *Human Immunodeficiency Virus*

HRV-5 : *Human Retrovirus-5*

HSG : *Human Salivary Gland*

HTLV-1 : *Human T-Lymphotropic Virus-1*

ICAM-1 : *Intercellular Adhesion Molecule-1*

IFI : ImmunoFluorescence Indirecte

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

IP3 : Inositol 1, 4, 5-triphosphate

JS : Jonction Serrée

KDa : Kilo Dalton

LB : lymphocytes B

LBe : Lymphocyte B effecteur

LB Fo : Lymphocyte B Folliculaire

LBm : Lymphocyte B mature

LB T : Lymphocyte B Transitionnel

LB ZM : Lymphocyte B de la Zone Marginale

LED : Lupus Erythémateux Disséminé

LFA-1 : *Leucocyte Function-Associated antigen-1*

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

LNH : Lymphome Non-Hodgkinien

LT : Lymphocytes T

LT reg : Lymphocyte T Régulateur

M3R : Récepteur Muscarinique 3

MAI : Maladie Auto-Immune

MALT : *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*

MB : Membrane Basale

MBD : *Methyl CpG Binding Domain*

MCL1 : *Myeloid Cell Leukaemia sequence 1*

MiARN : microARN

MMP : *Matrix Metalloproteinase*

MO : Moelle Osseuse

MP : Membrane Plasmique

MR : *Muscarinic Receptor*

mTOR : *Mammalian Target Of Rapamycin*

NFκB : Nuclear Factor κB

OLS : Organe Lymphoïde Secondaire

PARP : *Poly-(ADP-ribose) Polymerase*

Pb : Paire de Bases

PBMC : *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

PDK1 : Phosphoinositide Dependent protein Kinase 1

PI3K : Phospho Inositide 3-Kinase

PKC : Protéine Kinase C

PLC : Phospholipase C

PMA : Phorbol 12-Myristate 13-Acetate

PR : Polyarthrite Rhumatoïde

PtdIn(3,4,5)P3 : Phosphatidyl Inositol-3, 4, 5-Triphosphate

PTM : Protéine Transmembranaire

PTPN22 : *Protein Tyrosine Phosphatase Non Receptor type 22*

RE : Réticulum Endoplasmique

RM : Récepteur Muscarinique

RNP : Ribonucléoprotéine

S6K1 : S6 Kinase 1

SGEC : Salivary Gland Epithelial Epithelial Cell

SGS : Syndrome de Gougerot-Sjögren

SVF : Sérum de Veau Foetal

TAC1 : *Transmembrane Activator and Calcium α modulator ligand (CAML) Interactor*

THD : *TNF Homology Domain*

TLR : *Toll-Like Receptor*

TMD : *Transmembrane Domain*

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

TRAF : *TNF Receptor Associated Factor*

TRAIL: *TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*

UTR : *Untranslated Region*

VCAM : *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*

VIH : *Virus de l'Immunodéficience Humaine*

VLA-4 : *Very Late Antigen-4*

ZM : *Zone Marginale*

TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Table des figures

<u>Figure 1</u> : Anatomie et localisation des glandes salivaires principales.	24
<u>Figure 2</u> : Structure histologique d'une portion de glande salivaire mixte.....	25
<u>Figure 3</u> : Signalisation induite par Fas.....	50
<u>Figure 4</u> : Structure de la PKC δ , d'après Malavez et al, 2008.	52
<u>Figure 5</u> : Activation de la PKC δ et induction de l'apoptose, d'après Malavez et al, 2008.	54
<u>Figure 6</u> : La CE comme conducteur des lésions immunes dans le SGS, d'après Manoussakis et Kapsogeorgou, 2007.	58
<u>Figure 7</u> : Infiltration des LT dans la GS au cours du SGS, d'après Katsifis, 2007...	59
<u>Figure 8</u> : Possible implication des CD dans la pathogénèse du SGS, d'après Jonsson et al, 2011.	61
<u>Figure 9</u> : Maturation et différenciation des LB dans l'OLS, d'après Pers et al, 2008.	64
<u>Figure 10</u> : Représentation du gène humain et murin de BAFF, d'après Bossen, 2006.	68
<u>Figure 11</u> : Représentation des formes structurales de BAFF, d'après Bossen et Schneider, 2006.	70
<u>Figure 12</u> : Structure de BAFF, APRIL et de leurs récepteurs, d'après Mackay, 2002.	73
<u>Figure 13</u> : Expression des récepteurs de BAFF et d'auto-réactivité pendant l'ontogénèse des LB, d'après Varin et al, 2010.	75
<u>Figure 14</u> : Recrutement des protéines TRAF au niveau du récepteur TACI, d'après Mackay et Schneider, 2009.....	76
<u>Figure 15</u> : Implication de TRAF2 et TRAF3 dans la signalisation de BAFF passant par BR3, d'après Mackay et Scheider, 2009.	76
<u>Figure 16</u> : Principales voies de signalisation impliquant BAFF au niveau du LB, d'après Mackay et Schneider, 2009.	77
<u>Figure 17</u> : Schéma de la sécrétion salivaire : représentation de la coupe transversale de la glande salivaire, au niveau d'un acinus et de son canal, d'après Catalan et al, 2009.	83

<u>Figure 18</u> : Régulation de la sécrétion de salive par l'acétylcholine (Ach), d'après Tobin et al, 2009.....	85
<u>Figure 19</u> : Schéma général : Principaux mécanismes aboutissant à l'apoptose des CE et à la destruction de l'épithélium dans le SGS.	136

Table des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Composition et fonction des glandes salivaires.	25
<u>Tableau 2</u> : Principales manifestations glandulaires liées au SGS.	27
<u>Tableau 3</u> : Principales manifestations extra-glandulaires liées au SGS et leur fréquence, d'après Tzioufas et Voulgarelis, 2007 et Pavlakis et al, 2011.....	28
<u>Tableau 4</u> : Fréquence des auto-anticorps anti-SSA, anti-SSB et anti-SSC dans le SGS, la PR et le LED, d'après Sany, 1989.	30
<u>Tableau 5</u> : Corrélation entre les auto-anticorps spécifiques et les manifestations cliniques du SGS, d'après Routsias, 2007.	34
<u>Tableau 6</u> : Définition de la classification du score de Chisholm et Mason, d'après Ziza, 2004.	35
<u>Tableau 7</u> : Principaux syndromes lymphoprolifératifs à cellules B, d'après Sotto, 2005.	67
<u>Tableau 8</u> : Nomenclature de BAFF.	68
<u>Tableau 9</u> : Nomenclature des récepteurs de BAFF.....	72

INTRODUCTION

1. Aspects cliniques du syndrome de Gougerot-Sjögren (SGS)

1.1. Le SGS primaire (primitif) et secondaire

Le syndrome de Gougerot-Sjögren (SGS) est une maladie autoimmune (MAI) systémique inflammatoire découverte au siècle dernier par Henri Gougerot (1881-1955) et Henrik Sjögren (1899-1961) (**Annexe 1**). Cette pathologie chronique se caractérise principalement par la diminution des sécrétions salivaires et lacrymales, aboutissant à une sécheresse au niveau de la bouche (xérostomie) et des yeux (xérophtalmie).

Le SGS peut intervenir de manière isolée (on parle de SGS primaire ou primitif), ou secondairement à une MAI systémique, comme la polyarthrite rhumatoïde (PR), le lupus érythémateux disséminé (LED) ou la sclérodermie. On parle alors de SGS secondaire. Il peut également être associé à une MAI spécifique d'organe comme la thyroïdite auto-immune (TAI) ou la cirrhose biliaire primitive (CBP).

Le SGS touche 9 femmes pour 1 homme. Cette maladie affecte principalement les femmes autour de la ménopause, vers 40-50 ans. La prévalence de la maladie varie entre 0,1 et 3% (Binard et al, 2007).

Le SGS n'est pas une maladie fatale en principe, mais va affecter la qualité de vie des patients. Cependant une évolution vers le lymphome est observée chez 5 % des patients. A l'heure actuelle, il n'y a pas de traitement définitif disponible.

Les critères de classification du groupe de consensus américano-européen du SGS ont été établis en 2002 (Vitali et al, 2002). Ils permettent également de définir les critères cliniques et biologiques de diagnostic du SGS (**Annexe 2**).

1.2. Signes cliniques

Le SGS est une maladie à développement lent, les premières manifestations peuvent être non-spécifiques et apparaître jusqu'à quelques années avant l'établissement du diagnostic. Le SGS affecte le plus souvent les glandes exocrines, particulièrement celles des yeux et de la bouche. On parle d'atteinte glandulaire. Cependant, il peut également affecter d'autres organes, on parle alors d'atteinte extra-glandulaire.

1.2.1 Atteintes glandulaires

Le SGS touche principalement les glandes exocrines situées au niveau de la bouche et des yeux. En effet, les patients se plaignent le plus souvent de sécheresse buccale et/ou oculaire. Cela est dû à l'invasion et au remplacement progressif du tissu épithélial des glandes salivaires (GS) et/ou oculaires par des cellules immunitaires. L'épithélium glandulaire est progressivement détruit, conduisant à terme à la diminution de la fonction sécrétrice des glandes (salive ou larmes). Dans ce rapport, nous nous intéresserons particulièrement au syndrome sec associé aux GS.

1.2.1.1 Physiologie des glandes salivaires

Les GS font partie du système digestif. Elles participent à la sécrétion de la salive, aident à la lubrification, à la protection de la bouche et à la mastication. La **figure 1** et le **tableau 1** représentent la localisation et la composition des GS.

Figure 1 : Anatomie et localisation des glandes salivaires principales.

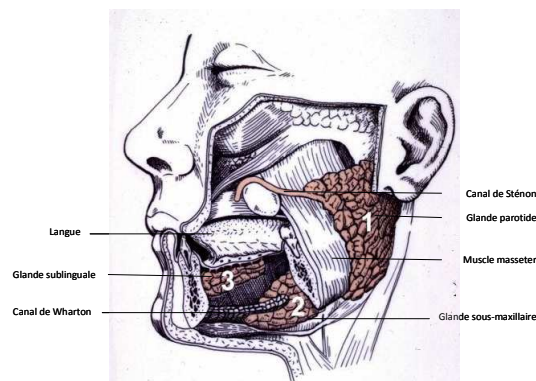
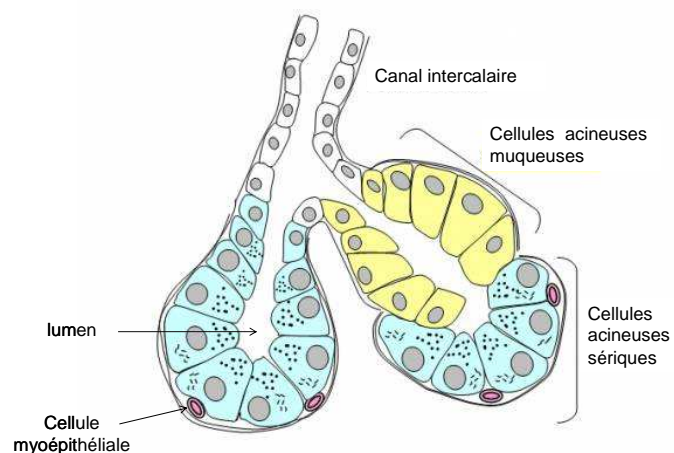


Tableau 1 : Composition et fonction des glandes salivaires.

COMPOSITION	Trois paires de GS principales : parotides, sub-linguales et sous-maxillaires. Des GS accessoires .
DESCRIPTION	<p>GS parotides: les plus volumineuses, elles sont situées en arrière de l'os montant du maxillaire, la partie de la joue proche du lobe de l'oreille. Ces GS libèrent la sécrétion de salive et des enzymes salivaires à travers le canal de Sténon s'ouvrant dans la bouche.</p> <p>GS sub-linguales: de forme aplatie transversalement, elles sont situées dans le plancher buccal. Ces GS sont en fait un regroupement de petites glandes dont chacune possède son canal excréteur.</p> <p>GS sous-maxillaires (sous-mandibulaires): de forme ovale, elles sont situées dans la partie latérale de l'os maxillaire. Elles véhiculent la salive à travers le canal de Wharton s'ouvrant dans le plancher buccal.</p> <p>GS accessoires: très nombreuses, elles se trouvent surtout au niveau de la face interne de la lèvre inférieure, de la face interne de la joue, autour du conduit parotidien et dans la muqueuse du voile du palais.</p>

Les GS sont composées de structures tubulaires ou acineuses. De manière générale, elles comportent une partie acineuse sécrétrice (qui peut être séreuse, muqueuse ou mixte selon la composition du liquide sécrété) et d'une structure en canaux. De plus, autour des cellules acineuses, des cellules myoépithéliales se contractent et entraînent le produit de sécrétion vers la lumière de l'acinus (lumen) (**Figure 2**).

Figure 2 : Structure histologique d'une portion de glande salivaire mixte.



1.2.1.2 Signes cliniques glandulaires

De part le rôle de la salive dans la lubrification de la bouche, l'hyposialie (diminution de la sécrétion de salive) provoque souvent une gêne pour avaler les aliments, et pour la phonation. La sécheresse buccale peut être douloureuse. Par ailleurs, les propriétés antibactériennes et antifongiques de la salive sont très importantes pour la santé buccale. Ainsi, du fait de l'hyposialie, les patients présentent souvent des problèmes dentaires (caries, dents fragilisées, maladies parodontales) et des infections. L'article de Yan et al (2011) démontre que la majorité des infections orales concernent le champignon de type levure *Candida albicans*, et qu'il est possible pour certains patients d'être multi-infectés (*Candida albicans* plus une autre espèce de *Candida*).

60% des patients présentent une hypertrophie des GS (Tzioufas et al, 2007). Les glandes parotides sont le plus souvent affectées par le gonflement, mais les glandes sous-maxillaires peuvent l'être également. Le gonflement des GS peut survenir de manière épisodique ou permanente, selon les patients. Il peut apparaître de manière unilatérale pour devenir bilatérale par la suite.

Au niveau des yeux, les principaux symptômes sont la sensation de présence de corps étranger et la sécheresse oculaire due à la diminution de la sécrétion de larmes.

D'autres glandes exocrines peuvent être affectées par le SGS. Les patients peuvent ainsi souffrir de sécheresse au niveau nasal, pulmonaire, vaginal.

Le **tableau 2** reprend les principales affections du SGS au niveau de la bouche et des yeux.

Tableau 2 : Principales manifestations glandulaires liées au SGS.

Principales manifestations au niveau de la bouche	Principales manifestations au niveau des yeux
Xérostomie	Xérophtalmie
Gêne lors de la mastication et de la déglutition	Sensation de sable ou de corps étranger dans les yeux
Nécessité de boire beaucoup d'eau en mangeant, parlant et pendant la nuit	Ulcération de la cornée
Langue fissurée	Infections
Caries et complications parodontales (gingivites, dents fragilisées, infections)	Photophobie
Hypertrophie des glandes salivaires	

1.2.2 Atteintes extra-glandulaires

50% des patients présentent des manifestations systémiques, telles une fatigue importante, une fièvre modérée, des douleurs articulaires et musculaires, ou l'atteinte d'autres organes (Tzioufas et al, 2007).

Selon le temps d'apparition des symptômes, on distingue les atteintes péri-épithéliales, résultant de l'invasion de l'épithélium par des lymphocytes, au-delà des glandes exocrines. On peut retrouver par exemple une atteinte hépatique, une néphrite interstitielle ou une bronchiolite obstructive. Ces signes cliniques apparaissent précocement dans la pathologie du SGS. Parmi ces manifestations, on peut retrouver un purpura palpable, une glomérulonéphrite ou une neuropathie périphérique. Ces atteintes sont souvent observées tardivement dans la maladie et sont associées à l'augmentation de la morbidité et au risque de développement de lymphomes (Tzioufas et al, 2007).

Le **tableau 3** récapitule les principales manifestations extra-glandulaires retrouvées au cours du SGS et leur fréquence.

Un symptôme clinique extra-glandulaire souvent rencontré chez les patients est l'atteinte des articulations. Fauchais et al (2010) démontrent que 45% des patients atteints d'un SGS primaire souffrent également des articulations. Ce symptôme peut

précéder ou apparaître en même temps que le syndrome sec. Les atteintes articulaires apparaissent donc précocement dans la pathologie, souvent en association avec d'autres manifestations systémiques du SGS comme des atteintes cutanées (Roguedas et al, 2006) et du système nerveux.

Tableau 3 : Principales manifestations extra-glandulaires liées au SGS et leur fréquence, d'après Tzioufas et Voulgarelis, 2007 et Pavlakis et al, 2011.

Manifestation	Fréquence (%)
Arthralgie/arthritis	75
Neuropathie périphérique	2-60
Phénomène de Raynaud	48
Atteintes pulmonaires	23
Purpura	11
Néphrite interstitielle	9
Cirrhose biliaire primitive	4
Lymphome	4
Glomérulonéphrite	2
Myosite	1

Un état de fatigue (somatique et mentale) est couramment rapporté par les patients, affectant grandement leur qualité de vie. Cette fatigue chronique ou la somnolence diurne peuvent être associées à un sommeil de mauvaise qualité, souvent perturbé par des douleurs musculo-squelettiques, le syndrome sec, l'anxiété ou une dépression (Theander et al, 2010).

Ainsi, le SGS est une pathologie multidisciplinaire impliquant différents praticiens : chirurgien-dentiste, ophtalmologiste, oto-rhino-laryngologiste, rhumatologue, immunologiste, gastroentérologue, neurologue, urologue, néphrologue, dermatologue, psychiatre.

1.3. Signes biologiques

1.3.1 Signes biologiques non spécifiques

Les principaux signes biologiques du SGS sont l'augmentation de la vitesse de sédimentation ou une anémie. Une leucopénie ou une thrombopénie sont plus rares.

La cryoglobulinémie est caractérisée par la présence d'immunoglobulines circulantes qui précipitent à des températures en-dessous de 37°C. Environ 20% des patients sont positifs pour ces cryoglobulines (Ioannidis et al, 2002). Une cryoglobulinémie positive est souvent signe d'un risque d'évolution vers un lymphome malin et d'une atteinte sévère des organes internes (Routsias et al, 2007).

Une hypergammaglobulinémie polyclonale est retrouvée fréquemment (surtout des IgG) ainsi qu'une augmentation de la β 2-microglobuline dans le sérum, la salive et parfois l'urine. Une hypocomplémentémie (faible taux de C3/C4) et une lymphocytopénie sont des facteurs prédictifs du lymphome dans le SGS primaire (Solans-Laqué et al, 2011). En effet, l'étude de Ramos-Casals et al (2005) démontre qu'il y a une association forte entre de faibles taux de C4 et la prévalence notamment de lymphadénopathie, de neuropathie périphérique, de vascularite cutanée, de cryoglobulines et de lymphome.

1.3.2 Signes biologiques immunologiques : les auto-anticorps

La présence d'auto-anticorps (Ac) est caractéristique des MAI. Des anticorps dirigés contre des antigènes nucléaires (AAN) sont retrouvés dans le sérum de 90% des patients (Routsias et al, 2007). De plus, des anticorps dirigés contre des organes ou des auto-antigènes spécifiques des tissus sont fréquemment retrouvés.

Les facteurs rhumatoïdes (FR), autoanticorps souvent observés dans la PR (70% des patients positifs) (Wolfe et al, 1991) sont retrouvés à des titres élevés chez 40 à 50% des patients atteints de SGS primaire (Pertovaara et al, 2001).

1.3.2.1 Les anticorps anti-antigènes nucléaires (AAN)

Les AAN les plus représentés dans le SGS reconnaissent les ribonucléoprotéines (RNP) Ro/SSA et La/SSB. Ces Ac sont présents dans 60-70% des cas de SGS et sont souvent requis pour établir le diagnostic et l'activité systémique du SGS (Hernandez-Molina et al, 2011).

Dans le SGS primaire, les Ac anti-Ro/SSA sont présents seuls dans 50 à 70% des cas, ou associés aux Ac anti-La/SSB dans 30 à 60% des cas. Retrouver des Ac anti-La/SSB seuls est un phénomène rare (Elkon et al, 1984). S'ils sont utiles pour le diagnostic du SGS, les Ac-anti Ro/SSA ne sont pas spécifiques de cette MAI. En effet, ils sont également présents dans 25 à 35% des cas de LED (Agarwal, 2003 et **tableau 4**). Les Ac anti-La/SSB sont fréquemment observés chez des patients ayant déjà des Ac anti-Ro/SSA. Ils sont retrouvés dans 40 à 71% des cas de SGS primaire dont ils sont assez spécifiques. La positivité pour les Ac anti-Ro/SSA et anti-La/SSB est souvent associée à des atteintes extraglandulaires, comme la vascularite ou une infiltration lymphocytaire des GS plus importante (Harley JB et al, 1982).

Tableau 4 : Fréquence des auto-anticorps anti-SSA et anti-SSB dans le SGS, la PR et le LED, d'après Sany, 1989.

	Anti-SSA (Ro)	Anti-SSB (La)
SGS primaire	54 à 88%	45 à 71%
LED + SGS	53 à 72%	20%
LED	25 à 35%	5 à 15%
PR + SGS	11%	5%
PR	3%	2%

1.3.2.2 Les auto-anticorps associés avec des manifestations particulières du SGS

1.3.2.2.1 Les anticorps anti-appareil mitotique

Les anticorps anti-centromères (AAC)

Les AAC sont traditionnellement associés au syndrome de CREST ou à une sclérose systémique limitée (Miyawaki et al, 2005). Cependant, ils sont retrouvés chez des patients atteints du syndrome de Raynaud avec une CBP, dans le lupus ou la PR (Salliot et al, 2007).

Les AAC reconnaissent plusieurs antigènes du centromère des chromosomes humains (CENP). L'étude de Pillemer et al (2004) montre que 22% des patients ayant un SGS primaire ont des anticorps anti-CENP, dirigés principalement contre la protéine CENP-C, et sont associés aux auto-anticorps anti-Ro/SSA et anti-La/SSB. Des AAC anti-CENP-H ont également été rapportés dans l'étude de Hsu et al, en 2006. Du point de vue clinique, la positivité pour les AAC est significative d'un phénomène de Raynaud et d'une sclérodactylie.

Les anticorps anti-NuMA 1 et NuMA 2

Des anticorps anti-fuseau mitotique (NuMA 1 et NuMA 2) sont parfois retrouvés dans le sérum de patients atteints de SGS. Comparés aux anticorps anti-NuMA2, les anti-NuMA1 sont plutôt associés au titre sérique des anti-NuMA, à la prédominance féminine et au jeune âge des patients atteints de SGS (Szalat et al, 2010). Ces autoanticorps sont plutôt isolés et ne sont pas associés à d'autres autoanticorps anti-nucléaires dans près de 75% des cas.

1.3.2.2.2 Les anticorps anti-anhydrase carbonique II

L'anhydrase carbonique est une enzyme qui catalyse la réaction réversible du dioxyde de carbone pour générer un proton et un ion bicarbonate, régule l'homéostasie acido-basique dans les érythrocytes, la chambre aqueuse de l'œil et

les tubules rénaux. L'anydrase carbonique II est la seule forme soluble de l'enzyme, elle est retrouvée dans le cytosol des cellules tubulaires rénales distales et proximales (Tzioufas et al, 2007). Des anticorps dirigés contre cette forme soluble de l'enzyme ont été retrouvés dans le sérum de patients atteints de SGS (Kino-Ohsaki et al, 1996, Itoh et al, 1992, Inagaki et al, 1991). La positivité pour ces autoanticorps peut être le signe d'une acidose tubulaire rénale distale.

1.3.2.2.3 Les anticorps anti-récepteurs muscariniques (cf chapitre 4.4.4, Rôle de l'acétylcholine et des récepteurs muscariniques)

L'acétylcholine (Ach) est un neurotransmetteur parasympathique régulant la sécrétion glandulaire. Il se lie aux récepteurs muscariniques (RM) présents à la surface des cellules épithéliales des GS. Des anticorps anti-RM (et plus particulièrement le récepteur M3R) ont été retrouvés dans le sérum de patients atteints de SGS. Ces autoanticorps fonctionnels reconnaissent le M3R et inhibent la neurotransmission, rendant les cellules moins sensibles à la stimulation muscarinique et réduisant ainsi la sécrétion de salive (Waterman et al, 2000).

1.3.2.2.4 Les anticorps anti-mitochondriaux (AAM)

Les AAM sont retrouvés chez 6.6% des patients atteints de SGS (Skopouli et al, 1994). Ces autoanticorps sont associés à des complications hépatiques pouvant s'apparenter à la cirrhose biliaire primitive (CBP).

1.3.2.3 Les autres auto-anticorps

1.3.2.3.1 Les anticorps anti-fodrine

La fodrine est un constituant du cytosquelette, formé de deux protéines, l'alpha-fodrine et la beta-fodrine. La fodrine forme des tétramères se liant à l'actine, la calmoduline et les microtubules (Bennett et al, 1990). Elle s'associe avec des canaux ioniques et des pompes.

En 1997, Haneji et al démontrent que des anticorps présents dans le sérum de patients ayant un SGS reconnaissent la forme clivée de l'alpha-fodrine. Le clivage et

la libération de ce fragment dans le milieu extracellulaire rendent l'alpha-fodrine auto-antigénique.

Ainsi, le clivage et la distribution altérée de la fodrine pourraient déréguler la fonction sécrétrice de la glande et contribuer à la réponse auto-immune envers cette protéine.

1.3.2.3.2 Les anticorps anti-Golgi

L'appareil de Golgi est un organe important dans l'apportement, le transport et l'adressage des protéines intracellulaires après leur synthèse dans le réticulum endoplasmique granuleux.

En 1982, Rodriguez et al démontrent que le sérum d'un patient atteint de SGS et d'un lymphome contient des anticorps anti-appareil de Golgi. Des études plus récentes ont montré que dans le SGS, des anticorps sériques reconnaissent surtout la giantine (Nozawa et al, 2004) ou la molécule golgin-97 (Griffith et al, 1997), appartenant à l'appareil de Golgi.

1.3.2.3.3 Miscellanées

D'autres anticorps ciblant d'autres auto-antigènes peuvent parfois être retrouvés dans le sérum de patients atteints de SGS. On peut citer l'actine, devenue antigénique suite à une modification post-traductionnelle (Stea et al, 2006), le facteur de transcription NOR 90/hUBF (protéine organisatrice de la région nucléolaire de 90kDa), la coiline p80 (Onouchi et al, 1999), la lipocaline, une protéine hautement exprimée dans la salive et les larmes, la PARP (poly-(ADP-ribose)-polymerase), molécule de signalisation apoptotique, l'ICA69 (auto-antigène des cellules des îlots de 69kDa, retrouvée dans les GS et lacrymales, dans les cellules beta du pancréas et le tissu nerveux) (revue Routsias et al, 2007), les sous-unités alpha et beta du protéasome (Feist et al, 1999). D'après Ramos-Casals et al (2006), 13% des patients ont des anticorps anti-phospholipide, tandis que 6% des patients ont des ANCA (anticorps cytoplasmiques anti-neutrophiles) et 1.5% des patients ont des anticorps anti-Sm, reconnaissant des protéines constituant les snRNP (small nuclear ribonucleoproteins).

Le **tableau 5** établit la corrélation entre les auto-anticorps et les manifestations cliniques du SGS.

Tableau 5 : Corrélation entre les auto-anticorps spécifiques et les manifestations cliniques du SGS, d'après Routsias, 2007.

Auto-anticorps	Manifestations cliniques
Anti-centromère	Phénomène de Raynaud et sclérodactylie
Anti-anhydrase carbonique II	Acidose tubulaire rénale distale
Anti-récepteurs muscariniques	Hypofonction glandulaire et diminution de la sensibilité des cellules à la stimulation muscarinique
Anti-mitochondrie	Pathologie hépatique et CBP
Facteurs rhumatoïdes	Haut risque de lymphomes et indicateur d'endommagements sévères de la glande salivaire
Cryoglobulines	Évolution fréquente vers les lymphomes malins et atteinte sévère des organes internes

1.3.3 L'infiltrat glandulaire

Le SGS affecte surtout les glandes exocrines. Le tissu épithélial est graduellement remplacé par des infiltrats de lymphocytes et de plasmocytes, ce qui conduit à la diminution de la fonction sécrétrice des glandes.

La biopsie des GS accessoires (BGSA) permet de confirmer l'atteinte des GS. L'examen histologique des GS renseigne sur l'importance de l'infiltrat lymphocytaire, le degré d'altération des structures glandulaires et celui de la prolifération fibroblastique (fibrose) (Chisholm, Mason, 1968).

La classification (score) semi-quantitative de Chisholm et Mason est utilisée pour standardiser la zone examinée et connaître le degré de changement histopathologique de la biopsie. Elle fait intervenir la notion de foyers (ou foci) définis

par le groupement d'au moins 50 cellules lymphoplasmocytaires sur un champ de 4mm² de tissu salivaire (Waterhouse et Doniach, 1966).

Les résultats sont énoncés sous forme d'un score de 0 à 4, selon l'importance de l'infiltration. Les scores 3 et 4 sont plutôt évocateurs du SGS (Chisholm et Mason, 1968).

Tableau 6 : Définition de la classification du score de Chisholm et Mason, d'après Ziza, 2004.

Stade	Cotation histologique de Chisholm et Mason
0	Glande normale, pas d'infiltrat
1	Infiltrat léger
2	Infiltrat moyen comportant moins d'un foyer par 4mm ²
3	1 foyer par 4mm ²
4	Plusieurs foyers par 4mm ²

Les lymphocytes majoritaires dans les infiltrats sont les lymphocytes T (LT) dont 75% sont des LT CD4⁺. Les lymphocytes B (LB) représentent 20 à 30% des cellules de l'infiltrat. Ces LB peuvent s'organiser en structures lymphoïdes appelées centres germinatifs (CG) ectopiques (Le Pottier et al, 2009) avec probablement une production locale d'Ac anti-Ro/SSA et anti-La/SSB (Salomonsson et al, 2003).

2. Etiopathologie du syndrome de Gougerot-Sjögren

L'étiologie exacte du SGS est encore mal connue. Cependant, plusieurs facteurs sont décrits, comme déclenchant ou amplifiant la maladie. Ainsi, dans cette partie, nous étudierons successivement les acteurs potentiellement impliqués dans l'initiation du SGS, c'est-à-dire, le rôle de la prédisposition génétique, de l'épigénétique, de l'environnement, du microchimérisme, des hormones et du stress.

2.1. Le rôle de la prédisposition génétique

Plusieurs observations laissent à penser que la génétique a un rôle dans l'apparition du SGS. Par exemple, la forte prédominance féminine des personnes atteintes ou le fait qu'il n'est pas rare qu'une personne atteinte de SGS ait des membres de sa famille touchés par d'autres types de MAI.

2.1.1 L'agrégation familiale

Concernant l'agrégation familiale, il n'est pas rare de trouver des membres de l'entourage d'un patient souffrant de SGS atteints d'un autre type de MAI. Ainsi, des pathologies telles que le LED, la PR, les MAI thyroïdiennes, le diabète de type I ou le vitiligo ont déjà été reportées dans l'entourage de patients atteints de SGS (revue Anaya et al, 2006a).

2.1.2 Les principaux gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

Le chromosome 6 humain comporte une région de 3,6 Mb codant pour le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Le CMH joue un rôle très important dans la régulation de l'immunité innée et adaptative. Il comporte des gènes hautement polymorphiques et de ce fait, présente une influence génétique de susceptibilité majeure aux MAI (Horton et al, 2004).

Les gènes les mieux caractérisés dans cette région CMH sont ceux de type II (CMH-II) et codant les protéines membranaires de présentation de l'antigène (HLA). L'étude du HLA permet d'identifier des marqueurs de prédiction génétique et de fournir des renseignements concernant les mécanismes de présentation de l'antigène et des réponses auto-immunes. Les allèles HLA-DR et HLA-DQ représentent les associations les plus fréquemment étudiées dans le SGS (Reveille, 1992), surtout HLA-DRB1 et HLA-DQB1 (Anaya et al, 2005). Il a également été démontré une forte association entre la présence des anticorps anti-Ro/SSA et anti-La/SSB et le HLA-DQB1 et HLA-DRB1 (Cobb et al, 2008).

2.1.3 Les autres gènes

D'autres gènes n'appartenant pas au système HLA ont été décrits dans le SGS, par exemple le gène TAP ou du TNF α .

La protéine TAP est nécessaire au transport et à l'adressage de peptides spécifiques aux molécules CMH. L'étude de Kumagai et al (1997) montre qu'il y a une augmentation du taux d'anticorps anti-Ro/SSA chez des patients, en lien avec la présence d'un allèle de TAP2 (Bky2). Cependant, cette association n'a pas été retrouvée dans l'étude de Jean et al (1998) ni celle d'Anaya et al (2002b).

Le gène codant le TNF α est hautement polymorphique. En 2004, Gottenberg et al démontrent qu'il y a une association entre l'allèle TNF2 et la positivité pour les anticorps anti-La/SSB dans le SGS. Cette association a été confirmée dans la population colombienne par Correa et al (2005).

2.1.4 Le polymorphisme des cytokines

Le SGS a été associé au polymorphisme du gène de plusieurs cytokines.

L'IL-10 est principalement produite par les monocytes. Elle induit la prolifération des LB et la production d'anticorps (comme les IgG1 et IgG2). Le gène de l'IL-10 est hautement polymorphique. L'influence du locus de l'IL-10 dans le SGS primaire a été confirmée par plusieurs études (Anaya et al. 2002a; Gottenberg et al. 2004).

La famille de l'IL-1 comporte l'IL-1 α , L'IL-1 β , deux récepteurs et un récepteur antagoniste de l'IL-1 (IL-1Ra) qui inhibe l'activité de l'IL-1 α et l'IL-1 β et module une variété de réponses immunes et inflammatoires liées à IL-1. IL-1Ra est codé par le gène IL1RN. Un polymorphisme a été retrouvé au niveau de l'exon 2 et considéré comme marqueur pour l'apparition du SGS (Perrier et al, 1998). Il a également été observé une augmentation du taux sérique d'IL-1Ra chez des patients.

Le PTPN22 (protein tyrosine phosphatase non receptor type 22) est exprimé surtout par les tissus lymphoïdes. Le gène code pour la protéine Lyp qui déphosphoryle les kinases Lck, Fyn et Zap-70, qui ont un rôle important dans la signalisation perçue par le récepteur à l'antigène du LT, mais son extrémité C-terminale contient un site de liaison pour les tyrosines kinases Src (Csk), ce qui lui permet de réguler de manière négative la signalisation des LT (Ittah et al, 2005). Cette régulation négative peut également s'effectuer par sa liaison à la molécule adaptatrice Grb2. L'allèle 1858T de PTPN22 est associé à plusieurs MAI, comme le SGS (Gomez et al, 2005), le diabète de type I, la PR, l'arthrite idiopathique juvénile, le LED (revue Cobb et al, 2010). Cet allèle interrompt l'interaction de Lyp et Csk, conduisant à un état d'activation aberrant des LT (Ittah et al, 2005).

Le CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) est un régulateur négatif important pour les réponses immunes des LT. Il contribue au maintien de la tolérance périphérique et agit pour supprimer l'activation des LT et la production de cytokines pro-inflammatoires. Il peut aussi déclencher l'apoptose des LT activés (Downie-Doyle et al, 2006). Le polymorphisme de ce gène a été retrouvé associé au SGS (Downie-Doyle et al, 2006, Gottenberg et al, 2007).

2.2. L'épigénétique

L'épigénétique regroupe un ensemble de mécanismes régulateurs qui modifient l'expression d'un gène sans changer sa séquence génomique (Hedrich et al, 2011). Ces modifications peuvent être maintenues tout au long de la vie d'une cellule et transmises par division cellulaire. Elles sont associées à plusieurs maladies, dont le cancer, les MAI, les maladies cardiaques et de la peau (Lu et al, 2010).

Les régulations épigénétiques jouent un rôle important dans l'expression d'un gène au niveau individuel, et dans l'expression « tissu-spécifique » ou « cellule-spécifique » des gènes. Elles sont propres à chaque individu.

Les trois principales modifications épigénétiques sont la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et les micro-ARNs.

2.2.1 Méthylation de l'ADN

Pendant la transcription, des facteurs se lient à des régions spécifiques de l'ADN, au niveau du promoteur. Lorsque des gènes ne doivent pas être exprimés, le meilleur moyen est d'empêcher les facteurs de transcription de se lier à l'ADN. Pour cela, des enzymes appelées DNA methyltransferases (DNMTs) transfèrent un groupement methyl (-CH₃) au niveau du carbone 5 des cytosines des groupements cytosine-phosphate-guanosine (CpG). Ces dinucléotides peuvent être plus concentrés au niveau de séquences répétitives constituant des régions spécifiques appelées îlots CpG. La plupart de ces îlots chevauchent la région du promoteur. La méthylation de l'ADN au niveau du promoteur est souvent associée à la répression transcriptionnelle (Ballestar et al, 2011).

L'ADN peut être déméthylé par des protéines de liaison aux domaines-CpG méthylés appelés MBD pour methyl CpG binding domain (Renaudineau et al, 2010).

2.2.2 Modifications post-traductionnelles des histones

Les modifications des histones peuvent être l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination, la phosphorylation, la sumoylation, la déimination/citrullination, l'ADP-ribosylation et l'isomérisation de la proline (Dieker et al, 2010).

L'acétylation des histones H3 et H4 par les histones acétyl transférases (HAT) favorise l'activation de la transcription. La méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9, induite par les méthyl transférases, réprime la transcription (Brooks et al, 2010).

2.2.3 Les micro-ARN

Les micro-ARN (miARN) sont des régulateurs post-transcriptionnels impliqués dans plusieurs mécanismes biologiques comme le développement, la différenciation, la prolifération et l'apoptose (Filipowicz et al, 2008). Ce sont des ARN non codants de 21-23 pb qui inhibent la traduction en se liant à leur ARNm complémentaire cible, provoquant sa dégradation (Ruan et al, 2009). Certains miARN interagissent avec les transcripts des gènes modulant la méthylation de l'ADN et des histones.

2.2.4 L'inactivation du chromosome X

En 1999, Stewart propose que l'inactivation du chromosome X peut être liée à la prédisposition féminine du SGS. Cette inactivation du chromosome X se fait au cours du développement embryonnaire, au stade blastula. L'un des deux chromosomes X parentaux (maternel ou paternel) est alors condensé au hasard, formant une structure hétérochromatique appelée le corps de Barr. Cette inactivation est principalement due au gène Xist (X inactive specific transcript), qui est actif uniquement sur le chromosome X inactivé. Le produit de ce gène est un ARN non codant qui va recouvrir le chromosome X, amorçant ainsi son processus d'inactivation (Brockdorff, 2002). Le chromosome va ensuite subir des modifications épigénétiques, comme la méthylation au niveau des histones (Heard, 2004), aboutissant à la formation d'hétérochromatine et à la compaction du chromosome X inactivé en corps de Barr. Les tissus féminins matures sont constitués d'un mélange de cellules ayant inactivé soit le chromosome X maternel soit le chromosome X paternel.

Au cours de la sélection thymique des lymphocytes, les cellules reconnaissant des antigènes du soi sont éliminées. Cependant, il peut arriver que des lymphocytes puissent reconnaître les cellules ayant inactivé le chromosome X maternel ou paternel. Ce phénomène (appelé conjoncture de Kast) peut expliquer une prédisposition à l'auto-immunité plus importante chez les femmes que chez les hommes (Kast et al, 1977, Anaya et al, 2006a).

2.2.5 Implication de l'épigénétique dans le SGS

Yin et al (2010) s'intéressent à la molécule de costimulation des LB, CD70, et à la méthylation de son promoteur. CD70 interagit avec CD27 pendant le contact LB-LT pour permettre la différenciation des cellules plasmocytaires, la production d'immunoglobulines et augmenter la capacité cytotoxique des LT natural killer (NK). La proportion des LT exprimant CD70 est plus élevée chez les patients atteints de SGS par rapport aux témoins sains. Le transcrit de CD70 est également surexprimé chez les patients. Cette surexpression est corrélée à la déméthylation du promoteur de CD70 et pourrait contribuer à la pathogénie du SGS.

Plusieurs miARN sont impliqués dans le SGS. Les miR-150 et miR-146 sont surexprimés dans les tissus cibles et les lymphocytes périphériques de souris NOD, tandis que le miR-146 est surexprimé dans les lymphocytes périphériques et les GS des patients souffrant de SGS (Bulosan et al, 2009). Par ailleurs, miR-574 et miR-768-3p sont surexprimés dans les GS des patients ayant un SGS (Alevizos et al, 2010).

2.3. Le rôle des virus

Les virus peuvent déclencher des réactions autoimmunes. Plusieurs mécanismes peuvent conduire à la dérégulation de la réponse immunitaire. Ces virus peuvent s'insérer au niveau de gènes impliqués dans la régulation immunitaire, altérant ainsi leur expression. Par ailleurs, les LB peuvent produire des anticorps dirigés contre ces protéines, lesquels anticorps peuvent interagir avec des protéines du soi par un mécanisme moléculaire de mimétisme (Balada et al, 2010). Les CE des GS pathologiques peuvent agir comme présentatrices d'antigènes viraux ou d'autoantigènes aux LT, contribuant à l'expansion de LT autoréactifs.

2.3.1 Les virus Coxsackies

De l'ARN de Coxsackie virus a été trouvé dans les GS de patients atteints de SGS, montrant l'implication active de ce virus dans la pathologie du SGS

(Triantafyllopoulou et al, 2004). Stathopoulou et al (2005) ont trouvé que la séquence peptidique de l'autoantigène Ro/SSA possède 87% d'homologie avec une région de la protéine 2B du Coxsackie virus A21 et de Coxsackie virus A 13. De plus, leur étude montre qu'il y a une cross-réaction entre les anticorps reconnaissant la séquence peptidique homologue entre Ro/SSA et le virus. Cela peut être la conséquence du chimérisme moléculaire induit par le virus. Ainsi, une infection par le virus Coxsackie pourrait initier une réponse immune caractérisée par la production d'anticorps dirigés contre la protéine 2B, contenant une homologie avec l'autoantigène Ro/SSA. Si l'anticorps rencontre cet autoantigène, la réponse immune peut être perpétuée.

2.3.2 Les rétrovirus

L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est caractérisée par une lymphocytose infiltrative diffuse (LID) ou syndrome ressemblant au SGS. Cette affection est secondaire à une prolifération des LT CD8+ en réponse à certains antigènes du VIH. L'infection par le VIH diffère du SGS au niveau de l'infiltrat des GS où les cellules prédominantes sont des LT CD8+ (dans le SGS, ce sont les LT CD4+), dû à une lymphocytopenie des LT CD4+ et une lymphocytose des LT CD8 (Itescu S et al, 1989, 1990, Kordossis et al, 1998).

Plusieurs études montrent que l'infection par HTLV-1 (human T lymphotropic virus type 1), HIV (human immunodeficiency virus), HIAP-1 (human intracisternal A-type retroviral particle) ou HRV-5 (human retrovirus-5) est reconnue comme facteur déclencheur du SGS (revues par Sipsas et al, 2011).

2.3.3 Virus EBV, CMV, HCV et HBV

Des anticorps dirigés contre des virus ont été retrouvés dans le sérum et la salive. De l'ADN de l'EBV a été retrouvé dans la salive (Nagata et al, 2004) ou les lésions dans les GS de patients atteints de SGS.

De même, des taux de virus ont été retrouvés au niveau des lésions des GS pathologiques. Des virus comme le CMV (cytomégalo virus), le HCV (hepatitis C

virus) ou HBV (hepatitis B virus) peuvent ainsi être hébergés par les GS au cours du SGS (revue par Tzioufas et al, 2003).

2.4. Le rôle des hormones

Malgré le développement lent du SGS qui favoriserait l'apparition tardive des symptômes, la prédominance des femmes affectées par la pathologie surtout autour de la ménopause a poussé les scientifiques à s'interroger sur l'implication éventuelle des hormones sexuelles dans l'étiologie de la maladie (Lockshin, 2002 ; Porola, 2007). Des études ont ainsi porté sur les hormones stéroïdiennes et plus précisément sur la diminution de la concentration des œstrogènes (Porola et al, 2007).

La DHEA (déhydroépiandrostérone), la DHEA-S (déhydroépiandrostérone-sulfate) et l'androstènedione sont les androgènes surrénaliens circulants les plus importants chez la femme. Sous le contrôle de l'hypophyse, l'androstènedione et la testostérone sont synthétisées par les cellules intersticielles et les cellules thécales. La DHEA et DHEA-S sont sous la dépendance de la synthèse surrénale. L'ACTH (adrenocorticotropique hormone) stimule la synthèse corticale surrénale. Le rôle des précurseurs surrénaux, DHEA-S et DHEA, tout comme la synthèse périphérique d'hormones sexuelles actives est plus importante chez les femmes que chez les hommes. En effet, la sécrétion d'androgènes par les testicules est continue tout au long de la vie de l'homme, contrairement à la femme où la sécrétion d'œstrogènes par les ovaires cesse à la ménopause (Labrie et al, 2005).

L'étude de Valtysdottir et al (2001) montre que les patientes avec un SGS présentent une diminution du taux circulant de DHEA-S. Cette diminution pourrait refléter une hypofonction surrénale.

L'étude de Forsblad-d'Elia (2009) portant sur des femmes post-ménopausées avec un SGS primaire montre qu'une diminution du taux de stéroïdes sexuels est associée avec des symptômes de la maladie, comme la présence d'anticorps anti-SSA et/ou anti-SSB, la kératoconjonctivite sèche, le syndrome sec buccal et oculaire et le taux

de sédimentation des érythrocytes. Par ailleurs, le traitement par la DHEA restaure le taux hormonal à la normale chez les patientes et induit une amélioration du syndrome sec.

Cependant, l'équipe de Porola en 2011 n'a pas réussi à démontrer l'efficacité du traitement par DHEA sur l'augmentation du taux d'androgènes localement. La déplétion de la DHEA dans le SGS pourrait s'accompagner d'un défaut local dans la glande exocrine du catabolisme de l'hormone.

Par ailleurs, l'étude de Steinfeld et al (2000) montre que de la prolactine est surexprimée par les CE des GS dans le SGS. Par ailleurs, l'étude d'El Miedany et al (2004) démontre que le taux sérique de prolactine est supérieur chez les patientes atteintes de SGS par rapport aux témoins. Cependant, le taux de prolactine ne serait pas associé avec la durée de la maladie, le taux d'autoanticorps, le focus score dans les biopsies, mais corrélé avec l'endommagement des organes internes (Haga et Rygh, 1999).

Ainsi, la combinaison entre le déclin de la DHEA et DHEA-S sérique avec l'âge (Dessein et al, 2001), la diminution de production des oestrogènes par les ovaires, ainsi que la diminution des hormones observée dans le SGS (Valtysdottir, 2001) pourrait expliquer la prédominance des femmes dans l'atteinte de la maladie et l'âge d'apparition ou de développement des symptômes.

2.5. Le microchimérisme

Pendant la grossesse, des cellules peuvent franchir la barrière placentaire et circuler entre mère et fœtus, dans les deux directions. Ainsi, des cellules souches fœtales traversent le placenta et peuvent persister dans la circulation maternelle pendant des décennies. A contrario, des cellules maternelles peuvent également passer dans la circulation fœtale et persister jusqu'à l'âge adulte (Lo et al, 2000). La persistance de cellules (ou ADN) génétiquement différentes dans le même organisme est appelé « chimérisme » et lorsqu'elle implique de faibles taux de cellules du donneur, on parle de « microchimérisme ».

L'étude de Nelson et al en 1998 a été réalisée sur des femmes atteintes de sclérose systémique et des femmes saines, ayant mis au monde au moins un fils. Cette étude montre que le sang périphérique de patientes contient davantage d'ADN masculin que celui des patientes saines. En conclusion, la sclérose systémique pourrait être une maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) induite par les cellules fœtales chez les mères. La GVHD est un désordre chimérique pouvant se produire chez des receveurs de transplantation de cellules souches allogéniques.

Gratwhol et al (1977) démontrent que le SGS présente des ressemblances avec la GVHD. L'augmentation des cas de SGS après la grossesse et la prédominance des femmes atteintes pourrait indiquer un lien entre la maladie et la grossesse et pourrait impliquer un mécanisme de microchimérisme fœtal. En effet, les cellules souches fœtales persistantes dans la circulation maternelle peuvent se différencier en cellules de l'immunité compétentes matures qui pourraient reconnaître des antigènes spécifiques de la mère, être activées (Evans et al, 1999) et jouer un rôle dans l'inflammation des tissus.

L'étude d'Endo et al (2002) montre que la moitié des patientes atteintes de SGS ont de l'ADN fœtal masculin présent dans leurs GS (microchimérisme du chromosome Y), à la différence des personnes saines. Cependant, celle de Toda et al (2001) ne démontre pas de différence de microchimérisme dans le sang des patientes en comparaison avec des personnes saines. Par ailleurs, l'étude d'Aractingi et al (2002) n'a pas conclu sur un microchimérisme fœtal chez des patientes atteintes de SGS, à la différence de celles souffrant de sclérose systémique.

La sensibilité de la technique de détection des cellules fœtales pourrait expliquer la divergence de ces résultats. En conclusion, à l'heure actuelle, il n'est pas possible de conclure sur le rôle effectif du microchimérisme dans la pathologie du SGS.

2.6. Le rôle du stress

Le stress est généralement défini comme un déséquilibre entre la perception qu'une personne a des contraintes que lui impose son environnement et la perception

qu'elle a de ses propres ressources pour y faire face. Des états affectifs négatifs tels l'anxiété ou la dépression peuvent être la conséquence d'un excès de stress. Cela peut avoir des effets directs sur des processus biologiques ou des schémas comportementaux influençant le risque de maladies (Cohen, 2007). En effet, des études ont démontré l'implication du stress dans l'apparition ou l'exacerbation de MAI, comme le LED (Peralta-Ramirez et al, 2004) ou la PR (Straub et al, 2005) par exemple.

En 2009, l'étude de Karaiskos montre qu'environ un an avant l'apparition du SGS, la grande majorité des patients a vécu une période de fort stress psychologique dû à des évènements négatifs (comme la perte d'une personne de leur entourage). Toujours selon cette étude, le nombre et l'impact des évènements fortement stressants serait plus élevé dans le SGS que dans le lymphome ou chez des personnes saines (Karaiskos et al, 2009).

Cependant, bien que beaucoup de personnes soient exposées à des situations stressantes, elles ne développeront pas toutes de maladie. Le facteur stress, de même que les facteurs génétiques, hormonaux et environnementaux joueraient donc un rôle partiel dans l'apparition du SGS.

3. Immunopathologie du SGS

3.1. Le rôle des cellules épithéliales dans le SGS

Le tissu épithélial est souvent altéré ou détruit dans les MAI. Cependant, depuis quelques années, les CE ne sont plus seulement considérées comme les cibles des réactions immunitaires, mais elles jouent un rôle central dans l'initiation et l'amplification du SGS.

En effet, des études montrent que les CE des GS sont intrinsèquement activées. De plus, l'épithélium est capable de produire des signaux (chemokines, cytokines, molécules d'adhésion...) qui attirent les lymphocytes autour de l'épithélium de l'organe affecté. Ces lymphocytes vont pouvoir être responsable de l'apoptose ou de la nécrose des cellules constituant l'épithélium aboutissant au dysfonctionnement de l'organe.

3.1.1 L'activation in situ des CE dans le SGS

Les infiltrats lymphocytaires péri-ductaux sont le signe histopathologique du SGS. Les lésions glandulaires commencent autour des canaux. Manoussakis et Moutsopoulos montrent en 2000 qu'il y a des cellules inflammatoires localisées autour et dans l'épithélium. Cela suggère donc des interactions entre les lymphocytes et les CE.

De plus, l'étude des GS infiltrées de patients montre que les CE surexpriment des molécules immunoactives connues pour induire le homing des cellules lymphoïdes, la présentation de l'antigène, et l'amplification des interactions entre les cellules immunitaires et les CE.

Tout d'abord, les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) sont traditionnellement les cellules dendritiques, les macrophages et les LB. Ces cellules présentent l'antigène via des molécules du CMH-II et expriment des molécules d'adhésion comme ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1, CD54) et VCAM (Vascular Cell

Adhesion Molecule, CD106), et des molécules de co-stimulation pour former des synapses immunologiques avec les LT (Montoya et al, 2002).

Cependant, en 1985 et en 1986, les équipes de Lindahl et Moutsopoulos respectivement montrent que les CE des GS pathologiques expriment de manière aberrante des molécules du CMH de type II (HLA-DR), surtout à proximité des infiltrats de lymphocytes T (LT helper). L'expression de l'HLA-DR par ces cellules résidentes leur confère les capacités d'agir comme cellules présentatrices de l'antigène (CPA) aux lymphocytes sécréteurs d'IFN γ et d'autres molécules intervenant dans la réponse immune.

Ces résultats sont confirmés en 2002 par Tsunawaki et al. En effet, ils démontrent que les CE pathologiques (principalement ductales) expriment le HLA-DR et des antigènes du HLA de classe I. De plus, elles expriment des molécules de co-stimulation, comme CD80 (B7.1) et CD86 (B7.2). Dans leur étude, la production du transcrite de cytokines Th1 impliquées dans l'immunité cellulaire (IL-2, IFN- γ) est associée à l'expression de la molécule CD80 (B7.1), tandis que celle de cytokines Th2 impliquées dans l'immunité humorale (IL-4, IL-5) est associée à la molécule CD86 (B7.2). Les cytokines Th1 jouent un rôle dans l'induction et/ou la maintenance de la maladie, tandis que les cytokines Th2 induisent la différenciation des LB, leur prolifération et la production d'Ig.

Les CE expriment également des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM sous stimulation par l'IFN- γ ou le TNF- α et l'E-selectine. ICAM-1 et VCAM assurent la stabilisation de la synapse CPA/LT. Le récepteur d'ICAM-1 (LFA-1, CD11a/CD18) est détecté sur les LT infiltrant la glande (Kapsogeorgou et al, 2001). Ainsi, l'interaction entre ICAM-1/LFA-1 et VCAM/VLA-4 (récepteur de VCAM) peut être envisagée dans l'infiltration péri-ductale et l'activation des LT dans le SGS. La molécule CD40 est également exprimée par les CE des GS au cours du SGS, de manière constitutive et surexprimée par l'IFN γ (Dimitriou et al, 2002, Ohlsson et al, 2002), alors que le ligand du CD40 (CD40L) est surexprimé par les lymphocytes infiltrant la glande (Dimitriou et al, 2002). L'interaction entre le ligand et son récepteur

augmentent la réaction inflammatoire en activant directement les LT ou en augmentant les molécules de co-stimulation et d'adhésion sur la CPA.

En 2005, Spachidou et al montrent que les CE de GS expriment des molécules du TLR (toll-like récepteur), reconnaissant des schémas moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) et conduisant à la production de molécules de co-stimulation. En effet, cette équipe démontre que les CE expriment le TLR-1, TLR-2, TLR-3 et TLR-4. La stimulation des cellules par les ligands des TLR-2, -3 et -4 induit la surexpression d'ICAM-1, CD40 et CMH-I.

Des études ont montré que les CE des GS pathologiques produisent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6, le TNF α (Boumba et al, 1995, Fox et al, 1994). Elles expriment également de l'IL-12 (Horiuchi et al, 1999) et de l'IL-18 (Bombardieri et al, 2004).

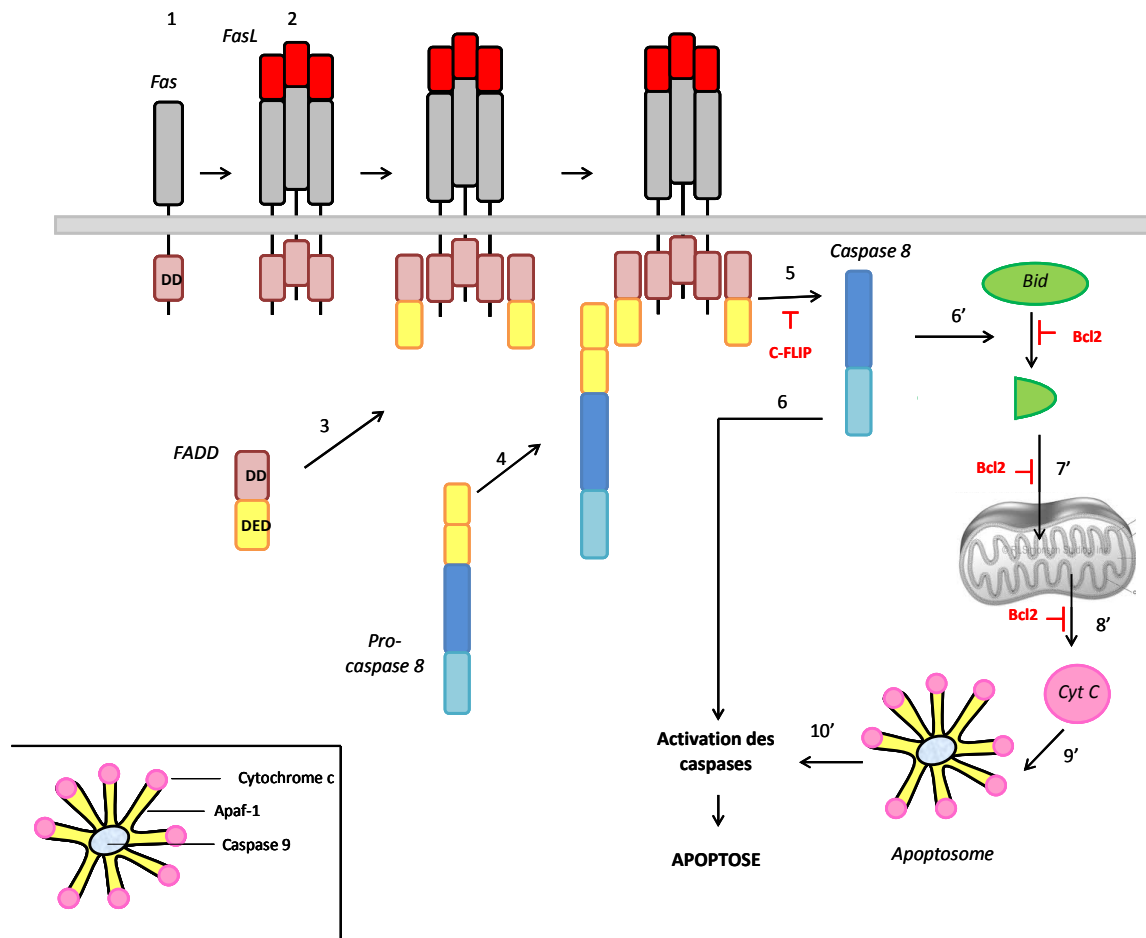
3.1.2 L'apoptose épithéliale et les exosomes

L'apoptose est un mécanisme homéostatique très important qui permet l'élimination de cellules endommagées pendant l'organogénèse et tout au long de la vie. L'apoptose peut être déclenchée par des molécules provenant d'autres cellules, comme les LT infiltrant la GS. Ces facteurs pro-apoptotiques peuvent être des enzymes comme la perforine ou les granzymes produits par les LT cytotoxiques, ou des récepteurs de mort membranaires, comme Fas (CD95).

3.1.2.1 La voie Fas/FasL

La voie Fas est une des voies principales de l'apoptose décrites dans la CE. Fas (APO-1, CD95) est une protéine transmembranaire appartenant à la famille du récepteur du TNF. Elle est aussi appelée « récepteur de mort ». Cette molécule est connue pour induire l'apoptose des cellules en interagissant avec son ligand, Fas ligand (FasL) ou avec des anticorps agonistes.

Figure 3 : Signalisation induite par Fas.



Légende : (1) A l'état basal, Fas est une molécule transmembranaire monomérique. Son extrémité C-terminale intracellulaire contient un domaine de mort (DD, Death Domain). (2) L'interaction de Fas et son ligand provoque la trimérisation de Fas. Cette trimérisation permet le recrutement de diverses protéines intracellulaires et la formation du complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex). Ce complexe est formé du trimère de Fas, de la protéine FADD (Fas-Associated DD), la pro-caspase 8 (FLICE), la pro-caspase 10 et c-FLIP (FLICE-Inhibitory Protein). (3) FADD possède un DD qui interagit avec celui de Fas et un domaine effecteur de mort (DED, Death Effector Domain) qui lui permet de recruter et d'interagir avec la pro-caspase 8 (4). (5) La formation du complexe DISC induit l'activation de la pro-caspase 8 en caspase 8 grâce à son clivage. La caspase 8 induit l'apoptose de la cellule par deux voies

distinctes. La première voie (6) passe par une cascade d'activation d'autres caspases par clivage protéolytique, dont la caspase 3, aboutissant à l'apoptose. La deuxième voie (6') passe par le clivage et l'activation de Bid (Bcl-2 interacting protein) qui va se transloquer dans la mitochondrie (7'), induisant la libération de cytochrome c (8'). Ce cytochrome C se lie alors à Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1) et à la pro-caspase 9 formant l'apoptosome (9'). La pro-caspase 9 est alors activée par clivage et va à son tour activer la caspase 3 (10'), aboutissant à l'apoptose de la cellule. Bcl2 inhibe l'activation de Bid, la libération du cytochrome c de la mitochondrie et la formation de l'apoptosome au repos (revue Lavrik et Krammer, 2011, Li et al, 1998).

Abu-Helu et al (2001) montrent que les CE des GS pathologiques co-expriment de manière constitutive Fas et son ligand (FasL) à leur surface. Cette expression est augmentée par l'IFN γ et le TNF α . Ces résultats sont semblables à ceux des équipes de Matsumura (2000) et de Kulkarni (2006), au niveau des CE de la lignée HSG (Human Salivary Gland). De plus, l'IFN γ induit l'augmentation de l'expression de CD40 qui régule négativement cFLIP (Ping et al, 2005). Les CE pathologiques expriment aussi fortement Bax, molécule pro-apoptotique et faiblement Bcl-2 (anti-apoptotique) (Kong et al, 1998, Jimenez et al, 2002).

3.1.2.2 La voie de la PKC δ

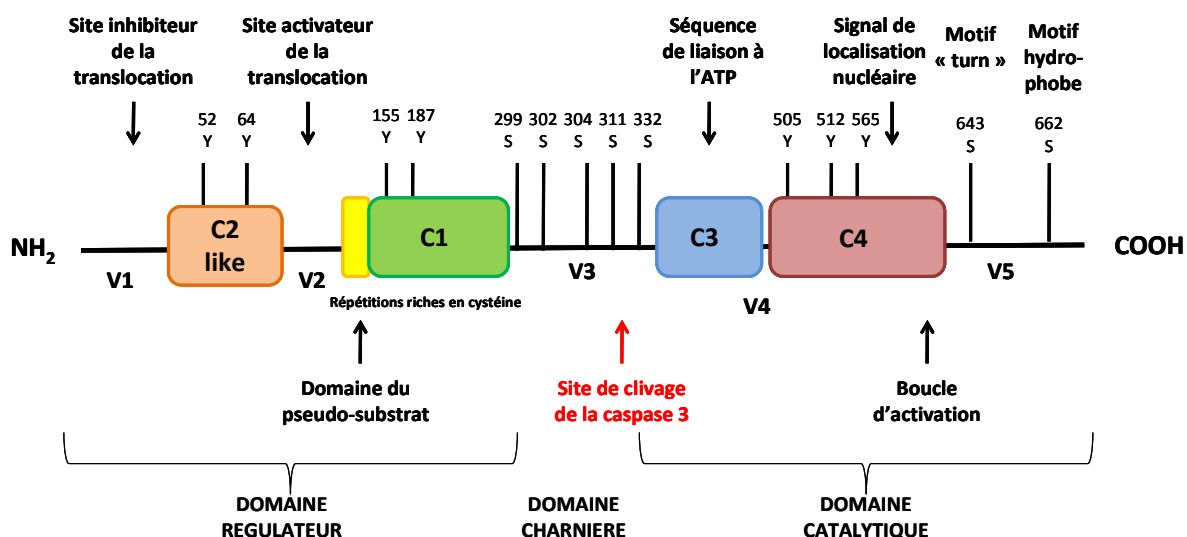
Les kinases sérine/thréonine de la famille PKC (Protéine kinase C) sont activées par plusieurs stimuli et régulent des fonctions cellulaires diverses, telles la croissance, la différenciation, l'apoptose et la sénescence (revue Dempsey et al, 2000, Wheaton et Riabowol, 2004).

Cette famille comporte onze membres, classés en trois groupes. On distingue les isoformes « conventionnels » (PKC α , PKC β I, PKC β II et PKC γ), les « nouveaux » isoformes (PKC δ , PKC ϵ , PKC η et PKC θ) et les isoformes « atypiques » (PKC ζ , PKC λ / τ) (Ohno et Nishizuka, 2002 ; Steinberg, 2008). Ces isoformes diffèrent en structure, fonction et propriétés biochimiques. Certains suppriment l'apoptose, comme les PKC α , - β , - ϵ , - η , - ζ et - τ , tandis que d'autres la favorisent, comme les

PKC θ et δ (Reyland, 2007). Traditionnellement, les PKC nécessitent du calcium pour leur stimulation physiologique. Cependant, la PKC δ est le premier isoforme identifié comme n'en ayant pas besoin pour son activité, d'où sa classification dans la catégorie des « nouveaux » isoformes (Gschwendt, 1999).

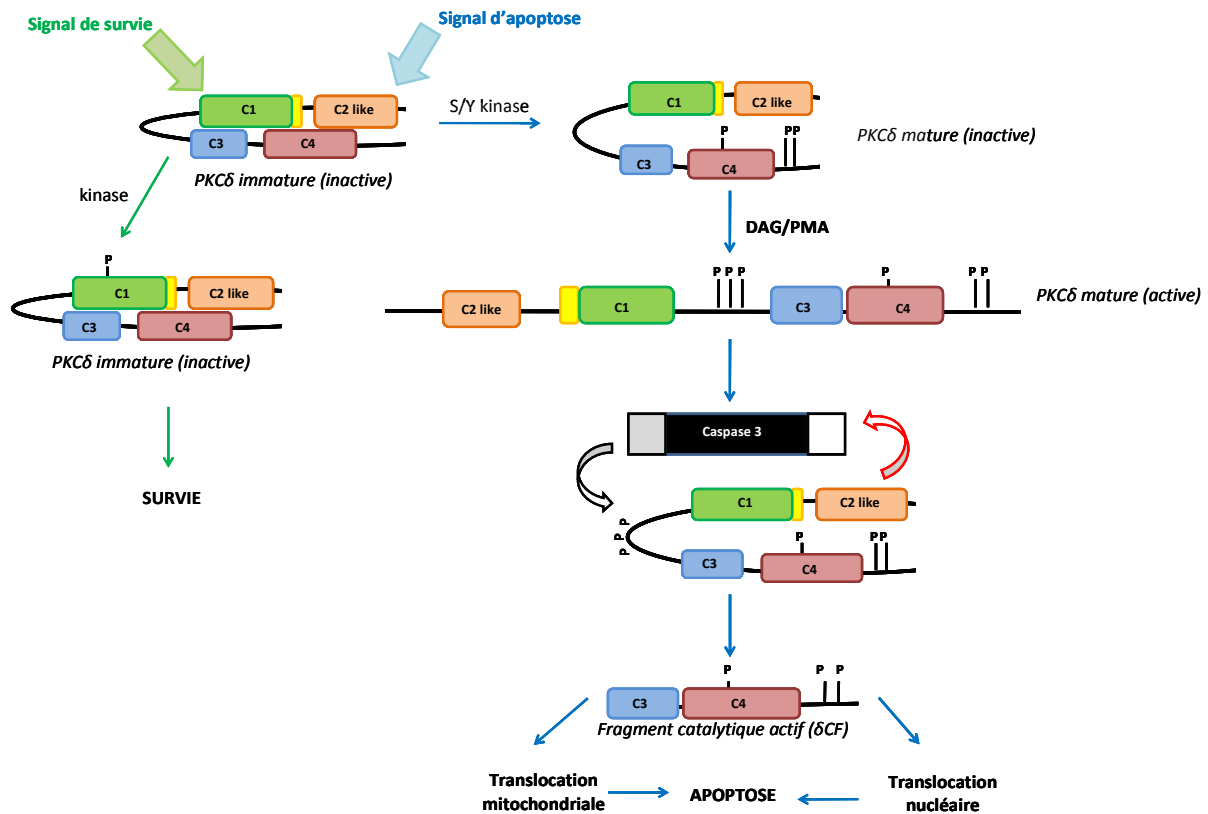
La PKC δ est nécessaire pour induire l'apoptose suite à l'irradiation par les UV, l'action d'agents génotoxiques, le taxol et la brefeldine A (Matassa et al, 2001, Reyland et al, 1999), l'ester de phorbol (Majumber et al, 2000), le stress oxydatif (Majumber et al, 2001) et les récepteurs de mort (Khwaja et Tatton, 1999). Cela a été déduit de plusieurs études réalisées avec des souris KO pour la PKC δ . Ainsi, les résultats de Humphries et al (2006) ou Leitges et al (2001) indiquent que les cellules musculaires lisses et les cellules épithéliales de la glande parotide sont résistantes à l'étoposide, à la brefeldine A, à l'irradiation gamma ou UV, ou au stress oxydatif. D'autres études, toujours réalisées avec des souris KO montrent que la PKC δ est impliquée dans d'autres mécanismes cellulaires, comme la prolifération cellulaire (Jackson et Foster, 2004) et la migration cellulaire (Humphries et al, 2006, Leitges et al, 2001).

Figure 4 : Structure de la PKC δ , d'après Malavez et al, 2008.



Légende : La protéine de la PKC δ fait 78 kDa et contient un domaine régulateur en position N-terminale et un domaine catalytique en position C-terminale. La PKC δ contient quatre régions conservées (C1-C4) et cinq régions variables (V1-V5). Les régions C3 et C4 appartiennent au domaine catalytique, tandis que le domaine C1 appartient au domaine régulateur. La région C1 contient des régions riches en cystéines et des séquences de liaison aux esters de phorbol comme le diacylglycérol (DAG) ou le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA). Contrairement aux isoformes conventionnels de la PKC qui possèdent une région C2 qui lie le calcium, la PKC δ possède une région C2-like en région N-terminale. Le domaine du pseudo-substrat entre les régions C1 et C2-like conserve la PKC δ dans une conformation inactive en bloquant l'accès à la poche de liaison au substrat. Les régions C3 et C4 contiennent le site de liaison à l'ATP et le signal de localisation nucléaire. La boucle d'activation contient des sites de phosphorylation important pour l'activation catalytique de la PKC δ . Le motif « turn » contient un site d'auto-phosphorylation important pour la maturation de la PKC δ . Enfin, l'hydrophobicité du dernier motif en C-terminal aide à la translocation de la PKC δ . Les domaines régulateur et catalytique sont séparés par un domaine charnière dans la région variable V3, laquelle région comporte également le site de clivage de la caspase 3. Enfin, la PKC δ contient plusieurs résidus tyrosine (Y) et sérine (S) phosphorylables, selon les stimuli (Basu, 2003).

Figure 5 : Activation de la PKC δ et induction de l'apoptose, d'après Malavez et al, 2008.



Légende : En réponse aux agents apoptotiques comme l'étoposide (Blass et al, 2002, DeVries et al, 2002), l'irradiation gamma (Yuan et al, 1998), Fas ligand (FasL) ou la privation d'interleukine-2 (IL-2) dans les LT (Scheel-Toellner et al, 1999), la PKCδ est phosphorylée sur plusieurs sites sérine et tyrosine. Cette activation va induire la caspase 3 à la cliver au niveau d'un site spécifique, pour libérer un fragment catalytique actif (δCF) de 40kDa qui va se transloquer dans le noyau ou la mitochondrie et induire l'apoptose de la cellule. La PKCδ est aussi impliquée dans la survie de la cellule stimulée par des stimuli anti-apoptotiques ou de cellules tumorales.

Le fragment catalytique est responsable de l'apoptose de la cellule. En effet, des études montrent que lorsqu'il est transitoirement exprimé, il se localise dans le noyau de la cellule même en l'absence de stimulus apoptotique et induit l'apoptose (DeVries et al, 2002, Jackson et Foster, 2004). Le clivage de la PKCδ facilite sa translocation nucléaire et pourrait amplifier la réponse apoptotique en permettant un transport rapide de la PKCδ dans le noyau.

L'équipe de DeVries-Seimon démontre en 2007 que la PKC δ peut également être clivée dans le noyau. En effet, leur étude indique que la PKC δ s'accumule rapidement mais de manière transitoire dans le noyau de la cellule stimulée par l'étoposide. Cette accumulation de la PKC δ est suivie par la translocation nucléaire de la forme active de la caspase 3 et du clivage de la PKC δ , pour générer le fragment catalytique.

Le fragment catalytique peut aussi se transloquer dans la mitochondrie et activer la voie apoptotique mitochondriale passant par la libération de cytochrome c, l'activation de la caspase 9 qui va à son tour activer la caspase 3 et d'autres caspases.

3.1.2.3 La voie TRAIL

TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand, Apo2L) est une protéine transmembranaire de type II. Il peut se lier à deux récepteurs agonistes conduisant à l'apoptose, TRAIL-R1 (DR4) et TRAIL-R2 (DR5) et à deux récepteurs antagonistes membranaires, TRAIL-R3 (DcR1) et TRAIL-R4 (DcR2) et un récepteur soluble, OPG (osteoprotégerin) qui régule principalement le développement et l'activation des ostéoclastes pendant le remodelage osseux (revue Falschlehner et al, 2007).

Tout comme pour Fas, la partie cytoplasmique de TRAIL-R1 et TRAIL-R2 contient un DD. TRAIL-R3 manque la partie intracellulaire et une partie du domaine transmembranaire, tandis que le DD de TRAIL-R4 est tronqué. La liaison entre TRAIL et TRAIL-R1 ou TRAIL-R2 conduit à la trimérisation du récepteur, la formation du complexe DISC, l'activation de la voie des caspases 3, 8 et 9, l'activation du cytochrome C et d'Apaf-1 (Nakamura et al, 2008).

La voie TRAIL peut être impliquée dans l'apoptose des CE dans le SGS. En effet, Matsumura et al (2002) démontrent que TRAIL est produit par les cellules mononucléées infiltrant les GS, tandis que TRAIL-R1 et TRAIL-R2 sont surexprimés par les CE ductales pathologiques. Par ailleurs, Chen et al (2009) démontrent que la production d'auto-anticorps et le score élevé du SGS sont associés à la production

de TRAIL par les cellules mononuclées infiltrant la GS. D'après l'équipe, ils sont également associés à l'expression de molécules d'adhésion comme ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) et de métalloprotéase comme MMP-3.

3.1.2.4 Les corps apoptotiques

Au cours du SGS, des auto-antigènes comme les RNP Ro/SSA et La/SSB sont libérées de la cellule et accessibles au système immunitaire. Pendant l'apoptose précoce, les protéines La/SSB se redistribuent de manière diffuse du noyau au cytoplasme. Tandis que les protéines La/SSB et Ro/SSA s'accumulent dans les corps apoptotiques et se trouvent exposés à la surface de la cellule (McArthur et al, 2002, Ohlsson et al, 2002a). Ainsi, en plus de participer à la destruction de l'épithélium et à diminuer la capacité fonctionnelle de la glande, l'apoptose conduit à la présentation d'antigènes intracellulaires, donc des auto-antigènes au système immunitaire.

3.1.2.5 Les exosomes

Les cellules ont un autre moyen pour présenter des molécules intracellulaires au système immunitaire. Il s'agit de la libération de petites vésicules membranaires (30-100nm), appelées exosomes. Ces exosomes se distinguent des corps apoptotiques et résultent de la fusion d'endosomes/lysosomes avec la membrane plasmique (Thery et al, 2002). Ils sont produits constitutivement par les cellules dendritiques, les plaquettes, les LT cytotoxiques, les LB, les réticulocytes et les CE intestinales néoplasiques. Les exosomes jouent un rôle dans l'exclusion de protéines et de membranes obsolètes, dans l'échange de matériel cellulaire et dans la communication intercellulaire. De plus, ils représentent un mécanisme acellulaire qui permet le transfert d'antigène de la CPA, ainsi que la stimulation ou l'inactivation des LT, directement ou indirectement par le transfert d'antigènes aux cellules dendritiques (Thery et al, 2002). En 2005, l'équipe de Kapsogeorgou montre que les CE des GS produisent ces exosomes de manière constitutive, sans lien avec l'activation, l'apoptose, ou la maladie (pas de différence dans la production d'exosomes dans les cellules dérivées de personnes atteintes de SGS ou de contrôles sains). L'équipe a démontré que ces exosomes contiennent les antigènes

Ro/SSA, La/SSB et Sm (autoantigène retrouvé au cours du LED). De ce fait, la production exosomale par les CE peut représenter un mécanisme physiologique pour la présentation de l'antigène (indépendamment de la cellule) dans le SGS.

3.1.3 La production des chemokines et l'attraction des lymphocytes

Dans le SGS, la perte de fonction glandulaire est liée à l'accumulation de cellules immunitaires au sein de l'épithélium et à la destruction de celui-ci. Ainsi, des infiltrats constitués de LT, des LB ou des CD peuvent être retrouvés dans les glandes (Stott et al, 1998, Xanthou et al, 1999).

CXCL13 (BCA1) attire les LB naïfs et certains LT via le récepteur CXCR5 (BLR1) et est important pour la formation des CG. Les équipes de Xanthou (2001) et de Salomonsson (2002, 2003) montrent que les CE produisent le CXCL13, alors que les cellules infiltrantes expriment CXCR5 (Amft et al, 2001).

L'équipe d'Amft et al (2001) montre par ailleurs que CXCL12 (SDF1), chemokine impliquée dans la rétention des leucocytes dans le tissu lymphoïde, est également produit par les CE, tandis que son récepteur CXCR4 est exprimé par les LT infiltrant la glande.

Xanthou et al (2001) démontrent que les CE des patients produisent CCL21 (SLC), une chemokine contrôlant l'adhésion et le recrutement des LT dans l'OLS. CXCL22 (STCP1), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19 (ELC) sont également retrouvés dans les lésions des GS pathologiques.

Ogawa et al (2002) démontrent que d'autres chemokines attirant les LT et induites par l'IFN γ sont produites par les CE dans le SGS, comme CXCL9 (Mig) et CXCL10 (IP10) alors que les LT CD3 $^{+}$ infiltrant la glande produisent leur récepteur commun, CXCR3.

Ainsi, la production épithéliale des chemokines favorisant le homing des lymphocytes est cruciale dans l'initiation et la perpétuation des lésions autoimmunes dans le SGS.

La **figure 6** résume les différentes contributions des CE dans l'immunopathologie du SGS.

Figure 6 : La CE comme conducteur des lésions immunes dans le SGS.

-> Correspond à la figure 1 (The epithelial cell as a conductor of the autoimmune lesions in SS) de l'article de **Manoussakis MN et Kapsogeorgou EK**, intitulé: **The role of epithelial cells in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. Clin Rev Allergy Immunol 32 (3): 225-230, 2007.**

Légende : L'activation récurrente des CE de GS (SGEC) due à des facteurs intrinsèques (comme l'infection par un agent épithéliotropique) et/ou des cytokines produites par des cellules infiltrantes activées, déchaîne les fonctions immunologiques et l'apoptose de l'épithélium affecté, qui, en retour, perpétue les mécanismes inflammatoires de la glande caractérisant le SGS.

Pour toutes ces raisons, le SGS peut être appelé « épithélite autoimmune », comme suggéré par Moutsopoulos dès 1994.

3.2. Le rôle des lymphocytes T dans le SGS

Les LT sont les cellules majoritaires dans les infiltrats des GS dans le SGS (Dalavanga et al, 1986). Parmi ces cellules, les LT CD4+ sont les plus représentés (ratio CD4/CD8 : 3-5/1). Ils possèdent des récepteurs pour l'IL-12, signe d'activation, ainsi que l'isoforme Ro des molécules CD45, ce qui caractérise les cellules mémoires.

Ces LT produisent un mélange d'IFN γ et d'IL-2, ce qui les range parmi les LT-Th1 plutôt que parmi les LT-Th2. Il est vrai que Th1 et Th2 prédominent alternativement dans l'infiltrat, ces premiers quand il est limité et les derniers quand il est étendu (Mitsias et al, 2002).

Une nouvelle catégorie de LT appelée Th17 et produisant de l'interleukine 17 (IL-17) a été décrite et associée à plusieurs MAI (Cua et al, 2003, Langrish et al, 2005). Le TGF β est une molécule importante pour le développement de ces LT Th17 (Mangan

et al, 2006, Veldhoen et al, 2006). Un lien a été établi entre ces deux molécules dans le SGS, puisqu'elles ont été trouvées au sein de GS pathologiques.

L'établissement et la maintenance de la tolérance du soi sont régulés par des mécanismes complexes comprenant la délétion des LT auto-réactifs et la régulation active de ceux qui échappent à la délétion. Les LT régulateurs (LT reg) suppriment la prolifération et la fonction des LT effecteurs, régulant ainsi l'homéostasie immune. Parmi les LT reg, les cellules positives pour CD4 et CD25 ont été les plus étudiées. Ces LT reg sont caractérisés notamment par l'expression de FoxP3 (forkhead/winged-helix transcription factor) qui régule le développement des LT et l'activité suppressive.

Ces LTreg immunosuppresseurs sont rares dans les lésions de SGS (Li et al, 2007). En effet, l'expression du gène FoxP3 permettant la différenciation des LT CD4+ en LTreg est inhibée par la sécrétion d'IL6 et de TGFβ1. Ce déséquilibre en faveur de la surexpression des LT Th17 pourrait contribuer à la perpétuation des lésions au sein des GS pathologiques.

La **figure 7** présente l'implication des LT dans la GS dans le SGS.

Figure 7 : Infiltration des LT dans la GS au cours du SGS.

-> Correspond à la figure 2 (Schematic representation of infiltrating populations of T cells and their regulation in pSS salivary glands) de l'article de **Katsifis GE, Moutsopoulos NM et Wahl SM**, intitulé : **T lymphocytes in Sjögren's syndrome: contributors to and regulators of pathophysiology**. *Clinic Rev Allerg Immunol* 32(3): 252-264, 2007.

Légende : Les LT infiltrant la GS deviennent activés via les cellules présentatrices d'antigène (CPA), à savoir les cellules dendritiques, les macrophages et les CE. Ces LT sécrètent alors des molécules inflammatoires et des cytokines. Les LT CD4⁺ (helper) peuvent se différencier en LT Th1 qui permettent l'élimination des pathogènes intracellulaires. Les LT Th2 permettent l'activation de LB, les réactions d'allergie et l'élimination des vers parasites. L'IFNγ sécrété par les LT Th1 a un effet suppresseur sur les LT Th2. Dans le même temps, les LT Th2 produisent de l'IL4 et

de l'IL10, activant ainsi des LB producteurs d'anticorps et inhibant les réponses Th1. Cependant, la balance Th1/Th2 penche du côté Th1 dans les tissus exocrines, surtout dans les glandes hautement infiltrées (Mitsias et al, 2002).

3.3. Le rôle des cellules dendritiques et des macrophages dans le SGS

3.3.1 Les cellules dendritiques

L'analyse des biopsies de GS dans le SGS a révélé que les LB et les LT représentent la majorité des cellules infiltrantes, mais elles contiennent aussi des macrophages, des cellules NK et des cellules dendritiques (CD). Les CD jouent un rôle clé dans l'initiation des réponses immunes et dans le maintien de la tolérance (Banchereau et Steinman, 1998). Ces CPA professionnelle présentent des antigènes de l'environnement via les complexes du CMH aux LT, dans les organes lymphoïdes. Les CD se différencient en deux groupes, les CD myéloïdes (CDm) et les CD plasmacytoïdes (CDp). Les CDm sont immatures et migrent vers les tissus lymphoïdes et périphériques. Elles contribuent aux réponses immunes médiées par les LT helper de type A (Th1) en produisant de l'IL-12 en réponse aux antigènes microbiens. Les CDp jouent un rôle dans l'immunité anti-virale innée. Elles sont aussi connues sous le nom de « cellules naturelles produisant l'interferon ».

En plus de leurs propriétés immunogéniques lors des infections de l'organisme, les CD jouent également un rôle dans la prévention de l'autoimmunité (Steinman et al, 2003).

Van Blokland et al (2000a) démontrent que des cellules dendritiques sont retrouvées augmentées dans les GS de souris NOD, un modèle murin du SGS, avant l'apparition de l'infiltrat lymphocytaire. Cela suggère que dans ce modèle, ces cellules présentatrices de l'antigène (CPA) pourraient être impliquées dans l'initiation du SGS et l'organisation des infiltrats lymphocytaires. Par ailleurs, d'autres études montrent qu'il y a des anomalies dans la distribution des CD au cours du SGS chez l'Homme. Ainsi, l'équipe de Manoussakis et al (2007) montre que les lésions des GS

de patients atteints de SGS présentent des infiltrats de macrophages et de cellules dendritiques (CD). Par ailleurs, Ozaki et al (2001, 2009) montrent que les CDm sont diminuées de manière sélective dans le sang périphérique et que cela est associé à l'infiltration de CDm dans les GS. Le nombre de cellules Th1 produisant l'IFN γ est augmenté dans le sang périphérique et les GS des patients, cela est associé à l'interaction avec les CD.

A part la présence de CDp dans les lésions inflammatoires dans le SGS, des taux réduits de ces cellules ont été retrouvés dans le sang périphérique de patients, suggérant le recrutement des cellules dans les organes cibles (Wildenberg et al, 2008, Vogelsang et al, 2010).

En 1998, Randolph et al arrivent à différencier des monocytes humains en CD, grâce à un modèle de trafic transendothélial. Depuis, il est reconnu que les monocytes peuvent se différencier en CD dans des conditions inflammatoires (Geissmann et al, 2010). Ces « CDtip » (TNF α and iNOS producing DC) sont caractérisées par la production de TNF α et l'iNOS (inducible nitric oxide synthase).

La **figure 8** résume les mécanismes impliquant les CD dans la pathogénie du SGS.

Figure 8 : Possible implication des CD dans la pathogénèse du SGS.

-> Correspond à la figure 3 (Possible involvement of dendritic cells in the pathogenesis of Sjögren's syndrome) de l'article de **Jonsson R, Vogelsang P, Volchenkov R, Espinosa A, Wahren-Herlenius M et Appel S**, intitulé : **The complexity of Sjögren's syndrome : novel aspects on pathogenesis. *Immunol Lett* 141 (1) : 1-9, 2011.**

Légende : En réponse à l'infection virale ou aux complexes immunes contenant de l'ARN du soi, les CDp sont recrutées à partir du sang dans les GS où elles produisent de l'IFN α . D'autres cellules sont ensuite recrutées, comme les CDm, les monocytes, les LT et les LB. L'IFN α pourrait conduire à l'up-régulation des gènes stimulés par l'IFN, expliquant la signature-IFN observée dans un sous-groupe de

patients. Les CDm présentant les auto-antigènes stimulent les LT auto-réactifs, qui à leur tour activent les LB auto-réactifs produisant les auto-anticorps. Dans ce contexte inflammatoire, les monocytes recrutés se développent en CDtip produisant davantage de cytokines inflammatoires.

3.3.2 Les macrophages

Les macrophages font partie des cellules retrouvées dans les lésions des GS au cours du SGS. Ils ont été associés à la sécrétion d'IL-12 et IL-23 dans le SGS (Manoussakis et al, 2007, Kastifis et al, 2009).

L'étude de Van Blokland et al (2000) indique que des macrophages positifs pour RFD9 sont détectés dans les GS de patients atteints de SGS et que leur présence est étroitement corrélée avec l'infiltrat lymphocytaire. De plus, Christodoulou et al (2010) démontrent que la présence des macrophages et monocytes est associée à la sévérité des lésions.

L'équipe de Greenwell-Wild et al (2011) démontre que les GS pathologiques contiennent de grandes quantités de chitinases, molécules exprimées pendant la différenciation des monocytes en macrophages. Dans le SGS, les gènes les plus fortement exprimés sont ceux de CHIT1 et CHI3L1 et sont exprimés par des cellules phagocytaires exprimant le marqueur CD68. L'expression des chitinases est augmenté par stimulation de cytokines dont l'IFN α .

Ainsi, les macrophages pourraient être impliqués dans la pathogénie du SGS.

3.4. Le rôle des lymphocytes B dans le SGS

3.4.1 Les rôles principaux

3.4.1.1 Les LB circulants

Outre la sécrétion d'anticorps et surtout d'auto-anticorps pendant le SGS, les LB présentent également des anomalies dans la distribution de leurs sous-populations car les sous-populations LBm1-LBm5 décrites dans les organes lymphoïdes

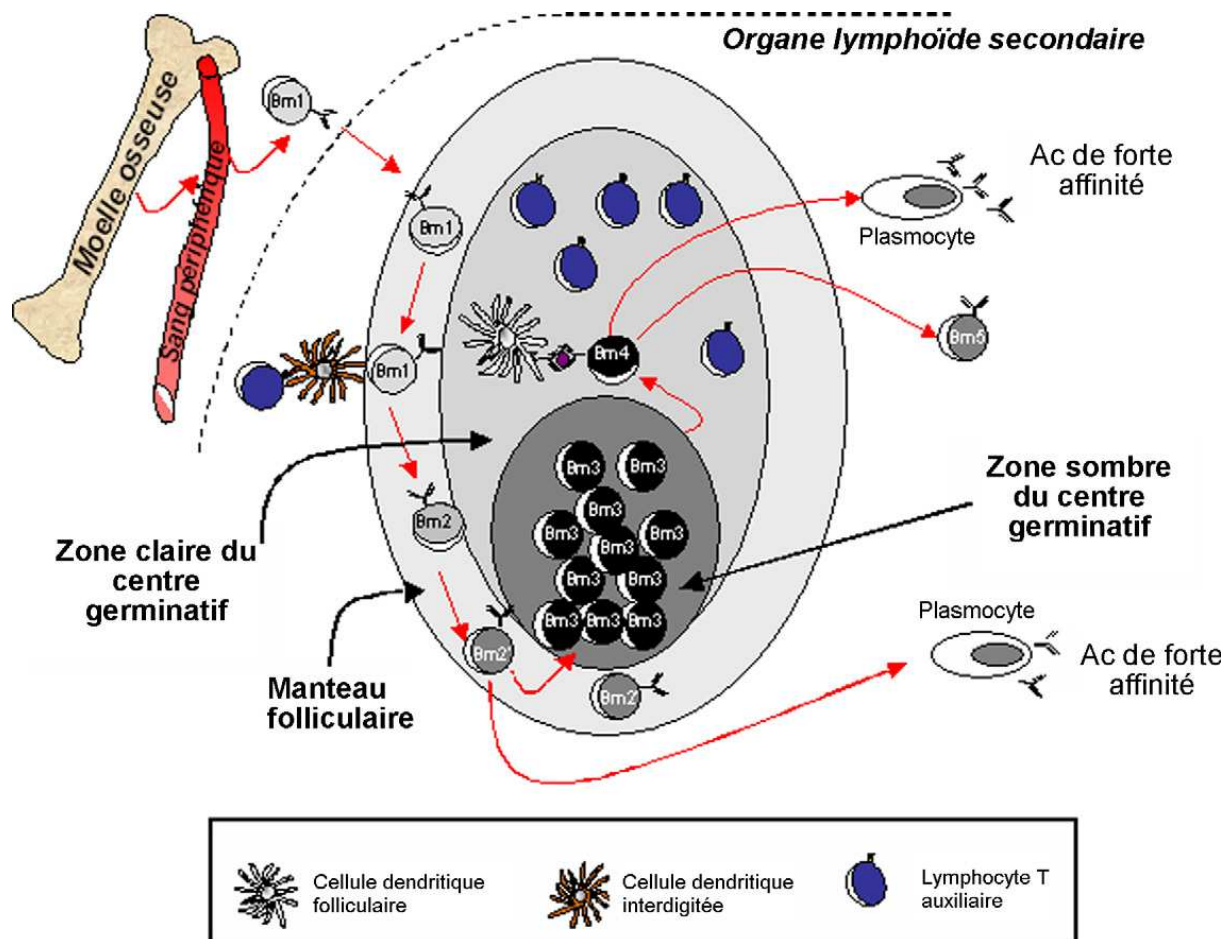
secondaires (OLS) sont retrouvées dans la circulation sanguine, à l'exception des LB du centre germinatif (CG) (**Figure 9**).

Ainsi au cours du SGS, les LBm2 et LBm2' sont augmentés alors que les eLBm5 et LBm5 sont diminués (Bohnhorst et al, 2001a et 2001b, d'Arbonne et al, 2006). Cette anomalie de distribution nous a d'ailleurs permis de proposer l'utilisation d'un ratio $(Bm2+Bm2') / (eBm5+Bm5) \geq 5$ comme marqueur diagnostique du SGS (Binard et al, 2009).

De plus, les LBm2 et LBm2' surexpriment la molécule CD19 membranaire, co-récepteur activateur du récepteur à l'antigène (BCR) et répriment l'expression de CD32, co-récepteur inhibiteur du BCR. Or, avec CD21 (autre co-récepteur activateur du BCR), CD19 amplifie le signal du BCR en prolongeant sa localisation dans les radeaux lipidiques, structures membranaires riches en cholestérol et connus pour être le siège des transductions de signaux (Cherukuri et al, 2001). Ainsi, l'augmentation du CD19 dans le SGS induit une rétention accrue du BCR dans les radeaux lipidiques, conférant ainsi à ces LB une diminution du seuil d'activation du BCR (d'Arbonne et al, 2006).

La **figure 9** récapitule les différentes sous-populations des LB matures répertoriées au niveau de l'OLS.

Figure 9 : Maturation et différenciation des LB dans l'OLS, d'après Pers et al, 2008.



Légende : Les LB naissent dans la moelle osseuse (MO) ou dans le foie fœtal avant la naissance. Sous l'influence du micro-environnement et des cellules stromales, les LB se différencient depuis le stade pré-pro-B, pro-B à pré-B. Puis, les cellules arrivent dans le sang périphérique au stade LB transitionnels. Ils sont alors véhiculés vers les OLS (rate, ganglions lymphatiques, amygdales...) où ils évoluent en LB matures folliculaires (LB Fo) ou LB matures de la zone marginale (LB ZM). Les LB Fo sont classés en sous-populations allant de LBm1 à LBm5. Les LBm1 et LBm2 constituent le manteau du centre germinatif (CG). Les LBm2' sont les cellules fondatrices du centre germinatif. Les LBm3 constituent la zone sombre du CG et évoluent en LBm4 qui se différencie en LB mémoires eBm5 et LBm5 ou en plasmocytes sécrétant d'anticorps.

3.4.1.2 Les LB dans les glandes salivaires

Dans la GS, des altérations d'expression des molécules d'adhésion peuvent être à l'origine de la formation de centres germinatifs (CG) ectopiques, contenant des CD et des LB en prolifération (Salomonsson et al, 2003). Stott et al (1998) montrent que la

quantité de CG ectopiques dans les GS pathologies est corrélée avec le taux d'auto-anticorps. Ces GS favorisent l'expansion clonale des LB, la sélection des LB auto-réactifs de forte affinité et leur différenciation en LB mémoire. Ils pourraient ainsi participer à la progression du SGS. Nos résultats ont démontré que ces CG restent rares mais qu'ils pouvaient contenir des LB autoréactifs contribuant à la production *in situ* d'auto-anticorps et donc à la destruction des glandes (Le Pottier et al, 2009b).

En effet, la majorité des LB de l'infiltrat ont un phénotype de LB transitionnels de type 2 proche des LB ZM (Daridon et al, 2006). Cela indique que chez l'homme, ce ne sont pas les LB de la ZM qui infiltrent les GS mais des LB transitionnels qui vont s'y différencier en LB de la ZM. Ces cellules sont des LB T1, comme cela a été démontré par Pers et al (2007) car, après traitement des patients par un anticorps anti-CD20 (rituximab) et déplétion des LB, les premières cellules à coloniser les GS après la reconstitution ont un phénotype similaire aux LB T1.

Une autre anomalie retrouvée au niveau des GS dans le SGS est la présence de LB CD27+ mémoires, alors que ces cellules sont rarement retrouvées dans la circulation sanguine (Larsson et al, 2005). Hansen et al (2002) démontrent que la présence anormale de ces cellules au sein de la GS pourrait être liée à l'expression de CXCL13, en association avec son récepteur CXCR5 exprimé sur le LB mémoire.

Par ailleurs, des LB CD5+ sont également retrouvés dans les GS au cours du SGS (Youinou et al, 1988). Il a été démontré que ces cellules sont associées à la production d'auto-anticorps naturels, d'anticorps anti-idiotypique de forte affinité et elles peuvent se comporter comme des CPA polyréactifs (Pers et al, 1999).

3.4.2 SGS et lymphome

Le développement d'un lymphome, et plus particulièrement le lymphome non-hodgkinien (LNH) est considéré comme un mauvais pronostic dans la progression du SGS. En effet, il est décrit comme la principale cause de mort prématurée au cours du SGS, d'après l'étude de Theander publiée en 2004. En effet, les patients atteints

d'un SGS ont 18 fois plus de risque de développer un lymphome par rapport à la population générale (Zintzaras et al, 2005).

L'étude de Voulgarelis en 1999 montre que les GS sont le site privilégié du développement d'un LNH. Plus généralement, un lymphome peut se développer à partir des sites de lésions lymphoprolifératives et passer d'un stade de prolifération bénigne à maligne. Theander en 2011 démontre que l'organisation des LB en centres germinatifs (CG) est un facteur tissulaire prédictif du lymphome. Dans son étude, 86% des patients étudiés ayant des GS présentant des structures en CG ont développé un LNH.

De manière générale, les LNH les plus représentés au cours du SGS sont de type MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) ou lymphome des LB monocytoïdes (Voulgarelis et al, 1999) ou DLBCL (diffuse large B cell lymphoma) (Solans-Laqué et al, 2011). Des LNH impliquant les LT sont plus rares.

D'après l'étude de Solans-Laqué et al (2011), les facteurs prédictifs du lymphome au cours du SGS sont le gonflement de la glande parotide (37%), un purpura palpable (18%), une splénomégalie (18%), une fièvre récurrente (18%), de faibles taux de C3 (64%) et C4 (46%), une cryoglobulinémie (46%), une immunoglobulinémie monoclonale (46%). Le risque de développer un LNH augmente avec la durée du SGS.

Par ailleurs, un autre facteur comme Flt-3L (Fms-like tyrosine kinase 3 ligand) pourrait jouer un rôle dans la survenue du lymphome au cours du SGS. En effet, l'étude de Tobon et al (2010) implique le rôle potentiel de Flt-3L dans le développement d'un lymphome. A l'état physiologique, cette molécule (membranaire ou soluble) interagit avec son récepteur (Flt-3) au niveau des cellules hématopoïétiques dans la moelle osseuse et favorise l'hématopoïèse (leur mobilisation et leur croissance dans le sang, les organes lymphoïdes ou les tissus parenchymateux) et leur survie. Dans le SGS, Flt-3L est augmenté dans le sérum des patients. Cela est corrélé avec des anomalies de distribution des LB dans le sang périphérique et avec la prolifération des LB infiltrant les GS.

Le **tableau 7** présente les principaux lymphomes associés aux lymphocytes B.

Tableau 7 : Principaux syndromes lymphoprolifératifs à cellules B, d'après Sotto, 2005.

LNH indolents	LNH agressifs
Lymphome folliculaires	Lymphome diffus à grandes cellules B
Lymphome du MALT	Lymphome de Burkitt
Leucémie lymphoïde chronique (LLC)	Lymphome du manteau (formes blastiques)
Lymphome du manteau (formes communes)	Lymphome anaplasique

3.5. Le rôle de BAFF dans le SGS

3.5.1 Le gène de BAFF

BAFF est une protéine appartenant à la famille du TNF, plus précisément, cette cytokine est un ligand du TNF et joue un rôle très important dans la maturation, l'activité et la survie des LB.

Décrite à la fin des années 90, cette molécule est connue sous différents noms, dont BAFF, BLyS, TALL-1, THANK, TNFSF13B (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Nomenclature de BAFF.

Nom usuel	Nom complet	Origine cellulaire	Référence
BAFF	B cell Activating Factor belonging to the TNF Family	Leucocytes humains	Schneider et al, 1999
BlyS	B Lymphocyte Stimulator	Neutrophiles et monocytes humains	Moore et al, 1999
TALL-1	TNF- and ApoL-related leukocytes-expressed Ligand-1	Leucocytes humains de sang périphérique	Shu et al, 1999
THANK	TNF Homolog that activates Apoptosis, Nuclear Factor- κ B and c-Jun NH2-terminal Kinase	Granulocytes humains	Mukhopadhyay et al, 1999
zTNF4	Z Tumor Necrosis Factor 4	Foie	Gross et al, 2000
TNFSF20	Tumor Necrosis Factor SuperFamily member 20 (ancienne nomenclature)		Tribouley et al, 1999
TNFSF13B	Tumor Necrosis Factor SuperFamily member 13B (nouvelle nomenclature)		
CD257	Cluster of Differentiation 257		

3.5.2 Structure du gène de BAFF

Chez l'homme, le gène de BAFF est localisé sur le chromosome 13 en position q33.3. Il est composé de 37 389 paires de bases (pb), réparties sur 6 exons et 5 introns (Schneider et al, 1999). Il est localisé sur le chromosome 8 de la souris (Mackay M et al, 2003) et contient alors 7 exons (**Figure 10**).

Figure 10 : Représentation du gène humain et murin de BAFF

-> Correspond à la figure 1 (Genomic organization of BAFF, APRIL, and their receptors) de l'article de **Bossen C et Schneider P**, intitulé : **BAFF, APRIL and their receptors: Structure, function and signaling**. *Semin Immunol* 18(5): 263–275, 2006.

Légende : Chez l'homme, l'exon 1 code pour le domaine transmembranaire et ses régions flanquantes. L'exon 2 code pour le site de clivage d'une furine. Les exons 3 à 6 codent pour le domaine d'homologie du TNF (THD) qui se lie aux récepteurs. L'exon 3 est excisé par épissage alternatif ce qui conduit à un variant de BAFF appelé Δ BAFF. THD: TNF Homology Domain (domaine homologue au TNF), TMD:

TransMembrane Domain (domaine transmembranaire), UTR: UnTranslated Region (région non traduite en 3' et 5'), Stop : codon stop.

3.5.3 Les variants de BAFF

Différentes formes de BAFF existent, résultant de l'épissage alternatif du gène. Jusqu'à présent, trois variants d'épissage de BAFF ont été décrits : un transcrit long (Ψ BAFF) et deux transcrits courts (Δ BAFF et $\Delta 4$ BAFF) (Gavin et al, 2003, Le Pottier et al, manuscrit soumis).

3.5.3.1 Le transcrit long de BAFF (Ψ BAFF)

Ce transcrit n'est pas fonctionnel car l'épissage alternatif des introns n'est pas complet et cela conduit à un codon stop prématuré.

3.5.3.2 Le transcrit court de BAFF (Δ BAFF)

Ce transcrit de BAFF a été identifié chez les souris et l'homme. Chez l'homme, l'ARNm est plus court de 57pb, car l'exon 3 a été excisé par épissage alternatif. Ce variant est une forme mutée, non clivable de BAFF membranaire. Cette protéine est capable de former avec la forme complète de BAFF des hétérotrimères inactifs vis-à-vis des récepteurs et non clivables. Δ BAFF est donc considéré comme un régulateur négatif de BAFF, puisqu'il le rend moins disponible pour la cellule (Gavin et al, 2002).

3.5.3.3 Un nouveau variant de BAFF: $\Delta 4$ BAFF

Un nouveau variant de BAFF a été identifié (Le Pottier et al, manuscrit soumis). Il s'agit du variant $\Delta 4$ BAFF, résultant de l'épissage alternatif de l'exon 4. 114pb sont manquants. Ce variant est augmenté dans l'autoimmunité et dans les lymphoproliférations des LB et agit comme facteur de transcription de la forme classique de BAFF.

3.5.4 Les protéines de BAFF

3.5.4.1 BAFF et ses formes structurales

Le transcrit le plus courant de BAFF code une protéine transmembranaire de type II, composée de 285 acides aminés (AA). Cette protéine de 31.2kDa peut être clivée au niveau d'un site consensus furine pour donner une forme de BAFF soluble de 17kDa et de 152 AA (Mackay F, 2003).

L'analyse cristallographique de BAFF montre que BAFF a une structure trimérique (Mackay F, 2003). Toutefois, 20 trimères de BAFF peuvent s'organiser en une superstructure pouvant aller jusqu'à 60-mer. Cette formation multimérique rappelle celle des capsides virales (**Figure 11**).

Figure 11: Représentation des formes structurales de BAFF.

-> Correspond à la figure 3 (Structure of BAFF) de l'article de **Bossen C et Schneider P**, intitulé : **BAFF, APRIL and their receptors: Structure, function and signaling**. *Semin Immunol* 18(5): 263–275, 2006.

Légende : Structure protéique secondaire du monomère (A), du trimère (B) et du 60-mer de BAFF (C). Formation du complexe BAFF/récepteur (BAFF-R) (D). Les régions FLAP sont également représentées. Ces régions en forme de coude sont nécessaires à la formation de la superstructure de BAFF (60-mer).

3.5.4.2 BAFF et la glycosylation

La protéine BAFF possède deux sites potentiels de N-glycosylation, situés au niveau des asparagines 124 et 142. En 1999, Schneider et al démontrent que la forme complète de BAFF est glycosylée au niveau de l'asparagine 124. L'absence de glycosylation sur l'autre asparagine serait due à la structure secondaire de la protéine. Cependant, l'équipe de Diao et al (2007) montre que la forme clivée de BAFF est glycosylée au niveau de l'asparagine 242, après expression de la forme soluble chez la levure *Pichia pastoris*. Le poids de la forme soluble de BAFF passe de 17kDa à 20kDa.

Cette différence de résultat pourrait s'expliquer par le type cellulaire utilisé (lignée 293T issue de cellules embryonnaires de rein humain contenant l'antigène grand T du virus SV40 pour l'équipe de Schneider, levure *Pichia pastoris* pour l'équipe de Diao).

3.5.5 Les cellules exprimant BAFF

BAFF est surtout exprimé par les macrophages, les neutrophiles, les monocytes, les cellules dendritiques folliculaires (Hase et al, 2004), les lymphocytes T activés (Huard et al, 2004), les LB et les LT infiltrant les GS des patients atteints de SGS primaire (Daridon et al, 2007).

Parmi les cellules d'origine non-hématopoïétiques, citons les cellules épithéliales des GS (Daridon et al, 2007), les synoviocytes (Ohata et al, 2005), les astrocytes (Krumbholz et al, 2005), les adipocytes (Alexaki et al, 2009), les cellules de carcinome (Pelekanou et al, 2008), les cellules du trophoblaste (Guo et al, 2008).

L'expression de BAFF peut être régulée par d'autres cytokines. Ainsi, l'expression de BAFF membranaire est augmentée au niveau des monocytes stimulés par l'IL-10 (Nardelli et al, 2001), l'IFN- α , l'IFN- γ ou CD40L (Litinskiy et al, 2002) au niveau des monocytes.

Les polynucléaires neutrophiles n'expriment pas de BAFF membranaire (Scapini et al, 2003). L'étude démontre que sous stimulation des neutrophiles par le G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) et l'IFN- γ , le transcrite de BAFF est augmenté et BAFF est sécrété. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la furine bloque la sécrétion. Donc dans ce type cellulaire, BAFF serait clivé au niveau intracellulaire et non à la surface de la cellule, avant d'être sécrété.

3.5.6 Les récepteurs de BAFF

BAFF possède 3 récepteurs de la famille du TNF: BAFF-R (BR3), TACI et BCMA (**Tableau 9**).

Tableau 9 : Nomenclature des récepteurs de BAFF.

Nom usuel	Nom complet	Référence
BAFF-R	BAFF-Receptor	Thompson et al, 2001
BR3	BlyS Receptor 3	Yan et al, 2001
TNFRSF13C	TNF Receptor SuperFamily member 13C	
CD268	Cluster of Differentiation 268	
TACI	Transmembrane Activator and CAML Interactor	Von Bülow et Bram, 1997
TNFRSF13B	TNF Receptor SuperFamily member 13B	
CD267	Cluster of Differentiation 267	
BCMA	B Cell Maturation Antigen	Laabi et al, 1992
TNFRSF17	TNF Receptor SuperFamily member 17	Laabi et al, 1994
CD269	Cluster of Differentiation 269	

A la différence des autres récepteurs du TNF, la partie N-terminale extracellulaire des récepteurs de BAFF ne possède pas de peptide signal. De plus, ce domaine extracellulaire est beaucoup plus petit que les autres récepteurs de la famille du TNF (Bodmer et al, 2002).

Le domaine extracellulaire de BR3 n'est composé que d'un domaine riche en cystéine (CRD) partiel car il lui manque 2 cystéines qui constituent le CRD complet (Kalled et al, 2005). Les protéines TRAF (TNF-R Associated Factor) sont importantes dans l'activation du signal induit par les récepteurs de BAFF. Du fait d'une séquence de liaison aux TRAFs modifiée, BR3 ne peut se lier qu'à TRAF-3, contrairement à TACI et BCMA (Xu et Shu, 2002).

Le domaine extracellulaire de TACI possède deux CRD (Kalled et al, 2005). TACI peut se lier aux protéines TRAF-2 et TRAF-5 d'une part et à TRAF-6 d'autre part, grâce à une séquence de liaison « classique » et une « non classique » (Xia et al, 2000).

BCMA ne possède qu'un CRD dans son domaine extracellulaire. Au niveau intracellulaire, il peut se lier aux protéines TRAF-1, TRAF-2, TRAF-3, TRAF-5 et

TRAF-6 (Hatzoglou et al, 2000). La **figure 12** représente la structure de BAFF et de ses récepteurs.

Figure 12 : Structure de BAFF, APRIL et de leurs récepteurs.

-> Correspond à la figure 1 (Interactions between BAFF, APRIL and their receptors APRIL-R, BCMA, TACI and BAFF-R) de l'article de **Mackay F et Browning JL**, intitulé : **BAFF : a fundamental survival factor for B cells**. *Nat Rev Immunol* 2 (7): 465-475, 2002.

Légende : Au niveau de la partie extracellulaire des récepteurs, A1, C2 et X2 représentent des modules dans les domaines riches en cystéines (CRD). La partie intracellulaire comprend les sites de liaison à la protéine TRAF. Les protéines transmembranaires de type I contiennent en plus généralement un domaine de mort (DD) que n'ont pas les protéines transmembranaires de type III (Mackay F, 2003). L'épaisseur des flèches est proportionnelle à l'affinité du ligand pour le récepteur. APRIL, un autre membre de la famille du TNF est aussi représenté, ainsi que son récepteur spécifique (APRIL-R).

3.5.7 Cellules exprimant les récepteurs de BAFF

3.5.7.1 Les LT

Von Bulow et Bram (1997) et Von Bulow et al (2000) ont décrit TACI à la surface des LT humains périphériques activés grâce à l'utilisation d'un anticorps polyclonal anti-TACI. Cependant ce résultat est contredit par l'équipe de Wu et al (2000) qui met en évidence l'ARNm de TACI au cours de l'activation des LT. De même, Ng et al (2004) n'ont pas réussi à montrer l'expression de TACI sur les LT périphériques ni des organes lymphoïdes secondaires (OLS) avec des anticorps monoclonaux.

BR3 est observé à la surface des LT activés CD4+ provenant des OLS. De plus, Ng et al (2004) et Ye et al (2004) ont montré que BR3 est présent sur les LT reg (CD4+ CD25+).

BCMA n'a pas été décrit à la surface des LT.

3.5.7.2 Les LB

Les LB expriment les trois récepteurs de BAFF, cependant, ils présentent des profils d'expression selon leur différenciation et leur degré de maturation (figure 11 et article 1). BR3 est exprimé à partir des LB T1 jusqu'aux LB mémoires, mais n'est pas exprimé par les cellules plasmatisques. BCMA est exprimé en fin de différenciation des cellules, par les LB mémoires et les cellules plasmatisques. TACI est exprimé par les LB mémoires et par quelques LB matures actives.

3.5.7.3 Les autres types cellulaires

Les monocytes expriment TACI à leur surface après stimulation par BAFF (Chang et al, 2006). Le transcrite de BR3 a été observé dans une lignée de cellules épithéliales de glandes mammaires (Jung et al, 2004), tandis que BR3 est également observé sur les cellules épithéliales des GS au cours du SGS (Daridon et al, 2007).

3.5.8 Signalisation de BAFF

3.5.8.1 L'action de BAFF sur la maturation et la différenciation des LB

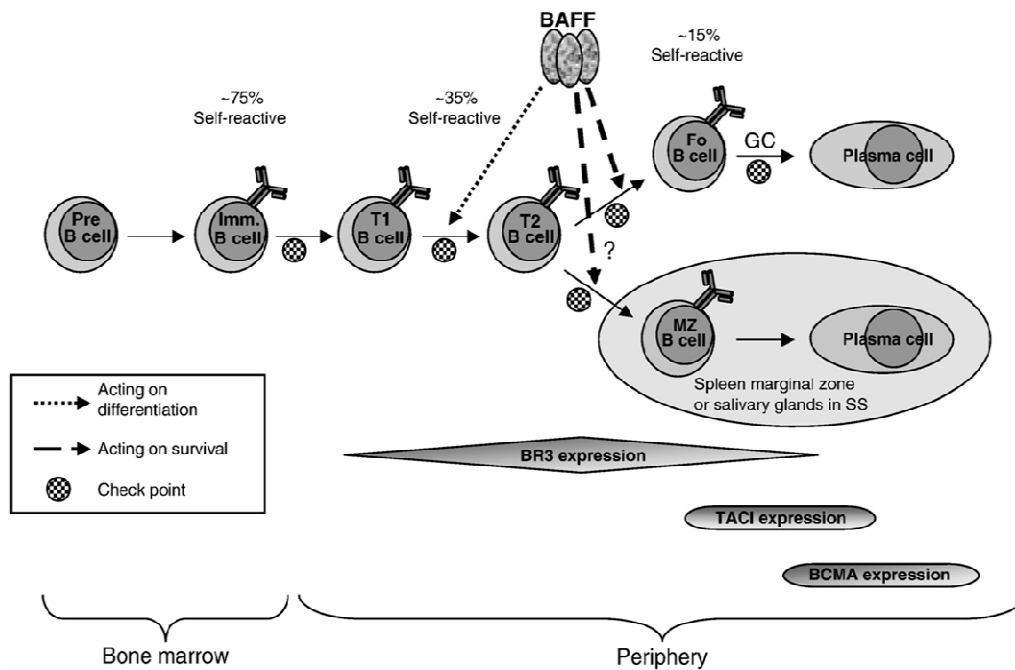
BAFF joue un rôle très important dans la différenciation et la maturation des LB. En effet, il joue un rôle essentiel dans le développement des LB transitionnels. Des souris déficientes pour BAFF présentent un arrêt du développement des LB au stade LB T1 et un défaut des LB T2 et matures. Le même phénotype est observé chez des souris déficientes pour BR3 (Schiemann et al, 2001, Batten et al, 2000). La surexpression de BAFF par des souris transgéniques conduit à l'accumulation de LB T2 et de LB matures (Mackay et al, 1999). BAFF et son récepteur BR3 sont donc importants pour la survie de la différenciation des LB T1 et LB T2.

BAFF joue également un rôle crucial dans la survie des LB ZM et Fo. Ainsi, des souris déficientes en BAFF voient leurs LB ZM diminuer (Gross et al, 2001). De plus, cette sous-population est surexprimée dans les souris transgéniques pour BAFF (Mackay et al, 1999) et est localisée dans d'autres tissus, comme les ganglions lymphatiques, le sang et les GS (Groom et al, 2002, Daridon et al, 2007). Rauch et al

(2009) montrent que l'injection d'un anticorps bloquant la liaison entre BAFF et son récepteur BR3 aboutit à la diminution des LB ZM et Fo chez des souris.

La **figure 13** résume les étapes de la maturation des LB, depuis le stade pré-B aux plasmocytes, ainsi que l'implication de BAFF dans l'ontogénèse des LB.

Figure 13 : Expression des récepteurs de BAFF et d'auto-réactivité pendant l'ontogénèse des LB, d'après Varin et al, 2010.



Légende : Fo : folliculaire, CG : centre germinatif, MZ : zone marginale, Pre : précurseur, SS : SGS, T1, T2 : transitionnel de type 1 ou 2.

3.5.8.2 Signalisation de BAFF au niveau du LB

Plusieurs voies de transduction du signal de BAFF sont décrites au niveau du LB.

3.5.8.2.1 La voie TRAF

Les TRAFs (TNF receptor-associated factors) sont des protéines trimériques intracellulaires qui se lient à des séquences spécifiques présentes sur les récepteurs de BAFF. TRAF2 et TRAF6 se lient à TACI et activent la voie classique de NF-κB (voie NF-κB1) si au moins deux molécules trimériques de TRAF sont proches, c'est-

à-dire, lorsqu'au moins six récepteurs TACI sont recrutés en réponse au 60-mer de BAFF (**Figure 14**).

Figure 14 : Recrutement des protéines TRAF au niveau du récepteur TACI.

-> Correspond à la figure 1 (BAFF, APRIL and their receptors) de l'article de **Mackay F et Schneider P**, intitulé : **Cracking the BAFF code**. *Nat Rev Immunol* 9 (7) : 491-502, 2009.

En absence de liaison de BAFF et BR3, NIK forme un complexe avec TRAF2 et TRAF3. TRAF2 recrute l'inhibiteur cellulaire de l'apoptose (cIAP) qui va ubiquitinyler NIK, le dégrader par le protéasome, et donc inhiber la voie alternative du NF- κ B. En revanche, la liaison de BAFF trimérique à BR3 déclenche le recrutement de TRAF3 par BR3, et sa dégradation par TRAF2. NIK est ainsi libéré, et va activer la voie alternative de NF- κ B, aboutissant à la survie cellulaire (**Figure 15**).

Figure 15 : Implication de TRAF2 et TRAF3 dans la signalisation de BAFF passant par BR3.

-> Correspond à la figure 2 (The role of TRAF molecules in BAFF-R signaling) de l'article de **Mackay F et Schneider P**, intitulé : **Cracking the BAFF code**. *Nat Rev Immunol* 9 (7) : 491-502, 2009.

3.5.8.2.2 La voie AKT

Pakte et al (2006) montrent que la signalisation induite par BAFF au niveau du LB passe par la molécule AKT. AKT est une molécule intermédiaire entre BAFF et mTOR (mammalian target of rapamycin) dans la cascade de signalisation. mTOR intervient dans des mécanismes comme la glycolyse, la synthèse protéique et la croissance cellulaire. La signalisation induite par BAFF active PI3K (phosphoinositide 3-kinase), résultant en l'accumulation de PtdIns(3,4,5)P3 (phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate) et le recrutement à la membrane de PDK1 (phosphoinositidedependent protein kinase 1) et d'AKT1. Suite à la phosphorylation et l'activation d'AKT1 par PDK1, PKC β et/ou le complexe mToRC2, cette molécule va activer mToRC1, en synergie avec PI3K. mToRC1 va phosphoryler ses cibles

S6K1 (S6 kinase 1) et 4EBP1 (eukaryotic initiation factor 4E (EIF4E) binding protein 1). S6K1 phosphorylée va activer les ribosomes et augmenter la synthèse protéique, tandis que 4EBP1 phosphorylée va libérer EIF4E qui induit la traduction des ARNm. 4EBP1 est également la cible de PIM2, une kinase induite par NF- κ B2.

3.5.8.2.3 La voie Bim

Les protéines « BH3-only » sont des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Bim (Bcl-2-interacting mediator of cell death) fait partie de cette famille et induit l'apoptose en interagissant avec les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2. Bim est nécessaire pour l'apoptose et le développement des cellules hématopoïétiques. La signalisation de BAFF conduit à la diminution de la protéine Bim (Craxton et al, 2005). La dégradation de Bim nécessite l'activation de MEK et Erk.

3.5.8.2.4 La voie de la PKC δ

Miyamoto et al (2002) démontrent que la PKC δ joue un rôle dans l'établissement de la tolérance des LB (Miyamoto et al, 2002), tandis que Mecklenbräuker et al (2002, 2004) démontrent que la signalisation de BAFF passe par l'inhibition de la voie de la PKC δ . En 2011, Banninger et al montrent que des souris KO pour la PKC δ présentent des défauts de l'apoptose, et développent des symptômes ressemblant au SGS, à savoir une hyperprolifération des LB B220+, une infiltration lymphocytaire des tissus, la production d'auto-anticorps, des lésions et le dysfonctionnement des GS.

La **figure 16** résume les principales voies de signalisation induites par BAFF au niveau du LB.

Figure 16 : Principales voies de signalisation impliquant BAFF au niveau du LB.

-> Correspond à la figure 4 (Signal transduction through BAFF receptors) de l'article de **Mackay F et Schneider P**, intitulé : **Cracking the BAFF code**. *Nat Rev Immunol* 9 (7) : 491-502, 2009.

Légende : La stimulation de BR3 par BAFF active la phospho-inositide-3 kinase (PI3K), conduisant à l'accumulation de phosphatidyl-inositol-3,4,5-triphosphate (PtdIns(3,4,5)P3) et au recrutement membranaire de la protéine kinase 1 dépendante du phospho-inositide (PDK1) et AKT1. AKT1 est phosphorylée par PDK1 et par la PKC β et /ou le complexe mToRC2 (cible de la rapamycine chez les mammifères). mToRC1 est activé par la PI3K et AKT1, tandis que la kinase PIM2 est induite par la voie alternative de NF κ B2. Les cibles de mToR1 sont S6K1 (S6 kinase 1) et 4EBP1 (eukaryotic initiation factor 4E (EIF4E) binding protein 1). Le S6K1 phosphorylé active les ribosomes et le 4EBP1 libère EIF4E qui va permettre la traduction. 4EBP1 est également une cible de PIM2. MyC joue également un rôle dans la croissance cellulaire et serait en partie sous le contrôle de BAFF via la voie classique (canonique) de NF κ B1. BAFF permet la survie des LB en augmentant le ratio de MCL1 sur BIM. MCL1 (myeloid cell leukaemia sequence 1) et BIM (Bcl-2-interacting mediator of cell death) sont des molécules anti- et pro-apoptotique respectivement, appartenant à la famille de Bcl-2. Ce contrôle se termine au niveau transcriptionnel, via l'activation de la CREB (cyclic AMP responsive element-binding protein) pour augmenter la transcription de MCL1 ou à travers l'inhibition de FOXO3A (forkhead box O3A) pour réprimer la transcription de Bim. Il s'effectue aussi au niveau traductionnel (via l'activation de EIF4E). BAFF et AKT1 régulent négativement la GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β) et la PKC δ . Ces deux kinases déstabilisent MCL1. AKT1 et PIM2 inactivent BAD (Bcl-2-antagonist of cell death) par phosphorylation. Les voies NF κ B contrôlent également l'expression des intégrines sur les LB de la ZM et régulent le switch de classe des immunoglobulines de type I indépendant des LT.

3.5.8.3 BAFF dans le SGS

Une production excessive de BAFF est souvent associée à des MAI, comme le SGS (Mackay et Browning, 2002). En effet, des taux sériques élevés de BAFF ont été retrouvés chez des patients atteints de SGS (Mariette et al, 2003, Pers et al, 2005). Cependant, Le Pottier et al (2009) montrent qu'il y a des disparités dans la détection de ce BAFF sérique, cela est notamment dû aux formes glycosylées et non

glycosylées de BAFF, reconnues de manière différente par les anticorps utilisés au laboratoire.

Daridon et al (2007) montre par ailleurs que les LT, LB et CE des GS sont capables de produire du BAFF in situ. Le microenvironnement est important pour la production de BAFF et donc son action. Nardelli et al (2001) montrent que la surexpression de certaines cytokines comme l'IL-10 ou l'IFN γ favorise la production de BAFF. Ce BAFF va permettre la survie des LB mémoires (Avery et al, 2003), qui, grâce à un environnement favorable (IL-10, LT activés) vont pouvoir se différencier en plasmocytes sécréteurs d'auto-anticorps et contribuer à la pathogénicité du SGS.

BAFF joue un rôle très important dans le maintien des CG et dans la maturation des CD folliculaires (Vora et al, 2003). Il pourrait favoriser la formation de CG ectopiques et créer un réseau de CD folliculaires capable de retenir les complexes immuns dans les GS.

D'autres anomalies liées à BAFF sont retrouvées dans le SGS. Ainsi, Groom et al (2002) démontrent que les GS de souris transgéniques pour BAFF présentent des LB ressemblant à ceux de la ZM, ce qui est également observé chez l'homme (Daridon et al, 2006). Ces cellules peuvent se comporter comme CPA pour les LT.

D'autre part, l'étude de Groom et al (2007) montre que des souris transgéniques pour BAFF développent un SGS en l'absence des LT, dû à l'hyperactivation des TLR 7 et 9 à la surface des LB par l'excès de BAFF. Cette activation des TLR serait donc capable de stimuler les LB autoréactifs indépendamment des LT.

Ainsi, BAFF et la dérégulation de son expression sont des facteurs très importants dans la l'immunopathologie du SGS (**cf Article 1**).

4. Pathogénie de la glande salivaire

4.1. Altération de la membrane basale

En plus de son rôle de barrière physique protégeant le tissu de l'invasion cellulaire, la membrane basale (MB) contribue au maintien de l'architecture, de la différenciation, de la prolifération, de la croissance, de la migration et de la mort des cellules. Le remodelage de la MB est régulé par les métalloprotéases de la matrice (MMP) et par leurs inhibiteurs tissulaires.

Au cours du SGS, des changements structuraux de la MB ont lieu au niveau de la GS. En 2006, Molina démontre que les cellules acineuses et ductales surexpriment les MMP3 et MMP9. En dégradant deux composants essentiels de la MB, la laminine et le collagène de type IV, ces protéines sont responsables de la désorganisation de la MB. Cela peut entraîner le détachement de l'épithélium et la mort des CE. Par ailleurs, de par sa fonction de barrière physique contre l'invasion cellulaire, l'endommagement de la MB favorise l'infiltration de cellules inflammatoires dans le tissu glandulaire, en synergie avec l'action de cytokines, de chemokines et de la présentation d'antigènes par les CE (Molina et al, 2006, Goicovich et al, 2003, Perez, 2000).

4.2. Rôle des jonctions serrées

La polarité apico-basale des cellules épithéliales détermine la direction des processus sécrétoires et dépend des interactions inter-cellulaires (les jonctions serrées) (Paris et al, 2008) et entre cellules et lame basale. Les jonctions serrées (JS) sont très importantes dans l'asymétrie des CE hautement polarisées puisqu'elles se localisent de manière asymétrique au pôle apical de la membrane basolatérale des cellules.

Les JS sont des complexes protéiques comprenant des composants de la membrane plasmique (MP) comme les claudines et l'occludine, et des composants du cytosol,

comme ZO-1 (Mitic et al, 2000). Les JS établissent la frontière entre les domaines de MP basolatérale et apicale, définissent la polarité des cellules, ainsi que le flux d'ions et d'eau entre les CE (Mitic et al, 2000, Flynn et al, 2009).

La dérégulation des JS intercellulaires et la perte de la fonction de barrière épithéliale ont été décrites dans diverses pathologies autoimmunes (revues par Cereijido et al, 2007). Goicivich et al (2003) démontrent que les acini des patients atteints de SGS présentent des altérations dans les composants structuraux du pôle apical, avec une dilatation du lumen, la perte des microvilli et des changements structuraux au niveau de microvilli restants. Ce la suggère la perte de fonction de barrière des GS.

Ewert et al (2010) montrent que les GS de patients atteints de SGS présentent une altération dans l'expression de protéines constituant les JS. Il y a une diminution de l'expression de ZO-1 et de l'occludine, tandis que les claudines 1 et 4 sont surexprimées chez les patients. De plus, il y a une relocalisation des protéines des JS. En effet, les JS sont localisées exclusivement au niveau apical des cellules acineuses et ductales chez les personnes saines. Par contre, l'étude indique que ZO-1 et l'occludine ne sont presque plus présentes au pôle apical des cellules et que les claudines 3 et 4 sont redistribuées au niveau de la MP basolatérale. Ces mêmes résultats sont obtenus après stimulation des cellules par TNF α et l'IFN γ in vitro, suggérant que la production locale de cytokines pourrait contribuer au dysfonctionnement de la GS en altérant l'intégrité des JS des CE.

Les protéines impliquées dans l'exocytose de granules sécrétoires sont localisées au pôle apical des cellules acineuses. Les protéines de la famille de l'eitrine, de la radixine et de la myosine (ERM) sont des molécules ubiquitaires, retrouvées co-localisées avec la F-actine aux pôles apicaux des cellules acineuses. L'eitrine est exprimée par les CE, où il s'associe aux microvilli. L'activation de cette protéine est nécessaire pour sa liaison avec les protéines membranaires et avec l'actine. L'étude de Perez et al (2010) montre qu'il y a une délocalisation de l'eitrine dans le SGS. En effet, d'une localisation apicale prédominante au niveau des acini des contrôles, elle est surexprimée et détectée majoritaire au niveau basal des cellules. De plus, l'actine

F se retrouve dans le cytoplasme des cellules pathologiques, pouvant expliquer partiellement la délocalisation de l'eitrine, dont la forme phosphorylée et active est aussi anormalement présente au niveau basal dans le SGS. Finalement, la perte de l'eitrine au niveau apical des cellules pourrait altérer les interactions entre l'acine et la MP, ce qui pourrait expliquer la désorganisation des microvilli et l'hyposécrétion glandulaire.

Le mécanisme d'exocytose est également affecté dans le SGS. En effet, celui-ci requiert le ciblage, transport et la fusion contrôlés des granules sécrétoires matures avec la MP apicale de la cellule. L'exocytose requiert la fonction de plusieurs protéines, dont les petites GTPases de la famille de Rab3. Les protéines Rab sont membres des petites protéines G liées à Ras qui participent à différentes étapes dans le trafic intracellulaire de vésicules, dont l'exocytose. Elles assurent la reconnaissance spécifique entre les vésicules et les membranes cibles en recrutant des effecteurs spécifiques nécessaires à la fusion et au relargage des molécules (Grosshans et al, 2006). L'isoforme D de la famille Rab3 (Rab3D) participe à l'étape finale de l'exocytose (Seabra et al, 2002). L'étude de Bahamondes et al (2011) indique que Rab3D est sous-exprimée dans le SGS. De plus, dans les acini séreux pathologiques, cette protéine peut avoir une distribution normale apicale, ou être distribuée dans le cytoplasme, ce qui peut être lié avec la perte de la polarité nucléaire, ou sous-exprimée. Ces anomalies sont accompagnées par la redistribution de l'eitrine, le gonflement des vésicules de Golgi et l'accumulation des composants de la salive (mucine 7) dans le cytoplasme, ce qui pourrait contribuer à la diminution de la sécrétion de salive par les patients atteints de SGS.

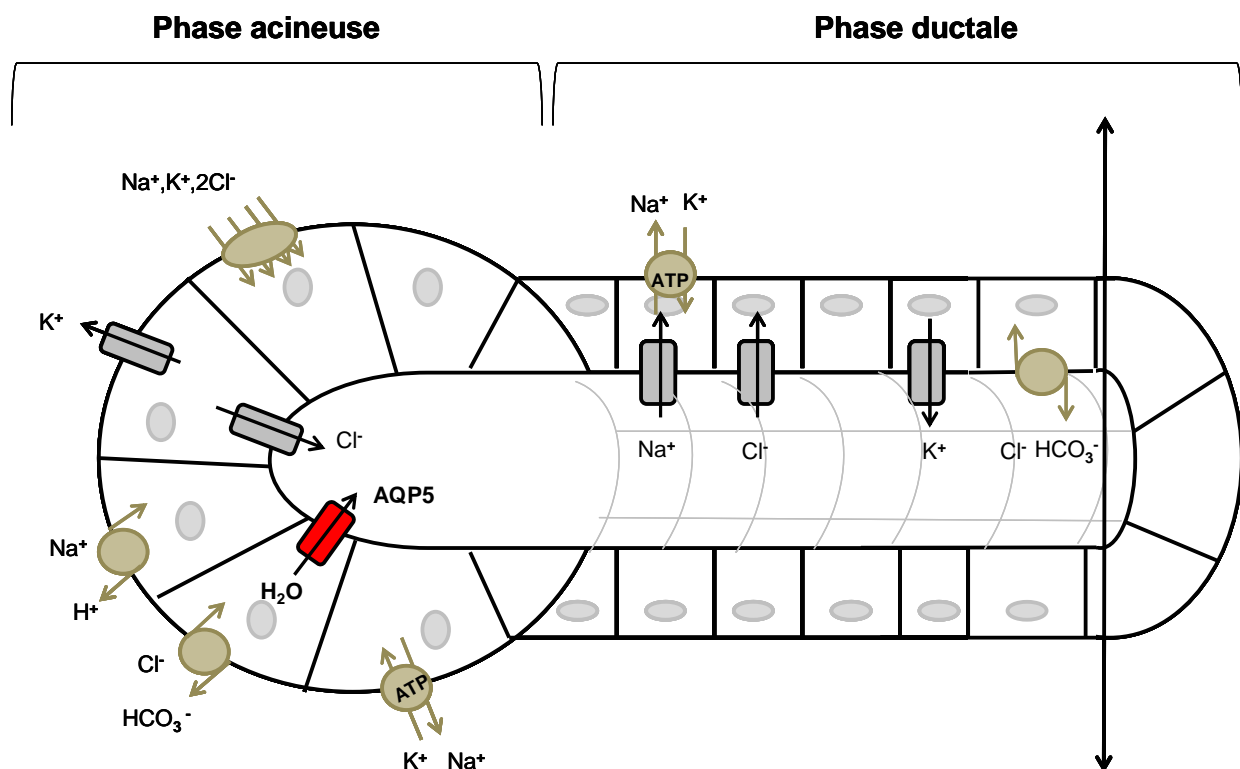
4.3. Rôle des aquaporines

Les aquaporines (AQP) sont de petites protéines hydrophobes transmembranaires qui s'organisent en canal dans la membrane plasmique. Cette famille de protéines est divisée en deux groupes, les aquaporines (laissant passer les molécules d'eau) et les aquaglycéroporines (laissant passer l'eau, le glycérol et les petits solutés). Il existe 13 aquaporines (Delporte et Steinfeld, 2006).

La production de la salive se fait en deux étapes. La phase primaire ou acineuse produit la salive primaire, un fluide riche en ions NaCl. La phase définitive ou ductale permet la réabsorption du NaCl et la sécrétion de K^+ , permettant ainsi la modification de la salive primaire en salive définitive tout au long de l'épithélium ductal.

Brièvement, pendant la phase acineuse, des ions Cl^- et Na^+ entrent dans la cellule à travers la membrane basolatérale, puis sont libérés dans le lumen en traversant le pôle apical de la cellule grâce à des pompes. L'accumulation d'ions dans le lumen permet la libération d'eau dans le lumen, grâce notamment à l'aquaporine 5 (AQP5), située au niveau apical de la cellule. Une salive isotonique est ainsi produite. Pendant la phase ductale, les cellules ductales réabsorbent le Na^+ et le Cl^- et libèrent du K^+ et de l' HCO_3^- dans la salive. La salive finale est hypotonique (**Figure 17**).

Figure 17 : Schéma de la sécrétion salivaire : représentation de la coupe transversale de la glande salivaire, au niveau d'un acinus et de son canal, d'après Catalan et al, 2009.



Des études ont montré que la localisation de l'AQP5 est modifiée au niveau des CE dans le SGS. En effet, d'une localisation exclusivement apicale chez des personnes saines, la protéine se retrouve davantage au niveau basal et moins au niveau apical des cellules. Cette distribution anormale et la dépoliarisation de l'AQP5 pourraient ainsi contribuer à la diminution de la sécrétion de salive chez les patients atteints de SGS (rev. Konttinen et al, 2006 ; Delporte et al, 2006). Cependant, certains scientifiques réfutent cette hypothèse (Waterman et al, 2003). Selon eux, il n'y aurait pas de modification dans la distribution de l'AQP5 dans les GS de patients et de contrôles. Ces différences pourraient être dues aux techniques utilisées pour mettre en évidence la protéine.

Par ailleurs, d'autres AQP pourraient jouer un rôle dans la pathologie du SGS. Ainsi, la down-régulation de l'AQP1 sur les cellules myoépithéliales pourrait influencer sur la sécrétion salivaire dans la maladie (Beroukas et al, 2002).

4.4. Rôle de l'acétylcholine et des récepteurs muscariniques

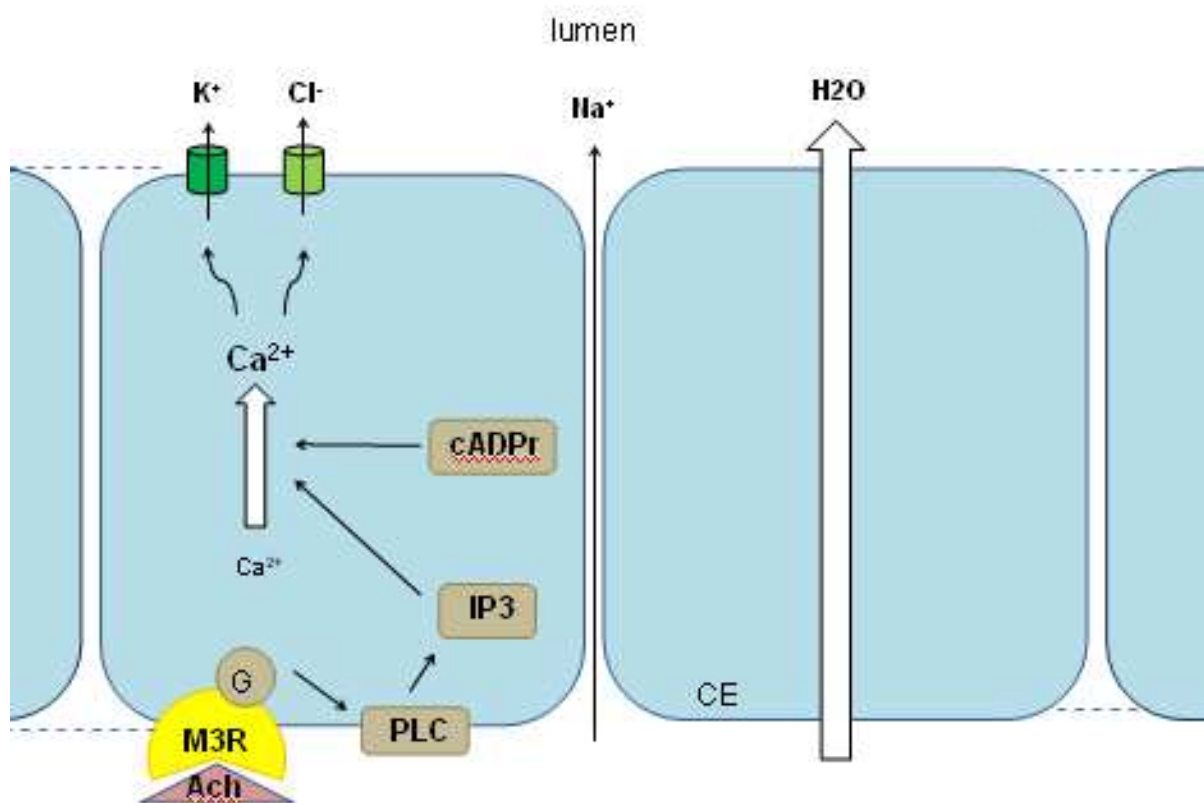
Les récepteurs muscariniques (RM) sont des protéines à sept domaines transmembranaires, couplées aux protéines G. Cette famille de récepteurs comporte cinq membres, de M1R à M5R (Shah et al, 2009). Les RM sont exprimés dans le tractus digestif, notamment au niveau des GS, des muscles lisses et des cellules muqueuses de l'estomac et de l'intestin (revue par Tobin, 2009).

L'acétylcholine (Ach) est un neurotransmetteur parasympathique, agoniste endogène des RM. Lorsque le RM est stimulé l'Ach, il y a libération de calcium dans la cellule. Cela conduit à des réponses cellulaires calcium-dépendantes, parmi lesquelles la contraction du muscle lisse de la vessie ou l'activation des canaux à chlore des GS pour la sécrétion de salive par exemple. Cependant, les RM peuvent également jouer un rôle dans l'inflammation, la croissance cellulaire et la prolifération (revue par Tobin, 2009).

M3R participe à la régulation du flux et du volume de la sécrétion de salive dans les GS. Ce récepteur est exprimé par les GS et les GL (Naito et al, 2005). En 2002, Beroukas et al localisent les M3R au niveau des acini et de l'épithélium des canaux des GS, à la fois chez les patients et les témoins sains. De plus, ces récepteurs sont localisés sur la membrane plasmique (MP) des cellules épithéliales et des cellules myoépithéliales. Ainsi, on peut considérer une action directe de l'Ach sur ce récepteur (via les cellules acineuses) et indirecte (via les cellules myoépithéliales).

La **figure 18** présente les mécanismes moléculaires déclenchés par l'Ach au niveau de la CE de la GS.

Figure 18 : Régulation de la sécrétion de salive par l'acétylcholine (Ach), d'après Tobin et al, 2009.



Légende : L'Ach est libérée par les nerfs parasympathiques proches des CE acineuses des GS. La liaison de l'Ach avec son récepteur M3R active la protéine G et par suite la phospholipase C (PLC), une enzyme liée à la membrane. La PLC

activée produit de l'inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP3), qui se fixe à son récepteur situé au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Ce récepteur étant également un canal calcique, cette liaison permet l'ouverture du canal et la libération de calcium (Ca^{2+}) depuis le RE jusqu'au cytoplasme. Un autre récepteur, le récepteur ryanodine participe également à la libération de Ca^{2+} grâce à l'action de son modulateur, l'adénosine diphosphate cyclique (cADPR). L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire conduit à la sortie dans le lumen de K^+ et surtout de Cl^- , permettant ainsi le passage de sodium (Na^+) entre les cellules, et le gradient osmotique génère la sécrétion de fluide salivaire.

Des autoanticorps anti-M3R ont été retrouvés dans le sérum de patients atteints de SGS. Ces autoanticorps fonctionnels reconnaissent le M3R et inhibent ainsi la neurotransmission parasympathique. (Waterman et al, 2000).

En parallèle de la détection d'autoanticorps, Beroukas montre en 2002 qu'il y a une augmentation de la densité des RM sur les acini des GS. Cette up-régulation pourrait compenser une diminution de libération d'Ach par les nerfs parasympathiques ou la baisse de son action post-neuronale (Beroukas et al, 2002).

Finalement, l'implication des RM peut être envisagée dans la perte de sécrétion des GS dans le SGS.

ARTICLE 1

B-cell tolerance breakdown in Sjögren's syndrome: focus on BAFF

**Marie-Michèle Varin, Laëtitia Le Pottier, Pierre Youinou,
Damien Saulep, Fabienne Mackay, Jacques-Olivier Pers**

Autoimmunity Reviews 9 (9) : 604-608, 2010

Rôle de BAFF dans la rupture de la tolérance des lymphocytes B dans le syndrome de Gougerot-Sjögren

Article 1: B-cell tolerance breakdown in Sjögren's syndrome: focus on BAFF

Le syndrome de Gougerot-Sjögren (SGS) est une pathologie caractérisée le plus souvent par une sécheresse buccale et oculaire, principalement dues à la destruction des glandes salivaires (GS) et lacrymales. Cette destruction de l'épithélium glandulaire a longtemps été associée à l'infiltration de lymphocytes T (LT) au sein du tissu. Cependant, il apparaît que les lymphocytes B (LB) contribuent également à la pathogénie du SGS. Par ailleurs, la cytokine BAFF (B-cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor (TNF) family) est également très importante dans le développement de la pathologie, puisque des études sur des souris transgéniques surexprimant cette molécule montrent que les LB de ces souris ont proliféré et qu'elles vont présenter les symptômes caractéristiques du lupus puis avec l'âge ceux du SGS.

L'objectif de cette revue est de mieux comprendre les effets de BAFF sur la rupture de la tolérance des LB dans le SGS.



Review

B-cell tolerance breakdown in Sjögren's Syndrome: Focus on BAFF

Marie-Michèle Varin^{a,b,c}, Laëticia Le Pottier^{a,b,c}, Pierre Youinou^{a,b,c,d}, Damien Saulep^e,
Fabienne Mackay^e, Jacques-Olivier Pers^{a,b,c,d,*}

^a EA 2216 « Immunologie et Pathologie », Université de Brest, France

^b IFR 148 ScInBioS, Université de Brest, France

^c Université Européenne de Bretagne, France

^d Brest University Medical School Hospital (CHU Augustin Morvan), Brest, France

^e Department of Immunology, Monash University, Alfred Hospital, Melbourne, Victoria, Australia

ARTICLE INFO

Available online 8 May 2010

Keywords:

BAFF
Sjögren's syndrome
B-cell tolerance
Rituximab

ABSTRACT

Sjögren's syndrome (SS) is an autoimmune epithelitis hallmarked by a destruction of epithelial cells, the subsequent lymphocytic infiltration of exocrine glands and their ensuing dryness. Given the prominent role currently assigned to B cells in SS, it is not surprising that the B cell activating factor belonging to the Tumor Necrosis Factor family (BAFF) is involved in its pathogenesis. When overexpressed, this cytokine leads to self-reactive B cells emergence at the transitional B-cell stage. BAFF overexpression that has been observed in SS, is associated with B-cell tolerance breakdown and autoantibody production. Furthermore, BAFF is responsible for the abnormal distribution of B cells subsets and B-cell hyperactivity described in the blood. In the salivary glands, a minority of B-cell clusters represent ectopic germinal center cells, while the majority manifest features consistent with transitional type 2 (T2) and marginal-zone (MZ)-like B cells. Interestingly, both types of B-cell cluster include autoreactive B cells and BAFF is associated with expansion of T2 B cells and MZ-like B cells in the salivary glands. Finally, BAFF plays a major role in B-cell repopulation after their depletion by rituximab in SS.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. BAFF and its receptors	605
1.1. BAFF heterogeneity (reviewed in [6,7])	605
1.2. BAFF receptors	605
1.3. BAFF functions in immune tolerance: what can we learn from mouse SS models?	605
1.3.1. Double-transgenic mice expressing both HEL and anti-HEL B cell receptor	605
1.3.2. BAFF-transgenic mice	606
1.3.3. Act-1-deficient mice	606
2. BAFF in Sjögren's syndrome	606
2.1. BAFF overexpression is associated with autoantibody production in primary SS	606
2.2. Conflicting results exist for BAFF quantification	606
2.3. Increased BAFF levels are associated with abnormalities of circulating B cells in pSS	606
2.4. Aberrant expression of BAFF in the salivary glands impacts B cells exclusively	607
2.5. Effect of BAFF on marginal-zone-like B cells infiltrating the salivary glands	607
2.6. Autoreactive B cells and ectopic germinal centers	607
2.7. Effect of BAFF on memory B cells infiltrating the salivary glands	607
2.8. BAFF Modulates repopulation of B cells in the blood and salivary glands of rituximab-treated patients with Sjögren's Syndrome	607
Take-home messages	608
References	608

* Corresponding author. Laboratory of Immunology, Brest University Medical School Hospital, BP 824, F29609, Brest, France. Tel.: +33 298 22 33 84; fax: +33 298 22 38 47.
E-mail address: pers@univ-brest.fr (J.-O. Pers).

Sjögren's syndrome (SS) is an autoimmune epithelitis characterized by destruction of exocrine glands [1]. Even though keratoconjunctivitis sicca (resulting from the involvement of lacrimal glands) and xerostomia (resulting from the involvement of salivary glands, SG) are usually prominent, SS presents as a multifaceted condition with a broad variety of clinical manifestations and biological abnormalities.

Although the pathogenesis of primary SS remains unclear, the disease has traditionally been ascribed to T cells. However, recent evidence indicates a major contribution of B cells [2]. In this context, B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor (TNF) family (BAFF) became strikingly associated with SS [3]. Mice transgenic (Tg) for BAFF have contributed to a better understanding of the key roles of the factor in SS [4]. Indeed, BAFF overexpression is responsible for B cell compartment expansion and autoimmune manifestations such as lupus-like disease and SS which progress with age. Moreover, the same manifestations occur in these mice even when T cells are absent [5]. In this review, we will focus on the role of BAFF in the breakdown of tolerance in SS.

1. BAFF and its receptors

1.1. BAFF heterogeneity (reviewed in [6,7])

Like most of the ligand from the TNF family members, BAFF is a transmembrane type II protein (32 kDa) that can be cleaved by a furin convertase to produce a soluble form (17 kDa) [8]. The biologically active form of BAFF is trimeric but sometimes 20 trimers of soluble BAFF associate into a virus-like 60-mer structure. An alternatively spliced mRNA, in which exon 3 is absent, encodes a variant (Δ BAFF) that is described to act, in mice, as a negative regulator of BAFF function by forming heterotrimers with the full-length form. Currently, the protein corresponding to Δ BAFF has never been characterized. BAFF can also form heterotrimers with APRIL (A Proliferation Inducing Ligand) and possesses a functional N-linked glycosylation site, which can considerably affect its biological activity.

BAFF is mainly produced by monocytes, macrophages, dendritic cells and B cells but also by non-lymphoid cells like astrocytes, synoviocytes and epithelial cells [7].

1.2. BAFF receptors

BAFF binds to three receptors: TACI (transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor), BCMA (B-cell maturation antigen) and BAFF-R (BAFF receptor, also known as BR3). All three are mainly expressed on B cells [7]. For each receptor, the density on cell surface varies from transitional type 1 (T1) B cell to plasma cell (Fig. 1). In human, BAFF-R is expressed from the T1 B cell stage to the memory B cell stage but is absent in plasma cells. Unlike BAFF-R, BCMA is expressed at terminal differentiation stages: memory B cells and plasma cells. TACI is also expressed on memory B cells but also on some active mature B cells [9].

1.3. BAFF functions in immune tolerance: what can we learn from mouse SS models?

1.3.1. Double-transgenic mice expressing both HEL and anti-HEL B cell receptor

To avoid the generation of pathogenic auto-antibodies (Abs), self-reactive lymphocytes have to be deleted or anergised during successive immune checkpoints during B cell development and maturation, establishing this way immune tolerance. Because immunoglobulin (Ig) gene rearrangement is a random mechanism, 50–75% of the newly generated B cells in the bone marrow have a self-reactive B cell receptor (BCR). However, only 1–3% of the population develops an autoimmune disease. Consequently, effective mechanisms exist for preventing immune activation of self-reactive lymphocytes.

BAFF is known for its role in survival of mature B cells [8]. Based on its receptor expression profile, BAFF has no effect on B-cell tolerance in the bone marrow but does act in the periphery (Fig. 1). BAFF certainly plays a major role in B cell tolerance after the transitional

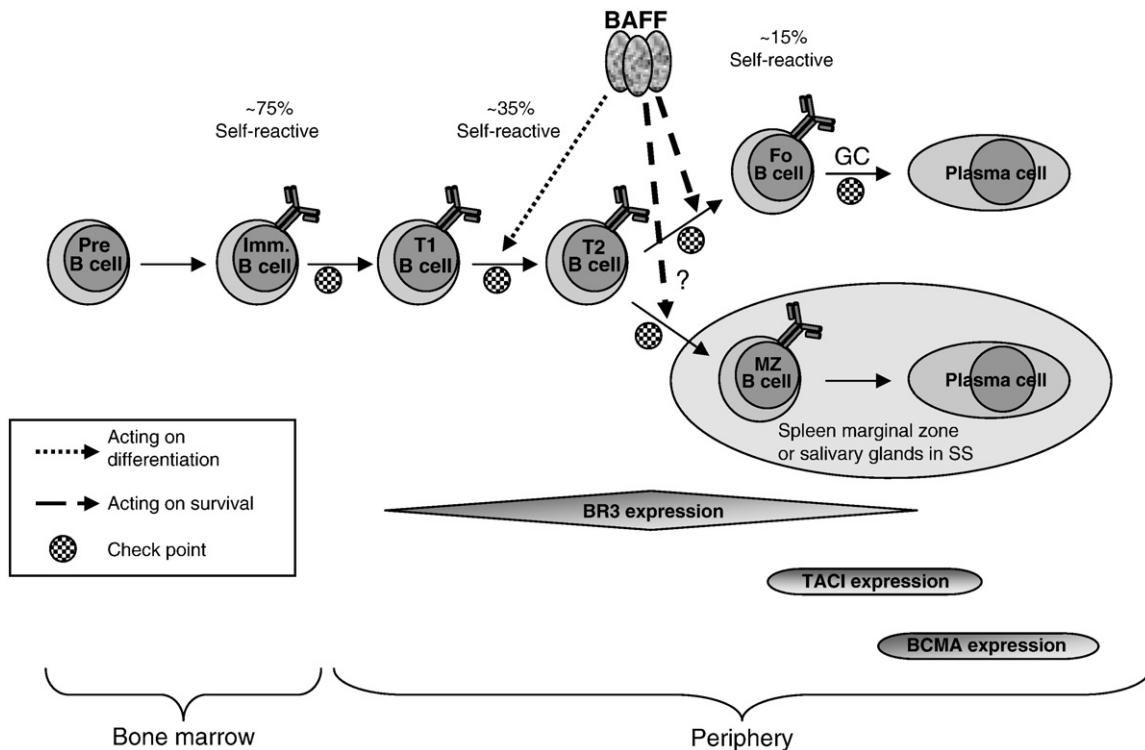


Fig. 1. BAFF receptors cell surface expression and self-tolerance during B cell ontogenesis. Data indicate the proportion of self-reactive B cells at specific B-cell stages before or after check points as determined in the anti-HEL/HEL transgenic models (See Section 1.3.1). Fo: follicular, GC: germinal centre, Imm: immature, MZ: marginal zone, Pre: precursor, SS: Sjögren's syndrome, T1 or 2: transitional type 1 or 2.

type 1 (T1) immature B cell stage. Whether or not BAFF can influence self-reactive T1 B cell elimination is unclear, however, BAFF is certainly needed for survival of T2 B cells and downstream B cell subsets. T2 B cells, which express high levels of BAFF-R, are indeed dependent on BAFF because of their propensity for apoptosis [10] and B cell ontogenesis is stopped at the T1 stage when BAFF or BAFF-R are lacking [11]. One of the most informative systems for studying B-cell tolerance is the double Tg mouse model expressing simultaneously the anti-hen-egg lysozyme (HEL) BCR and HEL. When HEL is expressed as a cell surface molecule, self-reactive B cells are deleted or undergo additional Ig gene rearrangements called receptor editing. When HEL is expressed as a soluble protein (sHEL), self-reactive B cells can migrate into the periphery where their fate depends on their capacity to compete with non-self-reactive B cells. Without competition, self-reactive T2 B cells persist in an anergic state. When competing, self-reactive T2 B cells need BAFF to sustain their survival and maturation. Because BAFF levels are limited under normal conditions, these self-reactive B cells undergo apoptosis. Thus, if double Tg mice for sHEL/anti-HEL are treated with antagonist for BAFF, survival of sHEL self-reactive B cells is dramatically decreased [12]. In contrast, when BAFF is overexpressed, sHEL self-reactive T2 B cells survive and colonize follicles and marginal zone in the spleen [13]. Of note when anti-HEL B cells compete with normal B cells in the animal, excessive expression of BAFF no longer prevents the escape of self-reactive B cells. When anti-HEL B cells compete with normal B cells, self-reactive cells are eliminated at a much earlier maturation stage (T1), a stage when B cells express little BAFF-R and as such are unable to sense excessive BAFF production that can only efficiently rescue T2 B cells.

1.3.2. BAFF-transgenic mice

BAFF-Tg mice constitute an effective model for autoimmunity. Overproduction of BAFF in these mice leads to B cell proliferation, autoAb production, and ultimately development of kidney failure similar to SLE-associated symptoms. Moreover, aging BAFF-Tg mice also present a primary SS-like disease, demonstrating inflammation and destruction of SGs [4]. In addition to the attendant polyclonal hypergammaglobulinemia, BAFF-Tg mice develop elevated titers of multiple autoAbs, including antinuclear Abs, anti-double-stranded DNA Abs, rheumatoid factors, circulating immune complexes, and Ig deposits in kidneys [4]. Some B cell subsets such as T2 B cells, follicular (Fo) B cells and marginal-zone (MZ) B cells are increased. Moreover, without stimulation, a high number of germinal centers (GC) are found in the spleen and the lymph nodes. Finally, lymphocytes infiltrating the SG are essentially MZ-like B cells [4]. Interestingly, BAFF-Tg mice develop the same SS manifestations when T cells are removed [5], but in this instance, BAFF exacerbates Toll-like receptor activation of B cells. An alternative model for the development of SS independently of T cells has since been proposed [3].

1.3.3. Act-1-deficient mice

Another mouse model, the Act-1-deficient model, can give us information on the importance of the signalling pathways mediated by BAFF in the development of SS. Act-1 is a negative regulator in CD40- and BAFF-mediated B cell survival [14]. Indeed, Act-1 deficient-mice develop autoimmune manifestations similar to SS: hypergammaglobulinemia, high levels of anti-SSA and anti-SSB autoAbs, like in human SS, and increased levels of T2, Fo and MZ B cells [15]. Furthermore, infiltrated lymphocytes are observed in lacrimal glands and SGs, and also correspond to MZ-like B cells. This mouse model is closer to human primary SS than the BAFF-Tg model, which is similar to secondary SS. Indeed, Act-1 knockout mice develop early SS manifestations. They also demonstrate that autoAb production is dependent on CD40/CD40L because when CD40 is deficient, autoAbs are not produced. Consequently, in Act-1 knockout mice, anti-SSA and anti-SSB production is T-cell dependent.

2. BAFF in Sjögren's syndrome

2.1. BAFF overexpression is associated with autoantibody production in primary SS

There is circumstantial evidence supporting the view that BAFF contributes to B-cell hyperactivity in human non-organ-specific autoimmune diseases. Indeed, BAFF is an effective costimulator of B-cell expansion and function. Recombinant soluble BAFF costimulates B cells *in vitro* to proliferate and secrete Ig [7] and elevated levels of BAFF were found in sera from patients with SLE [16], RA [17], and primary SS [18]. In primary SS, BAFF levels were higher in patients with anti-SSA or anti-SSB Abs compared to patients without detectable levels of these autoAbs [19]. In contrast, these autoAbs have not been detected in BAFF-Tg mice [4].

2.2. Conflicting results exist for BAFF quantification

In this respect, it is noteworthy that the levels of BAFF are elevated in sera and saliva [20] of patients with primary SS. However, a number of conflicting results have cast doubt on the reliability of the enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) presently in use for its quantification. There is also the intriguing issue of why the serum concentrations of BAFF remain within, or below, normal range in a proportion of patients with autoimmune disease. Furthermore, estimates of BAFF fluctuate with changes in inflammatory activity, extent of the disease and classification criteria chosen by the investigators for SS, RA and SLE. Also important is that the disease activity correlates better with leukocyte BAFF messenger RNA (mRNA) amounts than with plasma BAFF protein titers [21]. These ambiguities prompted us to set up our own ELISA for the measurement of BAFF [22]. Based on the finding that the majority of SS patients display high serum levels of BAFF, our in-house assay appeared to bypass previous flaws. We thus considered the Abs raised against synthetic peptides and used in certain ELISAs as capture or revealing agents. We reasoned that the ELISA polyclonal or monoclonal Abs recognize the glycosylated form of BAFF but not its nonglycosylated form, a bias that may arise from excessive nonglycosylated BAFF, at the expense of its glycosylated form, or from the presence of intragenic splice variants (our unpublished results). We concluded that high levels of BAFF were associated with autoAb production provided that the ELISA used recognizes both glycosylated and non-glycosylated forms of the soluble BAFF in serum [22].

2.3. Increased BAFF levels are associated with abnormalities of circulating B cells in pSS

For unknown reasons, patients with SS exhibit disturbed B-cell subset distribution in their blood with increased numbers of naïve Bm2/Bm2' cells and decreased numbers of memory B cells (eBm5/Bm5) [23]. The observed increase in BAFF levels in primary SS suggests the possibility that they are responsible for the high number of circulating Bm2/Bm2' cells and the associated functional abnormalities of B cells. Association of the BCR with lipid rafts was prolonged in primary SS. This may be accounted for by the overexpression of CD19, which prolongs signaling [24] or prevents the recruitment of negative regulators, whether such regulators are insufficient (CD32) or altered (CD45). Changes in the lipid raft dynamics might lead to an aberrant B cell response in primary SS. It is interesting that the entry of BCRs into the lipid rafts is inhibited in tolerant B cells. BCR enters lipid rafts under the influence of external factors, such as antigen and BAFF. The important finding that BAFF increases the expression of CD19 [25] is now extended by the finding that Bm2/Bm2' cells, abnormally increased in SS, carry more CD19 molecules in primary SS patients than in normal controls [23]. The CD19-induced persistence of the BCRs in lipid rafts may thus be

ascribed to BAFF. The possibility exists that BAFF cooperates with interleukin-2 (IL-2) and/or IL-4 and/or IL-10 that are produced by BAFF-activated B cells. This is not sufficient to deliver differentiation signals, but stimulation of immature B cells through the BCR increases the expression of BAFF-R, which renders cells responsive to BAFF signaling [24].

2.4. Aberrant expression of BAFF in the salivary glands impacts B cells exclusively

BAFF also appears to be implicated in pathophysiological mechanisms that occur in exocrine glands. First, constitutive synthesis of BAFF by epithelial cells does not distinguish SGs from patients with primary SS inasmuch as BAFF was also detected in the SGs of normal individuals [26]. However, levels of BAFF were higher on the plasma membrane of SG epithelial cell lines and also in their culture supernatants. The increased expression of BAFF by epithelial cells might then activate self-reactive B cells in primary SS. Next, transcripts for BAFF were observed in individual T lymphocytes (which was expected) but also in individual B lymphocytes (which was unexpected). There is also controversy regarding which cell subsets express receptors for BAFF. BAFF-R was also present on activated T cells in the blood but was absent on infiltrating T cells in the SGs [26]. Finally, based on the presence of BAFF-R on all B cells and the presence of TACI on subgroups of B cells, the membrane-bound form of BAFF, but not its soluble form, impacted B lymphocytes but not T lymphocytes [26]. For unknown reasons, autoantigen-driven B cells seem to be an exquisite target for BAFF [13].

2.5. Effect of BAFF on marginal-zone-like B cells infiltrating the salivary glands

The SGs of BAFF-Tg mice display an excess of MZ B cells that express high levels of BAFF-R and are potentially pathogenic [4]. Conversely, in BAFF-R-deficient mice, there is a paucity of MZ B cells, owing to an upstream accumulation of T1 B cells [27]. BAFF-R is essential for B cells to transition from the T1 to the T2 immature B cell stage and to become mature B cells. The expansion of T2 B cells and MZ B cells in the SGs has also been observed in patients with primary SS and only a limited proportion of B cell clusters fulfill the requisites for a real ectopic GC [28,29]. This is perfectly in line with antigen-driven clonal B cell proliferation and hypermutation in the exocrine tissue [30]. Engagement of their antigen receptor may induce those T2 B cells to apoptose unless BAFF or T cell signals help them to escape apoptosis. Inevitably, self-reactive MZ B cells encounter local autoantigen, so that they differentiate into memory B cells. Importantly, B cells can undergo somatic hypermutation in extrafollicular sites, provided they supply accessory cell help at levels comparable with GCs [31]. The alternative explanation is that MZ B cells derive from GCs in which hypermutation may be taking place. In either case, competitiveness of autoantigen-engaged B cells is reduced in the periphery of GCs, due to their increased dependence on BAFF [12]. Hence, the fate of B cells during their development is the result of a competition for BAFF, and the overexpression of BAFF in BAFF-Tg mice or in patients with primary SS augments survival signals to self-reactive T2 B cells, allowing them to resist death signals. The strongest difference distinguishing pSS patients with GCs in their SGs from those without such GCs, was the presence of interferon- γ and BAFF [32]. The differential modulation of BAFF receptors is functionally relevant to GC B cell differentiation to plasma cells [9], since BAFF-R is up-regulated in the early stages of this activation, followed by TACI and BCMA, while BAFF-R is downregulated in the late stages of this activation. As a consequence, BAFF would induce the production of chemokines specific for T2 and MZ B cells. This is consistent with the expression of CXCL13 on endothelial cells and within lymphoid follicles in primary SS [33]. The expansion of MZ B cells would thus be

caused by altered BAFF production and BAFF-R expression rather than by a decrease in BCR signaling, given the low levels of CD5 and high levels of CD19 [23] in these B cells. Ligation of the BCR up-regulates the expression of BAFF-R, and the coupling of BCR signaling with BAFF-R would be restricted to T2 and mature B cells [34].

Interestingly, sequential biopsies done before and after rituximab treatment showed the repopulating B cells in SGs. The results indicate that at 24 months after rituximab treatment, B cells aggregating in SGs are T1 B cells. Since transfer experiments have established that T1 B cells give rise to T2 B cells, T2 B cells present in SGs at baseline should originate from T1 B cells. Accordingly, in primary SS patients, B cells should be initiating lymphoid neogenesis [35].

2.6. Autoreactive B cells and ectopic germinal centers

Although BAFF is not required for the initiation of a GC, it has been found to play critical roles in sustaining GC reaction. BAFF Tg mice develop numerous spontaneous and large GCs. Most of the SG samples contained MZ-like areas, while few contained real ectopic GCs. Clues about the integrity of GC tolerance mechanisms have also been provided by tracing the emergence of B cells expressing the idiotype targeted by the 9G4 monoclonal Ab [29]. These findings indicate that the potential tolerance checkpoints that have evolved to restrict autoreactive B cells entering GCs could be defective in SS. Although rare, ectopic GC formation is likely to be involved in SS pathogenesis. These structures act as a conduit to recruit and expand autoreactive B cells. The activation-induced cytidine deaminase (AID) which helps in the generation of high-affinity Igs to exogenous antigens, may also contribute to the emergence of high-affinity and likely pathogenic autoAbs in the SGs. Subsequent to these initial events, self-antigen presentation by autoreactive B cells, as well as by professional antigen-presenting cells and epithelial cells [36] would be crucial in sustaining the autoimmune process in SS.

2.7. Effect of BAFF on memory B cells infiltrating the salivary glands

A minority of TACI- and BCMA-expressing B cells was also discerned in the SGs of patients with primary SS [28]. TACI appears prominent on T2 and mature B cells [9] because TACI-knockout mice have normal mature B cells and MZ B cells. TACI expression is the highest on mouse MZ and B1 B cells. However, we [28] and other investigators [37] have noticed that a proportion of memory B cells are housed in the SGs. Hence, one may speculate that once B cells differentiate into memory B cells and plasma cells, TACI and BCMA are up-regulated while, in turn, BAFF-R is down-regulated [38]. Human plasma cells derive from BCMA-expressing memory B cells, and long-lived plasma cells are lacking in BCMA-knockout mice. TACI and BCMA might thus expand the population of plasma cells, resulting in the local production of autoAbs.

2.8. BAFF Modulates repopulation of B cells in the blood and salivary glands of rituximab-treated patients with Sjögren's Syndrome

Finally, anti-CD20 monoclonal Ab infusions were shown to deplete B cells from SGs of patients with primary SS [39,40]. These studies suggest that rituximab could improve both subjective glandular manifestations and extraglandular signs. Baseline serum levels of BAFF correlated inversely with the duration of B cell depletion: the higher the BAFF levels, the shorter the duration of B cell depletion [35]. The efficacy of rituximab treatment is also diminished if the disease mechanism provides B cells with survival signals. In particular, repopulation of B cells might be modulated by BAFF through its effects on their lifespan [13]. It is known, for example, that BAFF controls a steady-state number of circulating B cells that survive differentiation [34]. The influence of BAFF on B cell return is further supported by the fact that B cells infiltrating the SGs not only expressed BAFF receptors,

but they also had the ability to synthesize this cytokine [26]. Relevant to this issue is the suggestion that the beneficial effects of rituximab-based B cell depletion may be offset by a BAFF-mediated antiapoptotic effect on reemerging B cells [38]. In this regard, the higher the level of BAFF before treatment, the shorter the duration of the B cell lymphopenia. Thus, if rituximab is to be routinely applied as a treatment strategy for primary SS, advance knowledge of the level of BAFF may help in tailoring the doses of rituximab and the frequency of administration. Furthermore, increased BAFF levels described following Rituximab treatment may lead to un-desirable effects disturbing B cell tolerance and generating de novo self-reactive B cells.

Take-home messages

- BAFF overexpression is implicated in B cell tolerance breakdown in Sjögren's syndrome.
- Several forms of BAFF coexist in serum and are responsible for discrepancies according to BAFF quantification.
- BAFF overexpression is associated with B cell abnormalities in Sjögren's syndrome such as aberrant B cell distribution, B-cell hyperactivity and autoantibody production.
- Aberrant expression of BAFF in the salivary glands impact B cells exclusively.
- BAFF favors expansion of transitional type 2 and marginal-zone-like B cells rather than ectopic GC in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome.
- BAFF plays a major role in B-cell repopulation after rituximab treatment in Sjögren's syndrome.

References

- [1] Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome: autoimmune epithelitis. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;72:162–5.
- [2] Le Pottier L, Devauchelle V, Pers JO, Jamin C, Youinou P. The mosaic of B-cell subsets (with special emphasis on primary Sjögren's syndrome). *Autoimmun Rev* 2007;6:149–54.
- [3] Mackay F, Groom JR, Tangye SG. An important role for B-cell activation factor and B cells in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2007;19:406–13.
- [4] Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, Ambrose C, Baetscher M, Schneider P, et al. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med* 1999;190:1697–710.
- [5] Groom JR, Fletcher CA, Walters SN, Grey ST, Watt SV, Sweet MJ, et al. BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *J Exp Med* 2007;204:1959–71.
- [6] Bossen C, Schneider P. BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Semin Immunol* 2006;18:263–75.
- [7] Mackay F, Schneider P. Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol* 2009;9:491–502.
- [8] Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med* 1999;189:1747–56.
- [9] Zhang X, Park CS, Yoon SO, Li L, Hsu YM, Ambrose C, et al. BAFF supports B cell differentiation in the lymphoid follicles through distinct receptors. *Int Immunol* 2005;17:779–88.
- [10] Brink R. Regulation of B cell self-tolerance by BAFF. *Semin Immunol* 2006;18:276–83.
- [11] Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, Cachero TG, Shulga-Morskaya S, Dobles M, et al. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA independent pathway. *Science* 2001;293:2111–4.
- [12] Lesley R, Xu Y, Kalled SL, Hess DM, Schwab SR, Shu HB, et al. Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity* 2004;20:441–53.
- [13] Thien M, Phan TG, Gardam S, Amesbury M, Basten A, Mackay F, et al. Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity* 2004;20:785–98.
- [14] Qian Y, Qin J, Cui G, Naramura M, Snow EC, Ware CF, et al. Act1, a negative regulator in CD40- and BAFF-mediated B cell survival. *Immunity* 2004;21:575–87.
- [15] Qian Y, Giltiay N, Xiao J, Wang Y, Tian J, Han S, et al. Deficiency of Act1, a critical modulator of B cell function, leads to development of Sjögren's syndrome. *Eur J Immunol* 2008;38:2219–28.
- [16] Zhang J, Roschke V, Baker KP, Wang Z, Alarcón GS, Fessler BJ, et al. Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2001;166:6–10.
- [17] Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM, Stohl W. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 2001;44:1313–9.
- [18] Groom J, Kalled SL, Cutler AH, Olson C, Woodcock SA, Schneider P, et al. Association of BAFF/BlyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. *J Clin Invest* 2002;109:59–68.
- [19] Pers JO, Daridon C, Devauchelle V, Jousse S, Saraux A, Jamin C, et al. BAFF overexpression is associated with autoantibody production in autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1050:34–9.
- [20] Pers JO, d'Arbonneau F, Devauchelle-Pensec V, Saraux A, Pennec YL, Youinou P. Is periodontal disease mediated by salivary BAFF in Sjögren's syndrome? *Arthritis Rheum* 2005;52:2411–4.
- [21] Collins CE, Gavin AL, Migone TS, Hilbert DM, Nemazee D, Stohl W. B lymphocyte stimulator (BlyS) isoforms in systemic lupus erythematosus: disease activity correlates better with blood leukocyte BlyS mRNA levels than with plasma BlyS protein levels. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R6.
- [22] Le Pottier L, Bendaoud B, Renaudineau Y, Youinou P, Pers JO, Daridon C. New ELISA for B cell-activating factor. *Clin Chem* 2009;55:1843–51.
- [23] d'Arbonneau F, Pers JO, Devauchelle V, Pennec Y, Saraux A, Youinou P. BAFF-induced changes in B cell antigen receptor-containing lipid rafts in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2006;54:115–26.
- [24] Cherukuri A, Cheng PC, Sohn HW, Pierce SK. The CD19/CD21 complex functions to prolong B cell antigen receptor signaling from lipid rafts. *Immunity* 2001;14:169–79.
- [25] Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Takehara K. Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J Immunol* 2000;165:6635–43.
- [26] Daridon C, Devauchelle V, Hutin P, Le Berre R, Martins-Carvalho C, Bendaoud B, et al. Aberrant expression of BAFF by B lymphocytes infiltrating the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2007;56:1134–44.
- [27] Schneider P, Takatsuka H, Wilson A, Mackay F, Tardivel A, Lens S, et al. Maturation of marginal zone and follicular B cells requires B-cell activating factor of the tumor necrosis factor family and is independent of B cell maturation antigen. *J Exp Med* 2001;194:1691–7.
- [28] Daridon C, Pers JO, Devauchelle V, Martins-Carvalho C, Hutin P, Pennec YL, et al. Identification of transitional type II B cells in salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2006;54:2280–8.
- [29] Le Pottier L, Devauchelle V, Fautrel A, Daridon C, Saraux A, Youinou P, et al. Ectopic germinal centers are rare in Sjögren's syndrome salivary glands and do not exclude autoreactive B cells. *J Immunol* 2009;182:3540–7.
- [30] Loder F, Mutschler B, Ray RJ, Paige CJ, Sideras P, Torres R, et al. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med* 1999;190:75–89.
- [31] William J, Euler S, Christensen S, Shlomchik MJ. Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. *Science* 2002;297:2066–70.
- [32] Szodoray P, Alex P, Jonsson MV, Knowlton N, Dozmorov I, Nakken B, et al. Distinct profiles of Sjögren's syndrome patients with ectopic salivary gland germinal centers revealed by serum cytokines and BAFF. *Clin Immunol* 2005;117:168–76.
- [33] Amft N, Curnow SJ, Scheel-Toellner D, Devadas A, Oates J, Crocker J, et al. Ectopic expression of the B cell-attracting chemokine BCA-1 (CXCL13) on endothelial cells and within lymphoid follicles contributes to the establishment of germinal center-like structures in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2001;44:2633–41.
- [34] Batten M, Groom J, Cachero TG, Qian F, Schneider P, Tschopp J, et al. BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J Exp Med* 2000;192:1453–66.
- [35] Pers JO, Devauchelle V, Daridon C, Bendaoud B, Le Berre R, Bordron A, et al. BAFF-modulated repopulation of B lymphocytes in the blood and salivary glands of rituximab-treated patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2007;56:1464–77.
- [36] Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Functional expression of CD86 on human salivary gland epithelial cells that interacts with the CD28 receptor, but has reduced binding to CTLA4. *J Immunol* 2000;166:3107–13.
- [37] Hansen A, Odendahl M, Reiter K, Jacobi AM, Feist E, Scholze J, et al. Diminished peripheral blood memory B cells and accumulation of memory B cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2002;46:2160–71.
- [38] Hsu BL, Harless SM, Lindsley RC, Hilbert DM, Cancro MP. BlyS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators. *J Immunol* 2002;168:5993–6.
- [39] Devauchelle-Pensec V, Pennec Y, Morvan J, Pers JO, Daridon C, Jousse-Joulin S, et al. Improvement of Sjögren's syndrome after two infusions of rituximab (anti-CD20). *Arthritis Rheum* 2007;57:310–7.
- [40] Pijpe J, van Imhoff GW, Spijthervet FK, Roodenburg JL, Wolbing GJ, Mansour K, et al. Rituximab treatment in patients with primary Sjögren's syndrome: an open-label phase II study. *Arthritis Rheum* 2005;52:2740–50.

OBJECTIFS DE LA THESE

Les modifications épigénétiques pourraient jouer un rôle important dans le développement des MAI comme le SGS. Dans une première partie, nous nous sommes intéressés à l'expression d'éléments rétroviraux endogènes (HERV) sensibles à l'épigénétique et aux microARN au cours du SGS.

Plusieurs équipes ont démontré qu'au cours du SGS, le tissu épithélial des GS est infiltré par des lymphocytes et que les cellules épithéliales (CE) sont exposées à une mort plus importante que dans la GS saine. Nous avons donc mis en place un modèle *in vitro* afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires entrant en jeu au niveau de la glande pathologique.

Tout d'abord, nous avons utilisé la lignée cellulaire HSG (Human Salivary Gland) comme modèle de CE. Cette lignée est issue d'un carcinome humain de glande salivaire. Nous avons mimé l'infiltrat lymphocytaire de la GS pathologique en étudiant l'interaction entre les CE et les lymphocytes B (LB) et T (LT) grâce à des co-cultures entre ces cellules.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à BAFF et à ses récepteurs, et plus particulièrement au rôle de BAFF sur les CE. Pour cela, nous avons évalué l'expression de BAFF et de ses récepteurs à la surface des CE et étudié leurs effets fonctionnels.

RESULTATS

ARTICLE 2

Epigenetics and Sjögren's syndrome

**Christelle Le Dantec, Marie-Michèle Varin, Wesley H Brooks,
Jacques-Olivier Pers, Pierre Youinou, Yves Renaudineau**

**Article sous presse dans Current Pharmaceutical Biotechnology,
2012**

Implication de l'épigénétique dans le syndrome de Gougerot-Sjögren

Article 2 : Epigenetics and Sjögren's syndrome

1. Le contexte et les objectifs

Les modifications épigénétiques pourraient jouer un rôle important dans le développement des maladies auto-immunes (MAI) comme le SGS. Trois mécanismes importants ont été décrits, la méthylation de l'ADN, l'expression des microARN et les modifications post-traductionnelles associées à la production d'auto-anticorps.

Les microARN sont de petits ARN (18-23 pb) régulant l'expression de gènes au niveau post-transcriptionnel. Ceux-ci se fixent par complémentarité à la région 3' UTR (région non transcrite) de l'ARN messager (ARNm) cible, ce qui conduit à la répression de sa traduction ou sa dégradation. Les microARN sont impliqués dans le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire, le cycle cellulaire, l'apoptose, le développement des cellules immunitaires et dans les réponses immunes.

Les rétrovirus endogènes humains (HERV) sont des éléments d'origine rétrovirale intégrés dans le génome humain au cours de l'évolution. Ces éléments défectifs et non réplicatifs représentent 8% du génome. La réactivation de ces HERV est associée à des virus exogènes, des agents mitogènes, des cytokines pro-inflammatoires, des hormones stéroïdiennes ou l'exposition aux UV-B et aux rayons X. Ces séquences sont particulièrement sensibles aux changements de la méthylation de l'ADN.

La compréhension des régulations et modifications épigénétiques dans le SGS pourrait expliquer entre autres, la prédominance féminine et l'âge d'affection de la

maladie, le rôle de la prédisposition génétique, mais aussi l'hétérogénéité dans la réponse aux traitements selon les patients.

L'article suivant s'intéresse à l'expression des HERV et des microARN dans le SGS.

2. La démarche expérimentale

Les biopsies de GS ont été prélevées chez des patients souffrant de SGS avéré ou souffrant de syndrome sec avec suspicion de SGS. Le diagnostic des témoins a été réalisé rétrospectivement. Les GS ont été broyées, puis les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit RNable® (Eurobio) selon les instructions du fournisseur. Les ADNc correspondants ont été synthétisés par la technique de « random priming » grâce au kit SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen), selon les instructions du fournisseur. La présence d'HERVs a été étudiée par PCR, en utilisant des amorces spécifiques des HERV 4.1, Mid1 et LTR7.

Pour l'étude des microARN, les cellules épithéliales primaires ont été obtenues à partir des GS coupées en petits fragments et mises en culture pendant quatre semaines jusqu'à confluence. Les microARN étudiés sont miR-150, miR-155, miR-181a, et RNU48, un microARN contrôle. Ils ont été étudiés par RT-PCR grâce aux kits Taq Man miRNA RT (Applied Biosystems, Grand Island, NY) et Taq Man miRNA Cells to C_T (Ambion, Grand Island, NY), selon les instructions des fournisseurs. Les résultats sont exprimés en fonction de la moyenne \pm écart type. Les tests de comparaison ont été réalisés en utilisant le test de Mann-Whitney pour variables non appariées.

3. Les résultats et la discussion

Au moins un des trois HERV-E (HERV 4.1, HERV-Mid1 ou HERV-LTR7) a été détecté dans les GS de la grande majorité des patients étudiés.

L'intégration de certains HERV est considérée comme un facteur de risque de développer une MAI, comme le SGS. En effet, ils sont capables de moduler les réponses immunes par différents mécanismes, comme leur intégration dans le génome, ou l'expression du produit de leurs gènes. Au niveau du génome, leur présence peut perturber des gènes voisins et moduler l'expression des protéines endogènes résultantes, comme par exemple la protéine C4 du complément (Wouters et al, 2009). D'autre part, l'intégration des HERV a pu s'être faite au sein de régions de l'ADN liées à l'immunité ou à proximité de ces zones, créant ainsi un nouveau promoteur et générant des protéines tronquées ou des variants, par épissage alternatif. Au niveau protéique, il peut y avoir un phénomène de chimérisme moléculaire entre les protéines rétrovirales et les protéines endogènes, conduisant à la sécrétion d'auto-anticorps. Par ailleurs, l'homologie entre les protéines rétrovirales et endogènes peut conduire à la surexpression des endogènes, modifiant ainsi la physiologie cellulaire. Enfin, les protéines issues des HERV peuvent avoir des fonctions immunomodulatrices conduisant à la répression ou à l'expansion des lymphocytes.

Les microARN miR155 et 181a sont sur-exprimés dans les CE des patients atteints de SGS (par 2 et 4 fois respectivement, par rapport aux CE des contrôles). En revanche, l'expression de miR150 n'est pas modifiée entre les patients et les contrôles. Ce microARN joue un rôle dans la survie et la prolifération cellulaires.

En 2009, Pauley et al démontrent que des microARN, dont miR155, sont surexprimés avant l'apparition du SGS, que ce soit dans les GS ou dans les cellules mononucléées du sang périphérique chez l'Homme et chez la souris. Il est par ailleurs surexprimé lors d'une réponse immune adaptative dans plusieurs types cellulaires. MiR155 régule l'expression des TIRs (toll-like receptors and interleukin-1 receptors) qui jouent un rôle dans la dérégulation des réponses immunes. MiR181a est impliqué dans la différenciation et la prolifération cellulaires en ciblant une protéine homeobox (Hox-A11) et des oncogènes comme Tcl-1. La surexpression de miR155 et miR181a dans les CE des GS de patients pourrait être associée au SGS.

La surexpression de miR155 a été reportée dans plusieurs MAI comme la sclérose en plaque, la maladie inflammatoire de l'intestin ou la polyarthrite rhumatoïde (PR). MiR155 est également surexprimé dans des désordres inflammatoires comme l'athérosclérose ou l'eczéma atopique (revue Tomankova et al, 2011). Dans la PR, les fibroblastes des tissus synoviaux sont impliqués dans la destruction de l'articulation en surexprimant des gènes codant pour des molécules pro-inflammatoires et des enzymes intervenant dans la destruction de la matrice. La signalisation dans ces cellules est également dérégulée (Stanczyk et al, 2006).

MiR155 est surexprimé par les fibroblastes de la synoviocyte et dans le tissu synovial de patients atteints de PR. Stanczyk et al (2008) montrent que cette surexpression réprime la production de métalloprotéase 3 (MMP3) et réduit l'induction de MMP1 et MMP3 par les ligands des Toll-like récepteurs (TLR) et les cytokines. Ce miARN pourrait donc jouer un rôle important dans la modulation de la destruction du tissu au cours de la PR et donc pourrait être une molécule intéressante à étudier dans le cadre de traitement thérapeutique de la PR.

Finalement, les HERV et les miARN étudiés présentent des profils d'expression différents dans le SGS et chez les personnes saines. Ces facteurs d'épigénétique pourraient être des biomarqueurs de MAI comme le SGS.

EPIGENETICS AND SJÖGREN'S SYNDROME

Christelle Le Dantec¹, Marie-Michèle Varin¹, Wesley H Brooks³, Jacques-Olivier Pers¹⁻², Pierre Youinou¹⁻², Yves Renaudineau¹⁻²

¹EA2216 Immunology and Pathology, IFR 148 ScInBioS, Université de Brest, Brest;

Université Européenne de Bretagne, France

²Laboratory of Immunology, Pôle biologie, CHU Brest, Hôpital Morvan, Brest, France

³Experimental HTS, Drug Discovery; H. Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute;

Tampa, Florida, U.S.A.

Address correspondence to: Yves Renaudineau, Laboratory of Immunology, Brest University Medical School Hospital, BP824, F-29609, Brest, France. Phone: 33-298-22-33-84 ; Fax: 33-298-22-38-47 ; yves.renaudineau@univ-brest.fr

Abstract

There is growing evidence that epigenetics, the study of heritable changes in gene expression that do not involve mutations in the DNA itself, may play an essential role in autoimmune diseases (AID). In Sjögren's syndrome (SS), a chronic AID characterized by an epithelitis of the exocrine glands, epigenetic studies have focused on three mechanisms: DNA methylation and its consequences including human endogenous retrovirus (HERV) expression; microRNA expression; and protein post-translational modifications associated with autoantibody production. Although in its infancy, comprehension of the epigenetic (dys)regulation in SS may help us to understand: why SS affects predominantly middle-aged women; why genetically predisposed individuals develop SS but not others; why flare-ups occur; why treatment responses differ between patients; and why some patients develop lymphoma. From these studies will arise a better comprehension of the pathophysiology of SS as well as development of new diagnostic and prognostic biomarkers, and novel therapeutics for prevention and perhaps early intervention.

Keywords: Sjögren's syndrome, epigenetics, DNA methylation, microRNAs, post-translational modifications, human endogenous retrovirus

I. Introduction

Sjögren's syndrome (SS) is a chronic autoimmune disease affecting exocrine glands, mainly the salivary and lacrimal glands, leading to its designation as autoimmune exocrinopathy or autoimmune epithelitis [1]. Systemic features may be present, and patients with SS have a 20-40 fold increased risk of developing lymphoma [2–4], mostly salivary gland lymphoma. In the different SS manifestations, the epithelium is affected and injury is associated with dense lymphocytic infiltrates composed of activated T and B cells [5]. Epithelial cells play a central role in the disease through the recruitment and activation of lymphocytes, and the release of apoptotic blebs containing autoantigens (52 kDa and 60 kDa Ro/SSA, La/SSB, Sm) [6].

The etiology of SS is multifactorial and arises from an interplay of genetic predispositions, in particular HLA-DR allele subtypes, and specific gene polymorphisms including the ancestral haplotype 8.1, IL-10, SSA1, FCGR3B, CCL3L1, IRF5 and STAT4 [7-9]; immunological deregulation such as autoantibody (Ab) production; and environmental factors like UV light, nutrition, exposure to infectious agents, and drugs [10]. Interestingly, exposure to environmental factors, geographical particularities, radiation exposure, and sex have been advanced recently to explain the broad prevalence, 0.1% to 4.8%, reported in SS [1].

Initially, epigenetics was introduced to describe how environmental factors may influence a cell heritably or reversibly without affecting the nucleotide sequence of the DNA. Now, a more precise definition of epigenetics relates it to specific cellular processes including the control of transcription by DNA methylation and histone modifications, the control of transcripts by microRNAs (miRNA), and the influence on cellular regulatory processes by protein post-translational modifications (PTM). As a consequence, epigenetic processes control cellular differentiation and development, cellular life span, progression of carcinogenesis, and last but not least, the immune system.

II. DNA methylation and chromatin remodelling

A. DNA methylation and histone modifications

The density of chromatin varies along each chromosome with dense regions referred to as heterochromatin and less dense regions referred to as euchromatin. Heterochromatin participates in the inactivation of the genes, in the compaction of centromeres and telomeres, and in the silencing of transposons, such as human endogenous retroviruses (HERV) that are present in the “junk DNA”. Regulatory gene sequences present in the heterochromatin are characterized by increased DNA methylation of cytosines in the CpG motifs, histone deacetylation, and recruitment of non-histone DNA-binding proteins, like the heterochromatin protein 1 that blocks transcription factor access to promoters. In contrast, euchromatin is found in areas of transcriptionally active genes and shows decreased DNA methylation, and increased histones modifications such as acetylation.

Throughout the genome, methylated sites are distributed on about 70% of CpGs. The remaining demethylated motifs are concentrated in short repeated CpG sequence domains, called CpG islands, that control gene expression when associated with gene regulatory regions. In cancer cells, DNA methylation has been shown to contribute to gene silencing of tumor suppressor genes, and to DNA mutations and chromosomal instability when DNA methylation concerns CpG islands outside of regulatory areas. DNA methylation occurs by covalent addition of a methyl group from the methyl donor S-adenosyl-L-methionine (SAM) to the 5' carbon of the cytosine ring in

CpG pairs. At least five DNA methyltransferases have been characterized (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, DNMT3L and DNMT2). DNMT1 preferentially methylates hemi-methylated substrates, such as appear during cell division, and thereby DNMT1 contributes to the maintenance of DNA methylation patterns. DNMT3a and DNMT3b methylate unmethylated DNA and thus contribute to *de novo* methylation. DNMT2 displays only weak DNA methyltransferase activity. Its main function is to methylate aspartyl-tRNA. DNMT3L binds DNMT3a and DNMT3b to regulate their functions. DNA methylation causes transcriptional repression of associated genes directly by reducing the affinity between transcription factors and their target DNA, or indirectly via methyl-CpG-binding proteins (MBD), a group that includes MECP2, MBD1-MBD4 and Kaiso. The main function of MBD is to recruit proteins that do not bind directly to DNA, such as the histone deacetylases (HDACs) and HP1. Genetics and epigenetics are linked since it has been demonstrated that polymorphisms in the X-linked MECP2 gene confer a risk for development of systemic lupus erythematosus (SLE) [12]. However, association with SS is currently unknown.

Histones are small well-conserved proteins associated with DNA in a fundamental unit called the nucleosome that controls chromatin condensation and decondensation. Non-condensed nucleosomes resemble “beads on a string”, and each bead or nucleosome consists of two copies of the four histones (H2A, H2B, H3 and H4) surrounded by 146 bp of DNA coiling twice around the histone core. The number of nucleosomes per cell has been

estimated at around 10 million, and they are separated by 10-80 bp of linker DNA. In condensed DNA, the linker histone H1 binds to the linker DNA between nucleosomes to facilitate compaction. The histone amino terminal tails protruding from the nucleosomes are subject to many PTM including acetylation, methylation, ubiquitination, phosphorylation, sumoylation, deimination/citrullinisation, ADP ribosylation, and proline isomerization [13]. Histone PTM are recognized by specific proteins in order to control DNA folding via DNA-histone, histone-histone and nucleosome-nucleosome interactions. The most intensively studied modifications are acetylation and methylation. Indeed, the activity of histone acetyl transferases (HATs) is counterbalanced by HDACs that remove the acetyl groups. HDACs are divided into four classes: class I consists of HDAC 1-3 and 8 (nuclear localization), class II consists of HDAC 4-7 and 9-10 (cytoplasmic and nuclear localization), class III consists of sirtuins (SIRT 1-7) and class IV consists of HDAC 11 which exhibits features of classes I-II. Similarly, the impact of arginine or lysine methylation by histone methyl transferases (HMTs) is reversed by demethylating enzymes. It should be kept in mind that one histone can carry different modifications at any given time and that histone modifications are dynamic and can change rapidly in response to stimuli. In addition, PTM are not restricted to histones since, for example, HDAC2 can modify up to 200 non-histone targets including the U1 small nuclear (sn)-ribonucleoprotein (RNP) and the small cytoplasmic (sc)-RNP proteins 60 kDa Ro/SSA and La/SSB.

B. Twin studies

Studies involving monozygotic twins (MT) that are genetically identical constitute the ideal model to study epigenetic modifications [14]. Fraga et al. have demonstrated that DNA methylation patterns and histone acetylation profiles diverge in the peripheral blood between younger and older healthy MT [15]. Furthermore, it was also noted that MT with the greatest differences were those who have spent less of their lives together, thus providing evidence that changes may be related to differences in environmental exposures and/or diet. Using peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from pairs of siblings discordant for SLE, rheumatoid arthritis (RA) and dermatomyositis (DM), the same group has reported that only MT discordant for SLE, but not for RA or DM, exhibited global loss in their DNA methylation status when 807 promoters were analyzed [16], and this was associated with a reduction in DNMT1 and DNMT3b transcripts. Methyl cytosine modifications among 5 SLE twins and their corresponding healthy MT were scrutinized in more detail revealing a common set of 49 demethylated genes. Among the differentially methylated genes, some of them are involved in the immune response including IL-10, CD9, CD82, PECAM, the interferon gamma receptor 2 (IFNRG2), and the colony stimulating factor 3 receptor (CSFR3).

C. epigenetics in aging

The combined influence of aging and environmental factors in the epigenome may provide an explanation for age-related AID development. Indeed, when analysing DNA methylation status, a reduction with age is observed in the elderly and it appears to be proportional to the life expectancy [17]. Similarly, chromatin reorganization is observed in senescent cells in association with histone modifications [18]. However, studies of histone modifications in the elderly have concentrated mostly on the association between cellular life span and the NAD⁺ dependent HDAC class III sirtuin family. Indeed, manipulation of sirtuin activity influences cellular longevity positively when over-expressed and negatively when under-expressed [19].

Interestingly, young SIRT1 $-/-$ mice develop an SLE-like disease with anti-nuclear Abs (ANA) and glomerulonephritis. When they survive up to two years of age, a diabetes insipidus appears [20]. Sirtuin expression is controlled by environmental factors. In fact, smoking is associated with SIRT1-2 down-regulation and pro-inflammatory cytokine production, an effect prevented with the utilization of the SIRT1 activator resveratrol isolated from red wine. The beneficial effects of sirtuin inhibitors and HDAC class I-II inhibitors have also been demonstrated in different AID mouse models showing that the effect was related to reduction of cytokine production while autoAb synthesis remained unaffected [21-23]. The relation between life span and HDAC class I-II is still being debated.

III. Chromatin modifications in SS

A. DNA methylation in SS

Hydralazine and procainamide, drugs known to induce SS with immunological features of an SLE like disease [24-25], possess the capacity to remove the methyl group from cytosines present in CpG islands and, therefore, are referred to as demethylating agents. Both drugs, when given orally to mice for several weeks, are responsible for the development of an SLE-like disease with ANA [26]. Variations were observed depending on the animal strain, age, and sex and the effect disappeared after discontinuation of the drug. Richardson's group has demonstrated that hypomethylated CD4⁺ T cells became autoreactive. Indeed, passive transfer of CD4⁺ T cells pretreated with either of two distinct DNA methyltransferase inhibitors, 5-azacytidine or procainamide, into mice induced anti-dsDNA Ab production with the characteristics of a severe immune complex glomerulonephritis [27]. The influence of DNMT inhibitors was also addressed in B cells using bone marrow B cells pretreated with hydralazine and re-injected by passive transfer into syngenic mice leading to the detection of anti-nucleosome Abs in the recipients [28]. Similar to what was observed in SLE, scleroderma and DM [29], Yin et al. have recently reported that DNA methylation is impaired in

CD4+ T cells isolated from patients with SS [30]. As a consequence, several methylation sensitive autoreactive related genes are over-expressed. Among these genes, the promoter region flanking the CD70 gene, a B cell co-stimulatory molecule, is demethylated and CD70 is over-expressed in SS CD4+ T cells.

Different T cell and B cell subpopulations are characterized by abnormal DNA methylation patterns. First, the senescent CD4+ CD28– CD70+ Kir+ subpopulation, which is increased in RA and spondyloarthritis [31], second the defective pre-Treg CD4+ CD25– subpopulation that overexpress FoxP3 but lack regulatory functions [32], and third the CD5+ B cell [33]. In SS, whereas the CD4+ CD28- subpopulation is not altered, FoxP3+ T cells and CD5+ B cells are over-expressed in the blood and salivary glands from SS patients [34-37]. Like CD4+ CD25- FoxP3+ isolated from SLE patients, FoxP3+ T cells isolated from SS patients are unable to suppress the immune response suggesting that in both diseases FoxP3+ T cells are in fact demethylated and defective pre-Treg cells, an hypothesis that needs further confirmation [38]. Of note is the observation that the Treg/FoxP3 -/- Scurfy mice develop a rapid salivary gland inflammation and impaired salivation function after oral application of lipopolysaccharide (LPS) confirming that functional Treg are important to prevent SS [39].

B. SS and HERV elements

Throughout the genome, HERV are particularly sensitive to DNA methylation changes and several reports have identified such elements in salivary glands from SS patients [40-41]. In an attempt to confirm the importance of HERV expression in salivary glands from SS, we have tested by RT-PCR three HERV-E elements (Figure 1). Interestingly, all patients tested, except one, were positive for at least one HERV-E element. HERV are sequences derived from the integration of retroviral elements that account for at least 8% of the genome in comparison to only 3% of the genome being essential for life. Integration of most HERV into the genome occurred millions

of years ago and, after mutations and deletions that render infection impossible, HERV are transmitted like other stable Mendelian elements. Analysis of the HERV mutation rate, 0.15-0.21% mutations per million years, between the 5' long terminal repeat (LTR) and 3' LTR, may be helpful for dating chromosomal integration [42]. HERV reactivation has been associated with exogenous viruses, mitogens, pro-inflammatory cytokines, steroid hormones, UVB irradiation, and X-ray exposure.

When overexpressed, HERV may interfere with the immune response by different mechanisms [43]. First, is the possibility of molecular mimicry between a retroviral protein and an autoantigen. For example, HRES-1 p30gag that cross-reacts with the SLE autoantigen U1-snRNP is recognized as an autoantigen in up to 30% of SS patients and 50% of SLE patients compared to less than 5% in a healthy control group [40]. Similarly, another unknown HERV, which may be Erv-3, cross-reacts with the p24 Gag of HIV-1 leading to the detection of anti-p24 Abs in the blood of patients with SS (33%) and p24 related antigen in the salivary glands (47%) in the absence of HIV and HTLV-1 infection [41]. Second, HERV gene products may possess immunomodulatory functions leading to repression or expansion of T cell populations as demonstrated in multiple sclerosis [44]. Third, HERV gene products may be homologous to a cellular protein and its over-expression modifies the cellular physiology [45]. Fourth, HERV may have integrated into or adjacent to immune-related genes and provide a new promoter that generates truncated proteins, or isoforms by alternative splicing. An example is the HERV-CD5 endogenous retrovirus, located 8 kb upstream CD5 gene, which generates an alternative transcript with CD5 [46-48]. Fifth, HERV can

also influence neighbouring genes in an abnormal way. Presence of HERV-K(C4) in the 9th intron of the C4 complement gene, which occurs in 70% of the population, resulted in a reduction of C4B protein [49]. Sixth, HERV integration may be considered as a genetic risk factor for AID, as reported for HERV-K113 and patients with SS and MS [50].

C. SS and lymphoma

The methylation status of CpG islands of the pro-apoptotic death associated protein kinase (DAPK) was studied by Tosos et al. in samples from primary salivary gland lymphoma, the main SS associated lymphoma [51]. Surprisingly, the authors reported that demethylation of the DAPK gene characterized the SS sub-group when compared to the non-SS sub-group that are aberrantly hypermethylated. As a consequence, the tumor processes may be different between both sub-groups.

IV. Chromosome X and SS

In humans, females inactivate one of their two X chromosomes in each cell in order to express X-linked genes at similar levels as males that have only one X chromosome since most X-linked genes are not sex-specific [52]. The active chromosome is referred to as X_a, whereas the inactive one is referred to as X_i. The choice of which X chromosome to inactivate, the maternally-derived or the paternally-derived, is a random choice made in somatic cells early in development. As a consequence, in newborn females we observe a mosaic of groups of cells with the maternally-derived X inactivated next to groups of cells with the paternally-derived X inactivated. This pattern will be

conserved throughout life since the daughter cells and all subsequent generations will keep the same parentally-derived X chromosome inactive as was chosen by its original ancestor cell.

X chromosome inactivation (XCI) originates on the long arm of the X at position Xq13.3 in an area of DNA referred to as the X-Inactivation Center (XIC) that contains the 35kb human X-Inactivation Specific Transcript (XIST) gene that yields a long processed RNA transcript of approximately 19 kb. The XIST RNA does not appear to code for protein and remains in the nucleus where it can repress the Xi by coating the contiguous chromosome and recruiting proteins that further establish an inactive heterochromatic state. Furthermore, stable Xi repression involves continuous activity of DNMT1, DNA methylation, a series of histone modifications (hypoacetylation, methylation, and ubiquitination), plus the accumulation of the repressor histone variant, macroH2A. All these modifications contribute to formation of the heterochromatic Xi structure, also referred to as the Barr body, which is generally located at the periphery of the nucleus. The Xa chromosome (i.e. euchromatin) assumes a more central location in the nucleus, similar to autosomes, and remains active.

Several arguments suggest a role for the X chromosome in the development of SS. The first, and indirect one, relates to the female predominance in SS with a sex ratio of 9:1 between females and males. The second one is related to the association between numerical abnormalities of the X chromosome and SS since several reports of SS women with trisomy X

(47,XXX) or a super female phenotype (mosaic of XXXXX/XXXX/XXX/XX/XO) have been reported. On the other hand, the skewed XCI, (i.e. a significant preferential inactivation of one parentally-derived X over the other) reported in scleroderma was not observed in SS [53]. The recent observation that increased demethylation of the Xi is associated with over-expression of the B-cell co-stimulator CD40-ligand in CD4⁺ T cells from women with SLE suggests that this should be tested in SS [54]. Cumulatively, the possible involvement of the X chromosome and related epigenetic defects in SS needs further investigation.

V. RNA transcripts

A. MiRNA

MicroRNAs (miRNA) are genome-encoded 18- to 23-base-pair (bp) RNAs that regulate gene expression at the post-transcriptional level. MiRNAs are transcribed in the nucleus by RNA polymerase II or III forming long preliminary transcripts which are cleaved by Drosha in the nucleus, exported to the cytoplasm by exportin 5, processed by Dicer into mature miRNA duplexes, and separated into single strands at the core of the multiprotein RNA-induced silencing complex (RISC) by argonaut proteins to generate miRNAs. It is generally accepted that miRNAs, by base pairing, bind the 3' untranslated region (UTR) of specific messenger RNAs (mRNA) for degradation or translational repression (Figure 2A). One third of the transcriptome is suspected to be regulated by the 800–1,000 human miRNAs since one miRNA can alter the expression of hundreds of mRNAs. MiRNAs

regulate different cellular processes such as embryonic development, cell differentiation, cell cycle, apoptosis, immune cell development, and immune responses. One of the characteristics of miRNAs is that they are highly resistant to degradation by RNases and can be isolated from biopsies and all types of body fluids including plasma, saliva, urine, and exosomes thus making miRNAs excellent biomarkers.

B. MiRNA in SS

To date, few studies on miRNAs have been conducted in SS patients. According to Pauley et al., miR-146a and miR-155, two miRNAs up-regulated in response to the adaptive immune response in multiple cell types, are increased prior to disease onset in the salivary glands and in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from both SS patients and from the SS prone mouse model C57Bl/6.NOD-Aec1 Aec2 [55]. MiR-146a is a master gene regulator, activated by NF-kappaB, that controls the TLR/IFN pathway through the TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6), the IL-1 receptor associated kinase (IRAK1), the signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1), and the interferon regulatory factor 5 (IRF5) [56]. Examination of miR-155 targets reveals an effect on the response of toll-like receptors and interleukin-1 receptors (TIRs) that are suspected to affect the immune response. Interestingly, the FoxP3 transcription factor, which is over-expressed in T cells infiltrating SS salivary glands (see above), has been shown to induce miR-155 expression. Another source of miR-155 may be salivary gland epithelial cells since we have observed that cultured salivary epithelial cells from SS express two fold more miR-155 than controls (Figure 2B). Two other miRNA, were also tested revealing that miR-181a but not miR-150 was overexpressed in cultured salivary glands from SS patients. MiR-181a participates in differentiation and proliferation by targeting, respectively, a homeobox protein (Hox-A11) and oncogenes (Tcl-1). Testing salivary gland biopsies from SS patients, Illei's

group has observed that three miRNAs within the miR-17-92 cluster, miR-18a, hsa-miR-19a, and hsa-miR-19b, were upregulated [57]. The miR-17-92 cluster is crucial for T and B cell development and activation, and its over-expression is associated with a lymphoproliferative disease and an SLE-like disease with antinuclear Abs and glomerulonephritis. Two targets have been characterized for miR-17-92, the pro-apoptotic protein Bim and the tumor suppressor (PTEN).

C. MiRNA in RA and SLE

Similar to SS, the expression of miR-146a and miR-155 is increased in PBMC, and in fibroblast-like synoviocytes isolated from RA patients when compared to healthy controls [58]. A correlation with RA disease activity was observed for miR-146a and miR-16. In contrast, miR-146a is under-expressed in PBMC from SLE patients and this under-expression negatively correlates with disease activity, thus providing an explanation for the link observed between interferon over-expression and miR-146a downregulation in SLE [11]. MiRNA analysis in SLE should not be restricted to miR-146a since the analysis of PBMC from SLE patients has revealed nine up-regulated miRNAs (miR-21, miR-61, miR-78, miR-142-3p, miR-189, miR-198, miR-298, miR-299-pp, and miR-342) and seven down-regulated miRNAs (miR-17-5p, miR-112, miR-141, miR-184, miR-196a, miR-383, and miR-409-3p). In kidney biopsies from SLE patients, there are 66 miRNAs that are differentially expressed.

VI. post-translational modifications

A dysregulation of apoptosis is suspected to be involved in the early stage of SS and autoAb production. Supporting this possibility is the presence of histones, 52 kDa and 60 kDa Ro/SSA, La/SSB, and proteins relocated from the nucleus to apoptotic blebs on the cell surface of early apoptotic cells. Muller's group was the first to postulate that specific PTM histone modifications during cell death may generate neo-epitopes [13]. Indeed,

apoptosis-associated acetylation of histones H2B and H4 provides important epitopes for pathogenic autoAbs in SLE, and administration of acetylated peptides in lupus prone mice accelerated the disease, while non-acetylated peptides are ineffective and phosphorylated peptides are protective. Similarly, apoptosis and PTM have been proposed to influence 60 kDa Ro/SSA and La/SSB autoimmunity [59]. In fact, when using sera from SS patients, the Ab binding and the relative avidity is increased when La/SSB peptides phosphorylated at Serine 367 are used instead of crude peptides [60]. Modifications such as phosphorylation, citrullinisation or oxidation influence 60 kDa Ro/SSA peptide antigenicity, thus explaining why immunization with lipid oxidized 60 kDa Ro/SSA peptides increases the antigenicity and favors epitope spreading to La/SSB, U1-snRNP and Sm [61-62]. The preferential recognition of the post-transcriptional forms of La/SSB by anti-La/SSB Abs in SS was confirmed when using parotid glands from patients [63]. Then, as demonstrated with citrullinisation in RA [64], it appears that apoptotic specific PTM could influence autoimmunity at different levels: initiation of autoimmunity, autoAb production with epitope spreading, and production of pathogenic autoAb. Such a hypothesis warrants further investigation.

VII. Conclusion

While our current knowledge is limited of how epigenetic modifications may influence the course of SS, epigenetic studies will undoubtedly help to understand SS features: age-related development, female predominance, geolocalization, cycles of flare and remission, association with lymphoma, and

so forth. In addition, the reversible nature of epigenetic modifications offers the opportunity to identify target sites with potential impact on the prevention or progression of AID (Table 1). However, the revolution of epigenetics in AID and in SS [65] needs new collaborations between researchers from different research areas and the creation of the Brest Epigenetic task force during the Xth International Symposium on Sjögren's syndrome, 1-3 October 2009, Brest, France, will serve this purpose [66].

Acknowledgements

We are grateful to the “Association Française du Gougerot-Sjögren et des Syndromes Secs” for their support.

REFERENCES

1. Mavragani, C.P.; Moutsopoulos, H.M. The geoepidemiology of Sjögren's syndrome. *Autoimmun. Rev.*, **2010**, 9(5), A305-310.
2. Voulgarelis, M.; Dafni, U.G.; Isenberg, D.A.; Moutsopoulos, H.M. Malignant lymphoma in primary Sjögren's syndrome: a multicenter, retrospective, clinical study by the European Concerted Action on Sjögren's Syndrome. *Arthritis. Rheum.*, **1999**, 42(8), 1765-1772.
3. Baimpa, E.; Dahabreh, I.J.; Voulgarelis, M.; Moutsopoulos, H.M. Hematologic manifestations and predictors of lymphoma development in primary Sjögren syndrome: clinical and pathophysiologic aspects. *Medicine. (Baltimore)*, **2009**, 88(5), 284-293.
4. Tobón, G.J.; Renaudineau, Y.; Hillion, S.; Cornec, D.; Devauchelle-Pensec, V.; Youinou, P.; Pers, J.O. The FMS-like tyrosine kinase3-ligand, a mediator for B cell survival is also a marker for lymphoma in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis. Rheum.*, **2010**, 62(11), 3447-3456.
5. Christodoulou, M.I.; Kapsogeorgou, E.K.; Moutsopoulos, H.M. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome. *J. Autoimmun.*, **2010**, 34(4), 400-407.
6. Salomonsson, S.; Jonsson, M.V.; Skarstein, K.; Brokstad, KA.; Hjelmström, P.; Wahren-Herlenius, M.; Jonsson, R. Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis. Rheum.*, **2003**, 48(11), 3187-3201.
7. Cobb, B.L.; Lessard, C.J.; Harley, J.B.; Moser, K.L. Genes and Sjögren's syndrome. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, **2008**, 34(4), 847-868.

8. Mohammed, K.; Pope, J.; Le Riche, N.; Brintnell, W., Cairns, E., Coles, R., Bell, D.A. Association of severe inflammatory polyarthritis in primary Sjögren's syndrome: clinical, serologic, and HLA analysis. *J. Rheumatol.*, **2009**, 36(9), 1937-1942.
9. Delgado-Vega, A.M.; Alarcón-Riquelme, M.E.; Kozyrev, S.V. Genetic associations in type I interferon related pathways with autoimmunity. *Arthritis. Res. Ther.*, **2010**, 12, S2.
10. Pers, J.O.; Tobón, G.J.; Jamin, C.; Renaudineau, Y.; Youinou, P. Conference Scene: Updating the highlights of Sjögren's Syndrome. *Immunotherapy*, **2010**, 2(1), 13-20.
11. Brooks, W.H.; Le Dantec, C.; Pers, J.O.; Youinou, P.; Renaudineau, Y. Epigenetics and autoimmunity. *J. Autoimmun.*, **2010**, 34(3), J207-219.
12. Webb, R.; Wren, J.D.; Jeffries, M.; Kelly, J.A.; Kaufman, K.M.; Tang, Y.; Frank, M.B.; Merrill, J.; Kimberly, R.P.; Edberg, J.C.; Ramsey-Goldman, R.; Petri, M.; Reveille, J.D.; Alarcón, G.S.; Vilá, L.M.; Alarcón-Riquelme, M.E.; James, J.A.; Vyse, T.J.; Moser, K.L.; Gaffney, P.M.; Gilkeson, G.S.; Harley, J.B.; Sawalha, A.H.. Variants within MECP2, a key transcription regulator, are associated with increased susceptibility to lupus and differential gene expression in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, **2009**, 60 (4), 1076-1084.
13. Dieker, J.; Muller, S. Epigenetic Histone Code and Autoimmunity. *Clin. Rev. Allergy. Immunol.*, **2010**, 39(1), 78-84.
14. Ballestar, E. Epigenetics Lessons from Twins: Prospects for Autoimmune Disease. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **2010**, 39(1), 30-41.
15. Fraga, M.F.; Ballestar, E.; Paz, M.F.; Ropero, S.; Setien, F.; Ballestar, M.L.; Heine-Suñer, D.; Cigudosa, J.C.; Urioste, M.; Benitez, J.; Boix-

- Chornet, M.; Sanchez-Aguilera, A.; Ling, C.; Carlsson, E.; Poulsen, P.; Vaag, A.; Stephan, Z.; Spector, T.D.; Wu, Y.Z.; Plass, C.; Esteller, M. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2005**, 102(30), 10604-10609.
16. Javierre, B.M.; Fernandez, A.F.; Richter, J.; Al-Shahrour, F.; Martin-Subero, J.I.; Rodriguez-Ubreva, J.; Berdasco, M.; Fraga, M.F.; O'Hanlon, T.P.; Rider, L.G.; Jacinto, F.V.; Lopez-Longo, F.J.; Dopazo, J.; Forn, M.; Peinado, M.A.; Carreño, L.; Sawalha, A.H.; Harley, J.B.; Siebert, R.; Esteller, M.; Miller, F.W.; Ballestar, E. Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. *Genome. Res.*, **2010**, 20(2), 170-179.
17. Grolleau-Julius, A.; Ray, D.; Yung, R.L. The Role of Epigenetics in Aging and Autoimmunity. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **2010**, 39(1), 42-50.
18. McCord, R.A.; Broccoli, D. Telomeric chromatin: roles in aging, cancer and hereditary disease. *Mutat. Res.*, **2008**, 647(1-2), 86-93.
19. Finkel, T.; Deng, C.X.; Mostoslavsky, R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature*. **2009**, 460(7255), 587-591.
20. Sequeira, J.; Boily, G.; Bazinet, S.; Saliba, S.; He, X.; Jardine, K.; Kennedy, C.; Staines, W.; Rousseaux, C.; Mueller, R.; McBurney, M. sirt1-null mice develop an autoimmune-like condition. *Exp. Cell. Res.*, **2008**, 314(16), 3069-3074.
21. Grabiec, A.M.; Krausz, S.; de Jager, W.; Burakowski, T.; Groot, D.; Sanders, M.E.; Prakken, B.J.; Maslinski, W.; Eldering, E.; Tak, P.P.; Reedquist, K.A. Histone Deacetylase Inhibitors Suppress Inflammatory Activation of Rheumatoid Arthritis Patient Synovial Macrophages and Tissue. *J. Immunol.*, **2010**, 184(5), 2718-2728.
22. Lee, J.H.; Song, M.Y.; Song, E.K.; Kim, E.K.; Moon, W.S.; Han, M.K.; Park, J.W.; Kwon, K.B.; Park, B.H. Overexpression of SIRT1 protects

- pancreatic beta-cells against cytokine toxicity by suppressing the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Diabetes*, **2009**, 58(2), 344-351.
23. Trenkmann, M.; Brock, M.; Ospelt, C.; Gay, S. Epigenetics in Rheumatoid Arthritis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **2010**, 39(1), 10-19.
24. Darwaza, A.; Lamey, P.J.; Connell, J.M. Hydrallazine-induced Sjögren's syndrome. *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.*, **1988**, 17(2), 92-93.
25. Taylor, J.A. Procainamide toxicity. *Lancet*, **1968**, 1(7549), 978.
26. Cannat, A.; Seligmann, M. Induction by isoniazid and hydrallazine of antinuclear factors in mice. *Clin. Exp. Immunol.*, **1968**, 3(1), 99-105.
27. Quddus, J.; Johnson, K.J.; Gavalchin, J.; Amento, E.P.; Chrisp, C.E.; Yung, R.L.; Richardson, B.C. 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.*, **1993**, 92(1), 38-53.
28. Mazari, L.; Ouarzane, M.; Zouali, M. Subversion of B lymphocyte tolerance by hydralazine, a potential mechanism for drug-induced lupus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2007**, 104(15), 6317-6322.
29. Lei, W.; Luo, Y.; Yan, K.; Zhao, S.; Li, Y.; Qiu, X.; Zhou, Y.; Long, H.; Zhao, M.; Liang, Y.; Su, Y.; Lu, Q. I. Abnormal DNA methylation in CD4+ T cells from patients with systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, and dermatomyositis. *Scand J Rheumatol*, **2009**, 38(5), 369-374.
30. Yin, H.; Zhao, M.; Wu, X.; Gao, F.; Luo, Y.; Ma, L.; Liu, S.; Zhang, G.; Chen, J.; Li, F.; Zuo, X.; Lu, Q. Hypomethylation and overexpression of CD70 (TNSF7) in CD4+ T cells of primary Sjögren's syndrome. *J. Dermatol. Sci.* **2010**, 59(3), 198-203.

31. Chen, Y.; Gorelik, G.J.; Strickland, F.M.; Richardson, B.C. Decreased ERK and JNK signaling contribute to gene overexpression in "senescent" CD4+CD28- T cells through epigenetic mechanisms. *J. Leukoc. Biol*, **2010**, 87(1), 137-145.
32. Lal, G.; Bromberg, J.S. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood*, **2009**, 114(18), 3727-3735.
33. Garaud, S.; Le Dantec, C.; Berthou, C.; Lydyard, P.M.; Youinou, P.; Renaudineau, Y. Selection of the alternative exon 1 from the cd5 gene down-regulates membrane level of the protein in B lymphocytes. *J. Immunol.*, **2008**, 181(3), 2010-2018.
34. Christodoulou, M.I.; Kapsogeorgou, E.K.; Moutsopoulos, N.M.; Moutsopoulos, H.M. Foxp3+ T-regulatory cells in Sjögren's syndrome: correlation with the grade of the autoimmune lesion and certain adverse prognostic factors. *Am. J. Pathol.*, **2008**, 173(5), 1389-1396.
35. Sarigul, M.; Yazisiz, V.; Bassorgun, C.I.; Ulker, M.; Avci, A.B.; Erbasan, F.; Ulker, M.; Avci, A.B.; Erbasan, F.; Gelen, T.; Gorczynski, R.M.; Terzioglu, E. The numbers of Foxp3 + Treg cells are positively correlated with higher grade of infiltration at the salivary glands in primary Sjogren's syndrome. *Lupus*, **2010**, 19(2), 138-145.
36. Youinou, P.; Mackenzie, L.; Le Masson, G.; Papadopoulos, N.M.; Jouquan, J., Pennec, Y.L.; Angelidis, P.; Katsikis, P.; Moutsopoulos, H.M., Lydyard, P.M. CD5-expressing B lymphocytes in the blood and salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *J. Autoimmun*, **1988**, 1(2), 185-194.
37. Vaudo, G.; Bocci, E.B.; Shoenfeld, Y.; Schillaci, G.; Wu, R.; Del Papa, N.; Vitali, C.; Delle Monache, F.; Marchesi, S.; Mannarino, E.; Gerli, R. Precocious intima-media thickening in patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis. Rheum.*, **2005**, 52(12), 3890-3897.

38. Katsifis, G.E.; Moutsopoulos, N.M.; Wahl, S.M. T lymphocytes in Sjögren's syndrome: contributors to and regulators of pathophysiology. *Clin. Rev. Allergy. Immunol.*, **2007**, 32(3), 252-264.
39. Sharma, R.; Deshmukh, U.S.; Zheng, L.; Fu, S.M.; Ju, S.T. X-linked Foxp3 (Scurfy) mutation dominantly inhibits submandibular gland development and inflammation respectively through adaptive and innate immune mechanisms. *J. Immunol.*, **2009**, 183(5), 3212-3218.
40. Brookes, S.M.; Pandolfino, Y.A.; Mitchell, T.J.; Venables, P.J.; Shattles, W.G.; Clark, D.A.; Entwistle, A.; Maini, R.N. The immune response to and expression of cross-reactive retroviral gag sequences in autoimmune disease. *Br. J. Rheumatol.*, **1992**, 31(11), 735-742.
41. Yamano, S.; Renard, J.N.; Mizuno, F.; Narita, Y.; Uchida, Y.; Higashiyama, H.; Sakurai, H.; Saito, I. Retrovirus in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *J. Clin. Pathol.*, **1997**, 50(3), 223-230.
42. Renaudineau, Y.; Vallet, S.; Le Dantec, C.; Hillion, S.; Saraux, A.; Youinou, P. Characterization of the human CD5 endogenous retrovirus-E in B lymphocytes. *Genes. Immun.*, **2005**, 6(8), 663-671.
43. Renaudineau, Y.; Garaud, S.; Le Dantec, C.; Alonso-Ramirez, R.; Daridon, C.; Youinou, P. Autoreactive B Cells and Epigenetics. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **2010**, 39(1), 85-94.
44. Perron, H.; Lang, A. The Human Endogenous Retrovirus Link between Genes and Environment in Multiple Sclerosis and in Multifactorial Diseases Associating Neuroinflammation. *Clin. Rev. Allergy. Immunol.*, **2010**, 39(1), 51-61.
45. Fernandez, D.R.; Talarico, T.; Bonilla, E.; Li, Q.; Banerjee, S.; Middleton, F.A.; Phillips, P.E.; Crow, M.K.; Oess, S.; Muller-Esterl, W.; Perl, A. Activation of mammalian target of rapamycin controls the

- loss of TCRzeta in lupus T cells through HRES-1/Rab4-regulated lysosomal degradation. *J. Immunol.*, **2009**, 182(4), 2063-2073.
46. Renaudineau, Y.; Hillion, S.; Saraux, A.; Mageed, R.A.; Youinou, P. An alternative exon 1 of the CD5 gene regulates CD5 expression in human B lymphocytes. *Blood*, **2005**, 106(8), 2781-2789.
47. Garaud, S.; Le Dantec, C.; Jousse-Joulin, S.; Hanrotel-Saliou, C.; Saraux, A.; Mageed, R.A.; Youinou, P.; Renaudineau, Y. IL-6 modulates CD5 expression in B cells from patients with lupus by regulating DNA methylation. *J. Immunol.*, **2009**, 182(9), 5623-3562.
48. Hippen, K.L.; Tze, L.E.; Behrens, T.W. CD5 maintains tolerance in anergic B cells. *J. Exp. Med.*, **2000**, 191(5), 883-890.
49. Wouters, D.; van Schouwenburg, P.; van der Horst, A.; de Boer, M.; Schooneman, D.; Kuijpers, T.W.; Aarden, L.A.; Hamann, D. High-throughput analysis of the C4 polymorphism by a combination of MLPA and isotype-specific ELISA's. *Mol. Immunol.*, **2009**, 46(4), 592-600.
50. Moyes, D.L.; Martin, A.; Sawcer, S.; Temperton, N.; Worthington, J.; Griffiths, D.J.; Venables, P.J. The distribution of the endogenous retroviruses HERV-K113 and HERV-K115 in health and disease. *Genomics*, **2005**, 86(3), 337-341.
51. Toso, A.; Aluffi, P.; Capello, D.; Conconi, A.; Gaidano, G.; Pia, F. Clinical and molecular features of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphomas of salivary glands. *Head Neck*, **2009**, 31(9), 1181-1187.
52. Brooks, W.H. X Chromosome Inactivation and Autoimmunity. *Clin. Rev. Allergy. Immunol.*, **2010**, 39(1), 20-29.
53. Ozcelik, T. X chromosome inactivation and female predisposition to autoimmunity. *Clin. Rev. Allergy. Immunol.*, **2008**, 34(3), 348-351.

54. 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.
55. Pauley, K.M.; Stewart, C.M.; Gauna, A.E.; Dupre, L.C.; Kuklani, R.; Chan, A.L.; Pauley, B.A.; Reeves, W.H.; Chan, E.K.; Cha, S. Altered miR-146a expression in Sjögren's syndrome and its functional role in innate immunity. *Eur. J. Immunol.* **2011**, 41(7), 2029-2039.
56. Tsitsiou, E.; Lindsay, M.A. microRNAs and the immune response. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2009**, 9(4), 514-520.
57. Alevizos, I.; Illei, G.G. MicroRNAs in Sjogren's syndrome as a prototypic autoimmune disease. *Autoimmun. Rev.*, **2010**, 9(9), 618-621.
58. Chan, E.K.; Satoh, M.; Pauley, K.M. Contrast in aberrant microRNA expression in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: is microRNA-146 all we need? *Arthritis Rheum.*, **2009**, 60(4), 912-915.
59. Reed, J.H.; Jackson, M.W.; Gordon, T.P. B cell aptopes of the 60-kDa Ro/SSA and La/SSB autoantigens. *J. Autoimmun.*, **2008**, 31(3), 263-267.
60. Terzoglou, A.G.; Routsias, J.G.; Avrameas, S.; Moutsopoulos, H.M.; Tzioufas, A.G. Preferential recognition of the phosphorylated major linear B-cell epitope of La/SSB 349-368 aa by anti-La/SSB autoantibodies from patients with systemic autoimmune diseases. *Clin. Exp. Immunol.*, **2006**, 144(3), 432-439.
61. Terzoglou, A.G.; Routsias, J.G.; Moutsopoulos, H.M.; Tzioufas, A.G. Post-translational modifications of the major linear epitope 169-190aa of Ro60 kDa autoantigen alter the autoantibody binding. *Clin. Exp. Immunol.*, **2006**, 146(1), 60-65.

62. Scofield, R.H.; Kurien, B.T.; Ganick, S.; McClain, M.T.; Pye, Q.; James, J.A.; Schneider, R.I.; Broyles, R.H.; Bachmann, M.; Hensley, K. Modification of lupus-associated 60-kDa Ro protein with the lipid oxidation product 4-hydroxy-2-nonenal increases antigenicity and facilitates epitope spreading. *Free Radic. Biol. Med.*, **2005**, 38(6), 719-728.
63. Stea, E.A.; Routsias, J.G.; Samiotaki, M.; Panayotou, G.; Papalambros, E.; Moutsopoulos, H.M.; Tzioufas, A.G. Analysis of parotid glands of primary Sjögren's syndrome patients using proteomic technology reveals altered autoantigen composition and novel antigenic targets. *Clin. Exp. Immunol.*, **2007**, 147(1), 81-89.
64. Klareskog, L.; Rönnelid, J.; Lundberg, K.; Padyukov, L.; Alfredsson, L. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.*, **2008**, 26, 651-675.
65. Renaudineau, Y. The Revolution of Epigenetics in the Field of Autoimmunity. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **2010**, 39, 1-2.
66. Lu, Q.; Renaudineau, Y.; Cha, S.; Ilei, G.; Brooks, W.H.; Selmi, C.; Tzioufas, A.; Pers, J.O.; Bombardieri, S.; Gershwin, M.E.; Gay, S.; Youinou, P. Epigenetics in autoimmune disorders: Highlights of the 10th Sjögren's Syndrome Symposium. *Autoimmun. Rev.*, **2010**, 9(9):627-630.
67. Vinuesa, C.G.; Rigby, R.J.; Yu, D. Logic and extent of miRNA-mediated control of autoimmune gene expression. *Int. Rev. Immunol.*, **2009**, 28(3-4), 112-138.

LEGENDS TO THE FIGURES

Figure 1: Detection of human endogenous retrovirus transcripts in salivary glands from primary Sjögren's syndrome (SS) patients. A- Using the online basic local alignment search tool (BLAST) provided by ensemble (<http://www.ensembl.org/Multi/blastview>), the HERV-E 4.1 sequence yielded several elements over the whole genome including a copy from 19p13.1 showing 100% identity to the 4.1 clone. **B-** Detection of HERV-E transcripts in salivary glands from SS patients by RT-PCR using HERV 4.1, HERV-Mid1 and HERV-LTR7 specific primers. Details have been described previously [42].

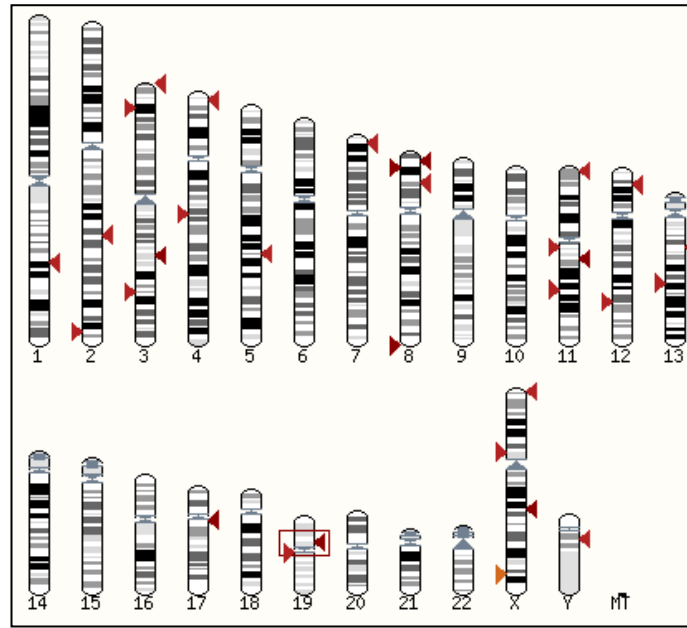
Figure 2: MiRNA in epithelial cells isolated from primary Sjögren's syndrome (SS) salivary glands. A- A schematic diagram illustrating how miRNAs can potentially modulate mRNA degradation and translation through interactions with the 3' UTR. **B-** A quantitative PCR expression analysis of three miRNAs (miR-150, miR-155 and miR-181a) in epithelial cells cultured from six SS patients and six controls reveals that the expression levels of miR-155 and miR-181a were significantly higher in SS. Results, normalized to the house keeping miR-RNU48, are expressed relative to controls and there is no significant difference in the expression of miR-150.

Table 1: Epigenetic abnormalities reported in three autoimmune diseases: Sjögren's syndrome (SS), systemic lupus erythematosus (SLE), and rheumatoid arthritis (RA).

	Autoimmune diseases		
	SS	SLE	RA
DNA hypomethylation			
CD4+ T cells	Yes [22]	Yes [21]	Yes [15]
Senescent CD4+ CD28-	No [29]	No [23]	Yes [23]
Pre-Treg CD4+ CD25-Foxp3+	(Yes ?)	Yes [24]	No
B cells	?	Yes [40]	?
miRNA			
miR-146a	Upregulated [48]	Downregulated [51]	Upregulated [51]
miR-155	Upregulated [48]	unaffected	Upregulated [51]
miR-17-92	Upregulated [50]	unaffected	?
miR-181a	Upregulated [Fig 2]	Upregulated [59]	?
X chromosome			
Skewed XCI	No [46]	No [46]	Yes [46]
CD40L expression on the inactive X	?	Yes [47]	?
MECP2 polymorphism	?	Yes [4]	No

Figure 1

A



B

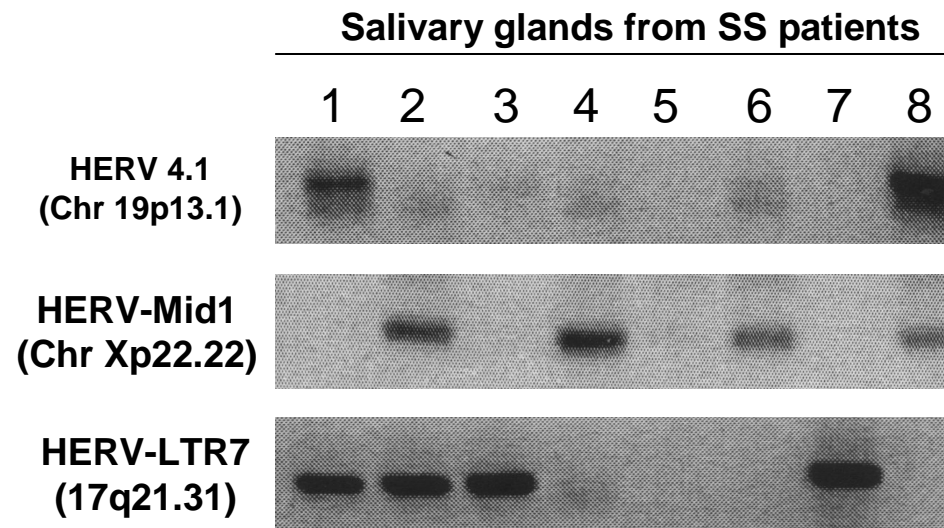
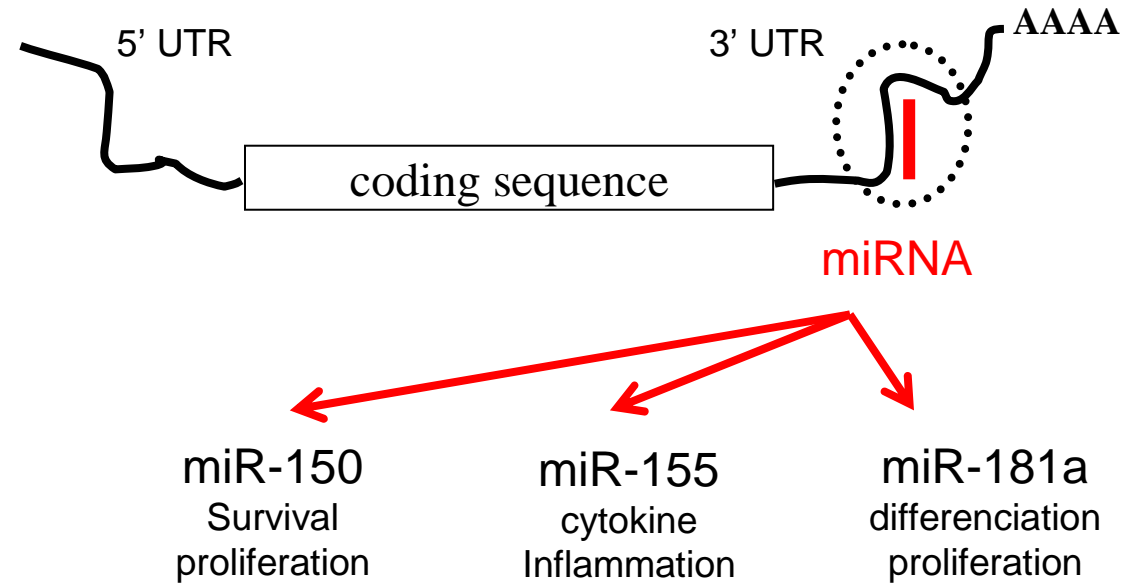
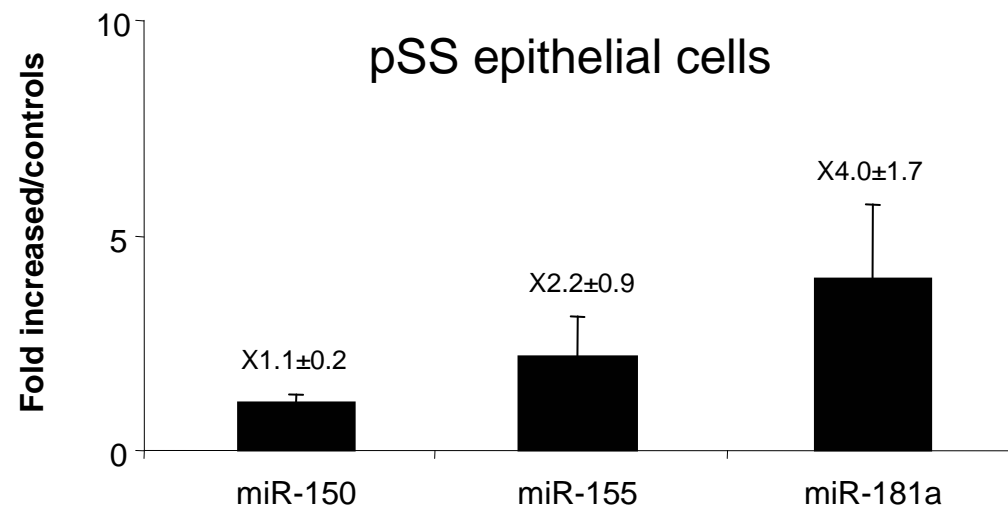


Figure 2

A



B



ARTICLE 3

In Sjögren's syndrome, B lymphocytes induce epithelial cells of salivary glands into apoptosis through protein kinase C delta activation.

Marie-Michèle Varin, Thomas Guerrier, Valérie Devauchelle-Pensec, Christophe Jamin, Pierre Youinou, Jacques-Olivier Pers

Autoimmunity Reviews 11 (4) : 252-258, 2012

Interaction entre les cellules épithéliales et les lymphocytes dans le syndrome de Gougerot-Sjögren

Article 3: In Sjögren's syndrome, B lymphocytes induce epithelial cells of salivary glands into apoptosis through protein kinase C delta activation.

1. Le contexte et les objectifs

Comme décrit dans l'introduction, le SGS se caractérise principalement par une sécheresse au niveau de la bouche et des yeux. Physiologiquement, cela s'explique partiellement par l'infiltration des glandes exocrines (salivaires et lacrymales) par des cellules immunitaires, principalement des lymphocytes T (LT) et B (LB). Cela conduit à la mort programmée des cellules épithéliales (CE) et par conséquent, à la destruction des glandes et à la perte de la fonction sécrétoire.

L'objectif de cette étude est de mieux comprendre l'effet des interactions entre les CE et les lymphocytes, grâce à un modèle *in vitro*.

2. La démarche expérimentale

Nous avons utilisé comme modèle d'étude de CE la lignée HSG (Human Salivary Gland). Ces cellules sont issues d'un carcinome irradié de la glande sous-mandibulaire humaine (Shirasuna et al, 1981). Elles présentent des propriétés des cellules ductales des canaux excréteurs et reproduisent des caractéristiques observées lors du SGS *in vivo* (revue par Kulkarni et al, 2006).

Les cellules HSG ont été co-cultivées pendant 24 heures avec des LB et des LT d'amygdale. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'importance du contact entre ces cellules grâce à des cultures en transwell. Puis, nous avons mesuré l'effet des lymphocytes sur la survie des CE, grâce au marquage des cellules

par de l'annexine V et de l'iodure de propidium et analyse par cytométrie en flux. Les cellules négatives pour ces deux marqueurs ont été considérées comme vivantes.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation et plus particulièrement aux voies Fas et protéine kinase C delta (PKC δ). Les CE ont été pré-incubées avec des inhibiteurs des voies Fas (ZB4) ou PKC δ (rottlerine) avant la co-culture. Leur survie a ensuite été analysée par cytométrie en flux. Par ailleurs, nous avons étudié l'activation de la PKC δ , d'une part, en la localisant dans les cellules grâce à un anticorps spécifique et analyse par microscopie confocale et d'autre part, par Western-blot, après avoir obtenu les fractions sub-cellulaires des cellules. L'activation d'autres molécules comme la caspase 3, la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) et l'histone H2B a également été analysée par Western-blot.

Dans un troisième temps, sur des coupes de GS pathologiques, nous avons localisé in situ la PKC δ au niveau des CE infiltrées par des lymphocytes, par microscopie confocale.

3. Les résultats et discussion

Dans la première partie des expériences, nous avons remarqué que les lymphocytes induisent la mort par apoptose des CE après 24 heures de co-culture, et que le contact entre les cellules est important dans ce phénomène. En effet, il n'y a pas de variation dans la survie des CE lorsqu'elles sont placées dans le compartiment inférieur de la chambre de transwell et que des lymphocytes sont placés dans le compartiment supérieur. Par contre, nous constatons une diminution de la survie des CE lorsqu'elles sont en contact direct avec des lymphocytes, diminution proportionnellement corrélée au ratio lymphocytes/CE. L'effet est plus prononcé avec les LB par rapport aux LT.

La première voie de signalisation étudiée dans les CE en co-culture est celle de Fas. La pré-incubation des cellules avec des doses croissantes de l'inhibiteur de la voie Fas, ZB4, a restauré une partie de la survie des cellules co-cultivées avec les LT, de

manière dose-dépendante. Cela suggère donc que la voie Fas intervient dans l'apoptose des CE induite par les LT. Cependant, elle ne semble pas impliquée dans celle induite par les LB puisque le ZB4 n'a pas inhibé de manière significative la mort des CE induite par les LB. Matsumura et al (2000) ont démontré que Fas est faiblement exprimé constitutivement par la lignée HSG en culture, mais que son expression est augmentée après stimulation par l'IFN γ ou le TNF α . L'effet de ZB4 sur les cellules co-cultivées avec les LT indique cependant que la voie Fas est majoritairement induite par ces LT, connus pour exprimer le ligand de Fas (FasL) à leur surface et sécréter de l'IFN γ et du TNF α .

La deuxième voie de signalisation étudiée est celle de la PKC δ . L'analyse par cytométrie en flux des CE après pré-incubation par la rottlerine, indique que la mort induite par les LB est inhibée. La rottlerine inhibe l'activation de la PKC δ en l'empêchant d'être transloquée dans le noyau. En effet, la PKC δ est impliquée dans l'apoptose, après son clivage par les caspases et sa translocation dans le noyau de la cellule (DeVries et al, 2002, DeVries-Seimon et al, 2007). Par ailleurs, la détection intracellulaire de la kinase par microscopie confocale confirme ces résultats. D'une localisation cytoplasmique à l'état basal, elle devient nucléaire lorsque les CE sont au contact des LB. Cette translocation est inhibée par la rottlerine.

Une analyse plus précise des voies de signalisation a été réalisée par Western-blot, à partir des fractions sub-cellulaires des CE (membranes et organites, cytoplasme et noyau). A l'état basal, sans co-culture, la PKC δ se trouve entière dans le cytoplasme des CE. Au contact des LB, deux fragments de la protéine sont détectés, dont le plus petit (le fragment catalytique actif) s'accumule dans le noyau. Cela s'accompagne par l'activation de la caspase 3, aussi retrouvée clivée dans la fraction nucléaire et qui va à son tour activer la PARP en la clivant. Ce résultat est confirmé par Datta et al (1996) et Jimenez et al (2002) qui démontrent respectivement que la caspase 3, responsable du clivage de la PKC δ , est activée ainsi que la PARP, dans les CE des GS au cours du SGS. Par ailleurs, la translocation nucléaire de la PKC δ est corrélée avec la phosphorylation de l'histone H2B sur la sérine 14 dans le noyau. Cela est aussi confirmé par l'étude de Mecklenbräuer et al en 2004.

Finalement, la détection de la PKC δ sur des coupes de GS pathologique indique une localisation variant selon l'environnement des CE. En effet, au niveau des CE ductales entourées de LB, le marquage ponctué de la PKC δ fait penser à une localisation nucléaire de celle-ci. Par contre, lorsque les CE sont entourées par des LT, ou en absence d'infiltrat lymphocytaire, le marquage est plus diffus, indiquant une localisation cytoplasmique de la PKC δ . Ainsi, au cours du SGS, la mort des CE induite par les LB pourrait privilégier cette voie de signalisation.



In Sjögren's syndrome, B lymphocytes induce epithelial cells of salivary glands into apoptosis through protein kinase C delta activation

Marie-Michèle Varin, Thomas Guerrier, Valérie Devauchelle-Pensec, Christophe Jamin, Pierre Youinou*, Jacques-Olivier Pers

Research Unit "Immunology & Pathology", European University of Brittany, and Brest University Medical School Hospital, Brest, France

ARTICLE INFO

Available online 7 October 2011

Keywords:

Sjögren's syndrome
B lymphocyte
Apoptosis
Epithelial cells

ABSTRACT

Sjögren's syndrome (SS) is a chronic autoimmune epithelitis associated with diffuse lymphocytic infiltration that varies in composition and differs according to lesion severity. T lymphocytes have been viewed as competent in their own right in the destruction of epithelial cells, whereas B lymphocytes that predominate in severe lesions have never been implicated in direct tissue damage. Using co-culture experiments with human salivary gland (HSG) cell line cells and tonsillar B lymphocytes, we observed that direct HSG cell-B lymphocyte contacts were able to induce apoptosis in epithelial cells. This B lymphocyte-mediated cell death could not be ascribed to Fas–Fas ligand interactions but required translocation of protein kinase C delta (PKC δ) into the nucleus of epithelial cells. Ultimately, activation of PKC δ resulted in histone H2B phosphorylation on serine 14 and poly (ADP-ribose) polymerase cleavage. Our results suggest that B lymphocytes infiltrating the SGs of patients with SS could evoke epithelial cell apoptosis.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	252
2. Material and methods.	253
2.1. Cell preparations.	253
2.2. Co-culture of B- and T-lymphocytes with HSG cells.	253
2.3. Stimulation of HSG cells	253
2.4. Immunofluorescence staining for PKC δ location	253
2.5. Subcellular proteome extraction	253
2.6. Immunofluorescence staining of SGs	254
2.7. Statistical analysis	254
3. Results.	254
3.1. Apoptosis of HSG cells in the presence of B and T lymphocytes	254
3.2. B lymphocyte-induced apoptosis of HSG cells is not mediated by Fas/FasL	254
3.3. B lymphocyte-induced apoptosis of HSG cells implies translocation of PKC δ location into the nucleus	254
3.4. Nucleus translocation of PKC δ induces H2B phosphorylation	254
3.5. PKC δ in the nucleus of those ECs which are surrounded by B lymphocytes	254
4. Discussion	254
Take-home messages	256
Acknowledgments	256
References	256

1. Introduction

Sjögren's syndrome (SS) is a common [1] autoimmune disorder characterized by the infiltration of lacrimal and salivary glands (SGs) by mononuclear cells with the ensuing destruction of the

* Corresponding author at: Laboratory of Immunology, Brest University Medical School Hospital, BP824, F-29609, Brest, France. Tel.: +33 298 22 33 84; fax: +33 298 22 38 47.

E-mail address: youinou@univ-brest.fr (P. Youinou).

parenchymal tissue. This disorder may develop alone, as primary SS, or against a background of connective tissue disease, as secondary SS. Damage of the exocrine cells accompany lymphocyte infiltrates of the ductal epithelial cells (ECs), and results in oral and ocular dryness [2]. However, these aggregates evolve from wild to focal, and from focal to diffuse, and vary in composition according to the severity of the disease.

In the SGs, activation of ECs [3] promotes lymphocyte settlement and infiltration. Here, T lymphocytes, of which the majority are CD4⁺, predominate over B lymphocytes. On the other hand, antigen-presenting cells (APCs), such as macrophages and dendritic cells consist of a minority of infiltrating cells. Of note is, however, that they are detectable even in wild lesions. Furthermore, the number of T lymphocytes correlates inversely with the infiltration grade and focus score, whereas those of B lymphocytes and macrophages increase in proportion [4]. Consequently, total T-CD4⁺ lymphocytes predominate in wild lesions, whereas B lymphocytes substitute for them along with the severity. This view confines their role to the production of antibody (Ab) and, following proliferation of one clone [5], restricted to the secretion of a monoclonal Ab (mAb).

Most of the studies have hitherto been concentrated on the role of CD4⁺ T lymphocytes in tissue destruction [6], neglecting potential damage accounted for by the B lymphocytes [7]. Thus, T lymphocytes induce ECs into apoptotic death through the release of proteases, or via the insertion of the Fas ligand (Fas L) of activated CD4⁺ T lymphocytes into the Fas receptor harbored by the target ECs [8]. Accordingly, agonistic anti-Fas Ab promotes apoptosis of cultured ECs. The unstimulated human SG (HSG) duct cell line cells that we used in the present study express low levels of Fas, this is upregulated by interferon (IFN)- γ and tumor necrosis factor (TNF)- α . Apoptosis induced by the CH11 anti-Fas mAb is subsequently exaggerated [9].

The delta isoform of protein kinase C (PKC δ) has also been implicated in regulation of apoptotic cell death in ECs [10]. Its activation is triggered by tyrosine phosphorylation, and followed by translocation from the cytoplasm to the nucleus [11]. Pre-treatment with rottlerin prevents nuclear accumulation of PKC δ , suggesting that, for its nuclear translocation to occur [12], some degree of kinase activity is required. In the nucleus, PKC δ encourages apoptosis by phosphorylating multiple proteins, such as lamin B which is degraded [13] or histone H2B which is phosphorylated at serine 14. These events condense the chromatin [14] and fragment the nucleosomal DNA [15].

Thus, T lymphocytes have long been viewed as competent in their own right by destroying ECs by cell-mediated mechanisms. A wealth of evidence support now that B lymphocytes solicit their help from T lymphocytes, release a number of cytokines [7], and serve as APCs. However, there are no studies on the direct effect of B lymphocytes on EC apoptosis within the SGS of patients with SS.

2. Material and methods

2.1. Cell preparations

HSG cell line cells were incubated in Dulbecco's modified Eagle's medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, CA), 100 μ /ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin (Panpharma, Fougères, France) and 1% non-essential amino acids (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO).

Tonsils were collected from five children undergoing routine tonsillectomy, and their mononuclear cells isolated by a 30-minute 1800-rpm centrifugation on Ficoll Hypaque (PAA, Pasching, Austria). These were then incubated with neuraminidase-treated sheep red blood cells for 90 min at 4 °C, layered onto Ficoll-Hypaque and centrifuged for another 30 min at 1800 rpm. B and T lymphocytes were

isolated from sheep red blood cells using ACK solution, and T lymphocytes further-purified using the Easy-Sep human T lymphocyte enrichment kit (StemCell Technologies, Grenoble, France).

Biopsy specimens of SGs were obtained from patients who fulfilled the American–European Consensus Group criteria for primary SS [16] and displayed a focus score ≥ 3 [17]. All patients and donors' parents gave informed consent, and the study was approved by our Ethics Committee.

2.2. Co-culture of B- and T-lymphocytes with HSG cells

HSG cells were seeded into 96-well flat-bottomed culture plates. Once they were grown to confluence, 1.5×10^5 B or T lymphocytes were added in 1 ml RPMI-1640 medium (Lonza) supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, and antibiotics. To avoid allogenic response and long-term culture artifacts, cells were collected 24 h later. Viability of HSG cells was assessed by using fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled annexin V and propidium iodide (PI). To construct the dose-effects curves, HSG cells were distributed into two series of three aliquots. In the first three aliquots, there were one, five and 10 B lymphocytes, respectively, for one HSG cell, and in the three aliquots one, five and 10 T lymphocytes, respectively, for one HSG cell. Transwells (Corning, Corning, NY) enabled to verify whether cell–cell contacts were discernable or not. To address this issue, confluent HSG cells were placed in the lower chamber and B- or T-lymphocytes in the upper.

2.3. Stimulation of HSG cells

In order to determine the implication of Fas in the signaling pathway, HSG cells were incubated with 0 to 10 μ g/ml of the ZB4 anti-Fas mAb (Beckman Coulter, Villepinte, France) for 1 h at 37 °C. The entry of PKC δ into the nucleus was blocked by treatment with 50 μ M rottlerin (Sigma-Aldrich) for 30 min at 37 °C before being added to the lymphocyte in culture.

2.4. Immunofluorescence staining for PKC δ location

Co-cultured HSG cells and B lymphocytes were stained with an anti-PKC δ mAb from BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ) and a rabbit anti-CD20 polyclonal Ab (pAb) from Thermo Scientific (Waltham, MA). The former Ab was revealed by a FITC-conjugated donkey anti-mouse pAb, and the latter by a rhodamine Red-X-conjugated donkey anti-rabbit pAb (both from Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA).

2.5. Subcellular proteome extraction

HSG cells in culture were separated from B cells using the Biomag goat anti-mouse IgG kit, according to the Qiagen's instructions (Hilden, Germany). Briefly, co-cultured HSG cells and B lymphocytes were incubated with mouse anti-CD19 mAb (Beckman-Coulter) for 30 min at 4 °C. Then, magnetic beads coated with goat anti-mouse IgG pAb were added, and HSG cells eluted, whereas the B lymphocytes were retained in the magnetic separator.

After isolation, non-denatured cytoplasmic, membrane, and nuclear extracts were prepared from HSG cells, cultivated alone or with B lymphocytes using the ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction kit according to the Calbiochem's instructions (Darmstadt, Germany). The cell fractions were harvested separately. The protein concentrations were measured with the Quanti-Assays kit (Invitrogen). The fractions were then resolved by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (GE Healthcare, Buckingham, England). After blocking of unbound sites with 5% non-fat milk in 10 mM Tris 0.1% Tween-20, the membrane was probed with one

of the following nine Abs: mouse anti- β -actin mAb (Abcam, Cambridge, United Kingdom), mouse anti-PKC δ mAb (BD Biosciences, Grenoble, France), mouse anti-PKC δ mAb (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), rabbit anti-P-cadherin pAb (BD Biosciences), rabbit anti-CD20 pAb (Thermo Scientific, Philadelphia, PA), rabbit anti-histone H3 pAb (Abcam), mouse anti-phosphorylated serine 14 of histone H2B mAb (Millipore, Billerica, MA), mouse anti-caspase 3 mAb (Cell Signaling, Danvers, MA), or mouse anti-poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mAb (Roche, Mannheim, Germany). The membranes were washed with buffer, incubated with secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG pAb (Beckman-Coulter), or HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG pAb (Jackson ImmunoResearch), and analyzed using the enhanced chemiluminescence system kit.

2.6. Immunofluorescence staining of SGs

OCT-embedded (Miles, Naperville, IC) SG biopsy specimens were snap-frozen in isopentane. From the blocks, 4 μ m-thick cryostat sections were cut and mounted onto poly-L-lysine-coated slides. The slides were incubated for 40 min at room temperature with mouse anti-PKC δ mAb, along with either goat anti-CD20 rabbit pAb or with rabbit anti-CD3 pAb (Neomarker, Fremont, CA). After three washes in phosphate buffered saline (PBS), they were incubated for another 40 min with tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC)-conjugated donkey anti-mouse IgG pAb (Jackson ImmunoResearch), followed by FITC-conjugated donkey anti-rabbit IgG pAb in PBS supplemented with 2% donkey serum (Sigma-Aldrich). After five rinses, the sections were fixed with 4% cold paraformaldehyde and analyzed with the TCS-NT Leica confocal imaging system (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). TRITC-conjugated donkey anti-mouse IgG pAb FITC-conjugated donkey anti-rabbit IgG alone (Rockland, Gilbertsville, PA) served as negative controls, and did not show any background fluorescence.

2.7. Statistical analysis

All results were expressed as the mean \pm standard deviation. Comparisons were made using the Mann–Whitney *U* test for unpaired data.

3. Results

3.1. Apoptosis of HSG cells in the presence of B and T lymphocytes

After a 24-hour co-culture with lymphocytes, apoptosis of HSG cells was FACS analyzed using the FITC-annexin V/PI double-staining technology. There appeared to have been upregulation in the presence of B or T lymphocytes. However B lymphocytes were two-fold more potent inducers of HSG cell apoptosis than T lymphocytes (Fig. 1A). Interestingly, cell–cell contacts were necessary for B-, as well as T-lymphocyte-induced HSG cell apoptosis, since no apoptosis was observed when normal B or T lymphocytes were placed in the upper chamber with HSG cells in the lower chamber of the transwell (Fig. 1A).

3.2. B lymphocyte-induced apoptosis of HSG cells is not mediated by Fas/FasL

Since HSG cells express low levels of Fas at baseline [9], an approach to Fas–FasL interactions was to pre-incubate them with the antagonistic ZB4 anti-Fas mAb. ZB4 T lymphocyte-induced apoptosis of the HSG cells was slightly diminished, and yet it exerted no effects on B lymphocyte-induced apoptosis (Fig. 1B). This data indicates that, unlike T lymphocytes, B lymphocytes do not promote the Fas/FasL interactions.

3.3. B lymphocyte-induced apoptosis of HSG cells implies translocation of PKC δ location into the nucleus

Apoptotic program in ECs of SGs has also been claimed to involve PKC δ [10]. We thus wanted to verify if kinase translocates into the nucleus after co-culture of HSG cells with normal B lymphocytes (Fig. 2A). PKC δ was seen outside the nucleus in the absence of B lymphocytes, but it moved inside the nucleus (in green) in their presence. Pre-treatment of HSG cells with rottlerin (which prevents location of PKC δ in the nucleus), retained PKC δ in the cytoplasm. As a result, B lymphocyte-induced apoptosis of HSG cells was inhibited when epithelial cells were pre-treated with rottlerin (Fig. 2B). In order to explore the molecular mechanisms underlying apoptosis promoted by B lymphocytes, HSG cells were isolated by negative cell-sorting and subjected to subcellular fractionation. The 78-kDa PKC δ was cleaved in the presence of B lymphocytes and its 45-kDa fragment transported into the nucleus (Fig. 3). Since PKC δ cleavage has been ascribed to caspase 3 [18], the activation of this enzyme was determined, and indeed the 35-kDa caspase 3 activation into 17-kDa fragments took place within the nuclear fraction in the presence of B lymphocytes, along with the cleavage product of PARP (Fig. 3A).

3.4. Nucleus translocation of PKC δ induces H2B phosphorylation

Association of PKC δ translocation to the nucleus and cell death raises the issue of the apoptosis-generating nuclear targets for PKC δ . The most readily accessible substrates for PKC δ in the nucleus are the histones. These are all the more credible as, when phosphorylated on their serine 14, histones H2B are known to be associated with apoptosis [19]. We therefore reasoned that B cell-induced apoptosis might reflect the ability of PKC δ to phosphorylate histones H2B. It appeared that serine 14 of histones H2B was indeed phosphorylated in the nucleus of HSG cells in the presence of B lymphocytes (Fig. 3).

3.5. PKC δ in the nucleus of those ECs which are surrounded by B lymphocytes

Interestingly, distinct profiles of lymphocyte infiltrates have been described within the SGs of SS patients. Do B lymphocyte infiltrates govern PKC δ location in the nucleus of ductal ECs? As a attempt to clarify this point, SG tissue sections were examined by immunofluorescence for the presence of lymphocytes (Fig. 4). When ductal ECs were surrounded by B lymphocytes (Fig. 4, box 1), PKC δ was seen as a punctuate staining within the nucleus. In contrast, when ductal ECs were surrounded by T lymphocytes (Fig. 4, box 3), or when there was no lymphocyte infiltrate (Fig. 4, box 2), PKC δ remained in the cytoplasm. Consequently, in primary SS, ductal ECs apoptosis might be directly caused by B lymphocyte infiltrates through the activation of PKC δ .

4. Discussion

Apoptotic death of ECs has been described as mediated by three different mechanisms [8]. Firstly, ECs may be intrinsically activated and kill themselves by membrane folding through autocrine Fas/FasL interactions. Secondly, ECs may interact with neighboring T lymphocytes and undergo apoptosis, again through Fas/ FasL interactions. Thirdly, activated cytotoxic CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes may release perforine and granzyme B from granules, with the ensuing activation of the caspase cascade [20–22]. AutoAbs to muscarinic receptors [23] may further alter the function of exocrine glands. Additionally, an altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors are associated with acinar damage [24,25]. Our data reinforces the implication of T lymphocytes on EC apoptosis, but this is the first time that a role for Fas-independent B lymphocyte-

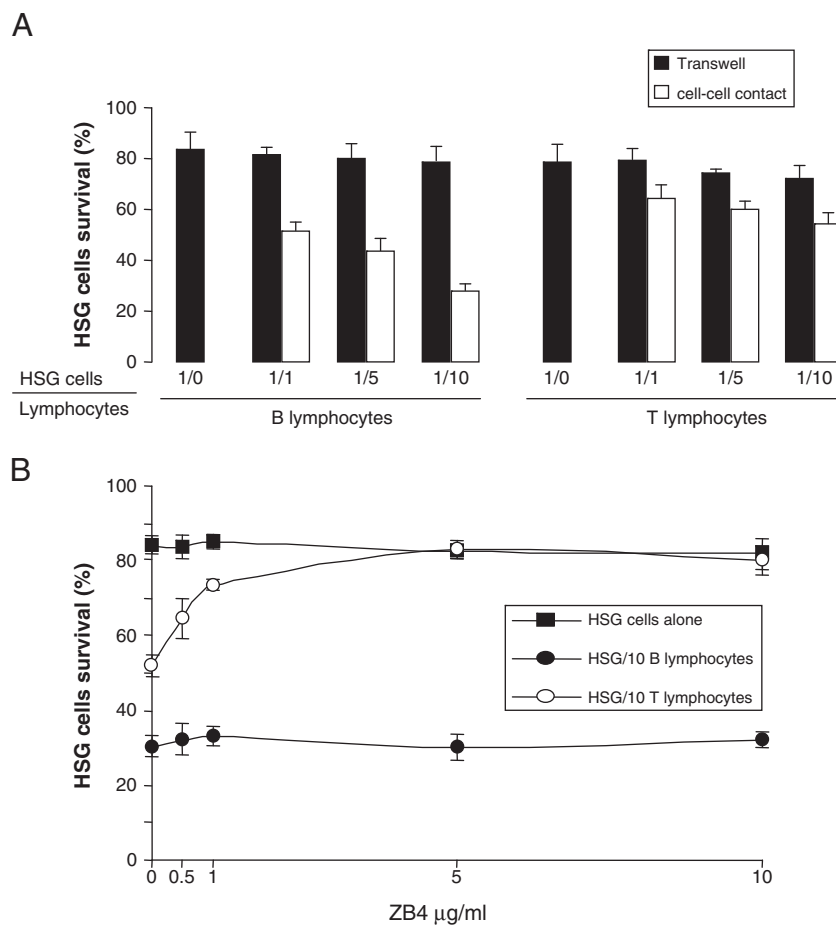


Fig. 1. B lymphocyte-induced apoptosis of epithelial cells from human salivary glands (HSGs) is not mediated by Fas–FasL interactions A – HSG cells and purified B or T lymphocytes from five tonsils were co-cultured for 24 h at different ratios: 1 HSG cell for 0, 1, 5 or 10 B or T lymphocytes. Apoptosis was measured by FACS through FITC-annexin V and PI staining. Transwells (solid bars) were used to determine cell–cell contacts. B – To test the implication of Fas in the question signaling pathway, HSG cells were pretreated with 0 to 10 µg/ml of the 2.34 anti-Fas mAb, prior to incubation with lymphocytes.

mediated apoptotic pathway is established. This process requires B lymphocytes to HSG cells interaction, induces caspase 3 activation, translocates PKC δ into the nucleus, promotes the phosphorylation of histone H2B, and results in apoptosis of ECs.

Such a pathway, associating caspase 3 activation and PKC δ cleavage, has previously been described in primary rat acinar cells from the parotid and submandibular glands after treatment with etoposide, a DNA-damaging agent, or with brefeldin A, a Golgi toxin. Jimenez et al. also detected the presence of activated caspase 3 and the cleavage product of PARP in the SGs from 15 SS patients and five normal controls [26]. They found that, compared with controls, the degree of activated caspase 3 was stronger and the amount of cleaved PARP higher in the acinar and ductal ECs of 13 of their 15 SS patients. However, this apoptosis was unrelated with the predominant type of infiltrating T or B lymphocytes.

T lymphocytes have long occupied the central stage of the debate on the type of lymphocytes involved in the pathophysiology of SS. The relevance of B lymphocytes has however been emphasized and new insights into their functions revealed. B-lymphocyte derived cytokines, including IFN- γ and IL-6 are likely to serve as effectors [24]. Given the kinetics of B-lymphocyte generation and their cytokine profile, T helper 1 phenotype may even be imprinted by effectors 1 cells through their expression of interleukin (IL)-2 and IFN- γ by B lymphocytes [27].

Furthermore, B lymphocytes act as APCs [28], behave as autophagic cells to bridge the gap between innate and adaptive responses [29] and regulate the formation of germinal centers (GCs) via the

production of lymphotoxins [30]. In the SGs of patients with SS, they settle as aggregates and conventional GCs that do not exclude autoreactive B lymphocytes [31]. As a consequence, these cells hold promise as the therapeutic targets.

Several trials with anti-CD20 mAb [32] and others [33] have been launched in primary SS. Clinical benefits were reported, although the underlying mechanisms were incompletely understood. They correlated with a decline in the number of B lymphocytes, including those infiltrating the SGs [34], but not with a reduction in the levels of most autoAbs [35–37]. Our results suggest that B lymphocyte depletion within the SGs could favor a decrease in ECs apoptosis and hence improve exocrine gland destruction.

Mechanisms involved in EC death induced by interaction with B lymphocytes through PKC δ activation require further investigation. The role of PKCs in apoptosis is controversial with data supporting both pro- and anti-apoptotic functions. For example, PKC α seems to be essential for the survival of ECs and in the absence of PKC α activity apoptosis is initiated [10]. Such apoptosis can be prevented by an inhibitory form of PKC δ , indicating that, under these precise conditions, apoptosis requires also PKC δ . In fact, PKC α and PKC δ display reciprocal functions in ECs, with PKC α functioning as a survival factor, while PKC δ acts rather as a trigger for apoptosis. It is interesting in this regard that Mecklenbräuer et al. showed that treatment of B lymphocytes with the potent survival agent for B-cell activating factor belonging to the TNF family (BAFF) prevents nuclear accumulation of PKC δ [38]. BAFF appears to be implicated in pathophysiological mechanisms that occur in the exocrine glands [39]. Constitutive

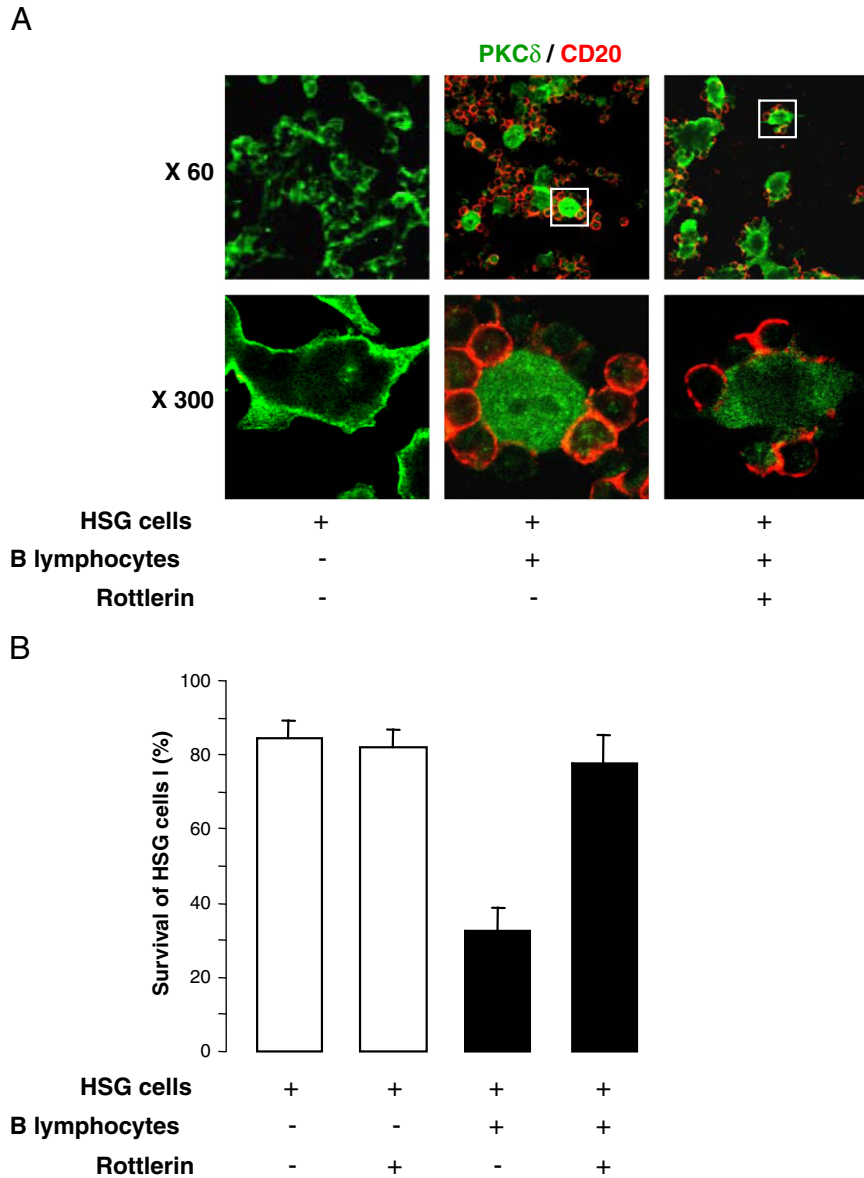


Fig. 2. B lymphocytes-initiate apoptosis of HSG cells through the translocation of PKC- δ into the nucleus. **A** – These cells were stained in green by FITC-anti-PKC δ mAb and B lymphocytes in red by TRITC-anti-CD20 pAb. To block translocation of PKC δ into the nucleus, HSG cells were pretreated with 50 μ M rottlerin before co-culture with B lymphocytes. **B** – HSG cell survival was quantitated by FACS using FITC-annexin V and PI as above.

synthesis of BAFF by ECs does not distinguish the SGs from patients with SS, inasmuch as BAFF was also detected in those from normal controls [40]. However, levels of BAFF were higher on the plasma membrane of patients' ECs and also in their culture supernatants, compared with healthy individuals. The increased expression of BAFF by ECs might then activate self-reactive B lymphocytes in SS which need BAFF for their survival. In return, the decrease of BAFF on ECs, due to its capture by infiltration B lymphocytes, could favor PKC δ activation and EC apoptosis. Consequently, links between B lymphocytes and ECs would be crucial in sustaining the autoimmune process in SS.

Take-home messages

- The epithelial cells of exocrine glands from patients with Sjögren's syndrome are induced into apoptosis by B lymphocytes.
- The results of transwell experiments indicate that cell–cell contacts are absolutely necessary to reproduce this damage.

- Intra-glandular apoptosis is not accounted for by Fas–Fas ligand interactions.
- Once translocated into the nucleus, the pyruvate kinase C delta induces phosphorylation on histones H2B.

Acknowledgments

We are grateful to Geneviève Michel and Simone Forest for their help with the typing of the text. Many thanks are also due to Roger Budd (Birmingham, United Kingdom) for his critical reading of our manuscript.

References

[1] Mavragani CP, Moutsopoulos HM. The geoeidemiology of Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev* 2010;9:305–10.

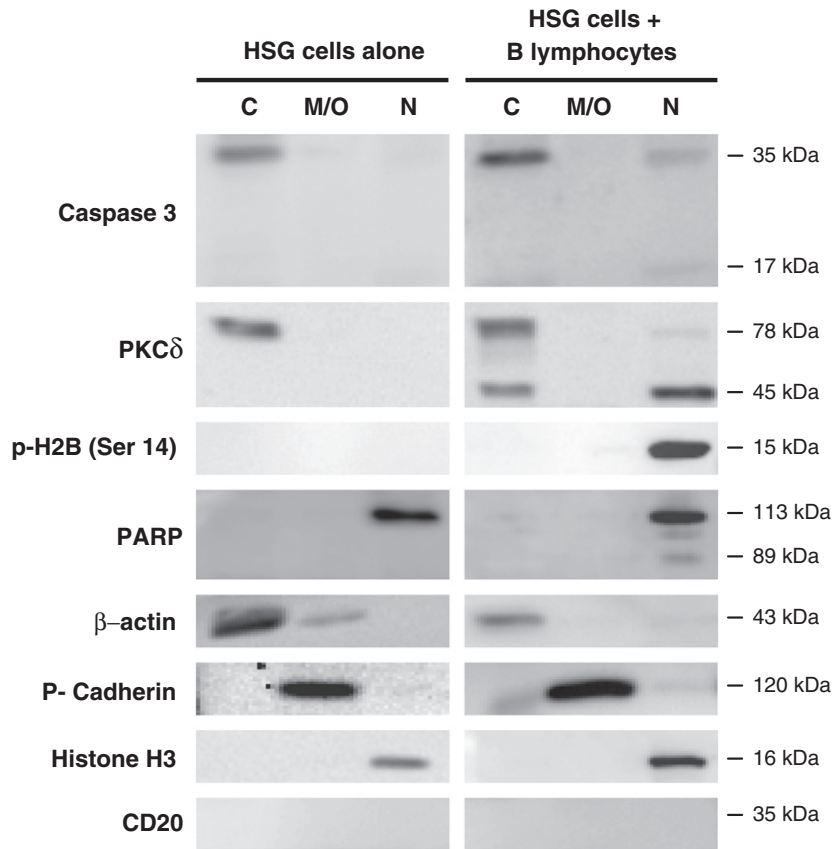


Fig. 3. PKCδ activation induces phosphorylation of histone H2B on serine 14. Subcellular fractionation of lysates from HSG cells alone or co-cultured with B lymphocytes was performed to isolate cytosol (C), membrane and organelles (M/O) and nucleus (N). Prior to lysis, HSG cells were negatively separated from B lymphocytes. The enriched different fractions were probed using anti-caspase 3 mAb, anti-PKCδ mAb, anti-phosphorylated histone H2B mAb and anti-PARP mAb. Nuclear, membrane and cytoplasm enrichments were tracked using anti-histone H3 pAb, anti-P-cadherin pAb and anti-β actin mAb respectively. Anti-CD20 Ab confirmed the absence of B lymphocytes.

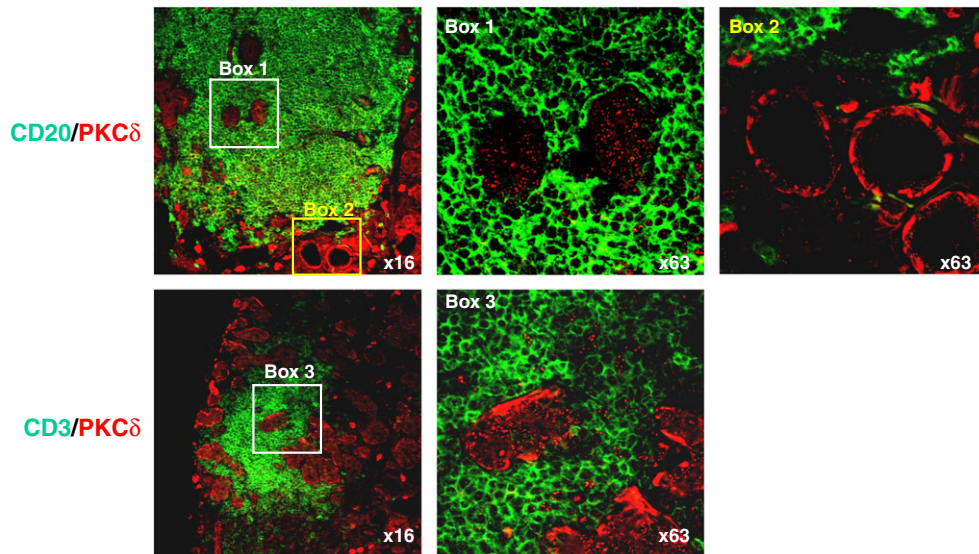


Fig. 4. PKCδ has a nuclear location in ductal epithelial cells when surrounded by B lymphocyte-infiltrates. PKCδ was stained in red, while B T lymphocytes were stained in green, using anti-CD20, and anti-CD3 mAbs, respectively. Original magnification ×16. Boxed areas at 16× magnification are shown on the right at 63× magnification.

[2] Youinou P, Pers JO. The international symposium on Sjögren's syndrome in Brest: the "top of the tops" at the "tip of the tips". *Autoimmun Rev* 2010;9:589–90.

[3] Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome: autoimmune epithelitis. *Clin Immunol Immunopathol* Aug 1994;72(2):162–5.

[4] Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome. *J Autoimmun* 2010;34:400–7.

[5] Talal N, Bunim JJ. The development of malignant lymphoma in the course of Sjögren's syndrome. *Am J Med* 1964;36:529–40.

[6] Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2002;20:323–70.

[7] Youinou P, Devauchelle-Pensec V, Pers JO. Significance of B cells and B cell clonality in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2010;62:2605–10.

- [8] Manganelli P, Fietta P. Apoptosis and Sjögren syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 2003;33:49–65.
- [9] Matsumura R, Umehiya K, Goto T, et al. IFN γ and TNF α induce Fas expression and anti-Fas-mediated apoptosis in a salivary ductal cell line. *Clin Exp Rheumatol* 2000;18:311–8.
- [10] Matassa AA, Kalkofen RL, Carpenter L, Biden TJ, Reyland ME. Inhibition of PKC- α induces a PKC- δ -dependent apoptotic program in salivary epithelial cells. *Cell Death Differ* 2003;10:269–77.
- [11] Blass M, Kronfeld I, Kazimirsky G, Blumberg PM, Brodie C. Tyrosine phosphorylation of PKC δ is essential for its apoptotic effect in response to etoposide. *Mol Cell Biol* 2002;22:182–95.
- [12] Yoshida K. PKC δ signaling: mechanisms of DNA damage response and apoptosis. *Cell Signal* 2007;19:892–901.
- [13] Cross T, Griffiths G, Deacon E, et al. PKC δ is an apoptotic lamin kinase. *Oncogene* 2000;4:2331–7.
- [14] Hu Y, Liu Z, Yang SJ, Ye K. Acinus-provoked PKC δ isoform activation is essential for apoptotic chromatin condensation. *Cell Death Differ* 2007;14:2035–46.
- [15] Ajiro K. Histone H2B phosphorylation in mammalian apoptotic cells. An association with DNA fragmentation. *J Biol Chem* 2000;275:439–43.
- [16] Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R. 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.
- [17] Daniels TE. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's syndrome. Assessment as a diagnostic criterion in 362 suspected cases. *Arthritis Rheum* 1984;27:147–56.
- [18] Datta R, Banach D, Kojima H, et al. Activation of the CPP32 protease in apoptosis induced by 1- β -D-arabinofuranosylcytosine and other DNA-damaging agents. *Blood* 1996;88:1936–43.
- [19] Fernandez-Capetillo O, Allis CD, Nussenzweig A. Phosphorylation of histone H2B at DNA double-strand breaks. *J Exp Med* 2004;199:1671–7.
- [20] Darmon AJ, Ley TJ, Nicholson DW, Bleackley RC. Cleavage of CPP32 by granzyme B represents a critical role for granzyme B in the induction of target cell DNA fragmentation. *J Biol Chem* 1996;271:21709–12.
- [21] Atkinson EA, Barry M, Darmon AJ, et al. Cytotoxic T lymphocyte-assisted suicide. Caspase 3 activation is primarily the result of the direct action of granzyme B. *J Biol Chem* 1998;273:21261–6.
- [22] Limesand KH, Barzen KA, Sanders LA, et al. Characterization of rat parotid and submandibular acinar cell apoptosis in primary culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2003;39:170–7.
- [23] Waterman SA, Gordon TP, Rischmueller M. Inhibitory effects of muscarinic receptor autoantibodies on parasympathetic neurotransmission in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2000;43:1647–54.
- [24] Pérez P, Goicovich E, Allende C, et al. Differential expression of matrix metalloproteinases in labial salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2000;43:2807–17.
- [25] Pérez P, Kwon YJ, Allende C, et al. Increased acinar damage of salivary glands of patients with Sjögren's syndrome is paralleled by simultaneous imbalance of matrix metalloproteinase 3/tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and matrix metalloproteinase 9/tissue inhibitor of metalloproteinases 1 ratios. *Arthritis Rheum* 2005;52:2751–60.
- [26] Jimenez F, Aiba-Masago S, Al Hashimi I, et al. Activated caspase 3 and cleaved PARP in salivary epithelium suggest a pathogenetic mechanism for Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:338–42.
- [27] Youinou P, Taher TE, Pers JO, Mageed RA, Renaudineau Y. B lymphocyte cytokines and rheumatic autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 2009;60:1873–80.
- [28] Harvey BP, Quan TE, Rudenga BJ, Roman RM, Craft J, Mamula MJ. Editing antigen presentation: antigen transfer between human B lymphocytes and macrophages mediated by class A scavenger receptors. *J Immunol* 2008;181:4043–51.
- [29] Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 2010;327:291–5.
- [30] Vinuesa CG, Cook MC. The molecular basis of lymphoid architecture and B cell responses: implications for immunodeficiency and immunopathology. *Curr Mol Med* 2001;1:689–725.
- [31] Le Pottier L, Devauchelle V, Fautrel A, et al. Ectopic germinal centers are rare in Sjögren's syndrome salivary glands and do not exclude autoreactive B cells. *J Immunol* 2009;182:3540–7.
- [32] Saraux A. The point on the ongoing B-cell depleting trials currently in progress over the world in primary Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev* 2010 Jul;9(9):609–14.
- [33] Tobón GJ, Saraux A, Pers JO, Youinou P. Emerging biotherapies for Sjögren's syndrome. *Expert Opin Emerg Drugs* 2010;15:269–82.
- [34] Pers JO, Devauchelle V, Daridon C, et al. BAFF-modulated repopulation of B lymphocytes in the blood and salivary glands of rituximab-treated patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2007;56:1464–77.
- [35] Silverman GJ, Weisman S. Rituximab therapy and autoimmune disorders: prospects for anti-B cell therapy. *Arthritis Rheum* 2003;48:1484–92.
- [36] Eisenberg R. Update on rituximab. *Ann Rheum Dis* 2005;64:iv55–7.
- [37] Gürcan HM, Keskin DB, Stern JN, Nitzberg MA, Shekhani H, Ahmed AR. A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol* 2009;9:10–25.
- [38] Mecklenbräuker I, Kalled SL, Leitges M, Mackay F, Tarakhovskiy A. Regulation of B-cell survival by BAFF-dependent PKC δ -mediated nuclear signalling. *Nature* 2004;431:456–61.
- [39] Varin MM, Le Pottier L, Youinou P, Saulep D, Mackay F, Pers JO. B-cell tolerance breakdown in Sjögren's syndrome: focus on BAFF. *Autoimmun Rev* 2010;9:604–8.
- [40] Daridon C, Devauchelle V, Hutin P, et al. Aberrant expression of BAFF by B lymphocytes infiltrating the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2007;56:1134–44.

The efficacy and safety of Belimumab in the treatment of active systemic lupus erythematosus. Results from the BLISS-76 study

Belimumab is a human IgG1 λ monoclonal antibody that binds soluble human B lymphocyte stimulator (BLyS, also known as BAFF). Overexpression of BLyS has been observed in systemic lupus erythematosus (SLE) and correlates with increased SLE disease activity and elevated anti-double stranded DNA (anti-dsDNA) antibodies concentrations.

The BLISS-76 study group (**Arthritis Rheum 2011; 63:3918–30**) performed a phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo controlled trial in order to assess the efficacy/safety of Belimumab plus standard therapy in patients with active SLE.

In this study 819 SLE patients with score ≥ 6 on the safety of Estrogens in Lupus Erythematosus National Assessment (SELENA) version of the SLE Disease Activity Index (SLEDAI) were randomized in a 1:1:1 ratio to receive 1 mg/Kg, 10 mg/kg Belimumab or placebo plus the standard therapy every 28 day for 72 weeks. Patients with severe nephritis and severe central nervous system involvement were excluded.

The primary efficacy end point was the SLE Responder Index (SRI) response rate at week 52 defined as a ≥ 4 -points reduction in SELENA-SLEDAI score, no new British Isles Lupus Assessment Group (BILAG) A organ domain score and no more than 1 new BILAG B score, and no worsening in physician's global assessment score vs baseline. The major secondary end point was the SRI response rate at 76 weeks.

Belimumab 10 mg/kg plus standard therapy met the primary efficacy end point, the SRI response at week 52 compared to placebo was 43.2% vs 33.5% ($p=0.017$). The risk of severe flares over 76 weeks (based on modified SLE flare Index) was reduced with 1 mg/kg Belimumab (34%, $p=0.023$). The incidence of adverse events (AE), including severe and serious AE was comparable across groups. Infusion reactions were more common with Belimumab than placebo (16% vs 10%) with no apparent dose relation. Non anaphylaxis was reported.

In conclusion, Belimumab plus standard therapy improved SRI response rate, reduced SLE disease activity and severe flares and was well tolerated in patients with SLE.

Luca Iaccarino

ARTICLE 4

BAFF-récepteur favorise la survie des cellules épithéliales en culture

**Marie-Michèle VARIN, Laëticia LE POTTIER,
Jacques-Olivier PERS**

RÉSUMÉ

Objectifs

Bien que BAFF et BR3 soient produits et exprimés par de nombreuses cellules, leur rôle n'a été démontré que sur la lignée lymphocytaire. Ayant démontré l'expression de BR3 à la surface de cellules épithéliales (CE) des GS nous avons essayé de comprendre son rôle fonctionnel.

Matériel – Méthodes

La présence de BR3 a été confirmée par différentes techniques (RT-PCR, immunofluorescence indirecte, FACS) sur la lignée épithéliale HSG, des biopsies de GS de témoins et de patients atteints d'un syndrome de Gougerot-Sjögren ainsi que sur leurs CE en culture. BR3 a été neutralisé en culture par incubation avec un anticorps (Ac) bloquant ou par transfection avec un ARN inhibiteur spécifique (SiBR3), puis la survie des CE a été évaluée. Enfin, l'effet de différents Ac anti-BAFF a été analysé.

Résultats

Les CE expriment BR3 et produisent BAFF. Le blocage de BR3 favorise l'apoptose des CE "in vitro". Cette apoptose se traduit par la translocation nucléaire de la PCK δ . La neutralisation de BAFF par des Ac anti-BAFF aboutit à des effets différents selon l'Ac utilisé suggérant que seules certaines formes de BAFF permettent la survie des CE en se fixant à BR3.

Conclusion

Notre étude démontre pour la première fois le rôle de BR3 dans la survie des CE en culture. Elle suggère également que seules certaines formes de BAFF sont impliquées dans les effets fonctionnels observés.

INTRODUCTION

La cytokine BAFF a été identifiée comme indispensable au développement et à la différenciation des lymphocytes B (LB) (Schneider et al, 1999; Moore et al. 1999). Elle agit par interaction avec trois récepteurs différents, BR3 (ou BAFF-R) (Thompson et al, 2001), TACI (von Bülow et al., 1997) et BCMA (Laâbi, 1992).

BAFF est exprimé dans les organes lymphoïdes par différents types cellulaires (Schneider et al, 1999). L'ARNm de BAFF est mis en évidence dans les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes T (LT) et les polynucléaires neutrophiles (Huard et al., 2004; Nardelli et al., 2000). De plus, la synthèse de BAFF peut être induite dans les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques après activation par des cytokines comme l'interferon (IFN)- α , l'IFN- γ , l'IL-10 et le CD40L (Litinskiy et al, 2002). Les cellules dendritiques folliculaires ont également été identifiées comme source possible de BAFF (Hase et al., 2004) et une faible production a été observée dans les LT activés (Huard et al., 2004). De plus, les cellules stromales de la moelle osseuse produisent massivement du BAFF afin de maintenir l'homéostasie des LB (Gorelik et al., 2003).

Enfin, BAFF est décrit dans différentes pathologies. En effet, les LB de leucémie lymphoïde chronique produisent BAFF (Kern et al., 2004) et des quantités élevées de BAFF soluble sont trouvées dans le sérum des patients souffrant de myélome (Mareaux et al., 2004). De même, des niveaux élevés de BAFF sont observés dans le sérum de patient atteints de maladies autoimmunes comme le lupus érythémateux disséminé, la polyarthrite rhumatoïde et le syndrome de Gougerot-Sjögren (SGS) (Pers et al., 2005). Dans le SGS, les LB et LT présents dans l'infiltrat produisent BAFF (Daridon et

al., 2007) et de façon plus surprenante, les astrocytes au cours de la sclérose en plaque se révèlent sécréteur de BAFF (Krumbholz et al., 2005).

Parmi les récepteurs de BAFF, BR3 est le plus spécifique. Bien que majoritairement exprimé par les LB matures, des expériences de Northern-Blot ont détecté l'ARNm de BR3 dans la rate, les ganglions, le thymus, les poumons et les testicules (Thompson et al, 2001; Yan et al, 2001). BR3 est également présent à la surface des LT CD4⁺ et CD8⁺ (Yan et al., 2001) et différentes lignées de lymphome l'expriment (Kern et al., 2004). Enfin au cours du SGS, nous avons observé que les LB de l'infiltrat expriment BR3 alors qu'il est absent de la surface des LT (Daridon et al., 2007). De façon étrange, nous avons également démontré la présence de BR3 sur les CE sans pouvoir expliquer les raisons de son expression.

Moutsopoulos définit le SGS comme une épithélite auto-immune (Skopouli, 1994). En effet, l'activation des cellules épithéliales (CE) est considérée comme le processus immunopathologique principal du développement du SGS. Ces cellules expriment l'HLA de classe II, constituant un pool de cellules présentatrices d'antigène (Germain et al., 1994) capable de présenter des auto-antigènes aux LT. L'expression des molécules HLA de classe II est souvent associée à la présence d'IFN- γ (Giroux et al., 2002), et les CE produisent de l'IFN- γ au cours du SGS (Hayashi et al., 2009) ce qui favorise également la production de BAFF (Litinsky et al., 2002).

La liaison de BAFF au récepteur BR3 conduit à la survie du LB. BR3 est en effet le récepteur de BAFF le plus important pour la survie des LB matures (Thompson et al., 2001). Bien que la cascade de signalisation transmise par BR3 dans le LB favorise préférentiellement l'activation de la voie NF κ B2 (Claudio et al., 2002), une autre voie de survie favorise la localisation cytoplasmique de la PKC δ au détriment de sa localisation nucléaire (Mecklenbräuker et al., 2002). Or la voie de la PKC δ (Reyland, 2002) et la voie

Fas (Manoussakis et al, 2007) sont les plus impliquées dans l'apoptose des CE.

L'objectif de ce travail a été de comprendre le rôle de BAFF et de l'expression de BR3 à la surface des CE.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Culture cellulaire

Les cellules de la lignée HSG ont été cultivées dans un incubateur, à 37°C et 5% de CO₂, dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Lonza, Verviers, Belgique) contenant 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF, Eurobio, Courtaboeuf, France), 2mM de L-glutamine (Gibco, Invitrogen, Auckland, Nouvelle-Zélande), 1% d'acides aminés non essentiels (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), 100IU/ml de pénicilline (Panpharma, Fougères, France) et 100µg/ml de streptomycine (Panpharma).

Les biopsies de glande salivaire ont été obtenues à partir de patients remplissant les critères du Groupe Consensus Américano-Européen pour le SGS primaire (Vitali et al, 2002) et ayant un focus score ≥ 3 . Tous les patients ont donné leur consentement, et l'étude a été approuvée par le Comité d'Ethique du CHRU de Brest. Brièvement, les biopsies ont été coupées en petits fragments et incubés dans du milieu BEM (Basal Epithelial Medium) supplémenté (SBEM). Le milieu SBEM est composé de trois volumes de milieu Ham's F12 (Invitrogen) et un volume de milieu DMEM, 2,5% de SVF décomplémenté, 2mM de L-glutamine, 10ng/ml d'EGF (Promega, Madison, WI), 0,5µg/ml d'insuline (Novo-Nordisk, Küssnacht, Suisse), 0,4µg/ml d'hydrocortisone (Sigma-Aldrich). Les cellules ont été incubées à 37°C et 5% de CO₂.

Stimulation des cellules

Après détachement des cellules HSG par de la trypsine (PAN-biotech GmbH, Aidenbach, Allemagne) et lavage dans du Phosphate Buffered Saline, Cryo Bio System, L'Aigle, France (PBS) à 1200 rpm pendant 10 minutes, elles ont été mises à adhérer sur des lames à 10 puits (Thermo Scientific, Pittsburg, PA) la veille de l'expérience. Elles ont ensuite été stimulées pendant 24

heures par un anticorps polyclonal de lapin anti-BR3 (ProSci, Poway, CA) ou par du BAFF recombinant humain (BAFFrh, Immunotools, Friesoythe, Allemagne). Les concentrations de l'anticorps anti-BR3 varient de 1 à 20 µg/ml, celles de BAFFrh, de 25 ng/ml à 3 µg/ml. En contrôle positif de l'apoptose, les cellules ont été stimulées par 200µM d'étoposide (Teva, Paris la Défense, France).

Les cellules épithéliales primaires issues de biopsie de glande salivaire ont été trypsinées et lavées par centrifugation à 1200 rpm pendant 10 minutes. Puis, elles ont été mises à adhérer dans des puits d'une plaque de 96 puits (Nunc, Roskilde, Danemark) la veille de l'expérience. Le lendemain, elles ont été incubées avec 20 µg/ml d'anticorps monoclonal de souris anti-BAFF (R&D Systems, Minneapolis, MN) ou d'anticorps polyclonal de lapin anti-BAFF (Upstate, Lake Placid, NY), pendant 24 heures. En contrôle négatif, elles ont été incubées avec un isotype d'IgG de souris (Immunotech, Marseille, France) ou un isotype d'IgG de lapin (SouthernBiotech, Birmingham, AL).

Détection de BAFF et de ses récepteurs par immunofluorescence

Des biopsies de glande salivaire ont été incorporées dans une résine spéciale Shandon Cryomatrix[®] (Thermo Scientific) et congelées dans de l'isopentane froid (Sigma-Aldrich) placé en bain-marie dans de l'azote liquide. A partir des blocs, des coupes de 4µm ont été obtenues par cryotome et montées sur des lamelles coatées à la poly-L-lysine (Thermo Scientific). Les coupes ont été incubées pendant 40 minutes à température ambiante avec un anticorps polyclonal de lapin anti-BAFF (Upstate, Lake Placid, NY), un anticorps monoclonal de souris anti-cytokeratine 18 couplé à l'isothiocyanate fluorescéine (FITC) (Sigma Aldrich), un anticorps polyclonal de lapin anti-BR3 (ProSci) ou un anticorps polyclonal de lapin anti-CD20 (Thermo Scientific). Après trois lavages avec du PBS, elles ont été incubées pendant 40 minutes avec un anticorps secondaire polyclonal d'âne anti-IgG de lapin couplé à de

l'isothiocyanate fluorescéine (FITC) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) ou un anticorps polyclonal d'âne anti-IgG de lapin couplé à la Rhodamine Red-X (RRX, Jackson ImmunoResearch), dans du PBS complété avec 2% de sérum d'âne (Sigma-Aldrich). Après cinq lavages en PBS, les coupes ont été fixées avec du paraformaldéhyde 4% froid (Sigma-Aldrich), montées entre lame et lamelle avec du Vectashield (Vector, Berhinger, CA) et analysées par microscopie confocale (TCS-NT Leica). L'anticorps secondaire couplé au FITC a servi de contrôle négatif.

Les cellules HSG ont été fixées sur la lame à 10 puits par incubation avec du PBS contenant 4% de paraformaldéhyde pendant 15 minutes, à 4°C. Elles ont ensuite été perméabilisées avec du PBS contenant 0,5% de Tween 20 (Sigma-Aldrich) et 0,2% de sérum albumine bovine (BSA, Sigma-Aldrich), pendant 20 minutes à température ambiante. Après rinçage, les cellules ont été incubées en présence d'un anticorps monoclonal de souris anti-BAFF, un anticorps polyclonal de lapin anti-BR3, un anticorps polyclonal de chèvre anti-TACI (Peprotech, Rocky Hill, NJ) ou un anticorps polyclonal de chèvre anti-BCMA (R&D Systems) pendant 40 minutes, à température ambiante. Après lavage au PBS, elles ont été incubées en présence d'un anticorps secondaire polyclonal d'âne anti-IgG de souris couplé au FITC, un anticorps polyclonal d'âne anti-IgG de lapin couplé au RRX ou d'un anticorps polyclonal d'âne anti-IgG de chèvre couplé au RRX (Jackson ImmunoResearch) pendant 30 minutes, à température ambiante et à l'obscurité. Après lavage au PBS, les cellules ont été montées entre lame et lamelle avec du Vectashield et observées par microscopie confocale.

Etude de la prolifération des cellules par immunofluorescence

Pour visualiser les cellules en prolifération, celles-ci ont été incubées avec l'anticorps monoclonal de souris anti-Ki-67 couplé au FITC (Dako, Glostrup, Danemark) et observées au microscope confocal.

Localisation de la PKC delta par immunofluorescence

La PKC delta a été localisée sur les cellules HSG en les incubant avec un anticorps monoclonal de souris anti-PKC delta (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), révélé par un anticorps secondaire polyclonal d'âne anti-IgG de souris couplé au FITC (Jackson ImmunoResearch). Le noyau des cellules a été marqué en incubant les cellules avec de l'iodure de propidium pendant 20 minutes à 4°C. Après lavage en PBS, les cellules ont été montées entre lame et lamelle avec du Vectashield et observées par microscopie confocale.

Les anticorps utilisés en immunofluorescence sont présentés en tableau 1.

Tableau 1 :

Antigène	Anticorps	Fluorochrome	Fournisseur
BAFF	Lapin anti-humain	/	Upstate
BR3	Lapin anti-humain	/	ProSci
TACI	Chèvre anti-humain	/	Peprotech
BCMA	Chèvre anti-humain	/	R&D Systems
Cytokeratine 18	Souris anti-humain	FITC	Sigma-Aldrich
PKC δ	Souris anti-humain	/	BD Biosciences
Ki-67	Souris anti-humain	FITC	Dako
CD20	Lapin anti-humain	/	Thermo Scientific
	Ane anti-IgG de lapin	FITC	Jackson ImmunoResearch
	Ane anti-IgG de souris	FITC	Jackson ImmunoResearch
	Ane anti-IgG de lapin	RRX	Jackson ImmunoResearch
	Ane anti-IgG de chèvre	RRX	Jackson ImmunoResearch

Détection de BAFF et de ses récepteurs par cytométrie en flux

Après trypsination et lavage des cellules HSG à 1200 rpm pendant 10 minutes, celles-ci ont été incubées avec un anticorps monoclonal de souris anti-BAFF (R&D systems), un anticorps polyclonal de lapin anti-BR3, un anticorps polyclonal de chèvre anti-TACI ou un anticorps polyclonal de chèvre anti-BCMA pendant 30 minutes à 4°C. Après lavage dans 1 ml de PBS par centrifugation à 1500rpm pendant 5 minutes à 4°C, les cellules ont été incubées avec un anticorps secondaire polyclonal d'âne anti-IgG de souris couplé au FITC, un anticorps polyclonal d'âne anti-IgG de lapin couplé au FITC ou un anticorps polyclonal d'âne anti-IgG de chèvre couplé au FITC (tous les trois de chez Jackson ImmunoResearch) pendant 30 minutes à 4°C et à l'obscurité. En contrôle, les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire seul couplé au FITC. Après lavage en PBS, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux sur l'appareil EPICS® XL-MCL (Coulter).

Les cellules épithéliales primaires obtenues à partir des biopsies de glande salivaire ont été marquées avec les anticorps anti-BR3, soit l'anticorps monoclonal de souris anti-BR3 (eBioscience, San Diego, CA) ou l'anticorps polyclonal de lapin révélés par des anticorps secondaires polyclonaux : un anticorps d'âne anti-IgG de souris couplé à la FITC ou un anticorps d'âne anti-IgG de lapin couplé à la FITC. Comme contrôles négatifs, les isotypes d'IgG de souris (Immunotech) et de lapin (SouthernBiotech) ont été utilisés, révélés par les anticorps secondaires spécifiques décrits précédemment.

Étude de la survie des cellules par cytométrie en flux

Les cellules ont été trypsinées et lavées en PBS par centrifugation à 1500 rpm, pendant 5 minutes et à 4°C. Puis, elles ont été incubées par de l'annexine V et de l'iodure de propidium du kit AnnexinV-FITC (Immunotech, Beckman-Coulter, Marseille, France) pendant 15 minutes, à 4°C et à

l'obscurité. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux. Les cellules négatives pour le marquage annexine V et l'iodure de propidium ont été considérées comme vivantes.

Les anticorps utilisés en cytométrie en flux sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 :

Antigène	Anticorps	Fluorochrome	Fournisseur
BAFF	Souris anti-humain	/	R&D Systems
BR3	Souris anti-humain	/	eBiosciences
BR3	Lapin anti-humain	/	ProSci
TACI	Chèvre anti-humain	/	Peptotech
BCMA	Chèvre anti-humain	/	R&D Systems
isotype	Souris anti-IgG	/	Immunotech
isotype	Lapin anti-IgG	/	SouthernBiotech
	Ane anti-IgG de souris	FITC	Jackson ImmunoResearch
	Ane anti-IgG de lapin	FITC	Jackson ImmunoResearch
	Ane anti-IgG de chèvre	FITC	Jackson ImmunoResearch

Étude de l'apoptose des cellules par technique TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling)

Après 24 heures de stimulation, les cellules ont été cytopspinées (Cytospin 3, Shandon) et séchées pendant 1 heure. Puis, elles ont été marquées par le kit TUNEL (MEBSTAIN Apoptosis kit II, Immunotech, Marseille, France) suivant les instructions du fournisseur. Brièvement, les

cellules ont été fixées pendant 15 minutes à 4°C avec une solution de NaH₂PO₄ (0,1 M, pH 7,4) contenant 4% de PFA. Puis, elles ont été perméabilisées pendant 15 minutes à température ambiante avec du PBS contenant 0,5% de Tween 20 et 0,2% de BSA. Après trois lavages à l'eau distillée, les cellules ont été incubées avec la solution TdT pendant 1 heure à 37°C. Puis, après trois autres lavages avec de l'eau distillée, elles ont d'abord été incubées 10 minutes à température ambiante avec la solution de blocage, puis avec la solution d'avidine-FITC pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Après trois rinçages au PBS et marquage du noyau des cellules avec de l'iodure de propidium pendant 20 minutes, à 4°C, celles-ci ont été lavées pendant 3 minutes avec du PBS, puis montées entre lame et lamelle avec du Vectashield, et observées par microscopie confocale.

RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction)

Les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit RNAbles[®] (Eurobio) selon les instructions du fournisseur. Les ADNc correspondants ont été synthétisés par la technique de « random priming » grâce au kit SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen), selon les instructions du fournisseur. L'amplification de la GAPDH (gène de ménage) et des trois récepteurs de BAFF (BR3, TACI et BCMA) consiste en une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes, suivie de 5 cycles avec 30 secondes à 94°C, 1 minute à 61°C et 1 minute à 72°C, puis 40 cycles avec 30 secondes à 94°C, 40 secondes à 56°C et 1 minute à 72°C, et une étape d'extension finale à 72°C pendant 10 minutes. Les produits de PCR ont été séparés sur un gel d'agarose (Interchim, Montluçon, France) à 2%, puis visualisés sous UV au moyen de Gel Red Nucleic Acid Stain (Interchim) grâce à une caméra pilotée par le logiciel Quantity One[®] Software version 4.6.3 (Biorad, Marnes-la-Coquette, France).

Les amorces utilisées pour la PCR sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3 :

Gène	Amorce sens	Amorce antisens
GAPDH	5'CTTAGCACCCCTGGCCAAGG 3'	5' CTTACTCCTTGGAGGCCATG 3'
BR3	5' CTGGTCCTGGTGGGTCTG 3'	5' TCTTGGTGGTCACCAGTTCA 3'
TACI	5' AGTGGCCTGGGCCGGAG 3'	5' CTCCTTGCGGCAGCTGAGTGAC 3'
BCMA	5' CCTCCTCTAACATGTCAGCGTTATTGTAATG 3'	5' GTCAATGTTAGCCATGCCAGGGA 3'

Marquage immunofluorescent des siRNA

Les petits ARN interférence (siRNA) de BR3 et des contrôles positif et négatif (Applied Biosystem, Ambion, Austin, TX) ont été couplés à la fluoresceine FAM grâce au kit Silencer siRNA labeling kit (Applied Biosystems). 5µg de siRNA à 20µM ont été incubés en présence de tampon de marquage, de l'agent de marquage FAM et d'eau (nuclease-free) pendant 1 heure à 37°C à l'obscurité. Puis, le mélange a été précipité avec 0,1 volumes de NaCl (5M) du kit et 2,5 volumes d'éthanol absolu (Carlo Erba Reagents, Rodano, Italie) pendant 1 heure, à -20°C. Après centrifugation à 14000g pendant 20 minutes à 4°C, le surnageant a été éliminé, puis le culot de siRNA a été lavé avec de l'éthanol 70% par centrifugation à 14000g pendant 5 minutes, à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot a été séché à température ambiante pendant 10 minutes, puis resuspendu dans de l'eau (nuclease-free), pour avoir une concentration finale de 20µM.

Transfection des cellules avec le siRNA de BR3

Les cellules ont été mises en culture la veille de la transfection à une concentration de $2 \cdot 10^4$ cellules dans des plaques de 96 puits. Le lendemain, les siRNAs de BR3 et des contrôles ont été incubés pendant 15 minutes avec

l'agent de transfection FuGENE HD (Promega, Madison, WI) et du milieu OptiMEM (Gibco), au ratio 3:1 (3µl de FuGENE HD pour 1µg de siRNA). Le mélange FuGENE HD/siRNA a été ensuite ajouté aux cellules qui ont été incubées pendant 24 heures à 37°C et 5% de CO₂. La survie des cellules a ensuite été étudiée par cytométrie en flux, après marquage par l'iodure de propidium.

Les séquences reconnues par les siRNA de BR3 sont représentées dans le tableau 4.

Tableau 4 :

Gène	Identification du siRNA	Séquence reconnue
BR3 « 1 »	s225507	Sens : GGAAAUCAAUUCAGCUCUtt
		Antisens : AGAGCUGAAUUUGAUUUCCaa
BR3 « 2 »	s41837	Sens : GCAUGCACAUGCCCUCUUUtt
		Antisens : AAAGAGGGCAUGUGCAUGCtg
BR3 « 3 »	s41838	Sens : CAUCUUUGACAGCCCUUGAtt
		Antisens : UCAAGGGCUGUCAAGAUGgt

Afin de renforcer l'effet de la transfection sur l'extinction du gène de BR3, les trois siRNA ont été transfectés en même temps aux cellules HSG.

Analyse des formes de BAFF par immunoblot

Le surnageant des cellules HSG et primaires a été concentré avec le kit Microcon[®] Centrifugal Filter Device (Millipore, Billerica, MA), selon les instructions du fournisseur. Après une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 10% SDS et transféré sur une membrane de polyvinylidène difluoride (GE Healthware, Buckingham, Angleterre). Les sites non spécifiques sont bloqués avec du Tris 10mM contenant 0,1% de Tween-20 (Sigma-

Aldrich) et 5% de lait (Régilait), la membrane a été marquée avec l'anticorps monoclonal de souris anti-BAFF (R&D Systems) ou l'anticorps polyclonal de lapin anti-BAFF (Upstate). Les membranes ont été lavées avec du tampon Tween-TBS et incubées avec un anticorps secondaire polyclonal de chèvre anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (HRP, Beckman Coulter) ou un anticorps polyclonal d'âne anti-IgG de lapin couplé à l'HRP (Jackson ImmunoResearch). Elles ont été analysées avec le kit Amersham ECL™ Advance Western Blotting Detection kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, Royaume Uni), grâce au logiciel Quantity One® Software version 4.6.3 (Biorad).

Statistiques

Tous les résultats sont exprimés en fonction de la moyenne \pm écart type. Les tests de comparaison ont été réalisés en utilisant le test de Mann-Whitney pour variables non appariées.

RÉSULTATS

Les cellules épithéliales expriment BAFF et BR3

Par IFI, nous observons l'expression de BAFF sur les cellules épithéliales des témoins et des patients atteints du SGS (Figure 1A). Les transcrits des récepteurs de BAFF ont également été analysés dans des cultures de CE de témoins et de malades et seul les transcrits du récepteur BR3 sont observés par RT-PCR (Figure 1B). La présence de la protéine BR3 est également démontrée par IFI sur des biopsies de GS et l'expression de BR3 sur les LB infiltrant les GS au cours du SGS est confirmée (Figure 1C).

La lignée épithéliale HSG présente les mêmes caractéristiques à savoir l'expression de BAFF et de BR3 et l'absence d'expression de TACI et BCMA (Figure 1D).

Le blocage du BR3 favorise l'apoptose des cellules épithéliales "in vitro".

Afin d'identifier le rôle de BR3 à la surface des CE, les cellules de la lignée HSG sont incubées en présence de BAFF recombinant et d'un anticorps anti-BR3 bloquant.

L'effet de ces deux stimulations sur la prolifération (marquage Ki-67) et l'apoptose des CE (technique TUNEL) est évalué (Figure 2). La présence de doses croissantes de BAFF recombinant n'a pas d'effet sur la prolifération et l'apoptose des CE. Par contre, le blocage de BR3 par l'anticorps anti-BR3 entraîne une baisse de la prolifération cellulaire (Figure 2A) et une augmentation de l'apoptose des CE (Figure 2B). Ce blocage de BR3 se traduit par la translocation de la PKC δ du cytoplasme vers le noyau (Figure 3) en accord avec le rôle de la PKC δ dans l'apoptose des CE.

Pour confirmer l'importance du récepteur BR3 dans la survie des CE, nous avons transfecté un ARN inhibiteur spécifique de BR3 (siBR3) aux CE de la lignée HSG (Figure 4A). La survie des CE transfectées par le siBR3 au cours du temps est diminuée par rapport aux CE transfectées par le siARN contrôle ($32,0 \pm 4,3\%$ vs $68,1 \pm 7,2$ à 72 heures, $p < 0,05$). Tous ces résultats démontrent l'importance de BR3 dans la survie des CE.

Effet de la neutralisation de BAFF sur la survie des cellules épithéliales

Afin d'observer l'importance de l'interaction BAFF/BR3 dans la survie des CE, nous avons neutralisé BAFF en incubant les CE issues de témoins avec une concentration saturante de différents anticorps anti-BAFF (Figure 4B). L'anticorps polyclonal de lapin anti-BAFF induit l'apoptose des CE ($31,9 \pm 14,0\%$ de survie) alors que l'anticorps monoclonal de souris anti-BAFF (Clone 137314) n'a pas d'effet ($75,4 \pm 9,2$ de survie, $p < 0,05$).

Certaines formes de BAFF participent à la survie des cellules épithéliales

Nous avons donc envisagé qu'il existait différentes formes de BAFF produites par les CE et que l'une de ces formes favorisait la survie. Ainsi, nous avons analysé par Western-blot le surnageant des CE en le révélant par les différents anticorps anti-BAFF utilisés précédemment (Figure 4C). Contrairement à l'anticorps monoclonal anti-BAFF de souris qui ne reconnaît que la forme de BAFF à 21kDa, l'anticorps polyclonal anti-BAFF de lapin reconnaît, en plus une forme de BAFF à 32 kDa et une forme à 17kDa. L'ensemble de ces résultats suggère que seules certaines formes de BAFF participent à la survie des CE en se fixant sur le récepteur BR3.

DISCUSSION

Notre étude démontre pour la première fois le rôle de BR3 dans la survie des CE en culture *in vitro*. Elle démontre en outre l'importance de certaines formes de BAFF dans les effets fonctionnels observés. De plus, l'expression de BR3 n'est pas liée au SGS car nous le détectons également chez les témoins.

Nous avons déjà observé que la majorité des kits ELISA, disponibles sur le marché, n'étaient pas en mesure de reconnaître l'ensemble des formes de BAFF présentes dans le sérum (Le Pottier et al., 2009). Nous avons observé que seuls certains anticorps polyclonaux pouvaient reconnaître les 2 formes à 28 et 21 kDa alors que l'anticorps monoclonal de souris ne reconnaissait que la forme glycosylée à 28kDa. L'importance de l'état de glycosylation a également été décrite par Shu et al. (1999) et Tribouley et al. (1999) qui observent différentes isoformes de BAFF ayant divers degrés de glycosylation. Ces auteurs envisageaient déjà des conséquences en termes d'oligomérisation et d'affinité de liaison aux récepteurs. Cependant, c'est la première fois qu'un rôle fonctionnel différent est décrit pour l'une des formes de BAFF. Une analyse plus fine des formes de BAFF fonctionnelles sera nécessaire pour mieux comprendre l'importance des modifications post-traductionnelles dans l'effet de survie que nous avons observé.

Il semble que la survie induite par BAFF *via* BR3 sur les CE permette de maintenir la PKC δ en dehors du noyau (Figure 3). Cette voie avait déjà été décrite dans les lymphocytes B (Mecklenbräuker et al., 2004) où le traitement des LB par BAFF empêchait la localisation nucléaire de la PKC δ . Cette PKC δ était déjà connue comme un agent intermédiaire commun à l'apoptose induite par différentes drogues dans la CE (Matassa et al., 2001). En effet, le transport de la PKC δ vers le noyau est nécessaire à l'induction de l'apoptose

des CE et, dans les conditions normales, une régulation active de la présence nucléaire de la PKC δ est indispensable à la survie (Reyland, 2007.)

Nos résultats permettent également de mieux comprendre nos précédentes observations sur l'apoptose induite par les lymphocytes B sur les CE en co-culture (Varin et al., 2010). Nous observons également une apoptose des CE associée à la translocation de la PKC δ dans le noyau des CE. Cette activation de la PKC δ était associée à la phosphorylation de l'histone H2B et au clivage de PARP. Il est donc probable que l'infiltrat des lymphocytes B qui exprime le récepteur BR3 entre en compétition avec la CE pour capter BAFF. Par conséquent l'apoptose induite par la présence des LB serait liée à un défaut de signalisation perçu par le récepteur BR3 présent au niveau de la CE entraînant l'activation de la PKC δ et sa localisation nucléaire.

Il est intéressant de noter que BR3 avait déjà été observé sur le CE des glandes mammaires lors du processus d'involution de ces glandes à la fin de la lactation (Jung et al., 2004). Cette phase est caractérisée par une apoptose massive des CE et un remodelage tissulaire (Strange et al., 1992). Cette régression post-lactéale est également accompagnée d'une réponse inflammatoire aiguë et les auteurs décrivent une augmentation de la production d'IFN- γ et de BAFF lors de ce phénomène. Cependant le rôle de BAFF et de BR3 n'a pas pu être démontré mais il est probable à la vue de nos résultats que l'expression transitoire de BAFF soit un moyen de régulation de l'apoptose massive subie par les CE lors de l'involution des glandes mammaires.

Enfin, nos résultats laissent présager des effets inattendus quant à l'utilisation, d'une immunothérapie anti-BAFF pour le traitement du SGS. En effet, outre le fait de priver les LB de ce facteur de survie, le traitement par un Ac anti-BAFF va également priver les CE en BAFF et ainsi favoriser leur

apoptose. Il sera donc indispensable d'évaluer les formes de BAFF reconnues par les Ac susceptibles d'être utilisés lors d'une immunothérapie anti-BAFF.

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1 - BAFF et BR3 sont exprimés par les cellules épithéliales (CE) "in vivo" et "in vitro". **A-** L'expression de BAFF a été évaluée par immunofluorescence indirecte (IFI) en microscopie confocale à l'aide d'un anticorps anti-BAFF de lapin sur des coupes issues de biopsies de patients atteints d'un syndrome de Gougerot-Sjögren (SGS) et de témoins. **B-** Par RT-PCR, l'expression des récepteurs de BAFF, BR3, TACI et BCMA a été évaluée sur des CE en culture provenant de biopsies de GS de malades (SGS) et de témoins. **C-** L'expression de BR3 (anticorps anti-BR3 couplé au RRX) est évalué par IFI dans les CE (marquage anti-CK18-FITC) et les LB (marquage anti-CD20-RRX) dans des biopsies de GS de SGS et de témoins. **D-** L'expression de BAFF et de ses récepteurs BR3, TACI et BCMA est évaluée par FACS et par IFI sur les cellules de la lignée épithéliale HSG.

Figure 2 - Le blocage de BR3 favorise l'apoptose des cellules épithéliales (CE) en culture. Les CE de la lignée HSG sont incubées avec différentes doses de BAFF recombinant (rhBAFF) ou d'anticorps anti-BR3 bloquant (anti-BR3). La prolifération est analysée par immunofluorescence indirecte à l'aide du marquage Ki-67. **A-** L'apoptose est mesurée par la technique Tunel (marquage vert) et l'iodure de propidium (marquage rouge). L'étoposide est utilisé comme inducteur de l'apoptose. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type de 6 expériences différentes.

Figure 3 - Le blocage de BR3 induit la translocation nucléaire de la PKC δ dans la cellule épithéliale (CE). Les CE de la lignée HSG sont incubées avec des doses croissantes d'anticorps anti-BR3 bloquant (anti-BR3) et la localisation de la PKC δ est observée par immunofluorescence indirecte en cytométrie confocale à l'aide d'un marquage par un anticorps anti- PKC δ couplé à la FITC. Les noyaux sont marqués en rouge par l'iodure de propidium (IP).

Figure 4 - Seules certaines formes de BAFF participent à la survie des cellules épithéliales (CE) en culture. **A-** L'importance de la présence de BR3 pour la survie des CE est confirmée par l'inhibition de BR3 à l'aide d'un ARN inhibiteur spécifique de BR3 (siBR3). La survie des CE est évaluée à 24h, 48h et 72h après la transfection par siBR3. Les CE non transfectées ou transfectées par un siARN contrôle sont utilisées comme témoins (moyenne \pm écart-type de 6 expériences différentes). **B-** Les CE de témoins sont incubées 24 heures en présence de différents anticorps (Ac) anti-BAFF (Ac anti-BAFF de lapin et Ac anti-BAFF de souris, clone 137314) et la survie évaluée par FACS après marquage à l'annexin V FITC et à l'iodure de propidium. Des immunoglobulines de lapin et de souris sont utilisées comme contrôle (moyenne \pm écart-type correspondants à 6 témoins différents). **C-** Le surnageant des CE est analysé par Western-Blot après migration sur SDS-PAGE et révélé par les différents Ac anti-BAFF.

RÉFÉRENCES

- Claudio E, Brown K, Park S, Wang H, Siebenlist U. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat Immunol.* 2002;3(10):958-65.
- Daridon C, Devauchelle V, Hutin P, Le Berre R, Martins-Carvalho C, Bendaoud B, Dueymes M, Saraux A, Youinou P, Pers JO. Aberrant expression of BAFF by B lymphocytes infiltrating the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2007;56(4):1134-44.
- Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell.* 1994;76(2):287-99.
- Giroux M, Schmidt M, Descoteaux A. IFN-gamma-induced MHC class II expression: transactivation of class II transactivator promoter IV by IFN regulatory factor-1 is regulated by protein kinase C-alpha. *J Immunol.* 2003;171(8):4187-94. Erratum in: *J Immunol.* 2003;171(11):6297.
- Gorelik L, Gilbride K, Dobles M, Kalled SL, Zandman D, Scott ML. Normal B cell homeostasis requires B cell activation factor production by radiation-resistant cells. *J Exp Med.* 2003;198(6):937-45.
- Hase H, Kanno Y, Kojima M, Hasegawa K, Sakurai D, Kojima H, Tsuchiya N, Tokunaga K, Masawa N, Azuma M, Okumura K, Kobata T. BAFF/BLyS can potentiate B-cell selection with the B-cell coreceptor complex. *Blood.* 2004 103(6):2257-65.
- Hayashi Y, Arakaki R, Ishimaru N. Salivary gland and autoimmunity. *J Med Invest.* 2009;56 Suppl:185-91.

- Huard B, Arlettaz L, Ambrose C, Kindler V, Mauri D, Roosnek E, Tschopp J, Schneider P, French LE. BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation. *Int Immunol.* 2004;16(3):467-75.
- Jung DJ, Bong JJ, Baik M. Extracellular proteinase inhibitor-accelerated apoptosis is associated with B cell activating factor in mammary epithelial cells. *Exp Cell Res.* 2004;292(1):115-22.
- Kern C, Cornuel JF, Billard C, Tang R, Rouillard D, Stenou V, Defrance T, Ajchenbaum-Cymbalista F, Simonin PY, Feldblum S, Kolb JP. Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood.* 2004;103(2):679-88.
- Krumbholz M, Theil D, Derfuss T, Rosenwald A, Schrader F, Monoranu CM, Kalled SL, Hess DM, Serafini B, Aloisi F, Wekerle H, Hohlfeld R, Meinl E. BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *J Exp Med.* 2005;201(2):195-200.
- Laâbi Y, Gras MP, Carbonnel F, Brouet JC, Berger R, Larsen CJ, Tsapis A. A new gene, BCM, on chromosome 16 is fused to the interleukin 2 gene by a t(4;16)(q26;p13) translocation in a malignant T cell lymphoma. *EMBO J.* 1992;11(11):3897-904.
- Le Pottier L, Bendaoud B, Renaudineau Y, Youinou P, Pers JO, Daridon C. New ELISA for B cell-activating factor. *Clin Chem.* 2009;55(10):1843-51.
- Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, Cerutti A. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat Immunol.* 2002;3(9):822-9.
- Manoussakis MN, Kapsogeorgou EK. The role of epithelial cells in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2007;32(3):225-30.

- Matassa AA, Carpenter L, Biden TJ, Humphries MJ, Reyland ME. PKCdelta is required for mitochondrial-dependent apoptosis in salivary epithelial cells. *J Biol Chem.* 2001;276(32):29719-28.
- Mecklenbräuer I, Kalled SL, Leitges M, Mackay F, Tarakhovsky A. Regulation of B-cell survival by BAFF-dependent PKCdelta-mediated nuclear signalling. *Nature.* 2004;431(7007):456-61.
- Moore PA, Belvedere O, Orr A, Pieri K, LaFleur DW, Feng P, Soppet D, Charters M, Gentz R, Parmelee D, Li Y, Galperina O, Giri J, Roschke V, Nardelli B, Carrell J, Sosnovtseva S, Greenfield W, Ruben SM, Olsen HS, Fikes J, Hilbert DM. BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science.* 1999;285(5425):260-3.
- Moreaux J, Legouffe E, Jourdan E, Quittet P, Rème T, Lugagne C, Moine P, Rossi JF, Klein B, Tarte K. BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone. *Blood.* 2004; 103(8):3148-57.
- Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, Moore PA, Olsen HS, Migone TS, Sosnovtseva S, Carrell JA, Feng P, Giri JG, Hilbert DM. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood.* 2001;97(1):198-204.
- Pers JO, Daridon C, Devauchelle V, Jousse S, Saraux A, Jamin C, Youinou P. BAFF overexpression is associated with autoantibody production in autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1050:34-9.
- Reyland ME. Protein kinase Cdelta and apoptosis. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(Pt 5):1001-4.
- Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, Ambrose C, Lawton P, Bixler S, Acha-Orbea H, Valmori D, Romero P, Werner-Favre C, Zubler RH, Browning JL, Tschopp J. BAFF, a novel ligand

of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med.* 1999;189(11):1747-56.

- Shu HB, Hu WH, Johnson H. TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens. *J Leukoc Biol.* 1999;65(5):680-3.
- Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Autoimmune epitheliitis: Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol.* 1994;12 Suppl 11:S9-11.
- Strange R, Li F, Saurer S, Burkhardt A, Friis RR. Apoptotic cell death and tissue remodelling during mouse mammary gland involution. *Development.* 1992;115(1):49-58.
- Thompson JS, Bixler SA, Qian F, Vora K, Scott ML, Cachero TG, Hession C, Schneider P, Sizing ID, Mullen C, Strauch K, Zafari M, Benjamin CD, Tschopp J, Browning JL, Ambrose C. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science.* 2001;293(5537):2108-11.
- Tribouley C, Wallroth M, Chan V, Paliard X, Fang E, Lamson G, Pot D, Escobedo J, Williams LT. Characterization of a new member of the TNF family expressed on antigen presenting cells. *Biol Chem.* 1999;380(12):1443-7.
- Varin MM, Le Pottier L, Youinou P, Saulep D, Mackay F, Pers JO. B-cell tolerance breakdown in Sjögren's syndrome: focus on BAFF. *Autoimmun Rev.* 2010;9(9):604-8.
- Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, Daniels TE, Fox PC, Fox RI, Kassan SS, Pillemer SR, Talal N, Weisman MH; 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(6):554-8.

- von Bülow GU, Bram RJ. NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Science.* 1997;278(5335):138-41.
- Yan M, Brady JR, Chan B, Lee WP, Hsu B, Harless S, Cancro M, Grewal IS, Dixit VM. Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency. *Curr Biol.* 2001;11(19):1547-52.

Figure 1

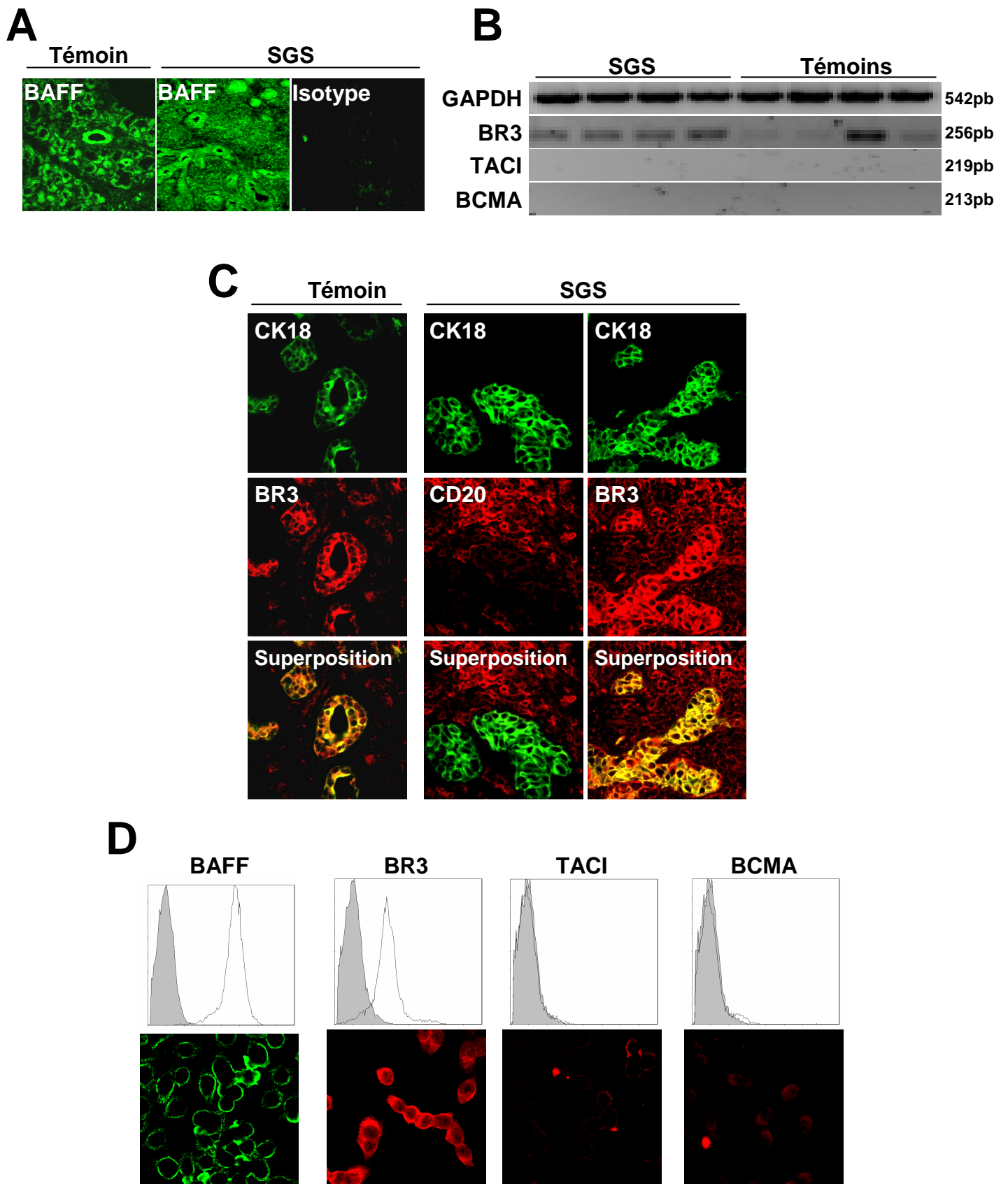


Figure 2

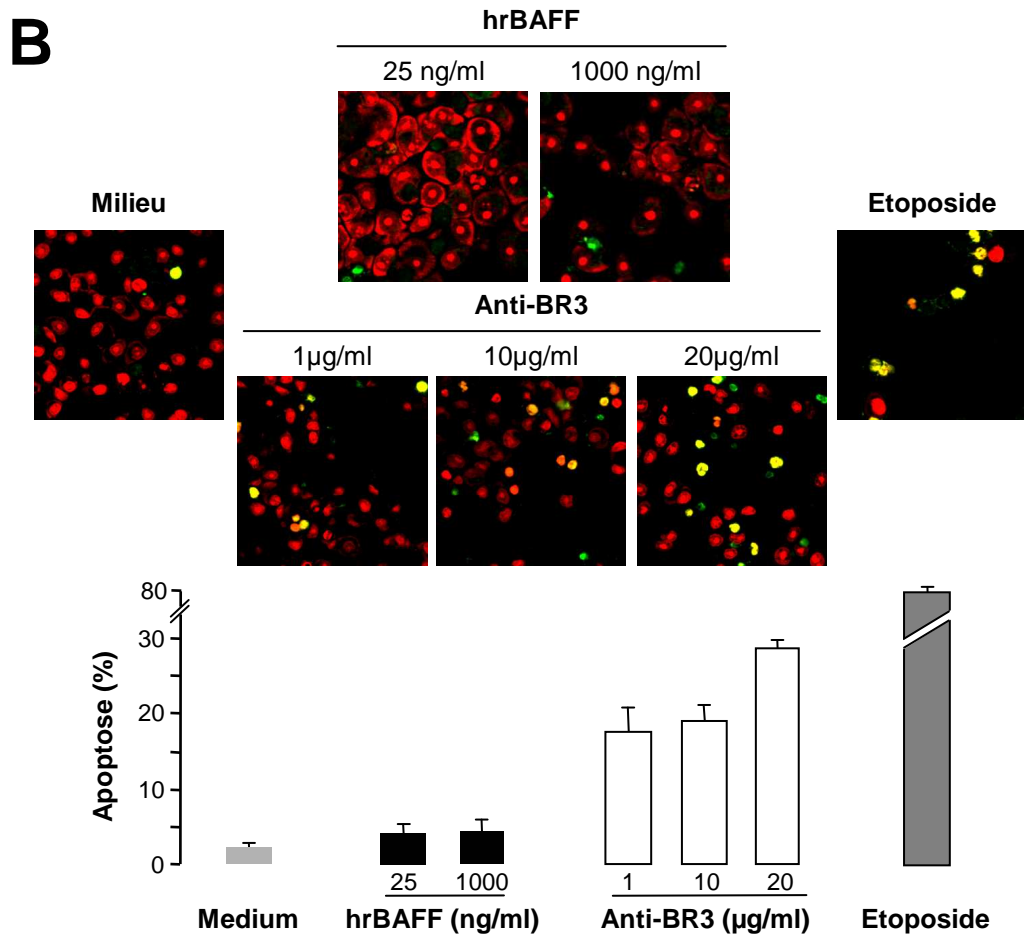
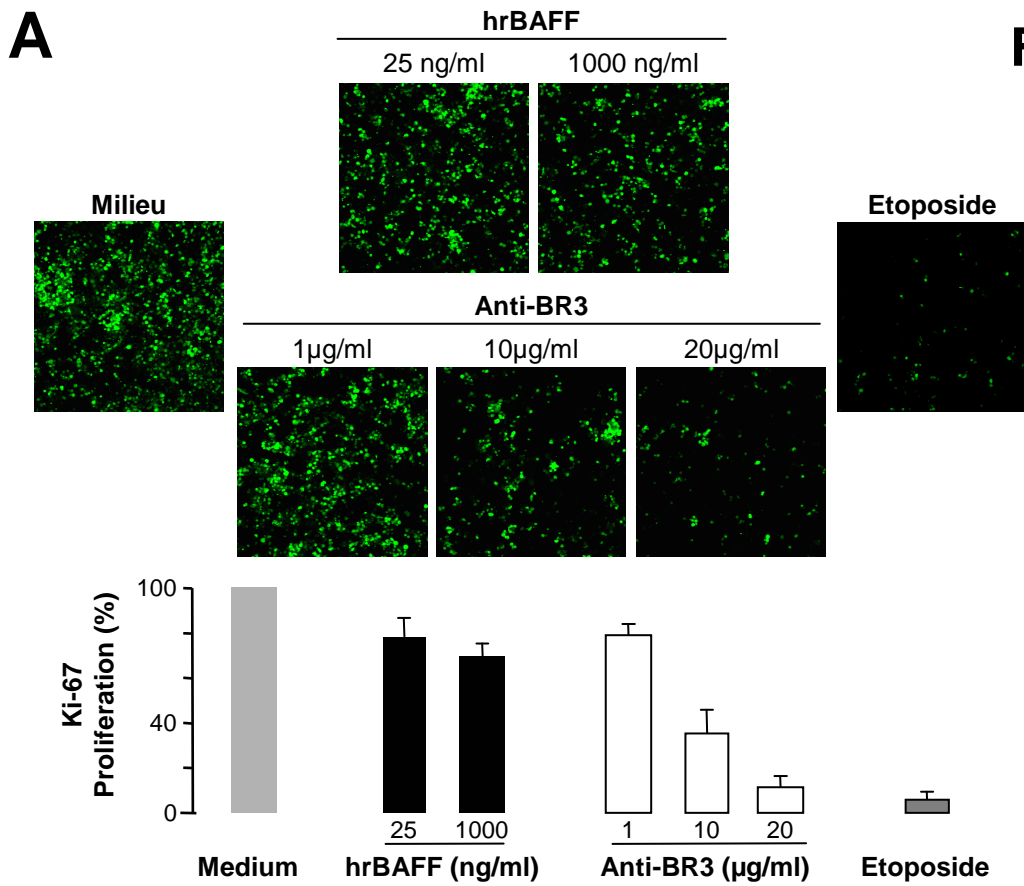


Figure 3

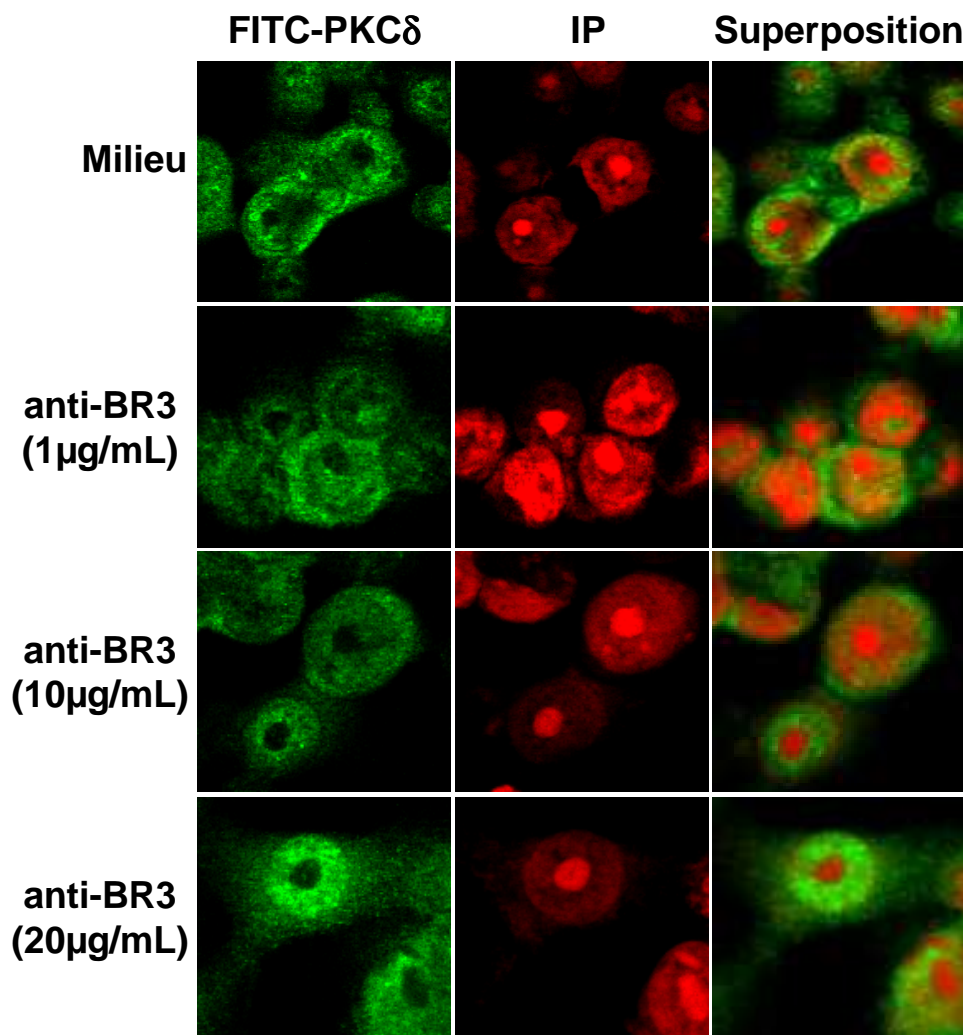
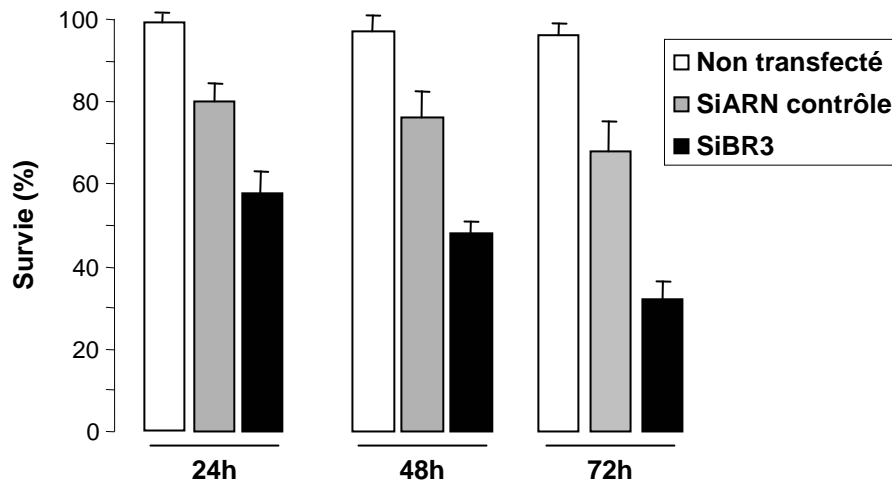
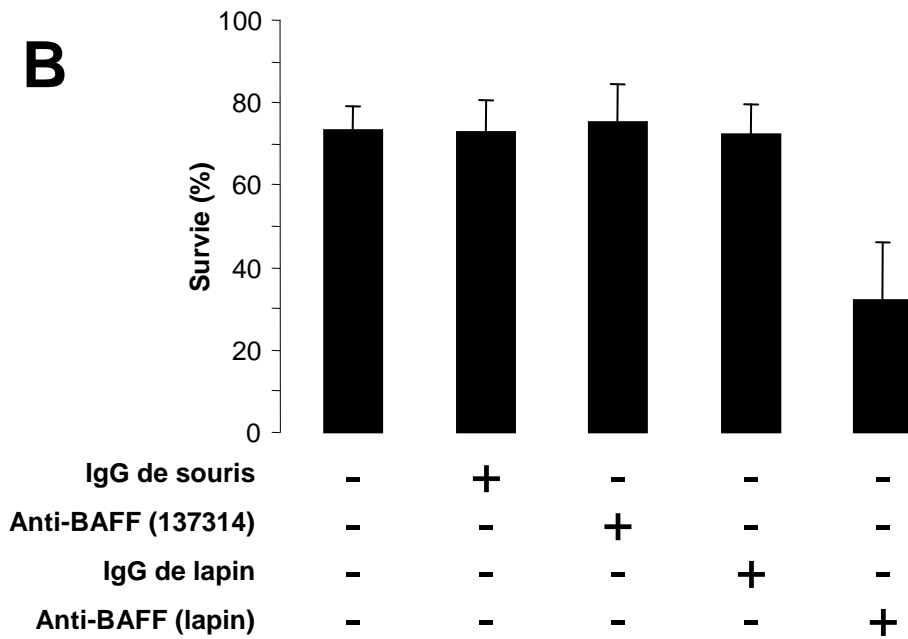


Figure 4

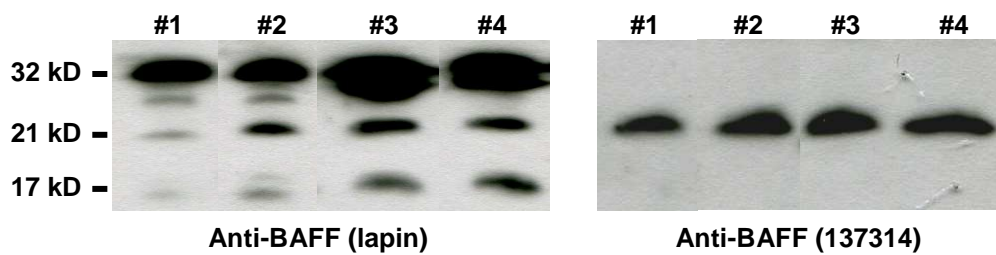
A



B



C



DISCUSSION

Notre étude s'est intéressée à différents phénomènes initiant ou amplifiant le SGS, aboutissant à la destruction de l'épithélium glandulaire et à la perte de fonction sécrétoire caractéristique du SGS. Cette étude s'est donc portée sur des mécanismes épigénétiques et sur le rôle des lymphocytes sur la destruction des CE constituant l'épithélium glandulaire.

Nous avons dans un premier temps montré que dans les GS des patients, les éléments rétroviraux et les miARN ont un profil d'expression distinct de celui des personnes saines, montrant ainsi l'implication de l'épigénétique dans la pathologie **(Article 2)**.

Dans un deuxième temps, nous avons montré que les CE entrent en apoptose suite à l'interaction des lymphocytes B et T, mais que deux voies de signalisation différentes sont impliquées **(Article 3)**. La voie Fas semble privilégiée par les LT, tandis que la voie de la PKC δ semble privilégiée par les LB. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux LB car ils semblent plus efficaces pour induire la mort des CE dans notre modèle d'étude.

Le mode d'induction de la signalisation apoptotique par les LB n'a pas été formellement identifié, mais dans une troisième partie, nous avons tout de même porté notre attention sur la molécule BAFF puisqu'elle est produite par les LB mais aussi par les CE qui expriment également l'un de ses récepteurs, BR3 **(Article 4)**. Nous avons étudié l'effet de BAFF sur les CE. Nous avons démontré que BAFF est impliqué dans la survie de ces cellules, et que le blocage de sa signalisation ou la sous-expression de son récepteur conduit à la mort des cellules.

Nous avons émis comme hypothèse que l'interaction des LB et des CE conduit à l'apoptose de ces dernières par privation de la signalisation de survie par BAFF. En effet, les LB exprimant aussi BR3 à leur surface, nous pouvons penser qu'ils peuvent capter BAFF en co-culture, le rendant moins disponible pour les CE, qui meurent.

Finalement, nous avons montré que plusieurs formes de BAFF sont exprimées par les cellules et reconnues de manière différentielle par les anticorps. Il pourrait s'agir d'isoformes plus ou moins glycosylés ou de variants. Cependant d'autres études sont nécessaires afin de pouvoir les identifier.

De part leur rôle important dans la régulation de l'expression des gènes, les miARN contrôlent étroitement le développement des cellules immunitaires et les fonctions immunes normales. Ils pourraient également jouer un rôle important dans le développement de l'auto-immunité. Dans notre étude, miR155 et miR181a sont surexprimés chez les patients atteints de SGS. MiR155 est connu pour réguler les réponses immunes innées et adaptatives, la réponse du centre germinatif, le switch de classe des IgG en tant normal, tandis que miR181a joue un rôle dans le développement des LB et la signalisation du TCR (revue par Pauley et al, 2009).

La dérégulation de ces miARN peut avoir des incidences sur le développement et la fonction des cellules immunitaires ainsi que sur les réponses immunes. Cela peut donc conduire à l'auto-immunité.

Plusieurs études se sont portées sur la relation existante entre les miARN et les MAI, comme le SGS. L'équipe d'Alevizos a démontré en 2009 que l'analyse du profil des miARN permettait de distinguer des personnes saines des personnes souffrant de SGS, et pouvait même permettre de distinguer des patients entre eux, selon l'importance de l'infiltration des GS.

Même si des études complémentaires sont nécessaires, les miARN pourraient donc servir de biomarqueurs dans le SGS, dans le but peut-être de remplacer la BGS par des méthodes moins invasives pour poser le diagnostic de la maladie. Dans ce sens l'équipe de Michael (2010) a montré qu'il est possible d'étudier des miARN isolés à partir des exosomes présents dans la salive et que là aussi, le profil d'expression est différent entre les patients et les personnes saines. Malgré les cibles multiples de

chaque miARN et la complexité des voies de signalisation impliquées, des études complémentaires sur les effets de la dérégulation des miARN et l'étude des facteurs modulant leur expression pourraient permettre de mieux comprendre leur rôle dans la régulation des mécanismes inflammatoires conduisant à la pathologie du SGS.

Par ailleurs, du fait qu'un même miARN peut être impliqué dans différentes MAI, comme le SGS et la PR pour miR155 (revue Furer et al, 2010), l'étude de ces miARN pourrait permettre de s'intéresser à d'autres MAI dont ils peuvent être les biomarqueurs.

Les HERV peuvent s'intégrer n'importe où dans le génome et peuvent ainsi altérer l'expression et la fonction d'autres gènes. En réponse à différents signaux externes et internes, ils sont induits de manière tissu-spécifique et temps-dépendant.

Comme certains de ces facteurs sont associés au développement de MAI, cela suggère que les HERV peuvent être directement impliqués dans le développement de ces maladies, ou être activés au cours de ces maladies induite par ces signaux. Parmi ces facteurs se trouvent les agents mitogènes, les microorganismes, l'environnement (irradiation X et UV, hypoxie), certaines cytokines (TNF α , IFN β , IL-1), les hormones stéroïdes, les agents cytotoxiques, certaines vitamines (revue par Balada et al, 2009).

Plusieurs auteurs ont mis en évidence la relation entre les HERV et les MAI.

Parmi les HERV étudiés dans l'article 2, HERV 4.1 a fait l'objet de plusieurs études, surtout dans le LED. Ainsi, Piotrowski et al (2005) montrent que dans le LED, les HERV agissent par mécanisme de chimérisme moléculaire et que l'expression de HERV 4.1 est associée avec la production d'auto-anticorps anti-Sm et anti-ribonucléoprotéine U1 (RNP U1). Par ailleurs Hishikawa et al (1997) montrent que 48% des patients atteints de LED et 35% des patients souffrant de SGS possèdent

des anticorps reconnaissant la protéine p30 Gag dérivée du clone 4.1 de l'HERV. Les HERV sont donc activés dans la pathologie du SGS.

Dans d'autres MAI, comme le LED, la PR ou la sclérose en plaque (SEP), l'activation des HERV peut être déclenchée par l'infection virale par l'EBV (revue par Dreyfus, 2011). Les lymphocytes, les CE et probablement les macrophages peuvent être le site de la persistance virale. Le virus se réplique et peut entraîner une transformation maligne (Epstein MA, 2001).

Dans la SEP, la plupart des LB infiltrant le cerveau sont infectés par l'EBV. Serafini et al (2010) montrent que ce virus pourrait jouer un rôle dans l'activation de ces cellules, au même titre que BAFF, retrouvé produit par les LB au niveau des lésions et des follicules ectopiques. Cette activation pourrait favoriser la persistance virale et probablement participer à la rupture de la tolérance B dans le cerveau.

Comme les CE et les lymphocytes infiltrant les GS des patients atteints de SGS peuvent également héberger l'EBV (Wen et al, 1996), on peut émettre comme hypothèse que ce virus pourrait être impliqué dans l'activation des HERV dans cette pathologie, et pourrait de plus activer les LB et les LT dans la glande et participer à sa destruction.

Nous avons démontré que les LB induisent la mort des CE en culture par contact direct. Sachant que ces CE possèdent BR3 et que les LB expriment BAFF, on peut penser que l'interaction entre ces deux cellules passe par l'interaction entre BAFF et son récepteur.

La mort des CE co-cultivées avec les LB peut ainsi s'expliquer par le fait que le BAFF produit par les CE ou les LB n'est plus assez disponible pour les CE car il est aussi capté par les LB. Cette privation de signal de survie pourrait déclencher l'apoptose au niveau des CE. Ce résultat est confirmé par l'utilisation d'un anticorps

anti-BR3 bloquant et par transfection des CE par un siRNA spécifique de BR3. Le blocage ou la délétion de ce récepteur diminuent la prolifération et induisent l'apoptose PKC δ -dépendante des cellules. Ainsi, malgré la présence prédominante des LT parmi les cellules infiltrant la GS, les LB pourraient contribuer de manière directe à la mort de CE et la destruction de l'épithélium glandulaire au cours du SGS, notamment en activant la voie PKC δ dans ces CE.

Actuellement, des thérapies ciblant les LB, comme le Rituximab (anti-CD20), sont utilisées dans le traitement du SGS pour dépléter ces cellules et ainsi réduire l'auto-immunité. Des essais cliniques avec des anticorps anti-BAFF sont envisagés, du fait de l'importance de BAFF dans la dérégulation des LB dans cette pathologie.

On peut néanmoins se demander si ces thérapies n'atteindront pas aussi les CE puisque celles-ci sont dépendantes de BAFF pour leur survie. Ce défaut de signalisation par BAFF pourrait fragiliser l'épithélium et de ce fait diminuer la fonction sécrétoire de la glande.

Par ailleurs, nous avons trouvé que différentes formes de BAFF sont produites par les cellules et sont retrouvées également dans le surnageant de culture. Nous avons démontré que toutes les formes sériques de BAFF ne sont pas reconnues par les kits ELISA existant sur le marché (Le Pottier et al, 2009a). En effet, nous avons mis en évidence l'existence de formes plus ou moins glycosylées de BAFF, reconnues de manière différentielle par plusieurs anticorps. La glycosylation semble altérer la reconnaissance de l'épitope par les anticorps anti-BAFF. Cela pourrait expliquer pourquoi les concentrations sériques de BAFF varient selon les études, pour une population donnée de patients. Par ailleurs, nous avons essayé de rétablir la survie des CE en co-culture avec les LB, en abolissant la compétition supposée pour BAFF entre les deux types cellulaires. Pour cela, nous avons incubé les CE en co-culture, en présence de quantités croissantes de BAFF recombinant humain. Cependant, même avec de grandes concentrations de BAFF recombinant humain, cela n'a pas

permis de rétablir la survie des CE. Ce résultat pourrait s'expliquer par la forme du BAFF recombinant ou par un autre mécanisme (data not shown).

Toutes les formes de BAFF n'ont pas encore été identifiées. Le fait que les anticorps utilisés dans notre étude ne reconnaissent pas les mêmes formes de BAFF et n'induisent pas tous la mort des CE en culture, nous pouvons penser que seules certaines formes de BAFF interagissent de manière efficace avec BR3 exprimé à la surface des CE et sont impliquées dans la signalisation de survie. Par ailleurs, un nouveau variant de BAFF, $\Delta 4$ BAFF a été identifié (Le Pottier et al, manuscrit soumis). Ce variant, qui agit comme facteur de transcription de la forme classique de BAFF pourrait également être exprimé par les cellules en culture, et modifier l'expression du BAFF classique, modulant par là son expression et/ou sa fonction.

Passant de l'échelle biologique à celle de la population, nous pouvons supposer qu'au niveau qualitatif, les profils d'expression de BAFF sont différents entre les individus. Cela pourrait expliquer la divergence des réponses aux traitements ciblant BAFF dans les MAI.

Trois antagonistes de BAFF sont en cours de développement clinique, à différents stades. Ils empêchent l'interaction entre BAFF et ses récepteurs. On trouve parmi eux un anticorps monoclonal anti-BAFF (Belimumab ou Lymphostat B, Baker et al, 2003) et une protéine de fusion consistant en la partie Fc d'une Ig humaine et la partie extracellulaire de BR3 (Briobacept, ou BR3-Ig). Enfin, une protéine de fusion entre la partie extracellulaire de TACI et la partie Fc d'une Ig humaine (Atacicept, TACI-Ig) permet de neutraliser BAFF et APRIL (Seshasayee et al, 2003).

Le taux sérique BAFF étant augmenté dans la PR, et BAFF et APRIL étant retrouvés dans la synoviale de polyarthrite, les premiers essais cliniques pour inhiber BAFF ont été réalisés dans la PR (Seyler et al, 2005). Des patients ont été traités avec l'Atacicept. Les résultats se sont montrés modestes (Tak et al, 2008) en comparaison avec ceux obtenus chez la souris. En effet, chez la souris modèle de l'arthrite induite par le collagène, le ciblage local de BAFF inhibe l'expression de cytokines pro-

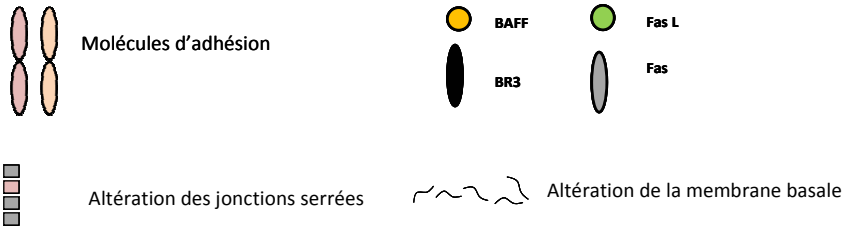
inflammatoires, altère la fonction des cellules dendritiques, supprime la génération des cellules plasmiques et des LT Th17 et améliore de manière significative la pathologie articulaire (Lai Kwan Lam et al, 2008). Le traitement n'améliore pas la maladie de manière significative chez l'homme. Atacicept a aussi été testé chez des patients atteints de LED (Dall'Era, 2007).

Des essais cliniques ont été réalisés sur des patients atteints de PR ou de LED (Furie et al, 2008) avec Belimumab. Dans le LED, ce traitement sûr et bien toléré induit la diminution de la production d'auto-anticorps, mais les études n'ont pas montré d'efficacité clinique significative après plusieurs semaines de traitement (Navarra et al, 2011). Des différences dans la distribution des formes de BAFF pourrait expliquer l'hétérogénéité des réponses des thérapies anti-BAFF des patients dans le LED.

Ainsi, il serait intéressant d'effectuer des études complémentaires pour mieux analyser les formes structurales de BAFF et leurs fonctions, dans le but d'identifier les formes les plus susceptibles d'être ciblées par immunothérapie anti-BAFF dans le traitement des MAI et d'améliorer l'efficacité du traitement.

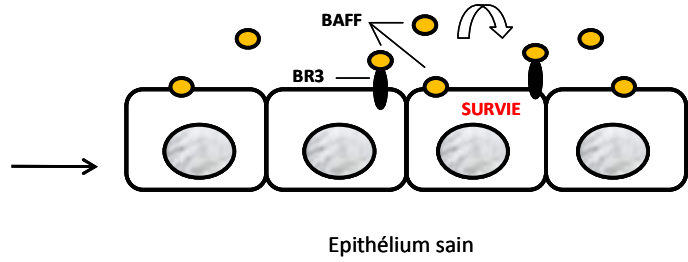
En conclusion, cette étude a montré que BAFF interagit avec son récepteur BR3 pour induire une signalisation de survie aux CE. Différentes formes de BAFF pourraient être impliquées dans cette signalisation. Par ailleurs, l'épigénétique et l'interaction directe des LB sont impliqués dans la mort des CE et par extension, dans la destruction de l'épithélium glandulaire au cours du SGS. L'interaction des LB induit l'apoptose des CE, principalement en activant la voie PKC δ dans ces cellules.

Figure 19 : Schéma général : Principaux mécanismes aboutissant à l'apoptose des CE et à la destruction de l'épithélium dans le SGS.

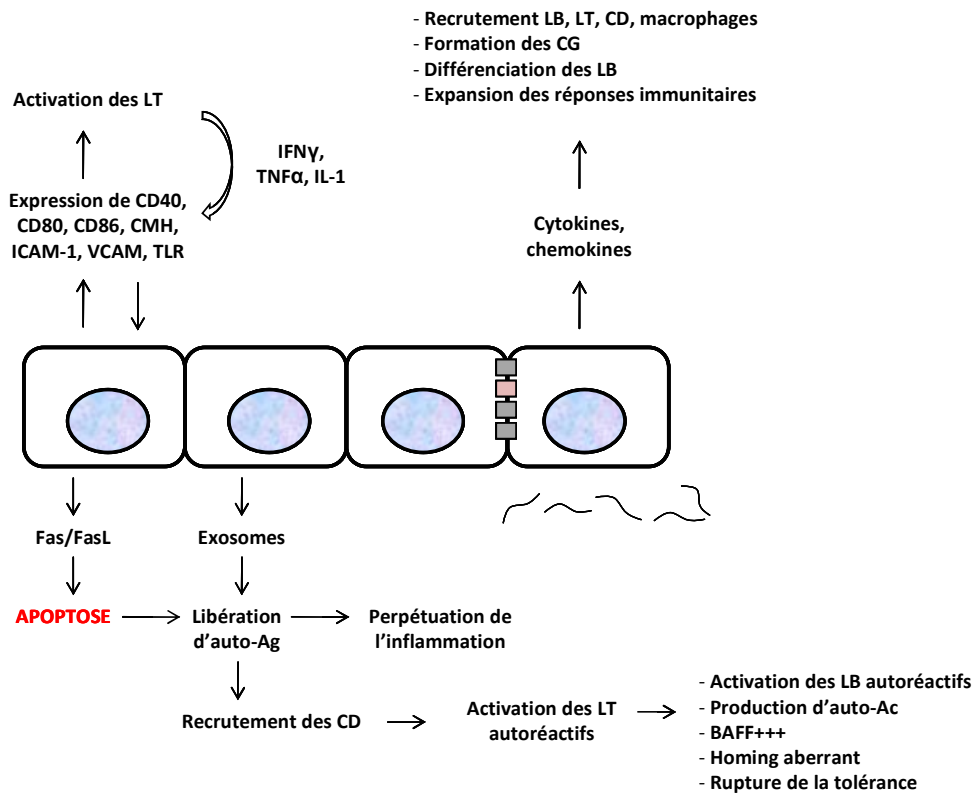


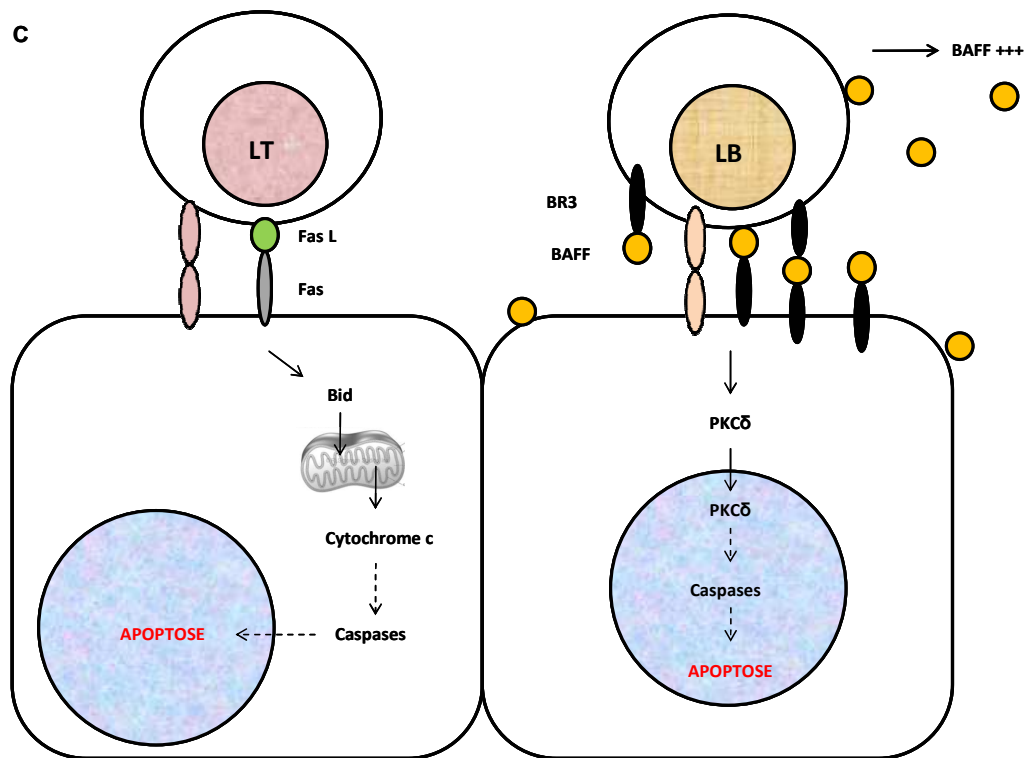
A

Épigénétique (HERV, miARN)
Généétisme
Hormones
Microchimérisme
Virus
Stress



B





Légende : (A) Différents facteurs agissent sur l'épithélium sain et favorisent son altération. (B) Les CE expriment CD40, des molécules du TLR, des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM), ainsi que des molécules de co-stimulation (CD80, CD86) et présentent l'antigène à des LT via le CMH, ce qui permet de les activer. Ces LT vont produire des cytokines comme IL-1, TNF α , IFN γ , ce dernier régulant de manière positive l'expression de CD40, de CMH et de Fas à la surface des CE. Cela participe à l'apoptose des CE et à la libération d'auto-antigènes (auto-Ag). De plus, les CE sont capables de produire des cytokines et des chemokines qui vont recruter les cellules immunitaires, dont les CD, également attirées par l'IFN γ , activant des LT et LB auto-réactifs. Cela va conduire à la production d'auto-Ac, à la surexpression de BAFF, au homing aberrant des lymphocytes, à la rupture de la tolérance et à l'expansion des réponses immunitaires. (C) L'interaction entre les LT et les CE conduit à l'apoptose des CE via la voie Fas. Les LB et les CE expriment BAFF et BR3. Il peut y avoir interaction entre BAFF soluble, BAFF membranaire et BR3. L'interaction entre les CE et les LB conduit à l'apoptose des CE via la voie PKC δ .

ANNEXES

Annexe 1 : Henri Gougerot et Henrik Sjögren, deux hommes pour une pathologie

Henri Gougerot (1881-1955)



Dermatologiste français diplômé d'un doctorat de médecine de l'université de Paris en 1908, il devient professeur agrégé de la faculté de médecine deux ans plus tard. Il est connu pour son travail sur les désordres immunologiques et particulièrement les mycoses. En 1909, il est le premier à décrire l'hémisporose avec De Beurmann. En 1925, il décrit trois cas particuliers d'atrophie des GS accompagnée de sécheresse oculaire, buccale et vaginale. La pathologie prend alors le nom de « syndrome de Gougerot ». En 1928, il devient chef de service à l'hôpital Saint-Louis, titulaire de la chaire de dermatologie et de clinique des maladies syphilitiques. Directeur des « Annales des maladies vénériennes », co-fondateur de la « Prophylaxie sanitaire et morale », il est l'un des directeurs de la Nouvelle Pratique Dermatologique, un

ouvrage collectif de huit volumes de l'école française de dermatologie, publié en 1936. Gougerot est surtout connu à travers ses travaux de recherche sur les maladies fongiques, dont les études fondamentales sur les sporotrichoses. Il possède à son actif plus de 2500 publications.

Henrik Sjögren (1899-1986)



Ophthalmologiste suédois diplômé en 1927 à Stockholm, il rencontre un patient se plaignant de sécheresse buccale et oculaire et de douleurs articulaires en 1929. Chacun de ces symptômes sont déjà bien connus, mais c'est leur association qui l'interpelle. En 1933, il défend sa thèse doctorale intitulée « Zur Kenntniss der Keratoconjunctivitis sicca » (A la rencontre de la kératoconjonctivite sèche), dans laquelle il présente 19 cas de kératoconjonctive sèche. Malgré l'enthousiasme de ses pairs, il ne reçoit qu'une note médiocre pour son travail, lui fermant les portes d'une

carrière académique. En 1943, sa thèse est traduite de l'allemand à l'anglais par un ophtalmologiste australien. Sjögren reprend ses travaux et présente ses résultats lors de plusieurs colloques internationaux. La maladie prend le nom de « maladie de Gougerot-Sjögren », souvent réduit à « maladie de Sjögren ». Il devient professeur honorifique à l'université de Göteborg en 1961, membre de la Société Rhumatologique Suédoise en 1976 et participe au premier colloque international sur le syndrome de Gougerot-Sjögren.

Annexe 2 : Critères de classification du groupe consensus américano-européen pour le syndrome de Gougerot-Sjögren (Vitali et al, 2002)

1. Symptômes oculaires

Au moins un des critères suivants :

- 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 critères suivants :

- Sensation quotidienne de bouche sèche depuis plus de 3 mois
- A 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

Révélés par le test de Shirmer (une bandelette buvard dont l'imprégnation par les larmes est inférieure à 5 mm en 5 minutes)

4. Signes histologiques

Une biopsie des GS GS accessoires montrant une infiltration lymphoplasmocytaire des glandes exocrines. L'étendue de cet infiltrat est déterminée par la classification

de Chisholm et Mason. Les GS des patients atteints d'un SGS présentent un ou plusieurs foyers, ce qui correspond aux grades 3 et 4 d'après cette classification.

5. Signes objectifs d'atteinte salivaire

Au moins un des tests ci-dessous positif :

- Scintigraphie salivaire
- Sialographie parotienne
- Flux salivaire sans stimulation $\leq 1,5$ ml/15 min (0,1 ml/min)

6. Auto-anticorps

Présence d'auto-anticorps anti-Ro/SSA et/ou anti-La/SSB.

Le diagnostic du SGS primaire est posé si au moins quatre des six critères sont remplis avec la présence obligatoire de l'item 4 (infiltrat dans les GS) ou de l'item 6 (présence d'auto-anticorps). Le diagnostic de SGS secondaire est posé devant la présence de l'item 1 ou 2, associé à deux des items 3, 4 ou 5.

Il existe des critères d'exclusion :

- Antécédents d'irradiation cervicale
- Infection par le VHC ou le VIH
- Lymphome pré-existant
- Sarcoïdose
- Réaction du greffon contre l'hôte
- Utilisation de médicaments anticholinergiques

BIBLIOGRAPHIE

Abu-Helu RF, Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Induction of salivary gland epithelial cell injury in Sjögren's syndrome: in vitro assessment of T cell-derived cytokines and Fas protein expression. *J Autoimm* 17(2): 141-153, **2001**.

Agarwal P. Immunopathogenesis of Sjögren's syndrome. *J Indian Rheumatol Assoc* 11: 71-75, **2003**, revue.

Alevizos I, Bajracharya SD, Alexander S, Turner RJ, Illei GG. MicroRNA profiling of minor salivary glands identifies disease and inflammation biomarkers in Sjögren's syndrome patients. *Arthritis Rheum* 60(10): S733, **2009**.

Alevizos I, Illei GG. MicroRNAs in Sjogren's syndrome as a prototypic autoimmune disease. *Autoimmun Rev.* 9(9): 618–621, **2010**.

Alexaki VI, Notas G, Pelekanou V, Kampa M, Valkanou M, Theodoropoulos P, Stathopoulos EN, Tsapis A, Castanas E. Adipocytes as immune cells: differential expression of TWEAK, BAFF and APRIL and their receptors (Fn14, BAFF-R, TACI and BCMA) at different stages of normal and pathological adipose tissue development. *The Journal of Immunology*, 183(9): 5948-5956, **2009**.

Amft N, Curnow SJ, Scheel-Toellner D, Devadas A, Oates J, Crocker J, Hamburger J, Ainsworth J, Mathews J, Salmon M, Bowman SJ, Buckley CD. Ectopic expression of the B cell-attracting chemokine BCA-1 (CXCL13) on endothelial cells and within lymphoid follicles contributes to the establishment of germinal center-like structures in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 44(11): 2633-2641, **2001**.

Anaya JM, Correa PA, Herrera M, Eskdale J, Gallagher G. Interleukin 10 (IL-10) influences autoimmune response in primary Sjögren's syndrome and is linked to IL-10 gene polymorphism. *J Rheumatol* 29(9): 1874-1876, **2002a**.

Anaya JM, Correa PA, Mantilla RD, Arcos-Burgos M. TAP, HLA-DQB1 and HLA-DRB1 polymorphism in Colombian patients with primary Sjögren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 31(6): 396-405, **2002b**.

Anaya JM, Delgado-Vega AM, Castiblanco J. Genetic basis of Sjögren's syndrome. How strong is the evidence? *Clin Dev Immunol*, 13(2-4): 209-222, **2006a**, revue.

Anaya JM, Gomez L, Castiblanco J. Is there a common genetic basis for autoimmune diseases? *Clin Dev Immunol* 13 (2-4): 185-195, **2006b**, revue.

Anaya JM, Mantilla RD, Correa PA. Immunogenetics of primary Sjogren's syndrome in Colombians. *Semin Arthritis Rheum* 34(5): 735-743, **2005**.

Aractingi S, Sibilia J, Meignin V, Launay D, Hachulla E, Le Danff C, Janin A, Mariette X. Presence of microchimerism in labial salivary glands in systemic sclerosis but not in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 46(4): 1039-1043, **2002**.

Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, Ambrose C, Bixler SA, Thien M, Brink R, Mackay F, Hodgkin PD, Tangye SG. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest* 112(2): 286-297, **2003**.

B

Bahamondes V, Albornoz A, Aguilera S, Alliende C, Molina C, Castro I, Urzua U, Quest AF, Barrera MJ, Gonzalez S, Sanchez M, Hartel S, Hermoso M, Leyton C, Gonzalez MJ. Changes in Rab3D expression and distribution in the acini of Sjögren's patients are associated with loss of cell polarity and secretory dysfunction. *Arthritis Rheum* 63(10): 3126-3135, **2011**.

Baker KP, Edwards BM, Main SH, Choi GH, Wager RE, Halpern WG, Lappin PB, Riccobene T, Abramian D, Sekut L, Sturm B, Poortman C, Minter RR, Dobson CL, Williams E, Carmen S, Smith R, Roschke V, Hilbert DM, Vaughan TJ, Albert VR. Generation and characterization of LymphoStat-B, a human monoclonal antibody that antagonizes the bioactivities of B lymphocyte stimulator. *Arthritis Rheum* 48(11): 3253-3265, **2003**.

Balada E, Ordi-Ros J, Vilardell-Tarres M. Molecular mechanisms mediated by Human Endogenous Retroviruses (HERVs) in autoimmunity. *Rev Med Virol* 19: 273-286, **2009**.

Balada E, Vilardell-Tarres M, Ordi-Ros J. Implication of human endogenous retroviruses in the development of autoimmune diseases. *Int Rev Immunol* 29(4):351-370, **2010**, revue.

Ballestar E. Epigenetic alterations in autoimmune rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 7(5): 263-271, **2011**, revue.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392(6673): 245-252, **1998**.

Banninger GP, Cha S, Said MS, Pauley KM, Carter CJ, Ornate M, Pauley BA, Anderson SM, Reyland ME. Loss of PKC δ results in characteristics of Sjögren's syndrome including salivary gland dysfunction. *Oral Dis* 17(6):601-609, **2001**.

Basu A. Involvement of protein kinase C-delta in DNA damage-induced apoptosis. *J Cell Mol Med* 7(4): 341-350, **2003**, revue.

Batten M, Groom J, Cahero TG, Qian F, Schneider P, Tschopp J, Browning JL, Mackay F. BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J Exp Med* 192(10): 1453-1466, **2000**.

Bennett V. Spectrin-based membrane skeleton: a multipotential adaptor between plasma membrane and cytoplasm. *Physiol Rev* 70(4):1029-1065, **1990**.

Beroukas D, Goodfellow R, Hiscock J, Jonsson R, Gordon TP, Waterman SA. Up-regulation of M3-muscarinic receptors in labial salivary gland acini in primary Sjögren's syndrome. *Lab Invest* 82(2): 203-210, **2002a**.

Beroukas D, Hiscock J, Gannon BJ, Jonsson R, Gordon TP, Waterman SA. Selective downregulation of aquaporin-1 in salivary glands in primary Sjögren's syndrome. *Lab Invest* 82(11): 1547-1552, **2002b**.

Binard A, Devauchelle-Pensec V, Fautrel B, Jousse S, Youinou P, Saraux A. Epidemiology of Sjögren's syndrome : where are we now ? *Clin Exp Rheumatol*, 25(1): 1-4, **2007**, revue.

Binard A, Le Pottier L, Devauchelle-Pensec V, Saraux A, Youinou P, Pers JO. Is the blood B-cell subset profile diagnostic for Sjögren syndrome? *Ann Rheum Dis*. 68(9): 1447-1452, **2009**.

Blass M, Kronfeld I, Kazimirsky G, Blumberg PM, Brodie C. Tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta is essential for its apoptotic effect in response to etoposide. *Mol Cell Biol* 22(1): 182-195, **2002**.

Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci* 27(1): 19-26, **2002**, revue.

Bohnhorst JO, Bjorgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjögren's syndrome. *J Immunol* 167(7): 3610-3618, **2001a**.

Bohnhorst JO, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Significantly depressed percentage of CD27+ (memory) B cells among peripheral blood cells in patients with primary Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol* 54(4): 421-427, **2001b**.

Bolstad AI, Jonsson R. Genetic aspects of Sjögren's syndrome. *Arthritis Res* 4(6): 353-359, 2002, revue.

Bombardieri M, Barone F, Pittoni V, Alessandsri C, Conigliaro P, Blades MC, Priori R, McInnes IB, Valesini G, Pitzalis C. Increased circulating levels and salivary gland expression of interleukin-18 in patients with Sjögren's syndrome: relationship with autoantibody production and lymphoid organization of the periductal inflammatory infiltrate. *Arthritis Res Ther* 6(5): R447-456, 2004.

Bossen C, Schneider P. BAFF, APRIL and their receptors: Structure, function and signaling. *Semin Immunol* 18(5): 263–275, 2006, revue.

Boumba D, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Cytokine mRNA expression in the labial salivary gland tissues from patients with primary Sjögren's syndrome. *Br J Rheumatol* 34(4): 326-333, 1995.

Brockdorff N. X-chromosome inactivation: closing in on proteins that bind Xist RNA. *Trends Genet* 18 (7): 352-358, 2002.

Brooks WH, Le Dantec C, Pers JO, Youinou P, Renaudineau Y. Epigenetics and autoimmunity. *J Autoimmun* 34(3):J207–219, 2010.

Bulosan M, Pauley KM, Yo K, Chan EK, Katz J, Peck AB, Cha S. Inflammatory caspases are critical for enhanced cell death in the target tissue of Sjogren's syndrome before disease onset. *Immunol Cell Biol* 87(1):81–90, 2009.

Bunim JJ, Talal N. The association of malignant lymphoma with Sjögren's syndrome. *Trans Ass Am Physicians* 76 : 45-56, 1963.

C

Catalan MA, Nakamoto T, Melvin JE. The salivary gland fluid secretion mechanism. *J Med Invest* 56 Suppl 192-196, 2009.

Cereijsido M, Contreras RG, Flores-Benitez D, Flores-Maldonado C, Larre I, Ruiz A, Shoshani L. New diseases derived or associated with the tight junctions. *Arch Med Res* 38(5): 465-478, 2007.

Chang SK, Arendt BK, Darce JR, Wu X, Jelinek DF. A role for BLyS in the activation of innate immune cells. *Blood* 108(8): 2687-2694, 2006.

Chen WS, Lin KC, Chen CH, Liao HT, Wang HP, Li WY, Lee HT, Tsai CY, Chou CT. Autoantibody and biopsy grading are associated with expression of ICAM-1, MMP-3, and TRAIL in salivary gland mononuclear cells of Chinese patients with Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 36(5): 989-996, **2009**.

Chisholm DM, Mason DK. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's disease. *J Clin Path* 21(5): 656-660, **1968**.

Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome. *J Autoimmun* 34(4): 400-407, **2010**.

Cobb BL, Lessard CJ, Harley JB, Moser KL. Genes and Sjögren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 34(4): 847-868, vii, **2008**, revue.

Cohen S, Janicki-Deverts D, Miller GE. Psychological stress and disease. *JAMA* 298(14): 1685-1687, **2007**.

Correa PA, Gomez LM, Cadena J, Anaya JM. Autoimmunity and tuberculosis. Opposite association with TNF polymorphism. *J Rheumatol* 32(2): 219-224, **2005**.

Craxton A, Draves KE, Gruppi A, Clark EA. BAFF regulates B cell survival by downregulating the BH3-only family member Bim via the ERK pathway. *J Exp Med* 202(10): 1363-1374, **2005**.

Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gormank D, Kastelein RA, Segwick JD. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is critical for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421(6924): 744-748, **2003**.

D

Dalavanga YA, Drosos AA, Moutsopoulos HM. Labial salivary gland immunopathology in Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol Suppl* 61: 67-70, **1986**.

Dall'Era M, Chakravarty E, Wallace D, Genovese M, Weisman M, Kavanaugh A, Kalunian K, Dhar P, Vincent E, Pena-Rossi C, Wofsy D. Reduced B lymphocyte and immunoglobulin levels after ataccept treatment in patients with systemic lupus erythematosus: results of a multicenter, phase Ib, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating trial. *Arthritis Rheum* 56(12): 4142-4150, **2007**.

D'Arbonneau F, Pers JO, Devauchelle V, Pennec Y, Saraux A, Youinou P. BAFF-induced changes in B cell antigen receptor-containing lipid rafts in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 54(1): 115-126, **2006**.

Daridon C, Devauchelle V, Hutin P, Le Berre R, Martins-Carvalho C, Bendaoud B, Dueymes M, Saraux A, Youinou P, Pers JO. Aberrant expression of BAFF by B lymphocytes infiltrating the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 56(4): 1134-1144, **2007**.

Daridon C, Pers JO, Devauchelle V, Martins-Carvalho C, Hutin P, Pennec YL, Saraux A, Youinou P. Identification of transitional type II B cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 54(7): 2280-2288, **2006**.

Datta R, Banach D, Kojima H, Talanian RV, Alnemri ES, Wong WW, Kufe DW. Activation of the CPP32 protease in apoptosis induced by 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and other DNA-damaging agents. *Blood* 88(6): 1936-1943, **1996**.

Delporte Christine, Steinfeld Serge. Distribution and roles of aquaporins in salivary glands. *Biochim Biophys Acta* 1758(8): 1061-1070, **2006**, revue.

Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, Messing RO. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279(3): L429-438, **2000**, revue.

Dessein PH, Joffe BI, Stanwix AE, Moomal Z. Hyposecretion of the adrenal androgen dehydroepiandrosterone sulfate and its relation to clinical variables in inflammatory arthritis. *Arthritis Res* 3(3):183-188, **2001**.

DeVries TA, Neville MC, Reyland ME. Nuclear import of PKC delta is required for apoptosis: identification of a novel nuclear import sequence. *EMBO J* 21(22): 6050-6060, **2002**.

DeVries-Seimon TA, Ohm AM, Humphries MJ, Reyland ME. Induction of apoptosis is driven by nuclear retention of protein kinase C delta. *J Biol Chem* 282(31): 22307-22314, **2007**.

Diao Z, Ye T, Cao P, Zhang J, Mei J, Lin Z, Zhang S. Expression, purification and characterization of recombinant human soluble BAFF secreted from the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 54(1): 11-17, **2007**.

Dieker J, Muller S. Epigenetic histone code and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* 39(1): 78-84, **2010**, revue.

Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. CD40 on salivary gland epithelial cells: high constitutive expression by cultured cells from Sjögren's syndrome patients indicating their intrinsic activation. *Clin Exp Immunol* 127(2): 386-392, **2002**.

Downie-Doyle S, Bayat N, Rischmueller M, Lester S. Influence of CTLA4 haplotypes on susceptibility and some extraglandular manifestations in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 54(8): 2434-2440, **2006**.

Dreyfus DH. Autoimmune disease: A role for new anti-viral therapies ? *Autoimmunity Reviews* 11: 88-97, **2011**.

E

Elkon KB, Gharavi AE, Hugues GR, Moutsopoulos HM. Autoantibodies in the sicca syndrome (primary Sjögren's syndrome). *Ann Rheum Dis* 43(2): 243-245, **1984**.

El Miedany YM, Ahmed I, Moustafa H, El Baddani M. Hyperprolactinemia in Sjögren's syndrome: a patient subset or a disease manifestation? *Joint Bone Spine* 71(3): 203-208, **2004**.

Endo Y, Negishi I, Ishikawa O. Possible contribution of microchimerism to the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Rheumatology* 41(5): 490-495, **2002**.

Epstein MA. Reflections on Epstein-Barr virus: some recently resolved old uncertainties. *J Infect* 43: 111-115, **2001**.

Evans PC, Lambert N, Maloney S, Furst DE, Moore JM, Nelson JL. Long-term fetal microchimerism in peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy women and women with scleroderma. *Blood* 93(6): 2033-2037, **1999**.

F

Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H. TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol* 39(7-8): 1462-1475, **2007**.

Fauchais AL, Ouattara B, Gondran G, Lalloué F, Petit D, Ly K, Lambert M, Launay D, Loustaud-Ratti V, Bezanahari H, Liozon E, Hachulla E, Jauberteau MO, Vidal E, Hatron PY. Articular manifestations in primary Sjögren's syndrome:

clinical significance and prognosis of 188 patients. *Rheumatology (Oxford)*, 49(6): 1164-1172, **2010**.

Feist E, Kuckelkorn U, Dörner T, Dönitz H, Scheffler S, Hiepe F, Kloetzel PM, Burmester GR. Autoantibodies in primary Sjögren's syndrome are directed against proteasomal subunits of the alpha and beta type. *Arthritis Rheum* 42(4): 697-702, **1999**.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9(2):102–114, **2008**, revue.

Flynn AN, Itani OA, Moninger TO, Welsh MJ. Acute regulation of tight junction ion selectivity in human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(9): 3591-3596, **2009**.

Forsblad-d'Elia H, Carlsten H, Labrie F, Konttinen YT, Ohlsson C. Low serum levels of sex steroids are associated with disease characteristics in primary Sjögren's syndrome; supplementation with dehydroepiandrosterone restores the concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 94(6): 2044-2051, **2009**.

Fox RI. Sjögren's syndrome. *Lancet* 366(9482): 321-331, **2005**, revue.

Fox RI, Bumol T, Fantozzi R, Bone R, Schreiber R. Expression of histocompatibility antigen HLA-DR by salivary gland epithelial cells in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 29(9): 1105-1111, **1986**.

Furer V, Greenberg JD, Attur M, Abramson SB, Pillinger MH. The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Clin Immunol* 136: 1-15, **2010**.

Furie R, Stohl W, Ginzler EM, Becker M, Mishra N, Chatham W, Merrill JT, Weinstein A, McCune WJ, Zhong J, Cai W, Freimuth W; Belimumab Study Group. Biologic activity and safety of belimumab, a neutralizing anti-B-lymphocyte stimulator (BLyS) monoclonal antibody: a phase I trial in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 10(5): R109, **2008**.

G

Gavin AL, Ait-Azzouzene D, Ware CF, Nemazee D. DeltaBAFF, an alternate splice isoform that regulates receptor binding and biopresentation of the B cell survival cytokine, BAFF. *J Biol Chem* 278(40): 38220-38228, **2003**.

Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science* 327(5966): 656-661, **2010**.

Goicovich E, Molina C, Perez P, Aguilera S, Fernandez J, Olea N, Alliende C, Leyton C, Romo R, Leyton L, Gonzalez MJ. Enhanced degradation of proteins of the basal lamina and stroma by matrix metalloproteinases from the salivary glands of Sjögren's syndrome patients: correlation with reduced structural integrity of acini and ducts. *Arthritis Rheum* 48(9): 2573-2584, **2003**.

Gomez LM, Anaya JM, Gonzalez CI, Pineda-Tamayo R, Otero W, Arango A, Martin J. PTPN22 C1858T polymorphism in Colombian patients with autoimmune diseases. *Genes Immun* 6(7): 628-631, **2005**.

Gottenberg JE, Busson M, Loiseau P, Dourche M, Cohen-Solal J, Lepage V, Charron D, Miceli C, Sibilia J, Mariette X. Association of transforming growth factor beta 1 and tumor necrosis factor alpha polymorphisms with anti-SSB/La antibody secretion in patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 50(2): 570-580, **2004**.

Gottenberg JE, Loiseau P, Azarian M, Chen C, Cagnard N, Hachulla E, Puechal X, Sibilia J, Charron D, Mariette X, Miceli-Richard C. CTLA-4 +49A/G and CT60 gene polymorphisms in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther* 9(2): R24, **2007**.

Gratwohl AA, Moutsopoulos HM, Chused TM, Akizuki M, Wolf RO, Sweet JB, Deisseroth AB. Sjögren-type syndrome after allogenic bone-marrow transplantation. *Ann Intern Med* 87(6): 703-706, **1977**.

Greenwell-Wild T, Moutsopoulos NM, Gliozzi M, Kapsogeorgou E, Rangel Z, Munson PJ, Moutsopoulos HM, Wahl SM. Chitinases in the salivary glands and circulation of patients with Sjögren's syndrome: macrophage harbingers of disease severity. *Arthritis Rheum* 63(10): 3103-3115, **2011**.

Griffith KJ, Chan EK, Lung CC, Hamel JC, Guo X, Miyachi K, Fritzler MJ. Molecular cloning of a novel 97-kD Golgi complex autoantigen associated with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 40: 1693-1702, **1997**.

Groom JR, Fletcher CA, Walters SN, Grey ST, Watt SV, Sweet MJ, Smyth MJ, Mackay CR, Mackay F. BAFF and MyD88 signals promote a lupus-like disease independent of T cells. *J Exp Med* 204(8):1959-1971, **2007**.

Groom J, Kalled SL, Cutler AH, Olson C, Woodcock SA, Schneider P, Tschopp J, Cachero TG, Batten M, Wheway J, Mauri D, Cavill D, Gordon TP, Mackay CR, Mackay F. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. *J Clin Invest* 10(1): 59-68, **2002**.

Gross JA, Dillon SR, Mudri S, Johnston J, Littau A, Roque R, Rixon M, Schou O, Foley KP, Haugen H, McMillen S, Waggle K, Schreckhise RW, Shoemaker K, Vu T, Moore M, Grossman A, Clegg CH. TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease: impaired B cell maturation in mice lacking BLyS. *Immunity* 15(2): 289-302, **2001**.

Gross JA, Johnston J, Mudri S, Enselman R, Dillon SR, Madden K, Xu W, Parrish-Novak J, Foster D, Lofton-Day C, Moore M, Littau A, Grossman A, Haugen H, Foley K, Blumberg H, Harrison K, Kindsvogel W, Clegg CH. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature* 404(6781), 995-999, **2000**.

Grosshans BL, Ortiz D, Novick P. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(32): 11821-11827, **2006**.

Gschwendt M. Protein kinase C. *Eur J Biochem* 259(3): 555-564, **1999**.

Guo WJ, Qu X, Yang MX, Zhang WD, Liang L, Shao QQ, Kong BH. Expression of BAFF in the trophoblast and decidua of normal early pregnant women and patients with recurrent spontaneous miscarriage. *Chin Med J (Engl)* 121(4): 309-315, **2008**.

H

Haga HJ, Rygh T. The prevalence of hyperprolactinemia in patients with primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 26(6):1291-1295, **1999**.

Haneji N, Nakamura T, Takio K, Yanagi K, Higashiyama H, Saito I, Noji S, Sugino H, Hayashi Y. Identification of alpha-fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjögren's syndrome. *Science* 276(5312): 604-607, **1997**.

Hansen A, Odendahl M, Reiter K, Jacobi AM, Feist E, Scholze J et al. Diminished peripheral blood memory B cells and accumulation of memory B cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 46(8): 2160-2171, **2002**.

Harley JB, Alexander EL, Bias WB, Fox OF, Provost TT, Reichlin M, Yamagata H, Arnett FC. Anti-Ro (SS-A) and anti-La (SS-B) in patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 29(2): 196-206, **1986**.

Hase H, Kanno Y, Kojima M, Hasegawa K, Sakurai D, Kojima H, Tsuchiya N, Tokunaga K, Masawa N, Azuma M, Okumura K, Kobata T. BAFF/BLyS can potentiate B-cell selection with the B-cell co-receptor complex. *Blood* 103(6): 2257-2265, **2004**.

Hatzoglou A, Roussel J, Bourgeade MF, Rogier E, Madry C, Inoue J, Devergne O, Tsapis A. TNF receptor family member BCMA (B cell maturation) associates with TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF 2 and TRAF 3 and activates NFκB, Elk-1, c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol* 165(3): 1322-1330, **2000**.

Heard E. Recent advances in X-chromosome inactivation. *Curr Opin Cell Biol* 16 (3): 247-255, **2004**.

Hedrich CM, Tsokos GC. Epigenetic mechanisms in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Trends Mol Med* **2011**, in press.

Hernandez-Molina G, Leal-Alegre G, Michel-Peregrina M. The meaning of anti-Ro and anti-La antibodies in primary Sjögren's syndrome. *Autoimmunity Reviews* 10(3): 123-125, **2011**, revue.

Hishikawa T, Ogasawara H, Kaneko H, Shirasawa T, Matsuura Y, Sekigawa I, Takasaki Y, Hashimoto H, Hirose S, Handa S, Nagasawa R, Maruyama N. Detection of antibodies to a recombinant gag protein derived from human endogenous retrovirus clone 4-1 in autoimmune diseases. *Viral Immunol* 10(3): 137-147, **1997**.

Horiuchi M, Yamano S, Inoue H, Ishii J, Nagata Y, Adachi H, Ono M, Renard JN, Mizuno F, Hayashi Y, Saito I. Possible involvement of IL-12 expression by Epstein-Barr virus in Sjögren's syndrome. *J Clin Pathol* 52(11): 833-837, **1999**.

Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, Lush MJ, Povey S, Talbot CC Jr, Wright MW, Wain HM, Trowsdale J, Ziegler A, Beck S. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet* 5(12): 889-899, **2004**, revue.

Huard B, Arlettaz L, Ambrose C, Kindler V, Mauri D, Roosnek E, Tschopp J, Schneider P, French LE. BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation. *Int Immunol* 16(3): 467-475, **2004**.

Humphries MJ, Limesand KH, Schneider JC, Nakayama KI, Anderson SM, Reyland ME. Suppression of apoptosis in the protein kinase C delta null mouse in vivo. *J Biol Chem* 281(14): 9728-9737, **2006**.

Hsu TC, Chang CH, Lin MC, Liu ST, Yen TJ, Tsay GJ. Anti-CENP-H antibodies in patients with Sjögren's syndrome. *Rheumatol Int* 26(4): 298-303, **2006**.

Inagaki Y, Jinno-Yoshida Y, Hamasaki Y, Ueki H. A novel autoantibody reactive with carbonic anhydrase in sera from patients with systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *J Dermatol Sci* 2(3): 147-154, **1991**.

Ioannidis JP, Vassiliou VA, Moutsopoulos HM. Long-term risk of mortality and lymphoproliferative disease and predictive classification of primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 46(3): 741-747, **2002**.

Itescu S, Brancato IJ, Buxbaum J, Gregersen PK, Rizk CC, Croxson TS, Solomon GE, Winchester R. A diffuse infiltrative CD8 lymphocytosis syndrome in human immunodeficiency virus (HIV) infection: a host immune response associated with HLA-DR5. *Ann Intern Med* 112(1): 3-10, **1990**.

Itescu S, Brancato LJ, Winchester R. A sicca syndrome in HIV infection: association with HLA-DR5 and CD8 lymphocytosis. *Lancet* 2(8661): 466-468, **1989**.

Itoh Y, Reichlin M. Antibodies to carbonic anhydrase in systemic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 35(1): 73-82, **1992**.

Ittah M, Gottenberg JE, Proust A, Hachulla E, Puechal X, Loiseau P, Mariette X, Miceli-Richard C. No evidence between 1858 C/T single nucleotide polymorphism of PTPN22 gene and primary Sjögren's syndrome. *Genes Immun* 6(5): 457-458, **2005**.

J

Jackson DN, Foster DA. *FASEB J* 18(6): 627-636, **2004**.

Jahn R. Les lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens: une information de la Ligne contre le cancer pour les personnes concernées et leurs proches. *Ligne suisse contre le cancer, Berne. 2è édition, 1-32, 2010*.

Jean S, Quelvennec E, Alizadeh M, Guggenbuhl P, Birebent B, Perdriger A, Grosbois B, Pawlotsky PY, Semana G. DRB1*15 and DRB1*03 extended haplotype interaction in primary Sjogren's syndrome genetic susceptibility. *Clin Exp Rheumatol* 16(6): 725-728, **1998**.

Jimenez F, Aiba-Masago S, Al Hashimi I, Vela-Roch N, Fernandes G, Yeh CK, Talal N, Dang H. Activated caspase 3 and cleaved poly(ADP-ribose) polymerase in salivary epithelium suggest a pathogenetic mechanism for Sjögren's syndrome. *Reumatology (Oxford)* 41(3): 338-342, **2002**.

Jonsson R, Vogelsang P, Volchenkov R, Espinosa A, Wahren-Herlenius M, Appel S. The complexity of Sjögren's syndrome : novel aspects on pathogenesis. *Immunol Lett* 141 (1) : 1-9, **2011**.

Jung DJ, Bong JJ, Baik M. Extracellular proteinase inhibitor-accelerated apoptosis is associated with B cell activating factor in mammary epithelial cells. *Exp Cell Res* 292(1): 115-122, **2004**.

K

Kalled SL, Ambrose C, Hsu YM. The biochemistry and biology of BAFF, APRIL and their receptors. *Curr Dir Autoimmun* 8: 206-242, **2005**, revue.

Kapsogeorgou EK, Abu-Helu RF, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Salivary gland epithelial cell exosomes: a source of autoantigenic ribonucleoproteins. *Arthritis Rheum* 52: 1517-1521, **2005**.

Kapsogeorgou EK, Dimitriou ID, Abu-Helu RF, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Activation of epithelial and myoepithelial cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome: high expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM.1) in biopsy specimens and cultured cells. *Clin Exp Immunol* 124(1): 126-133, **2001**.

Karaiskos D, Mavragani CP, Makaroni S, Zinzaras E, Voulgarelis M, Rabavilas A, Moutsopoulos HM. Stress, coping strategies and social support in patients with primary Sjögren's syndrome prior to disease onset: a retrospective case-control study. *Ann Rheum Dis* 68(1): 40-46, **2009**.

Kassan SS, Thomas TL, Moutsopoulos HM, Hoover R, Kimberly RP, Budman DR, Costa J, Decker JL, Chused TM. Increased risk of lymphoma in sicca syndrome. *Ann Intern Med*, 89(6): 888-892, **1978**.

Kast RE. Predominance of autoimmune and rheumatic diseases in female. *J Rheumatol* 4(3): 288-292, **1977**.

Katsifis GE, Moutsopoulos NM, Wahl SM. T lymphocytes in Sjögren's syndrome: contributors to and regulators of pathophysiology. *Clinic Rev Allerg Immunol* 32(3): 252-264, **2007**, revue.

Katsifis GE, Rekka S, Moutsopoulos NM, Pillemer S, Wahl SM. Systemic and local interleukin-17 and linked cytokines associated with Sjögren's syndrome immunopathogenesis. *Am J Pathol* 175(3): 1167-1177, **2009**.

Kino-Ohsaki J, Nishimori I, Morita M, Okazaki K, Yamamoto Y, Onishi S, Hollingsworth MA. Serum antibodies to carbonic anhydrase I and II in patients with idiopathic chronic pancreatitis and Sjögren's syndrome. *Gastroenterology* 110(5): 1579-1586, **1996**.

Kong L, Ogawa N, McGuff HS, Nakabayashi T, Sakata KM, Masago R, Vela-Roch N, Talal N, Dang H. Bcl-2 family expression in salivary glands from patients with primary Sjögren's syndrome: involvement of Bax in salivary gland destruction. *Clin Immunol Immunopathol* 88(2): 133-141, **1998**.

Konttinen YT, Porola P, Konttinen L, Laine M, Poduval P. Immunohistopathology of Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev* 6(1): 16-20, **2006**, revue.

Kordossis T, Paikos S, Aroni K, Kitsanta P, Dimitrakopoulos A, Kavouklis E, Alevizou V, Kyriaki P, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Prevalence of Sjögren's like syndrome in a cohort of HIV-1 positive patients: descriptive pathology and immunopathology. *Br J Rheumatol* 37(6): 691-695, **1998**.

Kovacs L, Szodoray P, Kiss E. Secondary tumours in Sjögren's syndrome. *Autoimmunity Reviews* 9(4): 203-206, **2010**, revue.

Krumbholz M, Theil D, Derfuss T, Rosenwald A, Schrader F, Monoranu CM, Kalled SL, Hess DM, Serafini B, Aloisi F, Wekerle H, Hohlfeld R, Meinl E. BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *J Exp Med* 201(2): 195-200, **2005**.

Kulkarni K, Selesniemi K, Brown TL. Interferon-gamma sensitizes the human salivary gland cell line, HSG, to tumor necrosis factor-alpha induced activation of dual apoptotic pathways. *Apoptosis* 11(12): 2205-2215, **2006**.

Kumagai S, Kanagawa S, Morinobu A, Takada M, Nakamura K, Sugai S, Maruya E, Saji H. Association of a new allele of the TAP2 gene, TAP2*Bky2 (Val577), with susceptibility to Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 40(9): 1685-1692, **1997**.

Khwaja A, Tatton L. Caspase-mediated proteolysis and activation of protein kinase C delta plays a central role in neutrophil apoptosis. *Blood* 94(1): 291-301, **1999**.

L

Labrie F, Luu-The V, Belanger A, Lin SX, Simard J, Pelletier G, Labrie C. Is dehydroepiandrosterone a hormone? *J Endocrinol* 187(2):169-196, **2005**, revue.

Lai Kwan Lam Q, King Hung Ko O, Zheng BJ, Lu L. Local BAFF gene silencing suppresses Th17-cell generation and ameliorates autoimmune arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(39): 14993-13998, **2008**.

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein Wm, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201(2): 233-240, **2005**.

Larsson A, Bredberg A, Henriksson G, Manthorpe R, Sallmyr A. Immunohistochemistry of the B-cell component in lower lip salivary glands in Sjögren's syndrome and healthy subjects. *Scand J Immunol* 61(1): 98-107, **2005**.

Lavrik IN, Krammer PH. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ*, sous presse, **2011**.

Leitges M, Mayr M, Braun U, Mayr U, Li C, Pfister G, Ghaffari-Tabrizi N, Baier G, Hu Y, Xu Q. Exacerbated vein graft arteriosclerosis in protein kinase C delta-null mice. *J Clin Invest* 108(10): 1505-1512, **2001**.

Le Pottier L, Bendaoud B, Renaudineau Y, Youinou P, Pers JO, Daridon C. New ELISA for B cell-activating factor. *Clin Chem* 55(10): 1843-1851, **2009a**.

Le Pottier L, Devauchelle V, Fautrel A, Daridon C, Saraux A, Youinou P, Pers JO. Ectopic germinal centers are rare in Sjögren's syndrome salivary glands and do not exclude autoreactive B cells. *J Immunol* 182(6): 3540-3547, **2009b**.

Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94(4): 491-501, **1998**.

Li X, Li X, Qian L, Wang G, Zhang H, Wang X, Chen K, Zhai Z, Li Q, Wang Y, Harris DC. T regulatory cells are markedly diminished in diseased salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 34: 2438-2445, **2007**.

Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, Cerutti A. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL. *Nat Immunol* 3(9): 822-829, **2002**.

Liu Y, Xu L, Opalka N, Kappler J, Shu HB, Zhang G. Crystal structure of sTALL-1 reveals a virus-like assembly of TNF family ligands. *Cell* 108(3): 383-394, **2002**.

Lo YM, Lau TK, Chan LY, Leung TN, Chang AM. Quantitative analysis of the bidirectional fetomaternal transfer of nucleated cells and plasma DNA. *Clin Chem* 46(9): 1301-1309, **2000**.

Lockshin MD. Sex ratio and rheumatic disease. *Autoimmun Rev* 1(3): 162-167, **2002**, revue.

Lu Q, Renaudineau Y, Cha S, Ilei G, Brooks WH, Selmi C, Tzioufas A, Pers JO, Bombardieri S, Gershwin ME, Gay S, Youinou P. Epigenetics in autoimmune disorders: highlights on the 10th Sjögren's syndrome symposium. *Autoimmun Rev* 9(9): 627-630, **2010**, revue.

Ludewig B, Junt T, Hengartner H, Zinkernagel RM. Dendritic cells in autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol* 13(6): 657-662, **2001**.

M

Mackay F, Ambrose C. The TNF family members BAFF and APRIL: the growing complexity. *Cytokine Growth Factor Rev* 14(3-4): 311-324, **2003**, revue.

Mackay F, Browning JL. BAFF: a fundamental survival factor for B cells. *Nat Rev Immunol* 2(7): 465-475, **2002**, revue.

Mackay F, Leung H. The role of the BAFF/APRIL system on T cell function. *Semin Immunol* 18(5): 284-289, **2006**, revue.

Mackay F, Schneider P. Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol* 9(7): 491-502, **2009**, revue.

Mackay F, Tangye SG. The role of the BAFF/APRIL system in B cell homeostasis and lymphoid cancers. *Curr Opin Pharmacol* 4(4): 347-354, **2004**, revue.

Mackay F, Woodcok SA, Lawton P, Ambrose C, Baetscher M, Schneider P, Tschopp J, Browning JL. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med* 190(11): 1697-1710, **1999**.

Mackay M, Schneider P, Rennert P, Browning J. BAFF and APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol* 21: 231-264, **2003**.

Majumder PK, Mishra NC, Sun X, Bharti A, Kharbanda S, Saxena S, Kufe D. Targeting of protein kinase C delta to mitochondria in the oxidative stress response. *Cell Growth Differ* 12(9): 465-470, **2001**.

Majumder PK, Pandey P, Sun X, Cheng K, Datta R, Saxena S, Kharbanda S, Kufe D. Mitochondrial translocation of protein kinase C delta in phorbol ester-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 275(29): 21793-21796, **2000**.

Malavez Y, Gonzalez-Mejia ME, Doseff AI. PRKCD (protein kinase C, delta). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, **2008**.

Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. *Nature* 441(7090): 231-234, **2006**.

Manoussakis MN, Boiu S, Korkolopoulou P, Kapsogeorgou EK, Kavantzas N, Ziakas P, Patsouris E, Moutsopoulos HM. Rates of infiltration by macrophages and dendritic cells and expression of interleukin-18 and interleukin-12 in the chronic inflammatory lesions of Sjögren's syndrome. Correlation with certain features of immune hyperactivity and factors associated with high risk of lymphoma development. *Arthritis Rheum* 56(12): 3977-3988, **2007**.

Manoussakis MN, Kapsogeorgou EK. The role of epithelial cells in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Clin Rev Allergy Immunol* 32 (3): 225-230, **2007**.

Manoussakis MN, Kapsogeorgou EK. The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *J Autoimmun* 35(3): 219-224, **2010**, revue.

Mariette X, Roux S, Zhang J, Bengoufa D, Lavie F, Zhou T, Kimberly R. The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 62(2): 168-171, **2003**.

Matassa AA, Carpenter L, Biden TJ, Humphries MJ, Reyland ME. PKC delta is required for mitochondrial-dependent apoptosis in salivary epithelial cells. *J Biol Chem* 276(32): 29719-29728, **2001**.

Matsumura R, Umemiya K, Goto T, Nakazawa T, Ochiai K, Kagami M, Tomioka H, Tanabe E, Sugiyama T, Sueishi M. Interferon gamma and tumor necrosis factor alpha induce Fas expression and anti-Fas mediated apoptosis in a salivary ductal cell line. *Clin Exp Rheumatol* 18(3): 311-318, **2000**.

Matsumura R, Umemiya K, Kagami M, Tomioka H, Tanabe E, Sugiyama T, Sueishi M, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K. Expression of TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) on infiltrating cells and of TRAIL receptors on salivary glands in patients with Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 20(6): 791-798, **2002**.

McArthur C, Wang Y, Veno P, Zhang J, Fiorella R. Intracellular trafficking and surface expression of SS-A (Ro), SS-B (La), poly(ADP-ribose) polymerase and alpha-fodrin autoantigens during apoptosis in human salivary gland cells induced by tumour necrosis factor-alpha. *Arch Oral Biol* 47(6): 443-448, **2002**.

Mecklenbräuker I, Kalled SL, Leitges M, Mackay F, Tarakhovsky A. Regulation of B-cell survival by BAFF-dependent PKC delta-mediated nuclear signaling. *Nature* 431(7007): 456-461, **2004**.

Mecklenbräuker I, Saijo K, Zheng NY, Leitges M, Tarakhovsky A. Protein kinase C delta controls self-antigen-induced B-cell tolerance. *Nature* 416(6883): 860-865, 2002.

Michael A, Bajracharya SD, Yuen PS, Zhou H, Star RA, Illei GG, Alevizos I. Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Dis* 16(1): 34-38, 2010.

Mitic LL, Van Itallie CM, Anderson JM. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279(2): G250-254, 2000.

Mitsias DI, Tzioufas AG, Veiopoulou C, Zintzaras E, Tassios IK, Kogopoulou O, Moutsopoulos HM, Thyphronitis G. The Th1/Th2 cytokine balance changes with the progress of the immunopathological lesion of Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 128(3): 562-568, 2002.

Miyamoto A, Nakayama K, Imaki H, Hirose S, Jiang Y, Abe M, Tsukiyama T, Nagahama H, Ohno S, Hatakeyama S, Nakayama KI. Increased proliferation of B cells and autoimmunity in mice lacking protein kinase C delta. *Nature* 416(6883): 865-869, 2002.

Miyawaki S, Asanuma H, Nishiyama S, Yoshinaga Y. Clinical and serological heterogeneity in patients with anticentromere antibodies. *J Rheumatol* 32(8): 1488-1494, 2005.

Molina C, Alliende C, Aguilera S, Kwon YJ, Leyton L, Martínez B, Leyton C, Pérez P, González MJ. Basal lamina disorganisation of the acini and ducts of labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome: association with mononuclear cell infiltration. *Ann Rheum Dis* 65(2): 178-183, 2006.

Montoya MC, Sancho D, Vicente-Manzanares M, Sanchez-Madrid F. Cell adhesion and polarity during immune interactions. *Immunol Rev* 186: 68-82, 2002, revue.

Moore PA, Belvedere O, Orr A, Pieri K, LaFleur DW, Feng P, Soppet D, Charters M, Gentz R, Parmelee D, Li Y, Galperina O, Giri J, Roschke V, Nardelli B, Carrell J, Sosnovtseva S, Greenfield W, Ruben SM, Olsen HS, Fikes J, Hilbert DM. BlyS: member of the tumor-necrosis factor family and B-lymphocyte stimulator. *Science* 285(5425), 260-263, 1999.

Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome : autoimmune epithéлитis. *Clin Immunol Immunopathol* 72(2) : 162-165, 1994.

Mukhopadhyay A, Ni J, Zhai Y, Yu GL, Aggarwal BB. Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor- κ B and c-Jun NH2-terminal kinase. *J Biol Chem* 274(23), 15978-15981, **1999**.

N

Nagata Y, Inoue H, Yamada K, Higashiyama H, Mishima K, Kizu Y, Takeda I, Mizuno F, Hayashi Y, Saito I. Activation of Epstein-Barr virus by saliva from Sjögren's syndrome patients. *Immunology* 111(2): 223-229, **2004**.

Naito Y, Matsumoto I, Wakamatsu E, Goto D, Sugiyama T, Matsumura R, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 64(3): 510, **2005**.

Nakamura H, Kawakami A, Iwamoto N, Ida H, Koji T, Eguchi K. Rapid and significant induction of TRAIL-mediated type II cells in apoptosis of primary salivary epithelial cells in primary Sjögren's syndrome. *Apoptosis* 13(11): 1322-1330, **2008**.

Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, Moore PA, Olsen HS, Migone TS, Sosnovtseva S, Carrell JA, Feng P, Giri JG, Hilbert DM. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood* 97(1): 198-204, **2001**.

Navarra SV, Guzmán RM, Gallacher AE, Hall S, Levy RA, Jimenez RE, Li EK, Thomas M, Kim HY, León MG, Tanasescu C, Nasonov E, Lan JL, Pineda L, Zhong ZJ, Freimuth W, Petri MA; BLISS-52 Study Group. Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus : a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 377(9767): 721-731, **2011**.

Nelson JL, Furst DE, Maloney S, Gooley T, Evans PC, Smith A, Bean MA, Ober C, Bianchi DW. Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *Lancet* 351(9102): 559-562, **1998**.

Ng LG, Sutherland AP, Newton R, Qian F, Cachero TG, Scott ML, Thompson JS, Wheway J, Chtanova T, Grrrom J, Sutton IJ, Xin C, Tangye SG, Kalled SL, Mackay F, Mackay CR. B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. *J Immunol* 173(2): 807-817, **2004**.

Nicolas X, Ansart S, Le Berre R, Le Pennec Y. Syndrome de Gougerot-Sjögren primitif : problèmes diagnostiques et thérapeutiques. *Mt* 10 : 334-341, **2004**.

Novak AJ, Grote DM, Stenson M, Ziesmer SC, Witzig TE, Habermann TM, Harder B, Ristow KM, Bram RJ, Jelinek DF, Gross JA, Ansell SM. Expression of BLyS and its receptors in B-cell non-Hodgkin lymphoma: correlation with disease activity and patient outcome. *Blood*, 104(8): 2247-2253, **2004**.

Nozawa K, Fritzler MJ, von Muhlen CA, Chan EK. Giantin is the major Golgi autoantigen in human anti-Golgi complex sera. *Arthritis Res Ther* 6(2): R95-R102, **2004**.

O

Ogawa N, Ping L, Zhenjun L, Takada Y, Sugai S. Involvement of the interferon- γ -induced T cell-attracting chemokines, interferon- γ -inducible 10-kd protein (CXCL10) and monokine induced by interferon- γ (CXCL9), in the salivary gland lesions of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 46(10): 2730-2741, **2002**.

Ohata J, Zvaifler NJ, Nishio M, Boyle DL, Kalled SL, Carson DA, Kipps TJ. Fibroblast-like synoviocytes of mesenchymal origin expree functional B-cell activating factor of the TNF family in response to proinflammatory cytokines. *J Immunol* 174(2): 864-870, **2005**.

Ohlsson M, Jonsson R, Brokstad KA. Subcellular redistribution and surface exposure of the Ro52, Ro60 and La48 autoantigens during apoptosis in human ductal epithelial cells: a possible mechanism in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol* 56(5): 456-469, **2002a**.

Ohlsson M, Szodoray P, Loro LL, Johannessen AC, Jonsson R. CD40, CD154, Bax and Bcl-2 expression in Sjögren's syndrome salivary glands: a putative anti-apoptotic role during its effector phases. *Scand J Immunol* 56(6): 561-571, **2002b**.

Ohno S, Nishizuka Y. Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. *J Biochem* 132(4): 341-350, **2002**.

Onouchi H, Muro Y, Tomita Y. Clinical features and IgG subclass distribution of anti-p80 coilin antibodies. *J Autoimmun* 13(2): 225-232, **1999**.

Ozaki Y, Amakawa R, Ito T, Iwai H, Tajima K, Uehira K, Kagawa H, Uemura Y, Yamashita T, Fukuhara S. Alteration of peripheral blood dendritic cells in patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 44(2): 419-431, **2001**.

Ozaki Y, Ito T, Son Y, Amuro H, Shimamoto K, Sugimoto H, Katashiba Y, Ogata M, Miyamoto R, Murakami N, Amakawa R, Fukuhara S. Decrease of blood dendritic cells and increase of tissue-infiltrating dendritic cells are involved in the

induction of Sjögren's syndrome but not in the maintenance. *Clin Exp Immunol* 159(3): 315-326, 2010.

P

Paris L, Tonutti L, Vannini C, Bazzoni G. Structural organization of the tight junctions. *Biochim Biophys Acta* 1778(3): 646-659, 2008.

Patke A, Mecklenbräuer I, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Tarakhovsky A. BAFF controls B cell metabolic fitness through a PKC beta-and Akt-dependent mechanism. *J Exp Med* 203(11): 2551-2562, 2006.

Pauley KM, Cha S, Chan EK. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity* 32(3-4): 189-194, 2009.

Pauley KM, Drupe LC, Kuklani R, Chan AL, Pauley BA, Stewart CM et al. Altered microRNA expression and its potential implication in Sjögren's syndrome. *In: 10th international symposium on Sjögren's syndrome, Brest, France, Oct 1-3, 2009, abstract book p89.*

Pavlakakis PP, Alexopoulos H, Kosmidis ML, Stamboulis E, Routsias JG, Tzartos SJ, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM, Dalakas MC. Peripheral neuropathies in Sjögren's syndrome: a new reappraisal. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82 (7): 798-802, 2011

Pelekanou V, Kampa M, Kafousi M, Darivianaki K, Sanidas E, Tsiftsis D, Stathopoulos EN, Tsapis A, Castanas E. Expression of TNF-superfamily members BAFF and APRIL in breast cancer: immunohistochemical study in 52 invasive ductal breast carcinomas. *BMC Cancer* 8: 76, 2008.

Peralta-Ramirez MI, Jimenez-Alonso J, Godoy-Garcia JF, Perez-Garcia M; Group lupus Virgen de la Nieves. The effects of daily stress and stressful life events on the clinical symptomatology of patients with lupus erythematosus. *Psychosom Med* 66(5): 788-794, 2004.

Perez P, Goicovich E, Alliende C, Aguilera S, Leyton C, Molina C, Pinto R, Romo R, Martinez B, González MJ. Differential expression of matrix metalloproteinases in labial salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 43(12): 2807-2817, 2000.

Perrier S, Coussediere C, Dubost JJ, Albuissou E, Sauvezie B. IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) gene polymorphism in Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 87(3): 309-313, 1998.

Pers JO, Daridon C, Devauchelle V, Jousse S, Saraux A, Jamin C, Youinou P. BAFF overexpression is associated with autoantibody production in autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1050: 34-39, **2005**.

Pers JO, Jamin C, Predine-Hug F, Lydyard P, Youinou P. The role of CD5-expressing B cells in health and disease. *Int J Mol Med* 3(3): 239-245, **1999**, *revue*.

Pers JO, Le Pottier L, Devauchelle V, Saraux A, Youinou P. B lymphocytes in Sjögren's syndrome. *Rev Med Interne* 29(12): 1000-1006, **2008**, *revue*.

Pertovaara M, Pukkala E, Laippala P, Miettinen A, Pasternack A. A longitudinal cohort study of Finnish patients with primary Sjögren's syndrome: clinical, immunological, and epidemiological aspects. *Ann Rheum Dis* 60(5): 467-472, **2001**.

Pillemer SR, Casciola-Rosen L, Baum BJ, Rosen A, Gelber AC. Centromere protein C is a target of autoantibodies in Sjögren's syndrome and is uniformly associated with antibodies to Ro and La. *J Rheumatol* 31(6):1121-1125, **2004**.

Ping L, Ogawa N, Sugai S. Novel role of CD40 in Fas-dependent apoptosis of cultured salivary epithelial cells from patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 52(2): 573-581, **2005**.

Piotrowski PC, Duriagin S, Jagodzinski PP. Expression of human endogenous retrovirus clone 4-1 may correlate with blood plasma concentration of anti-U1 RNP and anti-Sm nuclear antibodies. *Clin Rheumatol* 24(6): 620-624, **2005**.

Porola P, Laine M, Virkki L, Poduval P, Konttinen YT. The influence of sex steroids on Sjögren's syndrome. *Ann NY Acad Sci* 1108: 426-432, **2007**, *revue*.

Porola P, Straub RH, Virkki LM, Konttinen YT, Nordstrom DC. Failure of oral DHEA treatment to increase local salivary androgen outputs of female patients with Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 40(5): 387-390, **2011**.

Prashant A. Immunopathogenesis of Sjögren's syndrome. *J Indian Rheumatol Assoc* 11: 71-75, **2003**.

Price CM, McCarty GA, Pettijohn DE. NuMA protein is a human autoantigen. *Arthritis Rheum* 27(7): 774-779, **1984**.

R

Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Yague J, Akasbi M, Bautista R, Ruano M, Claver G, Gil V, Font J. Hypocomplementaemia as an immunological marker of

morbidity and mortality in patients with primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*, 44 (1): 89-94, **2005**.

Ramos-Casals M, Nardi N, Brito-Zeron P, Aguiló S, Gil V, Delgado G, Bove A, Font J. Atypical autoantibodies in patients with primary Sjögren's syndrome: clinical characteristics and follow-up of 82 cases. *Semin Arthritis Rheum* 35(5): 312-321, **2006**.

Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282(5388): 480-483, **1998**.

Rauch M, Tussiwand R, Bosco N, Rolink AG. Crucial role for BAFF-BAFF-R signaling in the survival and maintenance of mature B cells. *PloS One* 4(5): e5456, **2009**.

Renaudineau Y, Youinou P. Epigenetics and autoimmunity, with special emphasis on methylation. *Keio J Med* 60(1): 10-16, **2011**, revue.

Rennert P, Schneider P, Cachero TG, Thompson J, Trabach L, Hertig S, Holler N, Qian F, Mullen C, Strauch K, Browning JL, Ambrose C, Tschopp J. A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth. *J Exp Med* 192(1): 1677-1684, **2000**.

Reveille JD. The molecular genetics of systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol*, 4(5): 644-656, **1992**, revue.

Reyland ME. In: Apoptosis, cell signaling and human disease: molecular mechanisms. Vol 2 (Srivastava, R., ed.): 31-35, Humana Press, Totowa, **2007**.

Reyland ME, Anderson SM, Matassa AA, Barzen KA, Quissell DO. Protein kinase C delta is essential for etoposide-induced apoptosis in salivary gland acinar cells. *J Biol Chem* 274(27): 19115-19123, **1999**.

Rodriguez JL, Gelpi C, Thomson TM, Real FJ, Fernandez J. Anti-Golgi complex autoantibodies in a patient with Sjögren's syndrome and lymphoma. *Clin Exp Immunol* 49(3), 579-586, **1982**.

Roguedas AM, Youinou P, Lemasson G, Pennec YL, Misery L. Primary Sjögren's syndrome: a dermatological approach. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 20(3), 243-247, **2006**, revue.

Routsias JG, Tzioufas AG. Sjögren's syndrome-study of autoantigens and autoantibodies. *Clinical reviews in allergy & immunology* 32(3): 238-251, **2007**, revue.

Ruan K, Fang X, Ouyang G. MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Lett* 285(2):116–126, **2009**.

S

Salliot C, Gottenberg JE, Bengoufa D, Desmoulins F, Miceli-Richard C, Mariette X. Anticentromere antibodies identify patients with Sjögren's syndrome and autoimmune overlap syndrome. *J Rheumatol* 34(11): 2253-2258, **2007**.

Salomonsson S, Jonsson MV, Skarstein K, Brokstad KA, Hjelmstrom P, Wahren-Herlenius M, Jonsson R. Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 48(11): 3187-3201, **2003**.

Salomonsson S, Larsson P, Tengner P, Mellquist E, Hjelmstrom P, Wahren-Herlenius M. Expression of the B cell-attracting chemokine CXCL13 in the target organ and autoantibody production in ectopic lymphoid tissue in the chronic inflammatory disease Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol* 55(4): 36-342, **2002**.

Sany J. Syndrome de Gougerot-Sjögren. In : Immuno-Rhumatologie. **Sany J, Clot J.** *Médecine-Sciences Flammarion, Paris, chapitre 11: 189-199, 1989*.

Scapini P, Nardelli B, Nadali G, Calzetti F, Pizzolo G, Montecucco C, Cassatella MA. G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BlyS. *J Exp Med* 197(3): 297-302, **2003**.

Scheel-Toellner D, Pilling D, Akbar AN, Hardie D, Lombardi G, Salmon M, Lord JM. Inhibition of T cell apoptosis by IFN-beta rapidly reverses nuclear translocation of protein kinase C-delta. *Eur J Immunol* 29(8): 2603-2612, **1999**.

Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, Cachero TG, Shulga-Morskaya S, Dobles M, Frew E, Scott ML. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* 14(5537): 2111-2114, **2001**.

Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, Ambrose C, Lawton P, Bixler S, Acha-Orbea H, Valmori D, Romero P, Werner-Favre C, Zubler RH, Browning JL, Tschopp J. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med* 189(11): 1747-56, **1999**.

Seabra MC, Mules EH, Hume AN. Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends Mol Med* 8(1): 23-30, **2002**.

Serafini B, Severa M, Columba-Cabezas S, Rosicarelli B, Veroni C, Chiappetta G, Magliozzi R, Reynolds R, Coccia EM, Aloisi F. Epstein-Barr virus latent infection and BAFF expression in B cells in the multiple sclerosis brain : implications for viral persistence and intrathecal B-cell activation. *J Neuropathol Exp Neurol* 69(7): 677-693, **2010**.

Seshasayee D, Valdez P, Yan M, Dixit VM, Tumas D, Grewal IS. Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLYS receptor. *Immunity* 18(2): 279-288, **2003**.

Seyler TM, Park YW, Takemura S, Bram RJ, Kurtin PJ, Goronzy JJ, Weyland CM. BLYS and APRIL in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 115(11): 3083-3092, **2005**.

Shah N, Khurana S, Cheng K, Raufman JP. Muscarinic receptors and ligands in cancer. *Am J Physiol Cell Physiol* 296(2): C221-C232, **2009**, revue.

Shu HB, Hu WH, Johnson H. TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens. *J Leukoc Biol.* 65(5), 680-683, **1999**.

Skopouli FN, Barbatis C, Moutsopoulos HM. Liver involvement in primary Sjögren's syndrome. *Br J Rheumatol* 33(8): 745-748, **1994**.

Solans-Laqué R, Lopez-Hernandez A, Angel Bosch-Gil J, Palacios A, Campillo M, Vilardell-Tarres M. Risk, predictors and clinical characteristics of lymphoma development in primary Sjögren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum, sous presse*, **2011**.

Sotto JJ, Gressin R. Les lymphomes malins non hodgkiniens. Corpus médical. Faculté de médecine de Grenoble, **2005**.

Spachidou MP, Bourazopoulou E, Maratheftis CI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG, Manoussakis MN. Expression of functional Toll-like receptors by salivary gland epithelial cells: increased mRNA expression in cells derived from patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 147(3): 497-503, **2007**.

Stanczyk J, Ospelt C, Gay RE, Gay S. Synovial cell activation. *Curr Opin Rheumatol* 18(3): 262-267, **2006**.

Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, Detmar M, Gay S, Kyburz D. Altered expression of microRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58(4): 1001-1009, **2008**.

Stathopoulou EA, Routsias JG, Stea EA, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Cross-reaction between antibodies to the major epitope of Ro 60kD autoantigen and

a homologous peptide of Coxsackie virus 2B protein. *Clin Exp Immunol* 141(1): 148-154, 2005.

Stea EA, Routsias JG, Samiotaki M, Panayotou G, Papalambros E, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Analysis of parotid glands of primary Sjögren's syndrome patients using proteomic technology reveals altered autoantigen composition and novel antigenic targets. *Clin Exp Immunol* 147(1): 81-89, 2006.

Steinberg SF. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev* 88(4): 1341-1378, 2008, revue.

Steinfeld S, Rommes S, François C, Decaestecker C, Maho A, Appelboom T, Heizmann CW, Kiss R, Pochet R. Big prolactin 60kDa is overexpressed in salivary glandular epithelial cells from patients with Sjögren's syndrome. *Lab Invest* 80(2): 239-247, 2000.

Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21: 685-711, 2003.

Stewart JJ. Theory and treatment of the X-inactivation chimera in female prevalent autoimmune disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 47: 355-359, 1999.

Stott DI, Hiepe F, Hummel M, Steinhauser G, Berek C. Antigen-driven clonal proliferation of B cells within target tissue of an autoimmune disease. *J Clin Invest* 102(5): 938-946, 1998.

Straub RH, Dhabhar FS, Bijlsma JW, Cutolo M. How psychological stress hormones and nerve fibers may exacerbate rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 52(1): 16-26, 2005.

Szalat R, Ghillani-Dalbin P, Jallouli M, Amoura Z, Musset L, Cacoub P, Sène D. Anti-NuMA1 and anti-NuMA2 (anti-HsEG5) antibodies : Clinical and immunological features : A propos of 40 new cases and review of the literature. *Autoimmun Rev* 9(10): 652-656, 2010.

T

Tak PP, Thurlings RM, Rossier C, Nestorov I, Dimic A, Mircetic V, Rischmueller M, Nasonov E, Shmidt E, Emery P, Munafò A. Atacicept in patients with rheumatoid arthritis: results of a multicenter, phase Ib, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating, single- and repeated-dose study. *Arthritis Rheum* 58(1): 61-72, 2008.

- Talal N, Bunim JJ.** The development of malignant lymphoma in the course of Sjögren's syndrome. *Am J Med* 36 : 529-540, **1964**.
- Theander E, Manthorpe R, Jacobsson LT.** Mortality and causes of death in primary Sjögren's syndrome: a prospective cohort study. *Arthritis Rheum* 50(4): 1262-1269, **2004**.
- Theander E, Vasaitis L, Baecklund E, Nordmark G, Warfvinge G, Liedholm R, Brokstad K, Jonsson R, Jonsson MV.** Lymphoid organisation in labial salivary gland biopsies is a possible predictor for the development of malignant lymphoma in primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 70(8): 1363-1368, **2011**.
- Theander L, Strömbeck B, Mandl T, Theander E.** Sleepiness or fatigue? Can we detect treatable causes of tiredness in primary Sjögren's syndrome? *Rheumatology (Oxford)*, 49(6): 1177-1183, **2010**.
- Thery C, Zitvogel L, Amigorena S.** Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2: 569-579, 2002.
- Tobin G, Giglio D, Lundgren O.** Muscarinic receptor subtypes in the alimentary tract. *J Physiol Pharmacol* 60(1): 3-21, **2009**.
- Tobon GJ, Renaudineau Y, Hillion S, Cornec D, Devauchelle-Pensec V, Youinou P, Pers JO.** The Fms-like tyrosine kinase 3 ligand, a mediator of B cell survival, is also a marker of lymphoma in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 62(11): 3447-3456, **2010a**.
- Tobon GJ, Saraux A, Pers JO, Youinou P.** Emerging biotherapies for Sjögren's syndrome. *Expert Opin Emerg Drugs* 15(2): 269-282, **2010b**, revue.
- Tomankova T, Petrek M, Gallo J, Kriegova E.** MicroRNAs: emerging regulators of immune-mediated diseases. *Soumis dans Scand J Immunol*, **2011**.
- Triantafyllopoulou A, Tapinos N, Moutsopoulos HM.** Evidence for coxsackievirus infection in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 50(9): 2897-2902, **2004**.
- Tsunawaki S, Nakamura S, Ohyama Y, Sasaki M, Ikeba-Hiroki A, Hiraki A, Kadena T, Kawamura E, Kumamaru W, Shinohara M, Shirasuna K.** Possible function of salivary gland epithelial cells as nonprofessional antigen-presenting cells in the development of Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 29(9): 1884-1896, **2002**.
- Tzioufas AG, Moutsopoulos HM.** Sjögren's syndrome. In: Hochberg MC, Sllman AJ, Smolen JS, Winblatt ME, Weisman MH. Eds. *Rheumatology*, 3rd edition. London: Mosby: 1431-1443, **2003**.

Tzioufas AG, Voulgarelis M. Update on Sjögren's syndrome autoimmune epithelitis: from classification to increased neoplasias. *Best practice & research clinical rheumatology* 21(6): 989-1010, **2007**, revue.

V

Valtyisdottir ST, Wide L, Hallgren R. Low serum dehydroepandrosterone sulfate in women with primary sjögren's syndrome as an isolated sign of impaired HPA axis function. *J Rheumatol* 28(6): 1259-1265, **2001**.

Van Blokland SC, Van Helden-Meeuwsen CG, Wierenga-Wolf AF, Drexhage HA, Hooijkaas H, Van de Merwe JP, Versnel MA. Two different types of sialoadenitis in the NOD- and MRL/lpr mouse models for Sjögren's syndrome: a differential role for dendritic cells in the initiation of sialoadenitis? *Lab Invest* 80(4): 575-585, **2000**.

Van Blokland SC, Wierenga-Wolf AF, Van Helden-Meeuwsen CG, Drexhage HA, Hooijkaas H, Van de Merwe JP, Versnel MA. Professional antigen presenting cells in minor salivary glands in Sjögren's syndrome: potential contribution to the histopathological diagnosis? *Lab Invest* 80(12): 1935-1941, **2000**.

Varin MM, Le Pottier L, Youinou P, Saulep D, Mackay F, Pers JO. B-cell tolerance breakdown in Sjögren's syndrome: focus on BAFF. *Autoimmun Rev* 9(9): 604-608, **2010**.

Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24(2): 179-189, **2006**.

Vogelsang P, Brun JG, Oijordsbakken G, Skarstein K, Jonsson R, Appel S. Levels of plasmacytoid dendritic cells and type-2 myeloid dendritic cells are reduced in peripheral blood of patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 69(6): 1235-1238, **2010**.

Voulgarelis M, Dafni UG, Isenberg D, Moutsopoulos HM. Malignant lymphoma in primary Sjögren's syndrome: a multicenter, retrospective, clinical study by the European concerted action on Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 42(8): 1765-1772, **1999**.

Von Bülow GU, Bram RJ. NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Science* 278(5335): 138-141, **1997**.

Von Bülow GU, Russell H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Bram RJ. Molecular cloning and functional characterization of murine transmembrane activator

and CAML interactor (TACI) with chromosomal localization in human and mouse. *Mamm Genome* 11(8): 628-632, **2000**.

Von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 24(5): 323-258, **1995**, revue.

Vora KA, Wang LC, Rao SP, Liu ZY, Majeau GR, Cutler AH, Hochman PS, Scott ML, Kalled SL. Cutting edge: germinal centers formed in the absence of B cell-activating factor belonging to the TNF family exhibit impaired maturation and function. *J Immunol* 171(547-551), **2003**.

Voulgarelis M, Tzioufas AG. Pathogenetic mechanisms in the initiation and the perpetuation of Sjögren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol* 6(9): 529-537, **2010**, revue.

W

Waterhouse JP, Doniach I. Post-mortem prevalence of focal lymphocytic adenitis of the submandibular salivary gland. *J Pathol Bacteriol* 91(1): 53-64, **1966**.

Waterman SA, Gordon TP, Rischmueller R. Inhibitory effects of muscarinic receptor autoantibodies on parasympathetic neurotransmission in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 43(7): 1647-1654, **2000**.

Wen S, Shimizu N, Yoshiyama H, Mizugaki Y, Shinozaki F, Takada K. Association of Epstein-Barr virus (EBV) with Sjögren's syndrome: differential EBV expression between epithelial cells and lymphocytes in salivary glands. *Am J Pathol* 149(5): 1511-1517, **1996**.

Wheaton K, Riabowol K. Protein kinase C delta blocks immediate-early gene expression in senescent cells by inactivating serum response factor. *Mol Cell Biol* 24(16): 7298-7311, **2004**.

Wildenberg ME, Helden-Meeuwsen SG, Van de Merwe JP, Drewhage HA, versnel MA. Systemic increase in type I interferon activity in Sjögren's syndrome: a putative role for plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 38(7): 2024-2033, **2008**.

Wolfe F, Cathey MA, Roberts FK. The latex test revisited. Rheumatoid factor testing in 8,287 rheumatic disease patients. *Arthritis Rheum* 34(8): 951-960, **1991**.

Wouters D, Van Schouwenburg P, Van der Horst A, De Boer M, Schooneman D, Kuijpers TW, Aarden LA, Hamann D. High-throughput analysis of the C4 polymorphism by a combination of MLPA and isotype-specific ELISA's. *Mol Immunol* 46(4): 592-600, **2009**.

Wu Y, Bressette D, Carrell JA, Kaufman T, Feng P, Taylor K, Gan Y, Cho YH, Garcia AD, Gollatz E, Dimkell D, LaFleur D, Migone TS, Nardelli B, Wei P, Ruben SM, Ullrich SJ, Olsen HS, Kanakaraj P, Moore PA, Baker KP. Tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily member TACI is a high affinity receptor for TNF members APRIL and BLyS. *J Biol Chem* 275(45): 35478-35485, **2000**.

X

Xanthou G, Polihronis M, Tzioufas AG, Paikos S, Sideras P, Moutsopoulos HM. « Lymphoid » chemokine messenger RNA expression by epithelial cells in the chronic inflammatory lesion of the salivary glands of Sjögren's syndrome patients: possible participation in lymphoid structure formation. *Arthritis Rheum* 44(2): 408-418, **2001**.

Xanthou G, Tapinos NI, Polihronis M, Nezis IP, Margaritis LH, Moutsopoulos HM. CD4 cytotoxic and dendritic cells in the immunopathologic lesion of Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 118(1): 154-163, **1999**.

Xia XZ, Treanor J, Senaldi G, Khare SD, Boone T, Kelley M, Theill LE, Colombero A, Solovyev I, Lee F, McCabe S, Elliott R, Miner K, Hawkins N, Guo J, Stolina M, Yu G, Wang J, Delaney J, Meng SY, Boyle WJ, Hsu H. TACI is a TRAF-interacting receptor for TALL-1, a tumor necrosis factor family member involved in B cell regulation. *J Exp Med* 192(1): 137-143, **2000**.

Xu LG, Shu HB. TNFR-associated factor -3 is associated with BAFF-R and negatively regulates BAFF-R-mediated NFκB activation and IL-10 production. *J Immunol* 169(12): 6883-6889, **2002**.

Y

Yan Z, Young AL, Hua H, Xu Y. Multiple oral *Candida* infections in patients with Sjögren's syndrome: Prevalence and clinical and drug susceptibility profiles. *J Rheumatol* 38(11): 2428-2431, **2011**.

Ye Q, Wang L, Wells AD, Tao R, Han R, Davidson A, Scott ML, Hancock WW. BAFF binding to T cell-expressed BAFF-R costimulates T cell proliferation and alloresponses. *Eur J Immunol* 34(10): 2750-2759, **2004**.

Yin H, Zhao M, Wu X, Gao F, Luo Y, Ma L, Liu S, Zhang G, Chen J, Li F, Zuo X, Lu Q. Hypomethylation and overexpression of CD70 (TNFSF7) in CD4+ T cells of patients with primary Sjögren's syndrome. *J Dermatol Sci* 59(3): 198-203, **2010**.

Yoshida K, Liu H, Miki Y. Protein kinase C delta regulates Ser46 phosphorylation of p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage. *J Biol Chem* 281(9): 5734-5740, **2006**.

Yoshida K, Wang HG, Miki Y, Kufe D. Protein kinase C delta is responsible for constitutive and DNA damage-induced phosphorylation of Rad9. *EMBO J* 22(6): 1431-1441, **2003**.

Youinou P, Pers JO. The late news on BAFF in autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews* 9, 804-806, **2010**, revue.

Yuan ZM, Utsugisawa T, Ishiko T, Nakada S, Huang Y, Kharbanda S, Weichselbaum R, Kufe D. Activation of protein kinase C delta by the c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Oncogene* 16(13): 1643-1648, **1998**.

Z

Zintzaras E, Voulgarelis M, Moutsopoulos HM. The risk of lymphoma development in autoimmune diseases : a meta-analysis. *Arch Intern Med* 165(20): 2337-2344, **2005**.

Ziza JM. Syndrome de Gougerot-Sjögren. Godeau P, Herson S, Piette JC. *Traité de médecine*, 4è édition. *Médecine-Sciences Flammarion Paris*, tome 1, chapitre 16 : 160-170, **2004**.