



**HAL**  
open science

# Altérations du méthylome au cours du Syndrome de Gougerot Sjögren

Amandine Charras

► **To cite this version:**

Amandine Charras. Altérations du méthylome au cours du Syndrome de Gougerot Sjögren. Médecine humaine et pathologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2018. Français. NNT : 2018BRES0049 . tel-02049354

**HAL Id: tel-02049354**

**<https://theses.hal.science/tel-02049354v1>**

Submitted on 26 Feb 2019

**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 DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE  
DE BRETAGNE OCCIDENTALE  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605  
*Biologie Santé*  
Spécialité : *Immunologie*

Par

**Amandine CHARRAS**

## **Altérations du méthylome au cours du Syndrome de Gougerot Sjögren**

**Thèse présentée et soutenue à Brest, le 8 octobre 2018**  
**Unité de recherche: UMR 1227- Lymphocyte B et autoimmunité**

### **Rapporteurs avant soutenance :**

Pr Xavier MARIETTE                      PU-PH, Université Paris Sud, Paris  
Pr Marie-Pierre BUISINE                PU-PH, Université Lille 2, Lille

### **Composition du Jury :**

Président :	Pr Xavier MARIETTE	PU-PH, Université Paris Sud, Paris
Examineurs :	Pr Marie-Pierre BUISINE	PU-PH, Université Lille 2, Lille
Dir. de thèse :	Pr Yves RENAUDINEAU	PU-PH, Université Bretagne Occidentale, Brest
Co-dir. de thèse :	Pr Anne BORDRON	PU, Université Bretagne Occidentale, Brest

Si nous savions ce que nous faisons, on n'appellerait pas ça de la recherche, non ?

**Albert Einstein**

# Remerciements

Ce manuscrit vient clore un travail de 3 ans et une expérience riche et il est temps pour moi d'exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué à sa réalisation de près comme de loin.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Xavier Mariette et le Professeur Marie-Pierre Buisine, pour avoir accepté de faire partie de ce jury et d'évaluer ce travail.

Un grand merci au Professeur Yves Renaudineau et au Professeur Anne Bordron qui m'ont permis de réaliser cette thèse. Je voudrais les remercier tout particulièrement pour la confiance qu'ils m'ont accordé pour mener à bien ce projet, pour avoir cru en mon profil atypique et leur accompagnement tout au long de ces trois années.

Je voudrais ensuite exprimer ma reconnaissance au Professeur Jacques-Olivier Pers pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres du laboratoire d'immunologie mais aussi ceux qui l'ont quitté entre temps pour leur accueil, leurs conseils et leur bonne humeur.

Merci aux chercheurs, Christelle Le Dantec, Sophie Hillion et Laëtitia Le Pottier pour leurs aides et conseils techniques, mais également Patrice Hémon, Christophe Jamin et Olivier Mignen pour leur conseils lors des séminaires. Merci aux techniciennes, Nelly, Christine, Sylvie, Carole et Christine pour leur gentillesse.

Merci à Simone et Geneviève pour leur bienveillance ainsi que pour l'aide qu'elles m'ont apporté pour la mise en forme de ce manuscrit. Désolée, Geneviève pour le stress que je t'ai procuré dans les 2 dernières semaines de rédaction.

Merci à Stéphanie pour son aide dans la dernière ligne droite de ce travail.

Merci à Pierre pour son aide et sa disponibilité, j'ai finalement fait « un peu plus » de cytométrie que prévu.

Merci à toute l'équipe de techniciennes, doctorants, post-doctorants, master2, super héros, petits poussins, passés et actuels pour leur bonne humeur, les fous rires, les bons moments passés aux laboratoires ainsi qu'à l'extérieur et pour leur soutien dans les moments de doute. Je ne vous nomme pas par peur de faire des oublis mais le cœur y est. Je suis sûre que j'aurais l'occasion future de vous remercier individuellement. Petite pensée pour Papuche/Boudigou/Marina et Nathan et leurs tentatives de distractions lors de la phase finale de rédaction.

Enfin, je remercie tout spécialement ma famille et mes amis pour le soutien qu'ils ont pu m'apporter. Merci à mes parents et mes sœurs, sans leur aide, leurs encouragements et leur appui tout au long de ces années d'étude, je n'aurais pas pu aller au bout de cette aventure.

# Table des matières

<b>Table des matières</b> .....	<b>4</b>
<b>Liste des illustrations</b> .....	<b>8</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>9</b>
<b>Liste des Abréviations</b> .....	<b>10</b>
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>14</b>
<b>Les modifications épigénétiques</b> .....	<b>15</b>
<b>I. Qu'est-ce que l'épigénétique ?</b> .....	<b>15</b>
<b>II. Les différentes modifications épigénétiques et leurs rôles</b> .....	<b>17</b>
A. La méthylation de l'ADN .....	19
1. La mise en place de la méthylation.....	19
a) Les DNA Methyl Transferases.....	19
i. DNMT1 .....	23
ii. DNMT2 : TRDMT1 (tRNA (cytosine-5) -methyltransferase) .....	23
iii. DNMT3A/B .....	24
2. Rôle de la méthylation de l'ADN .....	25
i. Le promoteur .....	26
ii. Le corps du gène .....	27
iii. Les régions intergéniques .....	28
B. La déméthylation de l'ADN .....	33
3. La déméthylation passive de l'ADN .....	33
4. La déméthylation active de l'ADN .....	33
5. Rôle de la déméthylation de l'ADN.....	37
i. La reprogrammation épigénétique .....	37
ii. Le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire .....	39
iii. Le vieillissement .....	39
i. Le promoteur .....	41
ii. Les éléments de régulation à distance.....	41
iii. Le corps du gène .....	43
<b>Le Syndrome de Gougerot Sjögren</b> .....	<b>44</b>
<b>I. Signes cliniques, diagnostiques et épidémiologie</b> .....	<b>44</b>
A. Signes Cliniques.....	44
1. Les principales caractéristiques de la pathologie .....	44
2. Les complications au niveau d'autres organes .....	45
B. Outils pour le diagnostic .....	46
1. 2002-AECG .....	46
2. 2012-ACR (American College of Rheumatology) .....	47
3. 2016-ACR/EULAR .....	48
C. Epidémiologie .....	49
<b>II. Focus sur la glande salivaire et son atteinte</b> .....	<b>49</b>
A. Structure et fonction de la glande salivaire .....	50

<b>III. Etiologie.....</b>	<b>53</b>
A. 2 théories autour de l'origine de la pathologie.....	53
1. Un épithélium au cœur de la pathologie.....	53
2. Implication de mécanismes neuro-endocriniens.....	54
B. Facteurs environnementaux.....	55
C. Facteurs génétiques.....	56
<b>IV. Physiopathologie.....</b>	<b>57</b>
A. Implication du système immunitaire inné.....	57
1. Cellules dendritiques.....	57
2. Macrophages.....	58
3. Les monocytes.....	58
4. Cellules NK.....	59
B. Implication du système immunitaire adaptatif.....	59
1. Lymphocytes T.....	60
2. Lymphocytes B.....	62
C. Cellules épithéliales de la glande salivaire.....	63
<b>V. Un micro-environnement pro-inflammatoire au sein de la glande salivaire.....</b>	<b>67</b>
A. Une signature interféron.....	67
B. Production de cytokines pro-inflammatoire.....	69
C. Stress oxydatif.....	71
D. Dérégulation de la voie NFκB.....	73
E. Implication de la voie TGFβ.....	74
<b>VI. Transformation d'un SGS en lymphome du MALT.....</b>	<b>75</b>
<b>Epigénome et Syndrome de Gougerot Sjögren.....</b>	<b>76</b>
<b>Objectifs.....</b>	<b>82</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>84</b>
<b>Article 1.....</b>	<b>85</b>
<b>Cell-specific epigenome-wide DNA methylation profile in long-term cultured minor salivary gland epithelial cells from patients with Sjögren's syndrome.....</b>	<b>85</b>
I. Introduction et objectifs.....	85
II. Démarche expérimentale.....	86
III. Résultats - Conclusions.....	86
<b>Article 2.....</b>	<b>96</b>
<b>Defective DNA methylation in salivary gland epithelial acini from patients with Sjögren's syndrome is associated with SSB gene expression, anti-SSB/LA detection, and lymphocyte infiltration.....</b>	<b>96</b>
I. Introduction et objectifs.....	96
II. Démarche expérimentale.....	97
III. Résultats - Conclusions.....	97
<b>Article 3.....</b>	<b>107</b>

<b>Epigenetic modifications in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome affect cytokeratin 19 expression.....</b>	<b>107</b>
<b>I. Introduction et objectifs .....</b>	<b>107</b>
<b>II. Démarche expérimentale.....</b>	<b>107</b>
<b>III. Résultats - Conclusions .....</b>	<b>108</b>
<b>Article 4.....</b>	<b>119</b>
<b>An <i>in silico</i> approach reveals associations between genetic and epigenetic factors within regulatory elements in B cells from primary Sjögren's syndrome patients .....</b>	<b>119</b>
<b>I. Introduction et objectifs .....</b>	<b>119</b>
<b>II. Démarche expérimentale.....</b>	<b>120</b>
<b>III. Résultats - Conclusions .....</b>	<b>120</b>
<b>Résultats 5 .....</b>	<b>134</b>
<b>Influence du microenvironnement inflammatoire sur le contrôle des processus de méthylation/déméthylation de l'ADN dans les cellules épithéliales de glandes salivaires .....</b>	<b>134</b>
<b>I. Introduction .....</b>	<b>134</b>
<b>II. Matériel et Méthodes.....</b>	<b>136</b>
A. Le matériel biologique .....	136
1. Culture cellulaire.....	136
2. Les différents traitements .....	136
<b>Traitement</b> .....	136
B. Techniques moléculaires .....	137
1. Analyse quantitative par qRT-PCR .....	137
2. Western Blot.....	138
3. Cytométrie en flux .....	139
<b>III. Résultats .....</b>	<b>143</b>
A. Impact de l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sur la méthylation et l'hydroxyméthylation de l'ADN .....	143
1. Au niveau transcriptionnel.....	143
2. Au niveau protéique .....	144
3. Au niveau de l'ADN .....	145
4. Impact sur la viabilité et le cycle cellulaire .....	146
B. Impact de l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sur la voie Jak-Stat .....	147
1. Impact de l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sur STAT1 et STAT3 .....	147
2. Impact des inhibiteurs de Jak sur l'activation de STAT3 par l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	148
C. Effets de AG490 et Jakavi sur les enzymes DNMTs et TETs .....	149
D. Effet de la voie Jak/STAT3 sur la génération intracellulaire des ROS .....	150
E. Gènes cibles .....	151
1. ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1).....	151
2. PDL-1 (Programmed death-ligand 1) .....	152
A. IFNs et voie Jak-Stat .....	154
B. IFNs et enzymes DNMTs et TETs.....	155
C. IFNs et méthylation/hydroxyméthylation de l'ADN .....	157

D. Effets des IFN sur la génération des ROS .....	157
E. Effets sur les gènes cibles .....	158
<b>IV. Conclusion/Discussion.....</b>	<b>160</b>
<b>V. Bibliographie .....</b>	<b>162</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>164</b>
<b>I. Etablissement d'un lien entre les voies physiologiquement importantes et l'altération de la méthylation de l'ADN constatée .....</b>	<b>166</b>
A. La voie calcique .....	166
B. La voie WNT .....	167
C. Les voies interférons .....	168
<b>II. Les mécanismes d'actions en jeu.....</b>	<b>170</b>
A. Les facteurs génétiques et leurs liens avec les facteurs épigénétiques .....	170
B. Les altérations du méthylome/hydroxyméthylome et leur origine.....	171
<b>III. Régulation de l'expression de deux gènes sensibles à la méthylation (SSB et cytokératine 19) .....</b>	<b>173</b>
A. SSB/La.....	173
B. Cytokératine 19.....	173
<b>IV. Perspectives.....</b>	<b>174</b>
<b>V. Conclusions .....</b>	<b>176</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>178</b>
<b>Annexe 1.....</b>	<b>179</b>
<b>Annexe 2.....</b>	<b>182</b>
<b>Annexe 3.....</b>	<b>202</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>211</b>



# Liste des illustrations

Figure 1 :Représentation du paysage épigénétique vue par Conrad H Waddington. ....	15
Figure 2: les différentes étapes de compaction de l'ADN.....	18
Figure 3: Les 3 mécanismes epigenetiques principalement étudiés. ....	18
Figure 4: Cycle de méthylation et de demethylation de l'ADN.....	19
Figure 5 : Domaines et structures conservés des DNMTS. ....	20
Figure 6: Mécanisme catalytique des DNMTS issu de Lyko 2017. ....	22
Figure 7: Impact de facteurs extérieurs sur la méthylation de l'ADN.....	22
Figure 8: Modèle d'imprinting au locus IGF2-H19. ....	26
Figure 9: Corpuscule de Barr indiqué par les flèches chez l'individu de sexe féminin. ....	26
Figure 10: La méthylation de l'ADN a un impact sur l'épissage alternatif . ....	30
Figure 12:modèle de séquestration de DNMT1 propose par Di Ruscio et al. 2013 .....	32
Figure 13: Structure des TETs .....	34
Figure 14: Déméthylation active de l'ADN par la voie TETs/TDG/BER .....	36
Figure 15:Reprogrammation épigénétique .....	38
Figure 16: Rôle possible de la marque 5hmC dans le corps du gène.....	43
Figure 17: critères de diagnostic du syndrome de gougerot sjogren selon l'AECG en 2002.....	46
Figure 18: Critères de diagnostic du syndrome de gougerot sjogren selon ACR en 2012 .....	47
Figure 19:Localisation des 3 glandes salivaires principales chez l'Homme (A) et la souris (B) .....	50
Figure 20:illustration d'une unite productrice de salive .....	51
Figure 21:Un épithélium au cœur de l'inflammation et du processus pathologique. ....	53
Figure 22: Différenciation des Lymphocytes T CD4+ .....	60
Figure 23: Les Lymphocytes T folliculaire helper. ....	62
Figure 24: détails de la voie NFkB .....	65
Figure 25: Synthèse du rôle des SGECs et des acteurs immunitaires dans la pathogenèse du SGS.....	66
Figure 26: Illustration du ratio IFN $\gamma$ /IFN $\alpha$ proposé par Nezos et al 2015 .....	69
Figure 27:principe de la netose .....	72
Figure 28: miRNAs prédit lors de l'étude de Williams et al 2016, qui ciblent la voie TGF $\beta$ .....	74
Figure 29:les acteurs calciques impliqués dans l'établissement du flux salivaire. ....	166
Figure 30: une régulation interféron de type I est observé pour le groupe SGS tandis qu'il s'agirait d'une régulation de type 2 pour le groupe SGS+MALT.....	169
Figure 31: les différentes régions géniques .....	170
Figure 32: Lien entre l'activation des TETs et l'inhibition des DNMTs imaginé au niveau des cellules épithéliales de la glande salivaire. ....	172
Figure 33: Collecte de SGECs de patients SGS et de patients contrôle.....	174
Figure 34: principe de l'analyse de l'hydroxyméthylation de l'ADN qui sera utilisé.....	174
Figure 35: principe du traitement au bisulfite de sodium .....	175
Figure 36: Figure Finale.....	176

# Liste des tableaux

Tableau 1.	Description des différentes DNMTs chez l'Homme.....	21
Tableau 2.	les différentes protéines TETs.....	35
Tableau 3.	Critères de Classification du syndrome de Gougerot Sjögren 2016.....	48
Tableau 4.	Liste des différentes cytokines et chémokines pro-inflammatoires. ....	70

# Liste des Abréviations

2OG : oxoglutarate	CEPBA: CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha
5caC= 5 carboxylcytosine	CGI: Ilots CpG
5fC= 5 formylcytosine	Cl- : chlorure
5hmC= 5 hydroxy méthyl-cytosine	CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
5mC= 5 méthyl-cytosine	CMV : cytomégalovirus
ACR : <i>American College of Rheumatology</i>	CMV: cytomégalovirus
ACTH : Adréno Cortico Trophic Hormone	CTCF: CCCTC-binding
ADD: ATRX-DNMT3-DNMT3L	CUL4: Cullin 4
ADN: acide désoxyribonucléotidique	CXCL13 : chemokine (C-X-C motif) ligand 13
AECG : <i>American-European Consensus Group</i>	CXCR5:C-X-C chemokine receptor type 5
ANA : anticorps anti-ADN	CXXC: domaine zing finger
ARN pol II: ARN Polymérase II	DBP: DNA Binding Proteins
ARN: Acide RiboNucléique	DCir : DC immunoreptor
ARNt: ARN de transfert	DCs :cellules dendritiques classiques
ATM:Ataxia Telangiectasia Mutated	DDB1: Damage Specific DNA Binding Protein 1
ATRX: ATP-dependent helicase ATRX	DMRS : régions différenciellement méthylés
B7H6: Natural Killer Cell Cytotoxicity Receptor 3 Ligand 1	DNMT : DNA Methyl Transferase
BAFF : B-cell activating factor	DSBH : Double Stranded $\beta$ Helix
BAFF :B-cell activating factor	dsRNA : double stranded RNA
BAFF: B-cell activating factor	EBV : Virus d'Epstein Barr
BCR : B-cell receptor	EBV : Virus d'Epstein Barr
BER: Base Excision Repair	EGCG : gallate d'épigallocatechine
C-C:carbone-carbone	ESCs : cellules souches embryonnaires
CCL17, CCL19, CCL21 et CCL22 : Chemokine (C-C motif) ligand 17, 19, 21 et 22	FasL : Fas Ligand
CD40L : CD40 ligand	FISH : Fluorescence In Situ Hybridization

FLT3: FMS like tyrosine kinase 3  
 FOXp3 : forkhead box P3  
 FT : facteurs de transcription  
 G : Guanine  
 H+ : proton  
 H2O2 : peroxyde d'hydrogène  
 H3K27ac : acétylation de la lysine 27 de l'histone 3  
 H3K9me3 : Histone 3 triméthylé au niveau de la lysine 9  
 HDAC : Histone déacétylase  
 HHV-6,7,8: Herpes Virus Humain  
 HLA :*Human Leukocyte Antigen*  
 hnRNPs : heteronuclear ribonucleoprotein  
 HOCl : acide hypochloreux  
 HRV 5 : RhinoVirus Humain 5  
 HRV 5 :RhinoVirus Humain 5  
 HSAN1E: neuropathie héréditaire sensitive et autonome de type I  
 HTLV-1 : Virus T Lymphtropique Humain 1  
 HTLV-1 : Virus T Lymphtropique Humain 1  
 HUGO: HUman Genome Organization  
 I : intermediately  
 ICAM: Intercellular adhesion molecule  
 ICF: Immunodeficiency Centromeric region instability, Facial anomalies  
 ICOS : Inducible T-cell COStimulator  
 ICR : Imprinting Control Region  
 ID3: *Inhibitor Of DNA Binding 3*  
 IFN $\alpha$ : interféron alpha  
 IFN $\gamma$ : interféron gamma  
 IFN $\gamma$ R : IFN $\gamma$  Récepteur  
 IL-10,21,12,4,17 : Interleukine 10, 21,12,4,17  
 IL12 : Interleukine 12  
 IL12A: Interleukine 12  
 IL12A: Interleukine 12A  
 IL17 :Interleukine17  
 IL23 : interleukine 23  
 IL-23R: Interleukine-23 recepteur  
 IL6 : interleukine 6  
 IMAO : inhibiteurs de monoamine oxydase  
 iNOS : oxyde nitrique synthase  
 IRF5: Interferon Regulatory Factor 5  
 ISRS : Inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine  
 I $\kappa$ B $\alpha$  : nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha  
 JBP1 :J binding protein 1  
 K : lysine  
 KO :Knock-Out  
 KO : *Knock Out*  
 LAD : régions du génome associées aux lamines  
 LB : lymphocytes B  
 LI: low intermediately  
 LMRs : Low Methylation Regions  
 LSH: Lymphoid Specific Helicase  
 LT : lymphocytes T  
 LTh17: Lymphocytes T helper17

LTR: Long Terminal Repeat sequence

MAI : maladies autoimmunes

MALT : lymphome B des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses

MBPs : Methyl Binding Proteins

MEC : matrice extracellulaire

MeCP2 : methyl CpG binding protein 2

mESCs : cellules souches embryonnaires de souris

miRNAs : micro ARNs

MMPs : métalloprotéinase

MPO: Myeloperoxidase

MSG : glandes salivaires mineures

Mx1: MX Dynamin Like GTPase 1

NADPH oxydase : Nicotinamide Adénosine Dinucléotide Phosphate oxydase

NCF1 : Neutrophil Cytosolic Factor 1

NCR3: Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 3

NFκB: nuclear factor-kappa B

NO: monoxyde d'Azote

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> :anion nitrite

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> :nitrate

NOD :Nucleotide binding Oligomerization Domain

NOD : non obese diabetic

O<sub>2</sub><sup>-</sup> : ion superoxyde

PAMPs : motifs moléculaires associés aux pathogènes

PBD : PCNA Binding Domain

PBMCs : cellules mononuclées du sang périphérique

PCQ :Proline-Cystéine-Glutamate

PD-1 : Programmed cell death 1

pDCs : cellules dendritiques plasmacytoïdes

PGCs :Primordial Germ Cells

PKCδ :Protein Kinase C delta

PRRs : Pattern Recognition Receptors

pSS : *primary* Sjögren's Syndrome

PWWP : Proline-tryptophane-tryptophane-Proline

R : Arginine

RCS : Espèce Carbonyl Réactive

RdDM : RNA directed DNA Methylation

RFTS : Replication Foci Targeting Sequence

RNS : espèces réactives de l'azote

ROC1: RING of Cullins

ROS : espèces réactives de l'oxygène

S : Sérine

SAH: S-Adénosyl Homocysteine

SAM (ou AdoME): S-adénosyméthionine

SAP : serum amyloid P component

SGEC: Salivary gland epithelial cell

SGS : syndrome de Gougerot Sjögren

SINE: Long and Small Interspersed Element

SMUG1 : single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase 1

SNP : Single Nucleotid Polymorphism.

SRA : SET and RING Associated

SRSF1: serine and arginine rich splicing factor 1

sSS : secondary Sjögren's Syndrome

STAT4: Signal Transducer and Activator of Transcription 4

T : Thymine

TDG : thymine DNA glycosylase

Tet: ten-eleven-translocation

TFBS : Site de Fixation aux Facteurs de Transcription

Tfh : Lymphocytes T folliculaire helper

Th1 : Lymphocytes T helper

TLR : Toll Like Receptor

TNFAIP3: TNF Alpha Induced Protein 3, A20

TNFRSF13C : récepteur de BAFF

TNIP1: TNFAIP3-interacting protein 1

Treg : Lymphocytes T régulateurs

TSS : Site d'initiation de la transcription

U : Uracile

UHRF: Ubiquitin like containing PHD and RING finger domains 1

VCAM: vascular cell adhesion molecule 1

VprBP : Vpr Binding Protein

# INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

# Les modifications épigénétiques

## I. Qu'est-ce que l'épigénétique ?

La difficulté à donner une définition précise pour l'épigénétique vient du fait que ce terme recouvre des phénomènes très dissemblables et qu'il a été introduit à deux reprises au cours du 20<sup>ème</sup> siècle.

Ainsi, le terme épigénétique a été défini pour la première fois en 1942 par l'embryologiste et philosophe anglais Conrad H. Waddington, dont l'objet d'étude était de comprendre le rôle des gènes dans le développement. Par son travail il a cherché à comprendre comment s'opérait le passage du génotype au phénotype au cours de l'évolution. Pour Waddington, ses théories étaient une manière de critiquer la génétique qui selon lui ne remplissait pas son objet d'étude. En effet, dans les années 1940s, la génétique consistait en une cartographie des gènes sur les chromosomes. Sa conception est celle du paysage épigénétique et des processus conduisant des gènes aux caractères observables. L'image du paysage épigénétique est particulièrement

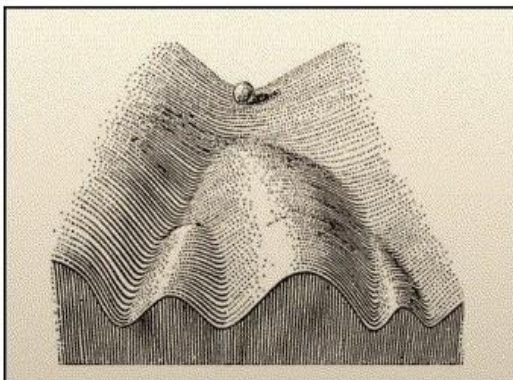


Figure 1 : Représentation du paysage épigénétique vue par Conrad H Waddington.

révélatrice de ses conceptions : les gènes dessinent des vallées que les cellules parcourent, lorsqu'elles se différencient, comme des rivières coulent le long d'une vallée. Ici la balle représente une cellule. Les différents couloirs de la vallée représentent des destins cellulaires distincts dans lesquels la petite balle peut s'engager. Ainsi au début de son parcours, plusieurs choix s'offrent à

elle, mais une fois qu'une voie est choisie, le retour est impossible. Dès sa conception, l'épigénétique est donc une réaction à « l'insuffisance » de la génétique dans l'explication du développement des organismes.

Le deuxième sens du mot épigénétique, dominant aujourd'hui, se forma petit à petit au cours des années 1970s. Il s'agit ainsi d'expliquer les différents processus moléculaires d'activation et d'inactivation de l'expression des gènes qui sont observés et qui ne sont pas dus à un changement de la séquence d'ADN (acide désoxyribonucléotidique). Ainsi, de façon rétrospective, il était possible d'expliquer certaines particularités génétiques telles que le



modèle de l'opéron présenté par François Jacob et Jacques Monod dans les années 1960s. En effet, ce premier modèle moléculaire de la régulation des gènes était incomplet pour expliquer les mécanismes de contrôle de l'activité des gènes au cours du développement embryonnaire.

En parallèle, la découverte de la structure en double hélice de l'ADN en 1953 et celle du code génétique ont conduit à imaginer que le séquençage du génome (lecture du génome et établissement de son écriture, c'est-à-dire la succession des lettres A, T, C et G) était suffisant pour expliquer le fonctionnement d'un organisme, le génome constituant ainsi un livre où tout semblait être inscrit. C'est dans cette optique qu'a eu lieu en 2003 le séquençage du génome humain. Le début des années 2000 correspond à l'aboutissement de projets d'envergures internationales de séquençage du génome humain (HUGO, *HUMAN Genome Organization* ; et lancé plus tardivement par Celera Genomics), parus dans *Nature* et *Science*. Mais les grandes révélations attendues n'étaient pas au rendez-vous puisqu'il était toujours impossible d'expliquer la complexité et le fonctionnement du vivant. Ainsi, les résultats ne permettaient pas de répondre notamment à la question posée quelques années auparavant par le généticien américain Thomas Hunt Morgan : « si les caractères de l'individu sont déterminés par les gènes, pourquoi toutes les cellules d'un organisme ne sont-elles pas identiques ? »

Notre génome est un long filament d'ADN de 2 mètres de long qui renferme 22000 gènes, soit deux fois moins que celui de la paramécie, un organisme « simple » au regard de l'Homme. Ces données semblent donc apporter plus de questions que de réponses initialement posées. C'est dans cette perspective qu'intervient la notion d'épigénétique qui va ainsi sortir de son cadre classique d'étude à savoir l'étude du développement embryonnaire et de la différenciation des cellules de l'organisme pour fournir une explication à la complexité du vivant en s'intéressant aux mécanismes de « modulation » à l'expression des gènes.

Une définition non conventionnelle de l'épigénétique donnée par Thomas Jenuwein du Max Planck, Fribourg, Allemagne, est la suivante : « On peut sans doute comparer la distinction entre la génétique et l'épigénétique à la différence entre l'écriture d'un livre et sa lecture. Une fois que le livre est écrit, le texte (les gènes ou l'information stockée sous forme d'ADN) sera le même dans tous les exemplaires distribués au public. Cependant, chaque lecteur d'un livre donné aura une interprétation légèrement différente de l'histoire... D'une manière très comparable, l'épigénétique permettrait plusieurs lectures d'une matrice fixe (le livre ou le code

génétique), donnant lieu à diverses interprétations, selon les conditions dans lesquelles on interroge cette matrice. »

Pour finir, nous retenons la définition actuelle de l'épigénétique qui est la suivante : il s'agit des modifications chimiques réversibles et héréditaires de la chromatine et de l'ADN qui participent à la régulation de l'expression des gènes et à la stabilité du génome sans changer la séquence primaire de l'ADN (Berger et al., 2009; Bird, 2007; Deans and Maggert, 2015; Russo et al., 1996).

## II. Les différentes modifications épigénétiques et leurs rôles

L'ADN se trouve sous forme compacté dans le noyau, d'un facteur 10000, pour former la chromatine dont l'unité élémentaire est le nucléosome. Ce dernier comporte 146 paires de bases enroulées autour d'un octamère d'histones qui est constitué de deux exemplaires de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4. Le nucléosome est donc un des complexes ADN-protéines très stable en condition physiologique dont l'une des fonctions est d'assurer la compaction de l'ADN. Toutefois son rôle ne se résume pas en une structure statique dans laquelle l'ADN serait séquestré (Wolffe and Guschin, 2000). Bien au contraire, il s'agit d'une entité dynamique, qui peut être modifiée dans sa composition, sa structure, ainsi que sa position sur l'ADN. Ces propriétés sont régulées par de nombreux complexes protéiques.

En conséquence, la dynamique de cette structure mais aussi son agencement le long de la double hélice d'ADN, joue un rôle dans le degré d'accessibilité de l'ADN, et peut réguler de nombreux processus biologiques au sein de la cellule eucaryote. Ci-dessous cette image illustre les différentes étapes de cette compaction de l'ADN (Annunziato, A. (2008) DNA Packaging : Nucleosomes and Chromatin. Nature Education 1(1) :26)

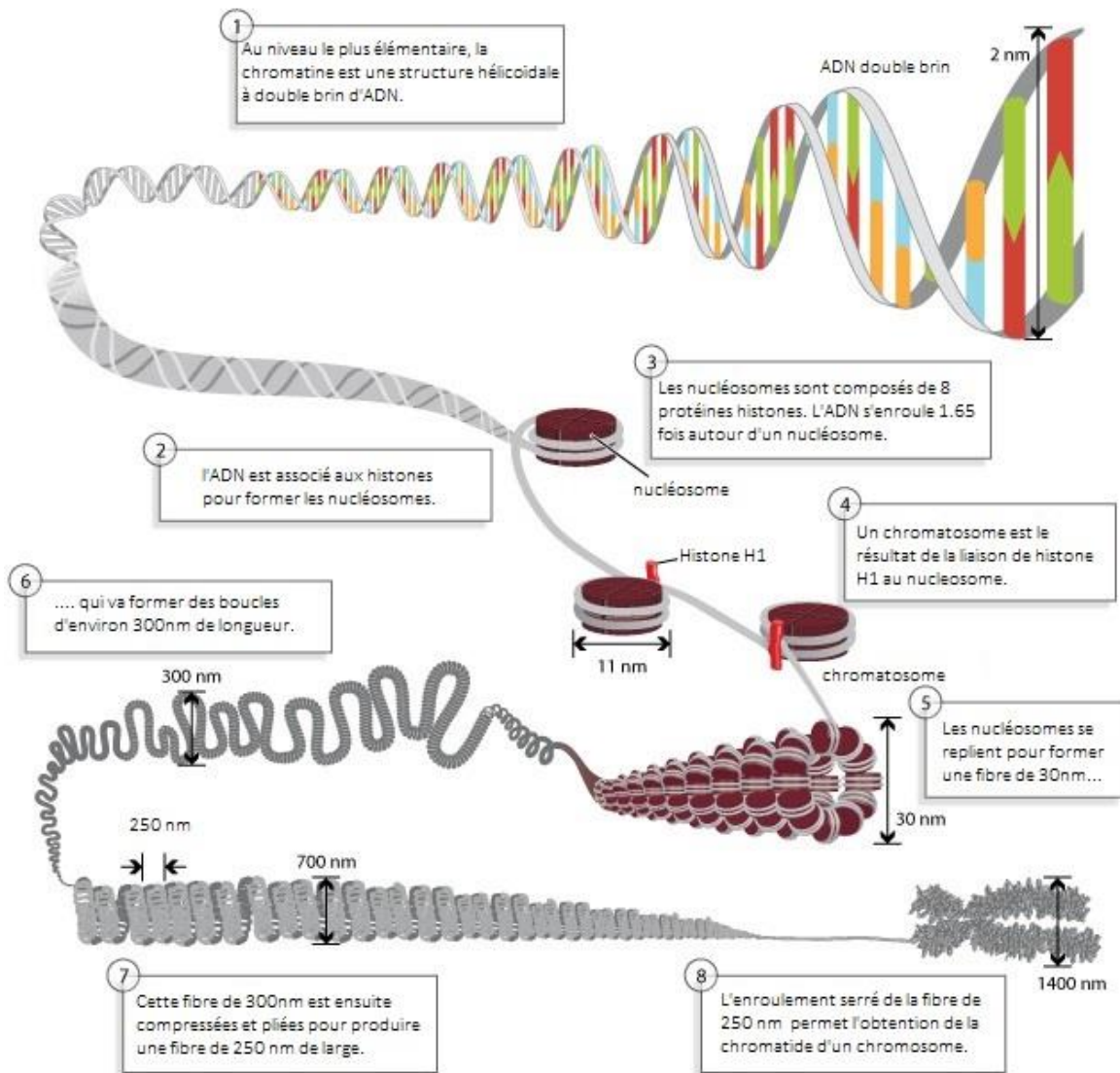


Figure 2: les différentes étapes de compaction de l'ADN.

Ainsi, lorsqu'on étudie des mécanismes épigénétiques, on s'intéresse aux mécanismes qui vont affecter cette compaction et donc l'accessibilité de l'ADN et la transcription des gènes. Comme

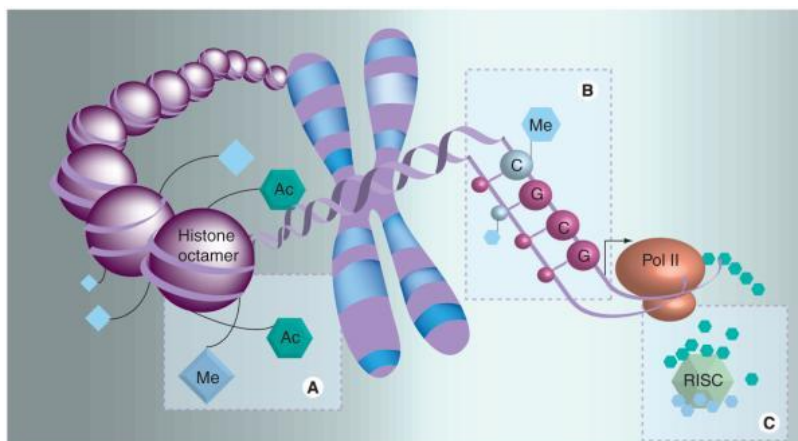


Figure 3: Les 3 mécanismes épigénétiques principalement étudiés.

cela est illustré dans la **Figure 3** (Jeffries and Sawalha, 2011), trois mécanismes sont principalement étudiés : il s'agit en (A) des modifications post-traductionnelles des histones chargées de la compaction de l'ADN, en (B) de l'état de méthylation

de l'ADN lui-même qui affecte la fixation des protéines nucléaires et en (C) des petits ARNs (Acide RiboNucléique) dont la fonction est de contrôler la stabilité des ARN messagers.

## A. La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est un processus épigénétique clé, qui est impliqué dans de nombreux processus cellulaires, telle que la différenciation, le *silencing* des éléments transposables, l'*imprinting* et la carcinogenèse (Shen and Laird, 2013; Smith and Meissner, 2013). Comme illustrée sur la **Figure 4** ci-dessous la méthylation de l'ADN chez les mammifères consiste principalement en l'ajout d'un groupement méthyl au niveau du carbone 5 des cytosines et ceci dans un contexte où la cytosine est suivie par une guanine. Cette action est réalisée par un groupe d'enzymes que sont les DNMTs pour DNA Methyl Transferase. Ce mécanisme de

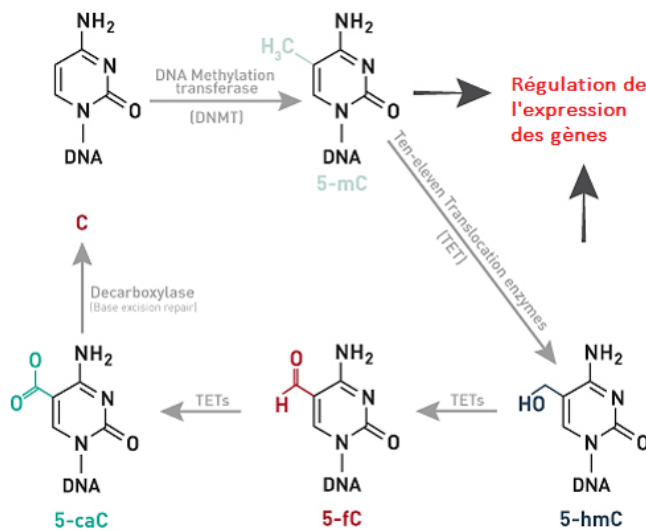


Figure 4: Cycle de méthylation et de déméthylation de l'ADN.

Source: <https://www.diagenode.com/categories/dna-methylation>  
 5mC= 5 méthyl-cytosine, 5hmC= 5 hydroxy méthyl-cytosine,  
 5fC= 5 formylcytosine, 5caC= 5 carboxylcytosine

### 1. La mise en place de la méthylation

#### a) Les DNA Methyl Transferases

Classiquement responsables de la mise en place de la méthylation au niveau de l'ADN, les DNMTs sont réparties en deux groupes, les méthyltransférases *de novo* (DNMT3A et 3B) et de *maintenance* (DNMT1). Chez l'Homme, on retrouve plusieurs DNMTs : DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B et DNMT3L (décrit ci-dessous **Figure 5** issu de Ravichandran et al. 2018).

méthylation est réversible, une perte du groupement méthyl au cours des différentes divisions cellulaires peut être observé si celui-ci n'est pas maintenu, il s'agit d'un mécanisme passif. Un mécanisme actif est également possible : il implique un groupe d'enzymes décrit pour la première fois en 2009, les protéines Tet (*ten-eleven-translocation*) (Tahiliani et al., 2009).

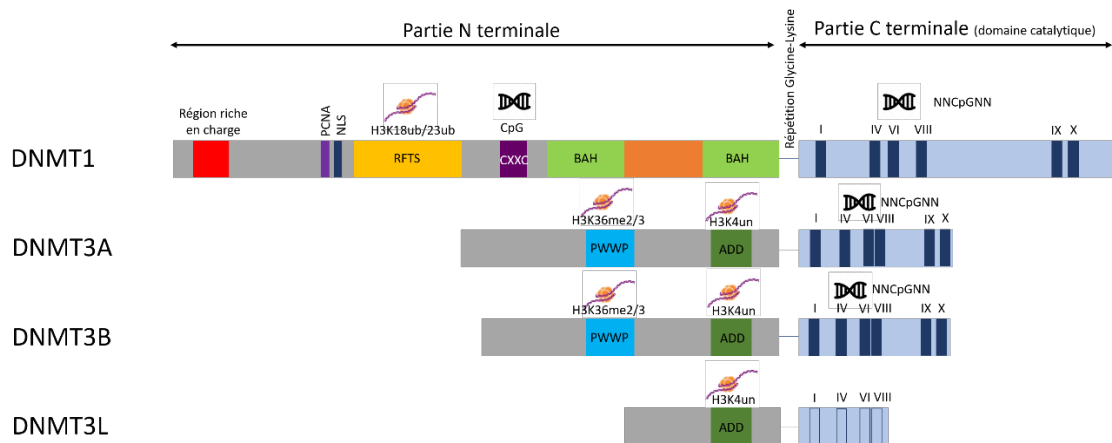


Figure 5 : Domaines et structures conservés des DNMTs.

La partie N terminale des enzymes contient de nombreux domaines d'interaction avec la chromatine (CXXC (domaine de liaison à des CpG non méthylés), ADD (ATRX-DNMT3-DNMT3L ; reconnaît et lie la lysine(K) 4 de l'histone 3, PWWP (Proline-tryptophane-tryptophane-Proline) reconnaît et lie la lysine(K) 36 de l'histone 3 di ou tri-méthylé ; RFTS qui reconnaît et lie les foci de réplication de l'ADN ou des protéines (PBD (PCNA Binding Domain))). La partie C terminale contient le domaine catalytique.

DNMT1, DNMT3A et DNMT3B sont les DNMTs canoniques chargées de l'ajout du groupement méthyl en position 5 de la cytosine qui est responsable de la mise en place des méthylations sur le génome. Par contraste DNMT2 et DNMT3L sont des membres non canoniques de la famille des DNMTs et ne possèdent pas de domaine catalytique fonctionnel. Cependant, ces protéines possèdent des domaines conservés qui permettent de les inclure dans un même groupe avec des domaines distincts qui font leur particularité d'action comme cela est décrit dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1. Description des différentes DNMTs chez l'Homme.

	<b>DNMT1</b>	<b>DNMT3A</b>	<b>DNMT3B</b>	<b>DNMT3L</b>	<b>DNMT2 TRDMT1 (tRNA aspartic acid methyltransferase)</b>
<b>Rôle admis</b>	Méthylation de maintenance	Méthylation de novo	Méthylation de novo	Cofacteur important pour l'activité de DNMT3	Méthylation des tARN
<b>Interaction moléculaire</b>	- UHRF1 (essentiel pour la méthylation de maintenance) - LSH - ATRX - ncRNA (issu du gène CEBPA)	- DNMT3L (formation d'un hétérotétramère qui augmente l'affinité pour l'ADN) - LSH	- LSH		
<b>Epissages alternatifs</b>			Différentes isoformes retrouvées dont certaines avec le domaine catalytique manquant qui aurait pour effet de stimuler la méthylation de l'ADN, se substituant ainsi à DNMT3L		
<b>Modifications post traductionnelles</b>	-méthylation des lysines 1094 et 142 qui conduiraient à la dégradation de la protéine. - phosphorylation de la sérine 143 qui protège de la dégradation.	- phosphorylation par la casein kinase 2 des sérines 386-389 (souris)/390-393 (Homme) du domaine PWWP, qui facilite le ciblage de l'hétérochromatine.			- phosphorylation de la sérine 219 par ATM
<b>Maladie humaine (liée à une mutation)</b>	HSAN1E (neuropathie héréditaire sensitive et autonome de type I)	Talton-Brown-Rahman syndrome	ICF syndrome		

Toutes les DNMTs utilisent comme substrat la S-adénosyméthionine (SAM ou AdoME) comme molécule donneuse du groupement méthyl. L'équipe de Klimasauskas décrit le mécanisme de retournement de base qui est indispensable au niveau du domaine catalytique des enzymes DNMTs pour la réaction d'ajout du groupement méthyl (Klimasauskas et al., 1994).

La réaction de méthylation est initiée par un résidu cystéine conservé dans le motif PCQ (Proline-Cystéine-Glutamate ; motif IV du domaine catalytique sur la **Figure 5**) qui est responsable d'une attaque nucléophile au niveau du carbone 6 de la cytosine (la chaîne d'acides aminés impliquée dans la réaction est en vert sur la **Figure 6** ci-dessous) de DNMT. Cette étape est suivie par le transfert du groupement méthyl (en orange sur la **Figure 6**) de SAM (en violet sur la **Figure 6**) et la perte d'un proton du carbone 5 de la cytosine pour former le 5 méthyl cytosine (5mC) (Du et al., 2016).

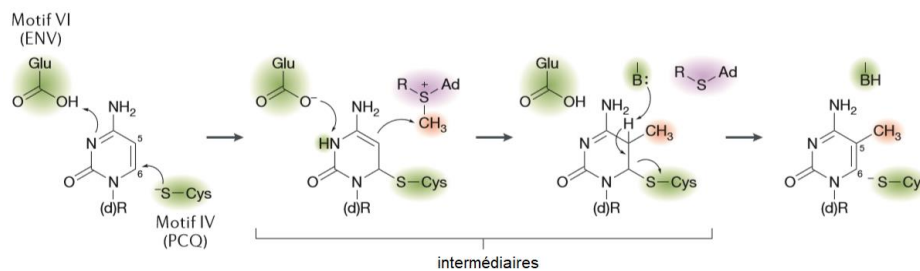


Figure 6: Mécanisme catalytique des DNMTs issu de Lyko 2017.

Le motif IV est un des motifs du domaine catalytique des DNMTs ; ENV est l'acide glutamique conservé présent au niveau du motif IV qui participe à l'attaque nucléophile lors de la réaction enzymatique ; PCQ est un motif Proline-Cystéine-Glutamate dont la cystéine est conservée et participe également activement à l'attaque nucléophile sur la cytosine. Est surligné en vert la chaîne d'acides aminés impliquée dans la réaction enzymatique, le cofacteur SAM est en violet et le groupement méthyle est en rouge. SAM : S Adénosyl Méthionine.

Enfin, l'action de ces enzymes est globalement influencée par des facteurs environnementaux

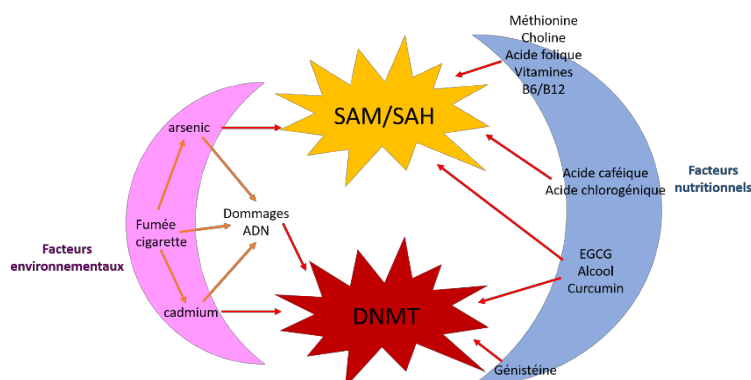


Figure 7: Impact de facteurs extérieurs sur la méthylation de l'ADN.

Les facteurs environnementaux, l'alimentation peuvent avoir un impact sur la disponibilité en SAM et ainsi indirectement réguler l'expression, le recrutement et l'activité des DNMTs. (issu de Zampieri et al, 2015).

SAM : S Adénosyl Méthionine ; SAH : S-Adénosyl Homocysteine; EGCG: gallate d'épigallocatechine.

et nutritionnels qui vont contrebalancer dans un sens ou l'autre l'ajout ou non d'un groupement méthyle sur la cytosine (Zampieri et al., 2015). Ainsi comme cela est illustré sur la figure ci-dessous, le gallate d'épigallocatechine (EGCG) qui est un polyphénol issu du

thé vert, le curcumin, la génisteine (isoflavone de graine de soja) (Fang et al., 2003, 2005; Lee et al., 2005; Liu et al., 2009; Xie et al., 2014); et l'éthanol vont avoir un impact sur la disponibilité en SAM. De même, des facteurs extérieurs comme la pollution (arsenic, cadmium), les médicaments (ioniazide, procainamide) ou en lien avec le style de vie peuvent avoir un impact sur la disponibilité en SAM (Zampieri et al., 2015).

#### i. DNMT1

DNMT1 est responsable du maintien de la méthylation de l'ADN après réplication. Cette réaction s'appuie sur un « patron » de méthylation qui est déjà établi. Elle est mise en place lors de la phase S du cycle cellulaire qui est la phase de réplication de l'ADN. Ainsi le brin d'ADN néosynthétisé, sera méthylé si le brin « parent » est méthylé. Cela est possible par son domaine RFTS (Replication Foci Targeting Sequence) qui lui permet de cibler comme son nom l'indique les foci de réplication de l'ADN (Fellinger et al., 2009). Et c'est les interactions de DNMT1 avec des partenaires tels qu'UHRF1 (Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1) (Bostick et al. 2007) par son domaine SRA (SET and RING Associated) (Jones et Liang 2009) et PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) (Lida et al. 2002) qui vont conduire l'enzyme au niveau de la fourche de réplication de l'ADN. Son activité enzymatique est plus importante sur les sites méthylés que non méthylés (Fatemi et al., 2001; Jeltsch et al., 2016). Cependant, elle est capable d'avoir une activité de méthylation *de novo* (Jair et al., 2006).

#### ii. DNMT2 : TRDMT1 (tRNA (cytosine-5) -methyltransferase)

Décrite en 1998 par Yoder et Bestor, le gène codant DNMT2 est localisée au niveau du chromosome 10p15.1 (Yoder and Bestor, 1998). Cette enzyme possède la même activité catalytique que les DNMTs 1, 3A, 3B et 3L. En 2006, le groupe de Bestor montra qu'il s'agissait d'une ARNt (ARN de transfert) methyl transferase capable donc de méthyler des ARNt. Cette méthylation, dont la réaction d'ajout est semblable à celle des autres DNMTs, a lieu sur le résidu C38 de 3 ARNts : ARNtAsp-GUC, ARNtGly-GCC et ARNtVal-AAC chez l'Homme et la drosophile. Cette position est proche d'une *wobble*

#### *Wobble pairing*

Quand on parle de *wobble* il faut entendre un mécanisme de "tolérance". L'ARN de transfert va "lire" des codons de 3 nucléotides en se fixant par complémentarité sur l'ARN messenger grâce à l'anticodon. Ainsi, le premier nucléotide du codon de l'ARNm sera associé au 3<sup>ème</sup> nucléotide de l'anticodon, et le 3<sup>ème</sup> nucléotide de l'ARNm sera lui associé au 1<sup>er</sup> nucléotide de l'anticodon.

Ce qui se passe c'est que l'ARNt va "tolérer" des différences au niveau du 3<sup>ème</sup> nucléotide de l'ARNm, c'est à dire que le premier nucléotide de l'anticodon ne va pas s'assembler obligatoirement selon la "loi" de la complémentarité.

Ainsi il existe une tolérance de la part des ARNts qui associera un même acide amine a des codons différents par leur 3<sup>ème</sup> base.



*base*, ce qui indiquerait que DNMT2 pourrait être impliquée dans des mécanismes de « régulation » de la traduction protéique (Jeltsch et al., 2016; Rasmussen and Helin, 2016). Concernant son activité de méthylation de l'ADN, la question est toujours en discussion.

### iii. DNMT3A/B

DNMT3A et 3B sont responsables de la méthylation *de novo* et cela à la fois en position cis et trans du brin d'ADN. Elles possèdent le même domaine catalytique que DNMT1, ce qui permet de souligner que l'activité *de novo* n'est pas dépendante de ce domaine mais des interactions avec des partenaires moléculaires et du domaine N terminal. Elles possèdent en position N terminal un domaine PWWP (Pro-Trp-Trp-Pro) qui est essentiel pour le recrutement de ces enzymes au niveau du centromère (rôle dans la mise en place de l'hétérochromatine et de la stabilité du génome). Elles possèdent également un domaine ADD (ATRX-Dnmt3-Dnmt3L) qui est riche en cystéine et est associé à un doigt de zinc qui permet l'interaction avec l'ADN. Ces enzymes ont été découvertes à la suite d'un KO (*Knock-Out*) de DNMT1 pour lequel une méthylation de l'ADN continuait à être observée (Lei et al., 1996). Des expériences de FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) ont permis par la suite de localiser ces enzymes au niveau des chromosomes humains (2p23 et 20q11). Leurs activités de méthylation *de novo* ont été démontrées par l'utilisation de cellules souches mutantes (Chen et al., 2003).

Par ailleurs, depuis 2015, leur rôle strict de méthylase *de novo* semble être mis à mal. En effet, des expérimentations *in vitro* suggèreraient également un rôle dans la déméthylation active de l'ADN selon des conditions très précises. Ainsi, lors d'une restriction de la disponibilité du cofacteur SAM, DNMT3A et B seraient capables de déaminer un motif 5mC (5 méthylcytosine) en thymine, cette thymine qui par la suite pourrait être remplacée par une cytosine non modifiée en empruntant la voie BER (Base Excision Repair). De plus, dans un environnement oxydoréducteur et en l'absence de SAM, DNMT3A et B pourraient même directement convertir une 5mC ou une 5 hydroxyméthylcytosine (5hmC) en une cytosine non modifiée, bien que la voie impliquée dans cette réaction reste inconnue (van der Wijst et al., 2015). Toutefois, ces mécanismes *in vitro* restent à être confirmés/infirmés *in vivo* et leurs pertinences, intérêts physiologiques à être étudiés et compris.

## 2. Rôle de la méthylation de l'ADN

### a) Implication dans les grands mécanismes

Montrée depuis les années 1980s, la méthylation de l'ADN est impliquée à la fois dans la régulation de l'expression génique et la différenciation cellulaire. Chez les mammifères des motifs de méthylation sont établis très tôt au cours du développement et maintenus tout au long de la vie de l'individu. Cette méthylation est essentielle pour de nombreux mécanismes cellulaires, et plus particulièrement :

**\*Le *silencing* des rétro-éléments et des éléments répétés** assurant la stabilité du génome. Ces éléments représentent plus de la moitié du génome (LTR (Long Terminal Repeat sequence), LINE et SINE (Long and Small Interspersed Element)), ils sont maintenus inactifs et la méthylation aide en ce sens, permettant ainsi d'éviter des éventuelles mutations par insertion (Jones and Takai, 2001; Lander et al., 2001; Robertson and Wolffe, 2000a; Yoder et al., 1997). Les répétitions en tandem sont retrouvées notamment en région centromérique, péri-centromérique et sub-télomérique et sont constitutivement méthylées (Jurkowska et al., 2011; Suzuki and Bird, 2008). La méthylation des régions centromériques permet d'éviter les recombinaisons centromériques et de contrôler les longueurs anormales du centromère (Jaco et al., 2008). La méthylation de l'ADN est également un répresseur important de la recombinaison de l'ADN au niveau des télomères et un régulateur négatif de leur longueur (Blasco, 2007; Gonzalo et al., 2007).

**\*La régulation de l'expression des gènes** exprimés de manière tissu-spécifique (mécanisme décrit plus finement dans le prochain paragraphe).

**\*L'empreinte parentale**, une des deux copies héritées par la mère ou le père est totalement éteinte alors que l'autre est active. C'est un mécanisme qui a été mis en évidence pour la première fois en 1984 par McGrath et Solter, et Surani et al 1984 (McGrath and Solter, 1984; Surani et al., 1984). L'équipe de Surani démontra la nécessité des génomes maternel et paternel pour le développement normal de l'embryon, ceci à la suite d'expérimentations sur des embryons murins. Le mécanisme a pu par la suite être plus finement expliqué et détaillé par l'identification des premiers gènes soumis à empreinte et important pour le

développement : Igf1l (paternel) et Igf2 et H19 (maternel) (Barlow et al., 1991; Bartolomei et al., 1991; DeChiara et al., 1991).

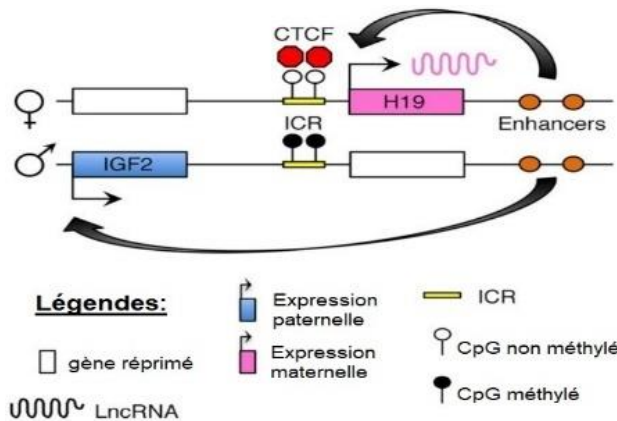


Figure 8: Modèle d'imprinting au locus IGF2-H19.

Sur l'allèle maternel, la région ICR (Imprinting Control Region) n'est pas méthylée, ce qui permet au répresseur transcriptionnel CTCF (CCCTC-binding) de se fixer et ainsi d'empêcher la transcription du gène IGF2. Sur l'allèle paternel, la méthylation au niveau de ICR va empêcher la fixation de CTCF et dans ce cas, il y aura une transcription du gène IGF2. (Kameswaran and Kaestner, 2014)

\*L'inactivation du chromosome X qui participe au phénomène de compensation de dosage. Une structure appelée corpuscule de Barr (voir Figure 9) est observée dans le noyau des cellules

### La compensation de dosage

La compensation de dosage est le processus par lequel les organismes égalisent l'expression de gènes entre les membres de sexes biologiques différents

femelles, il s'agit de l'un des 2 chromosome X extrêmement compacté. Cette structure a été

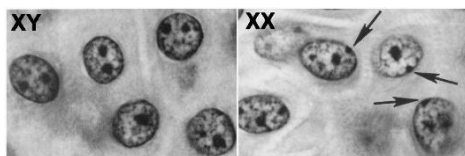


Figure 9: Corpuscule de Barr indiqué par les flèches chez l'individu de sexe féminin.

proposée pour la première fois en 1961 par Mary F. Lyon. En 1995 l'ARN non codant Xist a été identifié, il est produit uniquement par le chromosome X inactif et est à l'origine de la méthylation de l'ADN de ce même chromosome et de sa « compaction » par la suite.

## b) Implication dans la régulation de l'expression des gènes

### i. Le promoteur

La région promotrice d'un gène peut être délimitée en 3 sous parties :

-Le TSS (Site d'initiation de la transcription) : promeut l'expression des gènes en régulant la structure de la chromatine et la fixation des facteurs de transcription. Ils sont moins riches en

### Les Ilots CpG (CGI)

Les CGI sont définis comme des séquences de plus de 200pb qui présentent un enrichissement en GC avec plus de 50% de GC. On les retrouve dans plus de 70% des promoteurs chez les mammifères. Ils sont fortement conservés entre la souris et l'Homme ce qui permet d'illustrer leur importance. La méthylation de ces ilots permet un *silencing* stable de l'expression des gènes, elle est particulièrement importante également au cours du phénomène d'*imprinting*, et lors de la régulation de l'expression des gènes au cours du développement et de la différenciation. Leur méthylation est rarement tissu spécifique.

Les *shores* sont à plus de 2kb des CGI et leur méthylation est très fortement corrélée avec une diminution de l'expression des gènes et ils présentent un profil de méthylation qui est conservé et est tissu spécifique.

Les *shelf* se trouvent de 2kb à 4kb autour des CGI et enfin les *Open Sea* qui présentent les CpG que l'on retrouve de façon ponctuelle dans le génome.

nucléosomes que d'autres parties de l'ADN, et les nucléosomes qu'ils contiennent sont porteurs de marques d'histones permissives pour la transcription. C'est la présence du variant d'histone H2A.Z qui va limiter la méthylation des dinucléotides (Zilberman et al., 2008).

-La région promotrice centrale est pauvre en CpG.

Au sein des promoteurs, pour 70% d'entre eux, il est retrouvé une structure appelée Ilot CpG (voir bulle) qui est globalement non méthylée, une hyperméthylation est observée au cours du processus de tumorigenèse (Deltour et al., 2005).

Les éléments de régulation à distance du gène qui sont les *insulators*, *enhancers* et *repressors* sont également soumis à une régulation de leur fonction par la méthylation de l'ADN. Ces séquences sont porteuses d'une séquence CCCTC sur laquelle se fixent des protéines appelées facteurs de fixation CCCTC qui peuvent être des protéines USF1/USF2 ou CTCF. Ces protéines fixent l'ADN quand celui-ci n'est pas méthylé. La méthylation des séquences *insulators* inhibe l'activité de ceux-ci (exemple de ICR dans la régulation de l'expression du gène soumis à empreinte IGF2).

#### Insulator, enhancer, repressor

Les *insulators* empêchent les *enhancer/silencer* d'activer/inhiber la transcription des gènes voisins, et sont retrouvés entre un *enhancer* et le *promoter*. Un *enhancer* est une région de fixation des facteurs de transcription pour activer la transcription des gènes. A l'inverse, un *repressor* est une région de fixation des facteurs de transcription pour inhiber la transcription des gènes cibles.

Globalement ces régions sont pauvres en CpG et ont tendance à présenter des niveaux de méthylation assez variable tout en étant particulièrement enrichies en 5hmC lorsqu'elles sont actives.

#### ii. Le corps du gène

Brenet et son équipe ont montré que la méthylation de l'exon 1 d'un gène est généralement associée à sa répression transcriptionnelle (Brenet et al., 2011). Une hypométhylation des régions introniques peut conduire à l'exposition d'*enhancer* et ainsi favoriser des modifications d'expression des gènes concernés (Blattler et al., 2014).

#### Le corps du gène

Le corps du gène comprend les exons et les introns. Les exons sont des fragments de séquence primaire d'un gène qui seront recopiés dans la structure primaire de l'ARN messager après épissage. Les introns, parties non codantes des gènes des eucaryotes, sont coupés de la structure primaire des ARN au cours de la maturation des messagers.

La méthylation de l'ADN au sein du corps du gène contribuerait à une transcription optimale en autorisant l'accumulation de la marque activatrice H3K36me3 (triméthylation de la lysine 36 de l'histone 3) et en excluant la marque répressive H3K27me3 (triméthylation de la lysine 27 de l'histone) (Lee et al., 2015). Ce qui empêcherait des initiations de la transcription à partir de site cryptique d'initiation de la transcription qui pourrait ainsi créer de l'interférence avec le site TSS (Choi et al., 2011). De nombreux résultats expérimentaux obtenus suite à un séquençage après traitement au bisulfite de sodium ont permis de rapporter que les gènes les plus fortement exprimés présentaient le plus fort niveau de méthylation intragénique (Lee et al., 2015).

### iii. Les régions intergéniques

Les régions intergéniques regroupent tout fragment d'ADN présent entre des séquences codantes d'ADN, y compris les régions non traduites, les régions 5' et les 3' flanquantes, les introns, les pseudogènes non fonctionnels, et les séquences répétées non fonctionnelles. Ces régions représentent 80 à 90% du génome humain, et semblent fortement impliquées dans le maintien de la stabilité du génome. Pour les séquences répétées non fonctionnelles, il a été montré que l'expression des SINEs (Short Interspersed Nuclear Elements), des LINEs (Long Interspersed Nuclear Element), et des rétrovirus endogènes et des transposons de l'ADN étaient sources de perturbations de l'expression des gènes et de mutation de l'ADN (Kuster et al., 1997; Michaud et al., 1994; Ukai et al., 2003). Classiquement, ces séquences sont inactivées par la méthylation de l'ADN ou par la présence de mutations acquises au fil du temps suite à la déamination des 5 méthyl-cytosines (Walsh et al., 1998). Une hypométhylation induit leur expression, qui sera à l'origine d'une instabilité génomique (Gaudet et al., 2003).

### c) Méthylation de l'ADN et épissage alternatif

Il a été montré récemment que l'organisation de la chromatine, les marqueurs épigénétiques et la formation des boucles chromosomiques pouvaient avoir un impact sur l'épissage alternatif. C'est ainsi que la méthylation de l'ADN intervient dans ce processus. Une corrélation positive est ainsi observée entre la méthylation au niveau du corps du gène et son niveau d'expression. De plus, la méthylation de l'ADN semblerait aider à la distinction des exons et des introns. Trois protéines ont été identifiées comme faisant le lien entre la méthylation de l'ADN et la machinerie impliquée dans l'épissage alternatif.

\***CTCF** qui est un facteur de transcription impliqué dans de nombreux mécanismes tels que la régulation de la

### Recombinaison V(D)J

La recombinaison V(D)J est un mécanisme de recombinaison de l'ADN. C'est une réaction de recombinaison site-spécifique qui permet de créer une grande diversité de récepteurs des cellules T et d'immunoglobulines qui sont nécessaires à la reconnaissance de l'immense variété des antigènes étrangers.

transcription, la recombinaison des séquences V(D)J (variable-diversité-jonction) du récepteur à l'antigène des lymphocytes T et B et l'architecture de la chromatine. Sa liaison à l'ADN diminue le taux d'allongement de l'ARNm synthétisé par l'ARN Polymérase II (ARN pol II) et facilite l'inclusion d'exon. Cette liaison est empêchée par la méthylation de l'ADN, qui dans ce cas aboutit à l'exclusion de l'exon (Lev Maor et al., 2015)

\***MeCP2 (methyl CpG binding protein 2)**, protéine impliquée dans la régulation post transcriptionnelle des gènes. Dans ce cas, MeCP2 se lie à l'ADN méthylé et diminue le taux d'élongation par l'ARN pol II pour améliorer l'inclusion d'exon (Lev Maor et al., 2015).

\***Les protéines HP1** qui appartiennent à la super famille des protéines à chromodomaine et possèdent un domaine methyl-lysine binding chromodomain. Les protéines HP1 se lient à la marque d'histone H3K9me3 (triméthylation de la lysine 9 au niveau de l'histone 3) ainsi qu'à des facteurs d'épissage. Les protéines HP1 s'accumulent au niveau des exons, et les facteurs d'épissage qui se lient à HP1 exercent de cette façon leur effet sur l'inclusion et l'exclusion des exons dans l'ARNm. HP1 est capable de lier SRSF1 (serine and arginine rich splicing factor 1) qui appartient à la famille des protéines SR (nommées ainsi car leurs séquences protéiques contiennent des répétitions des acides aminés Sérine (S) et Arginine (R), impliquées dans l'épissage alternatif et se fixant aux séquences dites activatrices, ce qui va permettre d'inclure un exon ) et vont participer à l'inclusion de l'exon (Loomis et al., 2009; Yearim et al., 2015) dans l'ARNm. HP1 peut également se lier à d'autres membres de la famille SR : SRSB1 et SRSF3 (Yearim et al., 2015). Par ailleurs, HP1 peut lier des hnRNPs (heteronuclear ribonucleoprotein) qui ont l'effet inverse des protéines SR, elles se lient à des séquences inhibitrices, et dans ce cas ont un rôle de répresseur en masquant le site d'épissage (Ameyar-Zazoua et al., 2012).

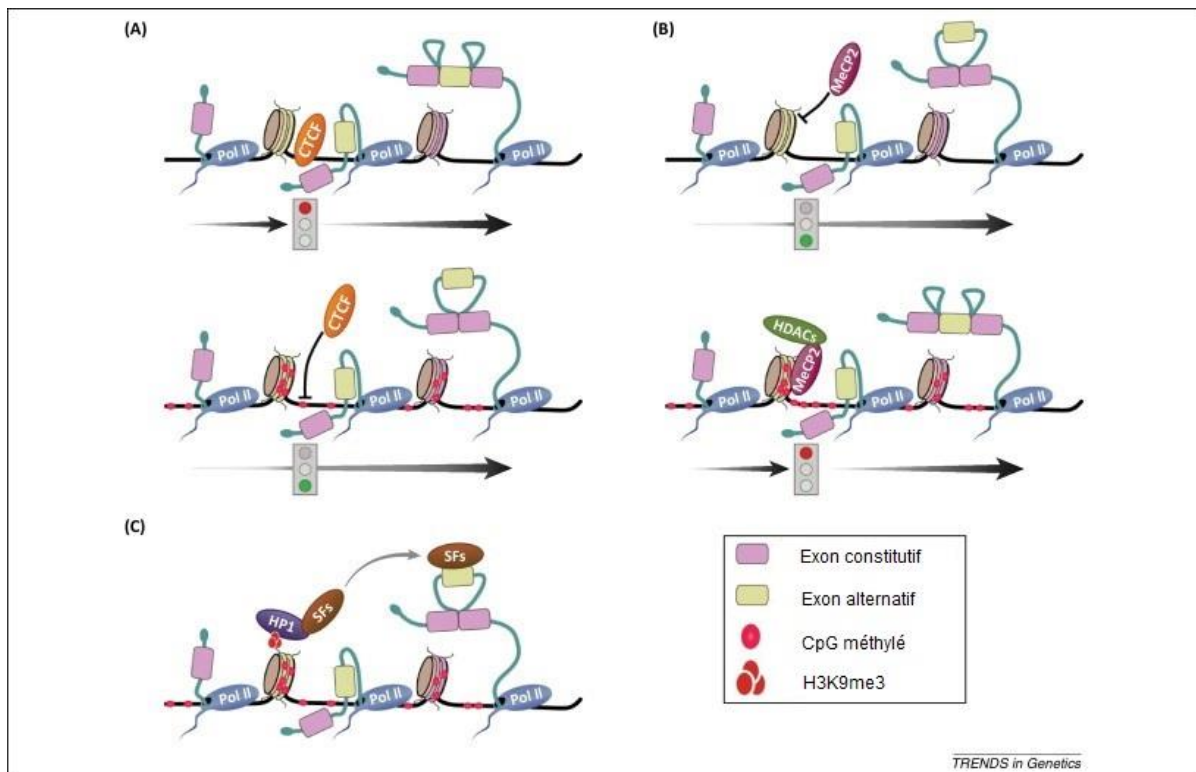


Figure 10: La méthylation de l'ADN a un impact sur l'épissage alternatif (issue de Maor et al 2015).

A) lorsque l'ADN n'est pas méthylié, CTCF se lie en aval de l'exon alternatif et crée ainsi un barrage pour l'élongation par l'ARN pol II, ce qui va permettre l'incorporation de l'exon dans l'ARNm. La méthylation de l'ADN empêche la fixation de CTCF et donc l'inclusion de l'exon. B) En l'absence de méthylation de l'ADN, MeCP2 ne se lie pas à l'exon alternatif, ce qui permet l'élongation rapide par l'ARN pol II et donc la non inclusion de l'exon. La méthylation de l'ADN au niveau de cet exon alternatif permet la liaison de MeCP2 qui va recruter des HDACs (Histones déacétylases), ce qui va permettre un ralentissement de l'ARN pol II lors de l'élongation et donc l'inclusion de l'exon. C) La méthylation de l'ADN stimule la méthylation de la lysine 9 de l'histone 3 (H3K9me3). HP1 se lie à H3K9me3 et recrute des facteurs d'épissage (SF), ce qui va permettre l'exclusion de l'exon. H3K9me3 : Histone 3 triméthylé au niveau de la lysine 9 ; HDAC : Histone déacétylase ; ARN pol II : ARN polymérase II.

#### d) Méthylation de l'ADN en dehors du contexte CpG

Bien que les DNMTs méthylient préférentiellement les cytosines dans un contexte CpG, des études biochimiques ont permis de mettre en évidence qu'elles pouvaient également méthyler dans un contexte non CpG avec une apparente préférence dans le sens suivant : CA>>CT>CC (Aoki et al., 2001; Gowher and Jeltsch, 2001).

Dans les cellules souches embryonnaires murines mais aussi humaines, il a été mis en évidence une méthylation de l'ADN dans un contexte différent du contexte CpG, principalement dans un contexte CpA, ceci grâce à l'action conjointe de DNMT3A/B de concert avec DNMT3L. Cette méthylation est asymétrique, elle n'est pas transmissible au cours des divisions cellulaires et est diluée au cours du temps. Si elle est relativement fréquente dans les cellules souches embryonnaires (Ramsahoye et al., 2000), on la retrouve également dans certains tissus somatiques (Pinney, 2014). Cette méthylation asymétrique des cytosines au niveau de promoteurs jouerait un rôle dans la régulation de l'expression de quelques gènes au niveau de

certaines tissus (Pinney, 2014). Par ailleurs, des études sur le cerveau, où la méthylation en dehors du contexte CpG est la plus forte, souligneraient son implication dans la maturation neuronale et la spécification des cellules du cerveau, processus cruciaux pour le développement de celui-ci (Lister et al., 2013).

Cependant, les fonctions moléculaires, ainsi que les mécanismes de mise en place et de maintien restent largement mal connus (Ravichandran et al., 2018).

#### e) Lien génome et épigénome

Depuis 1982, on sait que les cytosines méthylées sont plus sujettes à la désamination (c'est une réaction chimique au cours de laquelle une molécule perd un groupement amine) que les cytosines non méthylées (Wang et al., 1982). Ainsi le taux de désamination des 5mC serait 2 à 3,2 fois plus important que celui des cytosines non méthylées (C) (Ehrlich et al., 1986). La désamination des 5mC et C permet respectivement l'obtention d'une thymine et d'un uracile. La même équipe en 1990 montrait une excision moins efficace des résidus thymine lors de mésappariement G-T (Guanine-Thymine) par rapport au mésappariement G-U (Guanine-Uracile) (Ehrlich et al., 1990). Ceci permet d'expliquer la fréquence du polymorphisme Cytosine>Thymine (Holliday and Grigg, 1993). Cela est en accord avec l'observation du taux de transition CpG à TpG qui est de 10 à 50 fois plus importante que les autres transitions (Jiang et al., 2007; Zhao and Jiang, 2007). Une étude de 2012 souligne que parmi les 5mC, le taux de mutation de celles-ci semble être nettement plus important sur les sites dit *low intermediately* (LI mCpG sur la **Figure 11**, c'est-à-dire porteur à 40% de méthylation) et les *intermediately* (I mCpG sur la **Figure 11**, porteur de 40 à 60% de méthylation), cela à différents niveaux, des régions génomiques, aux chromosomes au génome complet (Xia et al., 2012).



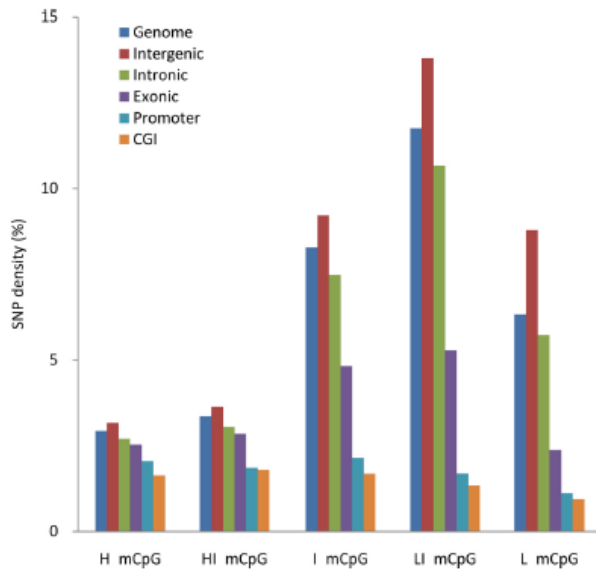


Figure 11: Illustration du taux de mutation pour les sites CpG méthylés dans le génome humain selon la région génomique concerné (issu de Xia et al. 2012).

L'axe des abscises : les sites CpG avec différents niveau de méthylation : H\_mCpG: highly methylated CpG (> 80%); HI\_mCpG: high-intermediately methylated CpG (60-80%); I\_mCpG: intermediately methylated CpG (40-60%); LI\_mCpG: low-intermediately methylated CpG (20-40%); L\_mCpG: lowly methylated CpG ( $\leq 20\%$ ). Sur l'axe des ordonnées est représenté le taux de mutation qui est calculé par la densité en SNPs au niveau des sites CpG.  
SNP : Single Nucleotid Polymorphism.

#### f) Méthylation de l'ADN et ARN non codants

Il existe un lien entre les ARN non codants et la méthylation de l'ADN. Ils peuvent ainsi être régulés par des mécanismes épigénétiques et être capables d'influer sur le paysage épigénétique (Ferreira and Esteller, 2018). C'est ainsi que l'on peut observer une diminution de l'expression de certains miRNAs (micro ARNs) lors de cancer suite à une hyperméthylation des motifs CpG au niveau de leurs promoteurs (Ferreira and Esteller, 2018), par exemple ce processus est observé pour miR-145 dans le gliome.

Des études récentes suggèrent un mécanisme d'inhibition de la méthylation médiée par les DNMTs via une interaction avec de petits ARNs. Ces mécanismes initialement décrits chez la plante, la drosophile et la levure, sont appelés RdDM (RNA directed DNA Methylation) et sont responsable d'un *silencing*

Site génomique transcriptionnellement inactif



Site génomique transcriptionnellement actif

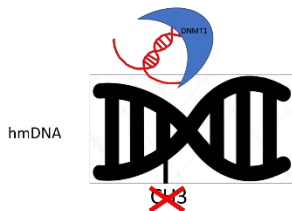


Figure 12: modèle de séquestration de DNMT1 propose par Di Ruscio et al. 2013

DNMT1 ne peut accéder aux sites génomiques transcriptionnellement actif lorsque DNMT1 interagit avec un ARN et donc reproduire le patron de méthylation. hmDNA : ADN hémiméthylé.

transcriptionnel au niveau du gène cible. Chez les mammifères, un mécanisme similaire a été décrit en 2013 par Di Ruscio et al. Les auteurs ont décrit une interaction possible entre DNMT1 et un ARN au niveau du locus CEPBA qui est critique pour la régulation de la méthylation de l'ADN. Ainsi, cet ARN se lierait à DNMT1 et empêcherait l'ajout de groupements méthyls au niveau précisément du gène CEPBA (CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha). Les auteurs ont par ailleurs réalisé des approches de *RNA sequencing* des transcrits associés avec DNMT1 en combinaison avec l'étude

de la méthylation du génome, leur a permis de généraliser

cette observation à d'autres loci. Ainsi une interaction DNMT1-ARN serait possible (Di Ruscio et al., 2013) et permettrait un contrôle de la méthylation.

## B. La déméthylation de l'ADN

### 3. La déméthylation passive de l'ADN

La méthylation de l'ADN, longtemps considérée comme étant une modification stable, de part la nature chimique de la liaison C-C (carbone-carbone), la seule manière de perdre ce groupement méthyl était envisagé de manière passive. Ainsi, une déméthylation pouvait être observée suite à une « dilution » de la marque lors de la réplication de l'ADN ou suite à une inhibition de la maintenance de celle-ci (Ravichandran et al., 2018).

En effet une déméthylation passive peut-être le fruit d'une diminution de l'expression des DNMTs (Oda et al., 2013; Zampieri et al., 2009), d'une localisation des DNMTs au niveau du cytosol (Cardoso and Leonhardt, 1999; Jurkowska et al., 2011) d'un défaut de recrutement sur l'ADN (Bostick et al., 2007; Oda et al., 2013), d'une diminution du substrat SAM (Ulrey et al., 2005) ou encore d'une inhibition de l'activité enzymatique des DNMTs (Caiafa et al., 2009; Fang et al., 2007).

Par ailleurs, la perte du complexe DNMT1/UHRF1/PCNA va provoquer la perte du maintien du profil de méthylation de l'ADN au cours des cycles cellulaires suivants. De plus, la présence de 5hmC peut jouer un rôle dans la déméthylation de l'ADN. Des expérimentations *in vitro* ont ainsi montré une diminution drastique de l'activité de DNMT1 sur un substrat porteur de 5hmC (Hashimoto et al., 2012; Ji et al., 2014; Valinluck and Sowers, 2007). Enfin, UHRF1 et 2 seraient capables de lier 5hmC ce qui suggère un détournement de la méthylation de l'ADN. Les dépôts larges de 5hmC sont suggérés comme capables d'induire une déméthylation passive de l'ADN notamment dans l'embryon pré-implantatoire et les PGCs (Primordial Germ Cells).

### 4. La déméthylation active de l'ADN

En 2009 Tahiliani et al ont mis en évidence les protéines TETs homologues chez les mammifères des protéines JBP1 (J binding protein 1) et JBP2 retrouvées chez les trypanosomes. En effet les trypanosomes possèdent dans leur génome une base J ( $\beta$ -D-glucosylhydroxymethyluracil), obtenue après hydroxylation et glucosylation de la thymine. La biosynthèse de cette base J fait intervenir deux enzymes JBP1 et JBP2, enzymes de la famille des 2OG (oxoglutarate) et Fe(II)

dependent oxygenase, qui catalysent la première étape de la biosynthèse J. Comme la 5mC, la base J est associée avec le *silencing* génique. C'est cette homologie qui a laissé penser aux auteurs une même possibilité d'action de ces enzymes chez les mammifères et leur a permis de mettre en évidence la déméthylation active de l'ADN et le lien avec la 5hmC (identifiées pour la première fois sur l'ADN des T-even bacteriophage (phage de Escherichia coli) en 1953 (Wyatt and Cohen, 1953)).

### a) Les enzymes TETs

Les protéines TETs sont des protéines de 180 à 230kDA possédant plusieurs domaines (**Figure**

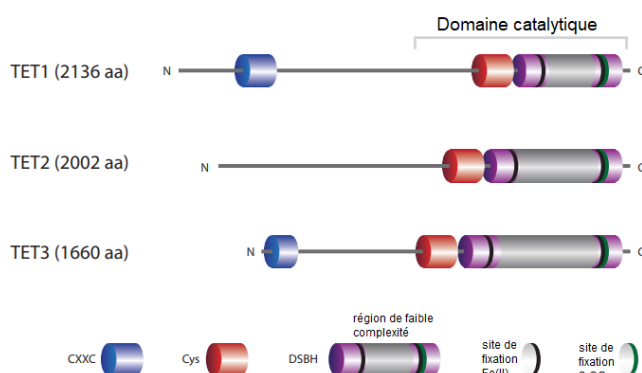


Figure 13: Structure des TETs (issu de Rasmussen and Helin, 2016).

Le domaine C terminal est partagé par l'ensemble des protéines TETs, il s'agit du domaine catalytique avec le domaine DSBH, un domaine riche en cystéines et les sites de fixation aux 2 cofacteurs Fe(II) et 2-OG. Le domaine DSBH contient une large région dont la fonction reste inconnue. TET1 et TET3 ont un domaine CXXC en N terminal qui permet la liaison à l'ADN.

Cys : domaine enrichi en cystéine ; DSBH : Double Stranded  $\beta$  Helix ; 2-OG : 2-Oxoglutarate.

**13**). Toutes les protéines TETs possèdent

le domaine DSBH (Double Stranded  $\beta$  Helix), un domaine riche en cystéines ainsi que deux sites de fixation pour les cofacteurs : Fe(II) et 2-Oxoglutarate (2-OG) qui, ensemble, forment le domaine catalytique principal en C terminal. Des

études ont montré que, par ce domaine,

les protéines TETs liaient

préférentiellement des cytosines dans un

contexte CpG et n'interagissaient pas avec

les bases avoisinantes et presque pas avec

les séquences d'ADN flanquantes (Rasmussen and Helin, 2016). En plus de leur domaine

catalytique TET1 et TET3 possèdent un domaine CXXC (domaine zing finger) qui leur permet

de se lier à l'ADN.

Tableau 2. Les différentes protéines TETs

	TET1	TET2	TET3
<b>Rôle supposé</b>	Formation de la 5hmC	Seraient impliquées dans la production des marques 5fC et 5CaC	
<b>Interaction moléculaire</b>	-Sin3a -MLL -DKK -Complexe PRC2 directement ou indirectement	-IDAX (CXX4)	
<b>Epissage alternatif</b>	Non	9 transcrits alternatifs dont 7 codant pour une protéine	4 transcrits alternatifs dont 2 donnant une protéine
<b>Régulation post-transcriptionnelle</b>	miR767 ; miR26a ; miR22 ; miR29 ;miR494 ; miR520b	miR22	miR22
<b>Modification post traductionnelle</b>		Protéolysée via IDAX (CXX4 ; qui pourrait être le résultat d'une scission d'un gène unique comprenant TET2 et CXX4)	Même régulation que TET2 sur son domaine CXXC absent
<b>Localisation</b>	Noyau	Noyau	Noyau + cytoplasme
<b>Maladies humaines</b>	Associé à une cinquantaine de pathologies humaines (recherche Ensembl) : cancer colorectal, cancer du pancréas, leucémie myéloïde aigue, cancer du sein...	Associé à 77 pathologies humaines (source Ensembl.org) : principalement des hémopathies et des cancers : mélanomes, cancer colorectal, cancer du sein...	Aucun phénotype associé avec TET3 mais SNP retrouvé chez les patients ayant un Lupus érythémateux systémique.

Les protéines vont permettre dans un premier temps l'oxydation de la 5mC en 5hmC, qui sera ensuite oxydée en 5 formylcytosine (5fC) puis en 5 carboxylcytosine (5caC) (He et al., 2011; Ito et al., 2011). Ces deux dernières cytosines qui sont les plus oxydées seront par la suite coupées par la thymine DNA glycosylase (TDG), une DNA mismatch repair enzyme qui se lie et excise les pyrimidines mal associées dans les paires G :U (Guanine-Uracile) et G :T (Guanine-Thymine) (Lindahl and Wood, 1999). En effet, la TDG n'est pas recrutée par la 5hmC mais uniquement

par la 5fC et 5caC ce qui a été démontré *in vitro* (He et al., 2011; Maiti and Drohat, 2011; Spruijt et al., 2013). Par ailleurs, des approches de KO et de mutations génétiques sur des cellules souches embryonnaires (ESCs) murines ont permis d'observer un enrichissement en 5fC et 5caC (He et al., 2011; Shen et al., 2013; Song et al., 2013). La surexpression de TDG dans la lignée HEK293 conduit à l'inverse à une diminution de 5fC et 5caC avec peu ou pas de changement pour les marques 5mC et 5hmC (Nabel et al., 2012).

L'obtention de ce site abasique va enclencher le processus de Base Excision Repair (BER), et pour finir au remplacement par une cytosine non modifiée

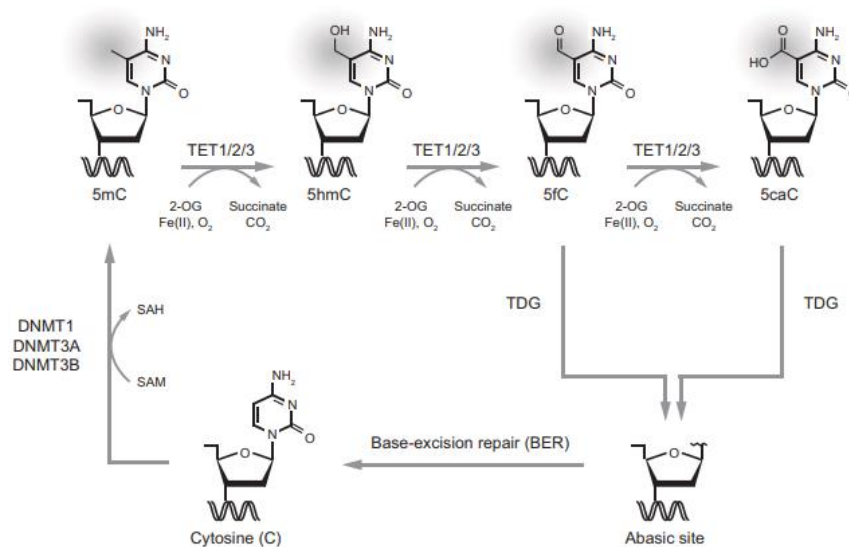


Figure 14: Déméthylation active de l'ADN par la voie TETs/TDG/BER (issu de Rasmussen and Helin, 2016)

Une cytosine peut être méthylée par DNMT1, 3A ou 3B, pour donner une 5mC. La 5mC peut par la suite subir une série d'oxydation par l'action des enzymes TETs qui vont ainsi donner 5hmC, 5fC, et 5caC. TDG va reconnaître 5fC et 5caC, et les exciser. Cela va conduire à l'obtention d'un site abasique qui sera reconnu par la voie BER et remplacé par une cytosine non modifiée. (SAH) S-adenosyl-homocysteine; (SAM) S-adenosyl-méthionine; 2-OG : 2-oxoglutarate ; 5mC : 5-méthyl-cytosine; 5hmC: 5-hydroxyméthylcytosine ; 5fC : 5 formylcytosine ; 5caC : 5 carboxylcytosine ; TDG : thymine DNA glycosylase.

Enfin, les TETs peuvent oxyder les thymines pour former la 5hmU (5hydroxyméthyluracile) qui est présente à faible niveau dans les ESCs (cellules souches embryonnaires) et est efficacement clivée et réparée par TDG en association ou non avec SMUG1 (single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase 1) et la voie BER. La fonction et le rôle de 5hmU restent à être expliqués et compris.

Les TETs peuvent lier VprBP (Vpr Binding Protein) qui va permettre par la suite la mono-ubiquitylation au niveau d'un résidu lysine conservé (K1229 pour Tet2) par un complexe E3 ligase : VprBP-DDB1 (Damage Specific DNA Binding Protein 1) – CUL4 (Cullin 4) – ROC1 (RING of Cullins) (CLR4<sup>VprBP</sup>) (Nakagawa et al., 2015; Yu et al., 2013). Cette modification n'affecte pas

l'activité catalytique *in vitro* mais a un impact sur la conformation de l'enzyme ce qui faciliterait et stabiliserait la liaison à l'ADN.

Des expériences sur des lignées cellulaires humaines et des tissus murins (Bachman et al., 2014; Blaschke et al., 2013; Minor et al., 2013; Yin et al., 2013) ont montré que la vitamine C stimule les TETs, les auteurs constatant une augmentation des marques 5hmC, 5fC, 5caC et une petite réduction de 5mC. La vitamine C se fixerait sur le domaine catalytique des TETs et contribuerait ainsi à augmenter l'efficacité du recyclage de Fe(II). Ceci permettrait de mettre en évidence une régulation, tout comme pour les DNMTs, des TETs par des facteurs extérieurs.

## 5. Rôle de la déméthylation de l'ADN

Contrairement à la marque 5mC, pour laquelle le niveau est relativement constant selon les différentes cellules somatiques et représente 4% des cytosines totales concernées (Ehrlich et al., 1982), celui des 5hmC est plus faible et il varie entre les différents types tissulaires. La 5hmC est la plus abondante dans le cerveau et les cellules souches embryonnaires, où elle concerne entre 0.4 et 0.7% des cytosines totales (Kinney et al., 2011; Kriaucionis and Heintz, 2009; Li and Liu, 2011; Münzel et al., 2011; Nestor et al., 2012). Les marques 5fC et 5caC sont-elles 10 à 100 fois moins abondantes que la marque 5hmC (0.02-0.002%) (Bachman et al., 2015; Pfaffeneder et al., 2011). En dépit de leur faible abondance, 5hmC et 5fC sont détectés après plusieurs divisions cellulaires ce qui suggérerait qu'il s'agit de marques stables et pouvant avoir une importance biologique. La majorité de ces produits oxydés est déposée de façon asymétrique, suggérant un mécanisme d'hérédité lors de la mitose différent de celui de la marque 5mC (Jones and Liang, 2009; Wu et al., 2014; Yu et al., 2012).

### a) Implication dans les grands mécanismes

#### i. La reprogrammation épigénétique

Au cours du développement très précoce chez les mammifères, un processus d'effacement total des marques épigénétiques dont la méthylation de l'ADN est observée avant la nidation de l'œuf. Par ailleurs, ce mécanisme est bien connu et décrit dans la mise en place des gamètes.

#### **\*Les PGCs (Primordial Germ Cells)**

Une déméthylation de l'ADN a lieu au stade pré-implantatoire après la fécondation pour permettre de restaurer la totipotence (Feng et al., 2010; Santos et al., 2002). Cette première vague de déméthylation est suivie d'une seconde vague, et est accompagnée d'une

augmentation de TET1 et TET2, puis d'une reméthylation de l'ADN quelques jours plus tard (Hackett et al., 2013; Seisenberger et al., 2013). Ceci va permettre d'obtenir des gamètes totipotents avec des empreintes sexe - spécifique (Ciccarone et al., 2012; Feng et al., 2010; Hajkova, 2011) . Les gamètes matures présentent finalement un niveau de méthylation qui est similaire à celui des cellules somatiques. Cette reprogrammation est nécessaire pour enlever les empreintes et ainsi enlever de façon partielle des modifications épigénétiques acquises (Guibert et al., 2012; Hackett et al., 2013; Seisenberger et al., 2013).

### \*Au niveau de l'embryon

Immédiatement après la fécondation de l'ovocyte chez la souris, un processus transitoire de déméthylation dans le pronucleus paternel est observé (Mayer et al., 2000; Oswald et al., 2000) à la suite de l'action de TET3, cela permet une accumulation de 5hmC et une diminution de 5mC (Gu et al., 2011; Iqbal et al., 2011; Ruzov et al., 2011; Wossidlo et al., 2011). Dans un premier temps pensé comme soumis uniquement à une déméthylation passive, il a été montré que le génome maternel subissait également une déméthylation active avec la présence relevée de 5hmC (Nakatani et al., 2015), mais à un niveau qui semble plus faible que pour le génome paternel (Wang et al., 2014). Enfin lors de l'implantation de l'embryon, on a un rétablissement de la méthylation (Okano et al., 1999).

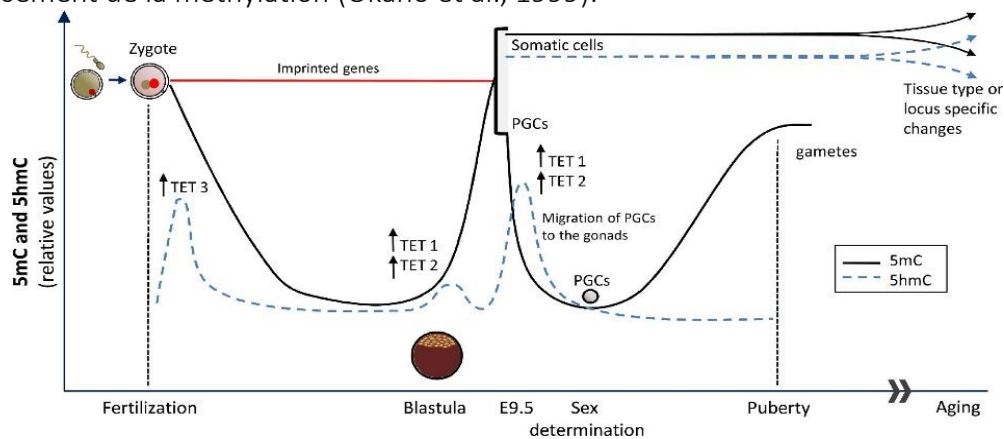


Figure 15: Reprogrammation épigénétique (López et al., 2017)

Les changements dans la composition en 5mC et 5hmC des gamètes sont représentés conjointement. Après la fécondation, on observe une perte de 5mC dans les pronuclei jusqu'au stade blastula, où les patrons de méthylations sont rétablis par une méthylation *de novo* en association avec TET1 et 2. Le génome paternel présente une déméthylation active réalisée par TET3. Les loci soumis à empreinte et quelques séquences répétées ont leur niveau de méthylation qui est maintenu lors de ces étapes. A ce point, les changements en composition en 5hmC et 5mC dans les PGCs (Primordial Germ Cells) et les cellules somatiques prennent des chemins différents. Les PGCs vont subir une deuxième vague de déméthylation de leur ADN dépendante de TET1 et 2. Cela sera suivi d'un rétablissement des patrons de méthylation selon le sexe de l'individu, qui se fera jusqu'à la naissance (mâle) et la puberté (femelle). Dans les cellules somatiques, bien que les niveaux de 5mC et de 5hmC semblent stables au cours du développement, des changements se produisent de façon tissu et locus spécifiques en fonction du style de vie de l'individu et de son vieillissement.

## ii. Le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire

La conversion 5mC en 5hmC se produit lors de la différenciation des cellules somatiques et est un processus clé lors de l'établissement des différents types cellulaires (Bocker et al., 2012). C'est ainsi qu'il y a acquisition de la marque 5hmC tout au long du neurodéveloppement chez la souris (des cellules souches neurales, aux cellules progénitrices, aux neurones matures) (Hahn et al., 2013; Orr et al., 2012; Song et al., 2011; Tan et al., 2013) avec une localisation plus spécifique au niveau du corps du gène et des éléments de régulation à distance (Colquitt et al., 2013; Hahn et al., 2013; Lister et al., 2013; Szulwach et al., 2011a, 2011b). Par ailleurs, TET2 est impliquée dans la différenciation des cellules hématopoïétiques humaines et murines (Figuroa et al., 2010; Kallin et al., 2012; Ko et al., 2011; Shearstone et al., 2011). Le taux de 5hmC est enrichi dans les enhanceurs actifs et le corps des gènes des lymphocytes T différenciés, où la présence de cette marque est davantage corrélée avec l'expression de gènes (Tsagaratou et al., 2014).

Globalement, bien qu'il semble clair que l'un des intermédiaires du processus de déméthylation actif à savoir, la marque 5hmC semble essentielle pour le contrôle du devenir cellulaire au cours de développement. Cela reste à être étudié plus finement, ainsi que le rôle et la fonction des autres intermédiaires (5fC, 5caC) qui restent à être pris en considération et compris.

## iii. Le vieillissement

Chez l'Homme, il est admis que les patrons épigénétiques changent au cours de la vie de l'individu de façon tissu et cellules spécifiques (Christensen et al., 2009; Day et al., 2013; Feil and Fraga, 2012; Heyn et al., 2012) et cela également entre individu du même génotype (Fraga et al., 2005; Madrigano et al., 2012; Pirazzini et al., 2012; Talens et al., 2012; Wong et al., 2010). Cette évolution du méthylome pourrait être un contributeur au vieillissement (Calvanese et al., 2009; Fraga, 2009; Issa, 2014).

C'est un phénomène que l'on qualifie d'« *epigenetic drift* », à savoir le fait que les similarités épigénétiques entre des individus jeunes sont perdues au cours du temps et conduit en une divergence des méthylomes chez la population âgée (Boks et al., 2009; Fraga et al., 2005; Heyn et al., 2012). Lorsque le focus est porté sur le méthylome, on parle dans ce cas de *DNA methylation drift*. Dans ce cas précis il s'agit de l'ensemble des changements non directionnels



du méthylome qui implique des évènements d'hyperméthylation et d'hypométhylation. Ils sont associés avec une accumulation progressive de dommages épigénétiques du fait de facteurs environnementaux, ou des erreurs spontanées lors du processus de transmission de l'information épigénétique. (Zampieri et al., 2015).

Globalement, une hypométhylation est observé lors du vieillissement (Hannum et al., 2013; McClay et al., 2014; Teschendorff et al., 2013), principalement au niveau de séquences répétées de l'ADN (SINE (ex alu), LTR (ex HERV-K) (Bollati et al., 2009; Christensen et al., 2009; Jintaridth and Mutirangura, 2010). Ceci permettrait de relier ce phénomène avec l'instabilité génomique observé au cours du vieillissement (Vijg and Dollé, 2007). En 2012, Heyn et al, à la suite d'une approche de séquençage après traitement au bisulfite de sodium, ont comparé la méthylation sur plus de 90% de l'ensemble des CpG du génome chez des nouveau-nés et des nonagénaires/centenaires. Cela leur a permis d'identifier et de confirmer la perte de méthylation de l'ADN. De plus, en accord avec les précédentes études, ils ont identifié des DMRs (régions différentiellement méthylés) au niveau des régions introniques et intergéniques, avec une colocalisation de ces régions avec des éléments répétés. Ils ont également mis en évidence une localisation de ces DMRs avec des régions du génome associées aux lamines (LAD), régions pour lesquelles des altérations du méthylome sont observées lors de cancer (Berman et al., 2011). Globalement les LAD sont des régions d'hétérochromatines dans lesquelles on retrouve des gènes clés du développement et des gènes type cellulaire spécifique qui sont maintenus réprimés (Guelen et al., 2008; Harr et al., 2015; Peric-Hupkes and van Steensel, 2010; Reddy et al., 2008). Ainsi une hypométhylation dans cette région pourrait être la cause ou refléter la différenciation cellulaire et l'état normal d'une cellule. Ce qui pourrait faire le lien avec l'apparition de certaines pathologies avec l'avancé en âge de l'individu.

Concernant l'implication d'un phénomène de déméthylation active du génome, de nombreuses études ont montré une augmentation générale de la marque 5hmC au niveau du cerveau chez les souris et les hommes âgés (Chen et al., 2012; Chouliaras et al., 2012; Haffner et al., 2011; Song et al., 2011; Szulwach et al., 2011a). Le niveau le plus fort est décrit dans les neurones matures chez les 2 espèces (Haffner et al., 2011). Chez la souris, on observe une augmentation de la marque 5hmC au niveau du gène 5-LOX, dont l'expression est connue pour augmenter chez les souris plus âgées (Chen et al., 2012). De façon intéressante, de nombreuses

études montrent un enrichissement âge dépendant en 5hmC et ceci de manière locus spécifique. Cependant ces mécanismes restent à être étudiés plus en profondeur.

## b) Implication dans la régulation de l'expression des gènes

### i. Le promoteur

Un enrichissement en 5hmC est retrouvé au niveau des zones TSS présentant un enrichissement en CpG qualifié d'intermédiaire à très riche (Williams et al., 2011). De plus au cours de la différenciation cellulaire, on constate qu'une diminution de l'expression des enzymes TETs dans les ESCs, est associée avec une diminution de 5hmC dans la région promotrice des gènes spécifiquement exprimés dans ces cellules. Cette perte d'hydroxyméthylation serait associée avec une augmentation de la méthylation et donc d'un *silencing* génique (Ficz et al., 2011). Le KO de TET1 aurait pour conséquence une augmentation ou une diminution de la régulation de la transcription génique, selon le contexte. Ainsi, il a été montré que TET1 peut lier une proportion significative de gènes ciblés par le complexe polycomb et se lier au complexe co-represseur SIN3A, ce qui illustre un rôle répressif de la transcription. La présence de 5hmC dans les promoteurs et non dans le corps du gène a un effet répressif sur la transcription *in vitro* (Robertson and Wolffe, 2000b).

### ii. Les éléments de régulation à distance

#### \*Les enhancers

Dans les cellules souches murines et cellules progénitrices neuronales, il a été identifié des régions génomiques appelées LMRs (*Low Methylation Regions*), qui ont une méthylation inférieure d'environ 30% par rapport à la moyenne. Ces régions sont pauvres en CpG, sensibles à la DNase, porteuses de structures chromatiniennes distinctes, et leur implication dans la régulation de la transcription a été démontrée par une approche de *reporter assays*, ce qui permet de les classer dans la catégorie des *enhancers* (Stadler et al., 2011). Ces LMRs présentent un enrichissement en enzyme TET1 et de nombreuses études semblent indiquer que les *enhancers* sont enrichis en 5hmC (Feldmann et al., 2013; Ficz et al., 2011; Pastor et al., 2011; Sérandour et al., 2012; Stroud et al., 2011; Sun et al., 2013; Szulwach et al., 2011a, 2011b; Wu et al., 2011), ce qui suggérerait que cette hydroxyméthylation serait déposée par TETs et serait importante pour le maintien d'un faible niveau de méthylation à cette position. Par ailleurs, des *DNA Binding Proteins* (DBP) (REST et CTCF) semblent être nécessaires et suffisantes pour l'établissement ces LMRs (Stadler et al., 2011). En 2013, Feldmann et collègues

ont démontré sur des ESCs que la délétion en CTCF était cytotoxique. En revanche, la délétion de REST conduit en la perte de 5hmC et en une accumulation de 5mC au niveau de ces LMRs. Ce qui supporterait un modèle où les DBPs comme REST et CTCF sont capables de recruter des enzymes TETs pour protéger ces régions de la méthylation. En ce sens, PRDM14 dirigerait les TETs sur les loci spécifiques pour la régulation de la transcription à travers la déméthylation des cytosines (Okashita et al., 2014).

#### **\*TFBS (Site de Fixation aux Facteurs de Transcription)**

Les ESCs de souris présentent un enrichissement en 5hmC au niveau d'*enhancer* porteurs de sites de fixation pour des facteurs de transcription (FT) de pluripotence comme Nanog, Sox2 et Oct4 (Costa et al., 2013; Stroud et al., 2011; Wu et al., 2011). Sur des cellules neurales et les adipocytes en différenciation, il est observé un changement dynamique en 5hmC au niveau de ces loci. On note la perte de 5hmC au niveau des *enhancers* avec des sites de fixation (SF) pour TF (TFBS) associés à la pluripotence alors que les *enhancers* avec les SF pour TFBS spécifiques de lignées comme Meis1 et PPAR gamma, ceci présentant au contraire un gain en 5hmC. Ce gain est associé avec d'autres changements chromatinien favorables à un état encore plus accessible comme la marque d'histone H3K27ac (acétylation de la lysine 27 de l'histone 3) (Sérandour et al., 2012). Lors du phénomène d'érythropoïèse, les loci qui présentent un gain en 5hmC sont associés avec des marques histones actives et de nombreux facteurs de transcription connus pour être importants dans ce processus comme GATA1,2, KLF1, STAT6 et STAT1 (Madzo et al., 2014). Chez la souris, TET1 serait recruté par NANOG pour améliorer l'expression de gènes clés impliqués dans la reprogrammation génique (Costa et al., 2013). Cela permet d'imaginer un modèle où de multiples facteurs de transcription sont capables de recruter TETs sur leur loci cibles.

L'activité des enzymes TETs permettrait de libérer des MBPs (*Methyl Binding Proteins*), et donc le recrutement protéines capables de lier 5hmC et/ou la déméthylation des CpG voisins (Mariani et al., 2013).

Une approche de mapping de la marque 5fC sur des mESCs (cellules souches embryonnaires de souris) a permis de montrer un enrichissement au niveau des *enhancers poised* à ce stade (Song et al., 2013).

### iii. Le corps du gène

On note l'enrichissement en 5hmC et en TET1 dans les régions intra-géniques et en particulier en région 3' des gènes activement transcrits (Wu et al., 2011). De façon intéressante, on constate que les gènes avec la plus forte densité en CpG intra-géniques sont enrichis en 5hmC, et le niveau de 5hmC dans le corps du gène a été montré comme augmenté lors de la différenciation neuronale, ceci sans affecter le niveau de 5mC (Hahn et al., 2013). Il y aurait donc un lien entre la présence des motifs 5hmC le long du corps du gène avec son expression génique (Colquitt et al., 2013; Madzo et al., 2014; Mariani et al., 2014).

Les exons « constitutifs » contiennent un niveau de 5hmC plus important que les exons soumis à un épissage alternatif (Khare et al., 2012). On observe en effet un enrichissement en 5hmC en périphérie des exons fortement exprimés dans les ESCs de souris et le KO de TET2 a pour effet de diminuer de manière significative de 5hmC dans ces régions (Huang and Rao, 2014). Un enrichissement en 5hmC au niveau en 5' des sites d'épissage à la jonction exon-intron, est noté dans le cerveau, ce qui suggère un lien entre 5hmC et l'épissage alternatif (Wen and Tang, 2014).

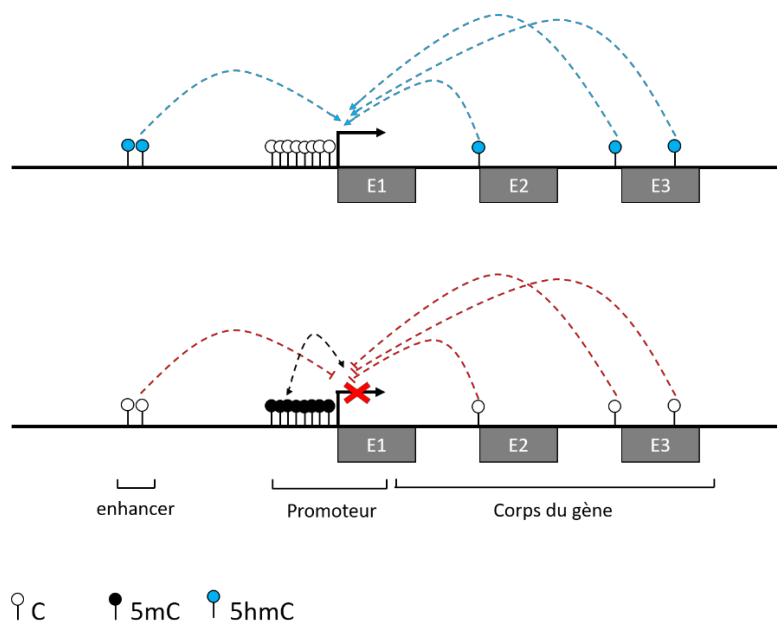


Figure 16: Rôle possible de la marque 5hmC dans le corps du gène.

Des études récentes semblent indiquer que l'hydroxyméthylation au niveau des enhancers et du corps du gènes régulerait positivement l'expression des gènes. La perte de ces marques notamment lors de cancer serait responsable d'une perte de l'expression du gène.

# Le Syndrome de Gougerot Sjögren

## I. Signes cliniques, diagnostiques et épidémiologie

### A. Signes Cliniques

#### 1. Les principales caractéristiques de la pathologie

Le syndrome de Gougerot Sjögren (SGS) est une maladie auto-immune chronique, au cours de laquelle on observe des dommages progressifs et irréversibles des glandes exocrines, plus particulièrement des glandes salivaires et lacrymales (Jonsson et al., 2011; Ramos-Casals et al., 2012). Elle se caractérise par une physiopathologie complexe aboutissant à une infiltration lymphocytaire avec *in fine* une dégradation de l'épithélium sécrétoire (Tzioufas et al., 2012). C'est une maladie avec un fort impact sur la qualité de vie. Il existe 2 formes de SGS :

- Le *primary* Sjögren's Syndrome (pSS) pour lequel on observe une perte de salivation et du flux lacrymal ainsi que des manifestations systémiques de la pathologie.
- Le *secondary* Sjögren's Syndrome (sSS) qui fait suite/accompagne une première maladie auto-immune (exemples : polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux systémique, sclérodémie systémique, cirrhose biliaire primitive). Il peut être suspecté lors d'atteintes d'organes tels que la thyroïde, le tube digestif ou le foie (Liapi et al., 2016).

Le diagnostic est difficile et est souvent retardé en raison de la variabilité des présentations cliniques et de la progression de la maladie. Cependant, les principaux signes cliniques observés chez les patients sont une sécheresse buccale (xérostomie) ainsi qu'une sécheresse des yeux (keratoconjunctivis sicca)

Du fait de la sécheresse buccale, on retrouve des infections de type candidose, qui seront à l'origine d'une muqueuse fragile et de caries qui conduiront à un renforcement de cette sécheresse (Fox and Liu, 2006; Jonsson et al., 2011; Soto-Rojas and Kraus, 2002). De plus le patient ressent une brûlure buccale, des difficultés à la mastication des aliments secs ou une dysphagie ce qui renforcera la nécessité de s'hydrater. Par ailleurs, chez ces patients on retrouve des difficultés à parler (Fox and Liu, 2006; Soto-Rojas and Kraus, 2002). Chez ces patients on peut retrouver également des parotidomégalies parfois compliquées de

parotidites bactériennes récurrentes (Fox and Liu, 2006; Rousso et al., 2005; Soto-Rojas and Kraus, 2002).

La sécheresse oculaire va conduire à des dommages au niveau de la cornée et de l'épithélium conjonctif qui vont créer une sensation d'inconfort, de sable dans les yeux (Tincani et al., 2013), une photophobie avec un besoin de mettre des gouttes fréquemment. Ce qui peut se compliquer par la suite par des ulcères de la cornée et des infections de la paupière (Tincani et al., 2013).

## 2. Les complications au niveau d'autres organes

Pour 30 et 70% des patients, chez qui un pSS a été diagnostiqué, on retrouve des manifestations systémiques très variées (Liapi et al., 2016). Ainsi très fréquemment, une fatigue est retrouvée, des manifestations musculosquelettiques de type arthralgies et des myalgies (García-Carrasco et al., 2002; Ramos-Casals et al., 2012).

Des complications peuvent atteindre d'autres organes comme :

- La peau= xérosis, phénomène de Raynaud, purpura et érythème annulaire (Tincani et al., 2013).
- Les poumons= bronchectasie, maladies obstructives des voies respiratoires (Nannini et al., 2013). On les retrouve dans 10 à 20% des cas.
- Le tube digestif= douleur épigastrique, dyspepsie, nausée, jéjunite, sigmoïdite et maladie intestinale inflammatoire (Cojocar et al., 2011). On retrouve également des maladies chroniques du foie de type : hépatomégalie, prurit, érythème palmaire et ictère chez les patients (Cojocar et al., 2011)
- Une sécheresse au niveau des muqueuses : au niveau vaginale (démangeaisons ou une dyspareunie).
- Des complications neurologiques : pour 2 à 25% des patients avec une prédominance de neuropathie périphérique principalement sensitive.
- Des atteintes rénales : tubulopathie rénale dans 20% des cas.
- Le SGS est également associé avec un risque augmenté de lymphomes à cellules B (décrit plus amplement dans la suite de ce chapitre).

## B. Outils pour le diagnostic

En pratique le diagnostic est difficile car les symptômes ne sont pas propres à la pathologie, et peuvent être le fruit d'autres traitements ou des effets de vieillissement. C'est pourquoi plusieurs tentatives de standardisation de celui-ci ont été réalisées.

### 1. 2002-AECG

Ainsi en 2002, l'*American-European Consensus Group* (Vitali et al., 2002) a proposé une première grille permettant le diagnostic de SS selon 6 items clairement définis (décrite **Figure 17**) et des critères de rejet.

<b>I – Symptômes oculaires</b> (au moins un des trois critères suivants)	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Sensation quotidienne, persistante et gênante des yeux secs depuis plus de 3 mois</li><li>• Sensation fréquente de «sable dans les yeux»</li><li>• Utilisation de larmes artificielles plus de 3 fois/jour</li></ul>	
<b>II – Symptômes buccaux</b> (au moins un des trois critères suivants)	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Sensation quotidienne de bouche sèche depuis plus de 3 mois</li><li>• A l'âge adulte, glandes salivaires enflées de manière répétée ou persistante</li><li>• Consommation fréquente de liquides pour avaler les aliments secs</li></ul>	
<b>III – Signes cliniques ophtalmologiques</b> (au moins un des deux tests suivants positif)	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Test de Schirmer <math>\leq 5</math> mm/5 minutes</li><li>• Score de van Bijsterveld <math>\geq 4</math></li></ul>	
<b>IV – Atteintes des glandes salivaires</b> (au moins un des trois tests suivants positif)	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Scintigraphie salivaire</li><li>• Sialographie parotidienne</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Flux salivaire sans stimulation <math>&lt; 1,5</math> ml/15 minutes</li></ul>
<b>V – Histopathologie</b>	
Sialadénite de score $> 1$ sur biopsie(s) de glandes salivaires accessoires (foyer: $> 50$ cellules mononucléées agglomérées; score = nombre de foyers sur $4 \text{ mm}^2$ de tissu glandulaire)	
<b>VI – Autoanticorps</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Anti-Ro (SS-A)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Anti-La (SS-B)</li></ul>
<b>Critères d'exclusion</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Antécédent d'irradiation cervicale</li><li>• Infection par le VIH ou le VHC</li><li>• Lymphome préexistant</li><li>• Sarcoïdose</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Réaction du greffon contre l'hôte</li><li>• Utilisation de médicaments anticholinergiques (après une période dépassant 4 fois la demi-vie)</li></ul>

Figure 17: critères de diagnostic du syndrome de gougrot sjogren selon l'AECG en 2002 (issue de Liapi et al., 2016).

Ainsi selon ces critères, un pSS est diagnostiqué si :

- On retrouve chez le patient 4 items sur 6 et à partir du moment où les items IV (histopathologie) ou VI (sérologiques) sont présents.
- Ou on retrouve chez le patient la présence de 3 critères objectifs sur 4 (items III-VI).

Si le patient souffre d'une autre pathologie mais présente les items I ou II ainsi que 2 des items III, IV et V alors dans ce cas, il s'agit également d'un sSS.

Comme le souligne Chen et collègues dans leur publication de 2018 (Chen et al., 2018), cette classification met avant tout l'accent sur la nécessité de retrouver chez le patients une positivité aux autoanticorps anti-SSA/Ro ou SSB/La au niveau sérique ou au niveau de la biopsie de glande salivaire. Enfin, ils mettent l'accent sur les patients dont les résultats négatifs à ces différents examens, peuvent conduire à poser un mauvais diagnostic.

De plus, les auteurs soulignent l'absence de mention des critères de pronostic de la maladie et des éléments de suivis des patients.

## 2. 2012-ACR (American College of Rheumatology)

Les critères de l'*American College of Rheumatology* (ACR) apparaissent en 2012 (Shiboski et al., 2012) (**Figure 18**).

1. Une kératoconjonctivite sèche avec un score de coloration oculaire $\geq 3$ (= somme du score cornéen à la fluorescéine (0-3) et du score conjonctival à la lissamine (0-6)), en l'absence d'usage de gouttes ophtalmologiques pour un glaucome et en l'absence de chirurgie cornéenne ou de chirurgie esthétique des paupières dans les 5 dernières années
2. Une biopsie des glandes salivaires accessoires montrant un focus score* $\geq 1$ pour 4 mm <sup>2</sup> (Chisholm et Mason grade 3 ou 4)
3. Présence d'anticorps anti-SSA/Ro et/ou anti-SSB/La ou (présence d'un facteur rhumatoïde associé à des anticorps antinucléaires à un titre $\geq 1/320$ )
<b>Critères d'exclusion</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antécédent de radiothérapie de la tête ou du cou</li> <li>• Infection par le virus de l'hépatite C</li> <li>• Infection par le VIH</li> <li>• Sarcoidose</li> <li>• Amyloïdose</li> <li>• Réaction du greffon contre l'hôte</li> <li>• Maladie associée aux IgG4</li> </ul>

Figure 18: Critères de diagnostic du syndrome de gougerot sjogren selon ACR en 2012 (Liapi et al 2016).

Focus score = agrégats de plus de 50 cellules.

Dans ces nouveaux critères sont ajoutés les facteurs rhumatoïdes et les anticorps antinucléaires qui augmentent les critères de diagnostic sans pour autant réduire la spécificité (Huo et al., 2010).



### 3. 2016-ACR/EULAR

Une nécessité de révision des critères établis en 2012, s'est faite sentir notamment du fait de projet d'études sur l'œil (Rasmussen et al., 2014). Par ailleurs, la comparaison des 2 types de critères 2014 ACR et AECG a souligné un taux de concordance de 0.81. A cela s'ajoutait la nécessité d'un consensus et la volonté d'établir un score avec un jugement en fonction de celui-ci (**Tableau 3**).

Tableau 3. Critères de Classification du syndrome de Gougerot Sjögren 2016

Critères de classification	Nombre de points
Sialadénite lymphocytaire avec focus score $\geq$ 1 sur la biopsie de glandes salivaires accessoires et focus score $\geq$ 1 foci/4 mm <sup>2</sup> .	3 points
Anticorps anti SSA/Ro positif	3 points
Occular staining score $\geq$ 5 (ou score de van Bijsterveld $\geq$ 4) pour au moins 1 œil.	1 point
Test de Schirmer $\leq$ 5mm/5min pour au moins un œil.	1 point
Flux salivaire sans stimulation $\leq$ 0.1ml/min	1 point
Critères d'exclusion :	
<ul style="list-style-type: none"><li>- Antécédent d'irradiation cervicale</li><li>- Infection par le VHC</li><li>- Infection par le VIH</li><li>- Sarcoidose</li><li>- Amylose</li><li>- Réaction du greffon contre l'hôte</li><li>- Maladie associée aux IgG4</li></ul>	

Ces nouveaux critères soulignent que la sialadénite lymphocytaire et la présence d'anticorps anti-SSA/Ro sont les critères les plus importants dans le diagnostic. La positivité pour l'anticorps anti-SSB/La n'est plus considérée comme un critère de classification. En effet, Baer et collègues, ont montré que le profil SSB+/SSA- n'est pas un profil associé avec des caractéristiques clés de la pathologie (Baer et al., 2015). De plus, l'exclusion du profil SSB+/SSA- des critères ne semblent pas affecter de manière significative la classification des patients. Enfin, cette nouvelle classification souligne l'importance d'examiner les défauts des fonctions lacrymales et salivaires. Avec ce critère on a une sensibilité plus importante mais une moins bonne spécificité en comparaison avec les anciens critères (Billings et al., 2018). Ainsi, comme le souligne Chen et collègues d'autres critères doivent être examinés, tels que la recherche de

nouveaux auto-anticorps et de nouvelles caractéristiques observables en échographie, ceci dans le but d'affiner les critères de diagnostic.

### C. Epidémiologie

Le Syndrome de Gougerot Sjögren est la deuxième maladie autoimmune la plus fréquente après la polyarthrite rhumatoïde. Elle touche principalement les femmes (9 pour 1 homme) (Jonsson et al., 2011) caucasiennes, entre 40-50 ans (Patel and Shahane, 2014).

La prévalence de la maladie est variable selon la population examinée et les critères pris en compte (voir paragraphe sur le diagnostic). L'incidence est estimée à 4 cas pour 1000 patients et la prévalence du SGS est de 0.1-4.8% en Europe, tandis que la prévalence à Pékin est de 0.77% ceci à partir des critères

de Copenhague (Patel and Shahane, 2014). Cependant, comme un certain nombre des caractéristiques de la pathologie

n'est pas spécifique au SGS et est partagé par d'autres maladies autoimmunes, la prévalence pourrait être sous-estimée (Both et al., 2017). Cette maladie peut également toucher tous les âges, ainsi quelques cas ont été observés chez les enfants, on dispose cependant de peu de données épidémiologiques. La maladie pour cette tranche d'âge reste souvent méconnue et le délai de diagnostic long. Ainsi, elle pourrait débiter dans l'enfance pour 5% des cas et toucherait surtout les filles avec un sex-ratio de 8/1 et un pic de fréquence vers l'âge de 10 ans. Dans ce cas, un sSS est plus fréquent et le SGS débute généralement à l'adolescence et précède ou est en simultané de l'autre maladie autoimmune. (Prieur and Quartier, 2009).

#### Prévalence, incidence

La prévalence est un outil de mesure statistique médicale. Elle renseigne sur le nombre de personnes atteintes par une maladie ou tout autre événement comme un accident, les suicides, au sein d'une population à un moment donné. Contrairement à la notion d'incidence, qui ne recense que les nouveaux cas sur un intervalle de temps donné, la prévalence comptabilise à la fois les nouveaux cas et ceux diagnostiqués plus anciennement à un instant précis. Elle est la plupart du temps exprimée en nombre de cas pour 100000 habitants.

## II. Focus sur la glande salivaire et son atteinte

Les glandes salivaires jouent un rôle important et essentiel dans la survie de l'organisme du fait de son impact sur la prise alimentaire, ainsi par exemple chez les souris un retrait des glandes salivaires principales entraîne leur décès au bout de quelques jours (Emmerson and Knox). Bien que cela ne soit pas le cas pour l'Homme, leur dysfonction à la suite d'anomalies génétiques (Syndrome lacrymo-auriculo-dento-digital ou une aplasie des glandes lacrymales et salivaires), d'atteintes suite à des chirurgies, des radiations lors de cancers de la tête et du cou ou des

maladies autoimmunes comme le SGS ; peuvent avoir un impact : difficultés à avaler, à mastiquer, difficultés à parler, altération de la muqueuse et des infections, altération des dents. Les thérapies actuelles, dans ce cas, sont très limitées et se résument à l'utilisation de médicaments sécrétagogues (dont la bromhexine, l'anétholtrithione, la pilocarpine et la ciméveline) pour stimuler la production de salive ainsi que de chewing-gum sans sucre (la mastication stimulant la salivation), et de salive artificielle en cas d'absence total de salivation. Des solutions à long terme n'étant pas disponibles, il y a une nécessité de développer des stratégies de régénérations cellulaires (Emmerson and Knox)

### A. Structure et fonction de la glande salivaire

Chez les mammifères, la salive est principalement sécrétée par 3 glandes majeures : la glande parotide, la glande sous maxillaire et la glande sublinguale qui vont participer à plus de 90% de la sécrétion de la salive ; Il existe également plus de 1000 glandes mineures qui contribueront à cette sécrétion (Miletich, 2010)(**Figure 19**).

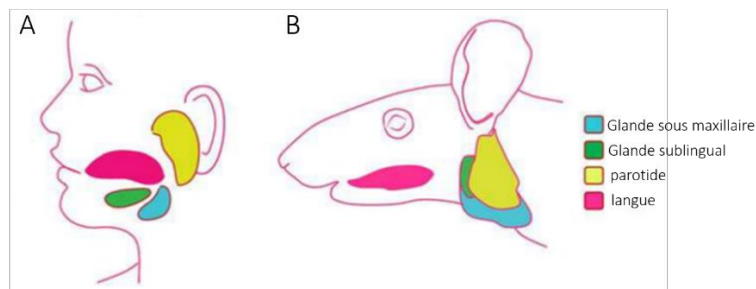


Figure 19: Localisation des 3 glandes salivaires principales chez l'Homme (A) et la souris (B) (Issue de Emmerson et Knox 2018).

D'un point de vue fonctionnel, ces glandes salivaires sont constituées d'une unité productrice de la salive. Dans cette unité productrice, on retrouve des cellules acinaires qui sont localisées à la fin d'un réseau de canaux et sont de 2 types : séreuses ou muqueuses. Chez l'homme, les cellules acinaires des parotides sont de type séreux, celles de la glande sous maxillaire sont de type séreux et muqueux et enfin celles de la glande sublinguale sont de type muqueux.

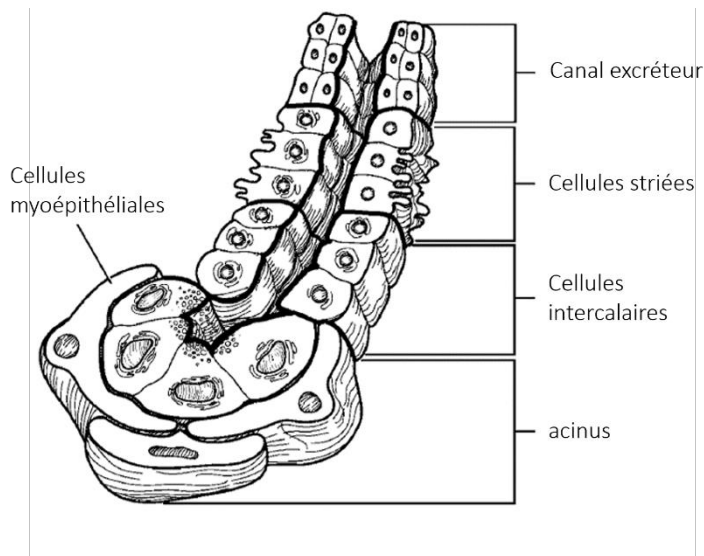


Figure 20: illustration d'une unité productrice de salive (issue de Holsinger and Bui 2007)

Les cellules acinaires séreuses sont de formes pyramidales, avec un large noyau central ; les cellules acinaires muqueuses sont en forme de colonne avec un noyau aplati vers la membrane basale. Autour des acini, on retrouve des cellules myoépithéliales qui vont aider à la sécrétion de la salive en les contractant en réponse à des stimuli nerveux (Segawa et al., 1995).

Une fois sécrétée la salive passe à travers un réseau de canaux composés de cellules intercalaires (les plus petit conduits sont composés de cellules épithéliales simples cuboïdales), striées (épithélium colonnaire) et de canaux excréteurs (épithélium colonnaire pseudo-stratifié) dans la cavité orale (Miletich, 2010) (**Figure 20**).

En moyenne, la quantité journalière de salive oscille entre 0.5 et 1L, ce qui nécessite une bonne vascularisation et innervation de ces glandes (Melvin et al., 2005).

Ainsi concernant les parotides, les capillaires sont dérivés de l'artère carotidienne externe et enroulent les acini. Quant aux glandes sublinguales et sous maxillaires, la vascularisation se fait par les artères sous mentonnières et sublinguales, qui sont des branches des artères linguales et faciales.

La sécrétion de la salive est en premier lieu contrôlée par les nerfs parasympathiques, et à un moindre niveau par les nerfs sympathiques du système nerveux autonome (Proctor and Carpenter, 2007).

La glande parotide reçoit des nerfs parasympathiques depuis le nerf XI glosso pharyngien via le ganglion otique. Alors que pour les 2 autres glandes, l'innervation est faite par la corde du tympan via le ganglion parasympathique sous maxillaire (Holsinger and Bui, 2007). Les nerfs parasympathiques activent à la fois des récepteurs cholinergiques et non cholinergiques pour permettre un flux salivaire, ceci en augmentant le transfert d'eau. Les nerfs sympathiques, qui proviennent des noyaux cervicaux supérieurs dans le tronc cérébral, régulent la sécrétion de

protéines et ainsi la viscosité de la salive. L'innervation parasympathique n'est pas uniquement nécessaire pour la fonction mais aussi pour le maintien de l'organe. En effet, si on enlève les nerfs parasympathiques on observe une atrophie de la glande, la réintroduction de l'innervation inverse le phénotype (Carpenter et al., 2009; Peronace et al., 1964; Snell and Garrett, 1958; Wells and Peronace, 1967). L'innervation sympathique est contrairement à l'innervation parasympathique non essentielle (Proctor and Asking, 1989). L'activation des récepteurs beta adrénergiques favoriserait la prolifération cellulaire (Hand and Ho, 1985; Johnson, 1984) et participerait donc à la régénération des tissus de la glande salivaire (Boshell and Pennington, 1980).

Ces glandes peuvent avoir leur fonctionnement perturbé (hyposalivation) lors d'un Syndrome de Gougerot Sjögren ou suite :

- A la prise de médicaments tels que :
  - o Les benzodiazépines
  - o Les antidépresseurs (inhibiteurs de monoamine oxydase (IMAO) tricycliques) > antidépresseurs (Inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine (ISRS))
  - o Les neuroleptiques
  - o Les antihistaminiques anciens > antihistaminiques H1
  - o Les beta et alpha bloquants
  - o Les antiparkinsoniens
  - o Les opiacés
  - o Les inhibiteurs calciques
  - o Certains antiviraux
  - o L'atropine
  - o Le tabac
- Le vieillissement
- Etat anxiodépressif
- Le diabète décompensé
- Sarcoïdose
- Infections par le Virus de l'immunodéficience Humaine ou le virus de l'hépatite C
- Réaction du greffon contre l'hôte (Liapi et al., 2016).

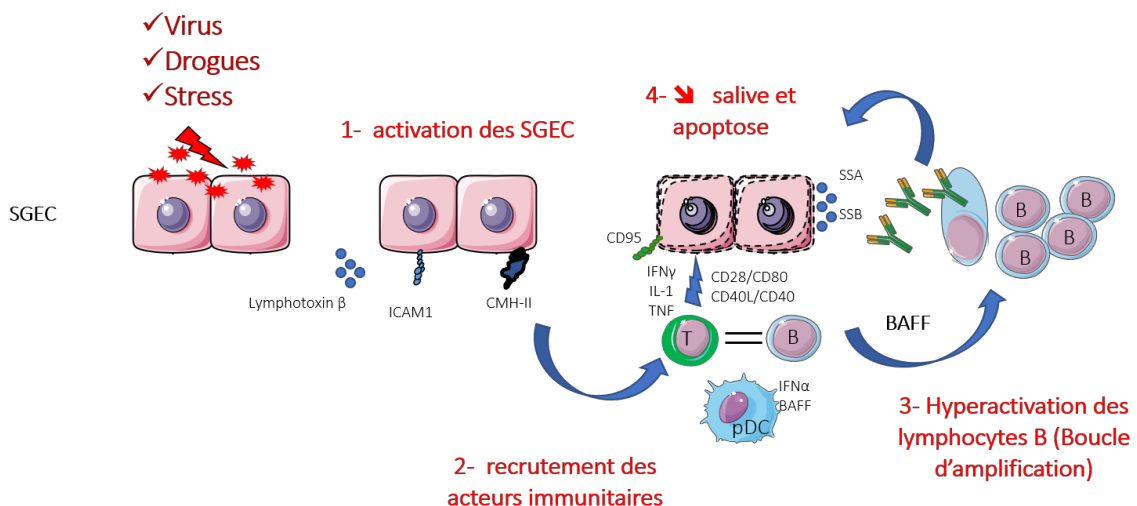
### III. Etiologie

#### A. 2 théories autour de l'origine de la pathologie

##### 1. Un épithélium au cœur de la pathologie

Cet épithélium particulier participe à la mise en place et au maintien d'un microenvironnement inflammatoire (signature interféron, qui sera détaillée plus amplement dans la suite de ce chapitre), microenvironnement favorable à l'émergence des clones lymphocytaires (Gottenberg et al., 2006). Ainsi, les lymphocytes circulants infiltreraient les glandes salivaires en suivant l'expression de la cytokine BAFF (B-cell activating factor) par les SGECs (cellules épithéliales issue de la glande salivaire) via une stimulation de celle-ci par l'interféron alpha (IFN $\alpha$ ) (Ding et al., 2016; Ittah et al., 2006).

Selon cette hypothèse le processus pathologique se déroulerait selon le schéma suivant



SGEC: Salivary Gland Epithelial Cells  
pDC: Plasmacytoid dendritic cells  
T: Lymphocytes T  
B: Lymphocytes B

Figure 21: Un épithélium au cœur de l'inflammation et du processus pathologique.

- 1- Dans un premier temps, il y aurait une activation des SGECs qui vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires et des chémokines. Ceci aurait pour effet de permettre le recrutement des lymphocytes T; les SGECs vont également exprimer le système de présentation antigénique HLA (*Human Leukocyte Antigen*) de classe 1, le ligand CD40 (une protéine de costimulation impliquée dans la présentation antigénique), le Fas ligand et le Fas récepteur (Manoussakis and Kapsogeorgou, 2010; Tzioufas et al., 2012).

- 2- Ce qui conduirait dans un 2<sup>ème</sup> temps à l'activation des lymphocytes T CD4+ et leur différenciation en cellules T helper folliculaires (Tfh), démontrée *in vitro*, (Gong et al., 2014)). Ces Tfh vont participer à améliorer ou augmenter la survie des lymphocytes B (LB), qui sont eux recrutés dans un 3<sup>ème</sup> temps (Manoussakis and Kapsogeorgou, 2010; Tzioufas et al., 2012; Youinou et al., 2012).
- 3- L'interaction des SGECs avec les LB va permettre d'obtenir différentes sous populations et va participer à leur prolifération (Morva et al., 2013).

Dans ce scénario, les SGECs participent pleinement au recrutement et à l'activation des acteurs immunitaires et ne se contentent pas d'être de simples victimes passives. À la suite de leur infiltration, les lymphocytes contribueraient à l'activation de processus de déméthylation de l'ADN dans les SGECs et ainsi à la promotion des mécanismes pathogéniques inflammatoires et autoimmuns qui sont déterminants pour l'intégrité des structures acinaires (Konsta et al., 2014). Puis, survient la perte de la fonction salivaire qui fait suite à la déstructuration des cellules acinaires et la désintégration de la matrice extracellulaire (MEC). On observe une augmentation de l'activité des MMPs (métalloprotéinase) et plus particulièrement de la MMP9 qui peut être sécrétée par des cellules épithéliales et lymphocytaires (Pérez et al., 2005; Tandon et al., 2017).

## 2. Implication de mécanismes neuro-endocriniens

Dans un premier temps, une possible implication de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien est soupçonnée avec le constat d'un niveau basal d'ACTH (Adrénocorticotrophique Hormone) et de cortisol plus bas chez les patients et qui serait associée avec un fonctionnement de l'hypophyse diminué et une réponse de la surrénale atténuée (test CRH ovin) (Johnson et al., 2000).

Par ailleurs l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique serait également impliqué par le défaut de sécrétion d'œstrogènes observé chez les patients (Tzioufas et al., 2008).

### ACTH et cortisol

**L'ACTH** (Adrénocorticotrophique Hormone) est une hormone synthétisée et sécrétée par l'hypophyse antérieure, qui active la croissance et le développement de la glande surrénale et stimule la sécrétion corticale de glucocorticoïdes, hormones qui interviennent dans les mécanismes de défense de l'organisme vis-à-vis du stress.

**Le cortisol** est une hormone stéroïdienne sécrétée par la glande surrénale après une stimulation par l'ACTH. Ses fonctions principales sont :

- l'augmentation de la glycémie par le biais de la néoglucogenèse,
- l'inhibition de certaines réponses du système immunitaire,
- la régulation du métabolisme des lipides, protéines et glucides,
- régulation du cycle circadien.

## B. Facteurs environnementaux

Plusieurs éléments laissent penser à une possible infection à l'origine de SGS avec une implication du système immunitaire inné (Kiripolsky et al., 2017). Tout d'abord, comme cela est suggéré par Emmerson et Knox (Emmerson and Knox), la glande salivaire est un terrain propice et latent d'infections virales et bactériennes. Ainsi, une signature IFN (voir paragraphe VI Signature Interféron) est largement retrouvée en périphérie, mais également au niveau des tissus glandulaires et constitue un indicateur possible d'une infection virale. Sur un modèle murin lupique, un traitement avec un agoniste de TLR3 (*Toll Like Receptor 3*) conduit à l'activation du système immunitaire inné de la souris mais aussi à une inflammation des glandes salivaires, un des symptômes clés du SGS, ce qui appuie la thèse d'une infection virale préalable à la maladie auto-immune (Nandula et al., 2013).

### TLR et TLR3

Les protéines TLR (Toll Like Receptor) ont été nommées ainsi en raison de leur ressemblance avec la protéine Toll découverte chez la drosophile d'abord pour son implication dans le développement embryonnaire puis pour son rôle immunitaire. Il existe une dizaine de classes de récepteurs TLR différentes qui reconnaissent un spectre assez large de motifs antigéniques (PAMP pour Pathogen Associated Molecular Patterns).

Le TLR3 reconnaît l'ARN sous forme de double brin de plus de 35 nucléotides caractéristiques des virus (dsRNA pour "double stranded RNA").

Enfin, force est de constater que certaines infections miment le SGS et conduisent à un phénotype qualifié de *SS-like illness* (Fox and Fox, 2011). Parmi les infections dont les symptômes s'approchent de ceux du SGS, on trouve : la tuberculose, la lèpre, l'infection à spirochètes, l'hépatite A, B et C, le parvovirus B19, la dengue, le paludisme, l'endocardite bactérienne subaiguë et le HIV. Certains de ces virus, et plus spécifiquement les virus de la famille des *herpesviridae*, présentent un tropisme pour les tissus de la glande salivaire et lacrymale (Fox and Fox, 2011). De plus, des études semblent souligner également une possible implication des virus : HTLV-1 (Virus T Lymphotrope Humain 1), CMV (cytomégalovirus), EBV (Virus d'Epstein Barr) et HRV 5 (RhinoVirus Humain 5) (Igoe and Scofield, 2013).

Concernant les *herpesviridae*, plusieurs constatations semblent les incriminer, ainsi une plus forte incidence de la réactivation du virus EBV est constatée chez les patients SGS avec une plus forte expression du HLA-DR (appartenant au Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II, molécules retrouvées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes dites

« professionnelles » telles que les cellules dendritiques, les LB, les macrophages, et certaines cellules de tissus particuliers (moelle osseuse rouge ou thymus)). Au niveau des glandes



salivaires, on observe une augmentation des antigènes pour l'EBV et de son ADN dans les lymphocytes infiltrant la glande salivaire (Fox et al., 1991; Inoue et al., 2012; Mariette et al., 1991). Barzilai et collègues constatent augmentation du titre de l'anticorps IgM dirigé contre le CMV dans leur cohorte de patients SGS par rapport à leur cohorte contrôle (Barzilai et al., 2007). Ramos-Casals et collègues ont montré une corrélation positive entre une cytopénie chez les patients atteints d'un SGS et une infection préalable au parvovirus B-19 humain (Ramos-Casals et al., 2000). Enfin, une plus forte prévalence du SGS chez les patients ayant une infection HCV (25.9%), ou une infection HBV (3.4%) est observée (Nagao et al., 2003). Dans les pays méditerranéens, les patients présentent également une plus forte fréquence (14%) d'infections de type hépatite C (García-Carrasco et al., 2002).

Ainsi de nombreux éléments soulignent une possible infection en lien avec le développement de la maladie auto-immune, cependant jusqu'à présent aucune étude ne permet d'établir un lien direct.

### C. Facteurs génétiques

L'implication de facteurs génétiques a été mise en évidence chez les paires de jumeaux. En effet, si l'un des 2 est atteint de la maladie, le deuxième aura 662 fois plus de risque de développer la pathologie par rapport à un individu dont le jumeau n'est pas atteint (Bolstad et al., 2000a).

C'est l'étude de Lessard et collègues, par une approche de séquençage du génome entier (GWAS ; Genome-Wide Association Study) qui a permis de mettre en évidence de nombreux polymorphismes associés à la pathologie (Lessard et al., 2013).

Ainsi ces polymorphismes sont retrouvés au niveau :

- Du complexe majeur d'histocompatibilité : HLA
- Des gènes de la voie de signalisation IFN type I et II : IRF5 (Interferon Regulatory Factor 5), IL12A (Interleukine 12A) et STAT4 (Signal Transducer and Activator of Transcription 4)
- Des gènes de la voie NFκB (nuclear factor-kappa B) (TNIP1 (TNFAIP3-interacting protein 1) et TNFAIP3 (TNF Alpha Induced Protein 3, régulateur négatif de la voie NFκB)
- Des gènes impliqués dans le trafic cellulaire (CXCR5 (C-X-C chemokine receptor type 5))
- Activation et différenciation des cellules productrices d'anticorps (BLK)
- Des gènes de la signalisation TLR et du BCR (B-cell receptor). (Voir tableau récapitulatif en Annexe 1)

## IV. Physiopathologie

Précédemment, a été évoquée la possible implication d'une infection notamment virale en amont de la pathologie. Au cours d'une infection virale ou bactérienne, celles-ci vont solliciter le système immunitaire inné en première ligne.

### A. Implication du système immunitaire inné

Le système immunitaire inné est la première ligne de défense et intervient dans la reconnaissance des PAMPs (motifs moléculaires associés aux pathogènes). Il englobe les barrières anatomiques de défenses contre l'infection (à la fois chimique et physique) et les réponses cellulaires. Il existe de nombreux récepteurs de ces PAMPs appelés PRRs (Pattern Recognition Receptors) avec les TLRs et les Nucleotide binding Oligomerization Domain (NOD) like receptors (NLRs). Cette première ligne de défense implique les cellules dendritiques, les natural killers et les macrophages. Or, ces cellules semblent jouer un rôle dans la physiopathologie du SGS.

#### 1. Cellules dendritiques

Les 2 types de cellules dendritiques à savoir les cellules dendritiques classiques (DCs) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) ont un rôle dans la pathogenèse du SGS (Sandhya et al., 2017). Les pDCs sont présentes dans les foci lymphocytaires des glandes salivaires des patients et plutôt dans les lésions légères (Christodoulou et al., 2010).

Ces pDCs sont considérées comme étant la principale source de production d'IFN $\alpha$  et en produiraient 1000 fois plus par rapport aux autres types cellulaires (Rönblom and Alm, 2001; Siegal et al., 1999), ce qui est appuyé par la présence à leur surface des récepteurs TLR7 et 9 dont l'activation (motif ARN simple brin pour le TLR 7 et motif ADN non méthylé pour le TLR9) a pour finalité la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN $\alpha$  par la cellule. On retrouve également des DCs dans la glande salivaire (van Blokland et al., 2000). Ces DCs vont former des *clusters* autour des cellules épithéliales, alors que les pDCs sont trouvées autour d'infiltrat lymphocytaire. Par ailleurs, dans le sang périphérique, on constate une diminution de pDCs et de certaines DC ce qui appuie l'argument de leur migration au niveau de la glande salivaire (Vogelsang et al., 2010). Cette migration serait facilitée par la production de chémokines comme CXCL13 (chemokine (C-X-C motif) ligand 13), CCL17, CCL19, CCL21 et

CCL22 (Chemokine (C-C motif) ligand 17, 19, 21 et 22) par les SGECs, dont les récepteurs sont exprimés par des DCs (Sandhya et al., 2017). A leur tour, les DCs stimulent et activent les Lymphocytes (LT) qui vont produire des cytokines pro-inflammatoires. Il est à noter que des souris KO (*Knock Out*) pour ID3 (*Inhibitor Of DNA Binding 3*, pour lesquelles on aurait probablement une inhibition du développement des pDCs) et des souris KO pour le DC immunoreptor (DCir) développent une inflammation de la glande salivaire ce qui met en lumière leur rôle probable dans la pathologie. Enfin, les DCs contribueraient à la formation des centres germinatifs ectopiques dans les tissus salivaires.

## 2. Macrophages

Il a été montré dans le modèle murin NOD (non obese diabetic, modèle utilisé pour l'étude du SGS), que les macrophages pouvaient infiltrer la glande salivaire avant les lymphocytes. Ceci va dans le sens de la constatation d'une augmentation des macrophages dans les tissus salivaires, cela en lien avec la progression de la pathologie chez les patients. Leur présence serait plutôt observée dans les lésions sévères (Christodoulou et al., 2010). Ces cellules seraient capables de sécréter de l'IL18 (Interleukine 18, qui permettrait dans un second temps de stimuler la production d'IFN $\gamma$  (IFN gamma) par le LT et les cellules NK) et CXCL13 (chimioattractant des LB). Chez la souris, la déplétion de ces cellules permet d'observer une amélioration de la production de larmes. Par ailleurs, les macrophages, chez la souris, seraient à l'origine de la production d'IL12 (Interleukine 12, responsable notamment de la différenciation des lymphocytes T en Th1 (Lymphocytes T helper)) (Zhou and McNamara, 2014).

## 3. Les monocytes

Les monocytes ont des fonctions en lien avec l'immunité innée et sa modulation, la production de cytokines et la phagocytose (Yang et al., 2014). Chez les patients atteints d'un SGS, il a été montré que ces cellules sont capables de sécréter des molécules pro-inflammatoires : interleukine 6, BAFF (Yoshimoto et al., 2011) et des gènes régulés par la voie IFN type I (qui comprend surtout l'interféron alpha et beta, voir plus d'information dans le paragraphe sur la signature interféron) (Brkic et al., 2010, 2013; Maria et al., 2014; Wildenberg et al., 2008).

Par ailleurs, les monocytes expriment un niveau plus faible de I $\kappa$ B $\alpha$  (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) (Lisi et al., 2012) et démontrent une activité réduite pour la phagocytose des cellules apoptotiques (Hauk et al., 2014). Ainsi, les

monocytes par leur présence reflètent le niveau d'inflammation chez les patients (Maria et al., 2014), les monocytes matures étant suggérés comme contributeurs de l'inflammation dans la glande salivaire (Wildenberg et al., 2009).

#### 4. Cellules NK

Les cellules NK des patients SGS expriment un marqueur d'activation qui est le récepteur NCR3 (Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 3 ou NKp30 [Sandhya et al., 2017]). Le ligand de ce récepteur est B7H6 (Natural Killer Cell Cytotoxicity Receptor 3 Ligand 1), qui est retrouvé à la surface des DCs et des SGECs ce qui va permettre un dialogue entre ces différents types cellulaires et contribuer à l'activation des cellules NK. Ainsi, les cellules NK activées vont sécréter de l'IFN $\gamma$ , cytokine qui joue un rôle dans le dysfonctionnement de la glande salivaire (Moutsopoulos et al., 1986) et qui contribue à la maturation des DCs et la différenciation des Lymphocytes T.

#### B. Implication du système immunitaire adaptatif

Au cours du SGS, on constate une infiltration massive de lymphocytes T et B dans la glande salivaire, qui sont tous deux des acteurs immunitaires du système immunitaire adaptatif. Si le système immunitaire inné n'est pas assez efficace, le système adaptatif est celui qui prend le relais et va permettre de combattre l'infection de façon plus précise, en développant une réponse sur mesure vis-à-vis de l'agent infectieux. C'est dans ce cadre que les lymphocytes T et B sont sollicités.

## 1. Lymphocytes T

Les LT sont majoritairement présents dans les formes modérées de la maladie (Christodoulou et al., 2010). Dans les infiltrats des glandes salivaires, on retrouve principalement des lymphocytes T CD4+. Le ratio CD4/CD8 est de 3-5 pour 1. Par ailleurs on retrouve différentes catégories de LT (**Figure 22**) :

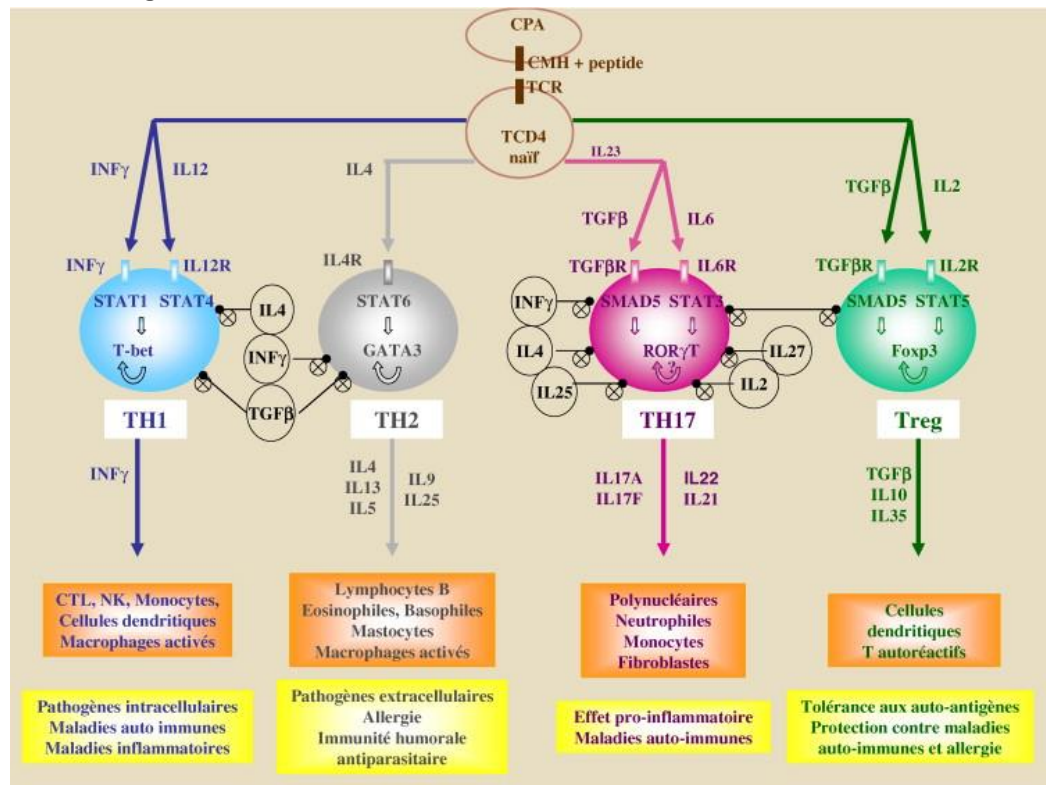


Figure 22: Différenciation des Lymphocytes T CD4+ (Essakalli et al., 2010)

### Les Lymphocytes T helper1 (LTh1)

Du fait de la présence d'IL12 (interleukine 12, sécrétée par les CD4 et les macrophages) et d'IFN $\gamma$  (sécrété par les cellules NK), les LT CD4+ se différencient en Th1. Le développement du SGS avec une augmentation de l'apoptose des cellules acinaires, l'hyposalivation et l'expression anormale des protéines salivaires observée dans les souris NOD sont abolis chez les souris NOD IFN $\gamma$ -/- et NOD IFN $\gamma$ R (IFN $\gamma$  Récepteur)-/-, soulignant le rôle joué par ces cytokines dans la phase pré-immune du SGS (Cha et al., 2004).

### Les Lymphocytes T helper17 (LTh17)

Les Th17 (capables de produire notamment de l'IL17) sont importants quant à la formation des centres germinatifs dans la glande salivaire au cours d'un SGS. On retrouve une augmentation de l'expression d'IL17 (Interleukine17) dans le sang, ainsi qu'une augmentation de son transcrit

et de la protéine dans les biopsies de glandes salivaires mineures (MSG) des patients, ce qui est corrélé avec le focus score retrouvé en histopathologie (Katsifis et al., 2009). On retrouve par ailleurs une augmentation d'IL6 (interleukine 6) et d'IL23 (interleukine 23) dans le plasma et les MSG de patients (Nguyen et al., 2008), ce qui permet d'expliquer la présence des Th17. On note également une augmentation de l'IL22 (qui va induire la production dans un second temps d'IL23 et d'IL17 dans la voie Th17) au niveau des glandes salivaires des patients (Ciccia et al., 2012). Or IL22 promeut une réponse inflammatoire intense dans le SGS (Sonnenberg et al., 2010). Une corrélation entre le niveau d'IL22, le faible flux salivaire et la sérologie des patients (anti-Ro, anti-La, RF) a également été établie (Lavoie et al., 2011).

Enfin, une plus forte expression de l'IL21 dans le sérum et dans les glandes salivaires des patients est corrélée avec le taux d'immunoglobulines et d'infiltration lymphocytaire. L'IL21 est produite, entre autre, par les Tfh qui jouent un rôle dans l'activation des lymphocytes B et la formation des centres germinatifs (Sandhya et al., 2017).

#### Les Lymphocytes T régulateurs (Treg)

Les lymphocytes Treg s'accumulent dans les MSG mais en cas d'inflammation renforcée ils seront accompagnés par les lymphocytes Th17. A noter qu'une faible expression du facteur de croissance FOXP3 (forkhead box P3) dans les lymphocytes Treg présents dans les glandes salivaires ont été montrés comme facteur prédictif de l'apparition de lymphome en plus du SGS (Sandhya et al., 2017).

#### Les Lymphocytes T folliculaire helper (Tfh) (Figure 23)

Au cours du SGS, les SGECs sont capable d'induire une différenciation des lymphocytes T en Tfh par la sécrétion de l'IL6 et du ligand ICOS (Inducible T-cell COStimulator). Il s'agit de la sous population de lymphocytes T spécialisée dans l'aide et le soutien des LB. Les cellules Tfh positives pour le récepteur CXCR5 sécrète l'IL21, cytokines qui participe à la maturation, la prolifération des LB et la formation des centres germinatifs dans les glandes salivaires de patients (Sandhya et al., 2017).

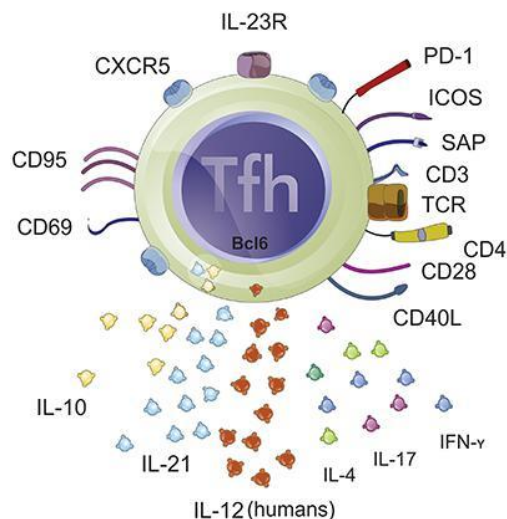


Figure 23: Les Lymphocytes T folliculaire helper. (Mesquita Jr et al., 2016)

Les Tfh sont cruciaux pour la formation de centres germinatifs et le développement des réponses cellulaires dépendantes des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires. La figure ci-dessus représente un Tfh avec à sa membrane les molécules les plus importantes, les facteurs de transcription et les molécules effectrices solubles

CD40L : CD40 ligand ; CXCR5 : C-X-C chemokine receptor type 5 ; IL-23R : Interleukine-23 récepteur ; PD-1 : Programmed cell death 1 ; ICOS : Inducible T-cell COstimulator ; SAP : serum amyloid P component ; IL-10,21,12,4,17 : Interleukine 10, 21,12,4,17 ; IFN $\gamma$  : Interféron  $\gamma$ .

## 2. Lymphocytes B

Les LB sont attirés dans les glandes salivaires via des chémokines sécrétées par les cellules épithéliales et en particulier par la chémokine CXCL13 (Salomonsson et al., 2002). L'activation des LB permet ensuite d'induire la sécrétion d'autoanticorps dirigés contre certains composants cellulaires et en particulier les ribonucléoprotéines SSA/Ro et SSB/La. On les retrouve majoritairement présents dans les formes sévères de la maladie (Christodoulou et al., 2010) et dans les centres germinatifs ectopiques. Ces centres sont des sites de production d'anticorps et leur présence est prédictive de lymphome (Sandhya et al., 2017).

En plus de produire des anticorps et des autoanticorps, les LB présentent une anomalie de distribution de leur sous population. Ainsi, on retrouve des LB transitionnels de type 2 et les LB *like marginal zone* dans ces centres germinatifs avec un rôle dans la production d'autoanticorps (Daridon et al., 2006). La distribution des sous populations de LB dans le sang périphérique pourrait aider à distinguer le SGS des autres maladies rhumatismales. En effet, les *activated naive* et *CD27- memory B cells* sont sur représentées alors que les *CD27+ memory B cells* sont diminuées dans le sang périphérique des patients (Binard et al., 2009).

Comme déjà évoqué dans ce paragraphe, c'est la sécrétion de la chimiokine CXCL13 qui est à l'origine du *homing* des LB vers les glandes salivaires. CXCL13 est sécrétée par les DC folliculaires, les cellules stromales et certains LT comme les Tfh. Son récepteur CXCR5 est localisé sur les LB et les Tfh et va permettre de guider notamment les LB jusqu'au follicule. Une expérimentation sur souris a permis de démontrer, que le niveau de CXCL13 refléterait le stade de la maladie (Kramer et al., 2013). Par ailleurs le « blocage » de CXCL13 permettrait de

diminuer/abroger l'inflammation dans les glandes salivaires. Enfin, on observe un niveau plus élevé dans la salive et le sérum des patients souffrant d'un SGS (Sandhya et al., 2017).

Une cytokine est également fortement impliquée dans le processus pathologique, c'est la cytokine BAFF (B-cell activating factor). Elle intervient dans l'hyperactivation des LB, et est induite après une stimulation par IFN (produit par les pDCs). BAFF joue un rôle dans le changement de classe des LB, la survie, la prolifération et spécialement dans les stades avancés, des LB. Cette cytokine est produite par les SGECs, les DCs, les macrophages, les lymphocytes T et B (Ittah et al., 2006). Les souris transgéniques pour l'expression de BAFF présenteraient un phénotype *SGS-like* (Mackay et al., 1999). Enfin, l'augmentation du taux de BAFF est corrélée avec les taux sériques de l'autoanticorps anti-SSA/Ro (Pers et al., 2005). La surproduction de BAFF au cours du SGS conduit donc à une hyperactivation des LB qui seront responsables du relargage des autoanticorps anti-ribonucléoprotéines (anti SSA /Ro et anti SSB/La). Les lymphocytes circulants pourraient infiltrer les glandes salivaires en suivant en plus de CXCL13, l'expression de BAFF par les SGECs (Ding et al., 2016; Ittah et al., 2006).

### C. Cellules épithéliales de la glande salivaire

Les cellules épithéliales ne sont pas des acteurs passifs et semblent jouer un rôle pivot entre l'immunité innée et adaptative et sont impliquées au cours de cette pathologie (Manoussakis and Kapsogeorgou, 2010). Et dans cette fonction plusieurs mécanismes sont en jeu (**Figure 25**) :

#### 1) Expression de molécules pro-inflammatoires

On constate aux zones d'infiltration des lymphocytes T une augmentation de l'expression du CMH de classe 2 par les SGECs, ce qui participerait à leur rôle de cellules présentatrices d'antigènes. Elles expriment par ailleurs les molécules de costimulation CD80, CD86 et CD40 qui vont renforcer l'interaction avec les acteurs immunitaires (Takeda et al., 2003), ce qui va notamment contribuer à stimuler la sécrétion de cytokines par les Th1 qui en retour vont entraîner l'augmentation de l'expression des antigènes HLA et des molécules de costimulation et d'adhésion à la surface des SGECs.

A cela s'ajoute une production de chémokines par les SGECs : CXCL13, CCL17, CCL19, CCL21 et CCL22. Ce qui va contribuer à l'infiltration des DCs, qui seront à l'origine d'une sécrétion d'IFN $\gamma$  qui va à son tour stimuler la production de CXCL10 et de CXCL9 par les cellules épithéliales. Ce



qui aura pour effet de participer au *homing* des LT dans les glandes salivaires et à la formation de centres germinatifs ectopiques.

Les SGECs sécrètent également des interleukines dont l'IL7, IL18 et IL 22. Ces interleukines sont cruciales pour l'immunité adaptative et l'activation des LT. Plus particulièrement IL18 et IL7 qui régulent la réponse Th1. L'IL22 est retrouvée très fortement sécrétée chez les patients atteints de SGS (Ciccia et al., 2012). L'un de ces récepteurs IL22-R1 est seulement exprimé par les cellules épithéliales (Sonnenberg et al., 2010). Enfin les SGECs produisent la cytokine BAFF (rôle sur les LB décrit précédemment).

## 2) Signalisation TLR dans le SGECs

Les TLRs (voir encart), et notamment le TLR 3 sont exprimés par les SGECs. Dans ce cadre sa stimulation va intervenir dans l'hypofonction des glandes exocrines, l'apoptose des cellules et la surexpression à la surface des corps apoptotiques des autoantigènes SSA/Ro et SSB/La. Bien que TLR3 soit généralement un récepteur intracellulaire, des expériences portant sur des SGECs et sur le modèle murin NZB/WF1 (souris femelle), ont permis de démontrer son expression à la membrane (Deshmukh et al., 2009; Spachidou et al., 2007). La suite de l'étude sur le modèle murin a permis de relier l'engagement du TLR3 avec la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN de type I dans la glande salivaire (Deshmukh et al., 2009). Enfin une étude sur le modèle murin NOD a permis de mettre en évidence dans un premier temps une expression élevée des transcrits pour TLR1, 2, 3, 4, et 9 dans les sialadénites. Puis, ces souris ont été traitées à la chloroquine (un inhibiteur des TLRs), ce qui a permis d'observer une diminution de la progression des sialadénites par rapport aux souris non traitées (Shimizu et al.).

### 3) Dérégulation de la voie inflammatoire NFκB (Nuclear Factor-kappa B) dans les SGECs

Les SGECs pourraient présenter une altération au niveau de la voie NFκB avec des défauts de fonctionnement de deux régulateurs négatifs : IκB et TNFAIP3 (TNF Alpha Induced Protein 3, A20). La voie NFκB est la principale voie de production des cytokines pro-inflammatoire (Figure 24).

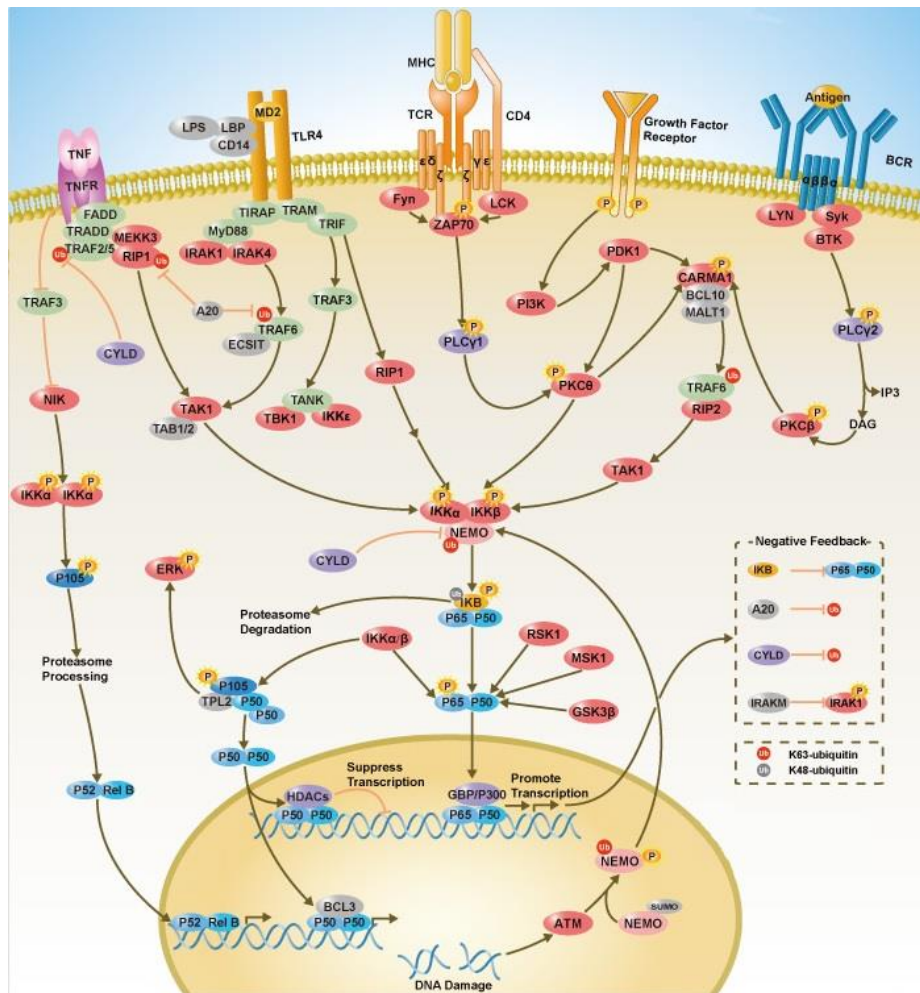


Figure 24: détails de la voie NFκB ([https://www.sinobiological.com/nf-kb-\(nfkb\)-pathway\\_reagents-for\\_growth-factor---receptor\\_signal.html](https://www.sinobiological.com/nf-kb-(nfkb)-pathway_reagents-for_growth-factor---receptor_signal.html))

Il a été montré sur un modèle murin présentant une mutation homozygote KI (*Knock In*) que le site κB enhancer présent dans le promoteur du gène IκBα était un régulateur essentiel de la transcription du facteur de transcription NFκB, de l'une infiltration lymphocytaire des glandes exocrines, d'un taux sérique des cytokines IL1a, IL17, TNFα plus important, et de la présence des autoanticorps anti-SSA/Ro et anti-SSB/La, mimant ainsi un phénotype SGS (Peng et al., 2010).

Chez les patients on retrouve un niveau d'expression faible de TNFAIP3 et un niveau élevé de NFκB dans les SGECs (Sisto et al., 2011). Par ailleurs les analyses de type GWAS ont permis de mettre en évidence des polymorphismes au niveau d'acteurs de cette voie (voir paragraphe sur les facteurs génétiques) (Lessard et al., 2013). L'ensemble de ces observations concordent pour une dérégulation de la voie NFκB et de son activation au cours du SGS.

#### 4) Apoptose des SGECs

L'apoptose exagérée des SGEC au cours du SGS implique, d'une part, un mécanisme autocrine Fas-FasL (Fas Ligand) dans les SGECs (Matsumura et al., 1998). En effet, les cellules Th1 infiltrantes sécrètent de l'IFNγ et TNFα qui vont favoriser l'induction de l'expression de Fas par les cellules épithéliales. D'autre part, l'infiltration des lymphocytes et notamment des LB va pouvoir induire l'apoptose via la voie PKCδ (Protein Kinase C delta) (Varin et al., 2012).

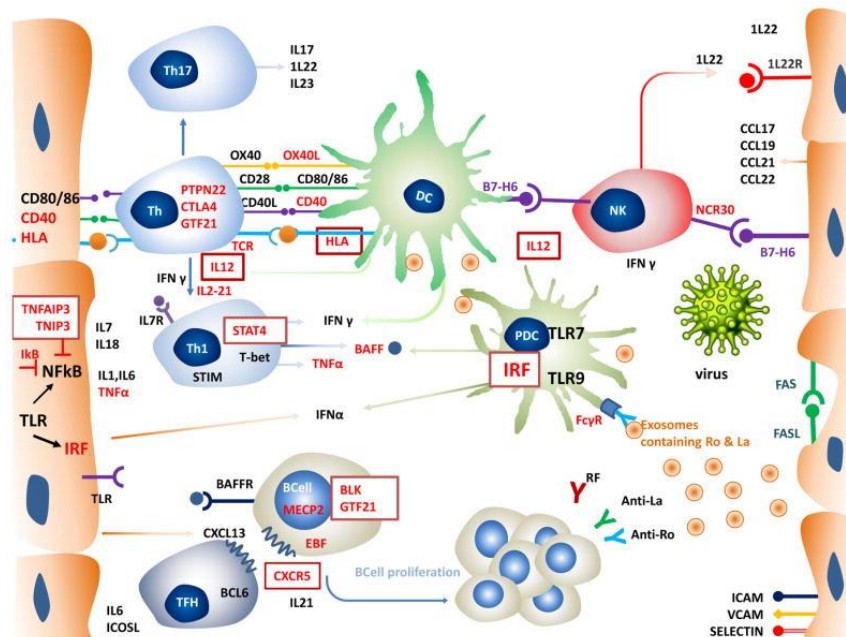


Figure 25: Synthèse du rôle des SGECs et des acteurs immunitaires dans la pathogenèse du SGS (issue de (Sandhya et al., 2017)).

Les SGECs expriment :

- le CMH de classe II et des molécules de costimulations (CD40 et CD80/86) qui vont permettre l'interaction avec les lymphocytes T, l'expression de B7-H6 permet la liaison avec les cellules NK par l'interaction avec NCR30.
- des chémokines (CCL17, CCL19, CCL21, CCL22) qui permettent le recrutement de lymphocytes T, de cellules dendritiques, et CXCL13, ce qui permet le *homing* des lymphocytes B.
- des cytokines comme TNFα, IL1, IL6, IL7, IL18, IL22, IFNα, BAFF
- IL33R
- des molécules d'adhésion : ICAM, VCAM et sélectine ; et TLR3
- FAS-FASL qui auront pour effet de causer la mort par apoptose des cellules.
- les SGECs relarguent après apoptose des exosomes contenant les autoantigènes Ro et La.

SGEC - Salivary gland epithelial cell, CMH-Complexe Majeur d'Histocompatibilité, NK-Natural killer, NCR-Natural-cytotoxicity-triggering receptor 3, IFN-Interféron, BAFF- B-cell activating factor, ICAM-Intercellular adhesion molecule, VCAM- vascular cell adhesion molecule 1, DC-Dendritic cell, pDC-plasmacytoïde dendritic cell.

## V. Un micro-environnement pro-inflammatoire au sein de la glande salivaire

Comme cela a pu être décrit précédemment, au sein de la glande salivaire du malade, on retrouve un environnement pro-inflammatoire qui participe à la pathogenèse du SGS. Celui-ci se caractérise par une signature IFN, une production de cytokines pro-inflammatoires et une probable dérégulation de la voie NFκB ainsi que de la voie TGFβ.

### A. Une signature interféron

Au cours du SGS on observe une altération de la production des IFNs. Ils vont jouer un rôle important dans la pathogenèse car ils régulent la transcription de nombreuses cytokines (Båve et al.; Gottenberg et al., 2006). Une augmentation du niveau d'IFN α (type I) dans la glande salivaire, le plasma (Mavragani et al., 2007) et dans le sang périphérique est constatée (Zheng et al., 2009). A cela s'ajoute une surexpression des gènes induit par IFN de type I dans ces mêmes tissus chez les patients.

De plus des analyses de types *microarray* sur des glandes salivaires mineures (Hjelmervik et al., 2005), des PBMCs (cellules mononuclées du sang périphérique)/sang total (Emamian et al., 2009), et des monocytes CD14+ périphériques

(Brkic et al., 2013) ont permis de mettre en évidence cette signature prédominante chez les patients. On la retrouve chez 60% des patients.

La sollicitation de l'IFN Type 1 dans la pathologie permettrait d'établir un lien entre l'immunité innée et immunité adaptative (Sandhya et al., 2017) décrit précédemment.

Chez ces patients on retrouve une corrélation positive entre ces gènes induits par la signalisation IFN de type 1 avec la présence des autoanticorps anti-SSA/Ro et anti-SSB/La (Brkic

#### Interférons

Les interférons sont des petites protéines d'environ 150 acides aminés, glycosylés ou non. On distingue surtout deux types d'après leurs propriétés biologiques et l'origine cellulaire :

- De Type I : interférons α, β, λ, ω.

Pratiquement, toutes les cellules de l'organisme synthétisent les interférons α et β, notamment les leucocytes (IFN-α), les fibroblastes (IFN-β) et les cellules épithéliales. Les gènes codant les interférons de type I sont tous situés sur le bras court du chromosome 9. Les IFN α, β, ω se fixent à un récepteur commun. Les IFN λ ont un récepteur particulier.

- inducteurs principaux : virus et microbes intracellulaires.
- fonction principale : antiviraux et antibactériens

- De Type II : interféron γ.

C'est l'interféron immun, car il est sécrété principalement par les cellules Natural Killer, les lymphocytes T helper-1 et les lymphocytes T-cytotoxiques. C'est un interféron glycosylé, dont le gène est situé sur le bras long du chromosome 12. L'IFN-γ a un récepteur particulier.

- inducteur principal : les antigènes.
- fonction principale : l'activation des cellules Natural Killer, des macrophages et des lymphocytes T- cytotoxiques.

- De Type III : très récent avec interféron-λ1, λ2 et λ3 (également nommé respectivement IL29, IL28A et IL28B)

*JC Lemahieu et A. Decoster, Antiviraux, FLM, p. 1*

et al., 2013; Emamian et al., 2009) et cela serait en association avec une maladie dite active (Borden et al., 2007; Emamian et al., 2009; Rönnblom and Alm, 2001).

Finalement la présence de pDCs fortement réduite en périphérie et préférentiellement recrutées dans les MSG est notée chez les patients (Gottenberg et al., 2006; Wildenberg et al., 2008).

Par ailleurs, ces mêmes patients présentent une forte prévalence de leucopénie, d'hyperglobulinémie, plus d'anticorps anti-nucléaires, et des anticorps anti-SSA/Ro, et un plus fort focus scores dans les tissus salivaires.

Ce qui pourrait permettre l'établissement de sous-groupes de patients, ceci en lien avec le polymorphisme génétique observé (Lessard et al., 2013). En effet Il y a plus de 15 loci concernés dont une grande partie est commune avec le lupus érythémateux systémique. Ainsi on retrouve des SNP (Single Nucleotid Polymorphism) dans plusieurs gènes comme : HLA (human leukocyte antigen), STAT4 (Signal transducer and activator of transcription 4), IRF5 (Interferon regulatory factor 5), IL12A (Interleukine 12) et TNPIP1.

En ce sens l'expression de Mx1 (MX Dynamin Like GTPase 1) dans les monocytes et dans le sang total des patients a été montrée comme un bon marqueur pour stratifier les patients sur la base de l'activité IFN type 1. Ceci afin de répondre aux interrogations suivantes :

- Est-ce que l'activité interféron peut être utilisée comme un prédicateur de la réponse aux traitements de patients ?
- Ou est-ce que cette voie IFN type I doit être ciblée par les traitements ? (Muskardin and Niewold, 2018)

En parallèle d'autres données semblent appuyer un rôle de IFN de Type II comme l'IFN  $\gamma$  dans la pathogenèse du SGS (Hall et al., 2012; Hertzog et al., 2011; Hjelmervik et al., 2005). Cela a été montré notamment chez l'homme et la souris (Cha et al., 2004; Gottenberg et al., 2006; Hall et al., 2012; Nguyen and Peck, 2013; Ogawa et al., 2002; Rönnblom and Eloranta, 2013). On sait que l'IFN  $\gamma$  est majoritairement produit par les LT, cellules NK et en moindre quantité par les DCs, macrophages et les LB (Pollard et al., 2013). Suite à la liaison de IFN  $\gamma$  à son récepteur et l'induction des gènes cibles, la ou les voies activées vont promouvoir une action défense de l'hôte, en favorisant des mécanismes d'apoptose, d'inflammation et les dommages tissulaires (Billiau and Matthys, 2009; Hu and Ivashkiv, 2009). Par ailleurs Hall et

collègues avaient montré une signature de Type II en lien avec un focus score plus important chez les patients (Hall et al., 2012), suggérant un marqueur pour le développement d'un lymphome (Carubbi et al., 2015).

En ce sens les cytokines Th1, dont IFN  $\gamma$  fait partie, avaient été précédemment associées à une forme plus sévère du SGS, forme sévère qui se caractérise par une infiltration lymphocytaire, la présence des macrophages et des DCs (Manoussakis et al., 2007; Mitsias et al., 2002). Par ailleurs ces mêmes cytokines ont été retrouvées chez des patients ayant développés un lymphome non hodgkinien suite à une infection par *helicobacter pilori* (Hauer et al., 1997; Riedel et al., 2001).

En 2015 Nezos et collègues, ont proposé un diagnostic chez les patients en s'appuyant sur le ratio d'ARNm IFN  $\gamma$ /IFN  $\alpha$  à partir de biopsies de glandes salivaires de patients comme nouveau biomarqueur de prédiction du développement d'un lymphome chez des patients SGS (Nezos et al., 2015).

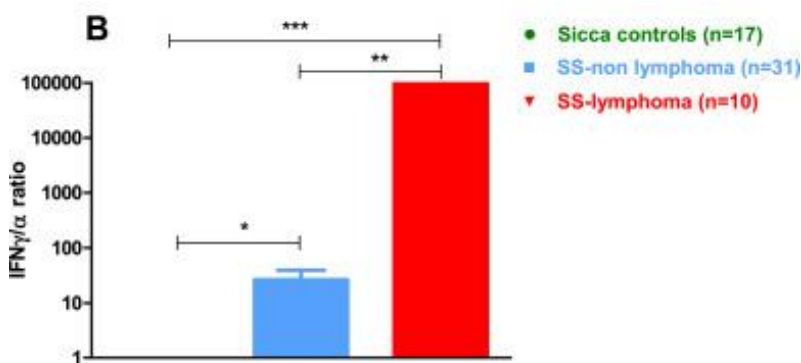


Figure 26: Illustration du ratio IFN  $\gamma$ /IFN  $\alpha$  proposé par Nezos et al 2015

Un ratio significativement plus élevé est observé chez les patients SGS avec un lymphome par rapport aux patients sans lymphome et présentant une sécheresse buccale sans être atteint d'un SGS (p-values :0.004 et 0.007, respectivement).

## B. Production de cytokines pro-inflammatoire

Décrite amplement dans les parties précédentes de ce chapitre, les chémokines sécrétées notamment par les cellules épithéliales vont participer au recrutement des acteurs immunitaires, puis la sécrétion de cytokines par ces mêmes cellules ainsi que les cellules immunitaires vont contribuer à la création d'un environnement inflammatoire (**Tableau 4**). Les cytokines ayant leur expression régulée par des cytokines, on observe une boucle d'amplification de leur production lors du processus pathologique.

Tableau 4. Liste des différentes cytokines et chémokines pro-inflammatoires.

Molécules	Cellule(s) sécrétrice(s)	Rôle
Interféron $\alpha$	pDCs	Rôle antiviral et anti bactérien
Interféron $\gamma$	NK et LT	Participe à la différenciation des LT CD4+ en Th1
CXCL13	Macrophage, cellules stromales et certains LT (Tfh) SGECs	Chimiotactisme des DCs, LB
CXCL10	SGECs	Chimiotactisme des LT
CCL17	SGECs	Chimiotactisme des DCs, LT
CCL19	SGECs	Chimiotactisme des DCs, LT et des LB
CCL21	SGECs	Chimiotactisme des DCs, LT et participerait à leur homing
CCL22	SGECs	Chimiotactisme des DCs, LT
BAFF	Monocytes, SGECs, DCs, LTs et LBs	Changement de classe des LB, la survie, la prolifération, la maturation et le développement des LB
TNF $\alpha$	Th1	Apoptose des SGECs
IL1a	Macrophages et SGECs	Inflammation
IL6	Monocytes, SGECs	Pro-inflammatoire, participe à la différenciation des LT en Tfh
IL7	SGECs	Activation des LTs
IL12	Macrophages et DC	Différenciation des LTs en Th1
IL17	Th17	
IL18	SGECs et macrophages	Stimulation dans un second temps de la production d'IFN $\gamma$ par les LTs et les NKs, Activation des LTs, régule la réponse Th1
IL21	Tfh	Rôle dans l'activation, la maturation des LB et la formation de centre germinatif
IL22	SGECs, NKs	A l'origine de la production d'IL23 et d'IL17, activation des LTs
IL23	Th17	Module la différenciation des LT en Th17, favorisant la libération de plusieurs cytokines comme l'IL17 et l'IL6

## C. Stress oxydatif

Un élément commun à toutes les maladies autoimmunes (MAI) est l'augmentation de la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène) et de RNS (espèces réactives de l'azote) en association avec la réponse inflammatoire. En temps normal la génération de ROS est un outil

de défense physiologique contre les infections microbiennes, mais dans le cas d'une production non appropriée des ROS comme c'est le cas dans les MAI, cela va conduire à une dégradation des tissus. Ces dommages sont le résultat de la réactivité des ROS avec des molécules environnantes telles que l'ADN, les lipides, les carbohydrates et les protéines. Les ROS, RNS et RCS (Espèce Carbonyl Réactive) que l'on retrouve dans les articulations sont l'ion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle, l'acide hypochloreux, le monoxyde d'azote, le peroxynitrite, les peroxides lipidiques et le sulfure d'hydrogène qui sont impliqués dans l'inflammation chronique et aiguë (Smallwood et al., 2018; Winrow et al., 1993; Winyard et al., 2005).

L'hydroxychloroquine, une drogue utilisée notamment dans le traitement du SGS est capable d'inhiber l'action de NOX2 (Müller-Calleja et al., 2017). Il s'agit d'un variant de la NADPH oxydase (Nicotinamide Adénosine Dinucléotide Phosphate oxydase). Cette enzyme catalyse la réaction d'oxydation du NADPH par le dioxygène, ce qui produit du NADP<sup>+</sup>, du H<sup>+</sup> et de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> (l'ion superoxyde). Ces deux derniers réagiront pour former le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> réagira avec un H<sup>+</sup> (proton) et un Cl<sup>-</sup> (chlorure) pour donner du HOCl (acide hypochloreux) et une molécule d'eau. Ce complexe enzymatique permet donc la synthèse de ROS mais conduit également à une activité des protéases augmentée. Les souris déficientes pour cette protéine présentent un phénotype proche du lupus (Campbell et al., 2012). De plus, la NADPH oxydase est indispensable au phénomène de NETose (Fuchs et al., 2007) (voir **Figure 27** pour le fonctionnement issu de (Berthelot et al., 2017)).

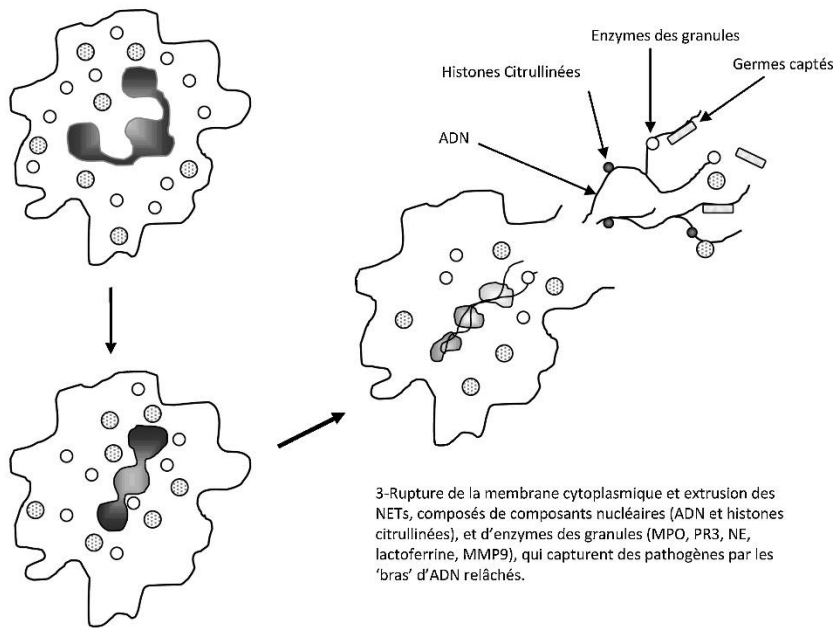
### ROS et RNS

Les ROS et les RNS décrivent plusieurs espèces, pouvant être radicalaires, chargées ou non. On peut citer par exemple les radicaux hydroxyle (OH•), l'anion-radical superoxyde (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>), le monoxyde d'azote (NO•), le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>•), les peroxydes (ROO•) et les lipides peroxydés (LOO•). En outre, le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), l'ozone (O<sub>3</sub>), l'oxygène singulet (O<sub>2</sub>), l'acide hypochloreux (HOCl), l'acide nitreux (HNO<sub>2</sub>), le peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), le trioxyde d'azote (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), et le peroxyde lipidique (LOOH), sont des dérivés non radicalaires. Toutes ces espèces peuvent conduire à des réactions radicalaires ou globalement oxydantes dans les organismes vivants. Dans la famille des radicaux mentionnés plus haut, on distinguera les radicaux primaires qui ont un rôle physiologique particulier et les radicaux secondaires, produits par réactions (non contrôlées, généralement) des radicaux primaires avec plusieurs matériaux biologiques présents dans une cellule soumise à un stress oxydant (lipides, protéines, glucides...).

Issu de la thèse de Cong Lu, *Analyse microélectrochimique du stress oxydant à l'échelle de la cellule unique : application aux cellules cancéreuses du sein*, 2012



1 : Flux de Calcium, activation de ligands membranaires (comme les PAMPs de divers pathogènes)  
 → production de radicaux oxygénés (ROS) → activation d'enzymes cytoplasmiques, dont PAD4



2-Hypercitrullination des histones aboutissant au débobinage de la chromatine

La membrane nucléaire devient poreuse, ce qui permet aux protéines de gagner le noyau et de se mélanger avec la chromatine déroulée

3-Rupture de la membrane cytoplasmique et extrusion des NETs, composés de composants nucléaires (ADN et histones citrullinées), et d'enzymes des granules (MPO, PR3, NE, lactoferrine, MMP9), qui capturent des pathogènes par les 'bras' d'ADN relâchés.

Figure 27:principe de la nétose

Par ailleurs un SNP pour le gène NCF1 (Neutrophil Cytosolic Factor 1 ; composant du complexe de la NADPH oxydase ; associé avec une déficience de Ncf1 (Neutrophil Cytosolic Factor 1)) a été montré comme augmentant la sévérité des arthrites et prédispose les humains et les rongeurs à des maladies autoimmunes (Smallwood et al., 2018).

Par ailleurs, la MPO (Myeloperoxydase) joue un rôle central dans l'élimination des pathogènes intracellulaires, elle catalyse la formation de l'acide hypochloreux (HOCl). Cependant, lorsqu'elle est relarguée à l'extérieur de la cellule après l'activation des neutrophiles, elle cause des dommages au niveau des sites inflammatoires, ce qui a été retrouvé notamment chez les patients atteints de SGS (Cay et al., 2012). A contrario, la MPO inhibe la génération de la réponse immunitaire adaptative en atténuant l'inflammation conduite par les LT et en limitant l'inflammation pathologique des tissus (Odobasic et al., 2013). Ainsi son rôle dans les MAI et dans le SGS reste ambigu.

Parmi les ROS, le NO (monoxyde d'Azote) n'est pas important uniquement lors des phénomènes tels que l'apoptose, l'inflammation, la biogenèse des mitochondries et la

régulation du tonus des vaisseaux sanguins, mais il est également impliqué dans des maladies inflammatoires telles que le SGS (Cejková et al., 2007).

Cependant, il existe très peu d'éléments quant à l'implication des ROS dans le processus pathologique du SGS. Une étude montre une diminution de la concentration de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (anion nitrite) et de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrate) dans la salive, mais en même temps montre une augmentation de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dans les urines (Xia et al., 2003). Cependant une autre étude montre une augmentation de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> dans glande salivaire labiale (Konttinen et al., 1997). L'hypofonction de la glande salivaire a probablement un impact sur le métabolisme des nitrates mais le processus reste jusqu'à présent peu clair.

Enfin NFκB, un facteur de transcription qui régule la transcription de nombreux gènes impliqués dans les réponses inflammatoires et immunitaires, est activé par des cytokines pro-inflammatoires comme IL1 et TNF alpha (Barnes and Karin, 1997). Cette activation de NFκB a été montrée également suite à une augmentation de l'expression de iNOS (oxyde nitrique synthase) (Xie et al., 1994). NFκB est élevé dans de nombreuses maladies inflammatoires chroniques, cela est inhibé par les glucocorticoïdes (Auphan et al., 1995) De nombreuses évidences suggèrent que les ROS servent de messenger secondaire (Schulze-Osthoff et al., 1995). Par ailleurs la N acétyl L cystéine, un antioxydant, empêcherait l'activation de la voie NFκB par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Schreck et al., 1991).

#### D. Dérégulation de la voie NFκB

On retrouve un polymorphisme génétique sur des acteurs de la voie NFκB (voir paragraphe sur les facteurs génétiques), ce qui laisse supposer sa possible implication à la création d'un environnement inflammatoire du fait de son rôle dans la régulation de l'expression de cytokines telles qu'IL6, IL8, TNFα, IL1β et IL8. De plus cette voie est sollicitée dans la synthèse de nombreuses cytokines pro-inflammatoires qui vont contribuer à l'inflammation par la présence des lymphocytes Th17 dans le microenvironnement de la glande notamment.

## E. Implication de la voie TGFβ

L'étude de Williams et collègues en 2016 a permis de mettre en évidence une signature de miRNA dans les monocytes CD14+ de patients SGS, dont l'expression est augmentée et qui serait capable de cibler de façon spécifique la voie de signalisation TGFβ (Williams et al., 2016) (Figure 28).

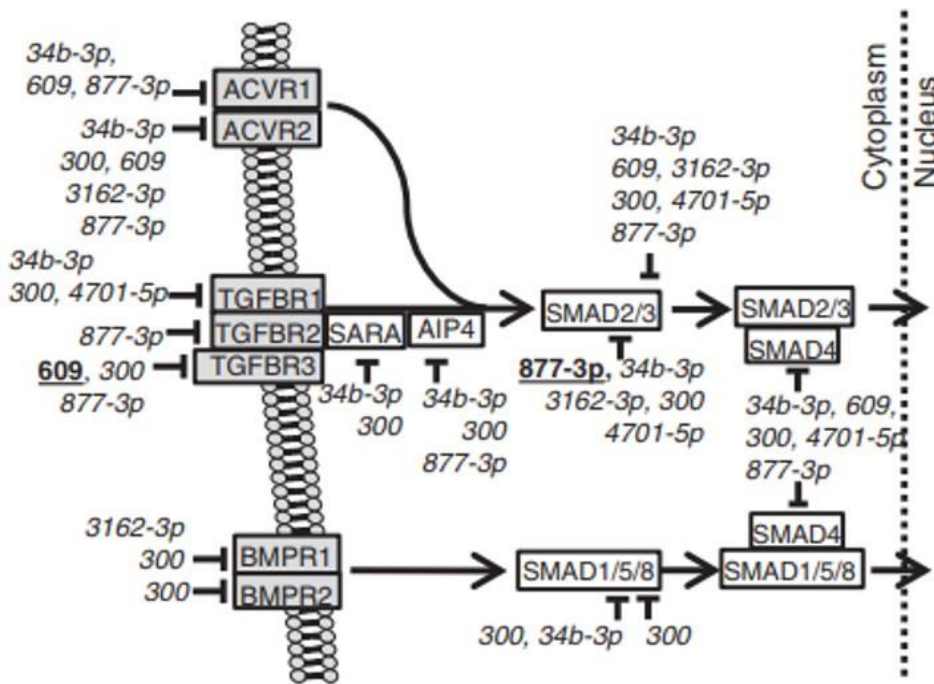


Figure 28: miRNAs prédit lors de l'étude de Williams et al 2016, qui ciblent la voie TGFβ

Il a été montré que TGFβ joue un rôle immunosuppresseur (Wahl et al., 1988) et anti-inflammatoire. Cette cytokine contribue notamment à la résolution de l'inflammation et au retour à l'homéostasie (Khalil, 1999; Massagué, 2012). Cette action est possible par une favorisation de la survie des Treg suite à une stimulation par TGFβ (Letterio and Roberts, 1998). Or les lymphocytes Treg sont impliqués dans la tolérance immunitaire et leur diminution est associée au développement d'une maladie auto-immune.

Ainsi la voie TGFβ contrebalance l'action de la voie NFκB, sa dérégulation ayant pour effet de favoriser l'état inflammatoire observé dans le SGS.

## VI. Transformation d'un SGS en lymphome du MALT

On observe chez les patients atteints d'un SGS un risque accru (une augmentation de 40 fois par rapport à la population générale) de développer un lymphome. Le ratio d'incidence est de 9-44 dans les études avant 2000 et est de 5 à 15 dans les études post 2000 par rapport à la population générale.

Parmi ces lymphomes, le lymphome B des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT) est celui qui est le plus représenté chez ces patients. Il se développe notamment dans les structures tissulaires telles que les glandes salivaires (Royer et al., 1997)

Un des facteurs prédictifs de l'apparition/développement d'un lymphome B est la présence d'une structure germinale « *center like* » à l'intérieur des muqueuses des glandes exocrines. Le niveau de CXCL13 dans le sérum des patients est également plus élevé chez les patients avec un lymphome, il en est de même pour BAFF. De même que pour FLT3 (FMS like tyrosine kinase 3), cytokine liée à la différenciation et à la prolifération des progéniteurs des LB précoces, est plus élevée dans le sérum de patients avec un lymphome.

A cela s'ajoute la présence de polymorphismes qui rendraient le patient atteint d'un SGS plus susceptible de développer un lymphome tel que les mutations sur le gène TNFAIP3. On retrouve également un polymorphisme de BAFF et TNFRSF13C (récepteur de BAFF).



Disponible en ligne sur

ScienceDirect  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte  
www.em-consulte.com



Mise au point

## Épigénome et syndrome de Gougerot-Sjögren



### *Influence of epigenetic in Sjögren's syndrome*

A. Bordron<sup>a</sup>, A. Charras<sup>a</sup>, C. Le Dantec<sup>a</sup>, Y. Renaudineau<sup>a,b,\*</sup><sup>a</sup> Inserm U1227, lymphocytes B et auto-immunité, institut Brest santé agro-matière, labex IGO, REPICGO network, université de Brest, 29609 Brest, France<sup>b</sup> Laboratoire d'immunologie et immunothérapie, CHRU Morvan, 29609 Brest cedex, France

#### INFO ARTICLE

Historique de l'article :

Disponible sur Internet le 18 octobre 2017

Mots clés :

Syndrome de Gougerot-Sjögren  
Maladie auto-immune  
Syndrome sec  
Épigénétique  
Lymphocytes B

#### RÉSUMÉ

Le syndrome de Gougerot-Sjögren (SGS) est une épithélite auto-immune à prédominance féminine caractérisée par un syndrome sec, une altération de la qualité de vie des patients, et des atteintes viscérales, voire un lymphome, pour les formes les plus agressives. Lors de ce processus, la cellule épithéliale devient capable de synthétiser des cytokines, des chémokines, et des auto-antigènes qui seront présentés au système immunitaire. En conséquence, cette épithélite s'accompagne d'infiltrations lymphocytaires qui peuvent entraîner la formation de pseudo-follicules dans lesquels sont présents des lymphocytes B auto-réactifs. L'intégration des données récentes portant sur l'étude du génome et surtout de l'épigénome, qui permet d'analyser les différents partenaires cellulaires, ouvre de nouvelles perspectives pour mieux comprendre la physiopathologie complexe de cette maladie encore incurable.

© 2017 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Publié par Elsevier Masson SAS.

Tous droits réservés.

#### ABSTRACT

Sjögren's syndrome (SS) is a systemic autoimmune epithelitis with a major female incidence, and characterized by a dry syndrome, impaired quality of life, visceral involvement, and lymphoma for the most aggressive cases. During this process, epithelial cells acquire the capacity to produce cytokines, chemokines, and autoantigens which can in turn be presented to the immune system. Consequently, this epithelitis is accompanied by lymphocytic infiltrations leading to the formation of pseudo-follicles in which self-reactive B lymphocytes are present. The recent integration of genomic and especially of epigenomic data, which make it possible to analyze the different cellular partners, opens new perspectives and allows to a better understanding of this complex and still incurable disease.

© 2017 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Published by Elsevier Masson SAS.

All rights reserved.

Keywords:

Sjögren's syndrome  
Autoimmune disease  
Dry syndrome  
Epigenetic  
B lymphocytes

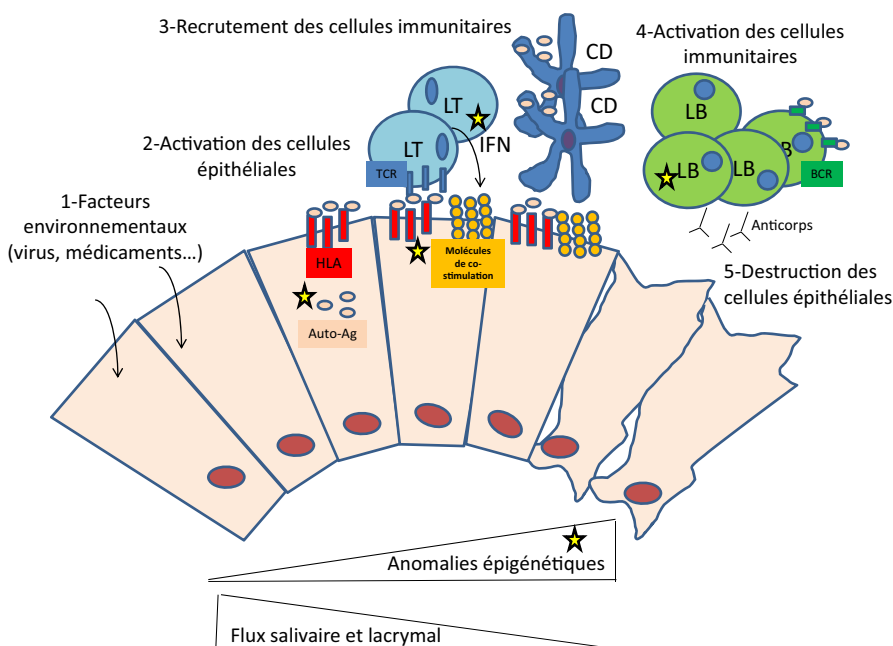
### 1. Introduction

Le syndrome de Gougerot-Sjögren (SGS) est une maladie systémique auto-immune qui se caractérise par une infiltration lymphocytaire des glandes exocrines avec un tropisme au niveau des glandes salivaires, lacrymales, vaginales pour les femmes, et des voies respiratoires supérieures [1]. Le tableau clinique qui en découle, comporte le plus souvent une xérostomie et une xérophtalmie, qui définissent le syndrome sec, en association avec

une fatigue intense et des douleurs étendues qui entraînent une altération profonde de la qualité de vie des patients [2]. Pour un tiers des patients, se surajoutent des manifestations systémiques, c'est-à-dire extra-glandulaires, pouvant toucher le rein, le foie et les poumons. La gravité de la maladie est généralement liée, d'une part, aux anomalies viscérales, et, d'autre part, au développement d'un lymphome B pour 5 % des patients [3]. Le SGS touche préférentiellement les femmes (9:1) dont l'âge moyen se situe autour de 50 ans [4]. Dans la forme primaire, la prévalence du SGS est comprise entre 0,01 % et 0,72 % [5,6]. Les formes secondaires (50 %), généralement d'intensité moindre, coexistent avec un lupus érythémateux systémique (LES), une polyarthrite rhumatoïde (PR), une thyroïdite, voir une cirrhose biliaire primitive (CBP).

\* Auteur correspondant. Laboratory of Immunology and Immunotherapy, Brest University Medical School Hospital, BP824, 29609 Brest, France.

Adresse e-mail : yves.renaudineau@univ-brest.fr (Y. Renaudineau).



**Fig. 1.** Modèle pathophysiologique du syndrome de Gougerot-Sjögren. CD : cellule dendritique ; DNMT1 : DNA méthyltransférase 1 ; HLA : *human leucocyte antigen* ; IFN : interféron ; LB : lymphocyte B ; LT : lymphocyte T.

Outre le fait que le SGS se caractérise par une épithélite auto-immune, sa physiopathologie soulève de nombreuses interrogations [7]. En effet, en se basant sur des données acquises à partir des glandes exocrines, et en particulier des glandes salivaires, plusieurs phases ont été mises en évidence (Fig. 1). Tout d'abord, une activation de l'épithélium est observée entraînant une infiltration lymphocytaire majoritairement constituée de lymphocytes T (LT) et plus particulièrement de LT activés CD4 et CD8 [8–10]. Ensuite, et de façon concomitante avec la progression de la maladie, de nouvelles populations cellulaires apparaissent telles que les cellules dendritiques (productrices d'interféron [IFN]), et les lymphocytes B (LB). Ces derniers peuvent devenir prédominants et s'organiser en centres germinatifs ectopiques avec l'aide des LT folliculaires et en présence de la cytokine *B cell activating factor* (BAFF) [11]. L'hyperactivation lymphocytaire B entraîne l'émergence de plasmablastes ce qui s'accompagne d'une production locale d'auto-anticorps (auto-Ac) dont les auto-Ac anti-syndrôme sec de type A (SSA/Ro) et de type B (SSB/La). Au niveau périphérique, la mise en évidence d'auto-Ac anti-SSA/SSB associés avec la détection de facteurs rhumatoïdes, d'une hypergammaglobulinémie, et d'une hypocomplémentémie traduit un profil immunologique actif [12]. Cette hyperactivation s'accompagne, au niveau périphérique, d'anomalies des sous-populations lymphocytaires B, reflet de l'attraction des LB mémoires dans les tissus [13–15]. Au niveau des glandes salivaires et du fait de cette hyperactivation, une augmentation de la taille des glandes et d'importantes modifications ultra-sonographiques sont observées [16]. Dans ce processus, les cellules épithéliales ne sont pas seulement les cibles mais également les acteurs puisqu'elles sont capables de conserver leurs propriétés activatrices vis-à-vis du système immunitaire inné et acquis après plusieurs semaines de cultures [17].

## 2. Les facteurs environnementaux, génétiques et épigénétiques

### 2.1. Facteurs environnementaux

Du fait de la présence d'une grande fatigue et d'arthralgies au diagnostic, une cause virale a été incriminée et avec comme

accusés les membres de la famille Herpès tels que le virus d'Epstein Barr (EBV) et le virus de l'herpès humain 6 (HHV6) [18]. Plusieurs arguments indirects plaident en ce sens tels que la mise en évidence d'une plus forte prévalence d'immunoglobulines de type G spécifiques de l'EBV et d'HHV6 [19]. Une réactivité croisée est également décrite pour ces deux virus avec la protéine SSB/La du fait d'épitopes communs [20]. Toutefois, aucune preuve directe n'a été rapportée sur le rôle direct de ces virus qui sont largement répandus dans la population générale, et plusieurs études ne retrouvent pas cette association. En conséquence, d'autres virus ont été suspectés, mais sans preuve directe également pour le virus *human T-cell lymphotropic virus 1* (HTLV1) et le virus de l'hépatite C (HCV) [21,22]. Parmi les autres facteurs associés au SGS, le tabac, les ultraviolets et des agents chimiques sont incriminés [23].

La composante géographique du SGS vient renforcer l'implication de facteurs environnementaux avec une plus forte prévalence rapportée dans les pays nordiques [24]. De plus, d'importantes variations cliniques sont également retrouvées selon la localisation géographique [25]. Un autre argument complète cette hypothèse environnementale et repose sur l'étude des jumeaux homozygotes pour lesquels le taux de concordance vis-à-vis du SGS, qui définit la part génétique d'une maladie, est de seulement 15 à 25 %, ce qui suggère donc une contribution de l'environnement à hauteur de 75 à 85 % [26].

### 2.2. Facteurs génétiques

Avec le développement des projets *genome-wide association study* (GWAS), c'est plus de 40 facteurs de risques qui ont été associés avec le SGS avec pour la grande majorité d'entre eux un faible effet sur le risque de la maladie [27]. En premier lieu, ce sont des facteurs impliqués dans la présentation antigénique soit directement au niveau des régions du système *human leucocyte antigen* (HLA) de classe I et II, soit en amont avec des facteurs engagés dans la régulation et l'expression des molécules HLA. Il est à noter que la présence des auto-Ac anti-SSA/SSB est associée avec un phénotype particulier, HLA-DR2 et DR3 [28]. Pour les autres facteurs de risque associés au SGS, on retrouve des facteurs impliqués dans l'immunité innée et acquise tels que des gènes codant pour des molécules de la voie

interféron (IFN) de type I et II (IRF5, IL12A et STAT4), la voie NF- $\kappa$ B (TNIP1 et TNFAIP3), le recrutement lymphocytaire T (CXCR5), ainsi que l'activation et la différenciation lymphocytaire B (BLK) [29–31]. Le mode d'action des facteurs de risque est complexe car peu d'entre eux jouent un rôle sur l'expression ou la fonction de la protéine associée. Cependant, une étude récente a révélé qu'ils n'étaient pas localisés au hasard mais qu'ils étaient présents dans des zones de régulations particulières (épigénétiques) et que ces zones étaient spécifiques pour un type cellulaire donné [30]. En conséquence, mieux comprendre ces nouvelles zones de régulation peut permettre de mieux comprendre la pathophysiologie de la maladie.

### 2.3. Facteurs épigénétiques

Les mécanismes épigénétiques jouent un rôle essentiel en agissant au niveau des étapes clés de la différenciation et de l'activation du système immunitaire. Ces mécanismes se définissent par leurs capacités à modifier l'expression des gènes sans faire appel à des mutations de l'ADN et cela de manière réversible et transmissible au fil des divisions cellulaires et des générations. Il existe donc plusieurs mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN (qui régulent la fixation des facteurs de transcription), les modifications post-traductionnelles des histones (qui favorisent la compaction de l'ADN), et les ARNs non codants dont les micro-ARN (qui interagissent avec les transcrits). Ces modifications sont spécifiques pour un type cellulaire donné. D'importantes modifications de ces processus ont été observées en pathologie et en particulier lors des cancers et des pathologies auto-immunes [26]. Pour preuve, l'utilisation de médicaments capables d'interférer avec les processus de méthylation de l'ADN, tels que l'hydralazine et la procainamide, peuvent générer l'induction d'un SGS associé avec un LES et cela, chez l'homme mais également chez la souris.

## 3. Analyse globale de la méthylation de l'ADN

Déméthylation de l'ADN dans le SGS: comme tout processus épigénétique, la méthylation de l'ADN est une marque transmissible lors des générations cellulaires successives. Elle se fait par le transfert d'un groupement méthyle au niveau du 5<sup>e</sup> carbone de la cytosine des dinucléotides CpG de l'ADN sous l'action des DNA méthyltransférases (DNMTs) [32,33]. À l'inverse, le processus de déméthylation de l'ADN est soit passif lors des divisions cellulaires, soit actif et initié par les enzymes d'oxydation *ten eleven translocation* (TET). Globalement, la méthylation de l'ADN agit sur la transcription des gènes soit de façon directe en empêchant les facteurs de transcription de se fixer, soit de façon indirecte en permettant le recrutement des enzymes en charge de la compaction de la chromatine telles que les histones déacétylases (HDAC) et les histones méthyltransférases (HMT). Chez les mammifères, la chromatine est normalement méthylée et compactée et ce sont les zones régulatrices et transcriptionnellement actives de l'ADN qui sont ouvertes et déméthylées. La détermination du taux de méthylation global de l'ADN peut se réaliser par chromatographie liquide haute performance (HPLC) et par technique histologique ou *enzyme-linked immunosorbent assay* (Elisa) en utilisant des anticorps monoclonaux anti-5mCyt (anti-5 méthylcytosine), l'Ac le plus utilisé étant le clone murin 33D3. Le taux global de méthylation retrouvé chez les mammifères varie selon le type cellulaire de 70 à 80 %, avec des taux plus faibles rapportés pour les cellules du système immunitaire.

Effectuée à partir des coupes histologiques issues de glandes salivaires mineures (GSM), à partir de cultures de cellules épithéliales issues des GSM, ainsi qu'à partir des populations lymphocytaires B et T périphériques [34], l'étude de la méthylation globale de l'ADN a permis de mettre en évidence au cours

du SGS : (1) une réduction importante de la méthylation globale de l'ADN dans les GSM au niveau des cellules épithéliales ; (2) que ce défaut est conservé en culture et qu'il est associé avec une répression de l'expression de l'enzyme de méthylation DNMT1 ; (3) à l'inverse, aucune différence de méthylation globale de l'ADN n'a pu être observée entre les LB et LT du sang périphérique des patients et des témoins ce qui souligne le fait que les modifications épigénétiques touchent préférentiellement la cellule épithéliale.

## 4. Implication des lymphocytes dans la déméthylation de l'ADN des cellules épithéliales de glandes mineures salivaires

La présence d'une importante infiltration lymphocytaire apparaît associée avec le défaut de méthylation de l'ADN dans les GSM puisque le niveau global de méthylation de l'ADN y est inversement proportionnel au score de Tarpley qui reflète cette infiltration [35]. Dans ce processus, le rôle des LB est fortement suspecté puisqu'il est possible de reproduire l'anomalie de méthylation de l'ADN dans la lignée cellulaire *human salivary gland* (HSG) lorsque cette dernière est co-cultivée en présence de LB. De plus, le contrôle épigénétique exercé par les LB sur les cellules épithéliales est réversible comme observé chez les patients traités par immunothérapie anti-lymphocytaire B de l'étude TEARS [34,36]. Cette observation permet d'envisager d'importantes perspectives thérapeutiques.

## 5. Analyse complète du méthylome

### 5.1. Technologie Infinium

Différentes stratégies technologiques ont été testées afin de déterminer le profil de méthylation de l'ADN génomique et dans le cas du SGS, c'est la technologie par « beadchip » qui utilise des microbilles développées par la société Illumina<sup>®</sup> qui est la plus utilisée. Cette technique présente comme avantage d'être reproductible et de nécessiter peu de matériel biologique. En pratique, l'ADN génomique est traité par le bisulfite de sodium qui convertit les bases cytosines non méthylées en uracile, puis l'ADN est hybridé avec les microbilles qui comprennent pour chaque région à analyser deux sondes de 50 paires de bases, l'une reconnaissant les loci CpG non méthylés et l'autre les loci CpG méthylés. Ensuite, l'utilisation de sondes fluorescentes permet de calculer des ratios entre les signaux générés par la fixation des deux sondes et donc de quantifier le taux de méthylation de l'ADN. Cette technique appelée HM450k (*human methylation 450K*) couvre 2 % des 28 millions de sites CpG du génome humain, 96 % des îlots CpG et 99 % des gènes avec en moyenne une couverture de 17 CpG par gène.

### 5.2. Analyse de la méthylation des motifs CpG de l'ADN des cellules du sang périphérique

Trois équipes ont utilisé la technologie HM450K pour étudier la méthylation de l'ADN sur l'ensemble du génome à partir des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC qui comprennent un mélange de lymphocytes T, B et monocytes), des LT (totaux et naïfs) ainsi que des LB de patients souffrant de SGS [37–39]. En ne tenant pas compte des différentes méthodes d'analyses entre ces 3 équipes, nous pouvons souligner différents points. Premièrement, des régions hyperméthylées de l'ADN sont retrouvées sur les gènes de présentation antigénique HLA de type I et II mais également sur certains gènes régulés par l'IFN de type I (IFI44L, IFITM1, STAT1). Deuxièmement, des voies de signalisation spécifiques sont retrouvées dans les LT (protéines de transduction du signal et facteurs de transcription) et pour les LB (récepteur des

cellules B et gènes de développement). Troisièmement, l'effet prédomine chez les patients qui possèdent des auto-Ac anti-SSA/SSB et dans les LB puisque les modifications de méthylation y sont 50 fois plus importantes que pour les LT [38].

### 5.3. Analyse de la méthylation des motifs CpG de l'ADN des glandes salivaires mineures

Deux équipes ont analysé la méthylation de l'ADN à l'aide des puces HM450K dans les GSM de patients atteints de SGS. Cependant, la limite de cette approche est liée à l'hétérogénéité des prélèvements puisque les GSM sont constituées à la fois de cellules épithéliales acinaires et ductales qui sont retrouvées chez les patients et les contrôles, mais également de plusieurs types de cellules immunitaires pour les patients. Malgré cette limitation, on retrouve comme pour les études GWAS l'importance de la voie IFN avec en particulier la mise en évidence d'un gène inductible par l'IFN, *oas2*, qui est déméthylé. Les autres régions différenciellement méthylées concernent des micro-ARNs ainsi qu'une grande variété de gènes impliqués dans l'activation cellulaire, la présentation antigénique, et la production d'auto-antigènes (auto-Ag) [40]. Il est à souligner que les altérations de la méthylation de l'ADN observées semblent être associées avec la gravité de la maladie [40,41].

Comme indiqué précédemment, l'étude des motifs CpG sur GSM est réalisée sur un mélange cellulaire, et ne reflète donc pas complètement l'impact des modifications de l'ADN sur les cellules épithéliales des GSM. Cette limitation peut être levée en utilisant comme source biologique des cellules épithéliales issues de GSM après 3 semaines de culture [42]. À partir de ces cellules épithéliales qui sont pures, d'importantes différences sont observées si l'on compare à l'aide des puces HM450K des patients SGS et des témoins. Ces différences concernent un grand nombre de gènes régulés par l'IFN (61 % des gènes), ainsi que la voie calcique (impliquée dans le contrôle du flux salivaire) et la voie Wnt (impliquée dans la survie et la différenciation des cellules épithéliales).

## 6. Reprogrammation épigénétique et conséquences

En parallèle des études basées sur l'utilisation des puces HM450K, d'autres approches technologiques ont été utilisées afin de tester l'impact d'un défaut du processus de méthylation de l'ADN sur différentes anomalies retrouvées au cours du SGS.

### 6.1. Rétrotransposons

Plus de 50 % de notre génome est composé de rétrotransposons qui correspondent à des séquences d'ADN capables de se multiplier au cours des générations pour donner naissance à des séquences répétées qui sont capables de s'intégrer de façon aléatoire sur l'ensemble du génome. Les rétrotransposons comprennent différentes familles dont les séquences Alu (13 %), LINE-1 (21 %) ainsi que les rétrovirus endogènes humains (8 %). Afin de se prémunir de l'action de ces éléments, ces derniers sont régulés par la méthylation de l'ADN comme démontré pour *human T-cell leukemia related endogenous retrovirus* (HRES-1), qui est inséré au niveau du bras long du chromosome 1 en position 1q42 [43]. Sous l'action de drogues ou dans certaines conditions pathologiques, ce contrôle peut être déficient permettant à l'auto-Ag Gag p38 d'être exprimé et d'activer le système immunitaire pour produire des auto-Ac anti-Gag p38 [44]. Ce phénomène est observé chez 10 % des patients atteints de SGS versus 1,5 % chez les témoins sains. Dans les GSM, en plus de l'expression de HRES-1, d'autres rétrovirus sont anormalement surexprimés tels qu'HERV-K113, HERV-5 et plusieurs membres du groupe HERV-E [45]. De même, un défaut de méthylation de l'ADN permet d'expliquer l'augmentation des séquences LINE-1 ce qui est également observé dans les GSM au cours du

SGS [46]. Pour les séquences Alu, ces dernières sont inductibles par l'IFN de type I (augmenté dans le SGS), ce qui entraîne la production des cytokines pro-inflammatoires en réponse à la formation d'un complexe avec l'auto-Ag SSA/Ro60 (TROVE2) voire d'un complexe immunitaire en cas de présence d'auto-Ac anti-SSA/Ro60 comme retrouvé dans le LES et SGS [47].

### 6.2. Auto-antigènes

En plus de l'auto-Ag Gag p38, deux autres auto-Ag (SSB/LA et ICA1) sont décrits comme étant sensibles à l'action de la méthylation de l'ADN dans le SGS [35,42]. Une déméthylation est observée chez les patients atteints de SGS pour le promoteur de SSB/LA, défaut qui s'accompagne d'une surexpression de l'auto-Ag. En conséquence, il n'est pas étonnant d'observer que ce défaut de contrôle prédomine chez les patients qui expriment des auto-Ac anti-SSB/La. En traitant les cellules de la lignée HSG avec le 5-Aza, il est possible de confirmer l'impact de la déméthylation de l'ADN sur l'expression de ces deux auto-Ag.

### 6.3. Autres gènes

Le traitement par 5-Aza provoque l'augmentation de l'expression de la cytokératine 19 dans la lignée HSG [48] mais également du gène de l'aquaporine 5 (AQP5) avec une augmentation du flux salivaire dans une lignée humaine de glande salivaire ductale [49]. L'analyse du promoteur de l'AQP5 par séquençage après conversion de l'ADN au bisulfite de sodium a permis de montrer qu'une hyperméthylation des îlots CpG au niveau des sites de fixation du facteur de transcription Sp1, empêchait la fixation de ce dernier et que la déméthylation des sites CpG par le 5-Aza permettait au contraire sa fixation et la transcription de ce gène. D'autres promoteurs de gènes ont été analysés et en particulier le gène de la dystonine (DST). Pour ce dernier, une hyperméthylation du promoteur est observée aboutissant à la sur-expression d'un variant d'épissage alternatif épithélial, l'antigène 1 de la pemphigoïde bulleuse [50] décrit comme pouvant être un auto-Ag dans d'autres maladies auto-immunes telles que les scléroses multiples [51].

## 7. Micro-ARNs

### 7.1. Description

Les micro-ARNs sont des ARNs simple brins et non codants de 19 à 22 nucléotides. Ces derniers sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques en régulant la transcription au niveau post-transcriptionnel. Au niveau du noyau, la première étape de la voie de synthèse des micro-ARNs est constituée par la production d'un transcrit primaire généré par la polymérase II et dont le repliement forme une structure en épingle à cheveux. Ensuite et sous l'action de l'enzyme Drosha, le pré-micro-ARN est libéré et exporté dans le cytoplasme à l'aide de l'exportine 5. Un second clivage, catalysé par l'enzyme DICER entraîne la formation d'un duplex et un seul des brins sera chargé dans le complexe *RNA-induced silencing complex* (RISC) en présence des protéines argonautes. Enfin, le complexe RISC va se fixer de façon préférentielle au niveau de la région terminale et non codante (3' UTR) des ARNs messagers ce qui conduit à une dégradation du messageur et/ou au blocage de sa traduction. Dans de nombreux processus auto-immuns, la dérégulation de l'expression des micro-ARNs est la conséquence d'autres défauts épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN et la modification des histones.



**Tableau 1**  
Dérégulation de l'expression des micro-ARNs au cours du syndrome de Gougerot-Sjögren.

Fonction	microRNA	Type cellulaire	mRNA cible	Auteurs
Voies NF- $\kappa$ B et TLR/IFN Flux salivaire	miR-146a	GSM, PBMC	IRAK1, TRAF6, NF- $\kappa$ B1, TLR2/4	[55,56]
	miR-BART13-3p, miR-768-3p, miR-574-3p	GSM, salive	STIM1	[57,58]
	miR-16	PBMC	TRIM21	[52,54]
Régulation des auto-antigènes	miR-223 miR-200b Let-7b miR-1207-5p miR-1695-3p	GSM, PBMC	TROVE2, TRIM21	[52,53]
Développement lymphocytes B Inconnue	miR-200b-3p	SSEC	TROVE2 TRIM21	[54]
	miR-155, miR-181a miR-203, miR-17-92, miR-4524, miR-5571, miR-5100, miR-5572	PBMC, GSM GSM, salive	SOCS1, TAB2, cMAF Inconnue	[52,55,59] [60–62]

GSM : glandes salivaires mineures ; PBMC : cellules mononucléées du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cells*) ; SSEC : cellules épithéliales de glande salivaire (*salivary gland epithelial cell*) ; TRIM21 : SSA/Ro 52 kDa ; TROVE 2 : SSA/Ro 60 kDa.

### 7.2. Analyse des micro-ARNs dans les glandes salivaires mineures

D'importantes variations concernant les micro-ARNs sont rapportées au niveau des GSM au cours du SGS, et l'analyse des voies biologiques concernées a permis de mettre en évidence plusieurs voies contrôlées par ces micro-ARNs (Tableau 1). Tout d'abord, le contrôle de la salivation via une action directe sur les flux calciques, ou via une action, en amont, sur les voies neurologiques [57]. Ensuite, le contrôle des auto-Ag avec la mise en évidence d'une réduction de l'expression des micro-ARNs chargés de contrôler les auto-Ag TRIM21 (SSA/Ro 52 kDa) et TROVE2 (SSA/Ro 60kDa) [52–54].

### 7.3. Analyse des micro-ARNs dans la salive

L'analyse des exosomes présents dans la salive a permis de retrouver plusieurs micro-ARNs et en particulier miR-146a, dont l'expression est augmentée et ceci dès les premiers stades du SGS [55,56]. La surexpression de miR-146a perturbe la voie *Toll-like receptors* (TLR)/IFN ainsi que le facteur de transcription NF- $\kappa$ B1. Parmi les cellules capables de sécréter des microvésicules contenant miR-146a on retrouve les cellules épithéliales, les lymphocytes ainsi que les monocytes.

## 8. Intégration de l'épigénome dans le modèle pathophysiologique

Les résultats issus de l'étude de l'épigénome dans le SGS nous amènent à compléter la modèle pathophysiologique de cette maladie (Fig. 1). Dans un premier temps, on retrouve des facteurs environnementaux capables d'entraîner d'importantes modifications épigénétiques ; facteurs tels que les virus, les UV, les médicaments, le stress qui agissent les cellules épithéliales et en particulier celles des acini. Des cytokines, des chémokines, des molécules d'adhésion ainsi que des molécules de co-stimulation sont alors induites par les cellules épithéliales transformées. Cela va favoriser, en plus du recrutement et de l'activation des LT, le recrutement des cellules dendritiques et des LB avec la formation des pseudo-centres germinatifs ectopiques. Pour les LB, on note qu'ils sont capables d'amplifier l'épithélite auto-immune en amplifiant le processus de déméthylation de l'ADN des cellules épithéliales des GSM. Du fait de cette hyperactivation, on note l'apparition d'auto-Ac voire la transformation maligne des LB.

## 9. Conclusion

Les observations relatives précédemment indiquent que les modifications de l'épigénome au cours du SGS sont déterminantes dans la pathophysiologie du SGS et que ce processus est amplifié chez des individus génétiquement prédisposés. Ces phénomènes épigénétiques sont réversibles et il est important de noter qu'ils concernent principalement les LB et les cellules épithéliales. L'utilisation de médicaments agissant sur la correction des

modifications de l'épigénome devrait donc permettre de restaurer le fonctionnement normal des glandes exocrines lacrymales et salivaires des patients.

### Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

### Remerciements

Les auteurs remercient chaleureusement Simone Forest et Geneviève Michel pour l'aide éditoriale apportée, ainsi que l'Association française du Gougerot-Sjögren et des syndromes secs et l'Association dentaire française.

### Références

- [1] Mavragani CP, Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome. *Annu Rev Pathol* 2014;9:273–85.
- [2] Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Siso-Almirall A, Bosch X. Primary Sjogren syndrome. *BMJ* 2012;344:e3821.
- [3] Brito-Zeron P, Kostov B, Solans R, Fraile G, Suarez-Cuervo C, Casanovas A, et al. Systemic activity and mortality in primary Sjogren syndrome: predicting survival using the EULAR-SS Disease Activity Index (ESSDAI) in 1045 patients. *Ann Rheum Dis* 2016;75:348–55.
- [4] Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Kostov B, Siso-Almirall A, Bosch X, Buss D, et al. Google-driven search for big data in autoimmune geoepidemiology: analysis of 394,827 patients with systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2015;14:670–9.
- [5] Maldini C, Seror R, Fain O, Dhote R, Amoura Z, De Bandt M, et al. Epidemiology of primary Sjogren's syndrome in a French multiracial/multiethnic area. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2014;66:454–63.
- [6] Kabasakal Y, Kitapcioglu G, Turk T, Oder G, Durusoy R, Mete N, et al. The prevalence of Sjogren's syndrome in adult women. *Scand J Rheumatol* 2006;35:379–83.
- [7] Brito-Zeron P, Baldini C, Bootsma H, Bowman SJ, Jonsson R, Mariette X, et al. Sjogren syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16047.
- [8] Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* 2010;34:400–7.
- [9] Mingueneau M, Boudaoud S, Haskett S, Reynolds TL, Nocturne G, Norton E, et al. Cytometry by time-of-flight immunophenotyping identifies a blood Sjogren's signature correlating with disease activity and glandular inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:1809–21.e12.
- [10] Kapsogeorgou EK, Christodoulou MI, Panagiotakos DB, Paikos S, Tassidou A, Tzioufas AG, et al. Minor salivary gland inflammatory lesions in Sjogren syndrome: do they evolve? *J Rheumatol* 2013;40:1566–71.
- [11] Ding J, Zhang W, Haskett S, Pellerin A, Xu S, Petersen B, et al. BAFF overexpression increases lymphocytic infiltration in Sjogren's target tissue, but only inefficiently promotes ectopic B-cell differentiation. *Clin Immunol* 2016;169:69–79.
- [12] Capaldo C, Carvajal Alegria G, Corneic D, Jousse-Joulin S, Devauchelle-Pensec V, Renaudineau Y. The active immunological profile in patients with primary Sjogren's syndrome is restricted to typically encountered autoantibodies. *Clin Exp Rheumatol* 2016;34:722.
- [13] Corneic D, Saraux A, Cochener B, Pers JO, Jousse-Joulin S, Renaudineau Y, et al. Level of agreement between 2002 American-European Consensus Group and 2012 American College of Rheumatology classification criteria for Sjogren's syndrome and reasons for discrepancies. *Arthritis Res Ther* 2014;16:R74.
- [14] Simonin L, Pasquier E, Leroy C, Corneic D, Lemerle J, Bendaoud B, et al. Lymphocyte disturbances in primary antiphospholipid syndrome and application to venous thromboembolism follow-up. *Clin Rev Allergy Immunol* 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s12016-016-8568-1>.

- [15] Alonso R, Buors C, Le Dantec C, Hillion S, Pers JO, Saraux A, et al. Aberrant expression of CD6 on B-cell subsets from patients with Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* 2010;35:336–41.
- [16] Gazeau P, Cornec D, Jousse-Joulin S, Guellec D, Saraux A, Devauchelle-Pensec V. Time-course of ultrasound abnormalities of major salivary glands in suspected Sjogren's syndrome. *Joint Bone Spine* 2017; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2017.02.007>.
- [17] Clark DA, Lamey PJ, Jarrett RF, Onions DE. A model to study viral and cytokine involvement in Sjogren's syndrome. *Autoimmunity* 1994;18:7–14.
- [18] Lucchesi D, Pitzalis C, Bombardieri M. EBV and other viruses as triggers of tertiary lymphoid structures in primary Sjogren's syndrome. *Expert Rev Clin Immunol* 2014;10:445–55.
- [19] Kivity S, Arango MT, Ehrenfeld M, Tehori O, Shoenfeld Y, Anaya JM, et al. Infection and autoimmunity in Sjogren's syndrome: a clinical study and comprehensive review. *J Autoimmun* 2014;51:17–22.
- [20] Haaheim LR, Halse AK, Kvakestad R, Stern B, Normann O, Jonsson R. Serum antibodies from patients with primary Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus recognize multiple epitopes on the La(SS-B) autoantigen resembling viral protein sequences. *Scand J Immunol* 1996;43:115–21.
- [21] Hajjar C, Sainte-Foie S, Savin J, Lacave J, Berlet F, Teron-Aboud B, et al. [HTLV1 infection and sicca syndrome]. *J Fr Ophtalmol* 1995;18:597–602.
- [22] Wattiaux MJ, Jouan-Flahault C, Youinou P, Cabane J, Andreani T, Serfaty L, et al. [Association of Gougerot-Sjogren syndrome and viral hepatitis C. Apropos of 6 cases]. *Ann Med Interne (Paris)* 1995;146:247–50.
- [23] Busche S, Shao X, Caron M, Kwan T, Allum F, Cheung WA, et al. Population whole-genome bisulfite sequencing across two tissues highlights the environment as the principal source of human methylome variation. *Genome Biol* 2015;16:290.
- [24] Mavragani CP, Moutsopoulos HM. The geoepidemiology of Sjogren's syndrome. *Autoimmun Rev* 2010;9:A305–10.
- [25] Brito-Zeron P, Acar-Denizli N, Zeher M, Rasmussen A, Seror R, Theander E, et al. Influence of geolocation and ethnicity on the phenotypic expression of primary Sjogren's syndrome at diagnosis in 8310 patients: a cross-sectional study from the Big Data Sjogren Project Consortium. *Ann Rheum Dis* 2016; <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-209952>.
- [26] Brooks WH, Le Dantec C, Pers JO, Youinou P, Renaudineau Y. Epigenetics and autoimmunity. *J Autoimmun* 2010;34:J207–19.
- [27] Lessard CJ, Ice JA, Adrianto I, Wiley GB, Kelly JA, Gaffney PM, et al. The genomics of autoimmune disease in the era of genome-wide association studies and beyond. *Autoimmun Rev* 2012;11:267–75.
- [28] Kovacs A, Szekeres E, Berek L, Endreffy E, Kovacs L, Makula E, et al. Relationship between the occurrence of anti-SSA, anti-SSB autoantibodies and HLA class II alleles from the aspect of in vitro inhibitory effect of glucocorticosteroid on the antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients with primary Sjogren's syndrome. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2000;47:421–31.
- [29] Burbelo PD, Ambatipudi K, Alevizos I. Genome-wide association studies in Sjogren's syndrome: what do the genes tell us about disease pathogenesis? *Autoimmun Rev* 2014;13:756–61.
- [30] Konsta OD, Thabet Y, Le Dantec C, Brooks WH, Tzioufas AG, Pers JO, et al. The contribution of epigenetics in Sjogren's syndrome. *Front Genet* 2014;5:71.
- [31] Lessard CJ, Li H, Adrianto I, Ice JA, Rasmussen A, Grundahl KM, et al. Variants at multiple loci implicated in both innate and adaptive immune responses are associated with Sjogren's syndrome. *Nat Genet* 2013;45:1284–92.
- [32] Renaudineau Y, Youinou P. Epigenetics and autoimmunity, with special emphasis on methylation. *Keio J Med* 2011;60:10–6.
- [33] Brooks WH, Renaudineau Y. Epigenetics and autoimmune diseases: the X chromosome-nucleolus nexus. *Front Genet* 2015;6:22.
- [34] Thabet Y, Le Dantec C, Ghedira I, Devauchelle V, Cornec D, Pers JO, et al. Epigenetic dysregulation in salivary glands from patients with primary Sjogren's syndrome may be ascribed to infiltrating B cells. *J Autoimmun* 2013;41:175–81.
- [35] Konsta OD, Le Dantec C, Charras A, Cornec D, Kapsogeorgou EK, Tzioufas AG, et al. Defective DNA methylation in salivary gland epithelial acini from patients with Sjogren's syndrome is associated with SSB gene expression, anti-SSB/LA detection, and lymphocyte infiltration. *J Autoimmun* 2016;68:30–8.
- [36] Devauchelle-Pensec V, Pennec Y, Morvan J, Pers JO, Daridon C, Jousse-Joulin S, et al. Improvement of Sjogren's syndrome after two infusions of rituximab (anti-CD20). *Arthritis Rheum* 2007;57:310–7.
- [37] Altorok N, Coit P, Hughes T, Koelsch KA, Stone DU, Rasmussen A, et al. Genome-wide DNA methylation patterns in naive CD4+ T cells from patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:731–9.
- [38] Miceli-Richard C, Wang-Renault SF, Boudaoud S, Busato F, Lallemand C, Bethune K, et al. Overlap between differentially methylated DNA regions in blood B lymphocytes and genetic at-risk loci in primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2016;75:933–40.
- [39] Imgenberg-Kreuz J, Sandling JK, Almlof JC, Nordlund J, Signer L, Norheim KB, et al. Genome-wide DNA methylation analysis in multiple tissues in primary Sjogren's syndrome reveals regulatory effects at interferon-induced genes. *Ann Rheum Dis* 2016;75:2029–36.
- [40] Cole MB, Quach H, Quach D, Baker A, Taylor KE, Barcellos LF, et al. Epigenetic signatures of salivary gland inflammation in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheumatol* 2016;68:2936–44.
- [41] Renaudineau Y, Ballestar E. Epigenetics: DNA methylation signatures in Sjogren syndrome. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12:565–6.
- [42] Charras A, Konsta OD, Le Dantec C, Bagacean C, Kapsogeorgou EK, Tzioufas AG, et al. Cell-specific epigenome-wide DNA methylation profile in long-term cultured minor salivary gland epithelial cells from patients with Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2017;76:625–8.
- [43] Fali T, Le Dantec C, Thabet Y, Jousse S, Hanrotel C, Youinou P, et al. DNA methylation modulates HRES1/p28 expression in B cells from patients with Lupus. *Autoimmunity* 2014;47:265–71.
- [44] Banki K, Maceda J, Hurley E, Ablonczy E, Mattson DH, Szegedy L, et al. Human T-cell lymphotropic virus (HTLV)-related endogenous sequence, HRES-1, encodes a 28-kDa protein: a possible autoantigen for HTLV-I gag-reactive autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:1939–43.
- [45] Le Dantec C, Vallet S, Brooks WH, Renaudineau Y. Human endogenous retrovirus group E and its involvement in diseases. *Viruses* 2015;7:1238–57.
- [46] Mavragani CP, Sagalovskiy I, Guo Q, Nezos A, Kapsogeorgou EK, Lu P, et al. Expression of long interspersed nuclear element 1 retroelements and induction of type I interferon in patients with systemic autoimmune disease. *Arthritis Rheumatol* 2016;68:2686–96.
- [47] Hung T, Pratt GA, Sundaraman B, Townsend MJ, Chaivorapol C, Bhangale T, et al. The Ro60 autoantigen binds endogenous retroelements and regulates inflammatory gene expression. *Science* 2015;350:455–9.
- [48] Konsta OD, Charras A, Le Dantec C, Kapsogeorgou E, Bordron A, Brooks WH, et al. Epigenetic modifications in salivary glands from patients with Sjogren's syndrome affect cytokeratin 19 expression. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol* 2016;53:e01.
- [49] Motegi K, Azuma M, Tamatani T, Ashida Y, Sato M. Expression of aquaporin-5 in and fluid secretion from immortalized human salivary gland ductal cells by treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine: a possibility for improvement of xerostomia in patients with Sjogren's syndrome. *Lab Invest* 2005;85:342–53.
- [50] Gonzalez S, Aguilera S, Alliende C, Urzua U, Quest AF, Herrera L, et al. Alterations in type I hemidesmosome components suggestive of epigenetic control in the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2011;63:1106–15.
- [51] Laffitte E, Burkhard PR, Fontao L, Jaunin F, Saurat JH, Chofflon M, et al. Bullous pemphigoid antigen 1 isoforms: potential new target autoantigens in multiple sclerosis? *Br J Dermatol* 2005;152:537–40.
- [52] Kapsogeorgou EK, Gourzi VC, Manoussakis MN, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Cellular microRNAs (miRNAs) and Sjogren's syndrome: candidate regulators of autoimmune response and autoantigen expression. *J Autoimmun* 2011;37:129–35.
- [53] Yang Y, Peng L, Ma W, Yi F, Zhang Z, Chen H, et al. Autoantigen-targeting microRNAs in Sjogren's syndrome. *Clin Rheumatol* 2016;35:911–7.
- [54] Gourzi VC, Kapsogeorgou EK, Kyriakidis NC, Tzioufas AG. Study of microRNAs (miRNAs) that are predicted to target the autoantigens Ro/SSA and La/SSB in primary Sjogren's Syndrome. *Clin Exp Immunol* 2015;182:14–22.
- [55] Shi H, Zheng LY, Zhang P, Yu CQ. miR-146a and miR-155 expression in PBMCs from patients with Sjogren's syndrome. *J Oral Pathol Med* 2014;43:792–7.
- [56] Pauley KM, Stewart CM, Gauna AE, Dupre LC, Kuklani R, Chan AL, et al. Altered miR-146a expression in Sjogren's syndrome and its functional role in innate immunity. *Eur J Immunol* 2011;41:2029–39.
- [57] Alevizos I, Alexander S, Turner RJ, Illei GG. MicroRNA expression profiles as biomarkers of minor salivary gland inflammation and dysfunction in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2011;63:535–44.
- [58] Gallo A, Jang SI, Ong HL, Perez P, Tandon M, Ambudkar I, et al. Targeting the Ca<sup>2+</sup> sensor STIM1 by exosomal transfer of Ebv-miR-BART13-3p is associated with Sjogren's syndrome. *EBioMedicine* 2016; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.06.041>.
- [59] Peng L, Ma W, Yi F, Yang YJ, Lin W, Chen H, et al. MicroRNA profiling in Chinese patients with primary Sjogren syndrome reveals elevated miRNA-181a in peripheral blood mononuclear cells. *J Rheumatol* 2014;41:2208–13.
- [60] Michael A, Bajracharya SD, Yuen PS, Zhou H, Star RA, Illei GG, et al. Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Dis* 2010;16:34–8.
- [61] Iborra M, Bernuzzi F, Invernizzi P, Danese S. MicroRNAs in autoimmunity and inflammatory bowel disease: crucial regulators in immune response. *Autoimmun Rev* 2012;11:305–14.
- [62] Tandon M, Gallo A, Jang SI, Illei GG, Alevizos I. Deep sequencing of short RNAs reveals novel microRNAs in minor salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Oral Dis* 2012;18:127–31.

# Objectifs

Comme décrit précédemment au cours de cette introduction, la physiopathologie du SGS reste mal connue. Toutefois plusieurs éléments suggèrent l'implication des facteurs épigénétiques dont la méthylation de l'ADN dans cette pathologie. Ainsi, un lien a été établi entre des drogues (hydralazine et procainamide) interférant avec la méthylation de l'ADN, en agissant sur les DNA methyl-transferases (DNMTs), et l'induction d'un syndrome sec associé à un lupus à la fois chez l'Homme et chez la souris (Cannat and Seligmann, 1968; Darwaza et al., 1988). Par la suite, il a été démontré que la production anormale des éléments HERVs (Human Endogenous RetroViruses) au niveau des cellules épithéliales de la glande salivaires des patients souffrant d'un SGS, traduisait un défaut du contrôle de la méthylation de l'ADN et favorisait l'expression d'autoantigènes cibles des autoanticorps (Dantec et al., 2012; Tugnet et al., 2013). Au laboratoire, Y. Thabet au cours de sa thèse s'est intéressée à l'état de méthylation des principaux partenaires cellulaires incriminés, à savoir les cellules épithéliales, les lymphocytes T et les lymphocytes B. Par ses travaux, elle a pu montrer que le processus de méthylation global de l'ADN dans les cellules épithéliales de glandes salivaires (SGECs) était déficient au cours du SGS et que ce défaut était en partie lié à la présence anormale des lymphocytes B dans la glande salivaire (Thabet et al., 2013).

Il semblait donc intéressant d'analyser plus finement cette déméthylation notamment grâce à l'analyse comparative du méthylome des SGECs entre des patients contrôles et des patients atteints d'un SGS. Cette étude réalisée à partir de la puce HM450K d'Illumina est l'objet du premier papier de cette thèse. Elle nous a permis de relier des voies physiopathologiques importantes du SGS avec le processus de méthylation de l'ADN.

Par la suite les conséquences de cette altération de la méthylation de l'ADN sont présentées dans les articles 2 à 4, les deux premiers s'intéressent à la régulation de l'expression de deux gènes sensibles à la méthylation de l'ADN à savoir l'autoantigène SSB/La (article 2) et la cytokératine 19 (article 3) et le dernier explore le lien qui existe entre les processus épigénétiques et les facteurs de risques du SGS.

Enfin la dernière partie de ce travail s'intéresse à décortiquer les mécanismes impliqués dans l'altération de la méthylation de l'ADN, la probable implication d'un mécanisme actif de déméthylation et le rôle du microenvironnement inflammatoire dans ces mécanismes (résultats 5).

# RESULTATS

## Cell-specific epigenome-wide DNA methylation profile in long-term cultured minor salivary gland epithelial cells from patients with Sjögren's syndrome

Amandine Charras, Orsia D Konsta, Christelle Le Dantec, Cristina Bagacean, Efstathia K Kapsogeorgou, Athanasios G Tzioufas, Jacques-Olivier Pers, Anne Bordron, Yves Renaudineau

Ann Rheum Dis. 2017 Mar;76(3):625-628.

### I. Introduction et objectifs

Le syndrome de Gougerot Sjögren (SGS) est une maladie auto-immune chronique qui se caractérise par des dommages progressifs et irréversibles des glandes exocrines, plus particulièrement des glandes salivaires et lacrymales. Cette pathologie affecte 0.1 à 3% de la population générale et est plus fréquente chez les femmes avec un ratio de 9 femmes touchées pour 1 homme. La physiopathologie est complexe aboutissant à une infiltration lymphocytaire qui est à l'origine de la destruction de l'épithélium sécrétoire et qui joue un rôle central dans l'initiation et l'amplification du SGS. Cette infiltration se caractérise également par une activation permanente des lymphocytes B, qui serait à l'origine d'une augmentation par 40 du risque de développer un lymphome de type B. Des études suggèrent l'implication de facteurs multiples dans la genèse de la pathologie à savoir des facteurs génétiques, environnementaux et épigénétiques. Concernant les facteurs épigénétiques plusieurs éléments suggèrent leur implication notamment via la méthylation de l'ADN. Ainsi, un lien a été fait entre des drogues (hydralazine et procainamide) interférant avec la méthylation de l'ADN et en agissant sur les DNMTs et l'induction d'un syndrome sec associé à un lupus à la fois chez l'Homme et chez la souris. Par la suite, il a été démontré que la production anormale des éléments HERVs (Human Endogenous RetroViruses) au niveau des cellules épithéliales de la glande salivaires des patients souffrant d'un SGS traduisait un défaut du contrôle de la méthylation de l'ADN qui favorisait l'expression d'autoantigènes cibles des autoanticorps (Le Dantec et al., 2012). Enfin

un défaut de méthylation de l'ADN dans les cellules épithéliales de glandes salivaires (SGECs) a été montré au cours du SGS et ce défaut serait en partie lié à la présence anormale des lymphocytes B dans la glande salivaire (Thabet et al., 2013).

L'objectif de ce travail était de mieux comprendre les altérations épigénétiques au cours du SGS et en particulier les défauts de méthylation de l'ADN observés dans les SGECs ceci en utilisant une approche sans *a priori*.

## II. Démarche expérimentale

Une étude globale de la méthylation de l'ADN a été réalisée sur 12 patients comportant 4 contrôles, 4 patients présentant un SGS et 4 patients présentant un SGS + MALT.

Pour cette analyse la puce HM450k d'Illumina a été utilisée ; elle permet de couvrir plus de 485 000 sites CpG sur l'ensemble du génome L'analyse des données obtenues par la puce 450KHM a été réalisée via R qui est un logiciel libre d'accès de traitement des données et d'analyses statistiques et qui met en œuvre un langage de programmation. Cela a pu être réalisé via l'utilisation de packages (des extensions libres d'accès dans lesquels sont regroupés des fonctionnalités utiles pour un type d'analyses de données) spécialement créés pour l'analyse de cette puce (Minfi, ChAMP). Ainsi les analyses ont été conduites de plusieurs manières en réalisant différentes comparaisons selon les sous-groupes. Ces différentes comparaisons avaient comme objectif d'identifier sans *a priori* des gènes présentant plusieurs sites différenciellement méthylés.

Par ailleurs, à ces analyses, a été ajoutée l'utilisation de bases de données accessibles en ligne plutôt généralistes telles que Ensembl et UCSC Genome Browser, ainsi que des bases de données plus ciblantes telles que DAVID et Interferome.

En parallèle ces analyses ont enfin été suivies par des sous analyses en fonction du traitement, de l'infiltration lymphocytaire et également en fonction du développement d'un lymphome suite à un syndrome de Gougerot Sjögren par le patient.

## III. Résultats - Conclusions

Les différentes analyses bioinformatiques réalisées à partir des données obtenues sur les puces HM450K d'Illumina nous ont permis d'obtenir différents panels de gènes qui seraient

différentiellement méthylés lors de ce phénomène pathologique. De façon intéressante nous avons identifié l'implication potentielle de la voie calcique et de la voie WNT dans nos différentes analyses. Par ailleurs nous avons pu retrouver par nos analyses une signature interféron, c'est-à-dire une implication des voies IFN dans la régulation des gènes identifiés comme différentiellement méthylés lors de la pathologie. Cela corrobore certaines études, où les patients ayant ce type de signature présentent une activité de la maladie plus importante. Ainsi on retrouverait une signature interféron plutôt de type 1 (induit principalement par les virus et microbes intracellulaire et dont la fonction principale est la production d'antiviraux et d'antibactériens) pour le SGS, et plutôt de type 2 (induit principalement par les antigènes et dont les fonctions principales sont l'activation des cellules NK, des macrophages et des lymphocytes T cytotoxiques) pour les SGS+MALT.

Enfin, une mise en parallèle avec les données accessibles en ligne pour les autres acteurs de la pathologie à savoir les lymphocytes B et T suggèrent des mécanismes qui seraient propres à chaque type cellulaire.



## CONCISE REPORT

# Cell-specific epigenome-wide DNA methylation profile in long-term cultured minor salivary gland epithelial cells from patients with Sjögren's syndrome

Amandine Charras,<sup>1</sup> Orsia D Konsta,<sup>1,2</sup> Christelle Le Dantec,<sup>1</sup> Cristina Bagacean,<sup>1,3</sup> Efsthathia K Kapsogeorgou,<sup>2</sup> Athanasios G Tzioufas,<sup>2</sup> Jacques-Olivier Pers,<sup>1</sup> Anne Bordron,<sup>1</sup> Yves Renaudineau<sup>1,3</sup>

**Handling editor** Tore K Kvien

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210167>)

<sup>1</sup>INSERM U1227 B lymphocytes and autoimmunity, Labex IGO, Réseau épigénétique et réseau canaux ioniques du canceropole Grand Ouest, Université de Brest, Brest, France

<sup>2</sup>Department of Pathophysiology, School of Medicine, National University of Athens, Athens, Greece

<sup>3</sup>Laboratory of Immunology and Immunotherapy, Brest University Medical School, CHRU Morvan, Brest, France

## Correspondence to

Professor Yves Renaudineau, Laboratory of Immunology and Immunotherapy, Brest University Medical School, CHRU Morvan BP824, Brest F29609, France; [yves.renaudineau@univ-brest.fr](mailto:yves.renaudineau@univ-brest.fr)

AB and YR are the last two senior authors contributed equally to this work.

Received 4 July 2016

Revised 2 December 2016

Accepted 26 December 2016

Published Online First

16 January 2017



CrossMark

**To cite:** Charras A, Konsta OD, Le Dantec C, et al. *Ann Rheum Dis* 2017;**76**:625–628.

## ABSTRACT

**Objectives** The aetiology of primary Sjögren's syndrome (pSS), also referred to as autoimmune epithelitis, is incompletely understood but includes an epigenetic contribution. Accordingly, the aim of this study was to investigate DNA methylation in salivary gland epithelial cells (SGEC), and to compare results with those publicly available from pSS B and T cells.

**Methods** Long-term cultured SGEC were selected to conduct an epigenome-wide association study (EWAS) in patients with pSS with comparison to controls using the HumanMethylation 450 K array from Illumina.

**Results** The analysis of differentially methylated CpG (DMC) uncovered 4662 positions corresponding to 2560 genes, and 575 genes with two or more DMC sites (DMCs), in SGEC as compared with controls. Further analysis highlighted an important proportion of interferon-regulated genes (61%), the calcium pathway (hypomethylated) and the Wnt pathway (hypermethylated). When comparing SGEC with pSS T and/or B cell results, an important overlap was observed with respect to differentially methylated genes (38.8%) and pSS risk factors (71.4%), although such assertion was not true when comparing DMCs.

**Conclusions** This study conducted in SGEC emphasises the role of DNA methylation in pSS pathogenesis and supports the necessity to conduct pure cell analysis for future EWAS studies when analysing salivary glands from patients with pSS.

## INTRODUCTION

In primary Sjögren's syndrome (pSS), several lines of evidence suggest a role for DNA methylation in the disease's pathophysiology, and this is reinforced by recent epigenome-wide association studies (EWAS).<sup>1</sup> With this in mind, quantitative analysis of 485 577 CpG sites in pSS peripheral blood naïve CD4<sup>+</sup> T cells and CD19<sup>+</sup> B cells was conducted using the Illumina HumanMethylation (HM) 450 K array, leading to the characterisation of new pathways.<sup>2–4</sup> In contrast, the EWAS study performed in minor salivary glands (MSG) showed modest variations in DNA methylation,<sup>2 5</sup> while we have recently observed global DNA methylation alterations in salivary gland epithelial cells (SGEC) from patients with pSS leading to, among other

perturbations, sicca syndrome (SS) B/La autoantigen deregulation.<sup>6 7</sup> As the cellular heterogeneity in the MSG biopsies may explain this paradox, long-term cultured SGEC were selected to conduct an EWAS study.

## METHODS

### Study participants

Samples were obtained from 16 individuals who met the revised American-European SS classification criteria,<sup>8</sup> and for which clinical characteristics are summarised in [table 1](#). The non-pSS control group patients (n=4) did not meet the aforementioned SS criteria. The institutional review board at the University of Athens approved this study, and participants signed an informed consent form. Non-neoplastic long-term cultured SGEC were established by standard technique as previously described.<sup>9</sup>

### DNA methylation analysis

DNA was extracted from cells (Qiagen, Valencia, California, USA); 500 ng of DNA from each sample was bisulfite-converted (Zymo Research, Irvine, California, USA), and DNA methylation was evaluated by hybridising bisulfite-converted DNA to the HM 450 K BeadChip (Illumina, San Diego, USA). These steps were performed by NXT-DX Company (Gent, Belgium) according to manufacturer's directions. Validation of the array data was performed using bisulfite DNA sequencing in a replicative pSS cohort (n=8) and in the human salivary gland (HSG) cell line cultured for 48 hours with increasing amounts of the DNA demethylating drug 5-azacytidine (5-aza).<sup>7</sup>

### Methylation data processing and analysis

DNA methylation data analysis was performed in the R environment (v3.2.3) using the Minfi (v1.16.1) statistical analysis package. This included correction for background signal and normalisation of each channel to control probes included in each array. Signal intensity was parsed into the Minfi R package quality control and Subset-quantile Within Array Normalization. The methylated and unmethylated probe values were used to calculate both M and β value ratios, and the following formulae were used:

$$M \text{ value} = \log\left(\frac{\text{Methylated}}{\text{Unmethylated}}\right);$$

$$\beta \text{ value} = \frac{\text{Methylated}}{\text{Methylated} + \text{Unmethylated} + 100}$$

The phenotype (pSS vs control) was defined as categorical, and the dmpFinder function was used (F-test). Based on the recommendations of Du *et al.*,<sup>10</sup> M values for each position with a  $p < 0.01$  were considered statistically significant. Next, another

cut-off was applied, and only probes with a median difference using  $\beta$  value up to 7% were kept for analysis.<sup>3</sup> The  $\beta$  value was selected due to its more intuitive biological interpretation. To visualise results, a heatmap was drawn.

**Pathway analysis**

For pathway analysis, only genes with at least two differentially methylated CpG (DMC) were considered. Pathway identification was performed considering, respectively, hypomethylated and hypermethylated probes and using the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID V6.7, <https://david.ncifcrf.gov>).<sup>11</sup> Parameters used in DAVID were a minimum gene group membership of two, a modified Fisher's exact p value (EASE score) maximum of 0.1 and the human genome as background. Moreover, the Interferome database V2.01 (<http://www.interferome.org>) was used for the analysis of the possible involvement of significantly differentially methylated interferon-regulated genes.<sup>12</sup>

**RESULTS**

To search for epigenetic modifications in SGEC from eight patients with pSS as compared with four controls, we performed an epigenome-wide DNA methylation analysis. CpG sites were selected, as previously done by Miceli-Richard *et al.*<sup>3</sup> Thereby, 4662 DMC sites (DMCs) were characterised (21% hypomethylated and 79% hypermethylated), corresponding to 2560 unique and annotated genes in SGEC from patients with pSS (figure 1A and online supplementary table S1). Among them, the majority of DMCs were present in genomic areas far from promoters (29.5% vs 41% of total probes;  $p < 10^{-4}$ ,  $\chi^2$  test) and CpG islands (12.4% vs 30.9% of total probes;  $p < 10^{-4}$ ), and within open sea regions (48.8% vs 36% of total probes;  $p < 10^{-4}$ ) and/or intergenic regions (29.1% vs 25% of total probes;  $p < 10^{-4}$ ). Almost identical results were reported in peripheral blood CD19<sup>+</sup> B cells from two studies (S1/S2),<sup>2,3</sup> while differences were observed with CD4<sup>+</sup> T cells from patients with pSS (figure 1B).<sup>4</sup>

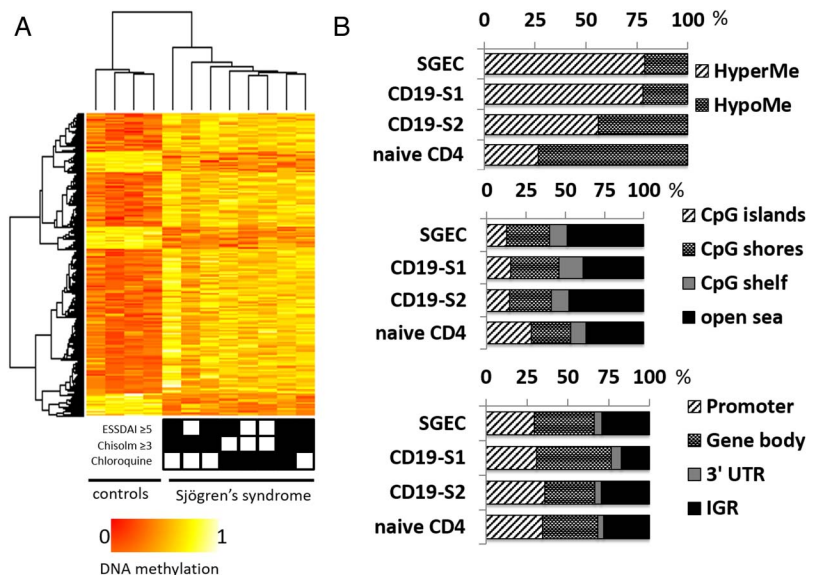
Next, genes and DMCs obtained in SGEC from patients with pSS were compared with publicly available data from peripheral

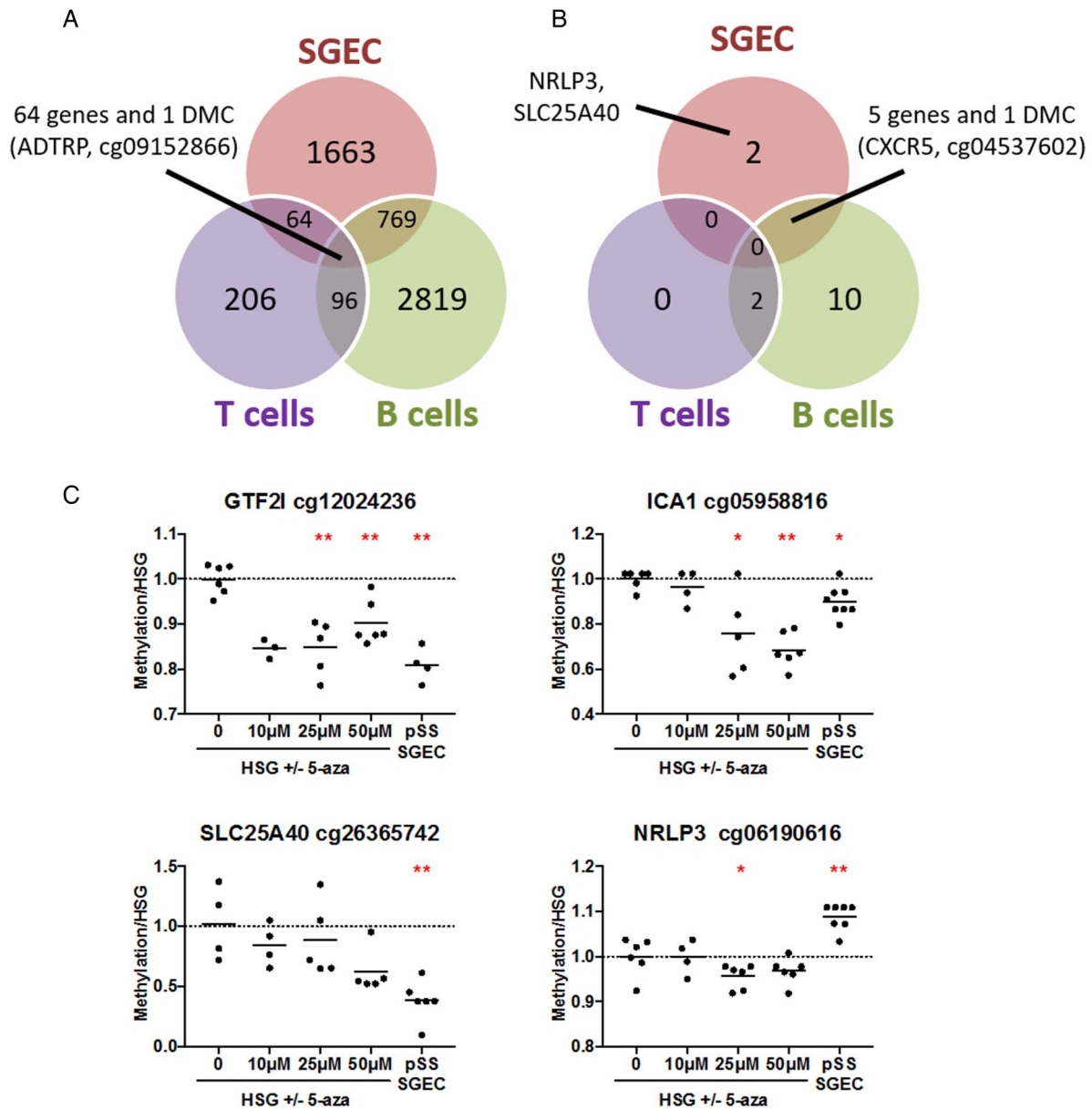
**Table 1** Clinical characteristics of the patients with primary SS and non-SS control groups

	Controls (n=4)	pSS HM 450 K (n=8)	pSS bisulfite sequencing (n=8)
Age, years, mean (range)	49 (38–66)	54 (24–74)	59 (39–76)
Dry mouth, n (%)	3/4 (75)	6/8 (75)	8/8 (100)
ESSDAI ( $\geq 5$ )	–	5/8 (62.5%)	
Autoantibodies			
ANA (HEp-2 cells), n (%)	0	8/8 (100)	7/8 (87.5)
Anti-SSA/Ro, n (%)	0	5/8 (62.5)	4/8 (50)
Anti-SSB/La, n (%)	0	3/8 (37.5)	2/8 (25)
RF, n (%)	0	8/8 (100)	3/8 (37.5)
Biopsies			
Focus score*, mean (range)	<1	5.2 (1–9)	4.1 (1–8)
Chisholm-Mason grade $\geq 3$ , n (%)	<1	5/8 (62.5)	3/8 (37.5)
Treatment			
Hydroxychloroquine, n (%)	0	4/8 (50)	3/8 (37.5)

\*The focus score is the number of mononuclear cell infiltrates containing at least 50 inflammatory cells (lymphocytic foci) in a 4 mm<sup>2</sup> of glandular tissue section. ANA, antinuclear antibodies; ESSDAI, EULAR Sjögren's syndrome disease activity index; HEp-2, Human Epithelioma 2 cell line; HM, HumanMethylation; no., number; pSS, primary Sjögren's syndrome; RF, rheumatoid factor; SS, Sjögren's syndrome; SSA, sicca syndrome A; SSB, sicca syndrome B.

**Figure 1** Whole methylome analysis in long-term cultured salivary gland epithelial cells (SGEC) from patients with primary Sjögren's syndrome (pSS) and controls. (A) Supervised hierarchical clustering of DNA methylation in patients with pSS. Orange and yellow represent 0 and 1 methylation according to the  $\beta$  values, respectively. Patients with elevated disease activity (ESSDAI score  $\geq 5$ ), elevated lymphocyte infiltration (Chisholm score  $\geq 3$ ) and those treated with hydroxychloroquine are reported in black. (B) Methylation status of long-term cultured SGEC, CD4<sup>+</sup> naïve T cells and CD19<sup>+</sup> B cells from two studies (S1 and S2).<sup>2–4</sup> Upper panel, hypermethylation (HyperMe) and hypomethylation status (HypoMe); middle panel, probe distribution based on proximity to CpG islands; lower panel, probe distribution according to the transcription start site (TSS)/ promoter region proximity.





**Figure 2** Cell-specific DNA methylation profile in long-term cultured salivary gland epithelial cells (SGEC) from patients with primary Sjögren's syndrome (pSS). (A) Venn diagram showing overlapped genes found in SGEC, CD4<sup>+</sup> naïve T cells and CD19<sup>+</sup> B cells from two studies (S1 and S2).<sup>2-4</sup> (B) Venn diagram showing overlapped genes in pSS gene risk factors in SGEC, CD4<sup>+</sup> naïve T cells and CD19<sup>+</sup> B cells. (C) GTF2I, ICA1, SLC25A40 and NRLP3 DNA methylation status in SGEC from eight patients with pSS, and human salivary gland (HSG) cell line cultured 48 hours with increasing amount of the DNA demethylating agent 5-azacytidine (5-aza at 0, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M and 50  $\mu$ M). Bisulfite DNA sequencing primers were designated to include the CpG of interest, as reported in online supplementary table S5. DNA methylation levels were normalised to that observed in the untreated HSG cell line (mean value of six experiments). p Values were calculated using the Mann-Whitney non-parametric test (\*0.05<p<0.01; \*\*0.01<p<0.001). ADTRP, androgen-dependent TFPI-regulating protein; DMC, differentially methylated CpG.

blood CD19<sup>+</sup> B cells (S1/S2 lists pooled) and from CD4<sup>+</sup> T cells isolated from patients with pSS.<sup>2-4</sup> As represented in [figure 2A](#) and online supplementary table S2, 64 genes including 16 annotated to calcium ion binding (GO:0005509;  $p=8.9\times 10^{-9}$ ) and only one DMC (cg09152866, androgen-dependent tissue factor pathway inhibitor (TFPI)-regulating protein, ADTRP) were common to the three cell types. With regard to genes found in two cell types, they were 993/2560 (38.8%), and only 209/12 244 (1.7%) when regarding DMCs.

Thereafter, to identify the common functional characteristics of genes with aberrant DNA methylation, genes with a minimum of two DMCs per gene were considered in SGEC and lymphocytes to perform a pathway analysis (see online

supplementary table S3). In SGEC, the calcium (hsa04020,  $p=0.02$ ) and the Wnt (hsa04310,  $p=0.004$ ) pathways were identified as enriched gene pathways for hypomethylated and hypermethylated DMCs, respectively. In contrast and when considering lymphocytes, methylated genes were enriched for the T cell receptor (TCR), B cell receptor (BCR) and T1 diabetes pathways in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and B cells, while for hypomethylated genes, the allograft rejection, tight junction and T1 diabetes pathways were associated within PBMC, B cells and T cells, respectively.

Subsequently, as an interferon signature was found to be an important upstream regulator of genes in pSS, we submitted gene lists, with a minimum of two DMCs per gene, to the

Interferome database. Compared with the results obtained with lymphocytes from patients with pSS, SGEC from patients with pSS showed a similar and important proportion of differentially methylated interferon-regulated genes (61%) that were related to the Wnt pathway (5/11) but not the calcium pathway.

Since single nucleotide polymorphisms in patients suffering from autoimmune diseases are strongly associated with epigenetic markers in long-range regulatory sequences,<sup>13</sup> the overlap between the 43 gene risk factors associated with pSS<sup>14</sup> and genes differentially methylated was tested in patients with pSS. In SGEC, 7/43 (16.3%) gene risk factors showed at least one DMC: CXCR5, GTF2I, ICA1, NRLP3, SLC25A40, tumour necrosis factor and MBL2. Among them, five gene risk factors and one DMC (cg04537602, CXCR5) were shared between SGEC and B cells (figure 2B). To validate HM450 K results, we quantitatively analysed DNA methylation patterns of the CpG of interest. Relative to the HSG cell line used as reference, a dose-dependent effect of 5-aza in HSG and variations in SGEC from patients with pSS were statistically confirmed for GTF2I, ICA1, SLC25A40 and NRLP3 (figure 2C).

Finally, patients with pSS were subdivided according to disease activity (ESSDAI  $\geq 5$  vs  $< 5$ ), lymphocyte infiltration (Chisholm  $\geq 3$  vs  $< 3$ ) and hydroxychloroquine intake. Variations were not found when comparing patient subgroups with the controls (figure 1A), while variations were observed when comparing pSS subgroups (see online supplementary table S4).

## DISCUSSION

Our study revealed major epigenetic changes when analysing pure cell populations and long-term cultured SGEC from patients with pSS. We also provide arguments to consider the importance of DNA methylation on interferon-regulated genes in SGEC, which is in accordance with other EWAS studies conducted in lymphocytes. Moreover, the calcium pathway, not previously reported in pSS, was highlighted, and it is known that this pathway induces changes in DNA methylation.<sup>15</sup> In addition, an important proportion of genes previously shown to be differentially methylated in T and/or B cells (41.3%) was also found when analysing SGEC, thus suggesting similar pathways between cellular subsets. However, such associations fall below 2% when comparing DMCs with only one DMC detected in the three cell subsets, and present in the 3' untranslated part of the ADTRP.

When considering genes sensitive to the strong DNA hypomethylating drug 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza) in the salivary gland cell lines such as HRM3, AQP5, E-cadherin, SSB/La and KRT19,<sup>7 16–19</sup> we found no statistical difference in the differential methylation in SGEC between patients with pSS and controls. In fact, important individual variations exist between DMCs as addressed for the KRT19 locus in SGEC between patients with pSS,<sup>19</sup> and during lifetime development in monozygotic twins<sup>20</sup> leading to a negative result when performing EWAS analysis. As a consequence, both individual and cell-type variations may explain the paradoxical overlap observed between the three cell types when testing genes, while such an overlap was not confirmed with regard to DMCs. As a consequence, for MSG methylome analysis in pSS, we recommend using pure cell populations.

Last but not least, the simultaneous genomic–epigenomic analysis also revealed significant associations between pSS-associated genetic risk factors and DMCs in SGEC, suggesting that pSS risk factors have the potential to affect DNA methylation-sensitive pathways in lymphocytes and in SGEC. Now, future studies are necessary in order to characterise

precisely the pathways, the cellular specificity, and to determine the functional consequences and the interactions between DMCs and genetic risk factors.

**Acknowledgements** The authors expressed gratitude for comments and editorial assistance to Dr. E. Ballestar (IDIBELL, Spain) and to Dr. W.H. Brooks (University of South Florida, FL). They are also grateful to Simone Forest and Geneviève Michel for their help in typing the paper. Part of the work has been supported by the Research Accounts of the University of Athens (Grant #9988). This work is supported by the Institut Français pour la Recherche Odontologique, the Region Bretagne and the Association Française du Gougerot Sjögren et des syndromes secs.

**Contributors** AC, ODK, CLD, CB, AB and YR analysed the data, drafted and revised the paper. EKK, AGT, J-OP and YR initiated the collaborative project and revised the project. ODK, EKK and AGT collected patient material and clinical data.

**Funding** Research Accounts of the University of Athens (9988).

**Competing interests** None declared.

**Patient consent** Obtained.

**Ethics approval** The institutional review board at the University of Athens.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

## REFERENCES

- 1 Renaudineau Y, Ballestar E. Epigenetics: DNA methylation signatures in Sjögren syndrome. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12:565–6.
- 2 Imgenberg-Kreuz J, Sandling JK, Almlof JC, et al. Genome-wide DNA methylation analysis in multiple tissues in primary Sjögren's syndrome reveals regulatory effects at interferon-induced genes. *Ann Rheum Dis* 2016;75:2029–36.
- 3 Miceli-Richard C, Wang-Renault SF, Boudaoud S, et al. Overlap between differentially methylated DNA regions in blood B lymphocytes and genetic at-risk loci in primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2016;75:933–40.
- 4 Altork N, Coit P, Hughes T, et al. Genome-wide DNA methylation patterns in naive CD4+ T cells from patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2014;66:731–9.
- 5 Cole MB, Quach H, Quach D, et al. Epigenetic signatures of salivary gland inflammation in Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2016;68:2936–44.
- 6 Thabet Y, Le Dantec C, Ghedira I, et al. Epigenetic dysregulation in salivary glands from patients with primary Sjögren's syndrome may be ascribed to infiltrating B cells. *J Autoimmun* 2013;41:175–81.
- 7 Konsta OD, Le Dantec C, Charras A, et al. Defective DNA methylation in salivary gland epithelial acini from patients with Sjögren's syndrome is associated with SSB gene expression, anti-SSB/LA detection, and lymphocyte infiltration. *J Autoimmun* 2016;68:30–8.
- 8 Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002;61:554–8.
- 9 Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Abu-Helu RF, et al. Establishment of a convenient system for the long-term culture and study of non-neoplastic human salivary gland epithelial cells. *Eur J Oral Sci* 2002;110:21–30.
- 10 Du P, Zhang X, Huang CC, et al. Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC Bioinformatics* 2010;11:587.
- 11 Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;4:44–57.
- 12 Rusinova I, Forster S, Yu S, et al. Interferome v2.0: an updated database of annotated interferon-regulated genes. *Nucleic Acids Res* 2013;41:D1040–6.
- 13 Farh KK, Marson A, Zhu J, et al. Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature* 2015;518:337–43.
- 14 Konsta OD, Le Dantec C, Charras A, et al. An in silico approach reveals associations between genetic and epigenetic factors within regulatory elements in B cells from primary Sjögren's syndrome patients. *Front Immunol* 2015;6:437.
- 15 Ng SF, Lin RC, Laybutt DR, et al. Chronic high-fat diet in fathers programs  $\beta$ -cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* 2010;467:963–6.
- 16 Shin YH, Jin M, Hwang SM, et al. Epigenetic modulation of the muscarinic type 3 receptor in salivary epithelial cells. *Lab Invest* 2015;95:237–45.
- 17 Yamamura Y, Aota K, Yamanoi T, et al. DNA demethylating agent decitabine increases AQP5 expression and restores salivary function. *J Dent Res* 2012;91:612–17.
- 18 Zhang CY, Mao L, Li L, et al. Promoter methylation as a common mechanism for inactivating E-cadherin in human salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Cancer* 2007;110:87–95.
- 19 Konsta O, Charras A, Le Dantec C, et al. Epigenetic modifications affect cytokeratin 19 expression in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol* 2016;53:e01.
- 20 Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:10604–9.

**Supplementary table 3:** Differentially methylated CpG (DMCs) using HM450k BeadChip (Illumina, CA) in long-term cultured minor salivary gland (MSG) epithelial cells (EC), whole MSG biopsies, peripheral blood mononuclear cells (PBMC), and lymphocyte subsets.

	<b>SGEC</b>	<b>MSG biopsies</b>	<b>PBMC</b>	<b>CD19<sup>+</sup> B cells</b>	<b>CD19<sup>+</sup> B cells</b>	<b>CD4<sup>+</sup> naïve T cells</b>
Patients (controls) references	8 (4)	15 (13) [2]	100 (400) [2]	24 (47) [2]	26 (22) [3]	11 (11) [4]
<b>DMCs (n)</b> <b>and selection criteria</b>	4,662 median >7%, p<0.01	45 P<1.3x10 <sup>-7</sup>	11,785 P<1.3x10 <sup>-7</sup>	453 P<1.3x10 <sup>-7</sup>	6,707 median >7%, p<0.01	753 mean >1.2, p≤0.01
Hypermethylated	3,673 (79%)	12 (26.7%)	5,614 (47.6%)	355 (78%)	3,754 (56%)	200 (26.6%)
hypomethylated	989 (21%)	33 (73.3%)	6,171 (52.4%)	98 (22%)	2,953 (44%)	553 (73.4%)
<b>Genes concerned (n)</b>	2,569	22	5,621	304	3,603	440
Hypermethylated	1,921 (74.8%)	6 (27.3%)	2,238 (39.8%)	244 (80.3%)	1,968 (54.6%)	109 (25.1%)
hypomethylated	544 (21.2%)	16 (72.7%)	2,654 (47.2%)	58 (19.1%)	1,379 (38.3%)	323 (74.4%)
With DMCs hyper/hypomethylated	104 (4%)	-	729 (13%)	2 (0.6%)	256 (7.1%)	8 (1.8%)
<b>Genome location</b>						
CpG islands (30.9%)	12.4 %	22.2%	9.4%	15%	14,6%	28.4%
CpG shores (23%)	27.6 %	11.1%	21.1%	30.9%	26.4%	24.8%
CpG shelf (9.7%)	11.2 %	4.4%	13.8%	15.2%	11.2%	10.1%
Open sea (36%)	48.8 %	62.2%	55.7%	38.9%	47,7%	36.7%

<b>Gene position</b>						
Promoter (41%)	29.5 %	35.6%	31.6%	30.9%	36.1%	34.5%
Gene body (31%)	36.7 %	17.8%	38.3%	45.7%	30.4%	33.9%
3'UTR (3%)	4.8 %	0%	5.5%	6.2%	3.9%	3.5%
IGR (25%)	29.1 %	46.7%	24.6%	17.2%	29.6%	28.2%
<b>Pathways (criteria)</b>	≥2 DMCs/gene	≥2 DMCs/gene	≥2 DMCs/gene	≥2 DMCs/gene	≥2 DMCs/gene	≥2 DMCs/gene
IFN-regulated genes	351/575 (61%)	-	1270/1863 (68.2%)	26/35 (74.3%)	511/898 (56.9%)	62/94 (66%)
Hypermethylated	Wnt pathway	-	TCR pathway T1 diabetes pathway	-	BCR pathway T1 diabetes pathway	-
hypomethylated	Ca <sup>2+</sup> pathway	-	Allograft rejection	-	Tight junction	T1 diabetes pathway
<b>Association with pSS gene risk-factors</b>	7/43 (16.3%) CXCR5, GTF2I, ICA1, NRLP3, SLC25A40, TNF, MBL2	0/43	17/43 (39.5%) BCL2, CCL2, CHRM3, EBF1, HLA-II, ICA1, IL10, IL12A, IRF5, LTA, NLRP3, PKN1, PTPN22, SLC25A40, STAT1, STAT4, TNFSF13B, TNFSF4, TNIP1	3/43 (7%) CXCR5, STAT1, TNFSF4	21/43 (48.8 %) BCL2, CD40LG, CXCR5, EBF1, BLK, GTF2I, HLA, ICA1, IKBKE, IL21, IRF5, LTA, MBL2, NFKB1, STAT1, TNF, TNFSF4	2/43 (4.7 %) LTA, STAT1

**Supplementary table 4 :** Differentially methylated CpG (DMCs) using HM450k BeadChip (Illumina, CA) in long-term cultured minor salivary gland (MSG) epithelial cells (EC) from 8 patients with primary Sjögren’s syndrome, sub-study analysis.

	<b>Active disease (ESSDAI <math>\geq</math>5)</b>	<b>lymphocytes infiltration (Chisolm <math>\geq</math>3)</b>	<b>Hydroxychloroquine intake</b>
<b>Patients</b>	4 versus 4	5 versus 3	4 versus 4
<b>DMCs (n) without controls</b>	1087	2145	1683
Hypermethylated	720 (66,2%)	1305 (60,8%)	658 (39,1%)
Hypomethylated	367 (33,8%)	840 (39,2%)	1025 (60,9%)
<b>Genes concerned (n) (<math>\geq</math>1 DMC)</b>	743	1469	1129
Hypermethylated	476 (64,1%)	896 (61%)	415 (36,8%)
Hypomethylated	255 (34,3%)	527 (35,9%)	670 (59,3%)
Hyper/Hypomethylated	12 (1,6%)	46 (3,1%)	44 (3,9%)
<b>Genes concerned (n) (<math>\geq</math>2 DMCs)</b>	47	95	100
Hypermethylated	34 (72,3%)	58 (61,1%)	19 (19%)
Hypomethylated	13 (27,7%)	36 (37,9%)	69 (69%)
Hyper/Hypomethylated	0 (0%)	1 (1%)	12 (12%)
<b>Pathways (<math>\geq</math>2 DMCs)</b>	0	0	hsa04070:Phosphatidylinositol signaling system (P=0,005)
<b>IFN-regulated genes</b>	249/743 (33,5%)	498/1469 (33,9%)	348/1129 (30,8%)
<b>gene list (<math>\geq</math>2 DMCs)</b>	PCDHGA1, PCDHGA3, PCDHGA2,	PCDHGA1, PCDHGA2, PCDHGA4,	GBP4, PTPRN2, HLA-DQB1, PCDHGA6,

	<p>PTPRN2, EBF3, PCDHGA5, PCDHGB2, PCDHGB1, PCDHGA4, PLOD2, PRR16, TAP1, TMEM132D, PRDM16, DDAH2, CCDC33, TNXB, SEPT9, ANKRD11, PPP1R2P1, ACAP3, AGER, ATP11A, CACNA2D4, CELSR1, CHFR, CNTNAP4, CRB2, ERFFI1, FAM38A, IGSF9B, LOC146336, MUC21, NARG2, NRXN2, NSUN7, PARD3, PCDHA6, RBMXL2, RCC2, SAMD11, SLC6A8, STAP2, STK24, TMEM51, TP63, ZNF556</p>	<p>PCDHGB1, PCDHGA3, PCDHGA5, PCDHGB2, PCDHGA6, PCDHGB3, PCDHGA7, MECOM, PCDHGB4, PCDHGA8, PTPRN2, SLC6A5, TLX1, ADCYAP1, BCOR, MIR548H3, DNAJC24, DCDC1, ELAVL4, FAM19A5, FCRL3, HMGA2, ICA1, NAA10, BCYRN1, NR3C1, OPCML, DOM3Z, STK19, TNXB, TTLL8, TUSC3, WFDC13, WFDC10B, ZIM2, PEG3, SEPT9, C1orf70, CELSR1, FAT1, FLJ22536, KIAA1522, KIAA1949, MSR1, NXN, TBCD, ABCA3, ABLIM2, AGRN, ATXN7L1, GNPTG, C4orf43, CAMTA1, CCDC42, DCAF12L2, DLGAP2, ESYT2, FAF1, GALNT9, GPR135, LOC100302652, GPR75, HCCA2, HDAC4, HRNBP3, IGBP1, IGSF11, ITFG1, JAK1, KIAA1715, SPON2, LOC100130872, LOC285830, LRIG1, LYRM4, MITF, MYT1L, NLGN1, PON1, PRDM16, PTPRU, PWWP2B, RBM33, RBMS1, RERE, SHANK2, SLC7A11, SVIL, TDRD3, UBE2E3, XIAP, MIMT1</p>	<p>PCDHGA1, PCDHGA5, PCDHGB1, PCDHGA2, PCDHGB2, PCDHGA3, PCDHGA4, PCDHA1, PCDHGB3, TM4SF19, TNXB, C12orf56, C6orf227, C6orf25, HLA-DQB2, HMGA2, GRID1, MIR346, MSH4, PCDHA3, PCDHA2, PCDHA6, PCDHB6, PCDHGA7, PCDHGA8, RIMBP2, SDK1, C15orf56, PAK6, CMIP, GNAS, NFIX, AFAP1, BEX1, DGKD, LOC100302652, GPR75, MUC5B, NCOR2, PCDHGA9, PCDHGB6, PCDHGB4, PCDHGB5, PRDM8, RARA, YJEFN3, ALOX12P2, C8orf73, CACNA2D4, CD6, CELSR1, DHRS3, DNAJC15, ECE1, EPHB1, FAM120C, GJB6, GMIP, GPC1, GRK6, HAND2, HDAC4, HTATSF1, KALRN, KIAA1804, KNDC1, LANCL3, LDLRAD3, MAGED2, MESTIT1, MOCS1, NBEAL2, NUMA1, OSBPL7, PAK4, PCDHGA11, PCDHGB7, PCDHGA10, PDXK, PIK3R1, PLCB3, PPP1R16A, PROCR, SBNO2, SLC38A10, SOX30, SYN1, SYNJ2, TAOK3, TNRC18, TPSD1, TSPAN6, UNKL, ZIC3, TUBGCP2, ZNF511</p>
--	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------



# Defective DNA methylation in salivary gland epithelial acini from patients with Sjögren's syndrome is associated with SSB gene expression, anti-SSB/LA detection, and lymphocyte infiltration.

Orsia D Konsta, Christelle Le Dantec, Amandine Charras, Divi Cornec, Efstathia K Kapsogeorgou, Athanasios G Tzioufas, Jacques-Olivier Pers, Yves Renaudineau

J Autoimmun. 2016 Apr;68:30-8.

### I. Introduction et objectifs

La pathophysiologie du Syndrome de Gougerot Sjögren reste encore très largement méconnue, son étiologie semble multifactorielle et de nombreux facteurs sont suspectés dont les facteurs épigénétiques. Ainsi au laboratoire, l'étude de Y. Thabet a permis de montrer précédemment un défaut de méthylation de l'ADN des cellules épithéliales de glandes salivaires (SGECs). Par son travail elle a pu relier ce défaut de méthylation à la présence anormale des lymphocytes B dans la glande salivaire, elle a permis également d'identifier une voie qui serait la voie PKC $\delta$ -MAPK/ERK-DNMT1 avec un défaut de DNMT1 chez les patients (Thabet et al., 2013).

L'objectif de ce travail initié par Orsia D Konsta était de confirmer l'importance de l'infiltration lymphocytaire sur le niveau de méthylation de l'ADN des SGECs issus non pas de patients Français comme dans la première étude, mais de patients grecs et d'établir un lien avec la pathogenèse.

## II. Démarche expérimentale

Pour cette étude une cohorte de patients grecs a été constituée avec 22 patients souffrant d'un SGS est correspondant au critères établis par l'AECG (Vitali et al., 2002) et 10 patients contrôle. A partir des prélèvements de glandes salivaires mineures, une culture cellulaire a été réalisée afin d'obtenir des SGECS selon le protocole établi par (Dimitriou et al., 2002). En parallèle des marquages par immunohistochimie ont été réalisés sur des sections de glandes salivaires. Enfin en parallèle le modèle *in vitro*, la lignée HSG, a été utilisé afin de tester les différentes hypothèses de travail.

## III. Résultats - Conclusions

Par ce travail, un défaut de méthylation dans les SGECS de patients associé avec une infiltration lymphocytaire a été confirmé sur une cohorte différente de l'étude princeps (Thabet et al., 2013). Par ailleurs une association a pu être faite entre ce défaut de méthylation de l'ADN et la positivité des patients à l'auto-antigène SSB.

Par la suite il a été montré dans un premier temps sur le modèle *in vitro* par l'utilisation d'un inhibiteur de DNMTs (le 5 Azacytidine), une régulation de l'expression de SSB/La par la méthylation de l'ADN. Cela a été par la suite retrouvé et confirmé chez les patients.

Cette étude permet ainsi de souligner l'importance de la méthylation de l'ADN dans la pathogenèse et notamment dans la surproduction de l'autoantigène SSB/La et ainsi la production auto anticorps anti-SSB/LA.



## Defective DNA methylation in salivary gland epithelial acini from patients with Sjögren's syndrome is associated with SSB gene expression, anti-SSB/LA detection, and lymphocyte infiltration



O.D. Konsta<sup>a,b</sup>, C. Le Dantec<sup>a</sup>, A. Charras<sup>a</sup>, D. Cornec<sup>a</sup>, E.K. Kapsogeorgou<sup>b</sup>,  
A.G. Tzioufas<sup>b</sup>, J.O. Pers<sup>a</sup>, Y. Renaudineau<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> INSERM ESPRI, ERI29/EA2216, SFR ScInBioS, LabEx IGO "Immunotherapy Graft Oncology", Innovative Medicines Initiative PRECISEADS, Réseau épigénétique et réseau canaux ioniques du Cancéropole Grand Ouest, European University of Brittany, Brest, France

<sup>b</sup> Department of Pathophysiology, School of Medicine, National University of Athens, Greece

<sup>c</sup> Laboratory of Immunology and Immunotherapy, CHU Morvan, Brest, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 September 2015

Received in revised form

10 December 2015

Accepted 10 December 2015

Available online 22 December 2015

#### Keywords:

Sjögren's syndrome

DNA demethylation

Anti-SSB antibodies

Lymphocytes

### ABSTRACT

The pathogenesis of primary Sjögren's syndrome (pSS) is complex, in part due to DNA methylation abnormalities. This study was undertaken to evaluate the importance of global DNA methylation (<sup>5mC</sup>) as determined in minor salivary glands (MSG) from well characterized pSS patients. Twenty-two pSS patients and ten controls were selected, and MSG were stained with anti-<sup>5mC</sup>, anti-<sup>5mC</sup>/anti-cytokeratin (KRT)19, or with anti-SSB/La antibodies (Ab). The DNA methylation status at the SSB gene promoter P1 and P1' was evaluated by methylation-sensitive restriction enzymes (MSRE) coupled with PCR. The effect of the DNA demethylating drug 5 azacytidine (5-Aza) was tested in the human salivary gland (HSG) cell line. In pSS, the reduction of global DNA methylation (<sup>5mC</sup>) was associated with lymphocyte infiltration, the emergence of <sup>5mC</sup><sup>low</sup> and KRT19<sup>high</sup> acini, and the detection of circulating anti-SSB/La Ab, but not with disease activity (ESSDAI). Next, treating HSG cells with 5-Aza was effective in inducing SSB expression. Finally in pSS patients positive for anti-SSB/La Ab, we further observed DNA demethylation at the SSB gene promoter P1 with consequent SSB overexpression at both the transcriptional and protein levels in salivary gland epithelial cells. In conclusion, our results highlight the importance of DNA methylation in the pathophysiology of pSS and to the emergence of anti-SSB/La Ab.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Primary Sjögren's syndrome (pSS) is a chronic systemic autoimmune epithelitis, which involves exocrine glands such as salivary and lacrimal glands as well as other parenchymal organs like kidney, lung, and liver [1]. It affects predominantly females during their fourth and fifth decades, with a female to male ratio of 9:1. Patients with pSS have a 20–40 fold increased risk of developing lymphoma [2]. Salivary gland analysis reveals acinar cell malfunctions, peri-epithelial mononuclear cell infiltration, and local detection of autoantibodies (Ab) directed against sicca syndrome autoantigens (SSA)/Ro and SSB/La. When detected in the serum,

anti-SSB/La Ab are more specific (94%) but less sensitive (40%) for pSS compared to anti-SSA/Ro (87% and 60–70%, respectively) that could be found in other autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE). Anti-SSA/SSB Ab positivity is associated with disease activity in pSS [3].

Over the last few years, epigenetic alterations including changes in DNA methylation, histone modifications, and microRNA expression have been described in pSS and suggest a key role for the pathogenesis of the disease [4,5]. When comparing pSS patients and controls, recent studies, including ours, have reported differential methylation profiles in interferon (IFN) regulated genes when testing CD4<sup>+</sup> T cells [6], DNA methylation deregulation patterns in B cells [7], and important global DNA methylation changes in minor salivary gland (MSG) epithelial cells [8]. Interestingly, epigenetic mechanisms are interconnected with pSS genetic risk factors [9] and reversible, thus opening new therapeutic perspectives in pSS and other autoimmune diseases [8,10,11].

\* Corresponding author. Laboratory of Immunology and Immunotherapy, Brest University Medical School Hospital, BP824, F29609, Brest, France.

E-mail address: [yves.renaudineau@univ-brest.fr](mailto:yves.renaudineau@univ-brest.fr) (Y. Renaudineau).

Given that the global DNA methylation status has shown an association with disease activity in autoimmune diseases [12], we were curious to further explore the contribution of MSG 5-methyl cytosine (<sup>5mC</sup>) staining in well characterized pSS patients. Such analysis further provides new insights into the pathogenesis of salivary gland epithelial cells (SGEC) and SSB gene regulation.

## 2. Patients and methods

### 2.1. Patients and minor salivary gland biopsies

MSG biopsies were obtained from 22 individuals who met the revised American-European SS classification criteria [13]. According to the MSG biopsy score established by Tarpley and colleagues [14], which evaluates MSG lymphocyte infiltration, pSS patients were categorized in three groups. The non-pSS control group patients (n = 10) did not meet the aforementioned SS criteria and had negative biopsies (<1 lymphocytic foci/4 mm<sup>2</sup> of glandular tissue). The cases were extensively characterized by our team at the University of Athens and the data are reported on Table 1. The institutional review board at the University of Athens approved this study, and participants signed an informed consent form.

### 2.2. Indirect immunofluorescence staining of tissue sections

Biopsy specimens were embedded in optimal cutting temperature (OCT)-compound snap frozen in isopentane, cut into thick tissue sections, and mounted into poly-L-lysine coated slides. For single staining of global DNA methylation (anti-<sup>5mC</sup>), serial sections were fixed in 4% cold paraformaldehyde for 10 min. After extensive washing, sections were treated with HCl 2 N for 30 min, washed and incubated with a mouse anti-<sup>5mC</sup> monoclonal (m)Ab (clone

3D3; Abcam, Cambridge, UK) diluted at 1:50 in PBS-BSA 2% Triton 0.3%. After 16 h at 4 °C, the slides were washed and incubated with a rhodamine red-X (RRX)-goat anti-mouse IgG Ab (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) diluted at 1:200 for 40 min. The images were acquired by a Zeiss Axioplan confocal laser scanning microscopy (Zeiss, Oberkochen, Germany). For the anti-SSB mAb single staining protocol and <sup>5mC</sup>/cytokeratine (KRT)19 double staining protocol, sections were fixed in 4% cold paraformaldehyde for 10 min. After extensive washing, the sections were incubated with 5% donkey serum (Sigma–Aldrich, St Louis, MO) to reduce background, and then incubated with the primary polyclonal rabbit anti-SSB Ab (Abcam) diluted at 1:20 in PBS for 16 h at 4 °C or with the monoclonal rabbit anti-KRT19 Ab (Clone EP1580Y, Abcam) diluted at 1:100 in PBS for 4 h at room temperature. After 3 washes, a fluorescein isothiocyanate (FITC)-goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch) diluted at 1:200 was applied to the sections. When the staining with the primary anti-KRT19 Ab and its secondary Ab finished, continued with the protocol of anti-<sup>5mC</sup> staining, as described above. The images were acquired by an Olympus confocal laser scanning microscopy (Hamburg, Germany). The intensity of <sup>5mC</sup> staining was quantified by Image J software (NIH image, Bethesda, MD) and results expressed as arbitrary units (AU).

### 2.3. Cell culture

In order to obtain non-neoplastic long term cultured SG epithelial cell lines (SGEC) from biopsies, SGEC were established by standard technique [15]. Cells were incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. The Human Salivary Gland (HSG) cell line established from irradiated neoplastic epithelial duct cells was suspended in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Lonza Inc., Allendale, NJ)

**Table 1**  
Characteristics of the individuals included in the study.

Features	SS patients				Sicca-controls (n = 10)
	Total (n = 22)	Mild (n = 9)	Intermediate (n = 7)	Severe (n = 6)	
<b>General</b>					
Age (years), median (range)	58 (24–84)	52 (24–71)	55 (33–76)	66 (54–84)	50.5 (38–65)
No of SS criteria fulfilled, median (range)	4 (3–5)	4 (3–4)	4 (3–5)	5 (3–5)	1 (0–2)
Mean duration (years) of sicca symptoms, median (range)	3 (0.5–10)	3(0.5–9)	3 (0.5–6)	3 (1–10)	NA
<b>Histological (MSG biopsy)</b>					
Tarpley score	2	1	2	3	0
Biopsy focus score (number of lymphocytic foci/4 mm <sup>2</sup> ), median (range)	2 (0.9–7.4)	1.3 (0.92–2.5)	1.9 (1.75–3.5)	3.9 (2.75–7.4)	0 (0–0.36)
<b>Clinical</b>					
ESSDAI score, median (range)	1 (0–8)	1 (0–5)	0 (0–4)	4 (0–8)	NA
Arthralgias/Arthritis (%)	31.8	55.6	14.3	16.7	20
SG enlargement (SGE) (%)	13.6	0	28.6	16.7	10
Raynaud's phenomenon (%)	22.7	22.2	28.6	16.7	30
Parenchymal organ involvement (%)	0	0	0	0	0
Lung involvement (%)	0	0	0	0	0
Renal involvement (%)	0	0	0	0	0
Liver involvement (%)	0	0	0	0	0
Indicative of vasculitic involvement (%)	13.6	11.1	0	33.3	0
Palpable purpura (%)	13.6	11.1	0	33.3	0
Vasculitis (%)	0	0	0	0	0
Peripheral neuropathy (%)	4.5	0	0	16.7	0
Lymphoma (%)	0	0	0	0	0
<b>Laboratory</b>					
Anti-Ro/SSA and/or La/SSB positive (%)	72.7	66.7	57.2	100	0
Anti-Ro/SSA positive (%)	72.7	66.7	57.2	100	0
Anti-La/SSB positive (%)	50	55.6	28.6	66.7	0
Rheumatoid Factor positive (%)	18.2	22.2	14.3	16.7	10
C3-levels (g/L), median (range)	1.01 (0.60–1.45)	1.13 (0.60–1.45)	1.02 (0.82–1.16)	0.78 (0.71–1.21)	1.07 (0.82–1.33)
C4-levels (g/L), median (range)	0.24 (0.04–0.54)	0.25 (0.13–0.54)	0.25 (0.19–0.36)	0.19 (0.04–0.29)	0.29 (0.22–0.39)
Cryoglobulinemia (%)	0	0	0	0	0
Hyper-gamma-globulinemia (%)	27.3	22.2	28.6	33.3	10
Leukopenia (%)	9	11.1	0	16.7	0

supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf sera (FCS; Eurobio, Les Ulis, France), 2 mM L-glutamine (Gibco BRL, France), non-essential amino acids 1% (Sigma–Aldrich) and antibiotics (Panpharma SA, Fougères, France). HSG cells were seeded at  $7 \times 10^5$  cells per well in a 6 well/plate (Nunc, Kamstrup, DK), and at 80% confluence the cells were treated (or not) with 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, and 50  $\mu$ M 5-Azacytidine (5-Aza) (Sigma–Aldrich), a selective inhibitor of DNMTs, for 48 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. After treatment, cell viability was estimated by flow cytometry using FITC-conjugated annexin-V (AV) and propidium iodide (IP) (Beckman Coulter), showing cell viability of over 97%.

#### 2.4. Western blot analysis

Whole cell extracts were isolated using lysis buffer containing 5 M NaCl, 1 M Tris–HCl, 100 mM NaF, 0.1 M EDTA and supplemented with protease inhibitors. The concentrations of the isolated proteins were determined using the micro BCA Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, ILL). The lysates were separated in 10% SDS-PAGE, transferred onto PVDF membrane, and probed with rabbit specific Abs from Abcam: anti-SSB, anti-TRIM21 (SSA/Ro52), anti-KRT19, and mouse anti- $\beta$ -actin (ACTB, clone 8226); and mouse anti-TROVE2 (SSA/Ro60, clone 1F2) from AbD-serotec in 1% skim milk in TBS/0.1% Tween-20, overnight at 4 °C, followed with the appropriate HRP-conjugated IgG antibodies (GE Health Care Limited, UK). Signals were visualized by Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore, Billerica, USA), a premixed, ready-to use reagent for chemiluminescent detection in Western blotting applications that employ horseradish peroxidase (HRP)-conjugated Ab. The results were expressed as ratios of optical density (OD) bands to those of ACTB bands used as loading controls.

#### 2.5. mRNA extraction and quantitative RT-PCR

Total mRNA was extracted using the RNable method (Eurobio, Les-Ullis, France), and cDNA synthesized by reverse transcription in 20  $\mu$ l volume with Superscript™II RNase reverse transcriptase (Invitrogen Life Sciences, Carlsbad, CA). Quantitative RT-PCR was carried out in 20  $\mu$ l mixtures containing 50 ng template cDNA, 1X Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), and 250 nM of each primer (Table 2). All assays included a negative control, which consisted of the reaction mixture with no template. The PCR conditions were the same for all genes. Comparison of cycle thresholds was completed with the  $2^{-\Delta Ct}$  method using GAPDH as an endogenous control.

**Table 2**  
Primer sets used in the study.

Gene	Primer name	Sequence (5' to 3')	Methods
SSB-P1	SSB-P1-F	ACAGTTTCACAGCAGGAGGA	MSRE-PCR1
	SSB-P1-R	CGGTCCCTGTGCTCTGAG	
SSB-P1'	SSB-P1'-F	CAGTTCGGCGTTGCTTAGAG	MSRE-PCR1'
	SSB-P1'-R	CATAGGAAGCACTTGAACGGG	
Global SSB	SSB Exon 3-F	GATGAAGGCTGGGTACCTTT	RT-qPCR
	SSB-Exon 4-R	TGCTCAATGCTTCCACAATTAC	
SSB-EXON1	SSB Exon 1-F	CGTTGCTGTGCTGTTTGIG	RT-qPCR
	SSB Exon 3-R	TCTGTTCTTTAGAAACTTGTCCC	
SSB-EXON1'	SSB Exon 1'-F	CAGATGTACACCGCTCAC	RT-qPCR
	SSB Exon 3-R	TCTGTTCTTTAGAAACTTGTCCC	
GAPDH	GAPDH-F	TGCCCTCAACGACCACCTT	RT-qPCR
	GAPDH-R	GGTCCAGGGTCTTACTCCT	

**Abbreviations:** F: forward; R: reverse.

#### 2.6. Methylation-sensitive restriction enzyme and PCR (MSRE-PCR)

Genomic DNA was purified using QIAmp DNA blood kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) and 200 ng DNA was distributed into five aliquots. The DNA concentration and the 260:280 nm absorbance ratios were calculated using a Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermoscientific Nanodrop Technologies, Wilmington, DE). The first aliquot was undigested and used as a positive control. The second to the fifth aliquots were digested with 20 U of either the methylation-insensitive restriction enzyme *MspI*, or with the methylation-sensitive restriction enzymes (MSRE) *HpaII*, *HgaI*, or *BstUI* for 16 h at 37 °C. Enzymes were from New England Biolabs (Beverly, MA), except *BstUI*, which was from Thermoscientific Technologies (Wilmington, DE). The MSRE-PCR assay is based on the inability of MSRE to digest a methylated CpG site. Next, PCR is conducted using primers positioned downstream and upstream of the *HpaI/MspI* CCGG site, the *HgaI* GACGC site and the *BstUI* CGCG site present within the SSB promoter P1, and the *HpaI/MspI* site present within SSB promoter P1'. The PCR protocol included an initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 36 cycles of denaturation at 94 °C for 30sec, annealing at 56 °C for 1 min, and primer extension at 72 °C for 1 min, PCR cycles were followed by final extension at 72 °C for 10 min. The PCR products were separated on an agarose gel and visualized with 0.5  $\mu$ g/ml Gel Red (Interchim, Montluçon France).

#### 2.7. Statistical analysis

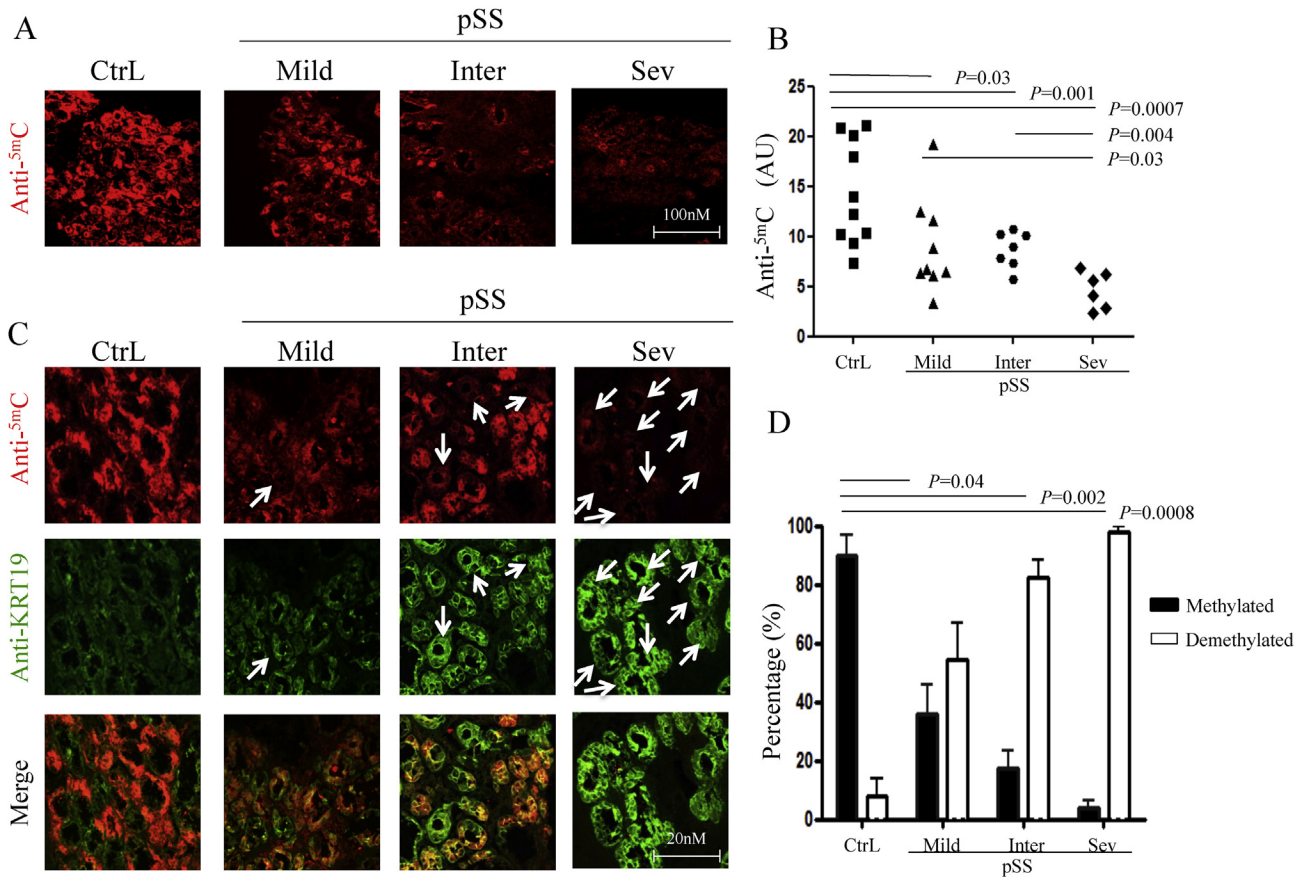
The results are expressed as arithmetic means with standard error of the mean (SEM). Data were compared using the non-parametric Mann–Whitney U-test for unpaired data, using the GraphPad-Prism 6.0 software. Significance was assessed as  $P < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. In patients with pSS, DNA demethylation is associated with lymphocyte infiltration

In order to confirm and extend our previous study that has established a defective global DNA methylation process in MSG epithelial cells from French pSS patients [8], a Greek replicative cohort was selected. Table 1 describes its characteristics. The replicative cohort was composed of 10 controls and 22 well-characterized pSS patients subdivided according to the Tarpley's scoring system as: patients with mild (Tarpley I,  $n = 9$ ), intermediate (Tarpley II,  $n = 7$ ), and severe lymphocyte infiltration (Tarpley III,  $n = 6$ ). Next, in order to test the global DNA methylation status, MSG biopsy sections were stained with an anti-<sup>5mC</sup> mAb (Fig. 1A and B), revealing an inverse association between <sup>5mC</sup> staining and lymphocyte infiltration in pSS patients (<sup>5mC</sup> (AU):  $4.6 \pm 0.7$  in severe pSS,  $8.7 \pm 0.7$  in intermediate pSS,  $9.0 \pm 1.6$  in mild pSS, and  $14.3 \pm 1.6$  in controls).

To rule out the possibility that the global DNA methylation reduction would reflect lymphocyte infiltration rather than epithelial MSG DNA demethylation, in pSS patients, we next selected KRT19 as an epithelial cell and acini marker in order to perform double indirect immunofluorescence staining for <sup>5mC</sup> and KRT19. Performed in MSG sections from 5 controls and 15 pSS patients, <sup>5mC</sup> and KRT19 double staining effectively revealed two distinct groups of acini, one methylated with low levels of KRT19 (<sup>5mC</sup><sup>high</sup> and KRT19<sup>low</sup>) and another one demethylated expressing high amounts of KRT19 (<sup>5mC</sup><sup>low</sup> and KRT19<sup>high</sup>; arrows in Fig. 1C). As both groups of acini co-exist in the same MSG, their proportion was calculated revealing that demethylated acini were predominantly found in pSS and that their proportion increased with lymphocyte



**Fig. 1.** Global DNA methylation analysis ( $^{5mC}$ ) in minor salivary glands (MSG) from patients with primary Sjögren's syndrome (pSS). A, Photomicrographs of MSG biopsy sections stained with an anti- $^{5mC}$  antibody (Ab) in a representative control (Ctrl) and pSS patients. The pSS patients were classified according to the grade of the inflammatory Tarpley's score in mild (Mild), intermediate (Inter), and severe (Sev). B, The intensities of  $^{5mC}$  staining from 10 Ctrl, who did not meet SS criteria, and 22 pSS patients subdivided according to the Tarpley's score were quantified by ImageJ software and results expressed as arbitrary units (AU). C, Photomicrographs showing global DNA methylation analysis ( $^{5mC}$ ) and epithelial cell staining (KRT19) in MSG from a representative control and pSS patients. Double staining revealed two distinct groups of acini. Pointed by arrows, the demethylated acini expressed high levels of KRT19 ( $^{5mC}{}^{low}$  and KRT19 $^{high}$ ), while regular acini were methylated and expressed low levels of KRT19 ( $^{5mC}{}^{low}$  and KRT19 $^{high}$ ). D, Repartition of the two groups of acini ( $^{5mC}{}^{low}$  KRT19 $^{high}$ : demethylated;  $^{5mC}{}^{high}$  KRT19 $^{low}$ : methylated) in Ctrl ( $n = 5$ ) and pSS patients ( $n = 15$ ) subdivided according to the Tarpley's score. Differences were considered positive and indicated when  $P < 0.05$ .

infiltration (Fig. 1D;  $0.04 < P < 0.0008$ ).

### 3.2. DNA methylation is reduced in pSS patients with anti-SSB Ab detection

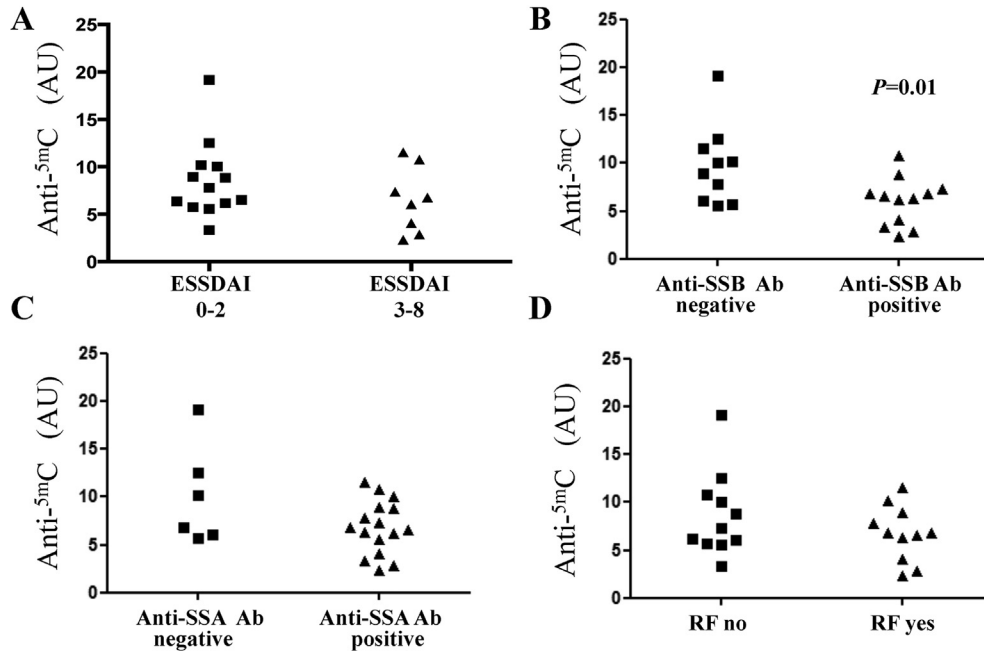
We further explored the association between  $^{5mC}$  staining in MSG with general (age, SS criteria, and disease duration), clinical (ESSDAI score, arthralgias/arthritis, SG enlargement, Raynaud's phenomenon, parenchymal organ involvement, and vasculitic involvement), and immunological parameters (anti-SSA/Ro Ab, anti-SSB/La Ab, rheumatoid factors, C3 and C4 complement fractions, cryoglobulinemia, hypergammaglobulinemia, and leukopenia) (Fig. 2 and data not shown). No difference was observed with the notable exception of anti-SSB/La Ab positive patients, which present a significant global  $^{5mC}$  staining reduction ( $^{5mC}$  (AU):  $6.0 \pm 0.7$  in pSS with anti-SSB/La Ab versus  $9.7 \pm 1.3$  in pSS without anti-SSB/La Ab,  $P = 0.01$ ). As a consequence, this result raises the question of epigenetic deregulation of the SSB gene in pSS patients.

### 3.3. The DNA methyl transferase inhibitor 5-azacytidine (5-aza) controls SSB expression

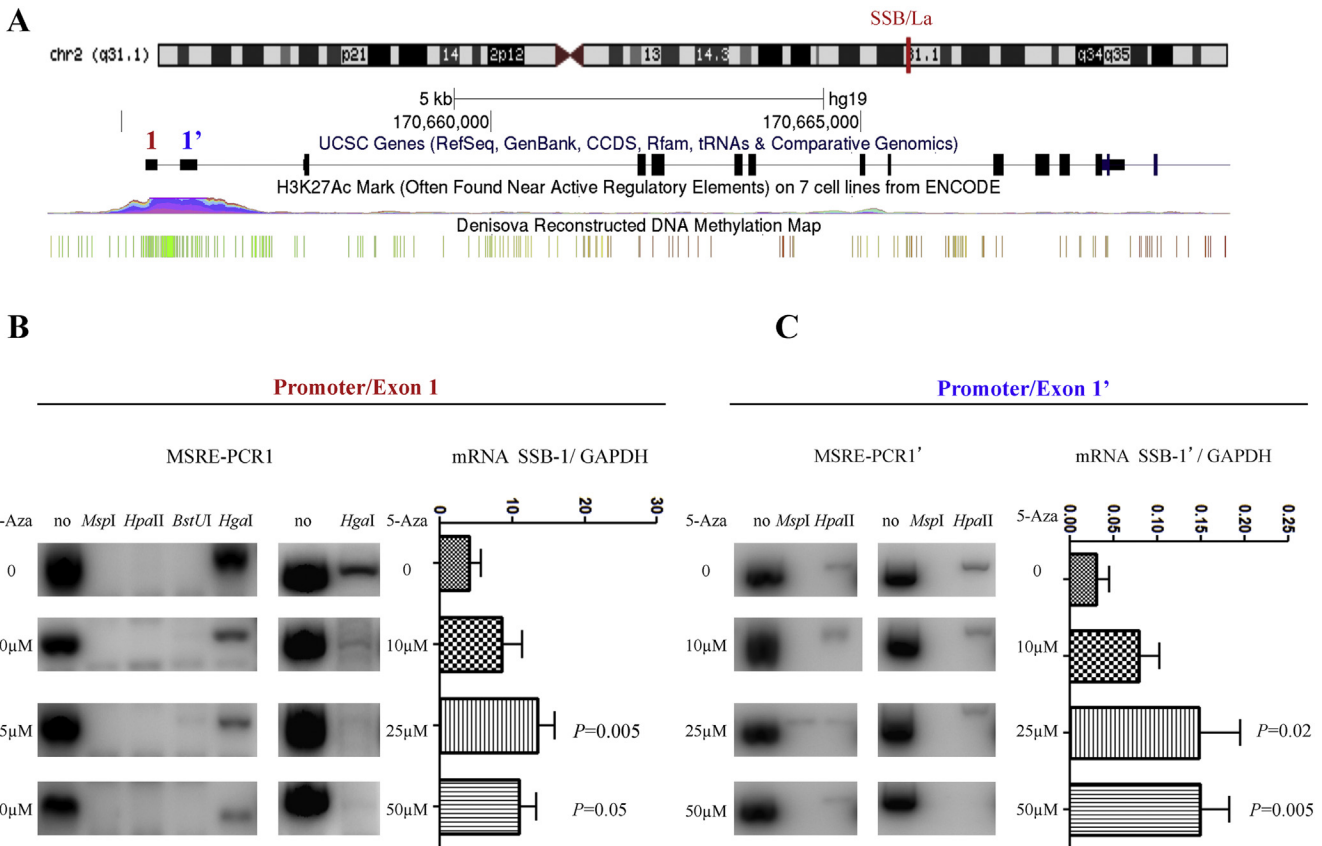
Located at chromosome 2 in the cytogenetic band 2q31.1, the SSB gene consists of 11 exons and possesses two alternative

promoters 1 (P1) and 1' (P1') that both encode the same protein [16,17]. Sequence analysis of CpG islands DNA methylation status and active H3K27Ac histone mark in 7 cell lines from the Encyclopedia of DNA elements (ENCODE) program, available from the UCSC genome browser data base (<https://genome.ucsc.edu>), are consistent with possible regulation by DNA methylation at P1 and/or P1' (Fig. 3A). Accordingly and to test whether SSB expression at promoter P1 and/or P1' was regulated by DNA methylation in epithelial cells, the HSG cell line was selected and cultured 48 h using the selective DNA methyl transferase inhibitor 5-Aza at 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M and 50  $\mu$ M.

First, the P1 SSB gene methylation status was assessed by MSRE-PCR using specific primers flanking CpG motifs containing *MspI*/*HpaII*, *Bstul* and *HgaI* restriction sites. As indicated in Fig. 3B (left), the MSRE-PCR1 was conducted in HSG cells using undigested DNA (lane 1, referred to as 100% methylation), DNA digested with the methylation-insensitive enzyme *MspI* (lane 2, 0% methylation), or DNA digested with the methylation-sensitive enzymes (lanes 3 to 5, *HpaII*, *Bstul*, and *HgaI*, respectively). In contrast to *HpaII* and *Bstul* activities that were unaffected by 5-Aza, treating HSG cells with increasing doses of 5-Aza was effective in demethylating the *HgaI* CpG site (position chr2:170,655,136; GRCh37/hg19 assembly). As a consequence of this modification and in order to determine the functional consequences of DNA methylation changes, we



**Fig. 2.** Comparison between minor salivary gland (MSG) <sup>5mC</sup> staining level and clinico-biological features reveals that patients with primary Sjögren’s syndrome (SS) and anti-SSB/La antibodies (Ab) have a reduced <sup>5mC</sup> Ab staining. A, European League Against rheumatism SS disease activity index (ESSDAI); B, Anti-SSB/La Ab; C, anti-SSA/Ro Ab; D, Rheumatoid factor (RF). Differences are indicated when  $P < 0.05$ .



**Fig. 3.** DNA methylation controls SSB expression in the human salivary gland (HSG) cell line treated with increasing amounts of 5-azacytidine (5-Aza). A, Sequence analysis of the SSB gene locus using the UCSC genome browser data base (<https://genome.ucsc.edu>). The analysis of the DNA methylation map and the H3K27Ac active histone marks suggests that SSB gene promoters (P)1 and (P)1’ are regulated by DNA methylation. B–C, Methylation sensitive restriction enzyme (MSRE)-PCR experiments using specific primers flanking CpG motifs containing *MspI/HpaII*, *BstUI* and *HpaI* restriction sites in SSB P1 (B) and *MspI/HpaII* in SSB P1’ (C), two out of three experiments are indicated. B’-C’, Real time quantitative PCR testing SSB-1 and SSB-1’ gene expression, eight experiments. Differences are indicated when  $P < 0.05$ .

performed gene expression analysis using a specific primer located in exon 1 and another one in exon 4. Inhibition of DNMTs by 5-Aza at 25  $\mu\text{M}$  increased the level of SSB-Exon 1 mRNA from  $4.1 \pm 1.6$  to  $13.6 \pm 2.3$  ( $P = 0.005$ ), indicating that DNA methylation controls SSB production (Fig. 3B, right).

Second, the methylation status at genomic SSB P1' and SSB-Exon 1' mRNA levels were also studied by MSRE-PCR and real-time PCR, respectively (Fig. 3C/C'). Inhibition of DNA methylation with 5-Aza reduced the P1' SSB gene DNA methylation status when using *Hpa*II in the MSRE-PCR1', and increased the level of SSB-Exon 1' mRNA from  $0.03 \pm 0.01$  to  $0.14 \pm 0.05$  (25  $\mu\text{M}$  5-Aza,  $P = 0.02$ ). As previously reported in non-lymphoid cells [18], the SSB-Exon 1' mRNA was found to be the minor isoform in SGEC.

#### 3.4. Protein analysis confirmed that expression of SSB is controlled by DNA methylation

The 5-Aza capacity to induce SSB expression at 46 kDa in MSG cells was confirmed at the protein level by Western blot and the higher effect was observed at 25  $\mu\text{M}$  (SSB/ACTB OD:  $0.6 \pm 0.3$  at 25  $\mu\text{M}$  5-Aza versus  $0.06 \pm 0.02$  without 5-Aza,  $P = 0.03$ ; Fig. 4A/B). As anti-SSB/La Ab detection is associated with anti-SSA Ab positivity in pSS patients, we further tested the effects of 5-Aza on the autoantigens TROVE2 (SSA/Ro 60 kDa) and TRIM21 (SSA/Ro 52 kDa) but failed to observe any variation (Fig. 4C/D).

#### 3.5. Anti-SSB/La antibody detection characterizes those patients with defective DNA methylation

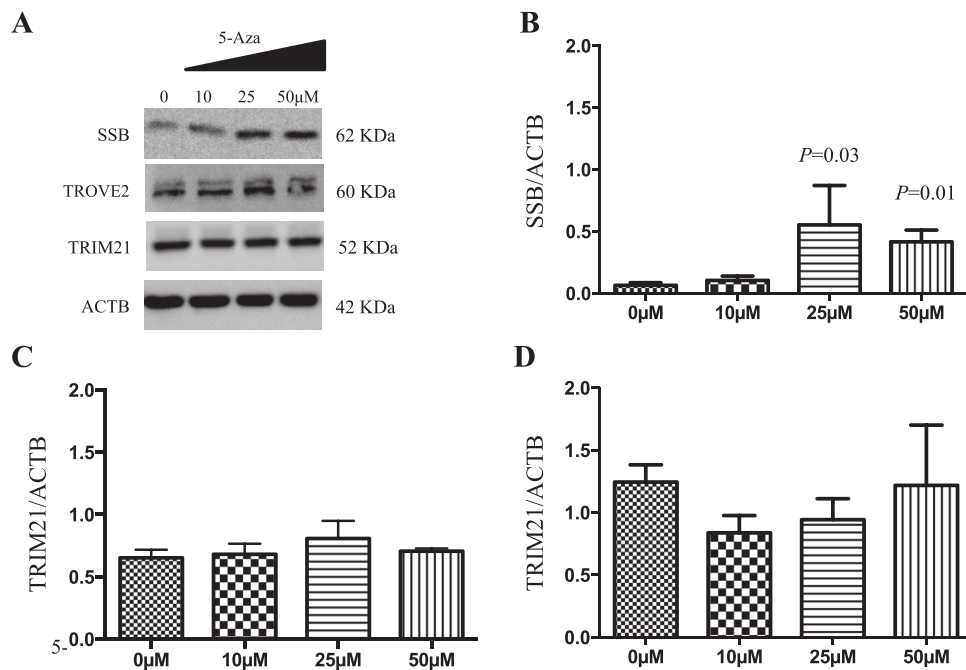
Finally, we used long term cultured SGEC from anti-SSB/La positive and anti-SSB/La negative pSS patients to test the genomic SSB P1 and SSB P1' methylation status (Fig. 5A). As suspected, the MSRE-PCR analysis revealed that genomic SSB P1 was hypomethylated in anti-SSB pSS patients in contrast to anti-SSB/La negative pSS patients. No conclusion could be made regarding

SSB P1'. Moreover, global SSB mRNA expression analysis by real time PCR revealed that two out of four patients positive for anti-SSB/La Ab were those with elevated SSB transcripts (Fig. 5B). Last but not least and to close the full circle, we further observed higher staining for anti-SSB/La Ab in those pSS patients with severe disease and positive when using an anti-SSB/La Ab in MSG in contrast to those patients negative for anti-SSB/La Ab (Fig. 5C).

## 4. Discussion

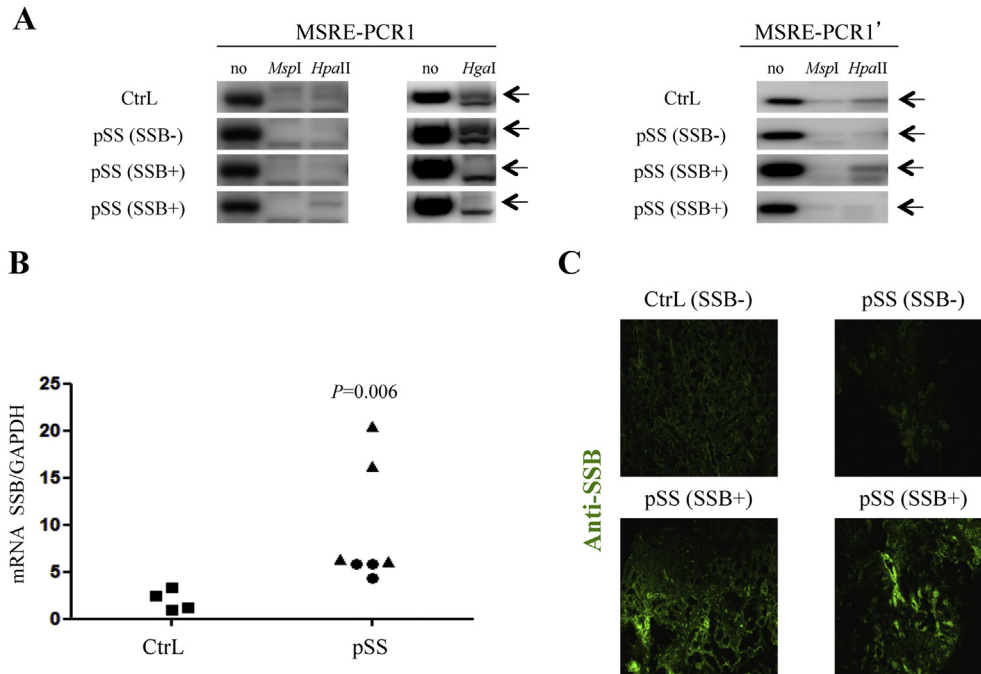
In this study, global DNA methylation was characterized in MSG tissue from 22 well-defined pSS patients with varying levels of lymphocyte infiltration in order to extend our previous observations showing an abnormal DNA methylation process resulting from a defective PKC-delta/ERK/DNMT1 pathway in SGEC from pSS patients, a process which is reversible in those patients treated with the anti-B cell mAb rituximab [8]. Results generated from the present study indicated that DNA demethylation in pSS is associated with lymphocyte infiltration, anti-SSB/La Ab detection, and the emergence of particular acini that are  $5^{\text{mC}}_{\text{low}}$  and  $\text{KRT19}^{\text{high}}$ . Interestingly such effect was independent from the ESSDAI disease activity score, thus suggesting that DNA demethylation is a primary event.

Several findings point toward a role for global DNA demethylation in autoimmune diseases as demonstrated in SLE [19,20], rheumatoid arthritis [21], and pSS in the present report. Comparable conclusions were made in SLE when using, instead of global analysis, DNA methylation profiles generated by arrays and next generation sequencing (NGS) [22,23], or when testing in SLE and pSS changes in repetitive sequences such as LINE-1, Alu and HERV elements [24,25]. An array-based DNA methylation analysis identified 553 CpG sites demethylated and 200 CpG sites methylated in  $\text{CD4}^+$  T cells in contrast to healthy controls [6]. Hypomethylation was reported in a number of suspected pSS promoting genes including lymphotoxin alpha (LTA), death-associated protein kinase



**Fig. 4.** Western blot results revealed that SSB expression was sensitive to the action of 5-azacytidine (5-Aza). The human salivary gland (HSG) cell line was treated 48 h with increasing amounts (0, 10, 25 and 50  $\mu\text{M}$ ) of the DNA demethylating drug 5-Aza. Western-blot analysis testing the effects of 5-Aza in HSG on SSB (A), TRIM21 (B), and TROVE2 (C) protein expression. Molecular weights are indicated. Results from 8 experiments, results are expressed as arbitrary units (AU) after normalization to  $\beta$ -actin (ACTB, AU = 1). Differences are indicated when  $P < 0.05$ .





**Fig. 5.** Patients with anti-SSB/La autoantibodies (Ab) have increased SSB expression that would result from a defective DNA methylation process within SSB gene regulatory sequences. **A**, MSRE-PCR1 and MSRE-PCR1' testing DNA methylation status in SSB gene promoter P1 and P1', respectively, in long term cultured salivary gland epithelial cells (SGEC) extracted from a control (CtrlL), a patient without anti-SSB/La Ab, and two patients with anti-SSB/La Ab. In case of *HgaI*, the specific band is indicated with an arrow. **B**, Real time PCR was carried out to compare SSB gene expression in SGEC from 7 pSS patients and 4 controls revealing that two patients with elevated SSB transcripts were those with anti-SSB/La Ab. **C**, Photomicrographs of MSG biopsy sections stained with an anti-SSB Ab revealed higher expression of SSB in those pSS patients with severe disease and positive for anti-SSB/La Ab ( $\Delta$ ) in contrast to those patients negative for anti-SSB/La Ab ( $\circ$ ) and CtrlL ( $\square$ ). Differences are indicated when  $P < 0.05$ .

1 (DAP-kinase), and TNFSF7/CD70 [26,27], while hypermethylation was reported in pSS preventing genes including aquaporin 5, FoxP3, and dystonin [28–30]. The mechanisms that control cell-type specific balance between methylation and demethylation activities need further exploration in pSS.

The origin and mechanisms leading to production of anti-SSB/La Ab in pSS, although incompletely understood, involve a multistep process including (i) SSB overexpression in SGEC [31], (ii) SSB protein post-translational phosphorylation leading to its association with the HLA molecules in SGEC [32], an association between anti-SSB/La Ab and HLA-DR3 has been reported [33], (iii) presentation to the immune system, (iv) B cell activation, proliferation, local production of the anti-SSB/La Ab, (v) SGEC apoptosis leading to cell surface and apoptotic blebs redistribution of the autoantigens SSA/Ro and SSB/La [34,35] and finally (vi), in response to this autoamplification loop, anti-SSB/La Ab detection together with anti-SSA/Ro Ab in peripheral blood of pSS patients [36]. In agreement with this general scenario, SSB mRNA and protein upregulation were observed in MSG from pSS patients who were positive for anti-SSB/La Ab. Further, we provide new arguments supporting the possibility that SSB expression is tightly regulated by DNA methylation, and this control is impaired in pSS. Such assertion was based on several observations including differential DNA methylation status at SSB gene promoters P1 and P1' between anti-SSB/La Ab positive and negative pSS patients and the action of the DNMT inhibitor 5-Aza in SSB gene promoters P1 and P1' and, as a result, SSB-Exon 1 and SSB-Exon 1' mRNA expression. DNA demethylation is also known to promote reactive oxygen species (ROS) accumulation and apoptosis [37], suggesting that DNA demethylation could also act in this way in pSS. The next step to further our understanding of the pathophysiology of pSS will be to determine the mechanisms that control DNA methylation and demethylation in SGEC and the interrelationship with lymphocyte infiltration as well

as with external factors (e.g. virus, drugs) and immune factors [38]. Moreover as anti-SSB/La Ab detection in pSS is classically associated with anti-SSA/Ro Ab, we further evaluated TROVE2 and TRIM21 auto-antigens and observed that SSA/Ro (Ro60 and Ro52) expression was unaffected by 5-Aza suggesting distinct mechanisms between SSB/La and SSA/Ro to control their expression and recognition as autoantigen in pSS. Several recent reports support a role for the type 1 interferon (IFN) pathway to promote TRIM21 expression, nuclear translocation and epitope presentation [39].

Two transcript variants, La (SSB-Exon 1) and La' (SSB-Exon 1'), resulting from alternate promoter usage are described with the particularly that both transcripts encode the same protein [40]. While La transcripts are ubiquitously expressed, La' transcripts present a tissue-specific expression profile, ratio 5(La):1(La') in MSG, which is compatible with our observation [16]. Moreover, a frameshift mutated La cDNA, within exon 7, and coding for mutated La cytoplasmic peptide results in a lupus-like disease when overexpressed in mice [41]. The protein encoded by the SSB/La gene is involved in diverse aspect of the RNA metabolism including RNA polymerase III protection from exonuclease digestion, processing of specific cellular and viral RNA precursors, acting as an RNA chaperone, influencing telomere homeostasis, and promoting microRNA expression [42–44]. Moreover, several post-translational modifications are described including multiple ubiquitination sites implicated in protein degradation, and a regulatory and auto-reactive phosphorylation site (S366) present in the C-terminal part of the protein [45].

Double staining of serial sections of MSG biopsies using <sup>5mC</sup> and KRT19 mAbs was effective in highlighting a novel group of acini, which is demethylated and expressed high amounts of KRT19. Within MSG, KRT19 expression varies according to the nature of acini as weak staining is reported in serous acinar cells in contrast to ductal, ductal-like structures and tumor cells that express high

amounts of KRT19 [46,47]. We can consider the proposal of Poduval et al. [48], supported by the animal model NOD/ShILtJ [49], which suggests that pSS is characterized by a loss of acinar cells and progenitor hyperplasia that have been blocked in their development because of the presence of B and/or T cell infiltrates. Accordingly, we can postulate that  $^{5m}C^{low}$  and KRT19 $^{high}$  acini correspond to the progenitors blocked in their development. Such hypothesis is further supported by the observation that MSG KRT19 expression is elevated at an early stage of epithelial differentiation and decreases with differentiation [50]. Moreover such hypothesis is also attractive to explain why depleting B cells from MSG with rituximab has important consequences on SGEC by restoring the global DNA methylation status [8], salivary gland tissue morphology [51], and salivary gland functions [52]. Several genes expressed by SGEC have been shown to be sensitive to the action of rituximab such as aquaporin-1/5 [53], BAFF [54], and genes belonging to the IFN pathway [55]. Extrapolating this data to the clinic, we could postulate that restoring DNA methylation in SGEC indirectly with anti-B cell therapies, or directly with epigenetic-targeted drugs would restore MSG functions opening new therapeutic perspectives in pSS.

In summary, we identified and confirmed DNA methylation changes in epithelial cells from pSS patients. These data indicate that abnormal DNA methylation is associated with lymphocyte infiltration, raising the possibility of using  $^{5m}C$  staining in MSG as a novel biomarker in pSS. Therefore, our findings emphasize the potential role of DNA methylation changes in the pathogenesis of pSS through SSB gene overexpression with consequences regarding microRNA expression [43], and anti-SSB/La Ab production [8]. Future studies are mandatory to characterize the cellular pathways involved in DNA methylation/demethylation, to establish the links with lymphocyte infiltration, and to better understand the cross-talk with pSS risk factors thus permitting better understanding of the different steps necessary to develop autoimmune diseases and subsequently lymphoma in genetically predisposed individuals exposed to particular environmental factors [56].

## Conflicts of interest

None.

## Acknowledgments

Authors are grateful to Simone Forest and Genevieve Michel for their secretarial assistance, and Dr. Wesley H. Brooks (University of South Florida, Tampa, USA) for editorial assistance. This work is supported by the Region Bretagne, the Association Française du Gougerot Sjögren et des Syndrome Secs (AFGS), and the Association Dentaire Française (ADF). The research leading to these results has received support from the Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking under grant agreement n° 115565, resources of which are composed of financial contributions from the European Union's Seventh Framework Program (FP7/2007–2013) and EFPIA companies' in-kind contribution.

## References

- [1] C.P. Mavragani, H.M. Moutsopoulos, Sjogren's syndrome, *Annu. Rev. Pathol.* 59 (2014) 273–285.
- [2] G.J. Tobon, Y. Renaudineau, S. Hillion, D. Cornec, V. Devauchelle-Pensec, P. Youinou, et al., The Fms-like tyrosine kinase 3 ligand, a mediator of B cell survival, is also a marker of lymphoma in primary Sjogren's syndrome, *Arthritis Rheum.* 62 (2010) 3447–3456.
- [3] L. Quartuccio, C. Baldini, E. Bartoloni, R. Priori, F. Carubbi, L. Corazza, et al., Anti-SSA/SSB-negative Sjogren's syndrome shows a lower prevalence of lymphoproliferative manifestations, and a lower risk of lymphoma evolution, *Autoimmun. Rev.* 14 (2015) 1019–1022.
- [4] O.D. Konsta, Y. Thabet, C. Le Dantec, W.H. Brooks, A.G. Tzioufas, J.O. Pers, et al., The contribution of epigenetics in Sjogren's Syndrome, *Front. Genet.* 5 (2014) 71.
- [5] C. Le Dantec, M.M. Varin, W.H. Brooks, J.O. Pers, P. Youinou, Y. Renaudineau, Epigenetics and Sjogren's syndrome, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13 (2012) 2046–2053.
- [6] N. Altorok, P. Coit, T. Hughes, K.A. Koelsch, D.U. Stone, A. Rasmussen, et al., Genome-wide DNA methylation patterns in naive CD4+ T cells from patients with primary Sjogren's syndrome, *Arthritis Rheumatol.* 66 (2014) 731–739.
- [7] C. Miceli-Richard, S.F. Wang-Renault, S. Boudaoud, F. Busato, C. Lallemand, K. Bethune, et al., Overlap between differentially methylated DNA regions in blood B lymphocytes and genetic at-risk loci in primary Sjogren's syndrome, *Ann. Rheum. Dis.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206998>.
- [8] Y. Thabet, C. Le Dantec, I. Ghedira, V. Devauchelle, D. Cornec, J.O. Pers, et al., Epigenetic dysregulation in salivary glands from patients with primary Sjogren's syndrome may be ascribed to infiltrating B cells, *J. Autoimmun.* 41 (2013) 175–181.
- [9] O.D. Konsta, C. Le Dantec, A. Charras, W.H. Brooks, M. Arleevskaia, A. Bordron, et al., An *in silico* approach reveals associations between genetic and epigenetic factors within regulatory elements in B cells from primary Sjogren's syndrome patients, *Front. Immunol.* (2015) <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00437>.
- [10] S. Garaud, C. Le Dantec, S. Jousse-Joulin, C. Hanrotel-Saliou, A. Saraux, R.A. Mageed, et al., IL-6 modulates CD5 expression in B cells from patients with lupus by regulating DNA methylation, *J. Immunol.* 182 (2009) 5623–5632.
- [11] T. Fali, C. Le Dantec, Y. Thabet, S. Jousse, C. Hanrotel, P. Youinou, et al., DNA methylation modulates HRES1/p28 expression in B cells from patients with Lupus, *Autoimmunity* 47 (2014) 265–271.
- [12] W.H. Brooks, C. Le Dantec, J.O. Pers, P. Youinou, Y. Renaudineau, Epigenetics and autoimmunity, *J. Autoimmun.* 34 (2010) J207–J219.
- [13] C. Vitali, S. Bombardieri, R. Jonsson, H.M. Moutsopoulos, E.L. Alexander, S.E. Carsons, et al., Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group, *Ann. Rheum. Dis.* 61 (2002) 554–558.
- [14] T.M. Tarpley Jr., L.G. Anderson, C.L. White, Minor salivary gland involvement in Sjogren's syndrome, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 37 (1974) 64–74.
- [15] I.D. Dimitriou, E.K. Kapsogeorgou, R.F. Abu-Helu, H.M. Moutsopoulos, M.N. Manoussakis, Establishment of a convenient system for the long-term culture and study of non-neoplastic human salivary gland epithelial cells, *Eur. J. Oral Sci.* 110 (2002) 21–30.
- [16] M. Bachmann, M. Hilker, D. Grolz, G. Tellmann, U. Hake, L. Kater, et al., Different La/SS-B mRNA isoforms are expressed in salivary gland tissue of patients with primary Sjogren's syndrome, *J. Autoimmun.* 9 (1996) 757–766.
- [17] D. Grolz, M. Bachmann, The nuclear autoantigen La/SS-associated antigen B: one gene, three functional mRNAs, *Biochem. J.* 323 (Pt 1) (1997) 151–158.
- [18] M.S. Carter, P. Sarnow, Distinct mRNAs that encode La autoantigen are differentially expressed and contain internal ribosome entry sites, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 28301–28307.
- [19] X. Zhu, J. Liang, F. Li, Y. Yang, L. Xiang, J. Xu, Analysis of associations between the patterns of global DNA hypomethylation and expression of DNA methyltransferase in patients with systemic lupus erythematosus, *Int. J. Dermatol.* 50 (2011) 697–704.
- [20] A.H. Sawalha, L. Wang, A. Nadig, E.C. Somers, W.J. McCune, C. Michigan Lupus, et al., Sex-specific differences in the relationship between genetic susceptibility, T cell DNA demethylation and lupus flare severity, *J. Autoimmun.* 38 (2012) J216–J222.
- [21] A. Corvetta, R. Della Bitta, M.M. Luchetti, G. Pomponio, 5-Methylcytosine content of DNA in blood, synovial mononuclear cells and synovial tissue from patients affected by autoimmune rheumatic diseases, *J. Chromatogr.* 566 (1991) 481–491.
- [22] S.Y. Lin, S.C. Hsieh, Y.C. Lin, C.N. Lee, M.H. Tsai, L.C. Lai, et al., A whole genome methylation analysis of systemic lupus erythematosus: hypomethylation of the IL10 and IL1R2 promoters is associated with disease activity, *Genes Immunol.* 13 (2012) 214–220.
- [23] R.W. Chan, P. Jiang, X. Peng, L.S. Tam, G.J. Liao, E.K. Li, et al., Plasma DNA aberrations in systemic lupus erythematosus revealed by genomic and methylomic sequencing, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) E5302–E5311.
- [24] C. Le Dantec, S. Vallet, W.H. Brooks, Y. Renaudineau, Human endogenous retrovirus group E and its involvement in diseases, *Viruses* 7 (2015) 1238–1257.
- [25] P. Sukapan, P. Promnarate, Y. Avihingsanon, A. Mutirangura, N. Hirankarn, Types of DNA methylation status of the interspersed repetitive sequences for LINE-1, Alu, HERV-E and HERV-K in the neutrophils from systemic lupus erythematosus patients and healthy controls, *J. Hum. Genet.* 59 (2014) 178–188.
- [26] A. Toso, P. Aluffi, D. Capello, A. Conconi, G. Gaidano, F. Pia, Clinical and molecular features of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphomas of salivary glands, *Head. Neck* 31 (2009) 1181–1187.
- [27] H. Yin, M. Zhao, X. Wu, F. Gao, Y. Luo, L. Ma, et al., Hypomethylation and overexpression of CD70 (TNFSF7) in CD4+ T cells of patients with primary Sjogren's syndrome, *J. Dermatol. Sci.* 59 (2010) 198–203.
- [28] K. Motegi, M. Azuma, T. Tamatani, Y. Ashida, M. Sato, Expression of aquaporin-

- 5 in and fluid secretion from immortalized human salivary gland ductal cells by treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine: a possibility for improvement of xerostomia in patients with Sjogren's syndrome, *Lab. Invest* 85 (2005) 342–353.
- [29] X. Yu, G. Liang, H. Yin, O. Ngalamika, F. Li, M. Zhao, et al., DNA hypermethylation leads to lower FOXP3 expression in CD4+ T cells of patients with primary Sjogren's syndrome, *Clin. Immunol.* 148 (2013) 254–257.
- [30] S. Gonzalez, S. Aguilera, C. Alliende, U. Urzua, A.F. Quest, L. Herrera, et al., Alterations in type I hemidesmosome components suggestive of epigenetic control in the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome, *Arthritis Rheum.* 63 (2011) 1106–1115.
- [31] A.G. Tzioufas, I. Hantoumi, M. Polihronis, G. Xanthou, H.M. Moutsopoulos, Autoantibodies to La/SSB in patients with primary Sjogren's syndrome (pSS) are associated with upregulation of La/SSB mRNA in minor salivary gland biopsies (MSGs), *J. Autoimmun.* 13 (1999) 429–434.
- [32] E.A. Stea, J.G. Routsias, M. Samiotaki, G. Panayotou, E. Papalambros, H.M. Moutsopoulos, et al., Analysis of parotid glands of primary Sjogren's syndrome patients using proteomic technology reveals altered autoantigen composition and novel antigenic targets, *Clin. Exp. Immunol.* 147 (2007) 81–89.
- [33] J.E. Gottenberg, M. Busson, P. Loiseau, J. Cohen-Solal, V. Lepage, D. Charron, et al., In primary Sjogren's syndrome, HLA class II is associated exclusively with autoantibody production and spreading of the autoimmune response, *Arthritis Rheum.* 48 (2003) 2240–2245.
- [34] S. Katsiogiannis, R. Tenta, F.N. Skopouli, Endoplasmic reticulum stress causes autophagy and apoptosis leading to cellular redistribution of the autoantigens Ro/Sjogren's syndrome-related antigen A (SSA) and La/SSB in salivary gland epithelial cells, *Clin. Exp. Immunol.* 181 (2015) 244–252.
- [35] A. Okuma, K. Hoshino, T. Ohba, S. Fukushi, S. Aiba, S. Akira, et al., Enhanced apoptosis by disruption of the STAT3-IkappaB-zeta signaling pathway in epithelial cells induces Sjogren's syndrome-like autoimmune disease, *Immunity* 38 (2013) 450–460.
- [36] A.C. Horsfall, L.M. Rose, R.N. Maini, Autoantibody synthesis in salivary glands of Sjogren's syndrome patients, *J. Autoimmun.* 2 (1989) 559–568.
- [37] T.E. Fandy, A. Jiemjit, M. Thakar, P. Rhoden, L. Suarez, S.D. Gore, Decitabine induces delayed reactive oxygen species (ROS) accumulation in leukemia cells and induces the expression of ROS generating enzymes, *Clin. Cancer Res.* 20 (2014) 1249–1258.
- [38] C. Le Dantec, P. Gazeau, S. Mukherjee, W.H. Brooks, Y. Renaudineau, How the Environment Influences Epigenetics, DNA Methylation, and Autoimmune Diseases 2015, February 2015, p. 520.
- [39] N.C. Kyriakidis, E.K. Kapsogeorgou, V.C. Gourzi, O.D. Konsta, G.E. Baltatzis, A.G. Tzioufas, Toll-like receptor 3 stimulation promotes Ro52/TRIM21 synthesis and nuclear redistribution in salivary gland epithelial cells, partially via type I interferon pathway, *Clin. Exp. Immunol.* 178 (2014) 548–560.
- [40] J.G. Routsias, A.G. Tzioufas, Autoimmune response and target autoantigens in Sjogren's syndrome, *Eur. J. Clin. Invest* 40 (2010) 1026–1036.
- [41] M.P. Bachmann, H. Bartsch, J.K. Gross, S.M. Maier, T.F. Gross, J.L. Workman, et al., Autoimmunity as a result of escape from RNA surveillance, *J. Immunol.* 177 (2006) 1698–1707.
- [42] S.L. Wolin, T. Cedervall, The La protein, *Annu. Rev. Biochem.* 71 (2002) 375–403.
- [43] C. Liang, K. Xiong, K.E. Szulwach, Y. Zhang, Z. Wang, J. Peng, et al., Sjogren syndrome antigen B (SSB)/La promotes global microRNA expression by binding microRNA precursors through stem-loop recognition, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 723–736.
- [44] L.P. Ford, J.W. Shay, W.E. Wright, The La antigen associates with the human telomerase ribonucleoprotein and influences telomere length in vivo, *RNA* 7 (2001) 1068–1075.
- [45] A.G. Terzoglou, J.G. Routsias, S. Avrameas, H.M. Moutsopoulos, A.G. Tzioufas, 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.* 144 (2006) 432–439.
- [46] S. Tolentino Ede, C.S. Teixeira, L.R. Azevedo-Alanis, H.M. Honorio, J.H. Damante, Phenotype and cell proliferation activity of duct-like structures in human sublingual glands: a histological and immunohistochemical study, *J. Appl. Oral Sci.* 23 (2015) 255–264.
- [47] H. Gustafsson, I. Virtanen, L.E. Thornell, Expression of cytokeratins and vimentin in salivary gland carcinomas as revealed with monoclonal antibodies, *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* 412 (1988) 515–524.
- [48] P. Poduval, T. Sillat, A. Beklen, V.P. Kouri, I. Virtanen, Y.T. Kontinen, Type IV collagen alpha-chain composition in synovial lining from trauma patients and patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.* 56 (2007) 3959–3967.
- [49] E.M. Gervais, K.A. Desantis, N. Pagendarm, D.A. Nelson, T. Enger, K. Skarstein, et al., Changes in the Submandibular Salivary Gland Epithelial Cell Subpopulations During Progression of Sjogren's Syndrome-Like Disease in the NOD/ShiLtJ Mouse Model, *Anat. Rec. Hob.* 298 (2015) 1622–1634.
- [50] M.D. Martins, V. Cavalcanti de Araujo, R. Raitz, N. Soares de Araujo, Expression of cytoskeletal proteins in developing human minor salivary glands, *Eur. J. Oral Sci.* 110 (2002) 316–321.
- [51] J. Pijpe, G.W. van Imhoff, F.K. Spijkervet, J.L. Roodenburg, G.J. Wolbink, K. Mansour, et al., Rituximab treatment in patients with primary Sjogren's syndrome: an open-label phase II study, *Arthritis Rheum.* 52 (2005) 2740–2750.
- [52] S. Jousse-Joulin, V. Devauchelle-Pensec, D. Cornec, T. Marhadour, L. Bressollette, S. Gestin, et al., Brief Report: ultrasonographic Assessment of Salivary Gland Response to Rituximab in Primary Sjogren's Syndrome, *Arthritis Rheumatol.* 67 (2015) 1623–1628.
- [53] T. Ring, M. Kallenbach, J. Praetorius, S. Nielsen, B. Melgaard, Successful treatment of a patient with primary Sjogren's syndrome with Rituximab, *Clin. Rheumatol.* 25 (2006) 891–894.
- [54] J.O. Pers, F. d'Arbonneau, V. Devauchelle-Pensec, A. Saraux, Y.L. Pennec, P. Youinou, Is periodontal disease mediated by salivary BAFF in Sjogren's syndrome? *Arthritis Rheum.* 52 (2005) 2411–2414.
- [55] V. Devauchelle-Pensec, N. Cagnard, J.O. Pers, P. Youinou, A. Saraux, G. Chiochia, Gene expression profile in the salivary glands of primary Sjogren's syndrome patients before and after treatment with rituximab, *Arthritis Rheum.* 62 (2010) 2262–2271.
- [56] C. Le Dantec, W.H. Brooks, Epigenomic revolution in autoimmune diseases, *World J. Immunol.* 5 (2015) 62–67.

# Epigenetic modifications in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome affect cytokeratin 19 expression.

Orsia D Konsta, Amandine Charras, Christelle Le Dantec, Efstathia K Kapsogeorgou, Anne Bordron, Athanasios G Tzioufas, Jacques-Olivier Pers, Yves Renaudineau

Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol. 2016 Jun 28;53(1):e01.

### I. Introduction et objectifs

La méthylation de l'ADN et son altération sont très fortement suspectées dans l'étiologie du Syndrome de Gougerot Sjögren, et cela notamment au niveau des cellules épithéliales de la glande salivaire. Un défaut de méthylation a été mise en évidence (Thabet et al., 2013) et le lien avec la pathogenèse a pu être fait avec l'infiltration lymphocytaire et la production d'un auto-anticorps SSB (Konsta et al., 2016). Dans cette étude une surexpression de la cytokératine 19 a été observée chez les patients présentant un défaut de méthylation majeur. Ces éléments semblent suggérer un contrôle de l'expression de la cytokératine 19 par la méthylation de l'ADN. L'objectif de ce travail initié par Orsia D Konsta était de répondre plus précisément à cette question.

### II. Démarche expérimentale

Pour cette étude, une cohorte de patients grecs a été constituée avec 13 patients souffrant d'un SGS est correspondant au critères établis par l'AECG (Vitali et al., 2002) et 4 patients contrôle souffrant d'un syndrome sec. A partir des prélèvements de glandes salivaires mineures, une culture cellulaire a été réalisée afin d'obtenir des SGECs (Dimitriou et al., 2002). En parallèle des marquages par immunohistochimie ont été réalisés sur des sections de glandes salivaires. Enfin en parallèle le modèle *in vitro*, utilisant la lignée HSG, a été utilisé afin de tester les différentes hypothèses de travail.

### III. Résultats - Conclusions

Par ce travail, dans un premier temps il a été montré une association entre le défaut de méthylation de l'ADN constaté chez les patients et la surexpression de la cytokératine 19 (KRT19) observée par immunohistochimie sur biopsies de glandes salivaires.

Par la suite il a été montré dans un premier temps sur le modèle *in vitro* (lignée HSG) par l'utilisation d'un inhibiteur de DNMTs (le 5 Azacytidine), une régulation de l'expression de KRT19 par la méthylation de l'ADN (transcrits et protéine).

Enfin ces résultats ont été appuyés par les données de méthylome issu de la puce 450k réalisée sur de l'ADN extrait de SGECs, qui confirment un défaut de méthylation au locus KRT19 chez les patients.

## ORIGINAL RESEARCH ARTICLES

### EPIGENETIC MODIFICATIONS AFFECT CYTOKERATIN 19 EXPRESSION IN SALIVARY GLANDS FROM PATIENTS WITH SJÖGREN'S SYNDROME

O.D. Konsta<sup>1,2\*</sup>, A. Charras<sup>1\*</sup>, C. Le Dantec<sup>1</sup>, E. Kapsogeorgou<sup>2</sup>, A. Bordron<sup>1</sup>, W.H. Brooks<sup>3</sup>, A.G. Tzioufas<sup>2</sup>, J.O. Pers<sup>1</sup>, Y. Renaudineau<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Research Unit EA2216 Immunology, Pathology and Immunotherapy, SFR ScinBios and Labex Igo "Immunotherapy Graft, Oncology", Réseau épigénétique du canceropole Grand Ouest, European University of Brittany, Brest, France <sup>2</sup>Department of Pathophysiology, School of Medicine, National University of Athens, 75 Mikras Asias street, Athens 11527, Greece <sup>3</sup>Department of Chemistry, University of South Florida, Tampa, Florida, USA <sup>4</sup>Laboratory of Immunology and Immunotherapy, Brest University Medical School, CHU Morvan, Brest, France

\*Have contributed equally to this work

#### Abstract

Primary Sjögren's syndrome (pSS) is a chronic autoimmune epithelitis. Several lines of experiments indicate that multiple factors contribute to salivary gland epithelial cell (SGEC) dysfunctions in SS including a combination of environmental factors, lymphocytic infiltrations, genetic predispositions as well as epigenetic defects. The epigenetic origin is reinforced by the observation that global DNA methylation (<sup>5mC</sup>) is altered in minor salivary glands from pSS patients and that such defect is associated with cytokeratin 19 (KRT19) overexpression. An epigenetic deregulation of the KRT19 gene was further tested by treating the human salivary gland (HSG) cell line with the DNA demethylating agent 5-azacytidine, and with the histone acetylase inhibitor trichostatin A. Blocking DNA methylation, but not histone acetylation, with 5-azacytidine was associated with KRT19 overexpression at both the transcriptional and protein level. Next, analysis of the CpG genome-wide methylome array in the KTR19 locus from long-term cultured SGEC obtained from 8 pSS patients revealed more reduced DNA methylation levels in those patients with defective global DNA methylation. Altogether, our data suggest that alteration of DNA methylation and, in turn, altered KRT19 expression in SGEC may contribute to pathophysiology thus opening new perspectives in pSS.

#### Key words

Sjögren's syndrome, DNA methylation, cytokeratin 19, epithelial cells

#### Introduction

Primary Sjögren's syndrome (pSS) is a chronic and systemic autoimmune epithelitis, affecting exocrine glands, such as salivary and lacrimal glands, plus parenchymal organs (1). As a consequence, the clinical manifestations include dry mouth (xerostomia), dry eyes (keratoconjunctivitis sicca) and systemic features. Patients with pSS have a 20-40 fold increased risk of developing lymphoma (2, 3). Furthermore, SS is characterized by abnormal salivary glands, altered blood B cell distribution, and the presence of circulating autoantibodies (Ab) against the sicca syndrome (SS)A/Ro and SSB/La ribonucleoprotein particles (4-8).

The mechanisms leading to the systemic autoimmune epithelitis are multifactorial and include a combination of genetic predispositions, environmental factors, and epigenetic factors (9-11). Epigenetics can be defined as inheritable modifications in gene expression that do not entail changes in the DNA sequence (12). Epigenetics can also explain how cells can differentiate into alternative cell types and how a phenotype can be passed from one cell to its daughter cells. Epigenetic

mechanisms are important controlling the pattern of gene expression during development, the cell cycle, and in response to biological or environmental changes. Epigenetic dysregulations have been linked with a long list of autoimmune diseases (AID) including SS (13, 14). A close association has been further established between epigenetic and genetic risk factors in AID in specific cellular subsets as observed in SS (15, 16).

Recently, we have observed that global DNA methylation was reduced in minor labial salivary glands (MSG) from pSS patients when comparing 5 methylcytosine (<sup>5m</sup>C) staining to controls (17). The defective DNA methylation process was related to an abnormal PKC-delta/Erk/DNMT1 pathway, which was conserved after long-term growth of a primary culture of salivary gland epithelial cells (SGEC) (18). The contribution of DNA demethylation in SSB overexpression and in turn to the production of anti-SSB Ab was further tested and confirmed by comparing MSG from anti-SSB positive to anti-SSB negative pSS patients, on the one hand, and by treating with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza) the human salivary gland (HSG) cell line to overexpress SSB, on the other hand (19). As part of this latter study, it was observed that cytokeratin (KRT)19 was overexpressed in those patients with major DNA methylation defects, suggesting control by DNA methylation. Further investigation of this control is the aim of the present work.

## Material and methods

### Patients and controls

MSG biopsies were obtained from 13 individuals fulfilling the criteria for pSS according to the revised American-European SS classification criteria (7, 20) including a biopsy focus score  $\geq 1$  (lymphocytic foci/4 mm<sup>2</sup> of glandular tissue). SG specimens were collected from 4 patients who did not meet the criteria for SS, although they had described sicca symptoms and, as such, had undergone an SG biopsy. The institutional review boards at the University of Athens approved this study, and participants signed an informed consent statement.

### Immunofluorescence staining of tissue sections

Biopsy specimens were embedded in optimal cutting temperature (OCT)-compound, snap frozen in isopentane, cut into thick tissue sections, and mounted into poly-L-lysine coated

slides. For global DNA methylation (anti-<sup>5m</sup>C), serial sections were fixed in 4% cold paraformaldehyde for 10 min. After extensive washing, sections were treated with HCl 2N for 30 min, washed and incubated with a mouse anti-<sup>5m</sup>C monoclonal (m)Ab (clone 33D3; Abcam, Cambridge, UK) diluted at 1:50 in PBS-BSA 2% Triton 0.3%. After 16h at 4°C, the slides were washed and incubated with a rhodamine red-X (RRX)-goat anti-mouse IgG Ab (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) diluted at 1:200 for 40 min. The images were acquired by a Zeiss Axioplan confocal laser scanning microscopy (Zeiss, Oberkochen, Germany). For the anti-KRT19 protocol, sections were fixed in 4% cold paraformaldehyde for 10 min. After extensive washing, the sections were incubated with 5% donkey serum (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) to reduce background, and then incubated with the monoclonal rabbit anti-KRT19 Ab (Clone EP1580Y, Abcam) diluted at 1:100 in PBS for 4h at room temperature. After 3 washes, a fluorescein isothiocyanate (FITC)-goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch) diluted at 1:200 was applied to the sections. The images were acquired by an Olympus confocal laser scanning microscopy (Hamburg, Germany). The intensity of <sup>5m</sup>C and KRT19 staining were quantified by Image J software (NIH image, Bethesda, MD) and results expressed as arbitrary units (AU).

### Epithelial cell cultures

In order to obtain non-neoplastic long-term cultured SG epithelial cell lines (SGEC) from biopsies, SGEC were established by standard technique (21). Cells were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. The Human Salivary Gland (HSG) cell line established from irradiated neoplastic epithelial duct cells was suspended in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Lonza Inc., Allendale, NJ) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf sera (FCS; Eurobio, Les Ulis, France), 2mM L-glutamine (Gibco BRL, France), non-essential amino acids 1% (Sigma-Aldrich) and antibiotics (Panpharma SA, Fougères, France). HSG cells were seeded at 7×10<sup>5</sup> cells per well in a 6 well/plate (Nunc, Kamstrup, DK), and at 80% confluence the cells were treated (or not) with 10 μM, 25 μM, and 50 μM 5-Aza (Sigma-Aldrich), a selective inhibitor of DNMTs, or with 5 μM, 10 μM, and 25 μM of trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, for 48h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. After treatment, cellular via-

bility was estimated by flow cytometry using FITC-conjugated annexin-V (AV) and propidium iodide (IP) (Beckman Coulter), and was over 97%.

### **RNA isolation and real time quantitative PCR**

Total mRNA was extracted using the RNA-ble method (Eurobio, Les-Ullis, France), and cDNA synthesized by reverse transcription in 20µl volume with Superscript™II RNase reverse transcriptase (Invitrogen Life Sciences, Carlsbad, CA). Quantitative RT-PCR was carried out in 20µl mixtures containing 50ng template cDNA, 1X Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), and 250nM of each primer. The following primers were used for real time quantitative PCR: KRT19 forward (Fw) 5'-CC-CGCGACTACAGCCACTA-3' and reverse (R) 5'-GCTCATGCGCAGAG-CCT-3'; and GAPDH Fw 5'-TGCCCTCAACGA-CCACTTT-3' and R 5'-GGTCCAGGGGTCTTACTCCTT3'. All assays included a negative control, which consisted of the reaction mixture with no template. Comparison of cycle thresholds was completed with the  $2^{-\Delta Ct}$  method using GAPDH as an endogenous control.

### **Western blot analysis**

Whole cell extracts were isolated using lysis buffer containing 5M NaCl, 1M Tris-HCl, 100mM NaF, 0.1M EDTA and supplemented with protease inhibitors. The concentration of the isolated proteins was determined using the micro BCA Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, ILL). The lysates were separated in 10% SDS-PAGE, transferred onto PVDF membrane, and probed with rabbit specific Abs from Abcam: anti-KRT19, and mouse anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in 1% skim milk in TBS/0.1% Tween-20, overnight at 4°C, followed with the appropriate HRP-conjugated IgG antibodies (GE Health Care Limited, UK). Signals were visualized by Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore, Billerica, USA), a premixed, ready-to use reagent for chemiluminescent detection in Western blotting applications that employ horseradish peroxidase (HRP)-conjugated Ab. The results were expressed as ratios of optical density (OD) bands to those of GAPDH bands used as loading controls.

### **DNA methylome analysis for KRT19**

DNA samples (500 ng) from long-term cultured

SGEC were submitted to the NXT-Dx service facility (Belgium) for bisulphite conversion (EZ-96 DNA methylation kit, Zymo Research) and DNA methylation profiling using the Illumina Human Methylation 450k platform to analyze the methylation status of 485,577 single CpG sites. The SWAN normalization method was used to normalize the data (22), and results were expressed in beta value and compared to the beta reference values. The beta value is the ratio of the methylated probe intensity and the overall intensity (sum of methylated and unmethylated probe intensity). A value of 0 indicates that all copies of the CpG site in the sample are unmethylated, while a value of 1 indicates that all copies are methylated which can be interpreted as the approximation of the percentage of methylation for the population of a given CpG site in the sample.

### **Statistical analysis**

The results are expressed as arithmetic means with standard error of the mean (SEM). Data were compared using the non-parametric Mann-Whitney U-test for unpaired data, using the GraphPad-Prism 6.0 software. Significance was assessed as  $P < 0.05$ .

## **Results**

### **In patients with pSS, DNA methylation is associated with cytokeratin 19 overexpression**

In order to extend our previous studies that have established a defective global DNA methylation ( $^{5mC}$ ) in MSG epithelial cells from pSS (17, 19), samples from thirteen pSS patients were stained with an anti- $^{5mC}$  mAb and with an anti-KRT19 mAb (Figure 1A), revealing for patient with low levels of  $^{5mC}$  high amounts of KRT19 (AU:  $3.0 \pm 0.4$  in  $^{5mC}$  low pSS patients versus  $1.8 \pm 0.3$  in  $^{5mC}$  high pSS patients,  $P=0.04$ ) (Figure 1B). As a consequence, this result raises the question of an epigenetic deregulation of the KRT19 gene in pSS patients.

### **DNA methylation controls KRT19 expression in human salivary glands**

Next, and to test whether KRT19 expression is regulated at the epigenetic level, the HSG cell line was selected and cultured 48h using either the DNA methyl transferase (DNMT) inhibitor 5-Aza, or the histone acetylase inhibitor trichostatine A. Inhibition of DNMTs by 5-Aza was effective, in a dose-effect relations-



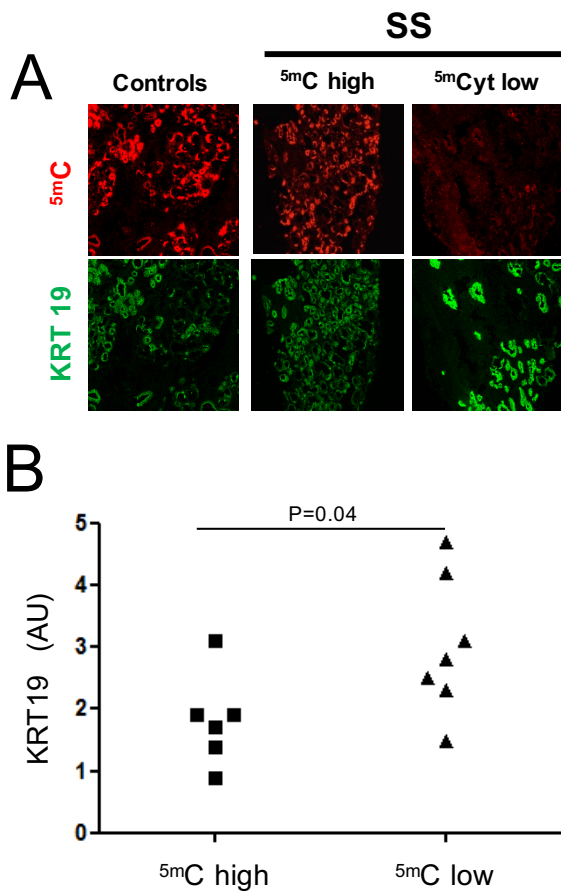


Figure 1. Global DNA methylation (5mC) and cytokeratin (KRT)19 analysis in minor salivary glands (MSG) from patients with primary Sjögren's syndrome (pSS). A- Photomicrographs showing global DNA methylation and KRT19 staining in MSG from a representative control and two pSS patients. The intensities of 5mC and KRT19 staining from 13 pSS patients were quantified by image J software and patients were subdivided according to the level of 5mC in two groups (5mC high n=6, and 5mC low n=7). B- Patients with reduced 5mC Ab staining have high levels of KRT19 staining. Differences were considered positive and indicated when  $P < 0.05$ .

hip, to increase the level of KTR19 at the protein level (Figure 2A) as observed by Western blot (KRT19/GAPDH protein (OD):  $7.6 \pm 10.3$

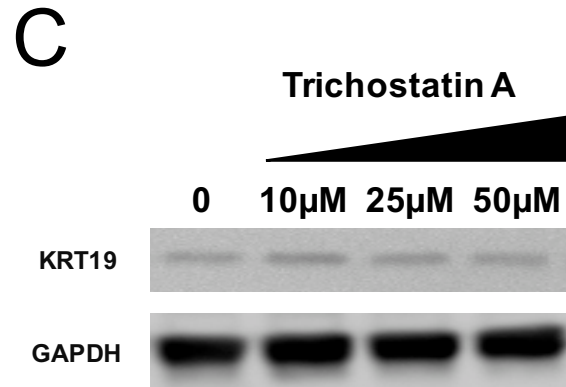
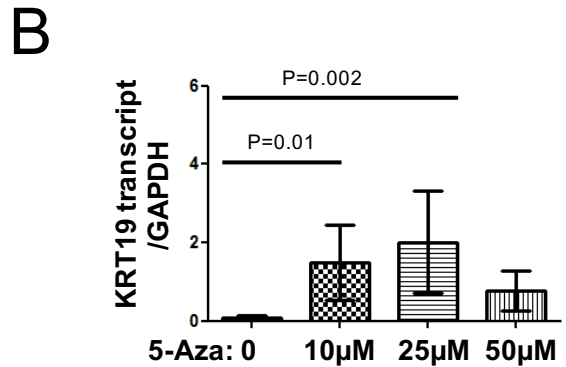
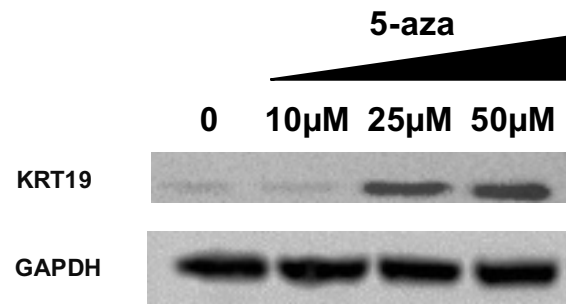
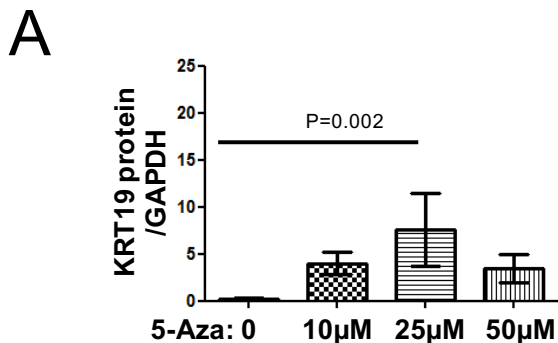


Figure 2. DNA methylation but not histone deacetylation controls KRT19 expression in the human salivary gland (HSG) cell line. The HSG cell line was treated 48h with increasing amounts of the DNA demethylating drug 5-azacytidine (5-Aza) or with the histone acetylase inhibitor Trichostatin A. A- Western blot analysis testing the effects of 5-Aza in HSG on KRT19. Results, from 8 experiments, are expressed as arbitrary units (AU) after normalization to GAPDH (AU=1). Left panel a representative experiment is presented. B- Real time quantitative PCR testing KRT19 gene expression, eight experiments. C- Representative Western blot analysis testing the effects of Trichostatin A. Differences are indicated when  $P < 0.05$ .

with 25µM 5-Aza versus  $0.24 \pm 0.09$  without 5-Aza,  $P=0.002$ ), and at the transcriptional level (Figure 2B) as seen by RT-qPCR (KRT19/GAPDH transcript:  $2 \pm 3.2$  with 25µM 5-Aza versus  $0.1 \pm 0.05$  without 5-Aza,  $P=0.002$ ). In contrast, when using trichostatin A, no effect on KRT19 expression was observed at the

transcriptional level (data not shown), and at the protein level (Figure 2C). Altogether, these results indicate that DNA methylation, but not histone acetylation, controls KRT19 gene expression in HSG.

#### Methylome analysis confirmed KRT19 DNA demethylation in those patients with reduced global DNA methylation

In addition, as KRT19 expression was increased at transcriptional level in long-term cultured SGEC from pSS patients (KRT19/GAPDH transcript:  $2.6 \pm 0.6$  in pSS patient versus  $0.6 \pm 0.2$  in controls,  $P=0.004$ ; data not shown), DNA methylation at the KRT19 locus was assessed in long-term cultured SGEC from 8 pSS patients using the human methylation 450K array from Illumina. As reported in Table 1, 14 probes spanning the KRT19 locus were selected and annotation was performed

using a combination of two tools based on information from the encyclopedia of DNA elements and the Roadmap Epigenome projects (<http://Ensembl.org> and <http://RegulomDB.org>) to determine whether CpG probes are likely to be within enhancers (probes 1-3 and 13-14), promoters (5-6), insulators (7-8), and/or repressors (9-12). The recruitment of RNA polymerase 2 (Pol2) was used to define promoters, enrichment of the histone H3k27Ac in the absence of Pol2 for enhancers, the DNA regulatory element CTCF for insulators, and enrichment of silencing histone marks (H3K-27me3 and H3K36me3) for repressors. Using the Illumina's reference  $\beta$  value as cut-off to discriminate probes with low methylation levels ( $\beta$  value < reference  $\beta$  value), it was observed that probes located within promoter area (probes 3-6) and probes located within distal regulatory area (probes 11-14) were di-

Number	CpG probe	Genomic probe location (hg19)	Gene location	ENCODE analysis	Beta value (cut-off)
1	cg12491114	chr 17:39685524-39685573	5'UTR	Enhancer (rs138464215)	0.09
2	cg03550233	chr17:39685434-39685483	5'UTR	Enhancer (TP53, rs4616333)	0.28
3	cg16585619	chr 17:39685250-39685299	5'UTR	Enhancer (rs28464674)	0.52
4	cg02416424	chr17:39684825-39684874	5'UTR	Promoter (SP1, TAF, rs143519434)	0.11
5	cg02893823	chr17:39684496-39684545	Exon 1	Promoter (SP1, TAF, rs372117019)	0.14
6	cg22379915	chr 17:39684239-39684288	Exon 1	Promoter (TAF, EZH2, rs145569885)	0.05
7	cg11462865	chr 17:39684076-39684125	Exon 1 / Intron 1-2	Insulator (CTCF, rs200315408)	0.09
8	cg17231690	chr 17:39684038-39684087	Intron 1-2	Insulator (CTCF, rs569080949)	0.04
9	cg13002493	chr 17:39683800-39683849	Intron 1-2	Repressor (H3K-27me3)	0.1
10	cg05396212	chr17:39683705-39683754	Intron 1-2	Repressor (H3K-27me3)	0.07
11	cg12871463	chr 17:39680662-39680711	Exon 4	Repressor (H3K36me3, rs148803515)	0.49

Number	CpG probe	Genomic probe location (hg19)	Gene location	ENCODE analysis	Beta value (cut-off)
12	cg27608102	chr 17:39680504-39680553	Exon 5	Repressor (H3K-36me3)	0.09
13	cg19051042	chr 17:39680271-39680320	Intron 5-6	Enhancer (STAT3, AP1, GATA, E2F, rs145636969)	0.13
14	cg09692449	chr17:39680217-39680266	Exon 6	Enhancer (STAT3, AP1, GATA, E2F, rs145232704)	0.09

Table 1.Characteristics of the 14 CpG probes used in the 450k bead chip from illumina spanning the human cytokeratin (KRT)19 gene. CpG probe annotation was performed using the two ENCODE web tools available at ensembl.org and RegulomeDb.org. Collected information included KRT19 genes location, regulatory function, transcription factor or CTCF binding and the presence of single nucleotide polymorphisms.

fferentially methylated. As expected and presented in Figure 3, those patients with reduced global DNA methylation were those with higher demethylated probes, confirming the link between global DNA demethylation, as determined by confocal microscopy in MSG, and KRT19 promoter demethylation in long-term cultured SGEC from pSS patients.

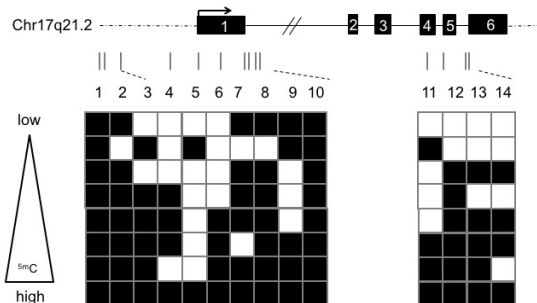


Figure 3. KRT19 gene DNA methylation in long term cultured salivary gland epithelial cells (SGEC) from primary Sjögren's syndrome (pSS) patients. KRT19 locus (chr 17: 39,679,869-39,684,560; GRCh 37/hg19) is shown depicting the location of the 14 CpG probes evaluated in this study. We identified two main hypomethylated CpG clusters that are present in the promoter area of KRT19 (3-5) and one present in the distal part of KRT19 (11-14). White boxes indicate CpG sites with a  $\beta$  value below the reference (see table 1).

**Discussion**

Several arguments, including our own studies, support a role for DNA methylation in pSS. Indeed, hydralazine and procainamide, two drugs known to act as DNA methylation inhibitors, induce SS with immunological features of systemic lupus erythematosus (SLE) both

in humans and rodents (23, 24). Interestingly, such effect disappeared after discontinuation of the drug and variations were observed depending on animal age, sex, and strain. In addition, an overexpression of DNA methylation sensors, such as human endogenous retrovirus genes, are reported in MSG from pSS patients (25). HERVs are believed to play a role in the pathophysiology of AID such as SS, SLE and rheumatoid arthritis (RA) through the production of anti-HERV autoantibodies or by interfering with neighboring genes like CD5 in SLE B cells (26-29). Similarly, DNA methylation changes in pSS are associated with the expression of micro-RNAs and non-coding regulatory RNAs (30). Moreover epigenetic histone mark modifications are immunogenic leading to autoantibody production (31).

In normal salivary glands, KRT19 is consistently expressed in epithelial cells with higher expression reported in ductal than in acinar cells (32). KRT19 is also described as an epigenetically regulated tumor and metastasis suppressor gene (33). As a consequence KRT19 promoter demethylation is reported in renal cell carcinoma (34), while KRT19 promoter hypermethylation was associated with transcriptional repression in a wide variety of tumor cells such as neuroblastomas, squamous cell carcinomas and uterine leiomyoma (35). In addition, treating tumor cells with the DNA demethylating inhibitor 5-Aza is effective for increasing KRT19 expression (36). Our study confirms the link between epigenetic DNA modifications and KRT19 gene expression in SG by testing the KRT19 DNA methylation status, and by demonstrating the effects

of 5-Aza on mRNA and protein expression. The Microarray-based Illumina Infinium 450K methylation array is characterized by its high resolution, quantitative measurements, accuracy, small sample requirement and a relatively low cost (37). In addition, the methylation status at the interrogated CpG sites could be investigated by comparing the measured intensities (38). Applied to SGEC from pSS patients and among the 14 KRT19 CpG probes tested, there were 12 methylation sites below the cut-off  $\beta$  value and in agreement with previous reports, variations occurred predominantly within the promoter region of KRT19. Interestingly, our results also suggested that a distal repressor/enhancer is present in the distal part of KRT19. Such hypothesis needs further exploration in order to test whether, or not, this element is effective in modulating KRT19 expression.

Genome-wide analysis of DNA methylation was reported in naïve CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> T cells, and B cells purified from patients with pSS, highlighting DNA methylation changes with the interferon pathway, disease activity, and anti-SSA/SSB Ab production, and an overlap was observed between DNA methylation probes and genetic risk-factors (39, 40). In line with these observations we have recently reported a link between defective global DNA methylation in SGEC and anti-SSB Ab production in pSS patients, and cross-talk between epigenetic factors and pSS-associated risk factors in B cells (9, 16). Genome analysis of the gene promoter DNA methylation status in CD4<sup>+</sup> T cells has further revealed a DNA promoter demethylation at lymphotoxin alpha (LTA) and CD70 (TNSF7) genes (39, 41), and a DNA hypermethylation profile at the Treg marker forkhead box P3 (FoxP3) promoter coupled with a significant decrease in FoxP3 expression (42). In contrast, authors failed to demonstrate an epigenetic regulation for interferon regulatory factors (IRF5) and CD40L in pSS (43, 44). In SGEC, DNA methylation is suspected of controlling important functions, such as salivary flux, based on the observations that 5-Aza is effective in inducing the expression of the aquaporin 5 (AQP5) gene in the human salivary gland ductal cell line NS-SV-DC (45), on one hand, and to the increased fluid secretion in the murine aging model C57Bl/6CrSkc on the other hand (46). Similarly, changes in the expression of the type I hemidesmosome BP230 protein in labial SG from pSS patients resulted from BP320 gene hypermethylation (47)

In conclusion, the increase in KRT19 mRNA levels in SGEC from pSS patients may be explained by DNA methylation changes. Therefore, future studies are mandatory to characterize and determine the functional consequences of DNA methylation and KRT19 changes observed in SGEC from pSS patients and will undoubtedly provide a better comprehensive understanding of the pSS pathogenesis with clinical and therapeutical applications in this disease (48).

Conflicts of Interest: None

**Acknowledgements:** This work is supported by the Institut Français pour la Recherche Odontologique (IFRO), the Region Bretagne, the Association Française du Gougerot Sjögren et des Syndrome Secs (AFGS), and the Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking under grant agreement n°115565, resources of which are composed of financial contributions from the European Union's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013) and EFPIA companies' in-kind contribution. Authors are grateful to Simone Forest and Genevieve Michel for their secretarial assistance.

## References

1. Mavragani CP, Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome. *Annu Rev Pathol*, 2014,9:273-285.
2. Tobon GJ, Saraux A, Pers JO, Youinou P. Emerging biotherapies for Sjogren's syndrome. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2010,15:269-282.
3. Tobon GJ, Renaudineau Y, Hillion S, Cornec D, Devauchelle-Pensec V, Youinou P, et al. The Fms-like tyrosine kinase 3 ligand, a mediator of B cell survival, is also a marker of lymphoma in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2010,62:3447-3456.
4. Cornec D, Saraux A, Jousse-Joulin S, Pers JO, Boisrame-Gastrin S, Renaudineau Y, et al. The Differential Diagnosis of Dry Eyes, Dry Mouth, and Parotidomegaly: A Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2015,49:278-287.
5. Cornec D, Jousse-Joulin S, Marhadour T, Pers JO, Boisrame-Gastrin S, Renaudi-

- neau Y, et al. Salivary gland ultrasonography improves the diagnostic performance of the 2012 American College of Rheumatology classification criteria for Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*, 2014,53:1604-1607.
6. Jousse-Joulin S, Devauchelle-Pensec V, Morvan J, Guias B, Pennec Y, Pers JO, et al. Ultrasound assessment of salivary glands in patients with primary Sjogren's syndrome treated with rituximab: Quantitative and Doppler waveform analysis. *Biologics*, 2007,1:311-319.
7. Cornec D, Saraux A, Cochener B, Pers JO, Jousse-Joulin S, Renaudineau Y, et al. Level of agreement between 2002 American-European Consensus Group and 2012 American College of Rheumatology classification criteria for Sjogren's syndrome and reasons for discrepancies. *Arthritis Res Ther*, 2014,16:R74.
8. Alonso R, Buors C, Le Dantec C, Hillion S, Pers JO, Saraux A, et al. Aberrant expression of CD6 on B-cell subsets from patients with Sjogren's syndrome. *J Autoimmun*, 2010,35:336-341.
9. Konsta OD, Le Dantec C, Brooks WH, Renaudineau Y. Genetics and Epigenetics of Autoimmune Diseases. eLS; DOI: 101002/9780470015902a0023593, 2015:1-9.
10. Konsta OD, Thabet Y, Le Dantec C, Brooks WH, Tzioufas AG, Pers JO, et al. The contribution of epigenetics in Sjogren's Syndrome. *Front Genet*, 2014,5:71.
11. Le Dantec C, Gazeau P, Mukherjee S, Brooks WH, Renaudineau Y. How the environment influences epigenetics, DNA methylation, and autoimmune diseases 2015 February 2015. 520 p.
12. Lu Q, Renaudineau Y, Cha S, Ilei G, Brooks WH, Selmi C, et al. Epigenetics in autoimmune disorders: highlights of the 10th Sjogren's syndrome symposium. *Autoimmun Rev*, 2010,9:627-630.
13. Brooks WH, Le Dantec C, Pers JO, Youinou P, Renaudineau Y. Epigenetics and autoimmunity. *J Autoimmun*, 2010,34:J207-219.
14. Renaudineau Y. The revolution of epigenetics in the field of autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2010,39:1-2.
15. Farh KK, Marson A, Zhu J, Kleinewietfeld M, Housley WJ, Beik S, et al. Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature*, 2015,518:337-343.
16. Konsta OD, Le Dantec C, Charras A, Brooks WH, Arleevskaya MI, Bordron A, et al. An in silico Approach Reveals Associations between Genetic and Epigenetic Factors within Regulatory Elements in B Cells from Primary Sjogren's Syndrome Patients. *Front Immunol*, 2015,6:437.
17. Thabet Y, Le Dantec C, Ghedira I, Devauchelle V, Cornec D, Pers JO, et al. Epigenetic dysregulation in salivary glands from patients with primary Sjogren's syndrome may be ascribed to infiltrating B cells. *J Autoimmun*, 2013,41:175-181.
18. Le Dantec C, Charras A, Brooks WH, Renaudineau Y. Similarities and differences of epigenetic mechanisms in lupus and Sjogren's syndrome. *Lupus Open Access*, 2015,1.
19. Konsta OD, Le Dantec C, Cornec D, Kapsogeorgou EK, Tzioufas AG, Pers JO, et al. Defective DNA methylation in salivary gland epithelial acini from patients with Sjogren's syndrome is associated with SSB gene expression, anti-SSB/LA detection, and lymphocyte infiltration. *J Autoimmun*, 2015:In press.
20. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis*, 2002,61:554-558.
21. Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Abu-Helu RF, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Establishment of a convenient system for the long-term culture and study of non-neoplastic human salivary gland epithelial cells. *Eur J Oral Sci*, 2002,110:21-30.

22. Maksimovic J, Gordon L, Oshlack A. SWAN: Subset-quantile within array normalization for illumina infinium Human-Methylation450 BeadChips. *Genome Biol*, 2012,13:R44.
23. Darwaza A, Lamey PJ, Connell JM. Hydrallazine-induced Sjogren's syndrome. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 1988,17:92-93.
24. Cannat A, Seligmann M. Induction by isoniazid and hydrallazine of antinuclear factors in mice. *Clin Exp Immunol*, 1968,3:99-105.
25. Le Dantec C, Varin MM, Brooks WH, Pers JO, Youinou P, Renaudineau Y. Epigenetics and Sjogren's syndrome. *Curr Pharm Biotechnol*, 2012,13:2046-2053.
26. Le Dantec C, Vallet S, Brooks WH, Renaudineau Y. Human endogenous retrovirus group E and its involvement in diseases. *Viruses*, 2015,7:1238-1257.
27. Garaud S, Morva A, Lemoine S, Hillion S, Bordron A, Pers JO, et al. CD5 promotes IL-10 production in chronic lymphocytic leukemia B cells through STAT3 and NFAT2 activation. *J Immunol*, 2011,186:4835-4844.
28. Fali T, Le Dantec C, Thabet Y, Jousse S, Hanrotel C, Youinou P, et al. DNA methylation modulates HRES1/p28 expression in B cells from patients with Lupus. *Autoimmunity*, 2014,47:265-271.
29. Brookes SM, Pandolfino YA, Mitchell TJ, Venables PJ, Shattles WG, Clark DA, et al. The immune response to and expression of cross-reactive retroviral gag sequences in autoimmune disease. *Br J Rheumatol*, 1992,31:735-742.
30. Jimenez SA, Piera-Velazquez S. Potential role of human-specific genes, human-specific microRNAs and human-specific non-coding regulatory RNAs in the pathogenesis of systemic sclerosis and Sjogren's syndrome. *Autoimmun Rev*, 2013,12:1046-1051.
31. Thabet Y, Canas F, Ghedira I, Youinou P, Mageed RA, Renaudineau Y. Altered patterns of epigenetic changes in systemic lupus erythematosus and auto-antibody production: is there a link? *J Autoimmun*, 2012,39:154-160.
32. Iwafuchi H, Mori N, Takahashi T, Yatabe Y. Phenotypic composition of salivary gland tumors: an application of principal [corrected] component analysis to tissue microarray data. *Mod Pathol*, 2004,17:803-810.
33. Chimonidou M, Strati A, Tzitzira A, Sotiropoulou G, Malamos N, Georgoulas V, et al. DNA methylation of tumor suppressor and metastasis suppressor genes in circulating tumor cells. *Clin Chem*, 2011,57:1169-1177.
34. Morris MR, Gentle D, Abdulrahman M, Clarke N, Brown M, Kishida T, et al. Functional epigenomics approach to identify methylated candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma. *Br J Cancer*, 2008,98:496-501.
35. Navarro A, Yin P, Monsivais D, Lin SM, Du P, Wei JJ, et al. Genome-wide DNA methylation indicates silencing of tumor suppressor genes in uterine leiomyoma. *PLoS One*, 2012,7:e33284.
36. Paiva F, Duarte-Pereira S, Costa VL, Ramalho-Carvalho J, Patricio P, Ribeiro FR, et al. Functional and epigenetic characterization of the KRT19 gene in renal cell neoplasms. *DNA Cell Biol*, 2011,30:85-90.
37. Walker DL, Bhagwate AV, Baheti S, Smalley RL, Hilker CA, Sun Z, et al. DNA methylation profiling: comparison of genome-wide sequencing methods and the Infinium Human Methylation 450 Bead Chip. *Epigenomics*, 2015:1-16.
38. Sun Z. High-throughput long noncoding RNA profiling for diagnostic and prognostic markers in cancer: opportunities and challenges. *Epigenomics*, 2015.
39. Altork N, Coit P, Hughes T, Koelsch KA, Stone DU, Rasmussen A, et al. Genome-wide DNA methylation patterns in naive CD4+ T cells from patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheumatol*, 2014,66:731-739.
40. Miceli-Richard C, Wang-Renault SF, Boudaoud S, Busato F, Lallemand C, Bethu-

- ne K, et al. Overlap between differentially methylated DNA regions in blood B lymphocytes and genetic at-risk loci in primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*, 2015.
41. Yin H, Zhao M, Wu X, Gao F, Luo Y, Ma L, et al. Hypomethylation and overexpression of CD70 (TNFSF7) in CD4+ T cells of patients with primary Sjogren's syndrome. *J Dermatol Sci*, 2010,59:198-203.
42. Yu X, Liang G, Yin H, Ngalamika O, Li F, Zhao M, et al. DNA hypermethylation leads to lower FOXP3 expression in CD4+ T cells of patients with primary Sjogren's syndrome. *Clin Immunol*, 2013,148:254-257.
43. Gestermann N, Koutero M, Belkhir R, Tost J, Mariette X, Miceli-Richard C. Methylation profile of the promoter region of IRF5 in primary Sjogren's syndrome. *Eur Cytokine Netw*, 2012,23:166-172.
44. Belkhir R, Gestermann N, Koutero M, Serror R, Tost J, Mariette X, et al. Upregulation of membrane-bound CD40L on CD4+ T cells in women with primary Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol*, 2014,79:37-42.
45. Moteji K, Azuma M, Tamatani T, Ashida Y, Sato M. Expression of aquaporin-5 in and fluid secretion from immortalized human salivary gland ductal cells by treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine: a possibility for improvement of xerostomia in patients with Sjogren's syndrome. *Lab Invest*, 2005,85:342-353.
46. Yamamura Y, Aota K, Yamanoi T, Kani K, Takano H, Momota Y, et al. DNA demethylating agent decitabine increases AQP5 expression and restores salivary function. *J Dent Res*, 2012,91:612-617.
47. Gonzalez S, Aguilera S, Alliende C, Urzua U, Quest AF, Herrera L, et al. Alterations in type I hemidesmosome components suggestive of epigenetic control in the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2011,63:1106-1115.
48. Le Dantec C, Brooks WH, Y. R. Epigenomic revolution in autoimmune diseases. *World Journal of Immunology*, 2015:in press.

## Article 4

# An *in silico* approach reveals associations between genetic and epigenetic factors within regulatory elements in B cells from primary Sjögren's syndrome patients

Orsia D Konsta, Christelle Le Dantec, Amandine Charras, Wesley H. Brooks, Marina I. Arleevskaya, Anne Bordron, Yves Renaudineau

Front Immunol. 2015 Aug 26;6:437.

### I. Introduction et objectifs

Au cours du Syndrome de Gougerot Sjögren (SGS), l'implication de mécanismes multiples à savoir des facteurs génétiques, environnementaux et épigénétiques est soupçonnée.

L'implication d'un polymorphisme génétique a pu être souligné notamment par l'étude de type GWAS (Genome Wide Association Study) de (Lessard et al., 2013) , les résultats permettent d'identifier 29 régions potentiellement associées à l'étiologie du SGS et soulignent également l'importance des systèmes immunitaires innés et adaptatifs.

Concernant les mécanismes épigénétiques, un lien a été établi entre des drogues (hydralazine et procainamide) interférant avec la méthylation de l'ADN et agissant sur les DNMTs et l'induction d'un Lupus Erytemateux Systémique (LES) ou d'un SGS chez l'Homme et la souris. Par la suite, il a été démontré la production anormale de HERV (Human Endogenous RetroViruses), dont l'expression est régulée par la méthylation de l'ADN, au niveau des cellules épithéliales de la glande salivaires de patients qui va dans ce sens. Et plus récemment une déméthylation de l'ADN sur les cellules épithéliales de la glande salivaire (SGECs), qui serait le fait de la présence des lymphocytes B.



Le but de ce travail visait à mieux comprendre les inter-relations qui existent entre les processus épigénétiques et génétiques au cours du SGS.

## II. Démarche expérimentale

L'approche abordée dans cet article est essentiellement une analyse bio-informatique. Pour celle-ci, la liste des mutations associées au SGS a été obtenue par analyse de la littérature, puis l'interdépendance de ces mutations avec des zones sous-contrôle épigénétiques a été testée en se basant sur différents outils accessibles sur le web et développés par les programmes ENCODE et Roadmap epigenomics.

## III. Résultats - Conclusions

Ainsi dans un premier temps un panel de variants génétique associée au SGS a été localisé principalement au niveau d'éléments régulateur du génome. Dans un second temps l'association de ces éléments avec une spécificité cellulaire a été établie. Ce qui a permis d'identifier environ 72 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) qui sont retrouvés associés à 43 gènes identifiés comme facteurs de risques.



# An *in silico* approach reveals associations between genetic and epigenetic factors within regulatory elements in B cells from primary Sjögren's syndrome patients

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Gayane Manukyan,  
National Academy of Sciences of the  
Republic of Armenia, Armenia

### Reviewed by:

Rudra Bhowmick,  
Oklahoma State University, USA  
María-Julieta González,  
Universidad de Chile, Chile  
Gabriel J. Tobón,  
Fundación Valle del Lili, Colombia

### \*Correspondence:

Yves Renaudineau,  
Laboratory of Immunology and  
Immunotherapy, Brest University  
Medical School Hospital,  
CHU Morvan, 2 Avenue Foch,  
BP824, Brest F29609, France  
yves.renaudineau@univ-brest.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Microbial Immunology, a section of  
the journal *Frontiers in Immunology*

**Received:** 12 June 2015

**Accepted:** 11 August 2015

**Published:** 26 August 2015

### Citation:

Konsta OD, Le Dantec C, Charras A,  
Brooks WH, Arleevskaya MI,  
Bordron A and Renaudineau Y (2015)

An *in silico* approach reveals  
associations between genetic and  
epigenetic factors within regulatory  
elements in B cells from primary  
Sjögren's syndrome patients.

Front. Immunol. 6:437.

doi: 10.3389/fimmu.2015.00437

Orsia D. Konsta<sup>1</sup>, Christelle Le Dantec<sup>1</sup>, Amandine Charras<sup>1</sup>, Wesley H. Brooks<sup>2</sup>,  
Marina I. Arleevskaya<sup>3</sup>, Anne Bordron<sup>1</sup> and Yves Renaudineau<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM ESPRI, ERI29/EA2216, SFR ScInBioS, LabEx IGO "Immunotherapy Graft Oncology", Innovative Medicines Initiative PRECISESADS, Réseau épigénétique et réseau canaux ioniques du Cancéropole Grand Ouest, European University of Brittany, Brest, France, <sup>2</sup>Department of Chemistry, University of South Florida, Tampa, FL, USA, <sup>3</sup>Department of Rheumatology, Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia, <sup>4</sup>Laboratory of Immunology and Immunotherapy, CHU Morvan, Brest, France

Recent advances in genetics have highlighted several regions and candidate genes associated with primary Sjögren's syndrome (SS), a systemic autoimmune epithelitis that combines exocrine gland dysfunctions, and focal lymphocytic infiltrations. In addition to genetic factors, it is now clear that epigenetic deregulations are present during SS and restricted to specific cell type subsets, such as lymphocytes and salivary gland epithelial cells. In this study, 72 single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with 43 SS gene risk factors were selected from publicly available and peer reviewed literature for further *in silico* analysis. SS risk variant location was tested revealing a broad distribution in coding sequences (5.6%), intronic sequences (55.6%), upstream/downstream genic regions (30.5%), and intergenic regions (8.3%). Moreover, a significant enrichment of regulatory motifs (promoter, enhancer, insulator, DNase peak, and expression quantitative trait loci) characterizes SS risk variants (94.4%). Next, screening SNPs in high linkage disequilibrium ( $r^2 \geq 0.8$  in Caucasians) revealed 645 new variants including 5 SNPs with missense mutations, and indicated an enrichment of transcriptionally active motifs according to the cell type (B cells > monocytes > T cells  $\gg$  A549). Finally, we looked at SS risk variants for histone markers in B cells (GM12878), monocytes (CD14<sup>+</sup>) and epithelial cells (A548). Active histone markers were associated with SS risk variants at both promoters and enhancers in B cells, and within enhancers in monocytes. In conclusion and based on the obtained *in silico* results that need further confirmation, associations were observed between SS genetic risk factors and epigenetic factors and these associations predominate in B cells, such as those observed at the FAM167A–BLK locus.

**Keywords:** Sjögren's syndrome, genetics, epigenetics, polymorphism, *in silico*, histone modifications, B cells

## Introduction

Primary Sjögren's syndrome (SS) is a systemic autoimmune epithelitis affecting exocrine glands, such as salivary and lacrimal glands (1). The clinical manifestations of SS include dry mouth (xerostomia), dry eyes (keratoconjunctivitis sicca), systemic features, and patients have a 20- to 40-fold increased risk of developing lymphoma (2–4). Histological examination shows focal and peri-epithelial T and B cell infiltration plus macrophages in exocrine glands and parenchymal organs, such as kidney, lung, and liver (5). SS is characterized by the presence of circulating autoantibodies (Ab) against the sicca syndrome (SS)A/Ro and SSB/La ribonucleoprotein particles (6).

It is estimated that there are over 120 million single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human genome (NCBI dbSNP database, Build 143) and, among them, hundreds are disease risk variants for autoimmune diseases (AID) with the particularity that they are for the vast majority excluded from protein-coding regions (exon) and present within regulatory areas (7, 8). Regulatory SNPs control genes through an effect on (i) the transcriptional machinery when present within a gene regulatory region [promoter, enhancer, insulator (a gene regulatory element that blocks interaction between enhancers and promoters), and expression quantitative trait loci (eQTL)], (ii) the spliceosomal complex formation that controls intron excision, (iii) the activation of mRNA non-sense-mediated decay (NMD), and (iv) the control of messenger RNA stability through microRNA (3'-UTR). In SS, the list of genetic variations is growing with the particularity that the odds ratio (OR) is usually modest (OR < 1.5) with the exception of the HLA genes that have a significant OR (usually > 2) (9). The associated risk genes analysis supports immunopathological pathways in SS, such as antigen presentation, cytokine signaling, and the NF- $\kappa$ B pathway (10). The characterization of regulatory SNPs in SS remains to be established.

In SS, several arguments support a role for epigenetic deregulation in disease initiation and progression (11, 12). The first clue was that two drugs, procainamide and hydralazine, induced SS in humans by blocking DNA methylation (13). Moreover, defects in DNA methylation characterize T cells, B cells, and salivary gland epithelial cells from SS patients (14–16), and such defects were associated with the expression of genes usually repressed by DNA methylation, such as transposons and miRNAs in salivary glands from SS patients (17, 18). Last, but not least, histone epigenetic markers and ribonucleoprotein post-translational modifications are immunogenic leading to autoAb production (14).

Accordingly, the aim of this work was to test the association between genetic and epigenetic determinants in SS. In the following, we pursue a two-staged analysis. First, we characterized a large panel of SS risk variants to reveal that they are predominantly present within regulatory elements. Second, we further explored the striking associations of those regulatory elements with cellular specificity and particularly in immune cells.

## Materials and Methods

### SS Genetic Risk Factors

Data mining based on peer reviewed literature information (PubMed) and publicly available databases (centralgwas.org)

served in the compilation of a list of 43 gene risk factors and their reported variants ( $n = 72$ ) in SS (Table S1 in Supplementary Material) (19–49). The number of SS patients and controls were also reported as well as the OR average (95%), when available. The gene list used in this study was manually updated further to include gene function, SNP number (dbSNP database), and genomic location according to the human genome reference GRCh38. Genetic variants and their observed associations with clinical and functional phenotype were submitted to The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ClinVar database<sup>1</sup>. The gene list was tested with the FatiGO web interface AmiGO2<sup>2</sup> for functional enrichment.

### Functional/Regulatory Genome Annotation Data

The variant effect predictor (VEP) tool<sup>3</sup> was used to determine the location of the variants (exon, intron, 5'/3'-UTR, Up/Downstream genic sequence, and intergenic section) and their consequences [missense, non-coding transcript, splice donor variant, and target of non-sense-mediated mRNA decay (NMD)].

Assessment of the SNPs functional relevance was further completed by requesting Regulome DB V1.1<sup>4</sup>, and HaploRegV2<sup>5</sup>, data bases (50, 51) for promoter [RNA polymerase II (Pol II) binding], enhancer (H3K27Ac, H3K36me3, and/or H3K27me3 binding in the absence of Pol II binding), insulator [CCCCTC-binding factor (CTCF)], transcription factor (TF) binding, DNase peak, and eQTL.

### Linkage Disequilibrium

Following SNP selection, the HaploRegV2 web portal was used to identify SNPs in linkage disequilibrium (LD,  $R^2 \geq 0.80$ ) in Europeans from the 1000 genome project using a maximum distance between variants of 200 kb in order to cover the enhancer elements (51).

### Statistical Analysis

Pearson's Chi-squared test with Yate's continuity correction, when appropriate, was used to evaluate the significance of differences between the regulatory motifs and the histone chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments. A probability ( $P$ ) of < 0.05 was considered significant.

## Results

### Autoimmune-Related Genes Associated with SS

A list of 43 SS-associated gene risk factors corresponding to 72 SNPs, referred to as SS risk variants, was extracted from the scientific literature (Figure 1). Among the risk factors, half (36/72) were associated with another AID (systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, systemic sclerosis, inflammatory bowel disease, autoimmune thyroiditis disease, insulin-dependent diabetes, primary biliary cirrhosis, autoimmune hepatitis), allergy, infections, and cancer, including B/T cell lymphomas. This partial

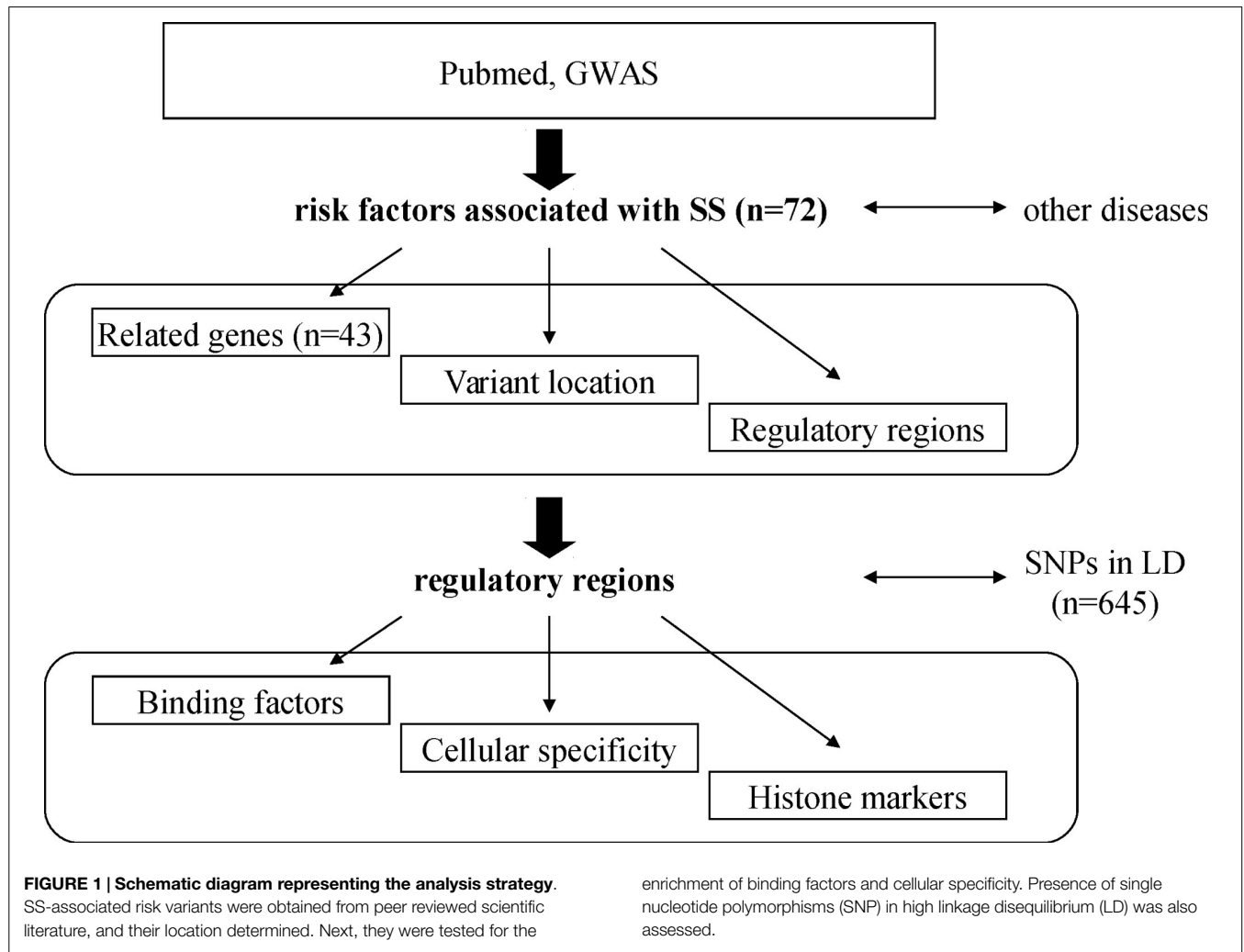
<sup>1</sup><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>

<sup>2</sup><http://amigo2.geneontology.org>

<sup>3</sup><http://www.ensembl.org>

<sup>4</sup><http://regulome.stanford.edu>

<sup>5</sup><http://www.broadinstitute.org>



overlap suggests that both common and distinct genetic traits are present in SS and equally distributed.

### Variant Location

Next, we used the VEP predictor tool in order to test the location of the different variants (**Figure 2**). Applied to the 72 SS risk variants, the VEP tools identified 4/72 (5.6%) exonic variants with missense mutations (IL17F, rs763780; MBL2, rs1800450; PTPN22, rs2476601; and TNFA1P3, rs2230926), and 40/72 (55.6%) intronic variants including an alternative splice donor variant (IRF5, rs2004640) and 4 variants that were predicted as targets of non-sense-mediated mRNA decay (NMD: ICA1, rs17143355; SLC25A40, rs10276819; STAT1, rs13005843; and TNIP1, rs6579837). Moreover, two 5'-UTR variants (CD14, rs2569190; and NCR3, rs11575837), one 3'-UTR variant (IL10, rs3024498), 12/72 (16.7%) upstream genic variants, 7/72 (9.7%) downstream genic variants, and 6/72 (8.3%) intergenic variants (>10 kb) were also observed.

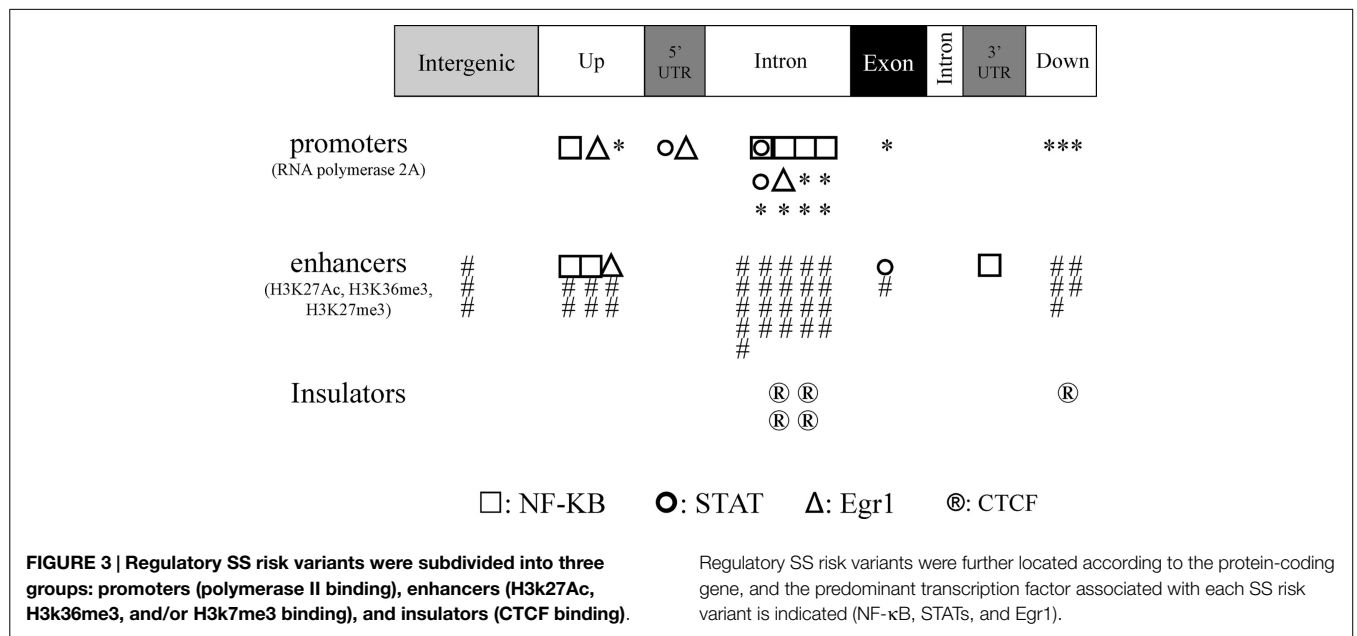
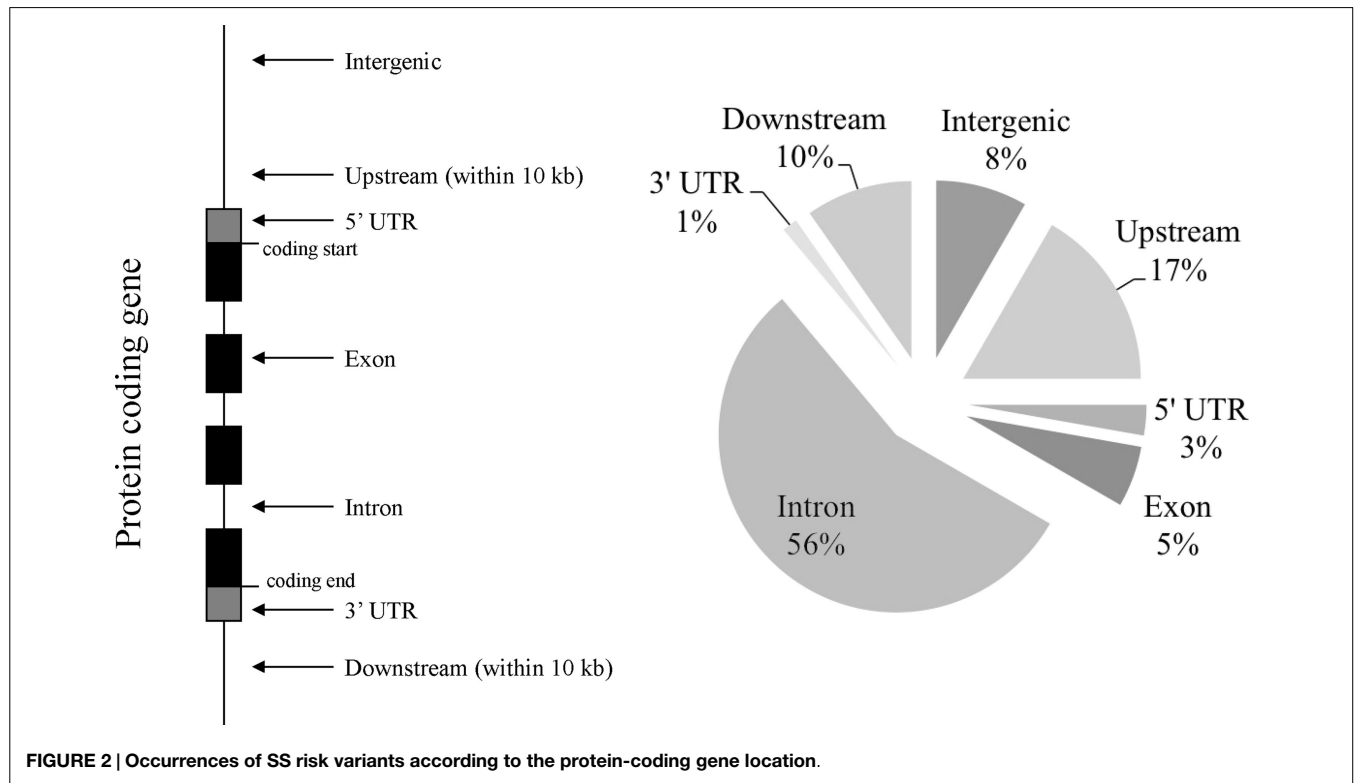
### Regulatory Regions and DNA Binding Molecules

We then used a combination of three tools based on information from the ENCODE program (VEP) and from both the ENCODE

and the Roadmap Epigenome programs (RegulomDB and HaploReg v2) to determine whether SS risk variants are likely to be within promoters, enhancers, or insulators. These regulatory motifs were defined according to the available ChIP results from multi-cell analysis showing 21/72 (29.2%) promoters, 41/72 (56.9%) enhancers, and 5/72 (6.9%) insulators. Of particular note, within the four SNPs with missense mutations, one promoter and two insulators were detected (**Figure 3**). Moreover, 34/72 (47.2%) DNase hypersensitive regions (DNase peak) and 12/72 (16.7%) eQTL were recovered. Looking specifically at promoters and enhancers, data from ChIP experiments revealed that NF- $\kappa$ B ( $n = 5$ ), STATs ( $n = 3$ ), and EGR-1 ( $n = 3$ ) were predominant in promoters, and NF- $\kappa$ B ( $n = 3$ ) in enhancers. For the remaining 5/72 (6.9%) SNPs, no regulatory functions were assigned which is significantly lower than the expected rate of 56.2% ( $P < 10^{-6}$ ) (50).

### Genes in High Linkage Disequilibrium

In order to improve the analysis, we used the HaploReg v2 tool to include 645 new SNPs that were identified to be in high LD with the 72 annotated SNPs (**Table 1**). This tool identifies 34 new genes, including one microRNA (Mir4752), five SNPs with



missense mutations (rs1041981 in LTA; rs78957773 in MCCD1, rs2230539 in PKN1, and rs52817781 plus rs2233290 in TNIP1), and indicated an overall 15.8-fold enrichment of enhancers in human embryonic cells (H1;  $P = 0.0001$ ) and 4.9-fold enrichment of enhancers in the GM12878 EBV-transformed lymphoblastoid B cell line ( $P = 0.0014$ ). A significant enrichment of transcriptionally active sites, identified by DNase enrichment analysis, was observed in the SNP set with a 21-fold increase in GM12878

lymphoblastoid B cells ( $P < 10^{-6}$ ), 10.8-fold increase in CD14<sup>+</sup> monocytes ( $P = 0.00002$ ), 9.2-fold increase in CD20<sup>+</sup> B cells ( $P = 0.001$ ), 8.2- to 8.5-fold increase in T cells ( $P < 0.005$ ), and 5.7-fold increase in the A549 epithelial cell line ( $P = 0.005$ ). Moreover, gene ontology biological process analysis (AmiGO2) identified “regulation of immune response” ( $P = 2.16 \times 10^{-18}$  and  $9.2 \times 10^{-17}$ ), “positive regulation of cytokine production” ( $P = 1.56 \times 10^{-11}$  and  $1.22 \times 10^{-13}$ ), “response to molecule of

**TABLE 1 | Gene risk factors associated with primary Sjögren's syndrome (SS).****SS gene risk factors extracted from the literature**

BAK1, BCL2, BLK, C4A, CCL2, CD14, CD40, CD40LG, CHRM3, CXCR5, EBF1, FAM167A, GTF2I, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA, ICA1, IKBKE, IL10, IL12A, **IL17F**, IL21, IRF5, LILRA3, **LTA\***, **MBL2**, NCR3, NFKB1, OR2B11, **PKN1\***, **PTPN22**, SLC25A40, STAT1, STAT4, TNF, **TNFA1P3**, TNFSF13B, **TNIP1\***, TNPO3, TNFSF4, Trim21

**New genes in high linkage disequilibrium**

ABCB1, AC053545.3, ADAD1, AF213884.2, APBB3, ATP6V1G2, ATP6V1G2-DDX39B, BTNL2, C6orf10, CCL11, CCL7, CTD-2049J23.2, DBF4, GGNBP1, HCG23, HLA-DPA1, IL2, KIAA1109, **MCCD1\***, Metazoa\_SRP, MIR4752, NDUFA2, NFKBIL1, PTGER1, RP11-10J5.1, RP11-356I2.2, RP11-356I2.4, RP3-527F8.2, RP5-998H6.2, RSNB1, RUNDC3B, SLC25A40, snoU13, XXbac-BPG254F23.7

*Bold missense mutations.*

*\*Missense mutations detected by linkage disequilibrium.*

bacterial origin" ( $P = 4.9 \times 10^{-7}$  and  $6.2 \times 10^{-9}$ ), and "cellular response to interferon" ( $P = 1.82 \times 10^{-7}$  and  $1.86 \times 10^{-7}$ ) as the most significant functions associated with the SS gene risk factors tested alone or associated with the genes revealed by the LD analysis, respectively.

### Cell Type-Specific Analysis Revealed Activated Enhancer and Promoter Histone Markers at SS Risk Variants in B Cells

To further explore cell type specific activation in promoters and enhancers at SS risk variants and according to the critical role played in the disease by epithelial cells, lymphocytes, and macrophages, we selected from the 18 ENCODE available cells: the human lung adenocarcinoma cell line A549 for epithelial cells, the GM12878 lymphoblastoid cells for B cells, and the peripheral blood CD14<sup>+</sup> monocytes for macrophages. For these three cell types, we mapped SS risk variants to markers of active promoters (H3K4me2, H3K4me3, and H3K9Ac), and to markers of active enhancers (H3K36me3 and H3K4me1) (52). In addition, H3K27Ac was selected as a marker of activity, and H3K27me3 as an inactive marker of enhancers.

As shown in **Figure 4A** and with regards to the 21 promoter SS risk variants, the three active promoter markers (H3K4me2, H3K4me3, and H3K9Ac) were significantly enriched in B cells (GM12878) in contrast to the epithelial cells (A549) and monocytes ( $0.01 < P < 0.0006$ , Chi square with Yate's correction). The active marker H3K27Ac was enriched in B cells and monocytes in contrast to epithelial cells ( $P = 0.0001$  and  $P = 0.02$ , respectively).

The same analysis was performed with the 41 enhancer SS risk variants (**Figure 4B**) revealing an enrichment of the enhancer active marker H3K36me3 in both B cells and monocytes in contrast to A549 cells ( $P = 0.02$  and  $P = 0.005$ , respectively). The active marker H3K27Ac was enriched in B cells ( $P = 0.0001$ ), and, although not significant, there is a trend for a monocyte enrichment in contrast to epithelial cells. In summary, these findings highlight the critical role of epigenetic factors in B cells to control both promoter and enhancer SS risk variants, and in monocytes to control enhancer SS risk variants.

### FAM167A-BLK Locus

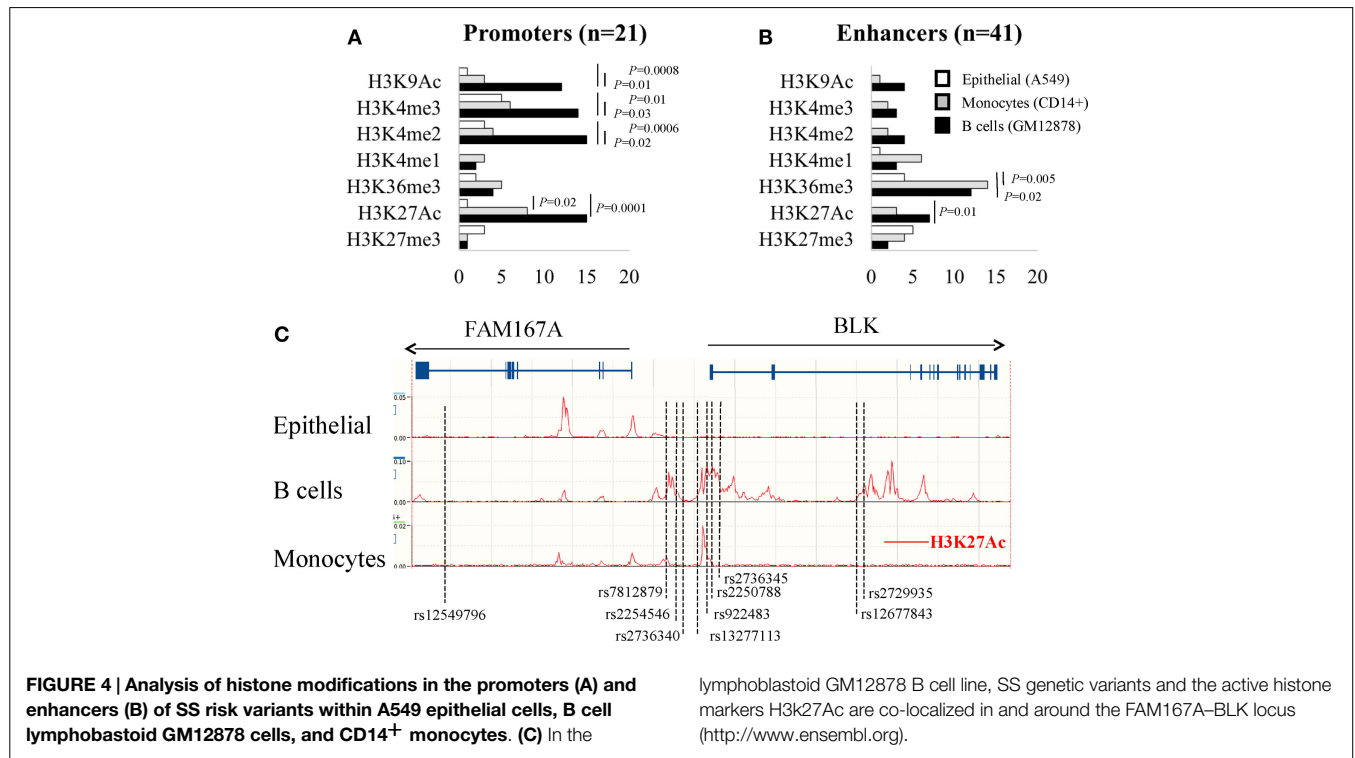
In order to validate our observations, and based on three reports, including the genome wide association study (GWAS) performed by Lessard et al., in 395 patients with SS and 1975 controls from European origins (31, 35, 41), the FAM167A-BLK locus (Chr 8:11421463-11564604) was selected to position the 8 FAM167A-BLK SS risk variants plus two 5'-UTR variants selected from the LD analysis and previously identified as lupus risk variants (53). These two SNPs are in high LD with 4/8 SS risk variants [rs922483 is in high LD with rs2736340 ( $r^2 = 0.81$ ), rs13277113 ( $r^2 = 0.83$ ), and rs2736345 ( $r^2 = 0.96$ ); and rs2250788 is in high LD with rs2254546 ( $r^2 = 0.98$ )]. As shown in **Figure 4C**, the 10 selected SNPs were positioned in the FAM167A-BLK locus revealing three groups. The first group contains an isolated SNP (rs12549796) that was present in an intronic part of the FAM167A gene. A second group ( $n = 7$ ) was present in the vicinity of the BLK promoter and exon 1, and a third group ( $n = 2$ ) was present ~35 kb downstream BLK promoter.

Next, as revealed by querying the Ensembl database using H3K27Ac to mark active promoters and enhancers, SNPs were positioned within 9/10 H3K27Ac active motifs in B cells (GM12878), which is in contrast to 2/10 H3K27Ac active motifs in monocytes, and none in epithelial cells. Such associations between genetic and epigenetic factors within regulatory elements in B cells for the FAM167A-BLK locus were further reinforced by using the RegulomeDB tool that summarizes results from the ENCODE and Epigenetic Roadmap programs. As indicated **Table 2**, the RegulomeDB tool supports that SS risk factors at FAM167A-BLK locus would predominantly affect B cells (lymphoblastoid and naive B cells) and, to a lesser extent, monocytes, T cells (naïve, TH2, and Treg), mesenchymal stem cells, and fibroblasts.

### Discussion

Primary SS is an autoimmune disease with a genetic basis in which at least 40 gene risk factors may be involved, including BLK, IRF5, STAT4, and the HLA locus. However, these genetic risk factors alone cannot explain all of the disease risk factors and, in particular, environmental risk factors (e.g., viruses, hormones . . .) that are likely to play a critical role in the process of the disease. Given the complexity of the disease, epigenetic analyses are conducted to provide new insights into the disease as DNA methylation patterns, chromatin structures, and microRNA are influenced both by the genetic machinery and by environmental factors (13, 54, 55). The primary role of the epigenome is to regulate, in a cell-specific manner, cellular development, and differentiation and such effects vary between individuals with age as revealed by testing identical twins (56), or between smokers and non-smokers (57). Furthermore, genetic variants and, in particular, non-coding and regulatory SNPs can influence cell type specific regions marked by accessible regions, thus opening new perspectives to better characterize disease risk factors and cell types contributing to the diseases which was the aim of the present *in silico* analysis.

Applied to SS, such strategy was fruitful in suggesting the existence of associations between genetic and epigenetic alterations in the setting of the disease. Indeed, a cell-specific overlap



**TABLE 2 | Summary of the cell type enrichment markers for FAM167-BLK variants according to the RegulomeDB prediction web tool.**

SNP	Promoter (histone markers)	Enhancer (histone markers)	Open chromatin (DNase)	eQTL	Pol II (ChIP-Seq)
rs12549796	No	Mesenchymal stem cells	Fibroblast	No	No
rs7812879	No	B lymphoblastoid, B cells, monocytes	No	B lymphoblastoid	No
rs2254546	No	B cells	No	B lymphoblastoid	No
rs2736340	No	B cells	No	B lymphoblastoid, monocytes	No
rs13277113	B lymphoblastoid	B cells, monocytes	B lymphoblastoid, B cells	B lymphoblastoid	No
rs922483	B lymphoblastoid, B cells, T cells, monocytes	Fibroblast	B lymphoblastoid, B cells, TH2, Treg	B lymphoblastoid	B lymphoblastoid
rs2250788	B lymphoblastoid, B cells, T cells, monocytes	Fibroblast	B lymphoblastoid, B cells	No	B lymphoblastoid
rs2736345	B lymphoblastoid, B cells, T cells	Fibroblast, Mesenchymal stem cells	B lymphoblastoid, B cells, TH2	B lymphoblastoid	B lymphoblastoid
rs12677843	No	No	No	No	No
rs2729935	No	B lymphoblastoid, B cells	No	No	No

exists between identified SS risk variants and the regulatory switches found by the ENCODE program, thus suggesting that DNA–protein binding and gene transcription are affected by the SNPs. Remarkably, almost all SS risk variants tested (94.4%) had *in silico* evidence of regulatory functions including the 3/4 missense SNPs and the 37/40 intronic SNPs. In addition and according to our *in silico* observations that need further confirmation, it could be postulated that SS risk variants control DNA-protein binding leading to the regulation of cell-specific promoters (Pol II, NF- $\kappa$ B, STATs), enhancers (NF- $\kappa$ B), and insulators (CTCF). These results also suggest that there is an effect on some common pathways (NF- $\kappa$ B, STATs) previously described to be affected in SS (10).

The genetic and epigenetic fine mapping of autoimmune risk factors was recently performed in 21 AID with the notable exception of SS (7). In line with our observations, it was observed that autoimmune risk variants were mostly non-coding (90%) and map predominantly to H3K27Ac positive immune-cell enhancers (60%) and promoters (8%). Next, a T cell signature was observed in nearly all of the AID tested except in lupus and primary biliary cirrhosis (two AID frequently associated with SS) that present a B cell signature, and type I diabetes with pancreatic islets. Finally, it was reported that autoimmune risk factors were enriched within binding sites for immune-related TFs, such as Pu-1 and NF- $\kappa$ B. As a consequence, the physiopathology of AID needs to be updated according to the recent progress in epigenetics (54).

Some limitations are inherent in this type of study. First, cells used in the ENCODE program are predominantly cell lines that are different from primary cells, such as the lymphoblastoid GM12878 B cell line, that results from EBV transformation of peripheral blood mononuclear cell using phytohemagglutinin as a mitogen. New results using primary cells, which are available from the Epigenome Roadmap program further supports similarities between lymphoblastoid GM12878 B cells and purified human CD20<sup>+</sup> B cells as we observed for the FAM167A–BLK locus when using the RegulomeDB tool. Second, although the ENCODE program is an extensive resource; the program is limited to certain cell types and DNA binding elements that limit the interpretation. Third, many SNPs are in tight genetic linkage and, as a consequence, genetic risk variants may not be causal, but rather reveal the presence of a linked SNP that is functionally relevant to the pathogenesis. Such a situation may be suspected for different SNPs tested from our selection since the LD analysis has revealed new missense mutations as well as new gene risk factors that need to be tested, such as chemokines (CCL7 and CCL11), cytokines (IL2) and the miRNA4752. Two SNPs in CCL11 have been associated with germinal center-like structure formation in SS patients (47), and CCL11 (Eotaxin) circulating levels were reduced in SS patients (58).

While the function of the protein encoded by FAM167A is unknown, the tyrosine kinase BLK controls B cell development and is activated after B cell receptor engagement. The FAM167A–BLK locus is associated with several AID, such as SS, lupus, rheumatoid arthritis, scleroderma, and vasculitis. Among them, two risk alleles (rs132771113 and rs9222483) are known to control BLK transcription during B cell development (53, 59). Moreover, by integrating epigenetic fine mapping, we further observed that all BLK-associated SS risk variants, including the two previously described, were all present within epigenetic marks in B cells. Altogether, this example illustrates the value of integrating epigenetic resources for investigating the complex mechanisms by which non-coding risk variants could modulate gene expression.

Last but not least, the B cell subset identified from our *in silico* study deserves several comments. First, B cell qualitative abnormalities have been reported in SS with important perturbations

in peripheral blood B cell profiling and B cell migration within exocrine glands (5, 60). Second, the association between the incidences of B cells in salivary gland epithelial cells has been addressed as well as the formation of ectopic germinal centers and transformation to B cell lymphoma (61). Third, non-HLA genetic associations in SS are predominantly related to B cell genes (BTK, CD40, EBF-1...) as we observed in our selection. Fourth, a recent study reported DNA methylation changes in B cells and such changes predominate within loci containing SS risk factors (16). Altogether, these observations provide rationale for targeting B cells in SS along with the observations that depleting B cells with Rituximab or targeting BAFF with Belimumab are both effective (62, 63).

In conclusion, we have tested, as a proof of concept, a novel approach that integrates both epigenetic information and results from genomic analysis to further enhance the value of the genetic risk factors highlighted in complex diseases, such as SS. Future work needs to be done in order to confirm experimentally the cellular specificity and the functional role of the characterized regulatory SNPs. Another consequence is that such approach could be used to select and/or propose future therapeutic drugs in SS as epigenetic mechanisms are reversible.

## Acknowledgments

Authors are grateful to Simone Forest and Genevieve Michel for their secretarial assistance. This work is supported by the Ligue Contre le Cancer, the Region Bretagne, the Association Française du Gougerot Sjögren et des Syndrome Secs (AFGS), the Association Laurette Fugain (grant 1674), and the Association Dentaire Française (ADF). The research leading to these results has received support from the Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking under grant agreement no. 115565, resources of which are composed of financial contribution from the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) and EFPIA companies' in-kind contribution.

## Supplementary Material

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2015.00437>

## References

- Mavragani CP, Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome. *Annu Rev Pathol* (2014) **9**:273–85. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104728
- Voulgarelis M, Dafni UG, Isenberg DA, Moutsopoulos HM. Malignant lymphoma in primary Sjogren's syndrome: a multicenter, retrospective, clinical study by the European concerted action on Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* (1999) **42**:1765–72. doi:10.1002/1529-0131(199908)4
- Baimpa E, Dahabreh IJ, Voulgarelis M, Moutsopoulos HM. Hematologic manifestations and predictors of lymphoma development in primary Sjogren syndrome: clinical and pathophysiologic aspects. *Medicine (Baltimore)* (2009) **88**:284–93. doi:10.1097/MD.0b013e3181b76ab5
- Tobon GJ, Renaudineau Y, Hillion S, Cornec D, Devauchelle-Pensec V, Youinou P, et al. The FMS-like tyrosine kinase 3 ligand, a mediator of B cell survival, is also a marker of lymphoma in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* (2010) **62**:3447–56. doi:10.1002/art.27611
- Cornec D, Saraux A, Pers JO, Jousse-Joulin S, Marhadour T, Roguedas-Contios AM, et al. Diagnostic accuracy of blood B-cell subset profiling and autoimmunity markers in Sjogren's syndrome. *Arthritis Res Ther* (2014) **16**:R15. doi:10.1186/ar4442
- Cornec D, Saraux A, Jousse-Joulin S, Pers JO, Boisrame-Gastrin S, Renaudineau Y, et al. The differential diagnosis of dry eyes, dry mouth, and parotidomegaly: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* (2014). doi:10.1007/s12016-014-8431-1
- Farh KK, Marson A, Zhu J, Kleiweitfeld M, Housley WJ, Beik S, et al. Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature* (2015) **518**:337–43. doi:10.1038/nature13835
- Kundaje A, Meuleman W, Ernst J, Bilenky M, Yen A, Heravi-Moussavi A, et al. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature* (2015) **518**:317–30. doi:10.1038/nature14248
- Cruz-Tapias P, Rojas-Villarraga A, Maier-Moore S, Anaya JM. HLA and Sjogren's syndrome susceptibility. A meta-analysis of worldwide studies. *Autoimmun Rev* (2012) **11**:281–7. doi:10.1016/j.autrev.2011.10.002
- Burbelo PD, Ambatipudi K, Alevizos I. Genome-wide association studies in Sjogren's syndrome: what do the genes tell us about disease pathogenesis? *Autoimmun Rev* (2014) **13**:756–61. doi:10.1016/j.autrev.2014.02.002



11. Brooks WH, Le Dantec C, Pers JO, Youinou P, Renaudineau Y. Epigenetics and autoimmunity. *J Autoimmun* (2010) **34**:J207–19. doi:10.1016/j.jaut.2009.12.006
12. Konsta OD, Thabet Y, Le Dantec C, Brooks WH, Tzioufas AG, Pers JO, et al. The contribution of epigenetics in Sjogren's syndrome. *Front Genet* (2014) **5**:71. doi:10.3389/fgene.2014.00071
13. Konsta OD, Le Dantec C, Brooks WH, Renaudineau Y. Genetics and epigenetics of autoimmune diseases. *eLS* (2015):1–9. doi:10.1002/9780470015902.a0023593
14. Thabet Y, Le Dantec C, Ghedira I, Devauchelle V, Cornec D, Pers JO, et al. Epigenetic dysregulation in salivary glands from patients with primary Sjogren's syndrome may be ascribed to infiltrating B cells. *J Autoimmun* (2013) **41**:175–81. doi:10.1016/j.jaut.2013.02.002
15. Altork N, Coit P, Hughes T, Koelsch KA, Stone DU, Rasmussen A, et al. Genome-wide DNA methylation patterns in naive CD4+ T cells from patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheumatol* (2014) **66**:731–9. doi:10.1002/art.38264
16. Miceli-Richard C, Wang-Renault SF, Boudaoud S, Busato F, Lallemand C, Bethune K, et al. Overlap between differentially methylated DNA regions in blood B lymphocytes and genetic at-risk loci in primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* (2015). doi:10.1136/annrheumdis-2014-206998
17. Le Dantec C, Varin MM, Brooks WH, Pers JO, Youinou P, Renaudineau Y. Epigenetics and Sjogren's syndrome. *Curr Pharm Biotechnol* (2012) **13**:2046–53. doi:10.2174/138920112802273326
18. Le Dantec C, Vallet S, Brooks WH, Renaudineau Y. Human endogenous retrovirus group e and its involvement in diseases. *Viruses* (2015) **7**:1238–57. doi:10.3390/v7031238
19. Nakken B, Jonsson R, Bolstad AI. Polymorphisms of the Ro52 gene associated with anti-Ro 52-kd autoantibodies in patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* (2001) **44**:638–46. doi:10.1002/1529-0131(200103)44
20. Correa PA, Gomez LM, Cadena J, Anaya JM. Autoimmunity and tuberculosis. opposite association with TNF polymorphism. *J Rheumatol* (2005) **32**:219–24.
21. Gomez LM, Anaya JM, Gonzalez CI, Pineda-Tamayo R, Otero W, Arango A, et al. PTPN22 C1858T polymorphism in Colombian patients with autoimmune diseases. *Genes Immun* (2005) **6**:628–31. doi:10.1038/sj.gene.6364261
22. Miceli-Richard C, Comets E, Loiseau P, Puechal X, Hachulla E, Mariette X. Association of an IRF5 gene functional polymorphism with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* (2007) **56**:3989–94. doi:10.1002/art.23142
23. Korman BD, Alba MI, Le JM, Alevizos I, Smith JA, Nikolov NP, et al. Variant form of STAT4 is associated with primary Sjogren's syndrome. *Genes Immun* (2008) **9**:267–70. doi:10.1038/gene.2008.1
24. Nordmark G, Kristjansdottir G, Theander E, Eriksson P, Brun JG, Wang C, et al. Additive effects of the major risk alleles of IRF5 and STAT4 in primary Sjogren's syndrome. *Genes Immun* (2009) **10**:68–76. doi:10.1038/gene.2008.94
25. Delgado-Vega AM, Castiblanco J, Gomez LM, Diaz-Gallo LM, Rojas-Villarraga A, Anaya JM. Bcl-2 antagonist killer 1 (BAK1) polymorphisms influence the risk of developing autoimmune rheumatic diseases in women. *Ann Rheum Dis* (2010) **69**:462–5. doi:10.1136/ard.2008.100818
26. Gestermann N, Mekinian A, Comets E, Loiseau P, Puechal X, Hachulla E, et al. STAT4 is a confirmed genetic risk factor for Sjogren's syndrome and could be involved in type 1 interferon pathway signaling. *Genes Immun* (2010) **11**:432–8. doi:10.1038/gene.2010.29
27. Iwamoto N, Kawakami A, Arima K, Nakamura H, Kawashiri SY, Tamai M, et al. Regulation of disease susceptibility and mononuclear cell infiltration into the labial salivary glands of Sjogren's syndrome by monocyte chemoattractant protein-1. *Rheumatology (Oxford)*. (2010) **49**:1472–8. doi:10.1093/rheumatology/keq079
28. Maiti AK, Kim-Howard X, Viswanathan P, Guillen L, Rojas-Villarraga A, Deshmukh H, et al. Confirmation of an association between rs6822844 at the IL2-IL21 region and multiple autoimmune diseases: evidence of a general susceptibility locus. *Arthritis Rheum* (2010) **62**:323–9. doi:10.1002/art.27222
29. Palomino-Morales RJ, Diaz-Gallo LM, Witte T, Anaya JM, Martin J. Influence of STAT4 polymorphism in primary Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* (2010) **37**:1016–9. doi:10.3899/jrheum.091007
30. Appel S, Le Hellard S, Bruland O, Brun JG, Omdal R, Kristjansdottir G, et al. Potential association of muscarinic receptor 3 gene variants with primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* (2011) **70**:1327–9. doi:10.1136/ard.2010.138966
31. Nordmark G, Kristjansdottir G, Theander E, Appel S, Eriksson P, Vasaitis L, et al. Association of EBF1, FAM167A(C8orf13)-BLK and TNFSF4 gene variants with primary Sjogren's syndrome. *Genes Immun* (2011) **12**:100–9. doi:10.1038/gene.2010.44
32. Bolstad AI, Le Hellard S, Kristjansdottir G, Vasaitis L, Kvarnstrom M, Sjowall C, et al. Association between genetic variants in the tumour necrosis factor/lymphotoxin alpha/lymphotoxin beta locus and primary Sjogren's syndrome in Scandinavian samples. *Ann Rheum Dis* (2012) **71**:981–8. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200446
33. Cay HF, Sezer I, Dogan S, Felek R, Aslan M. Polymorphism in the TNF-alpha gene promoter at position -1031 is associated with increased circulating levels of TNF-alpha, myeloperoxidase and nitrotyrosine in primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* (2012) **30**:843–9.
34. Kong F, Li JX, Li P, Li YZ, Zhang FC, Zhang J. Association of TNFSF4 polymorphisms with susceptibility to primary Sjogren's syndrome and primary biliary cirrhosis in a Chinese Han population. *Clin Exp Rheumatol* (2013) **31**:546–51.
35. Lessard CJ, Li H, Adrianto I, Ice JA, Rasmussen A, Grundahl KM, et al. Variants at multiple loci implicated in both innate and adaptive immune responses are associated with Sjogren's syndrome. *Nat Genet* (2013) **45**:1284–92. doi:10.1038/ng.2792
36. Li Y, Zhang K, Chen H, Sun F, Xu J, Wu Z, et al. A genome-wide association study in Han Chinese identifies a susceptibility locus for primary Sjogren's syndrome at 7q11.23. *Nat Genet* (2013) **45**:1361–5. doi:10.1038/ng.2779
37. Nocturne G, Boudaoud S, Miceli-Richard C, Viengchareun S, Lazure T, Nititham J, et al. Germline and somatic genetic variations of TNFAIP3 in lymphoma complicating primary Sjogren's syndrome. *Blood* (2013) **122**:4068–76. doi:10.1182/blood-2013-05-503383
38. Nordmark G, Wang C, Vasaitis L, Eriksson P, Theander E, Kvarnstrom M, et al. Association of genes in the NF-kappaB pathway with antibody-positive primary Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol* (2013) **78**:447–54. doi:10.1111/sji.12101
39. Rusakiewicz S, Nocturne G, Lazure T, Semeraro M, Flament C, Caillat-Zucman S, et al. NCR3/NKp30 contributes to pathogenesis in primary Sjogren's syndrome. *Sci Transl Med* (2013) **5**:195ra196. doi:10.1126/scitranslmed.3005727
40. Sun F, Li P, Chen H, Wu Z, Xu J, Shen M, et al. Association studies of TNFSF4, TNFAIP3 and FAM167A-BLK polymorphisms with primary Sjogren's syndrome in Han Chinese. *J Hum Genet* (2013) **58**:475–9. doi:10.1038/jhg.2013.26
41. Sun F, Xu J, Wu Z, Li P, Chen H, Su J, et al. Polymorphisms in the FAM167A-BLK, but not BANK1, are associated with primary Sjogren's syndrome in a Han Chinese population. *Clin Exp Rheumatol* (2013) **31**:704–10.
42. Zheng J, Yin J, Huang R, Petersen F, Yu X. Meta-analysis reveals an association of STAT4 polymorphisms with systemic autoimmune disorders and anti-dsDNA antibody. *Hum Immunol* (2013) **74**:986–92. doi:10.1016/j.humimm.2013.04.034
43. Du Y, Su Y, He J, Yang Y, Shi Y, Cui Y, et al. Impact of the leucocyte immunoglobulin-like receptor A3 (LILRA3) on susceptibility and subphenotypes of systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* (2014). doi:10.1136/annrheumdis-2013-204441
44. Nezos A, Papageorgiou A, Fragoulis G, Ioakeimidis D, Koutsilieris M, Tzioufas AG, et al. B-cell activating factor genetic variants in lymphomagenesis associated with primary Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* (2014) **51**:89–98. doi:10.1016/j.jaut.2013.04.005
45. Norheim KB, Le Hellard S, Nordmark G, Harboe E, Goransson L, Brun JG, et al. A possible genetic association with chronic fatigue in primary Sjogren's syndrome: a candidate gene study. *Rheumatol Int* (2014) **34**:191–7. doi:10.1007/s00296-013-2850-9
46. Paradowska-Gorycka A, Raszkievicz B, Jurkowska M, Felis-Giemza A, Romanowska-Prochnicka K, Manczak M, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the IL27 gene with rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* (2014) **80**:298–305. doi:10.1111/sji.12209
47. Reksten TR, Johnsen SJ, Jonsson MV, Omdal R, Brun JG, Theander E, et al. Genetic associations to germinal centre formation in primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* (2014) **73**:1253–8. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202500
48. Song GG, Bae SC, Seo YH, Kim JH, Choi SJ, Ji JD, et al. Meta-analysis of functional MBL polymorphisms. Associations with rheumatoid arthritis and primary Sjogren's syndrome. *Z Rheumatol* (2014) **73**:657–64. doi:10.1007/s00393-014-1408-x
49. Zheng J, Huang R, Huang Q, Deng F, Chen Y, Yin J, et al. The GTF2I rs117026326 polymorphism is associated with anti-SSA-positive primary

- Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* (2015) **54**:562–4. doi:10.1093/rheumatology/keu466
50. Boyle AP, Hong EL, Hariharan M, Cheng Y, Schaub MA, Kasowski M, et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res* (2012) **22**:1790–7. doi:10.1101/gr.137323.112
  51. Ward LD, Kellis M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucl Acids Res* (2012) **40**:D930–4. doi:10.1093/nar/gkr917
  52. Ernst J, Kellis M. ChromHMM: automating chromatin-state discovery and characterization. *Nat Methods* (2012) **9**:215–6. doi:10.1038/nmeth.1906
  53. Guthridge JM, Lu R, Sun H, Sun C, Wiley GB, Dominguez N, et al. Two functional lupus-associated BLK promoter variants control cell-type- and developmental-stage-specific transcription. *Am J Hum Genet* (2014) **94**:586–98. doi:10.1016/j.ajhg.2014.03.008
  54. Le Dantec C, Brooks WH, Renaudineau Y. Epigenomic revolution in autoimmune diseases. *World J Immunol* (2015) **5**:62–5. doi:10.5411/wji.v5.i2.00
  55. Le Dantec C, Gazeau P, Mukherjee S, Brooks WH, Renaudineau Y. How the environment influences epigenetics, DNA methylation, and autoimmune diseases. *Epigenetics and Dermatology*. Elsevier (2015). p. 467–87.
  56. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2005) **102**:10604–9. doi:10.1073/pnas.0500398102
  57. Tsaprouni LG, Yang TP, Bell J, Dick KJ, Kanoni S, Nisbet J, et al. Cigarette smoking reduces DNA methylation levels at multiple genomic loci but the effect is partially reversible upon cessation. *Epigenetics* (2014) **9**:1382–96. doi:10.4161/15592294.2014.969637
  58. Szodoray P, Alex P, Brun JG, Centola M, Jonsson R. Circulating cytokines in primary Sjogren's syndrome determined by a multiplex cytokine array system. *Scand J Immunol* (2004) **59**:592–9. doi:10.1111/j.0300-9475.2004.01432.x
  59. Hom G, Graham RR, Modrek B, Taylor KE, Ortmann W, Garnier S, et al. Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *N Engl J Med* (2008) **358**:900–9. doi:10.1056/NEJMoa0707865
  60. Alonso R, Buors C, Le Dantec C, Hillion S, Pers JO, Saraux A, et al. Aberrant expression of CD6 on B-cell subsets from patients with Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* (2010) **35**:336–41. doi:10.1016/j.jaut.2010.07.005
  61. Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* (2010) **34**:400–7. doi:10.1016/j.jaut.2009.10.004
  62. Devauchelle-Pensec V, Pennec Y, Morvan J, Pers JO, Daridon C, Jousse-Joulin S, et al. Improvement of Sjogren's syndrome after two infusions of rituximab (anti-CD20). *Arthritis Rheum* (2007) **57**:310–7. doi:10.1002/art.22536
  63. Pontarini E, Fabris M, Quartuccio L, Cappeletti M, Calcaterra F, Roberto A, et al. Treatment with belimumab restores B cell subsets and their expression of B cell activating factor receptor in patients with primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* (2015) **54**:1429–34. doi:10.1093/rheumatology/kev005

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Konsta, Le Dantec, Charras, Brooks, Arleevskaya, Bordron and Renaudineau. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

**Supplementary table 1:** Genetic risk factors associated with Sjögren's syndrome (see material and methods section for more details).

Gene	Function	Locus	SNP	Genomic location (GRCh38)	Annotation (VEP tool)	Functional relevance	ENCODE & Roadmap projects	Average OR (95% CI)	Patients / controls tested	Disease specificity	Reference
BAK1	Bcl2 antagonist	6p21.31	rs513349	6:33573942	Intron	Enhancer + Insulator (CTCF)	TF + DNase peak + Histone markers	0.51 (0.36-0.72)	99/252	SLE	(Delgado-Vega <i>et al.</i> , 2010)
BAK1	Bcl2 antagonist	6p21.31	rs5745582	6:33578721	Intron	Promoter (Pol2) + Insulator (CTCF)	eQTL + TF binding	1.56 (1.09-2.25)	99/252	-	(Delgado-Vega <i>et al.</i> , 2010)
BCL2	Apoptosis regulator	18q21.33	rs7230970	18:63153843	Intron	Promoter (Pol2)	TF + Tbp motif	0.78 (0.65-0.93)	540/532	-	(Nordmark <i>et al.</i> , 2011)
C4A	Complement	6p21.33	rs396458	6:32037872	Downstream	Enhancer	Histone markers	0.58 (0.39-0.86)	540	-	(Bolstad <i>et al.</i> , 2012)
CCL2	Chemokine	17q12	rs1024611	17:34252769	Upstream	Promoter (Pol2, NFKB1, PU1)	TF + DNase peak/footprint + IRF2	0.48 (0.23-1.00)	52/164	RA, IBD, DID, infection, cancer	(Iwamoto <i>et al.</i> , 2010)
CD14	Monocyte differentiation	5q31.3	rs2569190	5:140633331	5' UTR	Promoter (STAT3, Jun)	eQTL + TF + DNase peak/footprint	1.32 (1.11-1.57)	540/532	IBD, Allergy	(Nordmark <i>et al.</i> , 2011)
CD40	TNF receptor 5	20q13.12	rs1883833	20:46136819	Intergenic	Unknown	No	0.75 (0.63-0.89)	540/532	-	(Nordmark <i>et al.</i> , 2011)
CD40LG	CD40 ligand	Xq26.3	rs3092949	X:136645176	Upstream	Enhancer	Histone markers	0.77 (0.64-0.93)	540/532	-	(Nordmark <i>et al.</i> , 2011)
CHRM3	Muscarinic receptor	1q41	rs7548522	1:239835325	Intron	Enhancer	Histone markers	1.93 (1.24-3.01)	530/532	-	(Appel <i>et al.</i> , 2011)
CXCR5	Chemokine	11q23.3	rs7119038	11:118867572	Intergenic	Enhancer (H3K27me3)	Histone mark	0.74 (0.64-0.86)	395/1975	-	(Lessard <i>et al.</i> , 2013)
EBF1	EarLyB B-cell factor	5q33.3	rs3843489	5:158753215	Intron	Enhancer (Pax5)	TF	1.68 (1.29-2.18)	540/532	-	(Nordmark <i>et al.</i> , 2011)
EBF1	EarLyB B-cell factor	5q33.3	rs869593	5:159003867	Intron	Enhancer (Fos, Myc)	TF + DNase peak	-	540/532	-	(Nordmark <i>et al.</i> , 2011)
FAM167A-BLK	B cell kinase	8p23.1	rs12549796	8:11432188	Intron	Insulator (CTCF)	DNase peak	1.37 (1.15-1.63)	540/532	-	(Nordmark <i>et al.</i> , 2011)
FAM167A-BLK	B cell kinase	8p23.1	rs7812879	8:11482672	Intergenic	Enhancer	eQTL	0.86 (0.71-1.06)	555/597	SLE	(Sun <i>et al.</i> , 2013a)
FAM167A-BLK	B cell kinase	8p23.1	rs2254546	8:11486171	Intergenic	Enhancer	eQTL+NFAT binding	0.85 (0.69-1.04)	555/597	SLE, Kawasaki	(Sun <i>et al.</i> , 2013a)
FAM167A-BLK	B cell kinase	8p23.1	rs2736340	8:11486464	Upstream	Enhancer	eQTL + TF + Histone markers	-	540/577	SLE, PR, SSc, Kawasaki	(Sun <i>et al.</i> , 2013b)
FAM167A-BLK	B cell kinase	8p23.1	rs13277113	8:11491677	Upstream	Promoter (Pol2, MEF2A)	eQTL + TF binding + DNase peak	-	540/577	SLE, RA,SSc	(Sun <i>et al.</i> , 2013b)
FAM167A-BLK	B cell kinase	8p23.1	rs2736345	8:11494976	Intron	Promoter (Pol2, NFKB1)	eQTL + TF + DNase peak	1.30 (1.16-1.47)	395/1975	-	(Lessard <i>et al.</i> , 2013)

FAM167A-BLK	B cell kinase	8p23.1	rs12677843	8:11529680	Intron	Enhancer	Histone markers		540/532	-	(Nordmark <i>et al.</i> , 2011)
FAM167A-BLK	B cell kinase	8p23.1	rs2729935	8:11532274	Intron	Enhancer	Histone markers	1.30 (1.16-1.46)	395/1975	-	(Lessard <i>et al.</i> , 2013)
GTF2I	Transcription factor	7q 11.3	rs117026326	7:74711703	Intron	Enhancer	histone markers, MECP2 motif	2.20 (1.99-2.43) 1.70 (1.01-2.88)	542/1050 72/196	-	(Li <i>et al.</i> , 2013) (Zheng <i>et al.</i> , 2015)
HLA DPB1	Ag presentation	6p21.32	rs4282438	6:33104395	Intron	Enhancer	Histone markers	1.58 (1.45-1.72)	542/1050	cancer	(Li <i>et al.</i> , 2013)
HLA DQA1	Ag presentation	6p21.32	rs9271588	6:32623176	Intron	Promoter (Pol2, NFKB1, OCT2, PU1, MEF2A)	eQTL + TF + DNase peak/footprint	0.57 (0.53-0.63) 0.41 (0.36-0.46)	542/1050 395/1975	-	(Li <i>et al.</i> , 2013) (Lessard <i>et al.</i> , 2013)
HLA-DQA1	Ag presentation	6p21.32	rs116232857	6:32629287	Intron	Enhancer	Histone mark	3.53 (3.03-4.11)	395/1975	-	(Lessard <i>et al.</i> , 2013)
HLA-DQA1	Ag presentation	6p21.32	rs2187668	6:32638107	Intron	Promoter (Pol2)	eQTL + TF + DNase peak	2.47	574/451	SLE, CD, AIH, DID, RA, SSc, IBD	(Rusakiewicz <i>et al.</i> , 2013)
HLA-DQB1	Ag presentation	6p21.32	rs3129716	6:32689659	Intron	Promoter (Pol2, NFKB1, PAX5, OCT2)	eQTL + TF	3.45 (2.97-4.00)	395/1975	-	(Lessard <i>et al.</i> , 2013)
HLA-DRA	Ag presentation	6p21.32	rs3135394	6:32440720	Intron	Promoter (Pol2, STAT5)	TF	3.52 (3.02-4.10)	395/1975	-	(Lessard <i>et al.</i> , 2013)
HLA-DRA	Ag presentation	6p21.32	rs112357081	6:32451499	Intergenic (insertion)	Unknown	-	2.89 (2.43-3.44)	395/1975	-	(Lessard <i>et al.</i> , 2013)
ICA1	Islet cell autoantigen	7p21.3	rs17143355	7:8119939	Intron	target of NMD	No	0.66 (0.51-0.85)	540/532	-	(Nordmark <i>et al.</i> , 2011)
IKBKE	NF-KB pathway	1q32.1	rs17433804		Intron	Enhancer	TF + DNase peak		76/244*		(Reksten <i>et al.</i> , 2014)
IKBKE	NF-KB pathway	1q32.1	rs11117909	1:206476609	Intron	Enhancer	DNase peak + Histone mark	0.63 (0.47-0.84)	540/532	-	(Nordmark <i>et al.</i> , 2011)
IL10	cytokine	1q32.1	rs3024498	1:206768134	3' UTR	Enhancer (NFKB1)	TF + DNase peak	0.76 (0.62-0.94)	540/532	cancer, infections,	(Nordmark <i>et al.</i> , 2011)
IL12A	cytokine	3q25.33	rs485497	3:160001345	Intron	Enhancer	DNase peak	1.29 (1.16-1.46)	395/1975	lymphoma B	(Lessard <i>et al.</i> , 2013)
IL17F	cytokine	6p12.2	rs763780	6:52236941	Exon	missense	No		22	RA, SSc, IBD, GD, AITD, ITP, VKH, allergy, infections, cancer	(Paradowska-Gorycka <i>et al.</i> , 2014)
IL21	cytokine	4q27	rs6822844	4:122588266	Downstream	Enhancer	Histone markers	0.46 (0.23-0.95)	94/368	SLE, RA, DID, CD	(Maiti <i>et al.</i> , 2010)
IRF5	Transcription factor	7q32.1	rs3757387	7:128936032	Upstream	Enhancer	WRNIP1 binding	1.44 (1.29-1.62)	395/1975	-	(Lessard <i>et al.</i> , 2013)
IRF5	Transcription factor	7q32.1	rs2004640	7:128938247	Intron	Promoter (Pol2, E2F, EGR1) + Splice donor variant	TF + DNase peak	1.93 (1.15-3.42)	212/162	-	(Miceli-Richard <i>et al.</i> , 2007)
IRF5	Transcription factor	7q32.1	rs10488631	7:128954129	Downstream	Enhancer (GATA2)	TF + DNase peak	1.57 (1.23-1.99)	368/711	SSc, RA, SLE	(Nordmark <i>et al.</i> , 2009)

LILRA3	Receptor	19q13.4	rs103294	19:54293995	Downstream	Enhancer	eQTL + Histone markers	2.32 (1.38-3.88)	403/2169	SLE, RA, MS, cancer	(Du <i>et al.</i> , 2014)
LTA	Cytokine	6p21.33	rs909253	6:31572536	Intron	Promoter (Pol2, NFKB1, STAT5A)	TF + DNase peak	1.59 (1.34-1.89)	527/532	Myocardial infarction, psoriatic arthritis	(Bolstad <i>et al.</i> , 2012)
MBL2	Complement	10q21.1	rs1800450	10:52771475	Exon	Enhancer (p300) + Misense	TF + Histone markers	0.69 (0.54-0.92)	280/515	RA, infection	(Song <i>et al.</i> , 2014)
NCR3	Receptor	6p21.32	rs11575837	6:31592893	5' UTR	Promoter (Pol2, Egr1)	TF + DNase peak	0.38	574/451	Infection	(Rusakiewicz <i>et al.</i> , 2013)
NCR3	Receptor	6p21.32	rs2736191	6:31593133	Upstream	Promoter (Pol2, Egr1)	TF + DNase peak	0.43	574/451	infection	(Rusakiewicz <i>et al.</i> , 2013)
NFKB1	Transcription factor	4q24	rs4648022	4:102575280	Intron	Enhancer (USF1)	TF + Histone markers	0.64 (0.47-0.88)	540/532	lymphoma	(Nordmark <i>et al.</i> , 2011)
OR2B11 (NLRP3)	cryopyrin	1q44	rs10732302	1:247458926	Intergenic	Unknown	DNase peak	0.81 (0.67-0.99)	1105/4460		(Nordmark <i>et al.</i> , 2013)
PKN1	Protein kinase C	19p13.12	rs3786654	19:14447009	Intron	Promoter	Histone markers	1.3 (1.0-1.7)	193/376		(Norheim <i>et al.</i> , 2014)
PKN1	Protein kinase C	19p13.12	rs10416904	19:14468001	Intron	Enhancer + Insulator (CTCF) + target of NMD	TF + DNase peak + histone markers	1.6 (1.1-2.5)	193/376		(Norheim <i>et al.</i> , 2014)
PKN1	Protein kinase C	19p13.12	rs2241362	19:14472960	Downstream	Promoter (Pol2, Taf1)	TF + DNase peak	0.9 (0.7-1.3)	193/376		(Norheim <i>et al.</i> , 2014)
PTPN22		1p13.2	rs2476601	1:113834846	Exon	Enhancer (STAT3) + Misense	TF + DNase peak/footprint	2.42 (1.24-4.75)	70/308	RA, DID, SLE, AITD, Addison	(Gomez <i>et al.</i> , 2005)
SLC25A40	Mitochondrial Carrier	7q21.12	rs10276819	7:87852190	Intron	Enhancer + target of NMD	No	0.5 (0.2-0.8)	193/376		(Norheim <i>et al.</i> , 2014)
STAT1	Transcription factor	2q32.2	rs13005843	2:190989900	Intron	Promoter (Pol2) + target of NMD	TF	0.55 (0.37-0.82)	391		(Nordmark <i>et al.</i> , 2011)
STAT4	Transcription factor	2q 32.2	rs10168266	2:191071078	Intron	Enhancer	Histone markers	1.44 (1.32-1.57)	542/1050	SLE, PBC, IBD, SSc	(Li <i>et al.</i> , 2013)
STAT4	Transcription factor	2q 32.2	rs7574865	2:191099907	Intron	Unknown	No	1.46 (1.09-1.97) 1.40 (1.21-1.62) 1.32 (1.01-1.73)	124/1143	SLE, PBC, SSc, IBD	(Korman <i>et al.</i> , 2008) (Palomino-Morales <i>et al.</i> , 2010) (Zheng <i>et al.</i> , 2013)
STAT4	Transcription factor	2q 32.2	rs10181656	2:191105153	Intron	Insulator (CTCF)	TF + DNase peak		368/711	CBP, IBD	(Nordmark <i>et al.</i> , 2009)
STAT4	Transcription factor	2q 32.2	rs7582694	2:191105394	Intron	Enhancer (Fos, Esr1)	TF + DNase peak	1.41 (1.14-1.73) 1.40 (1.15-1.70) 1.57 (1.27-1.93)	368/711 540/532 186/152	SLE, RA, SSc	(Nordmark <i>et al.</i> , 2009) (Nordmark <i>et al.</i> , 2011)
TNF	Cytokine	6p21.33	rs1799964	6:31574531	Downstream	Promoteur (Pol2) + Insulator (CTCF)	TF + DNase peak	2.83 (0.27-7.8)	65/58	CD	(Gestermann <i>et al.</i> , 2010; Cay <i>et al.</i> , 2012)
TNF	Cytokine	6p21.33	rs1800629	6:31575254	Upstream	Enhancer (Egr1, cMyc)	eQTL + TF + DNase peak +	2.00 (1.61-2.49) 2.9	527/532 67/430	SLE, RA, AITD, IBD,	(Bolstad <i>et al.</i> , 2012) (Correa <i>et al.</i> , 2005)

							SP1 motif				AIH, DID, cancer, allergy, lymphoma B, infection, Polymyosite, SLE, SSc SLE, RA, Lymphoma B	
TNFA1P3	Nf Kappa B signalling	6q23	rs5029939	6:137874586	Intron	Promoter (Pol2, IKZF1)	TF + DNase peak	1.67 (1.40-1.99)	542/1050			(Li <i>et al.</i> , 2013)
TNFA1P3	Nf Kappa B signalling	6q23	rs2230926	6:137874929	Exon	Promoter (Pol2) + Misense	TF + DNase peak	1.28 (0.99-1.65)	1105/4460			(Nordmark <i>et al.</i> , 2013)
TNFSF13B (BAFF)	B cell activating factor	13q33.3	rs9514828	13:108269025	Upstream	Enhancer (IRF4)	TF + DNase peak	3.36	574/451			(Li, Zhang <i>et al.</i> 2013) (Nocturne <i>et al.</i> , 2013)
TNFSF13B (BAFF)	B cell activating factor	13q33.3	rs12583006	13:108285104	Intron	Enhancer	Histone markers	1.30 1.01-1.68)	1105/4460			(Nordmark <i>et al.</i> , 2013)
TNFSF4 (CD252)	OX40 ligand	1q25.1	rs1234313	1:173197108	Intron	Enhancer	Histone markers	0.23 (0.08-0.71)	111/137			(Nezos <i>et al.</i> , 2014)
TNFSF4 (CD252)	OX40 ligand	1q25.1	rs2205960	1:173222336	Upstream	Enhancer (NFKB1, MEF2A)	TF + DNase peak	0.52 (0.2-1.31)	111/137			(Nezos <i>et al.</i> , 2014)
TNFSF4 (CD252)	OX40 ligand	1q25.1	rs1234314	1:173208253	Upstream	Enhancer	DNase peak		250/393			(Kong <i>et al.</i> , 2013)
TNFSF4 (CD252)	OX40 ligand	1q25.1	rs1234315	1:173209324	Upstream	Enhancer	DNase peak		250/393			(Kong <i>et al.</i> , 2013)
TNFSF4 (CD252)	OX40 ligand	1q25.1	rs2205960	1:173222336	Upstream	Enhancer (NFKB1, BATF)	Histone markers	1.34 (1.14-1.64)	540/532			(Nordmark <i>et al.</i> , 2011)
TNIP1	NF kappa B signaling	5q33.1	rs6579837	5:151055333	Intron	Enhancer + target of NMD	DNase peak	1.11 (0.93-1.34)	555/597			(Sun <i>et al.</i> , 2013a)
TNIP1	NF kappa B signaling	5q33.1	rs12109187	5:151069300	Intron	Enhancer	TF + Histone markers	1.43 (1.20-1.71)	395/1975			(Lessard <i>et al.</i> , 2013)
TNIP1	NF kappa B signaling	5q33.1	rs3792783	5:151076171	Intron	Promoter (Pol2)	TF + DNase peak	2.1	540/532			(Nordmark <i>et al.</i> , 2011)
TNIP1	NF kappa B signaling	5q33.1	rs7708392	5:151077924	Intron	Enhancer (WRNIP1)	TF + Histone markers	1.43 (1.10-1.87)	1105/4460			(Nordmark <i>et al.</i> , 2013)
TNPO3		7q32.1	rs13246321	7:129061277	Downstream	Enhancer	Histone markers	1.33 (1.16-1.52)	1105/4460			(Nordmark <i>et al.</i> , 2013)
Trim21	Ro52 autoantigen	11p15.4	rs2855142	11:4389472	Intron	Enhancer	Histone markers + HEB motif	1.21 (1.08-1.36)	1105/4460			(Nordmark <i>et al.</i> , 2013)
								1.70 (1.35-2.13)	540/532			(Nordmark <i>et al.</i> , 2011)
									97/72			(Nakken <i>et al.</i> , 2001)

Abbreviations: SLE : systemic lupus erythematosus, RA : rheumatoid arthritis, SSc : systemic sclerosis ; IBD : inflammatory bowel disease, AITD : autoimmune thyroiditis disease, DID : insulin-dependent diabetes, PBC : primary biliary cirrhosis, autoimmune hepatitis ; CD :celiac disease, MS : multiple sclerosis. \*pSS patients with germinal centers versus pSS patients without germinal centers.

# Influence du microenvironnement inflammatoire sur le contrôle des processus de méthylation/déméthylation de l'ADN dans les cellules épithéliales de glandes salivaires

### I. Introduction

Le syndrome de Gougerot Sjögren (SGS) est une maladie auto-immune chronique, au cours de laquelle on observe des dommages progressifs et irréversibles des glandes exocrines, plus particulièrement des glandes salivaires et lacrymales (Ramos-Casals et al., 2012). Cette pathologie affecte 0.1 à 0.3% de la population générale et est plus fréquente chez les femmes que chez les hommes (avec un ratio de 9 femmes touchées pour 1 homme) (Tzioufas et al., 2012). Elle se caractérise par une physiopathologie complexe aboutissant à une infiltration lymphocytaire qui est à l'origine d'une dégradation de l'épithélium sécrétoire (Tzioufas et al., 2012). L'épithélium participe directement à la mise en place et au maintien d'un microenvironnement inflammatoire, avec notamment la présence d'une signature interféron (Gottenberg et al., 2006).

Y. Thabet, par ses travaux, a pu montrer que le processus de méthylation de l'ADN dans les cellules épithéliales de glandes salivaires (SGECs) était déficient au cours du SGS. De plus cette déméthylation de l'ADN serait reliée à l'infiltration lymphocytaire et passerait par les acteurs moléculaires en charge de la méthylation de l'ADN tel que la DNA methyltransferase (DNMT)1 (Thabet et al., 2013). En outre il semble que les enzymes TET (Ten-eleven Translocation Enzymes) impliquées dans le processus de déméthylation actif de l'ADN *via* la formation de 5-hydroxyméthylcytosine contribuent également au défaut de méthylation globale de l'ADN au cours du SGS (Lagos et al., 2018). Plus récemment, une approche sur les mêmes cellules avec

une technologie d'analyse globale de la méthylation (la puce HM450K d'Illumina) nous a permis d'obtenir, d'une part, différents panels de gènes différentiellement méthylés lors de ce phénomène pathologique et, d'autre part, de confirmer l'altération de la méthylation de l'ADN ainsi que l'importance de la voie interféron chez les patients (Charras et al., 2017). Par la même approche, Cole et collègues ont décrits un enrichissement pour le motif ARE (Antioxidant Response Element) des promoteurs retrouvés hypométhylés dans les LSG (Labial salivary gland) des patients (Cole et al., 2016). Activés lors d'un stress oxydatif (avec la génération notamment des Reactive Oxygen Species (ROS)), les AREs régulent l'inflammation, le métabolisme des carbohydrates, la régénération de la NADPH, le métabolisme du fer, le métabolisme des lipides et le remodelage tissulaire (Raghuraman et al., 2016).

Dans les maladies auto-immunes, on observe une surproduction des composés ROS qui seraient à l'origine des dommages tissulaires et du processus inflammatoire exacerbé, observé au cours de ces pathologies. Ces dommages sont le résultat de la réactivité des ROS avec des molécules environnantes telles que les cytokines pro-inflammatoires, l'ADN, les lipides, les carbohydrates et les protéines. Les ROS, RNS (Espèces Réactives de l'azote) et RCS (Espèce Carbonyl Réactive) que l'on retrouve dans les articulations au cours de maladies rhumatisantes sont l'ion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyle, l'acide hypochloreux (HOCl), le monoxyde d'azote (NO), le peroxydinitrite ( $ONO_2H$ ), les peroxides lipidiques et le sulfure d'hydrogène ( $H_2S$ ) qui sont impliqués dans l'inflammation chronique et aiguë (Smallwood et al., 2018; Winrow et al., 1993; Winyard et al., 2005). De nombreuses évidences suggèrent l'implication des ROS dans le processus pathologique du SGS (Smallwood et al., 2018).

Sachant que les ROS ont un impact sur le processus de méthylation de l'ADN comme démontré récemment lors de la carcinogenèse (Wu and Ni, 2015), nous avons donc exploré l'impact du stress oxydatif sur le contrôle de la méthylation et de la déméthylation de l'ADN dans les cellules épithéliales de la lignée humaine HSG (*Human Salivary Gland*).

D'autre part, l'interféron de type I (IFN  $\alpha$ , alpha) et de type II (IFN  $\gamma$ , gamma) étant d'importants médiateurs de l'inflammation au cours du SGS, nous avons donc complété les données précédentes avec l'analyse de l'effet de ces deux types d'IFN sur la lignée HSG.



L'objectif final étant de mieux comprendre le rôle de l'environnement inflammatoire sur les processus épigénétiques observés dans les cellules épithéliales des patients atteints de SGS.

## II. Matériel et Méthodes

### A. Le matériel biologique

#### 1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire humaine HSG a été utilisée comme modèle de cellules épithéliales salivaires. Les cellules HSG sont issues d'un carcinome irradié de la glande sous mandibulaire humaine (glande salivaire accessoire), et elles présentent des propriétés des cellules épithéliales ductales, cellules des canaux excréteurs, et reproduisent certaines des caractéristiques observées lors du SGS *in vivo*. Elles ont été cultivées en Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM ; Lonza Inc., Allendale, NJ), supplémenté avec du sérum de veau fœtal décomplémenté (Eurobio, Les Ulis, France) à 2.5%, de la L-glutamine à 2mM, de l'amphotéricine B à 250µg/mL, et de la pénicilline/streptomycine, à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été collectées suite à un traitement à la trypsine.

#### 2. Les différents traitements

Les cellules HSG ont été cultivées en présence de différents traitements répertoriés dans le tableau ci-dessous après avoir été synchronisées grâce à une privation en sérum pendant 24 heures :

**Tableau 1: Récapitulatif Des Différents Traitements Appliqués Sur Les HSG.**

Traitement	Concentration(s)	Temps de traitement	Référence produit
5 Azacytidine	10, 25 µM	48h	A1287-1VL Sigma
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (peroxyde d'hydrogène)	25µM, 50µM, 100µM, 150µM et 250µM	48h	-
IFN γ (Interféron gamma)	25ng/mL (500U/mL)	48h	Réf catalogue : 11343536, ImmunoTools
IFN α (Interféron alpha)	25ng/mL (500U/mL)	48h	Réf catalogue : 11343506, ImmunoTools
AG490	10µM, 20µM, 40µM et 50µM	48h	T3434 Sigma
NAC (N AcetylCystéine)	5mM, 10mM, 25mM, 50mM	48h	Hidonac® solution injectable 5g/25mL
Jakavi (Ruxolitinib)	10nM, 25nM, 50nM et 100nM	48h	-

## B. Techniques moléculaires

### 1. Analyse quantitative par qRT-PCR

#### a) Extraction ARN

Les ARNs, à la suite des différents traitements, ont été extraits avec du RNABLE<sup>®</sup> (Eurobio). Après collection des cellules, 0.2mL de RNABLE<sup>®</sup> ont été ajoutés pour lyser les cellules par pipetage répétés. 160µL de chloroforme ont été ajoutés puis le tube a été mélangé vigoureusement pendant 15-30 secondes au vortex. Les tubes ont été disposés sur la glace pendant 15min suivie d'une centrifugation à 14000g, à 4°C pendant 30 min. La phase aqueuse a été récupérée et transférée dans un nouveau tube, 1mL d'éthanol absolu a été ensuite ajouté puis les tubes placés à -20°C durant la nuit (précipitation des ARN). Le lendemain, les tubes ont été centrifugés à 14000g à 4°C pendant 30 min. Le culot d'ARN a été ensuite lavé 2 fois avec de l'éthanol à 75%, par centrifugation à 14000g à 4°C, pendant 10 min. Le culot a été laissé à sécher, puis repris dans de l'eau depc (diéthyl dicarbonate). La pureté et la quantité des ARNS ont été vérifiées par mesure de la densité optique à l'aide d'un nanodrop (Nano Drop<sup>®</sup> 1000, latech).

#### b) Réverse transcription (RT)

La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) a été réalisée à partir de 2µg d'ARNs totaux avec l'enzyme Superscript II (18064014, ThermoFisher), selon les recommandations du fournisseur. La présence des ADNc a été confirmée par l'amplification du gène de ménage GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase). Les ADNc ont été utilisés directement ou stockés à -20°C.

#### c) Polymerase Chain Reaction (PCR) quantitative

Les approches quantitatives ont été réalisées en utilisant le SYBR green comme fluorophore. Les différents couples d'amorces utilisés sont présentés dans le tableau ci-dessous. L'efficacité de chaque couple d'amorce a été déterminée après amplification réalisée sur une gamme de dilution sérielle d'ADNc ou d'ADNg (ADN génomique), selon la région étudiée. Pour les approches de RT-qPCR, 3µL d'ADNc stocks dilués au 1/50<sup>ème</sup> ont été utilisés comme matrice. La PCR quantitative a été réalisée dans 10µL finaux contenant ainsi 12ng de cDNA, 1X Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), et 250 nM de chaque

amorces (voir tableau ci-dessous). Le thermocycleur est capable de déterminer le Ct (Cycle threshold) correspondant au nombre de cycle à partir duquel la fluorescence mesurée se différencie du bruit de fond. La quantification relative (Qr) de l'expression des gènes cibles a été calculée selon la formule suivante :  $QR = \frac{2^{-\Delta Ct \text{ condition testée}}}{2^{-\Delta Ct \text{ condition contrôle}}}$ . La GAPDH a été utilisée comme contrôle interne.

**Tableau 2: Séquences, Températures d'hybridation des couples d'amorces utilisés lors des approches de PCR quantitative**

Nom du gène	Amorce sens	Amorce anti-sens	Efficacité	Température d'hybridation
DNMT1	CCTGTACCGAGTTGGTGATGGT	CCTCCGTGGGCGTTTC	2	60°C
DNMT3A	CTCCTGTGGGAGCCTCAATGTTACC	CAGTTCTGCAGTTTGGCACATTCC	2	60°C
DNMT3B	ACCACCTGCTGAATTACTCACGC	GATGGCATCAATCATCACTGGATT	2	60°C
TET1	AATGGAAGCACTGTGGTTTG	ACATGGAGCTGCTCATCTTG	2	60°C
TET2	AATGGCAGCACATTGGTATG	AGCTTCCACACTCCCAAAC	2	60°C
TET3	TTGCGTCGAACAAATAGTGG	CCCGTGTAGATGACCTTCTC	2	60°C
SSB	GATGAAGGCTGGGTACCTTT	TGCTCAATGCTTCCACAATTAC	2	60°C
ICAM1	GGCCGGCCAGCTTATACAC	TAGACACTTGAGCTCGGGCA	2	60°C
GAPDH	TGCCCTCAACGACCACTTT	GGTCCAGGGTCTTACTCCTT	2	60°C

DNMT : DNA methyltransferase ; TET : Ten-eleven Translocation Enzymes ; SSB : Sjögren syndrome type B ; ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule ; GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

## 2. Western Blot

### a) Extraction totale des protéines

Une extraction totale des protéines a été réalisée en utilisant un tampon de lyse cellulaire contenant 5 M NaCl (Chlorure de sodium), 1 M Tris-HCl (Tris Hydrochloride), 100 mM NaF (Florure de Sodium), 0.1 M EDTA (Éthylène diamine tétra acétique) et supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases. La quantité de protéines a été estimée par l'utilisation du MicroBC Assay Protein Quantification kit (Interchim, San Diego, CA).

### b) Extraction en fraction subcellulaire (adaptée de Schreiber et al 1990)

Pour l'obtention des différentes fractions protéiques, l'extraction a été réalisée en deux temps avec 2 tampons différents. Un premier tampon de lyse cellulaire (HEPES (ou acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) 10mM, KCl (Chlorure de potassium) 10mM, EDTA 0,1mM, DTT (dithiothréitol) 1mM, NP40 0,5%, sodium orthovanadate, inhibiteurs des protéinases) a permis, suite à une première centrifugation à 12000g, de récupérer la fraction cytoplasmique (200µL pour 2.10<sup>6</sup> cellules initiales). Puis un tampon de lyse nucléaire (HEPES 20mM, NaCl (Chlorure de Sodium) 400mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, sodium orthovanadate,

inhibiteurs des protéinases) pour l'obtention de la fraction nucléaire, à la suite d'une seconde centrifugation à 12000g (100µL pour 2.10<sup>6</sup> cellules initiales). La quantité de protéines a été estimée par l'utilisation du MicroBC Assay Protein Quantification kit (Interchim, San Diego, CA).

### c) Anticorps utilisés

**Tableau 3 : Récapitulatif des anticorps utilisés en western blot**

Protéine	Référence	Hôte	Dilution utilisée	Dilution anticorps secondaire	Taille attendue de la protéine	Anticorps secondaire biotynylé	Streptavidine-HRP
DNMT1	abcam, ab1357	Souris	1/500	1/10000	180kDa	-	-
DNMT3A	abcam, ab23565	Lapin	1/500	-	~102kDa	Anti lapin biotynylé 1/5000	1/500 dans PBS
TET2	abcam, ab94580	Lapin	1/2000	-	224kDa	Anti lapin biotynylé 1/5000	1/500 dans PBS
TET3	abcam, ab139311	Lapin	1/500	-	~179kDa	Anti lapin biotynylé 1/5000	1/500 dans PBS
STAT1	BD, catalog:519002093	Souris	1/1000	1/10000	84 et 91kDa	-	-
pSTAT1 (pY701)	BD, catalog: 612132	Souris	1/1000	1/5000	~94kDa	-	-
pSTAT3 (pY705)	BD, catalog 612357	Souris	1/500	-	~90kDa	Anti souris biotynylé 1/5000	1/500 dans PBS
Lamines A/C	Cell Signalling Technology (Ozyme), #2032	Lapin	1/1000	1/5000	~60/70kDa	-	-
Beta actine	abcam, ab8226	Souris	1/2000	1/10000	42kDa	-	-

DNMT : DNA methyltransferase ; TET : Ten-eleven Translocation Enzymes ; STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription.

## 3. Cytométrie en flux

### a) Marquage de la mort cellulaire

Une analyse de la mort cellulaire à la suite de l'application des différents traitements a été réalisée par un marquage annexine V-Iodure de propidium (IP). L'annexine V présente une forte affinité pour la phosphatidylsérine qui en condition normale est un phospholipide présent dans la membrane plasmique et n'est exposé au milieu extracellulaire que lors de l'apoptose. A ce premier marquage a été ajouté un agent intercalant de l'ADN qu'est l'IP et qui entre dans les cellules lors de l'altération de la membrane plasmique. Ainsi, avec ce marquage on peut distinguer les cellules en nécrose de celles en apoptose selon les critères indiqués dans le tableau suivant (**Tableau 4**) :

Tableau 4: Lecture et interprétation des résultats de cytométrie en flux suite à un marquage annexine V- Iodure de ProIPdium (IP)

Condition	Interprétation
Annexine V-/IP-	cellule vivante
Annexine V-/IP+	débris nucléaires
Annexine V+/IP-	phase précoce d'apoptose
Annexine V+/IP+	phase tardive d'apoptose et ou nécrose

### b) Marquage cycle cellulaire

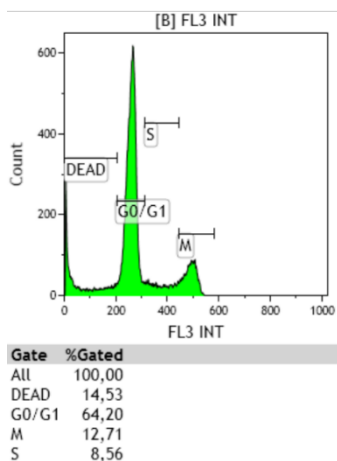
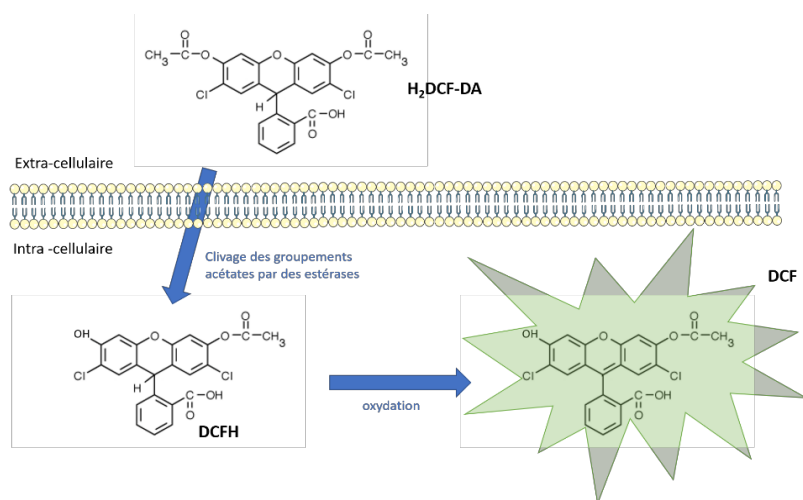


Figure 1 : Exemple d'interprétation d'un marquage du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire a également été apprécié suite à l'application des différentes conditions de culture (suite à une pré-étape de synchronisation des cellules par 24h de privation de sérum du milieu de culture) par un marquage à l'IP du noyau. Ainsi  $1.10^6$  cellules dans un premier temps ont été fixées avec de l'éthanol à 70% sur glace pendant 30 min. Les cellules ont été lavées puis traitées à la RNase A ( $125\mu\text{g}/\text{mL}$ ) pendant 15 min à température ambiante. Puis un marquage à l'IP ( $50\mu\text{g}/\text{mL}$ ) pendant 20 min sur glace a été effectué. Enfin les cellules ont été passées au cytomètre et l'interprétation a été réalisée.

### c) Mesure du stress oxydatif

Une sonde intracellulaire le H<sub>2</sub>DCF-DA (2', 7'-Dichlorodihydrofluorescéine diacétate, Invitrogen, Carlsbad, CA) a été utilisée afin de mesurer globalement la production des espèces



**Figure 2 : Fonctionnement du H<sub>2</sub>DCFH-DA (2',7'-Dichlorodihydrofluorescéine diacétate)**

réactives de l'oxygène (ROS).

Le H<sub>2</sub>DCFDA, perméant aux cellules, est une forme chimiquement réduite de fluorescéine. Au moment du clivage des groupes d'acétates par des estérases et une oxydation intracellulaire, l'H<sub>2</sub>DCFDA non fluorescent est converti en dichlorofluorescéine 2',7'

(DCF) hautement fluorescente (**Figure 2**). C'est ainsi qu'une fluorescence entre 517-527 nm est mesurée en cytométrie en flux et permet d'apprécier la génération ou non de ROS intracellulaires après les différents traitements.

Ainsi les cellules ont été lavées et marquées en PBS (Phosphate Buffered Saline) avec 10µM de sonde à 37°C pendant 30 min. Les cellules ont été ensuite lavées et la fluorescence a été mesurée en cytométrie en flux. Un traitement des cellules avec 250µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été utilisé comme témoin positif.

### d) Analyse des différents marqueurs de surface

Après 24h de synchronisation des cellules, l'effet des traitements après 48h de culture a été évalué sur les molécules ICAM-1, HLA-DR et PDL-1. Les caractéristiques des anticorps utilisés par cytométrie en flux sont présentées dans le tableau suivant.

Tableau 5 : Récapitulatif des anticorps utilisés en cytométrie en flux.

cible	fluorochrome	spécificité	hôte	Isotype	fournisseur	clone
ICAM-1 (CD54)	FITC (isothiocyanate de fluorescéine)	Homme	souris	IgG1	Beckman Coulter, Brea, CA	IMU0726U
PDL-1 (CD274)	PE (phycoérythrine)	Homme	souris	IgG1	Thermofisher, Waltham, US	MIH1
HLA-DR	PC7 (phycoérythrine cyanine 7)	Homme	souris	IgG1	Beckman Coulter Brea, CA	Immu-357

ICAM : InterCellular Adhesion Molecule; PDL-1 : Programmed death-ligand 1; HLA-DR: human leukocyte antigen-D Related

#### e) Analyse de la méthylation et de l'hydroxyméthylation de l'ADN

Des mesures de la méthylation et de l'hydroxyméthylation de l'ADN ont été réalisées en cytométrie en flux. Ainsi après 48h de culture des HSG en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IFN α (alpha) ou γ (gamma), les cellules ont été collectées puis ont été marquées avec les anticorps : anti-5-méthylcytosine (clone 33D3 ; abcam, ab10805, Cambridge, RU) ou anti-5-hydroxyméthylcytosine (abcam, ab178771, Cambridge, RU) directement couplés avec un fluorochrome : la FITC (isothiocyanate de fluorescéine) en utilisant le kit Lightning-Link® Rapid Fluorescein (Innova Biosciences, #310-0030). L'état de méthylation/hydroxyméthylation de l'ADN après traitement était apprécié par rapport aux cellules HSG cultivées dans les mêmes conditions mais n'ayant subi aucun traitement ceci par cytométrie en flux

### III. Résultats

#### PARTIE 1 : Action des ROS sur le méthylome et l'hydroxyméthylome des HSG

##### A. Impact de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la méthylation et l'hydroxyméthylation de l'ADN

La mise en place d'un environnement cellulaire oxydo-réducteur aboutissant à la production de ROS influence de nombreuses voies de signalisations et provoque notamment des changements du méthylome (Wu and Ni, 2015). Ces changements s'accompagnent d'un défaut de méthylation globale de l'ADN ainsi que d'une hyperméthylation au niveau de certains sites. L'objectif initial de notre étude a donc consisté à apprécier l'impact d'un stress oxydatif, en utilisant des doses croissantes d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sur le processus de méthylation/déméthylation de l'ADN dans notre modèle cellulaire HSG.

##### 1. Au niveau transcriptionnel

Tout d'abord nous avons étudié l'impact d'un effet dose d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur le taux de transcrits des enzymes impliquées dans la méthylation de l'ADN (DNMT3A, DNMT3B et DNMT1) et des enzymes impliquées dans l'hydroxyméthylation de l'ADN (TET1, TET2 et TET3) par qRT-PCR (**Figure 3**). Ainsi par rapport au niveau basal (HSG sans H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), on observe une augmentation dépendante de la dose d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des transcrits pour DNMT3A, DNMT3B et TET3 alors que le taux des transcrits pour TET2 et DNMT1 semblent inchangés (**Figure 3**). A noter que nous n'avons pas détecté TET1 dans nos extraits cellulaires et que DNMT3A est faiblement exprimé dans ces cellules, en conséquence nous n'avons pas poursuivi avec ces deux enzymes.



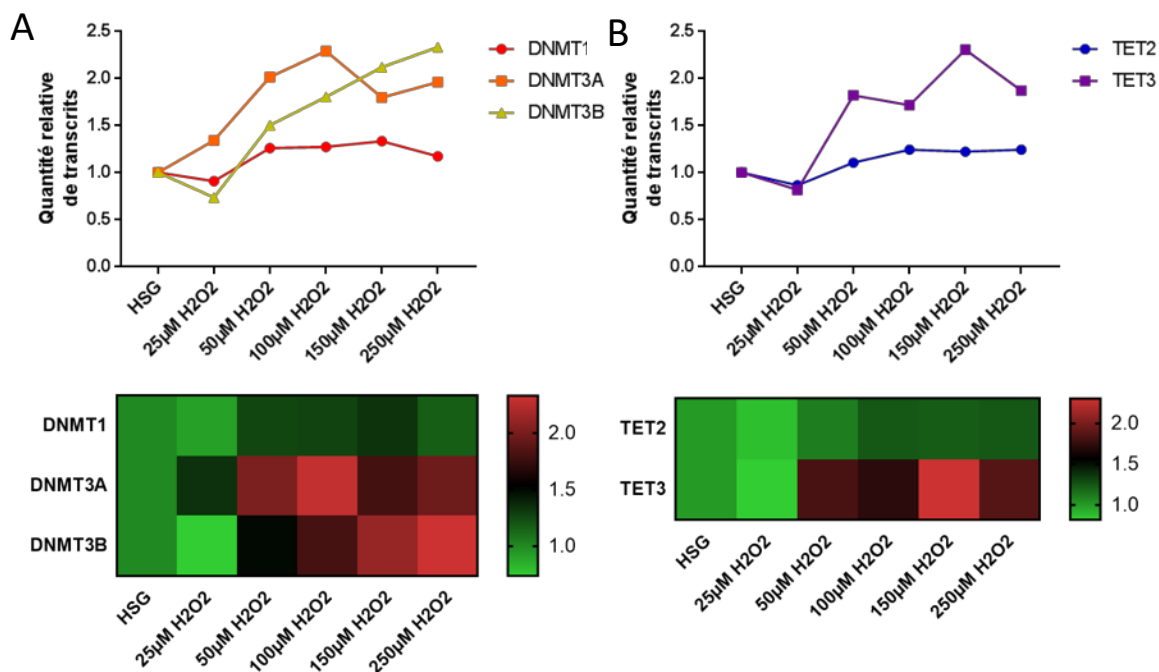
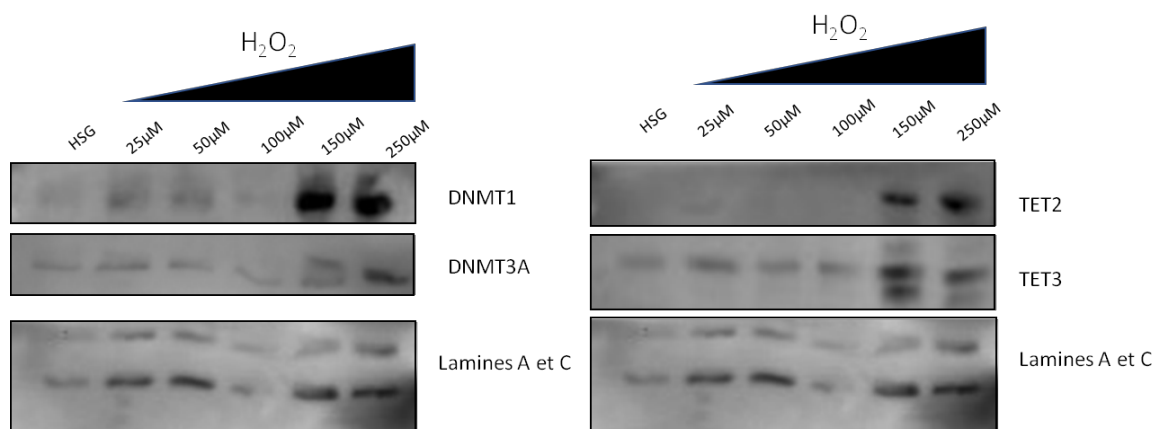


Figure 3 : Impact de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les enzymes DNMTs et TETs au niveau transcriptionnel. Quantification relative des transcrits DNMT1, DNMT3A, DNMT3B (A) et TET2 et TET3 (B) après un effet dose d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les cellules HSG après 48h de cultures. Nombre d'expériences n=1. Les Heatmap de synthèse des données de quantification relative des transcrits sont représentées avec en vert vif : faiblement transcrit, rouge vif : fortement transcrit. DNMT : DNA methyltransferase ; TET : Ten-eleven Translocation Enzymes.

## 2. Au niveau protéique

Afin de confirmer les résultats obtenus au niveau transcriptionnel, nous avons également regardé l'impact d'un effet dose d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au niveau des principales enzymes de méthylation (DNMT1 et DNMT3A) et d'hydroxyméthylation (TET2 et TET3). Ainsi un western blot a été réalisé à partir d'un extrait total des protéines (**Figure 4**). Cette étude met en évidence pour les fortes doses d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 μM et 250 μM) une augmentation de DNMT3A et de TET3, ce qui va dans le même sens que les résultats au niveau des transcrits (**Figure 3**) ; ainsi qu'une augmentation de DNMT1 et TET2 au niveau protéique ce qui pourrait traduire un effet post-traductionnel de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par un mécanisme inconnu sur ces enzymes puisque nous n'avons pas mis en évidence d'effet au niveau transcriptionnel.

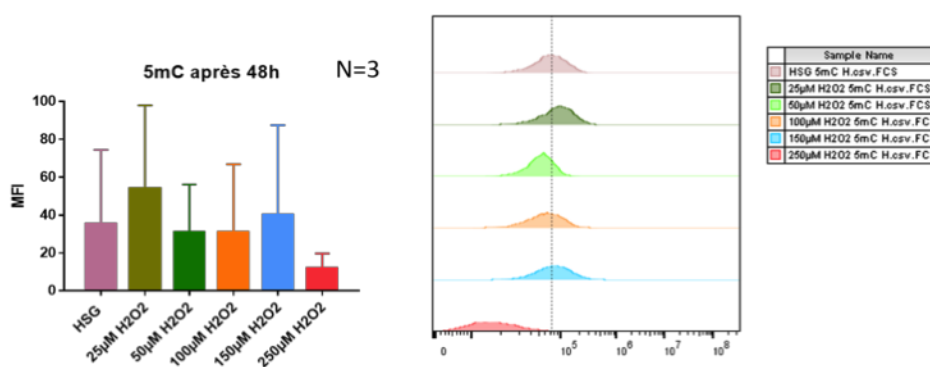


**Figure 4 : Impact de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les enzymes DNMTs et TETs au niveau protéique.**

Western blot sur les protéines DNMT1, DNMT3A, TET2, TET3 et lamines A et C après un effet dose de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 48h. Nombre d'expériences n= 1. Les lamines A et C servent de contrôle interne. DNMT : DNA méthyltransférase ; TET : Ten-elleven Translocation Enzymes.

### 3. Au niveau de l'ADN

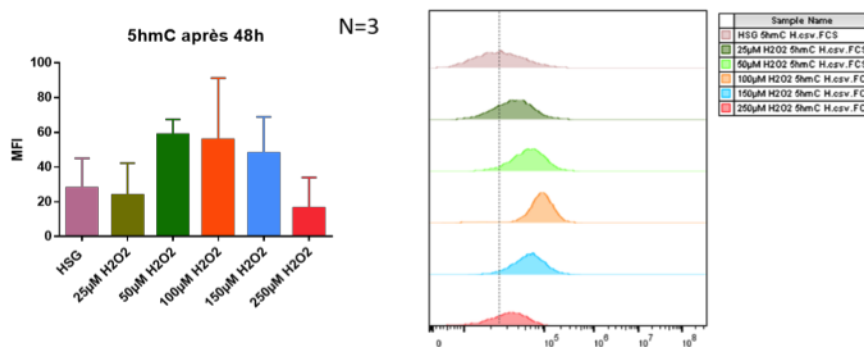
Puisque l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> agit à la fois sur les enzymes de méthylation de l'ADN (DNMTs) nous avons donc regardé d'une part l'impact d'un effet dose d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 réplicats) sur le niveau global de méthylation de l'ADN (5mC) par cytométrie en flux (**Figure 5**). On constate une augmentation de la méthylation de l'ADN à faible dose (25µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), peu d'effet entre 50 et 150µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ainsi qu'une forte réduction du marquage à la plus forte concentration d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (250µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).



**Figure 5: Impact de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la méthylation globale de l'ADN.**

Mesure de la méthylation globale de l'ADN (5mC ; 5 méthyl-cytosine) après traitement des HSG avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selon un effet dose pendant 48h, par cytométrie en flux. Nombre d'expériences n=3. MFI : mean fluorescence intensity ; Moyenne d'intensité de fluorescence.

L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> agissant sur les enzymes d'hydroxyméthylation/déméthylation de l'ADN (TETs), le niveau d'hydroxyméthylation de l'ADN (5hmC) a également été mesuré après 48h de culture en présence de doses croissantes d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Figure 6**). En effet, l'utilisation d'un anticorps anti-5hmC, permet d'apprécier la première étape du processus actif de déméthylation de l'ADN médié par les enzymes TETs. On constate une augmentation du marquage 5hmC par rapport à la condition contrôle pour les concentrations de 50µM à 150µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A noter que comme pour le marquage 5mC, les valeurs les plus faibles sont observées avec la concentration la plus forte d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (250µM). Ceci pouvant être le fait d'un effet de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la viabilité cellulaire à forte concentration (voir ci-dessous).

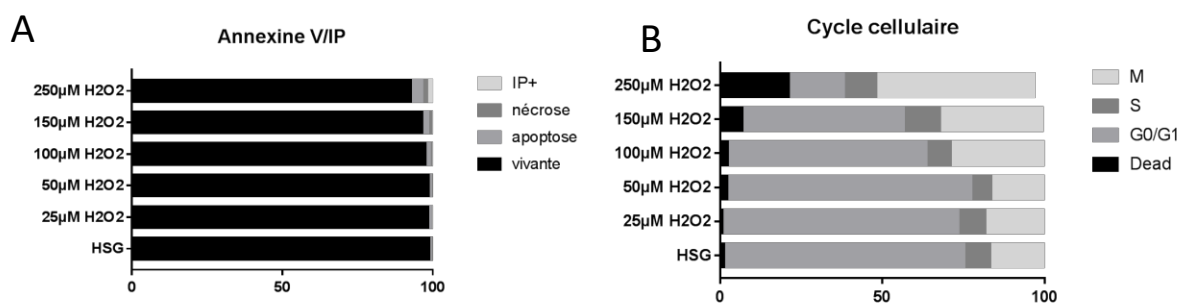


**Figure 6: Impact de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur l'hydroxyméthylation globale de l'ADN.**

Mesure de l'hydroxyméthylation de l'ADN (5hmC ; 5 hydroxyméthyl-cytosine) après traitement des HSG avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selon un effet dose pendant 48h, par cytométrie en flux. Nombre d'expériences n= 3. MFI : *mean fluorescence intensity* ; Moyenne d'intensité de fluorescence.

#### 4. Impact sur la viabilité et le cycle cellulaire

Afin de tester l'impact de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la viabilité cellulaire (Figure 7), nous avons donc regardé l'impact d'un effet dose d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la mort cellulaire et sur le cycle cellulaire. Ainsi on observe un effet sur ces deux paramètres pour les fortes concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et cet effet est surtout marqué à 250µM et de façon moindre à 150µM (zone subtoxique). Ces résultats permettent sans doute d'expliquer les résultats obtenus à 250µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par cytométrie en flux avec les marquages 5mC et 5hmC.



**Figure 7: Effet de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la viabilité et le cycle cellulaire.**

A). Etude de la mort cellulaire après un marquage AnnexineV/IP et de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire B), à la suite d'un traitement de 48h avec des doses croissantes d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aux concentrations de : 0µM, 25µM, 50µM, 100µM, 150µM et 250µM. Nombre d'expériences n=3.

En conséquence, l'ensemble de ces résultats indiquent que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est capable d'agir à la fois sur les enzymes de méthylation de l'ADN (DNMTs) et les enzymes de déméthylation de l'ADN (TETs) avec un impact qui semble plus marqué sur l'hydroxyméthylation de l'ADN que sur la méthylation de l'ADN dans les cellules HSG. De plus les effets les plus nets sont observés à la dose subtoxique de 150µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dose qui sera conservée par la suite dans les expériences avec les inhibiteurs.

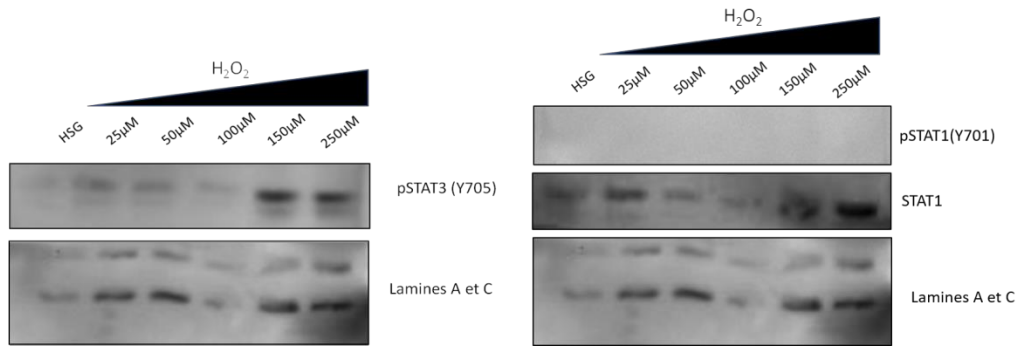
## B. Impact de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la voie Jak-Stat

Récemment Pan et collègues ont démontré une régulation de l'expression de TET3 par la voie Jak (Janus kinase) /STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription 3) chez la souris sur des cellules neurales (Pan et al., 2017). Par ailleurs il a également été montré une régulation de la transcription de DNMT1 par STAT3 dans des lignées de lymphomes T (Zhang et al., 2006). Ainsi ces éléments conduisent à impliquer la voie Jak/STAT3 au niveau de la régulation des transcrits DNMTs et TETs dans la lignée HSG par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. C'est ce qui est recherché dans les expériences suivantes.

### 1. Impact de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur STAT1 et STAT3

Dans un premier temps, une approche par Western blot a été réalisée sur des extraits totaux de protéines afin d'apprécier l'impact d'un effet dose d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la phosphorylation de STAT3 (pSTAT3) (Y705 (tyrosine 705)) et de STAT1 (Y705), STAT1 étant fréquemment associée à STAT3. Pour STAT3, on observe une augmentation de pSTAT3(Y705) sur les HSG et cet effet est

particulièrement net à 150 et 250µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pour STAT1, aucun effet de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur le niveau de phosphorylation de STAT1 (forme active) n'est observé même s'il semble y avoir un léger effet sur l'expression de la protéine totale après 48h de cultures (**Figure 8**).



**Figure 8 : Effet sur les acteurs de la voie Jak-Stat.**

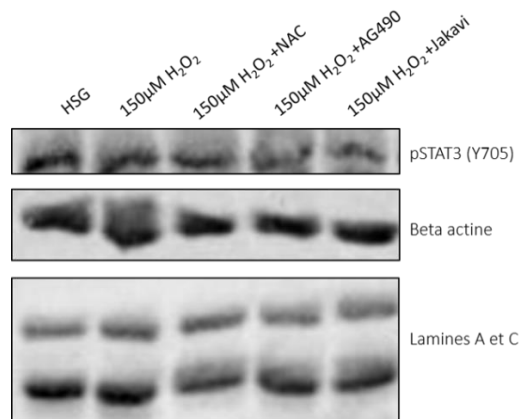
Western blot sur extraits totaux après 48h de traitement avec des concentrations croissantes en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les protéines STAT1, pSTAT1 (Y701), pSTAT3 (Y705) et lamines A et C, utilisées comme protéines de ménage. Nombre d'expériences n=1 STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription. pSTAT : phosphoSTAT.

## 2. Impact des inhibiteurs de Jak sur l'activation de STAT3 par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Afin d'étudier la voie Jak/STAT et son contrôle des enzymes DNMTs et TETs par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nous avons sélectionné différents inhibiteurs à savoir AG490 (un inhibiteur de Jak2), Jakavi (ou ruxolitinib un inhibiteur de Jak1 et Jak2). Afin de compléter ce panel nous avons également utilisé un antioxydant, la N acétylcystéine (NAC).

Avant de regarder l'impact de ces différents inhibiteurs sur les partenaires de la méthylation et de la déméthylation de l'ADN nous avons évalué l'effet de ces inhibiteurs sur l'induction de pSTAT3 médiée par 150µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En pratique, les cellules sont prétraitées 1h avec l'inhibiteur puis traités 48h avec 150µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Cette expérience, réalisée une seule fois, semble indiquer une réduction du niveau de pSTAT3 en présence des deux inhibiteurs de Jak (AG490, Jakavi) mais pas en présence de NAC qui agit en amont. Cela devra être confirmé et d'autant plus que le niveau basal de pSTAT3 était très élevé ce qui rend donc l'interprétation des résultats difficile (**Figure 9**)



**Figure 9: Effet des inhibiteurs de la voie Jak-Stat sur l'activation de pSTAT3 par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Western blot sur extraits totaux après 48h de traitement avec 150µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et avec ou non un prétraitement de 1h avec NAC (N-acétylcystéine ; 50mM), AG490 (Tyrphostin, 50µM), et Jakavi (ruxolitinib ,100nM) sur les protéines STAT1, pSTAT1 (Y701), pSTAT3 (Y705). La Beta actine et lamines A et C, sont utilisées comme protéines de ménage. STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription.

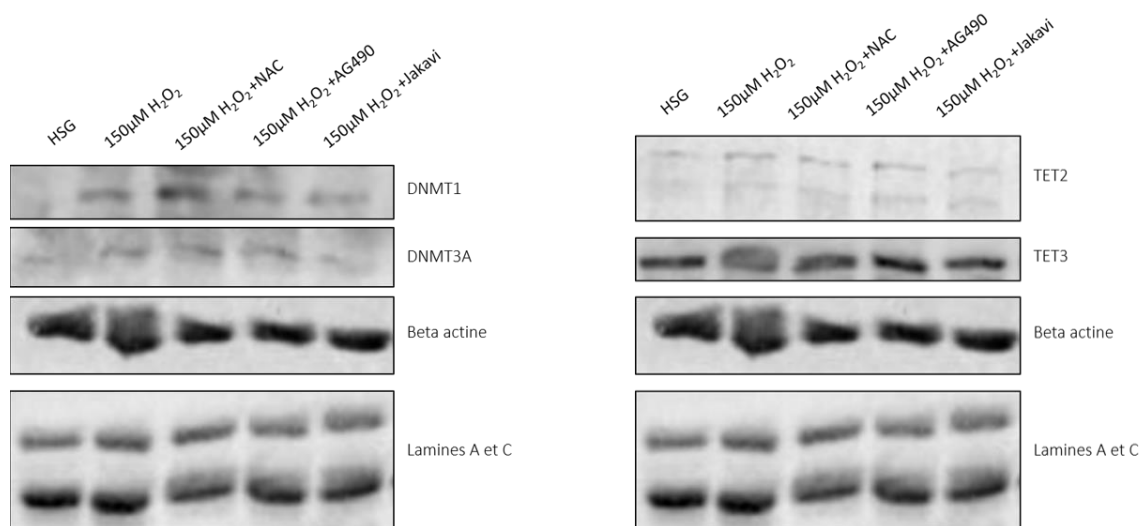
### C. Effets de AG490 et Jakavi sur les enzymes DNMTs et TETs

Nous avons ensuite regardé l'impact des inhibiteurs de Jak (AG490 et jakavi) ainsi que la NAC sur les enzymes de méthylation et de déméthylation de l'ADN (**Figure 10**). A nouveau cette expérience n'a été réalisée qu'une fois ce qui demandera donc de confirmer les résultats.

Pour DNMT1 et DNMT3A à un degré moindre, on note une augmentation de l'enzyme en présence de 150µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et cet effet apparait accentué en présence de NAC. Alors qu'une réduction semble se dessiner en présence de l'inhibiteur de la voie Jak/STAT : le jakavi.

Pour TET3, on observe une augmentation pour la concentration de 150µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et cette augmentation est inhibée par l'ajout des inhibiteurs Jak/STAT (AG490 et Jakavi) et du NAC.

Pour TET2, le niveau reste inchangé aux différentes conditions expérimentales testées.



**Figure 10: Effet des inhibiteurs de la voie Jak-Stat sur l'induction des enzymes DNMTs et TETs par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Western blot sur extraits totaux après 48h de traitement avec 150µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et avec ou non un prétraitement de 1h traitement avec NAC (N-acétylcystéine ; 50mM), AG490 (Tyrphostin, 50µM) et Jakavi (ruxolitinib ,100nM) sur les enzymes DNMT (DNA methyltransferase) 1, 3A, TET (TET : Ten-eleven Translocation Enzymes) 2 et TET3

Ces données suggèrent l'implication de la voie Jak/STAT via pSTAT3 (Y705) sur l'expression de DNMT1, DNMT3A et TET3 après un traitement par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des cellules HSG.

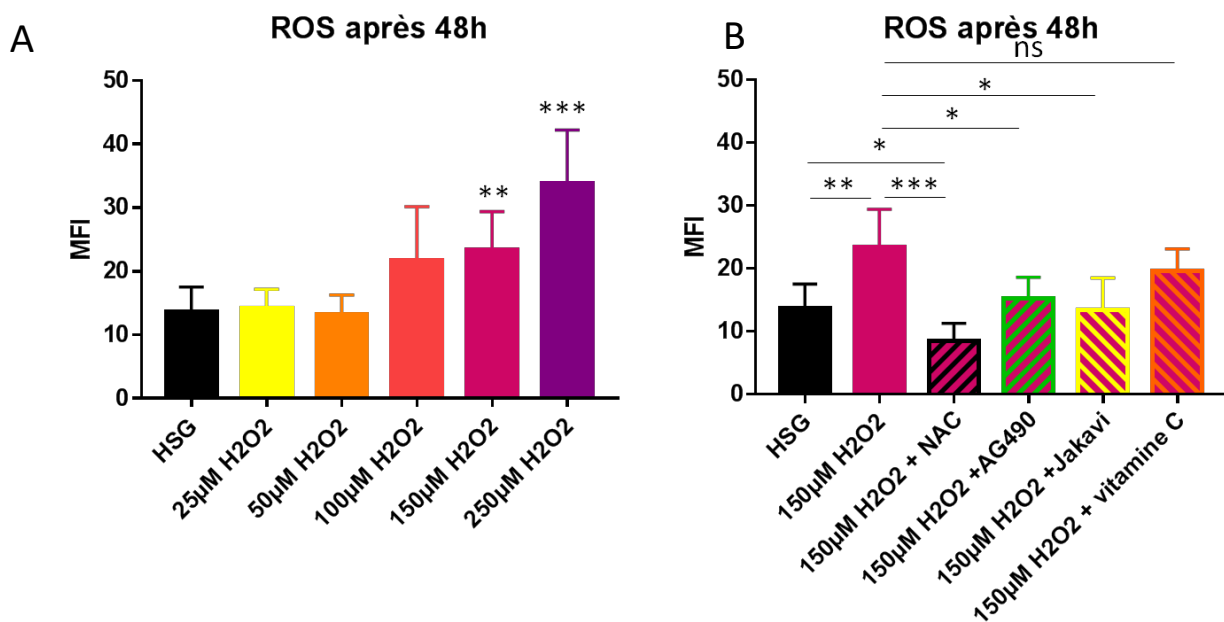
#### D. Effet de la voie Jak/STAT3 sur la génération intracellulaire des ROS

La voie Jak/STAT3 est également capable d'agir comme une voie d'amplification sur la production des ROS (Wang et al., 2018a), il était donc intéressant d'évaluer l'effet des inhibiteurs de Jak/SAT sur la production de ROS.

La concentration intracellulaire de ROS est testée et mesurée en cytométrie en flux par le marquage H<sub>2</sub>DCFDA. Comme indiqué **Figure 11A**, on observe une augmentation du niveau de ROS en fonction de la concentration d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après 48h de culture des cellules HSG.

Par la suite l'impact sur la génération de ROS induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 150µM, en présence d'AG490, de Jakavi, et de NAC a été étudiée (**Figure 11B**). La NAC est un acide aminé non essentiel qui va stimuler la production de glutathion et qui en s'oxydant réduit la quantité de radicaux libres dans la cellule, il s'agit donc d'un contrôle positif. On observe effectivement une diminution significative du taux de ROS après un pré-traitement au NAC, ainsi qu'une diminution significative des ROS après un pré-traitement avec des inhibiteurs de la voie Jak-Stat (AG490

et Jakavi). Cela atteste du rôle amplificateur de la voie Jak-STAT sur la production de ROS dans la lignée HSG.



**Figure 11: Impact de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la génération de ROS (reactive oxygen species) et des inhibiteurs de la voie Jak/Stat sur leur génération A/**

Mesure du stress oxydatif en cytométrie en flux avec la sonde intracellulaire H<sub>2</sub>DCF-DA à la suite d'un effet dose de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ; 25µM, 50µM, 100µM, 150µM et 250µM) A) pendant 48h. **B/** Mesure du stress oxydatif en cytométrie en flux avec la sonde intracellulaire H<sub>2</sub>DCF-DA à la suite des traitements avec des inhibiteurs de la voie Jak-Stat (AG490 et Jakavi) et un antioxydant (NAC (N-acétylcystéine)). Nombre d'expérimentation : 6. Test de Student : \*p<0.05, \*\*p<0.01 ; \*\*\*p<0.001. MFI: *mean fluorescence intensity*; Moyenne d'intensité de fluorescence

## E. Gènes cibles

### 1. ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1)

ICAM-1 est une glycoprotéine de surface inductible, qui peut réguler les interactions cellulaires dépendantes de l'adhésion. Son expression est induite lors d'un stress oxydatif ainsi qu'à la suite d'une stimulation par des cytokines inflammatoires (Lee et al., 2018a). C'est pourquoi son expression a été testée à la suite d'un effet dose de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les HSG.

On retrouve une augmentation de l'induction à la membrane d'ICAM-1 en fonction de la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les cellules HSG (**Figure 12A**). De plus, on observe que celle-ci est inhibée en présence des inhibiteurs de la production de ROS (NAC, contrôle positif) ainsi qu'en



présence des inhibiteurs Jak/STAT (AG490 et Jakavi) ce qui signifie que cette voie est impliquée dans l'expression d'ICAM-1 (Figure 12B).

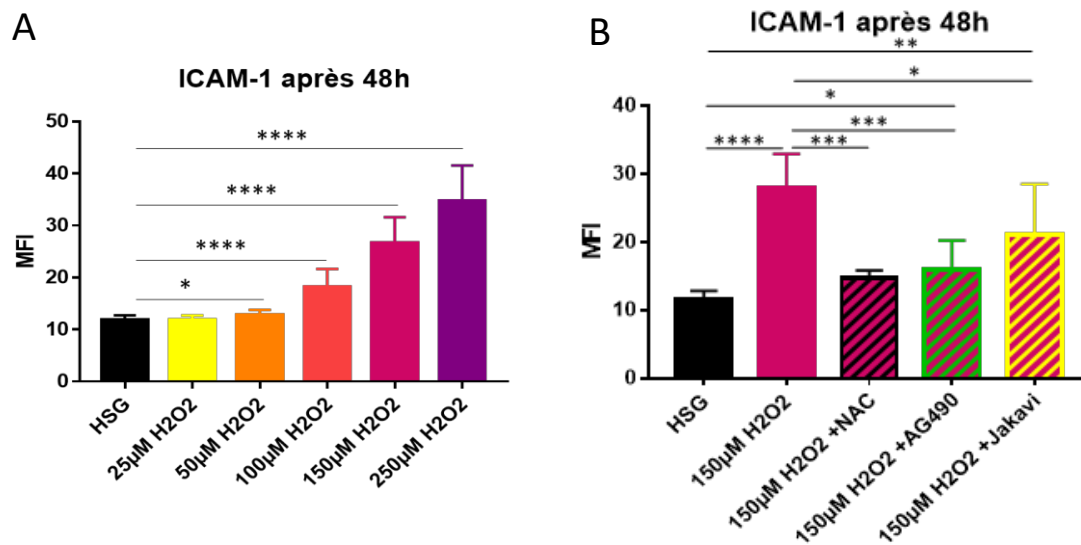


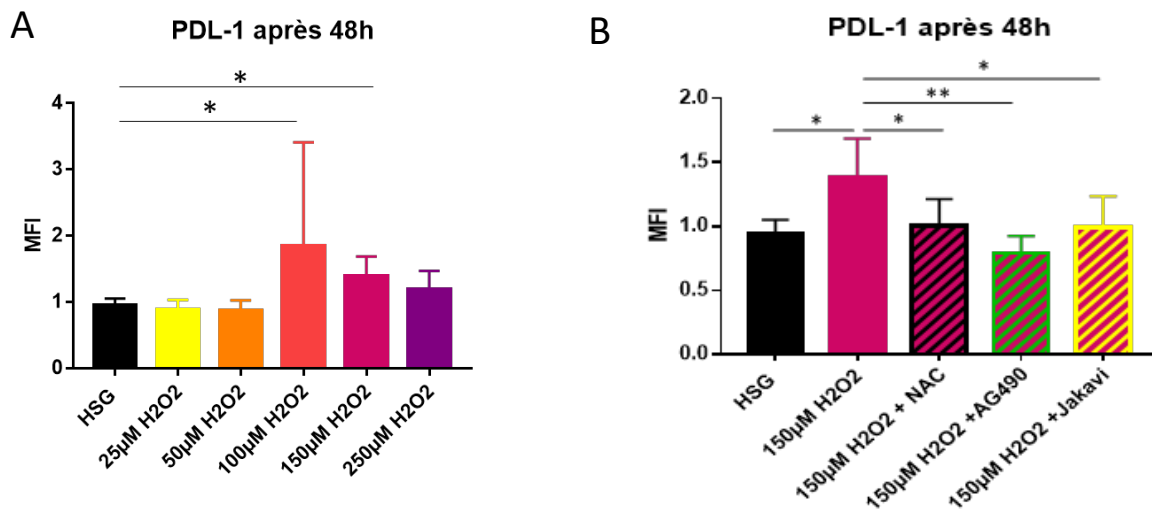
Figure 12: Impact de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et des inhibiteurs de la voie Jak-Stat sur l'expression de ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1)

Mesure de ICAM-1 en cytométrie en flux à la suite d'un effet dose de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ; 25µM, 50µM, 100µM, 150µM et 250µM) pendant 48h (A) ; à la suite de traitements avec des inhibiteurs de la voie Jak-Stat (Janus kinase-STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription) (AG490 et Jakavi) et un antioxydant (NAC (N-acétylcystéine)) (B)). Test de Student : \*p≤0.05, \*\*p≤0.01 ; \*\*\*p≤0.001, \*\*\*\*p≤0.0001. MFI : *mean fluorescence intensity* ; Moyenne d'intensité de fluorescence

## 2. PDL-1 (Programmed death-ligand 1)

PDL-1 est une protéine de surface qui interagit avec PD1 et B7.1 qui sont exprimés à la surface des lymphocytes T. L'interaction avec PDL-1 conduit à l'inactivation des lymphocytes T. Il a été montré que Stat 3 est capable de réguler sa transcription (Wang et al., 2018b). Par ailleurs il semblerait exister un lien entre la transition mésenchymo-épithéliale, la surexpression de PDL-1, des taux élevés de ROS et des phénomènes de résistance tumorale lors d'un traitement par le cisplatine (Wangpaichitr et al., 2017)

À la suite de l'application d'un effet dose de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, on retrouve une augmentation de l'induction à la membrane de PDL-1, de façon significative, pour les concentrations de 100 et 150µM (Figure 13A). Comme pour ICAM1, les trois inhibiteurs NAC, AG490, Jakavi inhibent l'induction de PDL-1 médiée par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 13B). Ainsi on retrouve une induction à la membrane à la suite d'un traitement H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> via l'implication de la voie Jak-Stat.



**Figure 13: Impact de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peroxyde d'hydrogène) et des inhibiteurs de la voie Jak-Stat sur l'expression de PDL-1 (Programmed death-ligand 1).**

Mesure de PDL-1 en cytométrie en flux à la suite d'un effet dose de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ; 25µM, 50µM, 100µM, 150µM et 250µM) pendant 48h (A) ; suite à des traitements avec des inhibiteurs de la voie Jak-Stat (Janus kinase-STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription) (AG490 et Jakavi) et un antioxydant (NAC (N-acétylcystéine)) (B)). Nombre d'expérience :6. Test de Student : \*p<0.05, \*\*p<0.01 ; \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. *mean fluorescence intensity* ; Moyenne d'intensité de fluorescence

### Conclusions PARTIE 1 (Figure 14):

Dans cette première partie, nous avons pu montrer que le traitement des HSG avec du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) était capable d'induire la génération d'un stress oxydatif de manière dose dépendante. Ce stress oxydatif serait capable d'activer la voie Jak-Stat via la phosphorylation de Stat3 (Y705) avec trois effets observés : (1) un effet sur la méthylation et hydroxyméthylation de l'ADN des cellules via le contrôle de l'expression des enzymes DNMTs et TETs ; (2) une boucle de rétrocontrôle positif sur la génération de ROS ; et (3) une augmentation de l'expression à la surface des cellules des protéines ICAM-1 et PDL-1. La dépendance de l'expression de PDL1 et ICAM1 restant à établir d'autant que l'utilisation de 5-azacytidine (agent déméthylant de l'ADN), utilisée seule, n'induit pas ICAM1 ni PDL1.

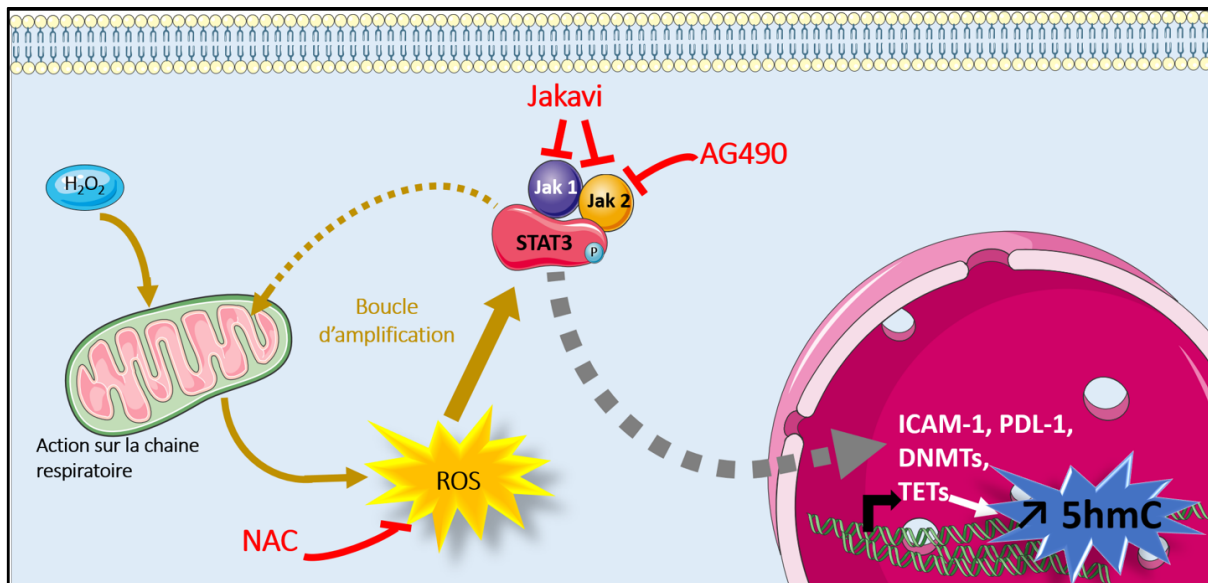


Figure 14: Conclusion PARTIE1

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène

ROS : Espèces Réactives de l'oxygène

NAC : N-acétylcystéine

STAT3 : Signal Transducers and Activators of Transcription

DNMTs: DNA Methyl Transferase

TET: Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase

5hmC: Hydroxyméthylation ADN

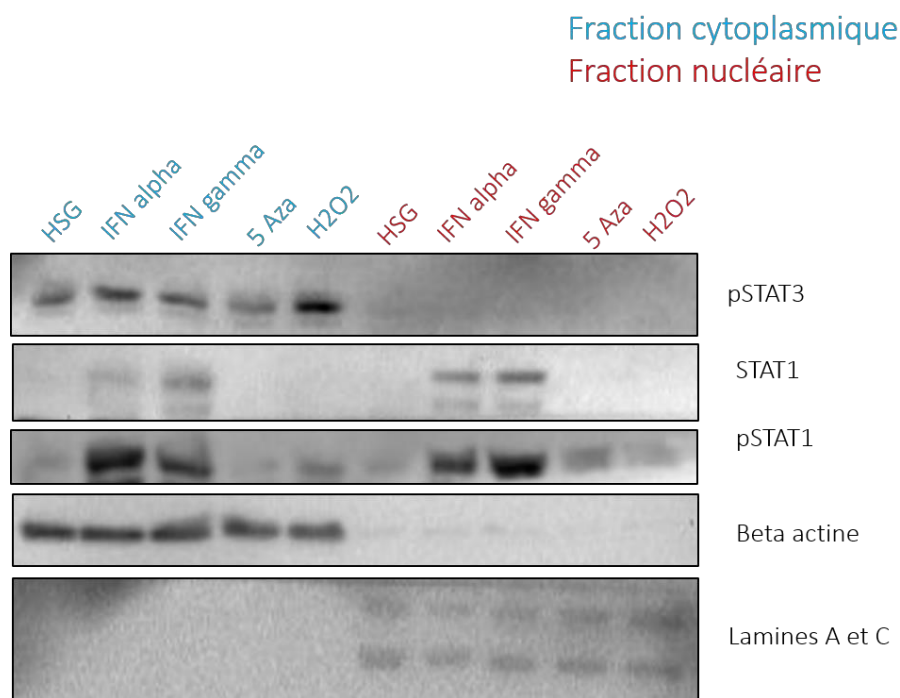
## PARTIE 2 : Action des Interférons $\alpha$ et $\gamma$ sur le méthylome et l'hydroxyméthylome des HSG

Après avoir établi un lien entre la voie la génération de ROS et de la voie Jak/STAT pour le contrôle de la méthylation/déméthylation de l'ADN dans les cellules HSG, nous avons par la suite exploré l'impact d'un traitement par les interférons de type I (IFN  $\alpha$ , alpha) et II (IFN  $\gamma$ , gamma), connus pour activer la voie Jak/stat, sur la méthylation et l'hydroxyméthylation de l'ADN de la lignée HSG.

### A. IFNs et voie Jak-Stat

A la suite d'une stimulation avec IFN  $\alpha$  et  $\gamma$  pendant 48h à la concentration de 25ng/ml sur des HSG, l'effet de ces cytokines pro-inflammatoires sur la phosphorylation de Stat1 (Y705) et de Stat3 (Y705) est appréciée par un Western blot sur des extraits protéiques des fractions cytoplasmiques et nucléaires (Figure 15). Sur l'extrait cytoplasmique on observe une augmentation de pSTAT1 (Y705) en présence des deux types d'IFN, cette forme active étant

capable d'être transportée dans le noyau comme constaté sur l'extrait nucléaire. En revanche pour STAT3 on n'observe pas d'effet des IFN sur la phosphorylation de STAT3 (fraction cytoplasmique) ni de transport nucléaire (fraction nucléaire) ce qui contraste avec les données obtenues avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (contrôle positif). Dans cette expérience nous avons ajouté l'inhibiteur de la méthylation de l'ADN, la 5-azacytidine.



**Figure 15 : Impact des traitements IFN (Interféron)  $\alpha$  (alpha),  $\gamma$  (gamma), 5 aza (5 azacytidine) et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peroxyde d'hydrogène) sur la voie Jak-Stat** (Janus kinase-STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription). Western blot sur extraits fractionnés des protéines : pSTAT3 (phosphoSTAT3) (Y705 (tyrosine 705)), STAT1 et pSTAT1 (Y701), Beta actine et lamines A et C après 48h de traitement IFN  $\alpha$  et  $\gamma$  (25ng/mL), 5 aza (25 $\mu$ M) et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (250 $\mu$ M).

### B. IFNs et enzymes DNMTs et TETs

On recherche par la suite l'effet des IFN  $\alpha$  et  $\gamma$  sur les DNMTs et TETs tout d'abord au niveau transcriptionnel (**Figure 16**). Alors que l'on n'observe pas d'effet sur les DNMTs et TET2, on observe en revanche une augmentation du taux de transcrits pour TET3 en présence des 2 types d'interférons.

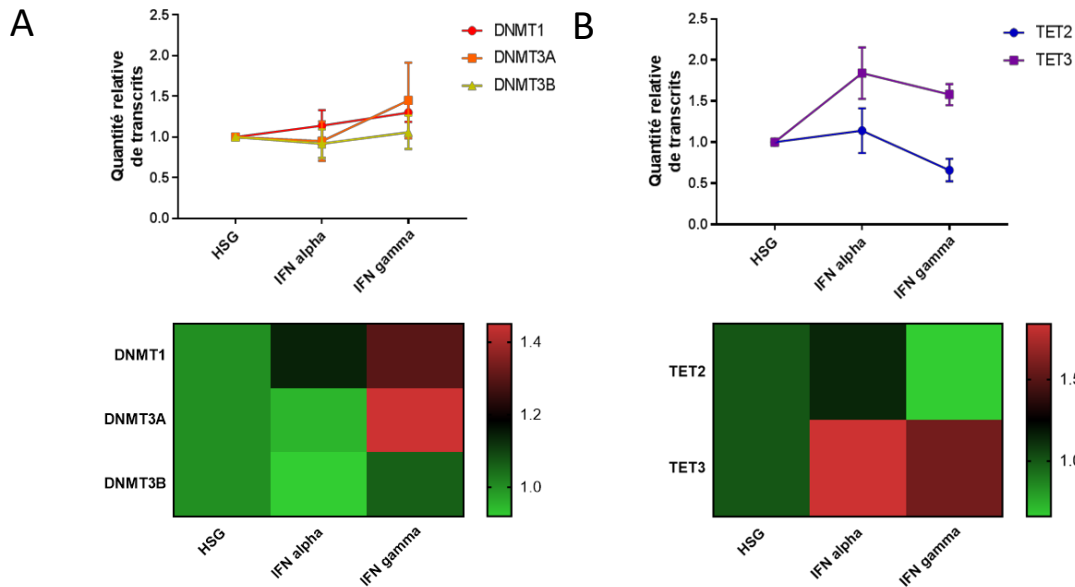


Figure 16 : Impact des traitements IFN (Interféron)  $\alpha$  (alpha) et  $\gamma$  (gamma) sur l'expression des enzymes DNMTs (DNA methyltransférase) A/ et TETs (TET : Ten-eleven Translocation Enzymes) B/.

Quantification relative des transcrits DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET2 et TET3 après 48h de traitement IFN  $\alpha$  et  $\gamma$  (25ng/mL). Heatmap de synthèse des données de quantification relative ; vert vif : faiblement transcrit, rouge vif : fortement transcrit. Nombre d'expérience : 5

Au niveau protéique (**Figure 17**) et par rapport aux cellules non traitées (HSG) on observe sur la fraction nucléaire une réduction de DNMT1 et DNMT3A avec l'IFN  $\alpha$ , alors que l' $H_2O_2$  utilisée à 150 $\mu$ M est capable d'induire DNMT1 comme décrit précédemment, **Figure 14**. Pour TET2, aucun effet n'est observé y compris avec l' $H_2O_2$ . Pour TET3 on ne note pas d'effet pour l'IFN  $\alpha$  et l'IFN  $\gamma$  alors que l'effet est faible avec l' $H_2O_2$ .

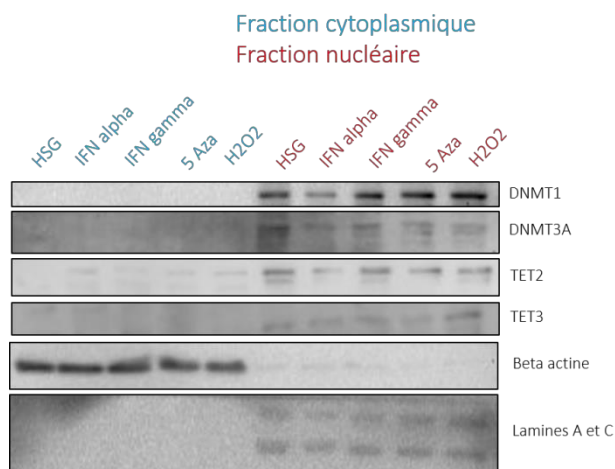
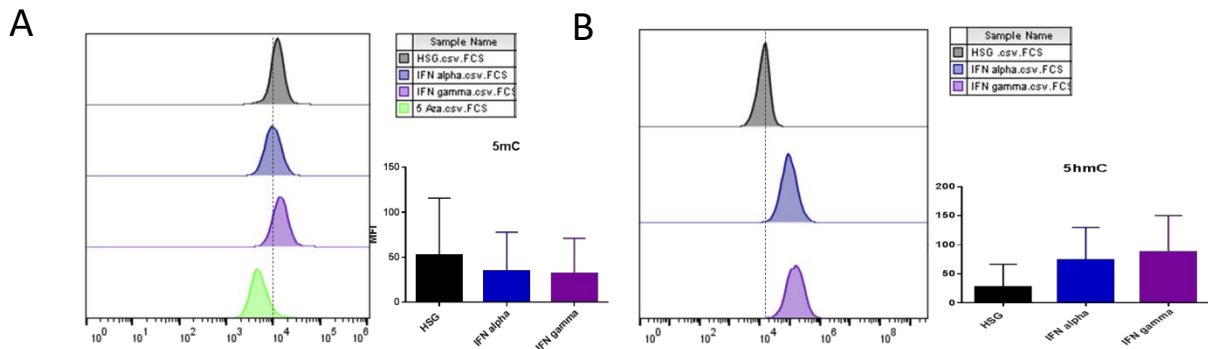


Figure 17 : Impact des traitements IFN alpha et gamma sur l'expression des enzymes DNMTs (DNA methyltransférase) et TETs (Ten-eleven Translocation Enzymes). Western blot sur extraits fractionnés des protéines : DNMT1, DNMT3A, TET2, TET3 et lamines A et C après 48h de traitement IFN  $\alpha$  et  $\gamma$  (25ng/mL), 25 $\mu$ M de 5 aza (azacytidine) et 250 $\mu$ M de  $H_2O_2$ .

### C. IFNs et méthylation/hydroxyméthylation de l'ADN

L'impact de l'IFN  $\alpha$  et de l'IFN  $\gamma$  sur la méthylation et l'hydroxyméthylation globale de l'ADN des HSG a également été étudié (**Figures 18A**). On ne note aucun effet des deux types d'IFN sur la méthylation de l'ADN (5mC) contrairement à ce qui est observé pour le 5-azacytidine un inhibiteur des DNMTs. En revanche, l'augmentation de l'hydroxyméthylation (5hmC) est significative pour l'IFN alpha et l'IFN gamma (**Figures 18B**).



**Figure 18 : Impact des traitements IFN (Interférons)  $\alpha$  (alpha) et  $\gamma$  (gamma) sur la méthylation et l'hydroxyméthylation de l'ADN.**

Mesure de la méthylation de l'ADN (5mC ; 5 méthyl-cytosine, A) et de l'hydroxyméthylation de l'ADN (5hmC ; 5 hydroxyméthyl-cytosine, B) après traitement des HSG avec IFN  $\alpha$  et  $\gamma$  et 5 aza (5 azacytidine à 25 $\mu$ M, contrôle positif de déméthylation de l'ADN) par cytométrie en flux  
Test de Mann Whitney : \* $p \leq 0.05$

Ces résultats indiquent un effet des IFNs  $\alpha$  et  $\gamma$  sur le processus actif de déméthylation de l'ADN via la formation de groupements 5hmC probablement médiée par l'induction de TET3 via l'activation de pSTAT1.

### D. Effets des IFN sur la génération des ROS

Nous avons précédemment montré que la voie Jak/STAT3 avait un effet sur le contrôle des ROS. C'est pourquoi l'effet de l'IFN  $\alpha$  et de l'IFN  $\gamma$  sur la génération d'un stress oxydatif après traitement des cellules HSG pendant 48h a été mesurée (**Figure 19**). Afin d'étudier la possible implication d'une voie Stat-ROS. Aucun effet des IFNs n'est observé.

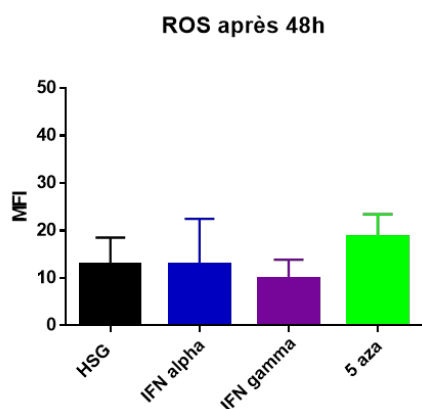


Figure 19 : Impact du traitement IFN (Interféron)  $\alpha$  (alpha) et  $\gamma$  (gamma) sur la génération de ROS (reactive oxygen species). Mesure du stress oxydatif en cytométrie en flux avec la sonde intracellulaire  $H_2DCF-DA$  (2', 7'-Dichlorodihydrofluorescéine diacétate) à la suite d'un traitement avec les IFNs  $\alpha$  et  $\gamma$  et d'un traitement avec un agent déméthylant de l'ADN le 5 azacytidine (5 Aza). Nombre d'expérience : 8. MFI : *mean fluorescence intensity* ; Moyenne d'intensité de fluorescence.

### E. Effets sur les gènes cibles

Comme décrit précédemment (Wu et al., 1997), on retrouve une augmentation de l'expression à la membrane des cellules HSG de la molécule d'adhésion ICAM-1 en présence d'IFN  $\gamma$ , cet effet n'est pas retrouvé en présence d'IFN  $\alpha$ .

L'ensemble de ces résultats indique une induction d'ICAM-1 et PDL-1 à la suite de stimulations IFN  $\alpha$  et  $\gamma$  n'empruntent pas les mêmes voies et que si pSTAT1 est impliqué ce facteur n'est pas suffisant pour en contrôler l'expression.

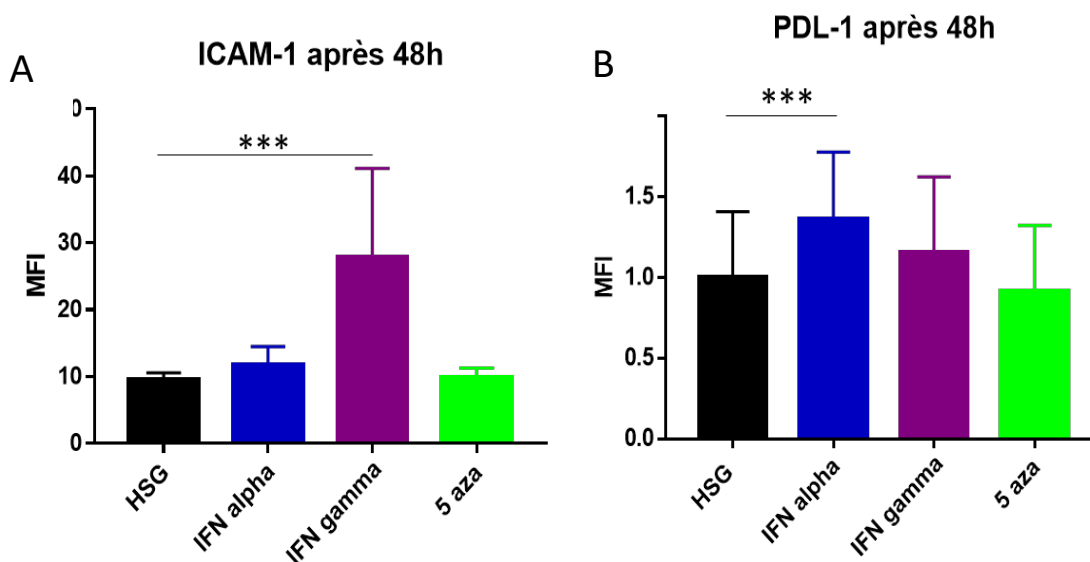


Figure 20 : Impact du traitement IFN (Interféron)  $\alpha$  (alpha) et  $\gamma$  (gamma) sur ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) et PDL-1 (programmed death ligand-1) Mesure de l'induction à la membrane de ICAM-1 et PDL-1 par cytométrie en flux (A) et (B) respectivement suite au traitement avec des IFNs et le 5aza (5azacytidine). Nombre d'expérience : 13. Test de Student : \*\*\* $p \leq 0.001$ . MFI : *mean fluorescence intensity* ; Moyenne d'intensité de fluorescence.

## Conclusions PARTIE 2 (Figure 21) :

Dans cette seconde partie, nous avons pu montrer que le traitement des HSG avec les IFNs  $\alpha$  et  $\gamma$  ont un impact sur le processus actif de déméthylation de l'ADN. Cet effet passerait par une augmentation des TETs et en particulier de TET3. Si cet effet devait passer par la voie Jak/STAT, c'est pSTAT1 qui serait impliqué et non pSTAT3. Par ailleurs ces deux types d'interférons activent des voies distinctes avec pour résultats une induction à la membrane de ICAM-1 strictement dépendante de IFN  $\gamma$  et une induction à la membrane de PDL-1 strictement dépendante de IFN  $\alpha$ . Enfin le lien entre l'expression d'ICAM-1 et PDL-1 par les IFNs et un processus épigénétique reste à démontrer.

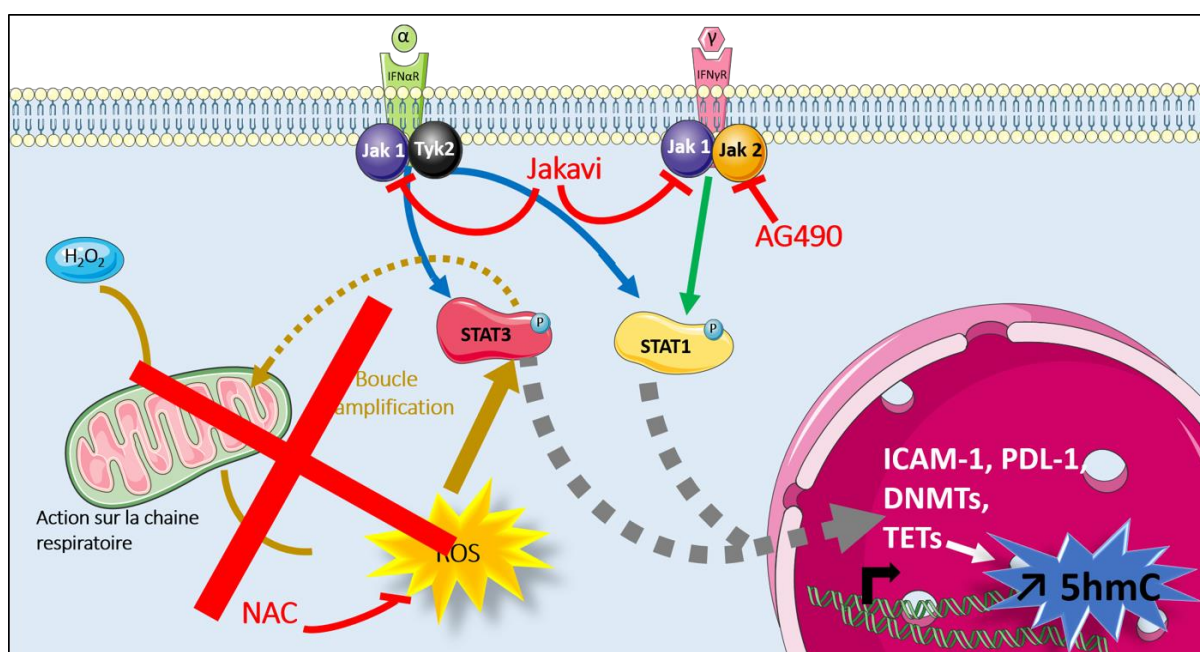


Figure 21: Conclusion PARTIE2

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène

IFN : Interféron

ROS : Espèces Réactives de l'oxygène

NAC : N-acétylcystéine

STAT3 : Signal Transducers and Activators of Transcription

DNMTs: DNA Methyl Transferase

TET: Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase

5hmC: Hydroxyméthylation AND



## IV. Conclusion/Discussion

Ce dernier travail s'est articulé en 2 parties avec dans un premier temps l'étude de l'impact d'un traitement à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puis dans un second temps l'étude de l'effet des IFNs sur le méthylome et l'hydroxyméthylome des cellules HSG.

Les principaux résultats de ces deux études sont résumés ci-dessous :

	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	IFN $\alpha$	IFN $\gamma$
DNMTs (RTqPCR)	↗ DNMT3A/3B	↗ DNMT3A	-
DNMTs (WB)	↗ DNMT1/3A	↘ DNMT1/3A	-
TETs (RTqPCR)	↗ TET3	↗ TET3	↗ TET3
TETs (WB)	↗ TET3, TET2	↗ TET3	↗ TET3
5mC	↘	-	-
5hmC	↗	↗	↗
pSTAT1 (Y701)	absent	Présent	présent
pSTAT3 (Y705)	présent	Absent	absent
ROS	Génération de ROS	Pas de ROS	Pas de ROS
Induction ICAM-1	présente	Absente	présente
Induction PDL-1	présente	Présente	absente

### PARTIE 1 : Etude de l'effet d'un traitement H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les HSG

Au cours de cette étude nous avons pu observer un effet dose dépendant du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur le niveau d'expression des transcrits de DNMTs et TETs, qui est retrouvé au niveau protéique.

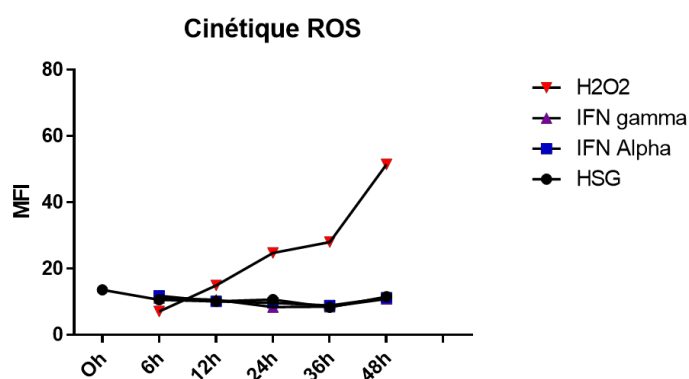
Ces premières observations ont conduit à mesurer le possible impact de cette dérégulation sur le niveau global de méthylation et d'hydroxyméthylation de l'ADN. Avec un effet notable sur l'hydroxyméthylation de l'ADN, on note une augmentation maximale du taux de 5hmC à la concentration de 100µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En revanche l'effet sur la méthylation est plus faible mais permet tout de même d'observer une diminution qui serait également maximale à 100µM avant d'observer une augmentation. Au-delà de cette concentration et surtout pour la condition à 250µM on observe un impact négatif du traitement qui va affecter la survie et le cycle cellulaire.

Par la suite il a été mis en évidence l'activation de la voie Jak-Stat via la phosphorylation de STAT3. Il semble que nos données rejoignent les observations de Wang et collègues, avec une boucle STAT-ROS, c'est ce que l'on observe avec les figures 11, 12 et 13. Où l'on constate que la phosphorylation de STAT3 (**Figure 11**) est nécessaire pour la génération de ROS, et l'induction à la membrane d'ICAM-1 (**Figure 12**) et de PDL-1 (**Figure 13**). Par ailleurs les ROS sont nécessaires à cette induction, puisqu'en leur absence, un traitement avec l'antioxydant NAC, on a évidemment moins de ROS, mais également une absence de ICAM-1 et PDL-1 à la membrane.

De plus l'implication de STAT3 comme facteur de transcription ciblant DNMTs et TETs a pu être montrée dans le passé (Pan et al., 2017; Zhang et al., 2006) et semble être ce que l'on observe dans nos résultats.

## PARTIE 2 : Etude de l'effet des IFNs $\alpha$ et $\gamma$ sur les HSG et son méthylome

La voie Jak-STAT est activée à la suite de stimulations IFNs. C'est ce qui est confirmé en Figure 15. Comme cela a pu être décrit par Lagos et collègues, on retrouve un effet des cytokines sur le méthylome et l'hydroxyméthylome qui serait dû à l'augmentation de l'expression de TET2 et TET3 (Lagos et al., 2018). Cependant à la suite de la première partie de ce travail, l'absence de génération de ROS après des traitements IFNs ne permet pas d'imaginer le même schéma d'action que pour  $H_2O_2$ . De plus une mesure au cours du temps n'a pas permis de détecter une génération de ROS au cours des 48h (**Figure S1**).



**Figure S1** : Mesure de la génération de ROS (reactive oxygen species) au cours du temps en l'absence de traitement et à la suite d'un traitement avec IFN (Interféron)  $\alpha$  et  $\gamma$  (25ng/ml) et à la suite d'un traitement au  $H_2O_2$  (peroxyde d'hydrogène) (250 $\mu$ M)

Cependant la technique de mesure des ROS utilisée permet d'apprécier uniquement le niveau total des ROS dont les sources sont multiples. Ainsi parmi les autres organites de la cellule on peut observer une génération à partir du peroxysome, du réticulum endoplasmique en plus de la mitochondrie. Il serait donc intéressant de cibler directement la mitochondrie en mesurant notamment la réduction du cytochrome C. Enfin on retrouve une induction des cibles ICAM-1 et PDL-1 qui se fait de façon distincte par IFN alpha pour PDL-1 et par IFN gamma pour ICAM-1.

Le microenvironnement inflammatoire semble ainsi pouvoir jouer un rôle dans les phénomènes épigénétiques observés dans les cellules épithéliales et doit donc être davantage exploré.

## V. Bibliographie

Charras, A., Konsta, O.D., Dantec, C.L., Bagacean, C., Kapsogeorgou, E.K., Tzioufas, A.G., Pers, J.-O., Bordron, A., and Renaudineau, Y. (2017). Cell-specific epigenome-wide DNA methylation profile in long-term cultured minor salivary gland epithelial cells from patients with Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 76, 625–628.

Cole, M.B., Quach, H., Quach, D., Alice, B., Taylor, K.E., Barcellos, L.F., and Criswell, L.A. (2016). Epigenetic signatures of salivary gland inflammation in sjögren's syndrome. *Arthritis Rheumatol.* n/a-n/a.

Gottenberg, J.-E., Cagnard, N., Lucchesi, C., Letourneur, F., Mistou, S., Lazure, T., Jacques, S., Ba, N., Ittah, M., Lepajolec, C., et al. (2006). Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2770–2775.

Lagos, C., Carvajal, P., Castro, I., Jara, D., González, S., Aguilera, S., Barrera, M.-J., Quest, A.F.G., Bahamondes, V., Molina, C., et al. (2018). Association of high 5-hydroxymethylcytosine levels with Ten Eleven Translocation 2 overexpression and inflammation in Sjögren's syndrome patients. *Clin. Immunol.*

Lee, C.-W., Wu, C.-H., Chiang, Y.-C., Chen, Y.-L., Chang, K.-T., Chuang, C.-C., and Lee, I.-T. (2018). Carbon monoxide releasing molecule-2 attenuates *Pseudomonas aeruginosa*-induced ROS-dependent ICAM-1 expression in human pulmonary alveolar epithelial cells. *Redox Biol.* 18, 93–103.

Pan, Z., Xue, Z.-Y., Li, G.-F., Sun, M.-L., Zhang, M., Hao, L.-Y., Tang, Q.-Q., Zhu, L.-J., and Cao, J.-L. (2017). DNA Hydroxymethylation by Ten-eleven Translocation Methylcytosine Dioxygenase 1 and 3 Regulates Nociceptive Sensitization in a Chronic Inflammatory Pain Model. *Anesthesiol. J. Am. Soc. Anesthesiol.* 127, 147–163.

- Raghuraman, S., Donkin, I., Versteyhe, S., Barrès, R., and Simar, D. (2016). The Emerging Role of Epigenetics in Inflammation and Immunometabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 27, 782–795.
- Ramos-Casals, M., Brito-Zerón, P., Sisó-Almirall, A., and Bosch, X. (2012). Primary Sjögren syndrome. *BMJ* 344, e3821.
- Smallwood, M.J., Nissim, A., Knight, A.R., Whiteman, M., Haigh, R., and Winyard, P.G. (2018). Oxidative stress in autoimmune rheumatic diseases. *Free Radic. Biol. Med.*
- Thabet, Y., Le Dantec, C., Ghedira, I., Devauchelle, V., Cornec, D., Pers, J.-O., and Renaudineau, Y. (2013). Epigenetic dysregulation in salivary glands from patients with primary Sjögren's syndrome may be ascribed to infiltrating B cells. *J. Autoimmun.* 41, 175–181.
- Tzioufas, A.G., Kapsogeorgou, E.K., and Moutsopoulos, H.M. (2012). Pathogenesis of Sjögren's syndrome: What we know and what we should learn. *J. Autoimmun.* 39, 4–8.
- Wang, Y., Yu, X., Song, H., Feng, D., Jiang, Y., Wu, S., and Geng, J. (2018a). The STAT-ROS cycle extends IFN-induced cancer cell apoptosis. *Int. J. Oncol.* 52, 305–313.
- Wang, Y., Wang, H., Yao, H., Li, C., Fang, J.-Y., and Xu, J. (2018b). Regulation of PD-L1: Emerging Routes for Targeting Tumor Immune Evasion. *Front. Pharmacol.* 9.
- Wangpaichitr, M., Kandemir, H., Li, Y., Wu, C., Nguyen, D., Feun, L., Kuo, M., and Savaraj, N. (2017). Relationship of Metabolic Alterations and PD-L1 Expression in Cisplatin Resistant Lung Cancer. *Cell Dev. Biol.* 6.
- Winrow, V.R., Winyard, P.G., Morris, C.J., and Blake, D.R. (1993). Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Br. Med. Bull.* 49, 506–522.
- Winyard, P.G., Moody, C.J., and Jacob, C. (2005). Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends Biochem. Sci.* 30, 453–461.
- Wu, Q., and Ni, X. (2015). ROS-mediated DNA methylation pattern alterations in carcinogenesis. *Curr. Drug Targets* 16, 13–19.
- Wu, A.J., Chen, Z.J., Kan, E.C., and Baum, B.J. (1997). Interferon- $\gamma$ -induced JAK2 and STAT1 signalling in a human salivary gland cell line. *J. Cell. Physiol.* 173, 110–114.
- Zhang, Q., Wang, H.Y., Woetmann, A., Raghunath, P.N., Odum, N., and Wasik, M.A. (2006). STAT3 induces transcription of the DNA methyltransferase 1 gene (DNMT1) in malignant T lymphocytes. *Blood* 108, 1058–1064.

# Discussion

Les objectifs de ce travail de thèse visaient notamment à mieux comprendre les défauts de méthylation de l'ADN observés dans les cellules épithéliales des glandes salivaires au cours du SGS ainsi que lors du passage du SGS vers un lymphome B de type MALT. Ceci afin de mieux comprendre le rôle des modifications de la méthylation de l'ADN dans le développement de la pathologie

Au cours du premier article, une analyse plus fine du méthylome des SGECS a été conduite entre des témoins et des patients atteints d'un SGS. Cette étude réalisée à partir de la puce HM450K d'Illumina, nous a permis de relier des voies physiopathologiques importantes du SGS avec le processus de méthylation de l'ADN. Cela a permis de mettre en lumière des altérations de la méthylation affectant des acteurs des voies calciques, de la voie WNT et aussi de retrouver une signature interféron. Enfin, une mise en parallèle avec des données de méthylomes obtenues à partir des lymphocytes B et T au cours du SGS par d'autres équipes ont permis de confirmer la spécificité cellulaire du processus épigénétique.

Les travaux du second et troisième article permettent de mettre en évidence les conséquences de cette altération du méthylome et s'intéressent à la régulation de l'expression de deux gènes sensibles à la méthylation de l'ADN à savoir l'autoantigène SSB/La (Article 2) et la cytokératine 19 (Article 3). Par ce travail, un défaut de méthylation dans les SGECS de patients associé avec une infiltration lymphocytaire a été confirmé sur une cohorte d'origine grecque et donc différente de l'étude princeps réalisée à partir de patients recrutés au niveau du site Brestois (Thabet et al., 2013). Par ailleurs une association a pu être faite entre ce défaut de méthylation de l'ADN et le profil sérologique des patients porteurs d'autoanticorps anti-SSB/La. Par la suite il a été montré dans un premier temps sur le modèle *in vitro* par l'utilisation d'un inhibiteur de DNMTs (le 5 Azacytidine), une régulation de l'expression des gènes SSB/La et KRT19 par la méthylation de l'ADN. Cela a été par la suite retrouvé, confirmé chez les patients puis appuyé par les données de méthylome issues de la puce 450k réalisée sur de l'ADN extrait de SGECS. Ces études permettent ainsi de souligner l'importance de la méthylation de l'ADN dans la pathogenèse et notamment au niveau de la surproduction de l'autoantigène SSB/La ce qui pourra favoriser la production d'auto anticorps anti-SSB/La.

L'Article 4 souligne l'implication de facteurs génétiques associés au SGS et leurs liens avec les processus épigénétiques.

Enfin la dernière partie de ce travail de thèse a permis d'explorer le rôle du microenvironnement inflammatoire (ROS et IFNs) sur les processus de méthylation et déméthylation de l'ADN.

## I. Etablissement d'un lien entre les voies physiologiquement importantes et l'altération de la méthylation de l'ADN constatée

De façon intéressante nous avons identifié l'implication de la voie calcique et de la voie WNT par notre approche bio-informatique. Par ailleurs nous avons pu observer une régulation possible par les voies interférons pour ces gènes différenciellement méthylés

### A. La voie calcique

Le calcium joue un rôle primordial dans la salivation, c'est plus précisément son entrée qui est importante. De nombreuses études soulignent son importance pour le bon fonctionnement de la glande salivaire (Ambudkar, 2018). En ce qui concerne le SGS de nombreuses pistes sont explorées et restent encore sujettes à discussion et compréhension. À la suite de l'analyse

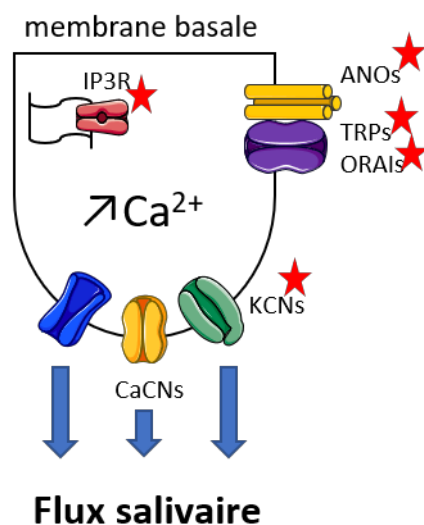


Figure 29: les acteurs calciques impliqués dans l'établissement du flux salivaire.

conduite dans l'Article 1 des acteurs clés de la voie calciques ont été mis en évidence comme différenciellement méthylés (Figure 29). On retrouve ainsi parmi les sites différenciellement déméthylés au cours du SGS l'IP3R (Inositol trisphosphate receptor) qui participe au relargage du calcium du réticulum endoplasmique, dont l'implication dans la pathologie a été soulignée par les travaux conduits par l'équipe de Ambudkar et collègues (Ambudkar, 2018). Il a été observé chez les patients SGS un défaut d'IP3R2 et une mauvaise localisation d'IP3R3 dans les cellules acinaires. Par la suite les travaux de Zeng et collègues sur la souris ont permis de démontrer que les déficiences en IP3R2 et IP3R3 conduisent, à une perte de la salivation, à un dysfonctionnement des glandes lacrymales et à une inflammation progressive au niveau oculaire (Zeng et al., 2017). Notre étude a mis également en évidence des défauts de méthylation des canaux ORAIs (Calcium release-activated calcium channel protein). Les canaux ORAIs sont activés suite à une baisse des

réserves calciques intra-cellulaire (Putney, 2009). C'est STIM1 (sensor protein stromal interaction molecule 1) qui va jouer un rôle de senseur auprès d'ORAI. En effet de par sa localisation au niveau du réticulum endoplasmique, STIM1 va détecter la baisse des réserves calciques, pour former des « clusters » et se relocaliser près de la membrane plasmique avec le canal ORAI. Ainsi l'interaction STIM1-ORAI va permettre l'entrée de calcium dans la cellule (Gudlur et al., 2013; Park et al., 2009; Zhou et al., 2010, 2013) *via* la voie SOCE (Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry) qui est critique pour la sécrétion de salive (Ambudkar, 2018). Bien que des mutations pour ORAI1 et de STIM1 aient été mises en évidence (Feske, 2009; Feske et al., 2015), au cours du SGS c'est le niveau d'expression de STIM1 qui semble critique (Cheng et al., 2012).

L'implication de mécanismes épigénétiques en lien avec le calcium a été mis en évidence avec notamment l'identification du miRNA ebv-miR-BART13-3p (Alevizos et al., 2011; Gallo et al., 2016). Ce miRNA pourrait être transféré par des exosomes des lymphocytes B aux cellules épithéliales de la glande (Gallo et al., 2012). Son expression dans la cellule épithéliale permettrait *in fine* la diminution du niveau de protéines STIM1 sans affecter le niveau de transcrits. Ainsi cela aurait pour effet d'atténuer le signal SOCE et d'altérer l'activation du facteur de transcription NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) et des cibles de celui-ci. Les autres cibles de ce miRNA sont la pompe SERCA (pompe Ca<sup>2+</sup> ATP dépendante, que l'on retrouve à la surface du réticulum endoplasmique) et le canal hydrique AQP5 (aquaporine5) (Gallo et al., 2016).

Il semble donc exister un lien entre ce défaut physiologique et une régulation par des mécanismes épigénétiques. Ainsi mieux comprendre ces régulations permettrait d'envisager l'utilisation de drogues épigénétiques afin de participer à la restauration du flux calcique des cellules épithéliales de la glande salivaire des patients souffrants d'un SGS.

## B. La voie WNT

De manière globale c'est une voie importante pour la régénération et la prolifération cellulaire. Pour la glande salivaire sous-maxillaire, la voie WNT intervient dans la morphogenèse et la différenciation cellulaire lors son développement. De plus la signalisation WNT contrôlerait la différenciation des cellules pro-acinaires et la formation des canaux, cela en coopération avec les voies FGF (Facteur de croissance des Fibroblastes) et KIT (protéine tyrosine kinase)



(Matsumoto et al., 2016). Récemment une étude fait état d'un phénomène de senescence précoce des cellules souches de la glande salivaire, avec des télomères raccourcis et un défaut de prolifération retrouvés chez les patients SGS (Pringle et al.). La senescence cellulaire se manifeste par un arrêt irréversible du cycle cellulaire, arrêt qui requiert l'action de plusieurs suppresseurs de tumeurs dont p53, pRB (protéine du rétinoblastome) et p16<sup>Ink4a</sup> (Cyclin-Dependent Kinase 4 Inhibitor A) (Brondello et al., 2012). La senescence serait un mécanisme à 2 visages qui d'une part favoriserait les mécanismes de cicatrisation et constituerait une barrière onco-suppressive. Et d'autre part contribuerait au vieillissement, à la dégénérescence tissulaire qui mènerait à des pathologies en lien avec le vieillissement (Brondello et al., 2012).

Pour Pringle et collègues, la diminution du pool de cellules souches et leur différenciation en cellules acinaires aurait pour but de maintenir la production de salive. De plus ils établissent un lien entre cette senescence précoce et l'environnement inflammatoire. En effet lorsqu'ils exposent des cellules souches de patients sains à des cytokines pro-inflammatoires, ils observent une prolifération cellulaire, l'expression de gènes en lien avec la senescence et la différenciation en cellules ductales intercalaires. Ainsi ils soulignent la possibilité d'envisager un traitement par régénération cellulaire avec la possibilité d'utiliser des iPS (*Induced Pluripotent Stem Cells*) en plus d'un traitement contre l'inflammation comme piste thérapeutique afin de favoriser la régénération de la salivation.

### C. Les voies interférons

Une première analyse via interférométrie nous a permis de mettre en évidence une régulation par les voies interférons de plus de 60% des gènes identifiés comme différentiellement méthylés. Cela est en adéquation avec des précédentes études qui soulignaient une signature interféron chez les patients SGS (Gottenberg et al., 2006). Par la suite des sous-analyses au sein de nos groupes de patients nous ont permis d'observer un glissement d'une régulation plutôt de type I pour les patients souffrant d'un SGS à une régulation plutôt de type II pour les patients souffrant en plus d'un SGS d'un lymphome de type MALT (**Figure 30**)

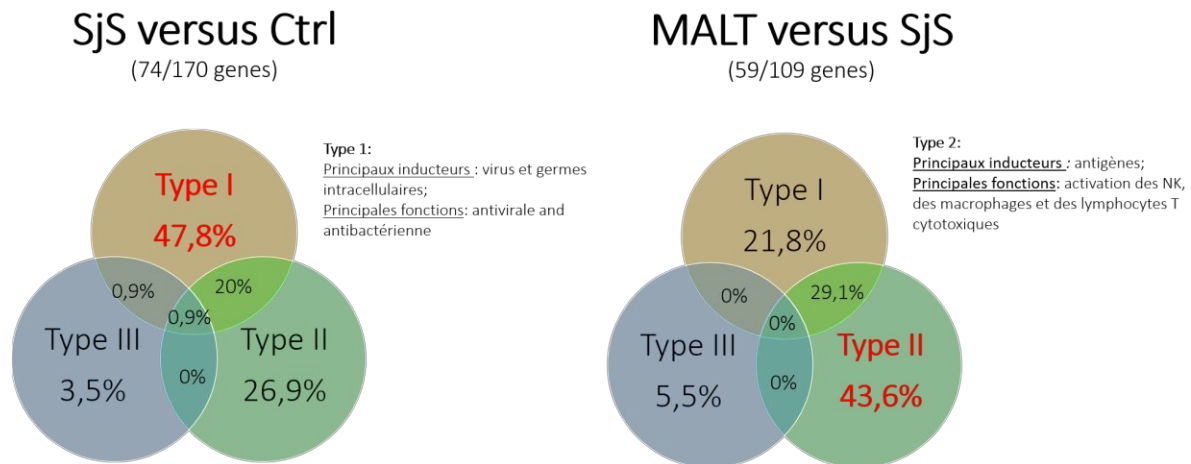


Figure 30: une régulation interféron de type I est observé pour le groupe SGS tandis qu'il s'agirait d'une régulation de type 2 pour le groupe SGS+MALT.

Ces différences de régulation pourraient être expliquées par des inductions différentes de ces 2 types d'interférons (Voir paragraphe sur la signature interféron en introduction). L'implication de l'IFN de type I reflète une sollicitation du système immunitaire inné tandis que l'IFN de type II serait plutôt un modulateur cette réponse, ceci pourrait ainsi constituer un marqueur d'évolution de la maladie.

Nos derniers résultats (voir Résultats 5) indiquent une action directe des interférons sur le méthylome/hydroxyméthylome des cellules. Ces résultats sont en adéquation avec une publication récente de Lagos et collègues (Lagos et al., 2018). En effet ces auteurs décrivent une augmentation de l'hydroxyméthylation de l'ADN qui s'expliquerait par une augmentation de l'enzyme TET2 chez les patients. De plus ils établissent un lien avec des interférons en retrouvant ces observations *in vitro* à la suite d'une stimulation par de l'interféron de la lignée cellulaire HSG. Cependant ils ne décrivent pas les voies de signalisations sous-jacentes potentiellement impliquées dans ce processus actif de déméthylation de l'ADN. Ainsi ces nouveaux éléments apportent de nouvelles perspectives à l'implication les interférons dans la physiopathologie du SGS. Bien qu'ils soient également un outil thérapeutique, la prise d'interférons peut conduire à des complications. C'est le cas notamment de l'IFN de type 1 avec l'IFN  $\alpha$ , qui est déjà utilisé en thérapeutique lors d'hépatites virales chroniques, de mélanomes, etc. Dans certains cas l'utilisation d'IFN  $\alpha$  peut s'accompagner du développement d'un lupus induit, les symptômes disparaissant à l'arrêt du traitement. Pour l'IFN  $\gamma$  (Type II) aucune complication auto-immune n'a été rapportée (Borg and Isenberg, 2007).

Récemment l'utilisation d'un inhibiteur ciblant Jak1 (le filgotinib) a permis de montrer sur des SGECS de patients, une diminution de l'expression de BAFF chez l'Homme. Et son administration à la souris, sur le modèle NOD/ShiLtJ, a permis d'observer une atténuation de la détérioration du flux salivaire. Par ailleurs, l'effet sur la voie Jak-Stat a été confirmé dans les 2 cas par l'obtention d'une inhibition de l'activation des STATs (Lee et al., 2018b)

Nos résultats soulignent également l'implication de la voie Jak-Stat dans ce processus de déméthylation actif. Nos approches *in-vitro*, avec une stimulation des HSG avec du peroxyde d'hydrogène indiquent un processus de déméthylation actif qui implique une voie Jak-STAT3-ROS. Cette voie a récemment été décrite sur un autre type cellulaire par Wang et collègues avec la description d'une boucle IFN-STAT-ROS (Wang et al., 2018)

Ainsi les inhibiteurs des voies Jak-Stat apparaissent prometteurs comme piste thérapeutique dans le SGS.

## II. Les mécanismes d'actions en jeu

### A. Les facteurs génétiques et leurs liens avec les facteurs épigénétiques

A la suite de l'analyse conduite dans l'article 4, 72 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) ont été retrouvés associés à 43 gènes identifiés comme facteurs de risques. Ils sont retrouvés majoritairement au niveau des régions introniques. Cela coïncide avec la localisation des CpGs que l'on retrouve différenciellement méthylé (Article 1) et qui sont retrouvés également majoritairement au niveau du corps du gène (**Figure 31**).

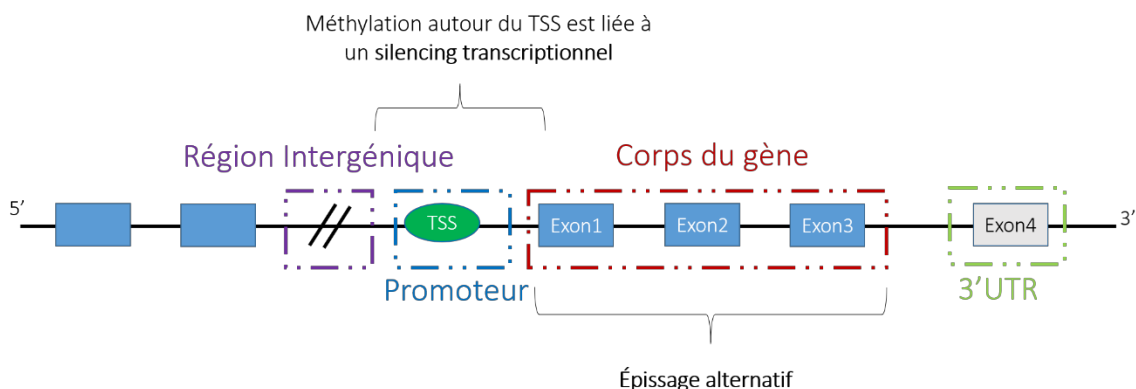


Figure 31: les différentes régions géniques

TSS : Site d'Initiation de la transcription ; 3'UTR : 3'Untranslated Transcribed Region

Ces zones correspondent à des zones d'épissages alternatifs, et pourront avoir un impact sur la transcription du gène cible et l'obtention d'une protéine finale.

Parmi les explications à cette observation, il y a le fait que le polymorphisme le plus commun pour le génome humain est la transition d'une cytosine à une thymine (Jiang et al., 2007; Zhao and Jiang, 2007). De plus il est admis qu'une cytosine qui n'est pas méthylée, est plus sujette à des mutations (Wang et al., 1982). On sait également que 6 à 8 % des SNPs conduisent à la création de site CpG ou à leur potentiel perte. Enfin à cela s'ajoute le phénomène de co-méthylation qui, lorsqu'un site est méthylé, il a de forte chance d'entraîner la méthylation du site le plus proche (Eckhardt et al., 2006).

## B. Les altérations du méthylome/hydroxyméthylome et leur origine

Les défauts de DNMT1 (Thabet et al., 2013) et l'augmentation de l'enzyme TET2 (Lagos et al., 2018) constatés dans les SGECS soulignent l'importance de ces deux voies dans le contrôle de la méthylation de l'ADN chez les patients (Article 1). Concernant DNMT1, la voie PKC $\delta$ /Erk/DNMT1 est suspecté et l'implication des lymphocytes B sur cette voie a été démontrée (Thabet et al., 2013). Au cours du lupus, il a été montré qu'un stress oxydatif participait à la nitration de PKC $\delta$  empêchant ainsi sa phosphorylation et donc l'activation de cette voie (Gorelik et al., 2012). Ainsi on pourrait imaginer en plus de l'implication des lymphocytes infiltrants la glande salivaire, la participation des molécules de ce nouvel environnement pro-inflammatoire dans l'inhibition de PKC $\delta$ .

Pour les enzymes TETs, la voie Jak-STAT est fortement suspectée (Résultats 5). De plus à la suite de la génération d'un stress oxydatif, on observerait la présence d'une voie STAT-ROS qui serait à l'origine d'une augmentation de TET3 et de l'hydroxyméthylation de l'ADN (Résultats 5).

Par ailleurs, récemment des altérations morphologiques et fonctionnelles de la glande salivaire des patients en lien avec un stress élevé du réticulum endoplasmique ont été soulignées. Ce stress réticulaire se manifesterait à la suite, ou du fait, d'un défaut de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1 (voie UPR classique : *unfolded protein response*) qui serait dû à une répression transcriptionnelle en lien avec une hyperméthylation des promoteurs des gènes de cette voie. Ces mêmes gènes présentent une régulation de leurs expressions également par l'IFN  $\gamma$  (Sepúlveda et al., 2018).

L'ensemble de ces observations permettrait d'imaginer le schéma ci-dessous (**Figure 32**) :

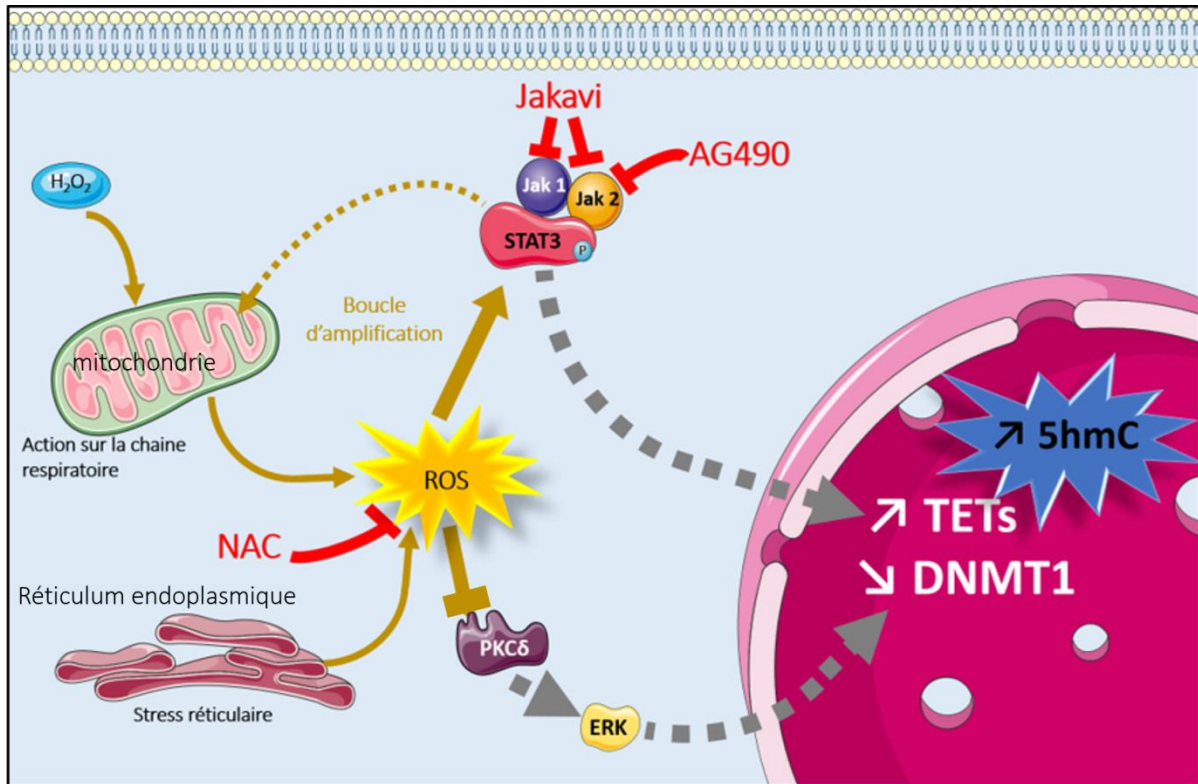


Figure 32: Lien entre l'activation des TETs et l'inhibition des DNMTs imaginé au niveau des cellules épithéliales de la glande salivaire.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène ; JAK 1,2 : Janus Kinase 1,2 ; STAT3 : Signal Transducers and Activators of Transcription ; ROS: Espèces Oxygénés Réactives ; PKCδ : Protéine Kinase C δ ; ERK : Extracellular signal-regulated kinases ; 5hmC : 5 hydroxyméthylcytosine ; TETs : Tet methylcytosine dioxygenases ; DNMT1 :DNA methyltransferase 1 ; Jakavi : ruxolitinib (inhibiteur Jak 1 et 2) ; AG490 : Tyrphostin (inhibiteur Jak2) ; NAC : N acétylcystéine.

Ainsi il pourrait être envisagé un traitement au N-acétylcystéine en complément des autres traitements envisagés. Une étude de 1986 en double aveugle sur l'effet du N-acétylcystéine sur des patients présentant un pSS et un sSS avait montré une amélioration de l'haleine (halitose) et de la sensation de soif, en revanche aucun changement concernant la composition de la salive n'avait été noté (Walters et al., 1986).

### III. Régulation de l'expression de deux gènes sensibles à la méthylation (SSB et cytokératine 19)

La conséquence de ces altérations du méthylome est d'une part la surproduction de l'autoantigène SSB/La et la production de l'auto-anticorps correspondant anti-SSB/La (Article 2). Et d'autre part une surexpression de la cytokératine 19 est constatée (Article 3).

#### A. SSB/La

Au cours du processus apoptotique des cellules épithéliales des glandes salivaires on observe à la surface des corps apoptotiques l'autoantigène SSB/La ce qui favorise la production des auto-anticorps anti-SSB/La par les lymphocytes B infiltrés. Cette apoptose est médiée par différents processus, via les lymphocytes T par un mécanisme Fas-FasL (Matsumura et al., 1998), par les lymphocytes B via la voie PKC $\delta$  (Varin et al., 2012), ainsi que *via* une troisième voie impliquant le stress réticulaire avec une relocalisation de SSB/La (Katsiogiannis et al., 2015). On peut donc imaginer un scénario qui serait le suivant avec dans un premier temps un stress cellulaire à l'origine des changements du méthylome conduisant à la surexpression de l'autoantigène SSB/La, puis lorsque le stress s'amplifie ce dernier participe à la mort cellulaire de la cellule et au relargage de l'auto-antigène, favorisant ainsi la production de l'auto-anticorps.

#### B. Cytokératine 19

La cytokératine 19 est un marqueur des cellules ductales et qui est peu présent dans les cellules acinaires. En lien avec les travaux récents de Pringle et collègues, la cytokératine 19 permettrait de suivre l'état physiologique de la glande salivaire et la différenciation en cellules ductales des cellules souches de la glande salivaire. Cela donnerait ainsi une indication quant à la progression de la pathologie et plus précisément le niveau de détérioration du tissu glandulaire.

## IV. Perspectives

L'une des perspectives de ce travail, actuellement en cours, est d'étudier l'hydroxyméthylation de l'ADN à partir d'une cohorte de patients SGS dont les cellules épithéliales ont été cultivées depuis février 2016 (**Figure 33**)

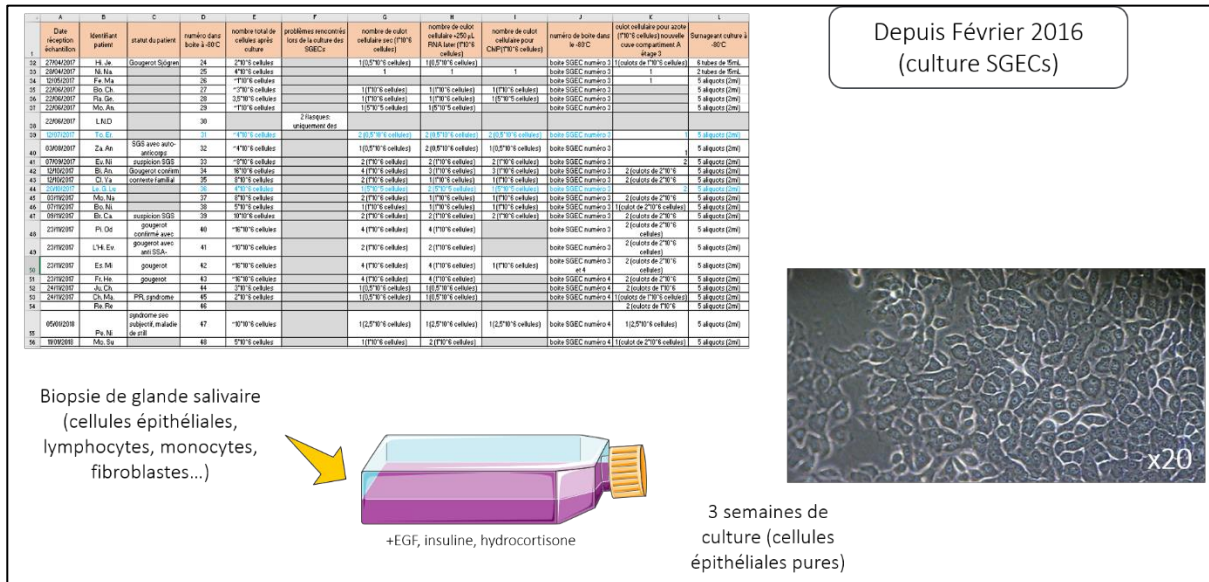


Figure 33: Collecte de SGECs de patients SGS et de patients contrôlé

Pour cette étude nous avons retenu une variante technologique, l'Infinium MethylationEPIC d'illumina®, proche de celle utilisée dans l'Article 1. Ainsi à la suite de l'extraction d'ADN génomique issu des SGECs, celui-ci va être traité selon le procédé détaillé en **Figure 34**, afin de permettre l'analyse de l'hydroxyméthylation de l'ADN de façon ciblée.

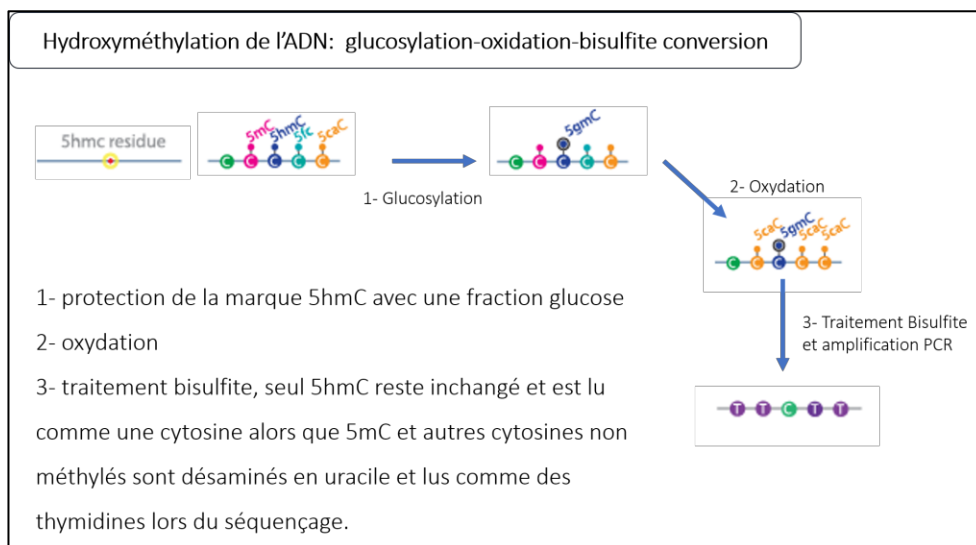


Figure 34: principe de l'analyse de l'hydroxyméthylation de l'ADN qui sera utilisé

5hmC : 5-hydroxyméthylcytosine ; 5mC : 5-méthylcytosine ; 5fC : 5-formylcytosine ; 5caC : 5-carboxylcytosine ; 5gmC : β-glucosyl-5-hydroxyméthylcytosine

De cette manière, nous pourrions discriminer et déterminer l'importance du processus de déméthylation active de l'ADN au cours du SGS. A cela, s'ajoute une étude de la méthylation de l'ADN sur les mêmes patients. Ces deux approches sont complémentaires, en effet lors du traitement au bisulfite de sodium de l'ADN on ne discrimine pas les cytosines méthylées et hydroxyméthylées **Figure 35**.

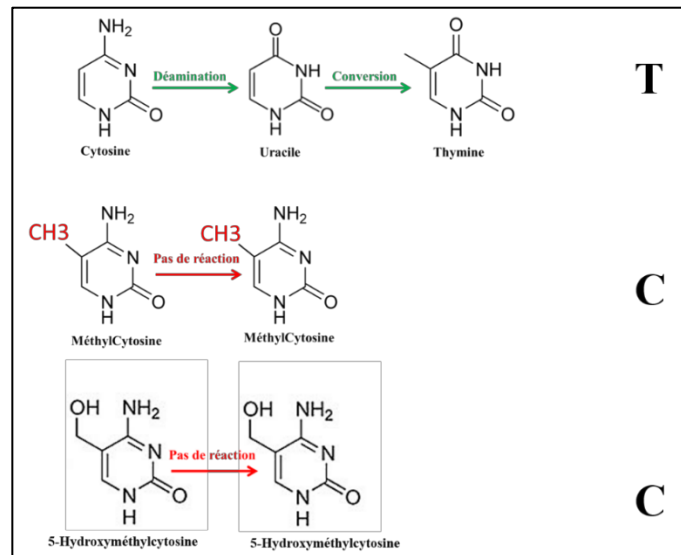


Figure 35: principe du traitement au bisulfite de sodium  
 CH<sub>3</sub> : groupement méthyl ; T : thymine ; C : cytosine

A cela s'ajoute une étude du transcriptome qui devrait permettre d'associer une signature transcriptionnelle à ces premières variations et de répondre en partie à l'implication de la voie Jak-Stat dans ces mécanismes.

Une deuxième perspective de cette étude est l'analyse plus fine de l'implication de la voie Jak-STAT et d'étudier chez les patients son implication.



## V. Conclusions

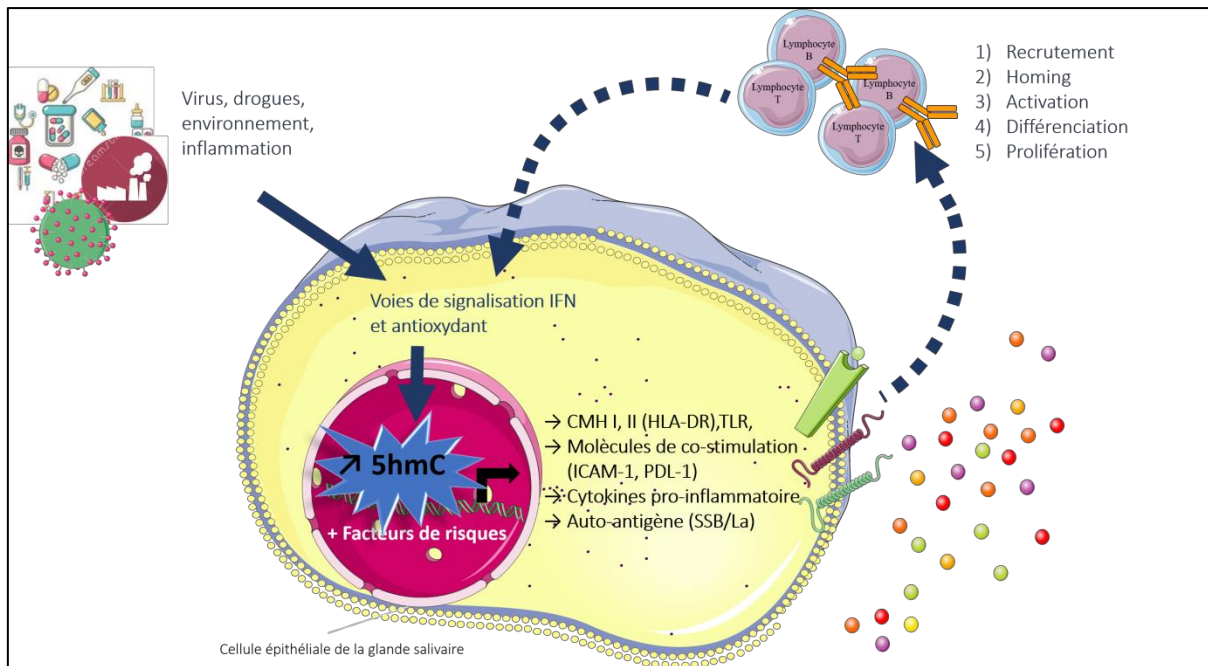


Figure 36: Figure Finale.

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité ; ICAM1 : InterCellular Adhesion Molecule1 ;  
 PDL-1 : Programmed death-ligand 1 ; 5hmC : 5hydroxyméthylcytosine ; IFN : Interféron

L'ensemble des observations faites au cours de ce travail permet d'obtenir le schéma final suivant **Figure 36**. Ainsi à la suite d'une activation des cellules épithéliales de la glande salivaire par des facteurs environnementaux, des drogues et un environnement inflammatoire, les voies interférons et de lutte contre un stress oxydatif seraient sollicitées. Cela aurait un impact direct sur le méthylome et l'hydroxyméthylome, permettant l'accès à l'ADN et favorisant la liaison de facteurs de transcription, qui dans un second temps permettrait la production par la cellule :

- De molécules de co-stimulation (ICAM-1 ; PD-L1 notamment)
- Du CMH de classe 1 et 2 (HLA-DR)
- De cytokines pro-inflammatoire
- D'auto-antigènes (notamment SSB/La).

La résultante de cela serait un recrutement des lymphocytes T puis B, qui grâce à l'environnement de la glande vont pouvoir être activés, proliférer et se différencier. Ces lymphocytes ayant eux-mêmes un impact sur le méthylome des cellules épithéliales. La cellule va ainsi perdre son identité de cellule sécrétrice de salive et devenir une cellule pseudo-présentatrice d'antigène qui va attiser cette boucle d'activation. Pour finir cette sur-

sollicitation des cellules épithéliales va aboutir à leur mort par apoptose et va conduire à une diminution drastique du pool de cellules souches de la glande salivaire.

Ainsi des questions restent :

- Quel est l'évènement déclencheur de l'inflammation ?
- Quel est le lien entre les mécanismes génétiques et épigénétiques ? lequel a un impact sur l'autre ?
- Enfin, est-il possible d'utiliser cette approche pour développer des drogues innovantes dans cette pathologie incurable ?

# Annexes

# Annexe 1

Voie	gène	Fonction du gène	référence
Fonction et signalisation des lymphocytes T	PTPN22	Récepteur lymphocyte T et signalisation des récepteurs de lymphocyte B	(Gomez et al., 2005)
	CTLA4	régulateur négatif de la fonction des lymphocytes T et maintient de la tolérance périphérique	(Downie-Doyle et al., 2006)
	GTF2IRD1-GTF2I	GTF2IRD1- Fonction non établi GTF2I -general transcription factor Iii (TFII-I), important pour la transcription et la transduction du signal dans les lymphocytes B et T	(Nordmark et al., 2009)
	STAT4	Facteur de transcription régulant la fonction des lymphocytes T	(Gestermann et al., 2010; Korman et al., 2008; Lessard et al., 2013; Li et al., 2013; Nordmark et al., 2009, 2011; Palomino-Morales et al., 2010)
	TCRBV	Récepteur lymphocyte T	(Lawson et al., 2005)
Fonction et signalisation des lymphocytes B	BLK	Tyrosine kinase non réceptrice impliqué dans la signalisation et le développement des lymphocytes B	(Lessard et al., 2013)
	FAM167A-BLK	FAM167A -Fonction non établi	(Nordmark et al., 2011)
	EBF-1	Facteur de Transcription pour le développement des lymphocytes B	(Nordmark et al., 2011)
	BAFF	B-cell activating factor, crucial pour la maturation des lymphocytes B	(Nossent et al., 2008)
Présentation antigénique et costimulation	Ro-52	Autoantigène	(Imanishi et al., 2005; Nakken et al., 2001)
	TAP2	Traitement de l'antigène	(Kumagai et al., 1997)
	CD40	Molécule costimulante du lymphocyte B	(Nordmark et al., 2011)
	CD14	Récepteur de reconnaissance de motifs	(Nordmark et al., 2011)
	TNFSF4/OX40L	Cytokine exprimée par de nombreuses cellules immunitaire, la liaison à TNFRSF4 abouti à la prolifération des lymphocytes T et à la production de cytokines	(Nordmark et al., 2011)
Cytokine, facteurs liés et récepteurs	IL-10	Anti-inflammatoire	(Font et al., 2002; Hukkonen et al., 2001; Qin et al., 2013)

	IL-4 récepteur alpha (IL-4R $\alpha$ )	Cytokine de la voie Th2	(Youn et al., 2000)
	IRF5(Interferon regulatory factor 5)	Facteur de transcription régulant la production d'interféron	(Lessard et al., 2013; Miceli-Richard et al., 2007, 2009; Nordmark et al., 2009)
	IRF5-TNPO3	Facteur de transcription régulant la production d'interféron	(Nordmark et al., 2009)
	IL-12 A	Importante cytokine de la voie Th1	(Lessard et al., 2013)
	TNF- $\alpha$	Pro-inflammatoire	(Gottenberg et al., 2004)
Récepteur de chémokine	CXCR5	Récepteur pour CXC chemokine ligand 13 crucial pour le homing des lymphocytes B et l'organisation des follicules lymphoïdes	(Lessard et al., 2013)
Signalisation NFkB s	IkB $\alpha$	Inhibiteur de NFkB	(Ou et al., 2008)
	TNFAIP3	Inhibiteur de NFkB	(Li et al., 2013)
	TNIP1	Inhibiteur de NFkB	(Lessard et al., 2013)
Divers	FCGR	Liaison à la portion Fc de IgG La variation du nombre de copies diminue la clairance des complexes immuns	(Mamtani et al., 2010)
	MBL	Active la 3 <sup>ème</sup> voie du complément	(Wang et al., 2001)
	NCR3	Récepteur activant les cellules NK	(Rusakiewicz et al., 2013)
	ApoE	Régulation de l'inflammation	(Pertovaara et al., 2004)
	Fas	Apoptose	(Bolstad et al., 2000b)
	MECP2	Facteur de transcription sensible à la méthylation de l'ADN	(Cobb et al., 2010)
	CHRM3	Récepteur muscarinique 3	(Appel et al., 2011)
GST	glutathion S-transférase empêche les dommages oxydatifs	(Morinobu et al., 1999)	

PTPN22- Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 CTLA4 -Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 GTF2IRD1-GTF2I- General transcription factor Iii/GTF2I repeat domain containing 1 STAT4 -Signal transducer and activator of transcription 4 TCRBV - T cell receptor b variable BLK - B lymphocyte kinase FAM167A-BLK Family with Sequence Similarity 167, Member A EBF-1 Early B-cell factor 1 BAFF B-cell activating factor TAP2 Transporters associated with antigen processing TNFSF4/OX40L- Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4 IRF5 -Interferon regulatory factor 5 TNF- $\alpha$  Tumor necrosis factor- $\alpha$  CXCR5 Chemokine (C-X-C motif) receptor 5 TNFAIP3 Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 TNIP1-- TNFAIP3-interacting protein 1 FCGR Immunoglobulin gamma Fc region receptor II-b MBL Mannose-binding lectin NCR3-- Natural-cytotoxicity-triggering receptor 3 MECP2 Methyl CpG binding protein 2 CHRM3 Muscarinic receptor 3 GST-Glutathione-S-transferase

# Annexe 2

# Primary Sjögren's Syndrome and Epigenetics

Amandine Charras\*, Christelle Le Dantec\*,  
Orsia D. Konsta\*.,\*\*, Wesley H. Brooks†,  
Anne Bordron\*, Yves Renaudineau\*,‡

\*European University of Brittany, Brest, France; \*\*National University of Athens, Greece;  
†University of South Florida, Tampa, FL, United States; ‡Brest University Medical School, CHU  
Morvan, Brest, France

## OUTLINE

11.1	Introduction	222
11.2	Involvement of Epigenetics in pSS	223
11.3	ALU, Long Interspersed Nuclear Elements, and Human Endogenous Retroviruses as Sensors of DNA Demethylation	223
11.4	X Chromosome in pSS	225
11.5	DNA Methylation is Affected in pSS	226
	11.5.1 Global DNA Methylation	226
	11.5.2 Genome-Wide Methylome Analysis	227
	11.5.3 DNA Methylation Enzymes	231
11.6	Histones in pSS	232
11.7	miRNA in pSS	232
	11.7.1 Description	232
	11.7.2 MiRNA in MSG and Saliva From pSS Patients	232
	11.7.3 MiRNA-146a in PBMCs and Exosomes From pSS Patients	234
11.8	Cross Talk With Genetic Risk Factors	234



11.9 Conclusions	234
References	235

## 11.1 INTRODUCTION

Primary Sjögren's syndrome (pSS) is a chronic autoimmune disorder referred to as an autoimmune exocrinopathy or autoimmune epithelitis [1]. The clinical manifestations can be subdivided into those that are related to exocrine dysfunctions, which mainly lead to xerostomia (dry mouth) and keratoconjunctivitis sicca (dry eyes), and those that affect parenchymal organs, which lead to systemic features and are characterized by periepithelial mononuclear cell infiltrates. Systemic manifestations could also result from immune complex depositions due to B-cell hyperactivation. Most patients will experience an indolent and benign evolution; however, approximately 5% of patients will develop a B-cell lymphoma [2–4]. An altered health-related quality of life and psychological features are also frequently reported in patients with pSS in addition to the classical sicca features. The treatment provided is based on the disease expression (i.e., the symptoms and the extraglandular manifestations), and a systemic disease activity index (ESSDAI) has been developed for follow-ups [5,6].

T cells predominate in exocrine glands during the initiation and moderate stages of the disease [7]; however, B cells and dendritic cells are recruited and activated as the disease evolves. B-cell hyperactivation is a dominant feature of pSS, and is characterized by: (1) the presence of circulating autoantibodies (Ab) against the sicca syndrome ribonucleoprotein particles (SSA/Ro and SSB/La), usually in association with rheumatoid factors and hypergammaglobulinemia [8]; (2) salivary gland echostructure abnormalities, which reflect inflammation and fibrosis [9,10]; (3) lymphocyte organization with germinal center-like structures; and (4) an abnormal peripheral blood B-cell profile [11–13]. Lymphocyte infiltration correlates poorly with decrease in lacrimal and salivary secretions. Epithelial cells are not only the target of the immune system in this physiopathological model, but they are also implicated in its genesis, as they act as nonclassical antigen presenting cells and produce adhesion molecules, costimulatory molecules, chemokines, and cytokines (further details are provided in [14,15]).

The etiology and pathogenesis of pSS remain unclear; however, environmental factors (e.g., viruses and drugs), genetic predisposition, and epigenetic factors have all been implicated [16–19]. Genetic risk factors associated with pSS include *HLA-DR* allele subtypes and up to 40 polymorphisms associated with key pathological pathways, including type I interferon (IFN)-regulated or induced genes (e.g., *IRF5* and *STAT4*), the NF- $\kappa$ B pathway (e.g., *TNIP1* and *TNFAIP3*), and B-cell activation (e.g., *CXCR5* and *BLK*) [20,21]. It is important to note that most of these genetic mutations are present within regulatory sequences, which are far from DNA-coding regions and within cell-specific epigenetic areas [22,23].

Epigenetics was initially introduced to explain how cells defined by a common genotype can differentiate into alternative phenotypes. Such a definition has evolved, and epigenetics now refers to the heritable changes in gene expression that do not entail modifications in the DNA sequence. Recent data also suggest that epigenetic mechanisms are not only important to regulate

development, control the cell cycle, and respond to external changes, but that they are also able to drive complex diseases [24–26].

## 11.2 INVOLVEMENT OF EPIGENETICS IN pSS

In the 1960s, the oral administration of hydralazine or isoniazid to mice for several weeks was shown to increase the incidence of antinuclear Ab. The authors also established a link with the relative frequency of systemic lupus erythematosus (SLE)-like syndromes in patients treated with the same drugs [27]. It is important to note that variations were observed depending on the animal strain, age, and sex; however, this effect disappeared after discontinuation of the drug. Both hydralazine and procainamide have the capacity to inhibit DNA methyltransferase (DNMT) activity and remove methyl groups from cytosines within phosphorylated cytosine–guanine (CpG) sites. Although hydralazine was used to cure hypertension, it was also reported to induce SS in humans on occasion [28,29].

Two research groups have demonstrated that autoreactivity in SLE is characterized by DNA hypomethylation in both CD4<sup>+</sup> T cells and CD19<sup>+</sup> B cells [30,31]. Conversely, experiments involving the passive transfer of DNMT inhibitor-pretreated CD4<sup>+</sup> T cells into mice induced the production of anti-dsDNA Ab and the generation of severe immune complex glomerulonephritis [32]. Similar results were also obtained when B cells, instead of CD4<sup>+</sup> T cells, were treated with demethylating drugs [33]. Further studies characterized the defective pathways that led to decreased DNMT1 expression in CD4<sup>+</sup> T cells, identifying the oxidative stress, PKC $\delta$ , and MAPK/ERK pathways [34,35].

## 11.3 ALU, LONG INTERSPERSED NUCLEAR ELEMENTS, AND HUMAN ENDOGENOUS RETROVIRUSES AS SENSORS OF DNA DEMETHYLATION

Transposons, frequently referred to as “junk” DNA, are subdivided into long interspersed nuclear elements (LINE, which occupy 16.9% of the genome), short interspersed nuclear elements [i.e., short stretch of DNA characterized by the action of the *Arthrobacter luteus* (*Alu*) restriction endonuclease, which occupy 10.6% of the genome], and long terminal repeat elements, which include the 400,000 copies of human endogenous retroviruses (HERVs). The latter have colonized up to 7% of the human genome by reversing the normal flow of genetic information from DNA to RNA [36]. HERV genes are mostly nonfunctional due to the presence of deletions, stop codons, or frame shifts; however, a few copies have the ability to generate functional proteins, although they are normally epigenetically suppressed. Tugnet et al. reported that the HERV-K family is the only group that can produce intact viral particles [37]. Moreover, members of the HERV-K family, together with HERV-E, are the most transcriptionally active as they retain intact open reading frames (ORFs), which therefore increases the possibility that HERVs may play a role in human diseases [38–40]. HERV-K elements are strongly suspected to be involved in amyotrophic lateral sclerosis, multiple sclerosis, and cancer [41], and an aberrant accumulation of retroelements is associated with two genetic diseases with SLE features (familial chilblain lupus and Aicardi–Goutieres syndrome) [42].

*Alu*, LINE-1, and HERV elements are overexpressed in the minor salivary glands (MSGs) of pSS patients, and this deregulation often results in defective control of DNA methylation (Table 11.1) [19,31,37,38,40,43–45]. The hypothesis that retroelements contribute to human autoimmunity and

**TABLE 11.1** Cell-Specific Epigenetic Modifications and Associated Environmental Factors in Patients with Primary Sjögren's Syndrome

	<b>MSG epithelial cells</b>	<b>B cells</b>	<b>T cells</b>	<b>Monocytes</b>	<b>References</b>
Environmental factors	Drugs, viruses, and stress	Drugs and EBV	Drugs	Viruses	[29,32,33]
Transposons	Altered Alu, LINE1, HERV-E, and HRES1	HRES1	Unknown	Unknown	[19,43,45,48]
DNA methylation	—	Altered	Altered	Unknown	See Table 11.3 [54]
DNA methylation pathways	Reduced PKC/Erk, DNMT1, and GADD45A	Unknown	Unknown	Unknown	[55]
Methylation-sensitive genes	Increased <i>SSB/LA</i> , <i>KRT19</i> , and <i>AQP5</i>	Unknown	<i>cd70</i> , <i>Ita</i> , and <i>foxP3</i>	Unknown	See Table 11.2
Histone modifications	H4 acetylation	Unknown	Unknown	Unknown	[56]
MiRNAs	Increased miR-146a, miR-574, and miR-768	Unknown	MiR-146a	MiR-34b	See Table 11.4
Reversibility	Anti-CD20 (DNA methylation)	Unknown	Unknown	Unknown	[55]

EBV, Epstein-Barr virus; MSG, minor salivary gland.

pSS is supported by different observations. First, numerous retroelements have been shown to be overexpressed in MSG since the discovery of the human intracisternal A-type retroviral particle [46–48], the human T-cell lymphotropic virus (HTLV) related endogenous sequence (HRES1) [48], and HERV-E elements (i.e., HERV-K113 and HRV-5) [19,49,50]. HRES1 was demonstrated to be regulated by DNA methylation. Another way to explore HERV overexpression (and DNA demethylation) in pSS is to test auto-Ab production against HERV antigens (i.e., *GAG* or *POLI*). Brookes et al. used synthetic peptides derived from HERV *HRES1* and highlighted anti-HRES1 Ab in 32% of pSS patients compared to <5% of controls [48]. Hishikawa et al. also detected anti-HERV clone 4-1 p30 gag Abs in 35% of pSS patients compared to 0% of controls [51]. Cross-reactivity was also tested for this group of auto-Abs, which illustrated that the anti-HRES1 Ab cross-reacted with the HTLV1 p19 capsid antigen, and that the anti-HERV clone 4-1 p30 gag Ab cross-reacted with the Smith and U1 small nuclear ribonucleoprotein particle autoantigens [52]. Second, after observing that a LINE-1 promoter was demethylated and its transcript overexpressed in MSG tissue from pSS patients, Mavragani et al. showed that transfection of plasmacytoid dendritic cells with a LINE-1-containing plasmid had the capacity to induce type 1 IFN [43]. Third, the overexpression of Alu in peripheral blood can induce an inflammatory response (e.g., IFN $\alpha$ , IL-6, and TNF $\alpha$ ) that is reversible in the presence of chloroquine (a molecular agent used in SLE and pSS). Alu elements purified from SLE patients can bind the autoantigen, SSA/Ro60, and form immune complexes with anti-SSA/Ro Abs. This mechanism is also suspected to occur in pSS [53]. Further experiments are needed to establish the contribution of retroelements in the pathophysiology of pSS and to characterize the main cellular subset that produces retroelements, as almost all experiments performed to date have used whole MSG tissues instead of isolated cell subsets.

---

## 11.4 X CHROMOSOME IN pSS

---

Several theories support a role for the X chromosome in the development of pSS: (1) pSS occurs predominantly in women with a ratio of 9:1 (females:males); (2) there are reports showing that trisomy X (47,XXX), a super female phenotype (mosaic of XXXXX/XXXX/XXX/XX/XO), or disomy X (47, XXY), which is referred to as Klinefelter's syndrome in males, may increase the risk of pSS occurrence [57–59]; and (3) females inherit both maternal and paternal X chromosomes whereas men receive the maternal X and the paternal Y chromosome, therefore a mechanism of dosage compensation is required to equalize X-linked gene expression that is not gender specific. Consequently, X-chromosome inactivation is a major epigenetic event in mammals, so that females only contain one transcriptionally active X chromosome [60,61]. The active chromosome is referred to as X<sub>a</sub> and the inactive chromosome as X<sub>i</sub>. The choice between the maternally- or paternally-derived X<sub>i</sub> is random and made in somatic cells in early embryo development [62]. After this, each daughter cell from that somatic cell will inherit the decision and maintain the same parentally derived X.

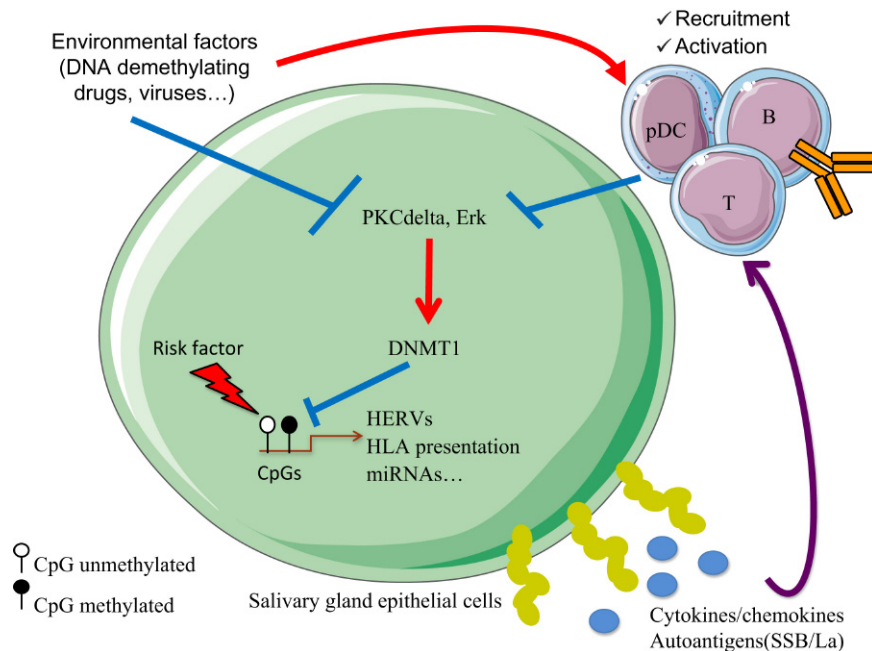
Overexpression of the X-linked CD40 ligand (CD40L) in CD4<sup>+</sup> T cells from female subjects with SLE was explained by increased DNA demethylation of the X<sub>i</sub> [63]. Belkhir et al. observed that CD40L was overexpressed in ex vivo activated CD4<sup>+</sup> T cells from female patients with pSS. The authors tested its control by DNA methylation but failed to demonstrate a link with the cytosine methylation status at CpG sites within the regulatory regions of CD40L. This suggests that CD40L overexpression in pSS CD4<sup>+</sup> T cells may occur through nonepigenetic regulatory mechanisms [64].

## 11.5 DNA METHYLATION IS AFFECTED IN pSS

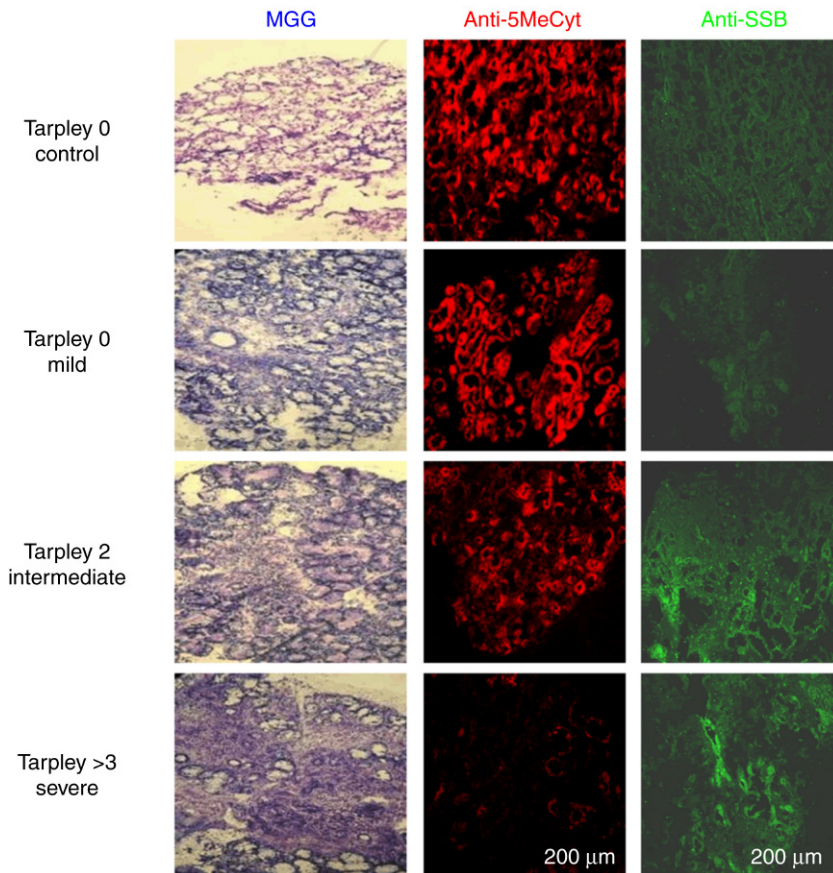
### 11.5.1 Global DNA Methylation

A recent study reported that pSS patients showed global DNA demethylation in MSG epithelial cells when compared to biopsies from controls. These defects were heritable, as observed during long-term primary culture of the salivary gland epithelial cells (SGEC) [55]. Global DNA demethylation in MSG cells was observed in patients with lymphocyte infiltration and for those patients that were positive for anti-SSB/La Ab (Fig. 11.1) [54,65]. SSB/La overexpression in SGEC from anti-SSB/La auto-Ab positive pSS patients was also shown to be associated with *SSB/LA* promoter demethylation (Figs. 11.2 and 11.3 adapted from [54,66]). However, no differences were observed in relation to age, sex, disease duration, clinical and biological parameters, drug intake, or disease activity (ESSDAI score).

Treatment with the demethylating drug, 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza), increases the expression of the autoantigen, SSB/LA, and cytokeratin-19 (*KRT19*) in a human salivary gland (HSG) cell line (Table 11.2) [54,65]. Incubation with 5-Aza also upregulated aquaporin 5 (*AQP5*) gene expression and increased fluid secretion in the HSG ductal NS-SV-DC cell line [67]. Abnormal subcellular localization of the AQP5 protein was also reported, thus providing an explanation for the abnormal salivary flux that characterizes pSS patients [68]. However, treatment of CD4<sup>+</sup> T cells from pSS patients and controls with 5-Aza was ineffective at inducing IRF5 and CD40L upregulation [64,69].



**FIGURE 11.1** Involvement of epigenetic mechanisms in minor salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *Ab*, antibody; *B*, B cell; *DNMT1*, DNA methyltransferase; *HERV*, human endogenous retrovirus; *HLA*, human leukocyte antigen; *IFN*, interferon; *pDC*, plasmacytoid dendritic cell; *SGEC*, salivary gland epithelial cell; *SSB/La*, anti-sicca syndrome B autoantibodies; *T*, T cell.



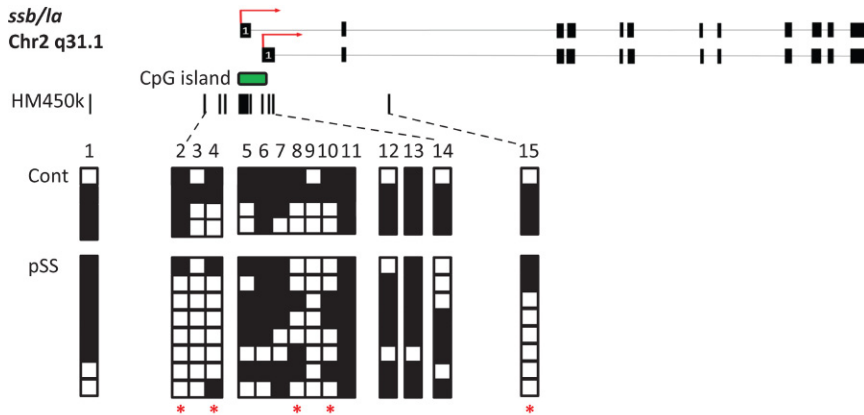
**FIGURE 11.2** Defective DNA methylation in salivary gland epithelial acini from patients with primary Sjögren's syndrome (pSS) is associated with lymphocyte infiltration and *ssb/la* gene expression. Photomicrographs of MSG biopsy sections stained with May-Günwald-Giemsa (MGG, blue), an anti-5mC antibody (clone 33D3, red), and an anti-SSB/La Ab (green) in a representative control and pSS patients (for more information see [54]). PSS patients were classified as mild, intermediate, or severe according to the grade of the inflammatory Tarpley's score.

Gonzalez et al. observed hypermethylation of the dystonin (*DST*) gene promoter and overexpression of an epithelial splice variant of *DST* (the bullous pemphigoid antigen 1) in acinar cells from pSS patients [73]. Hypotheses have since arisen related to the use of an alternative promoter [77] or to posttranslational modifications.

## 11.5.2 Genome-Wide Methylome Analysis

### 11.5.2.1 Infinium Technology

The most widely used strategy for studying DNA methylation in human pSS tissues is the Infinium Human Methylation 450K (HM450K) BeadChips (Illumina) (Table 11.3) [78]. This technology interrogates human genomic DNA after bisulfite conversion (which converts unmethylated



**FIGURE 11.3** DNA methylation of the *ssb/la* gene in long-term cultured salivary gland epithelial cells (SGEC) from primary Sjögren's syndrome (pSS) patients and controls (Cont) (from [66]). The *ssb/la* locus depicts the location of the CpG probes tested using the HM450K (Illumina). White boxes indicate CpG sites with a value below the reference and red stars (\*) represent CpG probes that were differentially methylated between controls and pSS patients.

cytosines to uracils) using two 50-mer probes per CpG locus: one unmethylated and one methylated. The methylation state at each probe is calculated by determining the fluorescence ratio between beads. The HM450K BeadChips cover 2% of the 28 million CpG sites in the human genome and 99% of the genes, with an average of 17 CpG sites per gene. The Methylation EPIC BeadChip (Illumina) was recently developed to further DNA methylation analysis and cover 850,000 CpG sites; however, pSS studies using this technology have yet to be published.

Genome-wide DNA methylation arrays need an appropriate experimental design to avoid misinterpretations [81]. First, and most important, epigenetic profiles are cell-specific. Therefore heterogeneous mixtures [i.e., MSG tissue or peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)] must be adjusted to analyze and decipher specific changes in the epigenetic profile as opposed to changes in the cellular composition. Second, the integration of quality controls for samples (i.e., probes, background, and adjustments for batch effects such as laboratory conditions and experiment time) can help to remove nonspecific signals. Third, probes residing in the X chromosome or including single nucleotide polymorphisms could or could not be filtered out. It should also be noted that methylation levels tend to be tightly correlated between nearby CpG loci, that somatic rather than germinal mutations affect methylation levels, that genes and gene regions (e.g., promoters) are not equally covered, and that gene pathway analysis can be biased by the selection of the CpG array. Therefore the fourth and final essential step in the experimental design is the validation of significant hits with independent data resources and other experimental approaches.

### 11.5.2.2 Whole Blood, T Cells, and B Cells

Genome-wide DNA methylation profiling was conducted in PBMCs, B cells, and T cells (whole and naive) using the HM450K beads [71,72,79,82] (Table 11.3). Although the methodological analyses used were distinct, several important points should be highlighted from these studies. First, although global DNA was unaffected, there was a trend for DNA hypermethylation in B cells and DNA demethylation in T cells when comparing differentially methylated beads. Second, B cells demonstrated approximately 50-times more DNA methylation changes than T cells, and such an

**TABLE 11.2** DNA Methylation Sensitive and Insensitive Genes in Patients With Primary Sjögren's Syndrome

Promoter		Cell type	Expression	Function	References
Hypomethylated	Normal or hypermethylated				
<i>AQP5</i>		NS-SV-DC	Up	Salivary flux	[67]
<i>CD70</i>		CD4+	Up	Costimulatory cytokine	[70]
<i>GTF2I</i>		SGEC and HSG	NT	Regulator of transcription	[66]
<i>HRES-1</i>		MSG, CD19+	Up	HTLV-1-related endogenous retrovirus	[45,48]
<i>ICA1</i>		SGEC and HSG	NT	Autoantigen	[66]
<i>IFI44L</i>		CD19+	NT	IFN pathway	[71]
<i>IFITM, IFITM3, AND</i>		CD19+	NT	IFN pathway	[71]
<i>KRT19</i>		SGEC and HSG	Up	Intermediate filament for epithelial cells	[65]
<i>LINE1</i>		MSG	Up	Induction of IFN-alpha	[43]
<i>LTA</i>		CD4+	Up	T-cell cytokine	[72]
<i>NLRP3</i>		SGEC and HSG	NT	NF-kB pathway	[66]
<i>RUNX3</i>		CD19+	NT	Transcription factor (Th17)	[71]
<i>SLC25A40</i>		SGEC and HSG	NT	Mitochondrial carrier	[66]
<i>SSB/LA</i>		SGEC and HSG	Up	Autoantigen and RNA metabolism	[54]
<i>TNFAIP8</i>		CD19+	NT	Antiapoptotic	[71]
	<i>CD40L</i>	CD4+	Unaffected	T-cell cosignal	[64]
	<i>DST</i>	MSG	Up BP320	Anchoring protein	[73]
	<i>FOXP3</i>	CD4+	Down	Regulatory T cells	[74,75]
	<i>IFI44L</i>	CD4+	NT	IFN pathway	[76]
	<i>IRF5</i>	CD19+ and CD4+	Unaffected	Transcription factor (IFN)	[69,71]

*CD4+*, CD4+T cells; *CD19+*, CD19+ B cells; *down*, downregulated; *HSG cell line*, human salivary gland epithelial cells; *IFN*, interferon; *MSG*, minor salivary gland; *NS-SV-DC cell line*, human salivary gland ductal; *NT*, not tested; *SGEC*, long-term cultured salivary gland epithelial cells; *up*, upregulated.

effect was increased when considering patients with anti-SSA/SSB Abs. Third, common identified pathways were related to antigen presentation and type I IFN, while specific pathways were related to receptor signaling and development genes in B cells, and solute carrier proteins and the runt-related transcription factor 1 (*RUNX1*) in T cells. Fourth, mapping of differentially methylated CpGs (DMCs) revealed that they were predominantly present within open-sea or intergenic



**TABLE 11.3** Genome-Wide Methylome Analysis Using the Human Methylation 450K BeadChip (Illumina) and Signaling Pathways in Cell Subtypes of Patients with Primary Sjögren's Syndrome

DNA methylation status according to control			Cell type	Pathways	References
DMCs (n) (selection criteria)	Hypomethylated (%)	Hypermethylated (%)			
45 ( $P < 1.3 \times 10^{-7}$ )	73.3	26.7	MSG	—	[79]
11,785 ( $P < 1.3 \times 10^{-7}$ )	52.4	47.6	PBMCs	Antigen presentation, IFN signaling, and Graft-versus-host disease signaling	[79]
453 ( $P < 1.3 \times 10^{-7}$ )	22	78	CD19 <sup>+</sup>	IFN signaling	[79]
6707 (Median >7%, $P < 0.01$ )	44	56	CD19 <sup>+</sup>	IL4 signaling, IL8 signaling, CXCR4 signaling, PTEN signaling, B-cell receptor signaling, B-cell development, and altered T- and B-cell signaling in RA and SLE signaling	[71]
753 (Mean >1.2, $P \leq 0.01$ )	73.4	26.6	CD4 <sup>+</sup>	Apoptosis and inflammatory pathways	[72]
7820	73	27	MSG	Immune response and signal transduction	[80]
4662 (Median >7%, $P < 0.01$ )	21	79	SGEC	Calcium and Wnt pathways	[66]

CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> naive T cells; CD19<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> B cells; DMCs, differentially methylated CpGs; MSG, minor salivary glands; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; SGEC, long-term cultured salivary gland epithelial cells.

genomic areas that were far from promoters and CpG islands. Fifth, overlaps between genes with DMCs and pSS-associated genetic risk factors were observed.

Analysis of promoter DNA methylation in CD4<sup>+</sup> T cells revealed demethylation and overexpression of *CD70* (TNF receptor-associated factor 7) [70]. Several genes involved in the IFN pathway were demethylated in naive CD4<sup>+</sup> T cells, including lymphotoxin alpha (*LTA*), signal transducer and activator of transcription (*STAT*)1, IFN-induced protein 44 like (*IFI44L*), IFN-induced transmembrane protein 1 (*IFITM1*), and ubiquitin specific peptidase 18 (*USP18*); *RUNX1* was hypermethylated [72]. However, promoter demethylation at the *IFI44L* gene locus in pSS patients was not confirmed in a separate study [76]. Yu et al. identified DNA hypermethylation in the forkhead box P3 (*FOXP3*) promoter in pSS patients, which corresponded to a decrease in the expression of *FOXP3* at both the mRNA and protein levels in peripheral CD4<sup>+</sup> T cells of patients compared to controls [75]. Of note, *FOXP3*+ regulatory T cells (T<sub>reg</sub>) frequency in the MSG correlated positively with the inflammation grade, C3 and C4 hypocomplementemia, and cryoglobulinemia [83,84].

### 11.5.2.3 Minor Salivary Glands (MSG)

Two studies used the HM450K beads to analyze MSG samples from pSS patients [79,80]; however, these studies were limited because of the small number of samples tested ( $n = 13-15$ ) and because of the heterogeneity of the MSG tissue, as it consists of infiltrating mononuclear cells (e.g., T cells, monocytes, B cells, and dendritic cells), acinar cells, ductal epithelial cells, fibroblasts, and myoepithelial cells [78]. Cole et al. [80] reported inverse correlations between the DNA methylation levels of the top five DMCs and the focus score (a measure of lymphocytic infiltration) and the ocular staining score (a measure of tear film reduction). An enrichment of DMCs in the promoter regions of genes involved in the stress response, the immune response, and signal transduction was reported. Moreover, analysis of transcription factor binding motifs within promoter regions around pSS-associated DMCs revealed antioxidant response elements, IFN-stimulated response elements, and PU-1 binding motifs.

However, results obtained from genome-wide analysis were different when long-term cultured SGENC were analyzed with HM450K instead of MSG samples [66]. PSS patients were discriminated from controls using a supervised hierarchical clustering of DNA methylation, and two pathways were shown to be enriched: (1) the calcium pathway (DNA hypomethylation), which is important for the control of salivary flux; and (2) the Wnt pathway (DNA hypermethylation), which is important for epithelial cell development and proliferation. An IFN signature was also highlighted for differentially methylated genes in pSS SGENC. Patients were further subdivided according to treatment, particularly hydroxychloroquine intake, which led to characterization of the phosphatidylinositol pathway. It should be noted that several DMCs were also present within pSS-associated risk factors (i.e., *ICAI*, *NRLP3*, *SLC25A40*, and *GTF2I*), which were sensitive to the actions of 5-Aza in the HSG cell line.

### 11.5.3 DNA Methylation Enzymes

Global DNA demethylation in long-term cultured SGENC is associated with a decrease in the methylating enzyme, DNMT1, and an increase in the demethylating partner, GADD45 $\alpha$  [55]. The contribution of B cells in the demethylation process was further highlighted following the treatment of pSS patients with rituximab, a chimeric anti-CD20 monoclonal Ab, in the TEARS open clinical trial [55,85]. Global DNA methylation levels were higher at 4 months after B-cell depletion in comparison with the MSG biopsy obtained at the initiation of rituximab therapy, thus suggesting

that DNA demethylation in SGEC may be partly attributed to the presence of infiltrating B cells. This is supported by the inverse correlation between global DNA methylation and lymphocyte infiltration [54,65]. This hypothesis was tested using coculture experiments, and B cells were confirmed to mediate DNA demethylation in the HSG cell line through altered ERK/DNMT1 signaling, similar to that reported in SLE [86].

---

## 11.6 HISTONES IN pSS

---

Global histone H3 and H4 hyperacetylation, and histone H3 demethylation, at lysine 4 characterize CD4<sup>+</sup> T cells from SLE patients [87]. In addition to positively affecting transcription, these modifications can also lead to the development of specific auto-Ab. This was demonstrated with the lupus-derived monoclonal Ab BT-164 and KM-2, which recognize histone H3 trimethylated lysine 27 and histone H4 acetylated lysine 8, 12, and 16, respectively [88–90]. Blocking histone hyperacetylation represents an interesting therapeutic alternative as two histone deacetylase inhibitors (Trichostatin A and suberoylanilide hydroxamic acid) can revert histone modifications and improve SLE symptoms in mice without affecting auto-Ab titers [91,92]. These results provide arguments to suggest that the DNA methylation modifications that characterize pSS patients are associated with histone modifications, and that some of the antihistone auto-Abs detected in pSS target post-translational histone modifications [93]. TNF $\alpha$  inhibition of *AQP5* expression in the NS-SV-AC cell line was tested, and demonstrated that such inhibition was independent of DNA methylation but controlled by histone H4 acetylation [56].

---

## 11.7 miRNA IN pSS

---

### 11.7.1 Description

MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding single-strand RNA transcripts of 19–22 nucleotides that regulate gene expression at the post-transcriptional level and are important in a wide range of physiological and pathological processes [94]. Primary miRNA transcripts are generated by RNA polymerase II in the nucleus and cleaved by an RNase III enzyme, Drosha. After cleavage, miRNAs are transported to the cytoplasm by exportin 5, where they are further processed by Dicer into mature miRNA duplexes. They are finally separated into single strands at the core of the multiprotein RNA-induced silencing complex (RISC) by Argonaute proteins. Most miRNAs bind to the 3' untranslated region of their target mRNAs and cause translation repression or mRNA degradation. Dysregulated miRNA expression is associated with DNA methylation and histone modifications in numerous autoimmune diseases.

### 11.7.2 MiRNA in MSG and Saliva from pSS Patients

Investigation of miRNAs in MSG samples revealed important differences between pSS patients and controls (Table 11.4) [95–97]. A predictive analysis of biologic pathways under miRNA control suggested that they regulate salivation through the regulation of neural pathways [95]. It was also claimed that downregulation of miRNAs targeting *TRIM21* and *TROVE2* in the MSG of pSS patients may partially explain the lack of transcriptional regulation of the sicca-associated

**TABLE 11.4** Deregulated Expression of miRNAs in Patients With Primary Sjögren's Syndrome

MiRNAs		Cell type	mRNA Target	Function	References	
Upregulated	Downregulated					
miR-146a	miR-155	PBMCs	<i>IRAK1/TRAF6</i>	NF- B and IFN regulator	[98,99]	
		PBMCs	<i>SOCS1, TAB2, and cMAF</i>	B-cell development	[99]	
miR-181a		PBMCs and MSG		B-cell development and salivary flux	[97,100]	
miR-16		PBMCs and MSG	<i>TRIM21</i>	Autoantigen and salivary flux	[97,101]	
miR-223		PBMCs	<i>TROVE2</i>	Autoantigen	[97]	
miR-200b		SGEC	<i>TRIM21</i> and <i>TROVE2</i>	Autoantigen	[97]	
Let-7b		SGEC SSA+*	<i>TRIM21</i> and <i>TROVE2</i>	Autoantigen	[97]	
miR-34b-3p		Monocytes	<i>GRB2, P38, and MEKK1</i>	MAPK pathway	[102]	
miR-877-3p		Monocytes	<i>SMAD2, SOS1, ERK1, RAC1, HGK, and STAT6</i>	TGFβ, MAPK, and JAK-STAT pathways	[102]	
miR-3162-3p		Monocytes	Unknown	Unknown	[102]	
miR-4701-5p		Monocytes	<i>SHP2, HIPK2, MKK7, and IFNAR1</i>	MAPK and JAK-STAT pathways	[102]	
		miR-1207-5p	MSG	<i>TRIM21</i>	Autoantigen	[103]
		miR-1695-3p	MSG	<i>TRIM21</i>	Autoantigen	[103]
miR-203		Saliva	Unknown	Unknown	[104]	
miR-768-3p		MSG and saliva	Unknown	Unknown	[95,104]	
		miR-574-3p	MSG and saliva	Unknown	Unknown	[95,104]
		miR-17-92	Unknown	Unknown	[105]	
miR-4524		MSG and HSG	Unknown	Unknown	[96]	
miR-5571		MSG and HSG	Unknown	Unknown	[96]	
miR-5100		MSG and HSG	Unknown	Unknown	[96]	
miR-5572	MSG and HSG	Unknown	Unknown	[96]		
miR-BART13-3p	B cells and saliva	<i>STIM1</i>	Ca <sup>2+</sup> pathway in HSG	[106]		

HSG, Human salivary gland cell line; MSG, minor salivary gland tissues; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; SGEC, long-term cultured salivary gland epithelial cells; SSA+, SGEC from patients that had autoantibodies to SSA/Ro and SSB/La; *TRIM21*, SSA/Ro 52 kDa; *TROVE 2*, SSA/Ro 60 kDa.

autoantigens, SSA/Ro 52 kDa and 60 kDa [97], while the SSB/LA autoantigen was proposed to be controlled by DNA methylation [54].

### 11.7.3 MiRNA-146a in PBMCs and Exosomes from pSS Patients

Pauley et al. reported that miR-146a was upregulated in PBMCs from pSS patients and SS-prone mouse models [107]. This observation has since been confirmed by other groups. MiR146a levels increase before pSS onset in PBMCs and during disease progression in the MSG, thus suggesting that miR-146a acts early in the disease pathogenesis. MiR-146a is also present within saliva exosomes, which are microvesicles secreted by cells including lymphocytes and epithelial cells [108]. MiR146a plays a critical role in increasing phagocytic activity and repressing inflammatory cytokine production in monocytes. The transcription factor, NF- $\kappa$ B, controls miR-146a and the downstream TLR/INF pathway through TNF-associated factor 6 (TRAF6), IL-1 receptor-associated kinase (IRAK1), STAT1, and IRF5 [98]. Zilahi et al. tested PBMCs from pSS patients and healthy controls for expression levels of miR146a and miR146b and their target genes *IRAK1*, *IRAK4*, and *TRAF6*. The authors established that miR146a/b and *TRAF6* were overexpressed in pSS patients, while *IRAK1* expression was significantly decreased. It was therefore proposed that *TRAF6* contributes to the increased activation of the NF- $\kappa$ B pathway through the involvement of PKC $\xi$ , as is typically seen in the disease [109].

## 11.8 CROSS TALK WITH GENETIC RISK FACTORS

The primary role of the epigenome is to regulate transcription, and recent research from the Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) and the Roadmap Epigenomic Program have highlighted that epigenetics can affect: (1) the transcriptional machinery, when present within promoters, enhancers, and insulators (e.g., gene regulatory elements that control interactions between enhancers and promoters); (2) the control of intron excision, when present in areas controlling spliceosome complex formation; and (3) the control of mRNA, through the control of nonsense mediated decay and stabilization via miRNAs.

It has also been shown that epigenetic signatures fall within pSS-associated genetic risk factors. This was demonstrated in B cells when analyzing both the active histone mark H3K27Ac [21] and DMCs [71]. This cross talk was shown to be cell-specific due to the overrepresentation of the association in cell-specific regulatory elements. Analysis of transcription factor binding sites within pSS risk variants revealed immune-related transcription factors (i.e., NF- $\kappa$ B, STATs, and PU-1), which are downstream of the type I and NF- $\kappa$ B pathways that are known to be affected in pSS [20].

## 11.9 CONCLUSIONS

PSS is a complex and heterogenous disease involving several cell types (i.e., B lymphocytes, T lymphocytes, and epithelial cells). Evidence suggests that epigenetic changes (i.e., DNA methylation, histone modifications, and miRNAs) confer a risk for pSS in genetically predisposed individuals. Another important point is cellular specificity, as there are important differences between epithelial cells and lymphocytes. However, these processes have been shown to be

reversible and involve specific pathways, therefore better understanding of the mechanisms controlling these pathways would undoubtedly benefit pSS diagnosis, prognosis, prevention, and treatment.

Given the large volume of experimental evidence for the transgenerational inheritance of epigenetic trails [110], the next step will be to test the contribution of parental epigenetic alterations in determining the risk for chronic diseases (i.e., pSS). If true, identification of such mechanisms may hold great promise for predicting susceptibility traits and for developing epigenetic drugs. These new drugs may lead to personalized treatment according to a patient's epigenetic status in their lymphocytes or SGECS.

## Acknowledgments

We are grateful to the "Association Française du Gougerot-Sjögren et des Syndromes Secs," the region Bretagne for their support, and to Genevieve Michel and Simone Forest for their help writing the chapter.

## References

- [1] Mavragani CP, Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome. *Annu Rev Pathol* 2014;9:273–85.
- [2] Voulgarelis M, Dafni UG, Isenberg DA, Moutsopoulos HM. Malignant lymphoma in primary Sjogren's syndrome: a multicenter, retrospective, clinical study by the European Concerted Action on Sjogren's Syndrome. *Arthritis Rheum* 1999;42(8):1765–72.
- [3] Baimpa E, Dahabreh IJ, Voulgarelis M, Moutsopoulos HM. Hematologic manifestations and predictors of lymphoma development in primary Sjogren syndrome: clinical and pathophysiologic aspects. *Medicine* 2009;88(5):284–93.
- [4] Tobon GJ, Renaudineau Y, Hillion S, Cornec D, Devauchelle-Pensec V, Youinou P, et al. The Fms-like tyrosine kinase 3 ligand, a mediator of B cell survival, is also a marker of lymphoma in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2010;62(11):3447–56.
- [5] Seror R, Bowman SJ, Brito-Zeron P, Theander E, Bootsma H, Tzioufas A, et al. EULAR Sjogren's syndrome disease activity index (ESSDAI): a user guide. *RMD Open* 2015;1(1):e000022.
- [6] Seror R, Ravaud P, Bowman SJ, Baron G, Tzioufas A, Theander E, et al. EULAR Sjogren's syndrome disease activity index: development of a consensus systemic disease activity index for primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2010;69(6):1103–9.
- [7] Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* 2010;34(4):400–7.
- [8] Capaldo C, Carvajal Alegria G, Cornec D, Jousse-Joulin S, Devauchelle-Pensec V, Renaudineau Y. The active immunological profile in patients with primary Sjogren's syndrome is restricted to typically encountered autoantibodies. *Clin Exp Rheumatol* 2016;34(4):722.
- [9] Jousse-Joulin S, Devauchelle-Pensec V, Morvan J, Guais B, Pennec Y, Pers JO, et al. Ultrasound assessment of salivary glands in patients with primary Sjogren's syndrome treated with rituximab: quantitative and Doppler waveform analysis. *Biologics* 2007;1(3):311–9.
- [10] Cornec D, Jousse-Joulin S, Marhadour T, Pers JO, Boisrame-Gastrin S, Renaudineau Y, et al. Salivary gland ultrasonography improves the diagnostic performance of the 2012 American College of Rheumatology classification criteria for Sjogren's syndrome. *Rheumatology* 2014;53(9):1604–7.
- [11] Cornec D, Saraux A, Cochener B, Pers JO, Jousse-Joulin S, Renaudineau Y, et al. Level of agreement between 2002 American-European Consensus Group and 2012 American College of Rheumatology classification criteria for Sjogren's syndrome and reasons for discrepancies. *Arthritis Res Ther* 2014;16(2):R74.
- [12] Simonin L, Pasquier E, Leroyer C, Cornec D, Lemerle J, Bendaoud B, et al. Lymphocyte disturbances in primary antiphospholipid syndrome and application to venous thromboembolism follow-up. *Clin Rev Allergy Immunol* 2017;53(1):14–27.
- [13] Alonso R, Buors C, Le Dantec C, Hillion S, Pers JO, Saraux A, et al. Aberrant expression of CD6 on B-cell subsets from patients with Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* 2010;35(4):336–41.
- [14] Voulgarelis M, Tzioufas AG. Pathogenetic mechanisms in the initiation and perpetuation of Sjogren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6(9):529–37.

- [15] Brito-Zeron P, Baldini C, Bootsma H, Bowman SJ, Jonsson R, Mariette X, et al. Sjogren syndrome. *Nature Rev Dis Primers* 2016;2:16047.
- [16] Liu A, La Cava A. Epigenetic dysregulation in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 2014;47(4):215–9.
- [17] Mavragani CP, Moutsopoulos HM. The geoepidemiology of Sjogren's syndrome. *Autoimmun Rev* 2010;9(5):A305–10.
- [18] Cobb BL, Lessard CJ, Harley JB, Moser KL. Genes and Sjogren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 2008;34(4):847–68. (vii).
- [19] Le Dantec C, Varin MM, Brooks WH, Pers JO, Youinou P, Renaudineau Y. Epigenetics and Sjogren's syndrome. *Curr Pharm Biotechnol* 2012;13(10):2046–53.
- [20] Lessard CJ, Li H, Adrianto I, Ice JA, Rasmussen A, Grundahl KM, et al. Variants at multiple loci implicated in both innate and adaptive immune responses are associated with Sjogren's syndrome. *Nat Genet* 2013;45(11):1284–92.
- [21] Konsta OD, Le Dantec C, Charras A, Brooks WH, Arleevskaya MI, Bordron A, et al. An in silico approach reveals associations between genetic and epigenetic factors within regulatory elements in B cells from primary Sjogren's syndrome patients. *Front Immunol* 2015;6:437.
- [22] Dozmorov MG, Wren JD, Alarcon-Riquelme ME. Epigenomic elements enriched in the promoters of autoimmunity susceptibility genes. *Epigenetics* 2014;9(2):276–85.
- [23] Farh KK, Marson A, Zhu J, Kleinewietfeld M, Housley WJ, Beik S, et al. Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature* 2015;518(7539):337–43.
- [24] Brooks WH, Le Dantec C, Pers JO, Youinou P, Renaudineau Y. Epigenetics and autoimmunity. *J Autoimmun* 2010;34(3):J207–19.
- [25] Renaudineau Y. The revolution of epigenetics in the field of autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* 2010;39(1):1–2.
- [26] Delgado-Vega AM, Alarcon-Riquelme ME, Kozyrev SV. Genetic associations in type I interferon related pathways with autoimmunity. *Arthritis Res Ther* 2010;12(Suppl 1):S2.
- [27] Cannat A, Seligmann M. Induction by isoniazid and hydrallazine of antinuclear factors in mice. *Clin Exp Immunol* 1968;3(1):99–105.
- [28] Brooks WH. X chromosome inactivation and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* 2010;39(1):20–9.
- [29] Darwaza A, Lamey PJ, Connell JM. Hydrallazine-induced Sjogren's syndrome. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1988;17(2):92–3.
- [30] Absher DM, Li X, Waite LL, Gibson A, Roberts K, Edberg J, et al. Genome-wide DNA methylation analysis of systemic lupus erythematosus reveals persistent hypomethylation of interferon genes and compositional changes to CD4+T-cell populations. *PLoS Genet* 2013;9(8):e1003678.
- [31] Garaud S, Le Dantec C, Jousse-Joulin S, Hanrotel-Saliou C, Saraux A, Mageed RA, et al. IL-6 modulates CD5 expression in B cells from patients with lupus by regulating DNA methylation. *J Immunol* 2009;182(9):5623–32.
- [32] Yung R, Powers D, Johnson K, Amento E, Carr D, Laing T, et al. Mechanisms of drug-induced lupus. II. T cells overexpressing lymphocyte function-associated antigen 1 become autoreactive and cause a lupus-like disease in syngeneic mice. *J Clin Invest* 1996;97(12):2866–71.
- [33] 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):6317–22.
- [34] Strickland FM, Li Y, Johnson K, Sun Z, Richardson BC. CD4(+) T cells epigenetically modified by oxidative stress cause lupus-like autoimmunity in mice. *J Autoimmun* 2015;62:75–80.
- [35] Gorelik G, Sawalha AH, Patel D, Johnson K, Richardson B. T cell PKC $\delta$  kinase inactivation induces lupus-like autoimmunity in mice. *Clin Immunol* 2015;158(2):193–203.
- [36] Balada E, Ordi-Ros J, Vilardell-Tarres M. Molecular mechanisms mediated by human endogenous retroviruses (HERVs) in autoimmunity. *Rev Med Virol* 2009;19(5):273–86.
- [37] Tugnet N, Rylance P, Roden D, Trela M, Nelson P. Human endogenous retroviruses (HERVs) and autoimmune rheumatic disease: is there a link? *Open Rheumatol J* 2013;7:13–21.
- [38] 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):663–71.
- [39] Renaudineau Y, Hillion S, Saraux A, Mageed RA, Youinou P. An alternative exon 1 of the CD5 gene regulates CD5 expression in human B lymphocytes. *Blood* 2005;106(8):2781–9.
- [40] Le Dantec C, Vallet S, Brooks WH, Renaudineau Y. Human endogenous retrovirus group E and its involvement in diseases. *Viruses* 2015;7(3):1238–57.
- [41] Li W, Lee MH, Henderson L, Tyagi R, Bachani M, Steiner J, et al. Human endogenous retrovirus-K contributes to motor neuron disease. *Sci Transl Med* 2015;7(307):307ra153.
- [42] Volkman HE, Stetson DB. The enemy within: endogenous retroelements and autoimmune disease. *Nat Immunol* 2014;15(5):415–22.

- [43] Mavragani CP, Sagalovskiy I, Guo Q, Nezos A, Kapsogeorgou EK, Lu P, et al. Expression of long interspersed nuclear element 1 retroelements and induction of type I interferon in patients with systemic autoimmune disease. *Arthritis Rheumatol* 2016;68(11):2686–96.
- [44] Garaud S, Le Dantec C, Berthou C, Lydyard PM, 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):2010–8.
- [45] Fali T, Le Dantec C, Thabet Y, Jousse S, Hanrotel C, Youinou P, et al. DNA methylation modulates HRES1/p28 expression in B cells from patients with lupus. *Autoimmunity* 2014;47(4):265–71.
- [46] Garry RF, Fermin CD, Hart DJ, Alexander SS, Donehower LA, Luo-Zhang H. Detection of a human intracisternal A-type retroviral particle antigenically related to HIV. *Science* 1990;250(4984):1127–9.
- [47] La Placa M, Vitone F, Bianchi T, Vincenzi C, Gibellini D, Re MC, et al. Serum antibodies against human intracisternal A-type particle (HIAP) endogenous retrovirus in alopecia areata patients: a hallmark of autoimmune disease? *J Invest Dermatol* 2004;123(2):407–9.
- [48] Brookes SM, Pandolfino YA, Mitchell TJ, Venables PJ, Shattles WG, Clark DA, et al. The immune response to and expression of cross-reactive retroviral gag sequences in autoimmune disease. *Br J Rheumatol* 1992;31(11):735–42.
- [49] Moyes DL, Martin A, Sawcer S, Temperton N, Worthington J, Griffiths DJ, et al. The distribution of the endogenous retroviruses HERV-K113 and HERV-K115 in health and disease. *Genomics* 2005;86(3):337–41.
- [50] Murovska M, Lejniece S, Kozireva S, Koulikovska M, Yin H, Blomberg J. Human retrovirus 5 sequences in peripheral blood cells of patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 2000;85(6):762–70.
- [51] Hishikawa T, Ogasawara H, Kaneko H, Shirasawa T, Matsuura Y, Sekigawa I, et al. Detection of antibodies to a recombinant GAG protein derived from human endogenous retrovirus clone 4-1 in autoimmune diseases. *Viral Immunol* 1997;10(3):137–47.
- [52] 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* 2005;24(6):620–4.
- [53] Hung T, Pratt GA, Sundararaman B, Townsend MJ, Chaivorapol C, Bhangale T, et al. The Ro60 autoantigen binds endogenous retroelements and regulates inflammatory gene expression. *Science* 2015;350(6259):455–9.
- [54] Konsta OD, Le Dantec C, Charras A, Cornec D, Kapsogeorgou EK, Tzioufas AG, et al. Defective DNA methylation in salivary gland epithelial acini from patients with Sjogren's syndrome is associated with SSB gene expression, anti-SSB/LA detection, and lymphocyte infiltration. *J Autoimmun* 2016;68:30–8.
- [55] Thabet Y, Le Dantec C, Ghedira I, Devauchelle V, Cornec D, Pers JO, et al. Epigenetic dysregulation in salivary glands from patients with primary Sjogren's syndrome may be ascribed to infiltrating B cells. *J Autoimmun* 2013;41:175–81.
- [56] Yamamura Y, Motegi K, Kani K, Takano H, Momota Y, Aota K, et al. TNF-alpha inhibits aquaporin 5 expression in human salivary gland acinar cells via suppression of histone H4 acetylation. *J Cell Mol Med* 2012;16(8):1766–75.
- [57] Ozelik T. X chromosome inactivation and female predisposition to autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008;34(3):348–51.
- [58] Harris VM, Sharma R, Cavett J, Kurien BT, Liu K, Koelsch KA, et al. Klinefelter's syndrome (47,XXY) is in excess among men with Sjogren's syndrome. *Clin Immunol* 2016;168:25–9.
- [59] Liu K, Kurien BT, Zimmerman SL, Kaufman KM, Taft DH, Kottyan LC, et al. X chromosome dose and sex bias in autoimmune diseases: increased prevalence of 47,XXX in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheumatol* 2016;68(5):1290–300.
- [60] Brooks WH, Renaudineau Y. Epigenetics and autoimmune diseases: the X chromosome-nucleolus nexus. *Front Genet* 2015;6:22.
- [61] Brooks WH, Renaudineau Y. The 'inactive X-chromosome-nucleolus nexus' hypothesis of autoimmune diseases and its implications. *Eur Med J* 2016;2(2):82–9.
- [62] Lessing D, Anguera MC, Lee JT. X chromosome inactivation and epigenetic responses to cellular reprogramming. *Ann Rev Genomics Hum Genet* 2013;14:85–110.
- [63] 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):6352–8.
- [64] Belkhir R, Gestermann N, Koutero M, Seror R, Tost J, Mariette X, et al. Upregulation of membrane-bound CD40L on CD4+ T cells in women with primary Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol* 2014;79(1):37–42.
- [65] Konsta OD, Charras A, Le Dantec C, Kapsogeorgou E, Bordron A, Brooks WH, et al. Epigenetic modifications in salivary glands from patients with Sjogren's syndrome affect cytokeratin 19 expression. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol* 2016;53(1):e01.
- [66] Charras A, Konsta OD, Le Dantec C, Bagacean C, Kapsogeorgou EK, Tzioufas AG, et al. Cell-specific epigenome-wide DNA methylation profile in long-term cultured minor salivary gland epithelial cells from patients with Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2017;76(3):625–8.



- [67] Motegi K, Azuma M, Tamatani T, Ashida Y, Sato M. Expression of aquaporin-5 in and fluid secretion from immortalized human salivary gland ductal cells by treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine: a possibility for improvement of xerostomia in patients with Sjogren's syndrome. *Lab Invest* 2005;85(3):342–53.
- [68] Lee BH, Gauna AE, Perez G, Park YJ, Pauley KM, Kawai T, et al. Autoantibodies against muscarinic type 3 receptor in Sjogren's syndrome inhibit aquaporin 5 trafficking. *PLoS One* 2013;8(1):e53113.
- [69] Gestermann N, Koutero M, Belkhir R, Tost J, Mariette X, Miceli-Richard C. Methylation profile of the promoter region of IRF5 in primary Sjogren's syndrome. *Eur Cytokine Netw* 2012;23(4):166–72.
- [70] Yin H, Zhao M, Wu X, Gao F, Luo Y, Ma L, et al. Hypomethylation and overexpression of CD70 (TNFSF7) in CD4+ T cells of patients with primary Sjogren's syndrome. *J Dermatol Sci* 2010;59(3):198–203.
- [71] Miceli-Richard C, Wang-Renault SF, Boudaoud S, Busato F, Lallemand C, Bethune K, et al. Overlap between differentially methylated DNA regions in blood B lymphocytes and genetic at-risk loci in primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2016;75(5):933–40.
- [72] Altorok N, Coit P, Hughes T, Koelsch KA, Stone DU, Rasmussen A, et al. Genome-wide DNA methylation patterns in naive CD4+ T cells from patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheumatol* 2014;66(3):731–9.
- [73] Gonzalez S, Aguilera S, Alliende C, Urzua U, Quest AF, Herrera L, et al. Alterations in type I hemidesmosome components suggestive of epigenetic control in the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2011;63(4):1106–15.
- [74] Sharma R, Deshmukh US, Zheng L, Fu SM, Ju ST. X-linked Foxp3 (Scurfy) mutation dominantly inhibits submandibular gland development and inflammation respectively through adaptive and innate immune mechanisms. *J Immunol* 2009;183(5):3212–8.
- [75] Yu X, Liang G, Yin H, Ngalamika O, Li F, Zhao M, et al. DNA hypermethylation leads to lower FOXP3 expression in CD4+ T cells of patients with primary Sjogren's syndrome. *Clin Immunol* 2013;148(2):254–7.
- [76] Zhao M, Zhou Y, Zhu B, Wan M, Jiang T, Tan Q, et al. IFI44L promoter methylation as a blood biomarker for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2016;75(11):1998–2006.
- [77] Elliott DA, Kim WS, Gorissen S, Halliday GM, Kwok JB. Leucine-rich repeat kinase 2 and alternative splicing in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012;27(8):1004–11.
- [78] Renaudineau Y, Ballestar E. Epigenetics: DNA methylation signatures in Sjogren syndrome. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12(10):565–6.
- [79] Imgenberg-Kreuz J, Sandling JK, Almlöf JC, Nordlund J, Signer L, Norheim KB, et al. Genome-wide DNA methylation analysis in multiple tissues in primary Sjogren's syndrome reveals regulatory effects at interferon-induced genes. *Ann Rheum Dis* 2016;75(11):2029–36.
- [80] Cole MB, Quach H, Quach D, Baker A, Taylor KE, Barcellos LF, et al. Epigenetic signatures of salivary gland inflammation in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheumatol* 2016;68(12):2936–44.
- [81] Wilhelm-Benartzi CS, Koestler DC, Karagas MR, Flanagan JM, Christensen BC, Kelsey KT, et al. Review of processing and analysis methods for DNA methylation array data. *Br J Cancer* 2013;109(6):1394–402.
- [82] Le Dantec C, Charras A, Bordron A, Brooks WH, Renaudineau Y. Epigenetic mechanisms in Sjögren's syndrome. *Eur Med J* 2016;1(5):21–8.
- [83] Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos NM, Moutsopoulos HM. Foxp3+ T-regulatory cells in Sjogren's syndrome: correlation with the grade of the autoimmune lesion and certain adverse prognostic factors. *Am J Pathol* 2008;173(5):1389–96.
- [84] Sarigul M, Yazisiz V, Bassorgun CI, Ulker M, Avci AB, Erbasan F, et al. The numbers of Foxp3 + T<sub>reg</sub> cells are positively correlated with higher grade of infiltration at the salivary glands in primary Sjogren's syndrome. *Lupus* 2010;19(2):138–45.
- [85] Devauchelle-Pensec V, Pennec Y, Morvan J, Pers JO, Daridon C, Jousse-Joulin S, et al. Improvement of Sjogren's syndrome after two infusions of rituximab (anti-CD20). *Arthritis Rheum* 2007;57(2):310–7.
- [86] Lu Q, Renaudineau Y, Cha S, Ilei G, Brooks WH, Selmi C, et al. Epigenetics in autoimmune disorders: highlights of the 10th Sjogren's syndrome symposium. *Autoimmun Rev* 2010;9(9):627–30.
- [87] Zhou Y, Qiu X, Luo Y, Yuan J, Li Y, Zhong Q, et al. Histone modifications and methyl-CpG-binding domain protein levels at the TNFSF7 (CD70) promoter in SLE CD4+ T cells. *Lupus* 2011;20(13):1365–71.
- [88] van Bavel CC, Dieker JW, Kroeze Y, Tamboer WP, Voll R, Muller S, et al. Apoptosis-induced histone H3 methylation is targeted by autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2011;70(1):201–7.
- [89] Dieker JW, Fransen JH, van Bavel CC, Briand JP, Jacobs CW, Muller S, et al. Apoptosis-induced acetylation of histones is pathogenic in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2007;56(6):1921–33.
- [90] Thabet Y, Canas F, Ghedira I, Youinou P, Mageed RA, Renaudineau Y. Altered patterns of epigenetic changes in systemic lupus erythematosus and auto-antibody production: is there a link? *J Autoimmun* 2012;39(3):154–60.

- [91] Reilly CM, Mishra N, Miller JM, Joshi D, Ruiz P, Richon VM, et al. Modulation of renal disease in MRL/lpr mice by suberoylanilide hydroxamic acid. *J Immunol* 2004;173(6):4171–8.
- [92] Mishra N, Reilly CM, Brown DR, Ruiz P, Gilkeson GS. Histone deacetylase inhibitors modulate renal disease in the MRL-lpr/lpr mouse. *J Clin Invest* 2003;111(4):539–52.
- [93] Dantec L, Charras A, Brooks W, Renaudineau Y. Similarities and differences of epigenetic mechanisms in lupus and Sjögren's syndrome. *Lupus* 2015;1:e101.
- [94] Zare-Shahabadi A, Renaudineau Y, Rezaei N. MicroRNAs and multiple sclerosis: from physiopathology toward therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2013;17(12):1497–507.
- [95] Alevizos I, Alexander S, Turner RJ, Illei GG. MicroRNA expression profiles as biomarkers of minor salivary gland inflammation and dysfunction in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2011;63(2):535–44.
- [96] Tandon M, Gallo A, Jang SI, Illei GG, Alevizos I. Deep sequencing of short RNAs reveals novel microRNAs in minor salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Oral Dis* 2012;18(2):127–31.
- [97] Kapsogeorgou EK, Gourzi VC, Manoussakis MN, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Cellular microRNAs (miRNAs) and Sjogren's syndrome: candidate regulators of autoimmune response and autoantigen expression. *J Autoimmun* 2011;37(2):129–35.
- [98] Pauley KM, Stewart CM, Gauna AE, Dupre LC, Kuklani R, Chan AL, et al. Altered miR-146a expression in Sjogren's syndrome and its functional role in innate immunity. *Eur J Immunol* 2011;41(7):2029–39.
- [99] Shi H, Zheng LY, Zhang P, Yu CQ. MiR-146a and miR-155 expression in PBMCs from patients with Sjogren's syndrome. *J Oral Pathol Med* 2014;43(10):792–7.
- [100] Peng L, Ma W, Yi F, Yang YJ, Lin W, Chen H, et al. MicroRNA profiling in Chinese patients with primary Sjogren syndrome reveals elevated miRNA-181a in peripheral blood mononuclear cells. *J Rheumatol* 2014;41(11):2208–13.
- [101] Gourzi VC, Kapsogeorgou EK, Kyriakidis NC, Tzioufas AG. Study of microRNAs (miRNAs) that are predicted to target the autoantigens Ro/SSA and La/SSB in primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 2015;182(1):14–22.
- [102] Williams AE, Choi K, Chan AL, Lee YJ, Reeves WH, Bubb MR, et al. Sjogren's syndrome-associated microRNAs in CD14(+) monocytes unveils targeted TGFbeta signaling. *Arthritis Res Ther* 2016;18(1):95.
- [103] Yang Y, Peng L, Ma W, Yi F, Zhang Z, Chen H, et al. Autoantigen-targeting microRNAs in Sjogren's syndrome. *Clin Rheumatol* 2016;35(4):911–7.
- [104] Michael A, Bajracharya SD, Yuen PS, Zhou H, Star RA, Illei GG, et al. Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Dis* 2010;16(1):34–8.
- [105] Iborra M, Bernuzzi F, Invernizzi P, Danese S. MicroRNAs in autoimmunity and inflammatory bowel disease: crucial regulators in immune response. *Autoimmun Rev* 2012;11(5):305–14.
- [106] Gallo A, Jang SI, Ong HL, Perez P, Tandon M, Ambudkar I, et al. Targeting the Ca<sup>2+</sup> sensor STIM1 by exosomal transfer of EBV-miR-BART13-3p is associated with Sjogren's syndrome. *EBioMedicine* 2016;216–26.
- [107] Pauley KM, Cha S, Chan EK. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2009;32(3–4):189–94.
- [108] Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One* 2012;7(3):e30679.
- [109] Zilahi E, Tarr T, Papp G, Griger Z, Sipka S, Zeher M. Increased microRNA-146a/b, TRAF6 gene and decreased IRAK1 gene expressions in the peripheral mononuclear cells of patients with Sjogren's syndrome. *Immunol Lett* 2012;141(2):165–8.
- [110] Haque MM, Nilsson EE, Holder LB, Skinner MK. Genomic clustering of differential DNA methylated regions (epimutations) associated with the epigenetic transgenerational inheritance of disease and phenotypic variation. *BMC Genomics* 2016;17:418.

# Annexe 3

# EPIGENETIC MECHANISMS IN SJÖGREN'S SYNDROME

Christelle Le Dantec,<sup>1</sup> Amandine Charras,<sup>1</sup> Anne Bordron,<sup>1</sup>  
Wesley H. Brooks,<sup>2</sup> \*Yves Renaudineau<sup>1,3</sup>

1. INSERM ESPRI, ERI29/EA2216, LabEx IGO "Immunotherapy Graft Oncology", Innovative Medicines Initiative PRECISESADS, Réseau épigénétique et réseau canaux ioniques du Cancéropole Grand Ouest, European University of Brittany, Brest, France

2. Department of Chemistry, University of South Florida, Tampa, Florida, USA

3. Laboratory of Immunology and Immunotherapy, Brest University Medical School, Hôpital Morvan, Brest, France

\*Correspondence to [yves.renaudineau@univ-brest.fr](mailto:yves.renaudineau@univ-brest.fr)

**Disclosure:** The authors have declared no conflicts of interest.

**Received:** 03.03.16 **Accepted:** 11.07.16

**Citation:** EMJ. 2016;1[5]:21-28.

## ABSTRACT

Primary Sjögren's syndrome (pSS) is a systemic autoimmune epithelitis and recent advances in our comprehension of its pathophysiology strongly suggest a multi-step process that involves environmental factors (e.g. chronic viral infection, drugs), followed by deregulation of the epigenetic machinery (e.g. DNA demethylation, histone modifications, microRNAs), which in turn specifically affects lymphocytes and epithelial cells leading to an aberrant inflammation. This process is amplified in the case of genetic mutations. As a consequence, autoreactive lymphocytes and autoantigens are produced leading to the development of autoantibodies. Moreover, it was observed that epigenetic modifications in pSS could be reversed, thus providing arguments to suggest that therapeutic strategies targeting the epigenetic deregulation and in particular the PKC-delta/Erk/DNMT1 pathway would be effective in pSS.

**Keywords:** Sjögren's syndrome (SS), epigenetics, DNA methylation, histone acetylation, endogenous retrovirus.

## INTRODUCTION

Sjögren's syndrome (SS) is a chronic and systemic autoimmune epithelitis, primarily affecting exocrine glands such as the salivary and lacrimal, and leading to dry mouth (xerostomia), and dry eyes (keratoconjunctivitis sicca).<sup>1</sup> Moreover, in one-third of SS cases, patients have systemic features that could affect the kidney, lung, liver, and thyroid. Although primary Sjögren's syndrome (pSS) is typically reported in women (sex ratio 9:1) during their fourth or fifth decade, the disease also occurs in both sexes and at any age.<sup>2</sup> SS is slowly progressive with benign evolution, except in up to 5% of patients that develop a lymphoma, usually B cell lymphoma.<sup>3</sup> In half of the patients, SS disease is a unique disease and referred to as pSS, while in the other half, SS is secondary and coexists with another autoimmune disease (AID) such as systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis, primary biliary cholangitis, and thyroiditis.

**Table 1: Epigenetic modifications in salivary gland epithelial cells from patients with primary Sjögren's syndrome.**

	Primary Sjögren's syndrome
<b>Environmental factors</b>	Drugs (procainamide, isoniazide) virus, stress <sup>9</sup> HERV-E (MSG) <sup>20,14</sup>
<b>Retrotransposons DNA methylation</b>	Decreased PKC-delta-Erk SGEC) <sup>21</sup> Decreased <i>DNMT1</i> (SGEC)
<b>microRNA Methylation sensitive genes Reversibility</b>	Increased GADD45A Increased <i>miR-146</i> , <i>-574</i> , <i>-768</i> <sup>59</sup> <i>SSB/La</i> , <i>KRT19</i> , <sup>52</sup> <i>aquaporin 5</i> <sup>21</sup> Anti-CD20 <sup>21</sup>

HERV-E: human endogenous retroviruses; MSG: minor salivary glands; SGEC: salivary gland epithelial cells; GADD45A: growth arrest and DNA damage inducible alpha; DNMT1: DNA methyltransferase; SBB/La: Sjögren's syndrome type B antigen; KRT19: Keratin 19.

Focal lymphocytic infiltration of tissues characterises pSS with typically an initial T cell predominance with an elevated CD4/CD8 ratio, while progressively B cells become preponderant and may be organised in germinal centre-like structures.<sup>4</sup> Antigen presenting cells have been described in heavy infiltrates. B cell hyperactivity characterises pSS patients highlighted by the presence of circulating autoantibodies (AAB) against the sicca syndrome A/Ro and B/La ribonucleoprotein particles, detection of rheumatoid factors, hyperglobulinaemia, and hypocomplementaemia.<sup>5</sup> It is suspected that an altered peripheral blood B cell distribution reflects B cell infiltration of the tissues.<sup>6-8</sup>

## ENVIRONMENTAL FACTORS

As reported in [Table 1](#), multiple lines of evidence support a role for environmental factors in pSS altering the epigenetic machinery<sup>9</sup> and this is supported by reports that drugs such as hydralazine and procainamide, two drugs known to interfere with the main epigenetic event, DNA methylation, induce SS in association with SLE in both humans and mice.<sup>10-12</sup> This hypothesis is reinforced further by observations that other factors effective in inducing important epigenetic changes have been associated with pSS such as ultraviolet light, smoking, and chemicals.<sup>13</sup> Other arguments are related to the disease concordance rates for monozygotic twins, revealing a rate of 15-25% for pSS which signifies a complex process involving more epigenetic than genetic components.<sup>14</sup> In addition, SS geoepidemiology distribution reveals that the highest rates are reported in Northern countries<sup>15</sup> and epidemiological studies indicate associations between SS and viruses and between SS and psychological stress. As a whole, these observations strongly suggest a major role played by epigenetic mechanisms in the development of pSS.<sup>16</sup>

## GLOBAL DNA METHYLATION ANALYSIS

### DNA is Demethylated in Primary Sjögren's Syndrome

DNA methylation is a heritable and reversible epigenetic mark involving the covalent transfer of a methyl group to the fifth carbon of the cytosine pyrimidine ring (<sup>5</sup>mC) in a CpG dinucleotide by DNA methyltransferases (DNMTs).<sup>17,18</sup> Recent research has

also revealed the presence of non-CG methylation in embryonic and pluripotent mammalian stem cells.<sup>19</sup> In mammals, most CpG dinucleotides are methylated with the notable exception of the active proximal and long range gene regulatory sequences (e.g. promoter, enhancer, insulator) that tend to be protected from methylation. When methylated, the DNA alone can physically prevent binding of transcriptional regulators to the gene, and more importantly, methylated DNA participates in chromatin compaction. The overall degree of genome DNA methylation can be easily estimated, usually around 70-80%, and for determining the amount, several approaches exist such as high performance liquid chromatography and immunological techniques (immunohistochemistry, enzyme-linked immunosorbent assay) based on utilisation of specific monoclonal antibodies such as the murine anti-<sup>5</sup>mC clone 33D3.

In AID, DNA demethylation is the most studied epigenetic hallmark with defects arising mainly from loss of maintenance DNA methylation at repeat elements which are normally heavily methylated, including satellites and retrotransposons (as discussed later). Such an effect is cell-specific and associated with defective DNMT1 activity, with a stronger effect reported in lymphocytes from SLE patients, synoviocytes in rheumatoid arthritis, and cells within the brain in multiple sclerosis.<sup>10,20-23</sup> Regarding pSS, we have recently reported that global DNA methylation was altered in epithelial cells when analysing minor salivary gland (MSG) biopsies.<sup>24,25</sup> Interestingly, and because of DNMT1 downregulation, global DNA demethylation was conserved after long-term culture of salivary gland epithelial cells (SGEC), thus confirming the heritability of the process. In contrast, no differences relative to controls were reported when analysing peripheral blood T and B cells from pSS patients for global DNA methylation,<sup>24,26,27</sup> indicating that global DNA demethylation is altered primarily in epithelial cells.

### Crosstalk Between Epithelial Cells and Lymphocytes

Clinical and biological factors associated with epithelial cell DNA demethylation in MSG biopsies were further explored, revealing that global DNA methylation was inversely correlated with the level of lymphocyte infiltration and anti-sicca syndrome B/La AAB detection but surprisingly, not with anti-sicca syndrome A/Ro AAB and the clinical

index designed to measure activity in pSS, the European League Against Rheumatism (EULAR) Sjögren's Syndrome Disease Activity Index (ESSDAI).<sup>25</sup> One further step was to demonstrate lymphocyte and B cell involvement, which was done by conducting co-culture experiments between the human salivary gland (HSG) epithelial cell line and B cells to reveal that B cells were effective to control within HSG cells global DNA methylation, through the control of DNMT1, in a time and dose-effective fashion.<sup>24</sup>

### Reversibility and PKC-delta /Erk/DNMT1 Pathway

At the molecular level, DNMT1 activity in SGEC is regulated upstream by the PKC-delta/Erk pathway. Direct contact between epithelial cells and B cells, but not with T cells, is effective in promoting PKC-delta degradation and downstream DNMT1

repression in SGEC.<sup>28</sup> As a consequence it was not surprising to observe that global DNA methylation was restored in MSG from pSS treated with an anti-CD20 monoclonal antibody (mAb) therapy, rituximab.<sup>24</sup> Thus part of the clinical activity of the B cell-depleting agent rituximab in pSS may be attributed to an epigenetic effect.<sup>29-34</sup> Similarly, in SLE a defective Erk/DNMT1 pathway leading to DNA methylation is reported in SLE B cells and this pathway could be restored by utilisation of another mAb, the anti-interleukin (IL)-6 receptor mAb itolizumab.<sup>35,36</sup>

## WHOLE METHYLOME ANALYSIS

### Infinium Technology

Several strategies have been developed for whole genome DNA methylation profile determination.

**Table 2: Genome-wide DNA methylation patterns in primary Sjögren's syndrome.**

	Whole blood <sup>36</sup>	B cells (CD19 <sup>+</sup> ) <sup>36</sup>	B cells (CD19 <sup>+</sup> ) <sup>23,24</sup>	All T cells (CD4 <sup>+</sup> ) <sup>23,24</sup>	Naïve T cells (CD4 <sup>+</sup> , CD45, RA <sup>+</sup> ) <sup>35</sup>
<b>Patients (controls)</b>	100 (400)	24 (47)	26 (22)	26 (22)	11 (11)
<b>Differentially methylated CpG</b>	11,785	453	6,707	119	753
Increased methylation	6,171 (52.4%)	98 (21.6%)	2,953 (44%)	54 (45.4%)	200 (26.6%)
Decreased methylation	5,614 (47.6%)	355 (78.4%)	3,754 (56%)	65 (54.6%)	553 (73.4%)
<b>Differentially methylated genes</b>	5,623	303	3,619	74	426
Hypermethylated	<i>EBF4</i>	<i>ZPBP2, STAT3</i>	<i>IRF5</i>	-	<i>RUNX1</i>
Hypomethylated	<i>MX1, IFI44L, PARP9, IFIT1</i>	<i>MX1, IFI44L, IFITM1, PARP9</i>	<i>IFITM1, IFI44L</i>	-	<i>LTA, STAT1, IFITM1, IFI44L, CD247</i>
<b>Pathways</b>					
Lymphocyte activation	-	-	Yes	-	Yes
Interferon pathway	Yes	Yes	Yes	-	Yes
Antigen presentation	Yes	-	-	-	Yes
<b>Association with clinical data</b>					
SSA/SSB AAB	-	Yes	Yes	-	Unknown
Disease activity (ESSDAI)	-	-	Yes	-	-
<b>Association with risk factors</b>					
	-	<i>HLA, IRF5, CXCR5, BLK</i>	<i>HLA, IRF5, CXCR5, BLK</i>	-	-

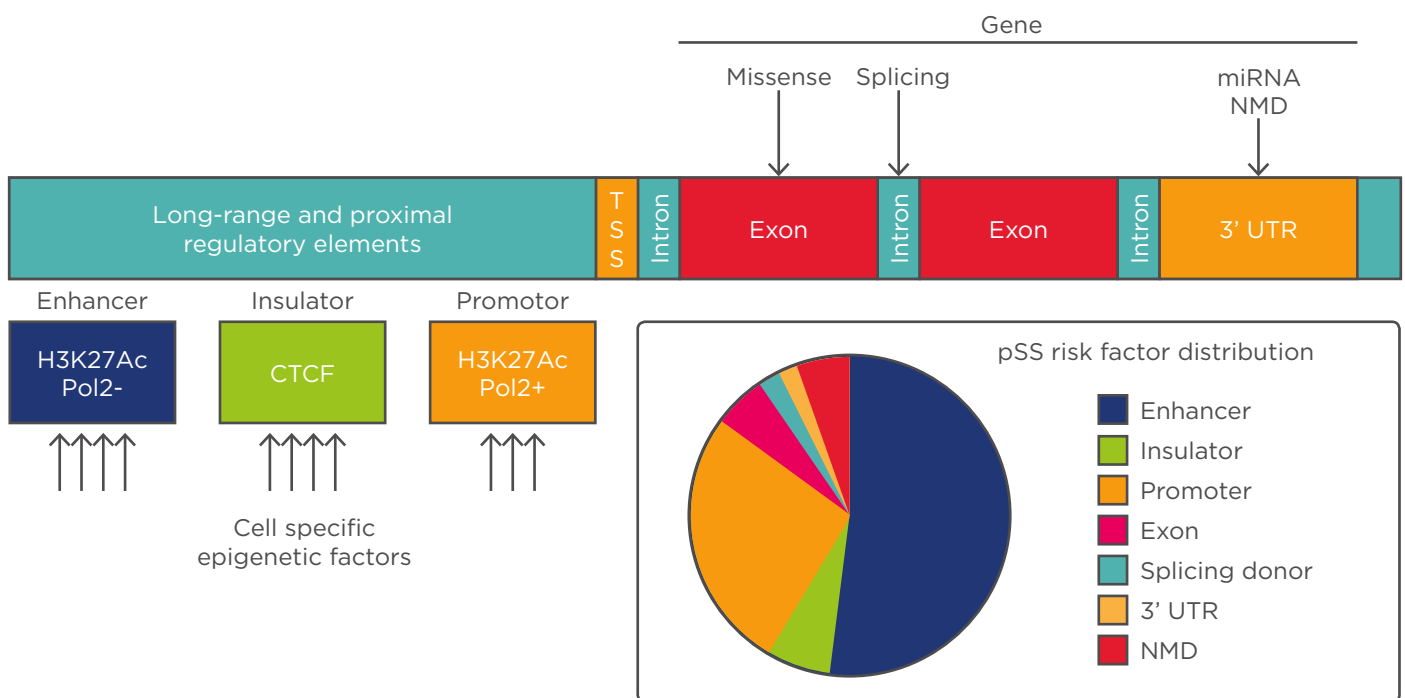
ESSDAI: EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index; HLA: human leukocyte antigen; IRF5: interferon regulatory factor 5; CXC: chemokine; BLK: B lymphocyte kinase; EBF4: early B cell factor 4; MX1: myxovirus resistance 1; IFI44L: interferon induced protein 44 like; IFIM1: interferon induced transmembrane protein 1; IFIT1: interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1; PARP9: poly(ADP-ribose) polymerase family member 9; ZPBP2: zona pellucida binding protein 2; STAT3: signal transducer and activator of transcription 3; RUNX1: runt-related transcription factor 1; LTA: lymphotoxin-alpha; CD247: cluster of differentiation 247; AAB: autoantibodies.

The most utilised of these, which is cost-effective and requires only a small amount of DNA, is the Infinium® methylation BeadChips developed by Illumina®.<sup>37</sup> This technology interrogates genomic DNA after bisulphite conversion (unmethylated cytosine is converted to uracil) using two 50-mer probes per CpG locus, one methylated and one unmethylated. The methylation state at each probe is calculated by determining the fluorescence ratio between the two beads. The human methylation 450K (HM450K) covered 2% of the 28 million CpG sites present in the human genome, 96% of the CpG islands, and 99% of the genes with an average of 17 CpG sites per gene.

### Whole Blood, B cells, and T cells

To date, genome-wide DNA methylation profiles were conducted with the HM450K beads in pSS by three groups using peripheral blood

mononuclear cells, T cells (whole and naïve), and B cells.<sup>26,27,38,39</sup> Although methylation analysis was not conducted in the same manner in the studies, several important points could be raised and they are summarised in Table 2. First, and irrespective of the lymphocyte subset, analysis of the hypermethylated genes highlighted as hot spots are the human leukocyte antigen regions (HLA I/II) and Type I interferon (IFN)-regulated/induced genes (*IFI44L*, *IFITM1*). Second, specific pathways were characterised including solute carrier proteins and the RUNX2 transcription factor for T cells and B cell receptor signalling and development genes for B cells. Third, between B cells and T cells, up to 50-times more DNA methylation changes are observed in B cells thus explaining that DNA methylation alterations in peripheral blood are predominantly related to B cells.



**Figure 1: A schematic of the different locations in which causal variants can occur and the distribution that is observed.**

Detailed mapping of causal variants in primary Sjögren's syndrome reveals that they map predominantly to regulatory elements (93.1). These elements are cell-type specific and hot spots for epigenetic factors (H3K27Ac for enhancers, H3K27Ac plus polymerase 2 (Pol2) for promoters, and the nuclear protein CCCTC-binding factor (CTCF) that prevent crosstalk between active and inactive chromatin for insulators). The other risk factors are related to mutations within the TSS, coding regions (silent, missense and nonsense mutations), splicing mutations, nonsense-mediated messenger RNA decay triggered by polymorphism, and miRNA targets in the 3'UTR.<sup>55,59</sup>

pSS: primary Sjögren's syndrome; TSS: transcription start site; 3'UTR: three prime untranslated region; TSS: toxic shock syndrome; CTCF: CCCTC-binding factor; Pol2: polymerase 2; NMD: nonsense-mediated messenger RNA decay.

## Minor Salivary Glands

So far, only one study has applied the HM450K beads to MSG obtained from pSS patients.<sup>39</sup> Moreover, such a study is limited because of the small sample size (N=15) and because MSG consist of multiple cell types including epithelial and acinar cells in pSS patients and controls, but also immune cells in pSS patients. Despite these limitations, the IFN induced gene *OAS2* was shown to be demethylated in MSG from pSS patients. Again the IFN pathway is highlighted and this is in agreement with histological and gene expression studies, conducted in MSG from pSS patients, which have demonstrated increased levels of IFN- $\alpha$  and altered interferon gene expression.<sup>31,40</sup>

Another way to test the influence of DNA methylation in pSS is to use DNMT inhibitors. In this manner, treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza) results in expression of the *SSB/La autoantigen* and *cytokeratin 19* genes in the HSG cell line,<sup>25,41</sup> *aquaporin 5* gene expression in the HSG ductal cell line NS-SV-DC,<sup>42</sup> alteration in the control of Type I hemidesmosome components,<sup>43</sup> and to the increased fluid secretion in the murine ageing model C57Bl/6Cr Skc. In contrast, 5-Aza was ineffective in inducing *IRF5* and *CD40L* upregulation in CD4<sup>+</sup> T cells from pSS women.<sup>44,45</sup>

## EPIGENETIC REPROGRAMMING AND RETROTRANSPOSONS

Interspersed and comprising 8% of human genome, human endogenous retroviruses (HERV) are controlled at the epigenetic level by DNA methylation.<sup>20</sup> When such control is impaired, HERV can produce different effects. One example is related to the human T cell leukaemia related endogenous retrovirus (HRES-1) that is inserted in the long arm of chromosome 1 at position 1q42 and controlled by DNA methylation,<sup>46</sup> when expressed the HRES-1 provirus produces a p38 gag protein that can induce AAB development as observed in 10% of patients with pSS in contrast to 1.5% in healthy donors.<sup>47</sup> An association between SLE and HRES-1 polymorphisms is also described.<sup>48</sup> Another example is HERV-CD5 that is integrated into chromosome 11 upstream of the host *cd5* gene exon 1 and downstream of the *cd6* gene.<sup>6</sup> This integration occurred just prior to the divergence of hominoids from old world monkeys 25 million years ago.<sup>49</sup> Defective DNA methylation at the HERV-CD5 promoter introduces an alternative promoter for the *cd5* gene, and enables transcription of a fusion

transcript with the consequence of an intracellular variant of CD5,<sup>35,50</sup> which can in turn promote B cell autoreactivity as observed in SLE B cells.<sup>51,52</sup>

In MSG from pSS patients and in addition to HRES-1,<sup>53</sup> other HERV were reported to be over-expressed including HERV-K113 and HERV-5,<sup>54</sup> and HERV-E elements.<sup>14</sup>

## GENETIC FACTORS AND CROSSTALK WITH EPIGENETIC FACTORS

### Genetic Risk Factors Associated with Primary Sjögren's Syndrome

Up to 40 non-HLA genetic risk-factors are characterised in pSS<sup>55</sup> and the recent development of genome-wide association studies conducted in Caucasian and Han Chinese pSS patients have contributed to improve this list.<sup>55,56</sup> Genetic loci associated with pSS are associated with key pathological pathways including antigen presentation (HLA I/II), Type I IFN-regulated/induced genes (*IRF5*, *STAT4*), NF- $\kappa$ B pathway (*TNIP1*, *TNFAIP3*), and B cell activation (*CXCR5*, *BLK*).<sup>57</sup> Interestingly, it has been demonstrated for some of these risk-factors that they are associated with gene expression as observed with *HLA* and *BLK-FAM167* genes.<sup>58</sup> Another observation is that parts of them (~50%) are shared with SLE and other AID, and related to important immune components crucial in the development of AID such as cytokines (IL-10, IL-21), receptors (TNFSF4/CD252), transcription factors (*IRF5*), and B cell signalling proteins (*BLK*, *BANK1*). However, and with the exception of the *HLA I/II* genes that have a significant odds ratio ([OR]; usually above 2), the other risk factors are usually modest (1.1<OR<1.8) and for half of the patients no risk factors were reported.

### Genetic Risk Factor Annotation

The vast majority of genetic factors associated with pSS are excluded from protein coding regions (5.6%), and as described in **Figure 1**, are in regulatory areas (93.1%).<sup>55,59</sup> Regulatory pSS risk factors are suspected of controlling genes through an effect on: i) the transcriptional machinery when present within cell specific regulatory regions referred to as promoters (29.2%), enhancers (56.9%), and insulators (6.9%) (an insulator is a gene regulatory element that blocks interactions between enhancers and promoters); ii) the spliceosome complex formation that controls intron



excision (2.4%); iii) the activation of messenger RNA non-sense mediated decay (5.6%), and; iv) the control of messenger RNA stability through microRNA binding at three prime untranslated regions (2.4%). Such a breakthrough in our understanding regarding AID-genetic risk factor functions was possible due to recent development of the ENCODE (Encyclopedia of DNA elements) and Roadmap Epigenomics programmes.<sup>60</sup>

### Genetic Risk Factors and Cellular Specificity

As the primary role of the epigenome is to regulate transcription in a cell-specific manner, recent research demonstrated whether or not genetic variants are enriched in tissue-specific epigenomic marks and whether or not they can influence autoreactivity.<sup>61,62</sup> In line with this hypothesis, a B cell signature was observed in nearly all of the pSS-associated risk-factors when considering the active histone mark H3K27Ac, expression quantitative trait loci, and differentially demethylated CpGs.<sup>55</sup> The salivary gland epithelial cell signature remains to be demonstrated, and we can postulate that both signatures overlap partially.

Moreover, it was also reported that binding sites for SS risk variants were enriched within binding sites for immune-related transcription factors such as NF- $\kappa$ B, STATs, and PU1; and some common pathways previously described to be affected in pSS (Type I IFN, NF- $\kappa$ B).

## CONCLUSIONS

The information presented here indicates that DNA demethylation confers a risk for pSS, providing a strong argument for epigenetic causality in genetically predisposed individuals. Although not reported in this review, DNA methylation defects in pSS are associated with other epigenetic modifications such as histone modifications and miRNA overexpression.<sup>63</sup> Another important point is related to the cellular specificity, which concerns mainly B cells and epithelial cells. However, it was also observed that the process was reversible and that DNA demethylating drugs are related to a defective PKC-delta/Erk/DNMT1 pathway. As a consequence, it can be postulated that drugs controlling this pathway would undoubtedly have benefits for pSS prevention and treatment.<sup>18,64</sup>

## Acknowledgements

This work was supported by the 'Région Bretagne', the 'Association Française Gougerot-Sjögren et des Syndromes Secs', and by the 'Institut Français pour la Recherche Odontologique'. We are also grateful to Simone Forest and Geneviève Michel for their help in typing the paper. The research leading to these results received support from the Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking under grant agreement n°115565, resources of which are composed of financial contributions from the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) and EFPIA companies' in-kind contribution.

## REFERENCES

1. Cornec D et al. The Differential Diagnosis of Dry Eyes, Dry Mouth, and Parotidomegaly: A Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2015;49(3): 278-87.
2. Pers JO et al. Conference scene: Updating the highlights of Sjogren's syndrome. *Immunotherapy.* 2010;2(1): 13-20.
3. Tobon GJ et al. The Fms-like tyrosine kinase 3 ligand, a mediator of B cell survival, is also a marker of lymphoma in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2010;62(11):3447-56.
4. Christodoulou MI et al. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjogren's syndrome. *J Autoimmun.* 2010; 34(4):400-7.
5. Capaldo C et al. The active immunological profile in patients with primary Sjogren's syndrome is restricted to typically encountered autoantibodies. *Clin Exp Rheumatol.* 2016;34(4):722.
6. Alonso R et al. Aberrant expression of CD6 on B-cell subsets from patients with Sjogren's syndrome. *J Autoimmun.* 2010;35(4):336-41.
7. Le Dantec C et al. Rationale for treating primary Sjogren's syndrome patients with an anti-CD6 monoclonal antibody (Itolizumab). *Immunol Res.* 2013;56(2-3): 341-7.
8. Cornec D et al. Diagnostic accuracy of blood B-cell subset profiling and autoimmunity markers in Sjogren's syndrome. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(1): R15.
9. Le Dantec C et al. How the environment influences epigenetics, DNA methylation, and autoimmune diseases? Qianjin Lu Q et al. (eds.) *Epigenetics and Dermatology.* Elsevier. pp.467-485.
10. Brooks WH et al. Epigenetics and autoimmunity. *J Autoimmun.* 2010;34(3): J207-19.
11. Konsta OD et al. The contribution of epigenetics in Sjogren's Syndrome. *Front Genet.* 2014;5:71.
12. Darwaza A et al. Hydrallazine-induced Sjogren's syndrome. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1988;17(2):92-3.
13. Busche S et al. Population whole-genome bisulfite sequencing across two tissues highlights the environment as the principal source of human methylome variation. *Genome Biol.* 2015;16(1):290.
14. Le Dantec C et al. Epigenetics

- and Sjogren's syndrome. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(10):2046-53.
15. Shapira Y et al. Geoepidemiology of autoimmune rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(8):468-76.
  16. Thabet Y et al. Altered patterns of epigenetic changes in systemic lupus erythematosus and auto-antibody production: is there a link? *J Autoimmun.* 2012;39(3):154-60.
  17. Renaudineau Y et al. Epigenetics and autoimmunity, with special emphasis on methylation. *Keio J Med.* 2011;60(1):10-6.
  18. Brooks WH et al. Epigenetics and autoimmune diseases: the X chromosome-nucleolus nexus. *Front Genet.* 2015;6:22.
  19. Butcher LM et al. Non-CG DNA methylation is a biomarker for assessing endodermal differentiation capacity in pluripotent stem cells. *Nat Commun.* 2016; 7:10458.
  20. Le Dantec C et al. Human endogenous retrovirus group E and its involvement in diseases. *Viruses.* 2015;7(3):1238-57.
  21. Liang J et al. A correlation study on the effects of DNMT1 on methylation levels in CD4(+) T cells of SLE patients. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(10):19701-8.
  22. Karouzakis E et al. DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2009;60(12):3613-22.
  23. Huynh JL et al. Epigenetic mechanisms in multiple sclerosis: implications for pathogenesis and treatment. *Lancet Neurol.* 2013;12(2):195-206.
  24. Thabet Y et al. Epigenetic dysregulation in salivary glands from patients with primary Sjogren's syndrome may be ascribed to infiltrating B cells. *J Autoimmun.* 2013;41:175-81.
  25. Konsta OD et al. Defective DNA methylation in salivary gland epithelial acini from patients with Sjogren's syndrome is associated with SSB gene expression, anti-SSB/LA detection, and lymphocyte infiltration. *J Autoimmun.* 2016;68:30-8.
  26. Miceli-Richard C et al. Overlap between differentially methylated DNA regions in blood B lymphocytes and genetic at-risk loci in primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(5):933-40.
  27. Miceli-Richard C et al. Genetic contribution of DKK-1 polymorphisms to RA structural severity and DKK-1 level of expression. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(7):1480-1.
  28. Varin MM et al. In Sjogren's syndrome, B lymphocytes induce epithelial cells of salivary glands into apoptosis through protein kinase C delta activation. *Autoimmun Rev.* 2012;11(4):252-8.
  29. Seret G et al. Mesangial cell-specific antibodies are central to the pathogenesis of lupus nephritis. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:579670.
  30. Devauchelle-Pensec V et al. Improvement of Sjogren's syndrome after two infusions of rituximab (anti-CD20). *Arthritis Rheum.* 2007;57(2):310-7.
  31. Devauchelle-Pensec V et al. Gene expression profile in the salivary glands of primary Sjogren's syndrome patients before and after treatment with rituximab. *Arthritis Rheum.* 2010;62(8):2262-71.
  32. Devauchelle-Pensec V et al. Effects of rituximab therapy on quality of life in patients with primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol.* 2011;29(1):6-12.
  33. Jousse-Joulin S et al. Ultrasound assessment of salivary glands in patients with primary Sjogren's syndrome treated with rituximab: Quantitative and Doppler waveform analysis. *Biologics.* 2007;1(3): 311-9.
  34. Pers JO et al. BAFF-modulated repopulation of B lymphocytes in the blood and salivary glands of rituximab-treated patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2007;56(5):1464-77.
  35. Garaud S et al. IL-6 modulates CD5 expression in B cells from patients with lupus by regulating DNA methylation. *J Immunol.* 2009;182(9):5623-32.
  36. Renaudineau Y et al. Autoreactive B cells and epigenetics. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2010;39(1):85-94.
  37. Sandoval J et al. Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics.* 2011;6(6):692-702.
  38. Altorok N et al. Genome-wide DNA methylation patterns in naive CD4+ T cells from patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 2014; 66(3):731-9.
  39. Imgenberg-Kreuz J et al. Genome-wide DNA methylation analysis in multiple tissues in primary Sjogren's syndrome reveals regulatory effects at interferon-induced genes. *Ann Rheum Dis.* 2016. [Epub ahead of print].
  40. Bave U et al. Activation of the type I interferon system in primary Sjogren's syndrome: a possible etiopathogenic mechanism. *Arthritis Rheum.* 2005;52(4): 1185-95.
  41. Konsta OD et al. Epigenetic modifications in salivary glands from patients with Sjogren's syndrome affect cytokeratin 19 expression. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol.* 2016;53(1):e01.
  42. Motegi K et al. Expression of aquaporin-5 in and fluid secretion from immortalized human salivary gland ductal cells by treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine: a possibility for improvement of xerostomia in patients with Sjogren's syndrome. *Lab Invest.* 2005;85(3):342-53.
  43. Gonzalez S et al. Alterations in type I hemidesmosome components suggestive of epigenetic control in the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2011;63(4):1106-15.
  44. Belkhir R et al. Upregulation of membrane-bound CD40L on CD4+ T cells in women with primary Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol.* 2014;79(1): 37-42.
  45. Gestermann N et al. Methylation profile of the promoter region of IRF5 in primary Sjogren's syndrome. *Eur Cytokine Netw.* 2012;23(4):166-72.
  46. Fali T et al. DNA methylation modulates HRES1/p28 expression in B cells from patients with Lupus. *Autoimmunity.* 2014; 47(4):265-71.
  47. Banki K et al. Human T-cell lymphotropic virus (HTLV)-related endogenous sequence, HRES-1, encodes a 28-kDa protein: a possible autoantigen for HTLV-I gag-reactive autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(5): 1939-43.
  48. Magistrelli C et al. Polymorphic genotypes of the HRES-1 human endogenous retrovirus locus correlate with systemic lupus erythematosus and autoreactivity. *Immunogenetics.* 1999; 49(10):829-34.
  49. Renaudineau Y et al. Characterization of the human CD5 endogenous retrovirus-E in B lymphocytes. *Genes Immun.* 2005;6(8):663-71.
  50. Renaudineau Y et al. An alternative exon 1 of the CD5 gene regulates CD5 expression in human B lymphocytes. *Blood.* 2005;106(8):2781-9.
  51. Garaud S et al. 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):2010-8.
  52. Renaudineau Y et al. B1- and CD5-Positive B Cells. eLS: John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
  53. Brookes SM et al. The immune response to and expression of cross-reactive retroviral gag sequences in autoimmune disease. *Br J Rheumatol.* 1992;31(11):735-42.
  54. Moyes DL et al. The distribution of the endogenous retroviruses HERV-K113 and HERV-K115 in health and disease. *Genomics.* 2005;86(3):337-41.
  55. Konsta OD et al. Genetics and Epigenetics of Autoimmune Diseases. eLS. 2015:1-9.
  56. Li Y et al. A genome-wide association study in Han Chinese identifies a susceptibility locus for primary Sjogren's syndrome at 7q11.23. *Nat Genet.* 2013; 45(11):1361-5.
  57. Burbelo PD et al. Genome-wide association studies in Sjogren's syndrome: What do the genes tell us

- about disease pathogenesis? *Autoimmun Rev.* 2014;13(7):756-61.
58. Lessard CJ et al. Variants at multiple loci implicated in both innate and adaptive immune responses are associated with Sjogren's syndrome. *Nat Genet.* 2013;45(11):1284-92.
59. Konsta OD et al. An in silico Approach Reveals Associations between Genetic and Epigenetic Factors within Regulatory Elements in B Cells from Primary Sjogren's Syndrome Patients. *Front Immunol.* 2015; 6:437.
60. Farh KK et al. Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature.* 2015;518(7539): 337-43.
61. Gibson G. Human genetics. GTEx detects genetic effects. *Science.* 2015; 348(6235):640-1.
62. Kundaje A et al; Roadmap Epigenomics Consortium. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature.* 2015;518(7539):317-30.
63. Lu Q et al. Epigenetics in autoimmune disorders: highlights of the 10th Sjogren's syndrome symposium. *Autoimmun Rev.* 2010;9(9):627-30.
64. Le Dantec C et al. Epigénétique et médecine prédictive. *Revue Francophone des Laboratoires.* 2015;473:71-5.

If you would like reprints of any article, contact: +44 (0) 1245 334450.

# Bibliographie

## A

Alevizos, I., Alexander, S., Turner, R.J., and Illei, G.G. (2011). MicroRNA expression profiles as biomarkers of minor salivary gland inflammation and dysfunction in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* *63*, 535–544.

Ambudkar, I. (2018). Calcium signaling defects underlying salivary gland dysfunction. *Biochim. Biophys. Acta.*

Ameyar-Zazoua, M., Rachez, C., Souidi, M., Robin, P., Fritsch, L., Young, R., Morozova, N., Fenouil, R., Descostes, N., Andrau, J.-C., et al. (2012). Argonaute proteins couple chromatin silencing to alternative splicing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 998–1004.

Aoki, A., Suetake, I., Miyagawa, J., Fujio, T., Chijiwa, T., Sasaki, H., and Tajima, S. (2001). Enzymatic properties of de novo-type mouse DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* *29*, 3506–3512.

Appel, S., Le Hellard, S., Bruland, O., Brun, J.G., Omdal, R., Kristjansdottir, G., Theander, E., Nordmark, G., Kvarnström, M., Eriksson, P., et al. (2011). Potential association of muscarinic receptor 3 gene variants with primary Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 1327–1329.

Auphan, N., DiDonato, J.A., Rosette, C., Helmberg, A., and Karin, M. (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* *270*, 286–290.

## B

Bachman, M., Uribe-Lewis, S., Yang, X., Williams, M., Murrell, A., and Balasubramanian, S. (2014). 5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification. *Nat. Chem.* *6*, 1049–1055.

Bachman, M., Uribe-Lewis, S., Yang, X., Burgess, H.E., Iurlaro, M., Reik, W., Murrell, A., and Balasubramanian, S. (2015). 5-Formylcytosine can be a stable DNA modification in mammals. *Nat. Chem. Biol.* *11*, 555–557.

Baer, A.N., McAdams DeMarco, M., Shiboski, S.C., Lam, M.Y., Challacombe, S., Daniels, T.E., Dong, Y., Greenspan, J.S., Kirkham, B.W., Lanfranchi, H.E., et al. (2015). The SSB-positive/SSA-negative antibody profile is not associated with key phenotypic features of Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* *74*, 1557–1561.

Barlow, D.P., Stöger, R., Herrmann, B.G., Saito, K., and Schweifer, N. (1991). The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature* *349*, 84–87.

Barnes, P.J., and Karin, M. (1997). Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* *336*, 1066–1071.

Bartolomei, M.S., Zemel, S., and Tilghman, S.M. (1991). Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature* *351*, 153–155.

Barzilai, O., Sherer, Y., Ram, M., Izhaky, D., Anaya, J.M., and Shoenfeld, Y. (2007). Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in autoimmune diseases: are they truly notorious? A preliminary report. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1108*, 567–577.

Båve, U., Nordmark, G., Lövgren, T., Rönnelid, J., Cajander, S., Eloranta, M.-L., Alm, G.V., and Rönnblom, L. Activation of the type I interferon system in primary Sjögren's syndrome: A possible etiopathogenic mechanism. *Arthritis Rheum.* *52*, 1185–1195.

Berger, S.L., Kouzarides, T., Shiekhattar, R., and Shilatifard, A. (2009). An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* *23*, 781–783.

Berman, B.P., Weisenberger, D.J., Aman, J.F., Hinoue, T., Ramjan, Z., Liu, Y., Noushmehr, H., Lange, C.P.E., van Dijk, C.M., Tollenaar, R.A.E.M., et al. (2011). Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina-associated domains. *Nat. Genet.* *44*, 40–46.

Berthelot, J.-M., Le Goff, B., Neel, A., Maugars, Y., and Hamidou, M. (2017). NETose : au carrefour des polyarthrites rhumatoïdes, lupus et vascularites. *Rev. Rhum.* *84*, 274–281.

Billiau, A., and Matthys, P. (2009). Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev.* *20*, 97–113.

Billings, M., Amin Hadavand, M., and Alevizos, I. (2018). Comparative analysis of the 2016 ACR-EULAR and the 2002 AECG classification criteria for Sjögren's syndrome: Findings from the NIH cohort. *Oral Dis.* *24*, 184–190.

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

Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature* *447*, 396–398.

Blaschke, K., Ebata, K.T., Karimi, M.M., Zepeda-Martínez, J.A., Goyal, P., Mahapatra, S., Tam, A., Laird, D.J., Hirst, M., Rao, A., et al. (2013). Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature* *500*, 222–226.

Blasco, M.A. (2007). The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat. Rev. Genet.* *8*, 299–309.

Blattler, A., Yao, L., Witt, H., Guo, Y., Nicolet, C.M., Berman, B.P., and Farnham, P.J. (2014). Global loss of DNA methylation uncovers intronic enhancers in genes showing expression changes. *Genome Biol.* *15*.

van Blokland, S.C., van Helden-Meeuwsen, C.G., Wierenga-Wolf, A.F., Drexhage, H.A., Hooijkaas, H., van de Merwe, J.P., and Versnel, M.A. (2000). 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. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *80*, 575–585.

- Bocker, M.T., Tuorto, F., Raddatz, G., Musch, T., Yang, F.-C., Xu, M., Lyko, F., and Breiling, A. (2012). Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET2 maintains the active state of the mammalian HOXA cluster. *Nat. Commun.* 3, 818.
- Boks, M.P., Derks, E.M., Weisenberger, D.J., Strengman, E., Janson, E., Sommer, I.E., Kahn, R.S., and Ophoff, R.A. (2009). The relationship of DNA methylation with age, gender and genotype in twins and healthy controls. *PLoS One* 4, e6767.
- Bollati, V., Schwartz, J., Wright, R., Litonjua, A., Tarantini, L., Suh, H., Sparrow, D., Vokonas, P., and Baccarelli, A. (2009). Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects. *Mech. Ageing Dev.* 130, 234–239.
- Bolstad, A.I., Haga, H.J., Wassmuth, R., and Jonsson, R. (2000a). Monozygotic twins with primary Sjögren's syndrome. *J. Rheumatol.* 27, 2264–2266.
- Bolstad, A.I., Wargelius, A., Nakken, B., Haga, H.J., and Jonsson, R. (2000b). Fas and Fas ligand gene polymorphisms in primary Sjögren's syndrome. *J. Rheumatol.* 27, 2397–2405.
- Borden, E.C., Sen, G.C., Uze, G., Silverman, R.H., Ransohoff, R.M., Foster, G.R., and Stark, G.R. (2007). Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 975–990.
- Borg, F.A.Y., and Isenberg, D.A. (2007). Syndromes and complications of interferon therapy. *Curr. Opin. Rheumatol.* 19, 61–66.
- Boshell, J.L., and Pennington, C. (1980). Histological observations on the effects of isoproterenol on regenerating submandibular glands of the rat. *Cell Tissue Res.* 213, 411–416.
- Bostick, M., Kim, J.K., Estève, P.-O., Clark, A., Pradhan, S., and Jacobsen, S.E. (2007). UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* 317, 1760–1764.
- Both, T., Dalm, V.A.S.H., van Hagen, P.M., and van Daele, P.L.A. (2017). Reviewing primary Sjögren's syndrome: beyond the dryness - From pathophysiology to diagnosis and treatment. *Int. J. Med. Sci.* 14, 191–200.
- Brenet, F., Moh, M., Funk, P., Feierstein, E., Viale, A.J., Socci, N.D., and Scandura, J.M. (2011). DNA Methylation of the First Exon Is Tightly Linked to Transcriptional Silencing. *PLoS ONE* 6.
- Brkic, Z., Olthof, E.D., Drexhage, H.A., and Versnel, M.A. (2010). Monocyte Gene Expression Signatures in Rheumatic Diseases: Biomarkers for Disease Activity and Tools for Diagnosis and Classification. *Open Arthritis J.* 3.
- Brkic, Z., Maria, N.I., van Helden-Meeuwsen, C.G., van de Merwe, J.P., van Daele, P.L., Dalm, V.A., Wildenberg, M.E., Beumer, W., Drexhage, H.A., and Versnel, M.A. (2013). Prevalence of interferon type I signature in CD14 monocytes of patients with Sjögren's syndrome and association with disease activity and BAFF gene expression. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 728–735.

Brondello, J.-M., Prieur, A., Philipot, D., Lemaitre, J.-M., Lenaers, G., Piette, J., and Dulić, V. (2012). La sénescence cellulaire: Un nouveau mythe de Janus ? *médecine/sciences* 28, 288–296.

C

Caiafa, P., Guastafierro, T., and Zampieri, M. (2009). Epigenetics: poly(ADP-ribosyl)ation of PARP-1 regulates genomic methylation patterns. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23, 672–678.

Calvanese, V., Lara, E., Kahn, A., and Fraga, M.F. (2009). The role of epigenetics in aging and age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* 8, 268–276.

Campbell, A.M., Kashgarian, M., and Shlomchik, M.J. (2012). NADPH oxidase inhibits the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 4, 157ra141.

Cannat, A., and Seligmann, M. (1968). Induction by isoniazid and hydrallazine of antinuclear factors in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 3, 99–105.

Cardoso, M.C., and Leonhardt, H. (1999). DNA Methyltransferase Is Actively Retained in the Cytoplasm during Early Development. *J. Cell Biol.* 147, 25–32.

Carpenter, G.H., Khosravani, N., Ekström, J., Osailan, S.M., Paterson, K.P., and Proctor, G.B. (2009). Altered plasticity of the parasympathetic innervation in the recovering rat submandibular gland following extensive atrophy. *Exp. Physiol.* 94, 213–219.

Carubbi, F., Alunno, A., Cipriani, P., Bartoloni, E., Baldini, C., Quartuccio, L., Priori, R., Valesini, G., De Vita, S., Bombardieri, S., et al. (2015). A retrospective, multicenter study evaluating the prognostic value of minor salivary gland histology in a large cohort of patients with primary Sjögren's syndrome. *Lupus* 24, 315–320.

Cay, H.F., Sezer, I., Dogan, S., Felek, R., and Aslan, M. (2012). Polymorphism in the TNF-alpha gene promoter at position -1031 is associated with increased circulating levels of TNF-alpha, myeloperoxidase and nitrotyrosine in primary Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Rheumatol.* 30, 843–849.

Cejková, J., Ardan, T., Simonová, Z., Cejka, C., Malec, J., Jirsová, K., Filipec, M., Dotrellová, D., and Brůnová, B. (2007). Nitric oxide synthase induction and cytotoxic nitrogen-related oxidant formation in conjunctival epithelium of dry eye (Sjögren's syndrome). *Nitric Oxide Biol. Chem.* 17, 10–17.

Cha, S., Brayer, J., Gao, J., Brown, V., Killedar, S., Yasunari, U., and Peck, A.B. (2004). A dual role for interferon-gamma in the pathogenesis of Sjogren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy in the nonobese diabetic mouse. *Scand. J. Immunol.* 60, 552–565.

Charras, A., Konsta, O.D., Dantec, C.L., Bagacean, C., Kapsogeorgou, E.K., Tzioufas, A.G., Pers, J.-O., Bordron, A., and Renaudineau, Y. (2017). Cell-specific epigenome-wide DNA methylation profile in long-term cultured minor salivary gland epithelial cells from patients with Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 76, 625–628.



Chen, H., Dzitoyeva, S., and Manev, H. (2012). Effect of aging on 5-hydroxymethylcytosine in the mouse hippocampus. *Restor. Neurol. Neurosci.* *30*, 237–245.

Chen, T., Ueda, Y., Dodge, J.E., Wang, Z., and Li, E. (2003). Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 5594–5605.

Chen, X., Wu, H., and Wei, W. (2018). Advances in the diagnosis and treatment of Sjogren's syndrome. *Clin. Rheumatol.* 1–7.

Cheng, K.T., Alevizos, I., Liu, X., Swaim, W.D., Yin, H., Feske, S., Oh-hora, M., and Ambudkar, I.S. (2012). STIM1 and STIM2 protein deficiency in T lymphocytes underlies development of the exocrine gland autoimmune disease, Sjogren's syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 14544–14549.

Choi, S.H., Heo, K., Byun, H.-M., An, W., Lu, W., and Yang, A.S. (2011). Identification of preferential target sites for human DNA methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* *39*, 104–118.

Chouliaras, L., van den Hove, D.L.A., Kenis, G., Keitel, S., Hof, P.R., van Os, J., Steinbusch, H.W.M., Schmitz, C., and Rutten, B.P.F. (2012). Age-related increase in levels of 5-hydroxymethylcytosine in mouse hippocampus is prevented by caloric restriction. *Curr. Alzheimer Res.* *9*, 536–544.

Christensen, B.C., Houseman, E.A., Marsit, C.J., Zheng, S., Wrensch, M.R., Wiemels, J.L., Nelson, H.H., Karagas, M.R., Padbury, J.F., Bueno, R., et al. (2009). Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS Genet.* *5*, e1000602.

Christodoulou, M.I., Kapsogeorgou, E.K., and Moutsopoulos, H.M. (2010). Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome. *J. Autoimmun.* *34*, 400–407.

Ciccarone, F., Klinger, F.G., Catizone, A., Calabrese, R., Zampieri, M., Bacalini, M.G., De Felici, M., and Caiafa, P. (2012). Poly(ADP-ribosyl)ation acts in the DNA demethylation of mouse primordial germ cells also with DNA damage-independent roles. *PloS One* *7*, e46927.

Ciccio, F., Guggino, G., Rizzo, A., Ferrante, A., Raimondo, S., Giardina, A., Dieli, F., Campisi, G., Alessandro, R., and Triolo, G. (2012). Potential involvement of IL-22 and IL-22-producing cells in the inflamed salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* *71*, 295–301.

Cobb, B.L., Fei, Y., Jonsson, R., Bolstad, A.I., Brun, J.G., Rischmueller, M., Lester, S.E., Witte, T., Illei, G., Brennan, M., et al. (2010). Genetic association between methyl-CpG binding protein 2 (MECP2) and primary Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* *69*, 1731–1732.

Cojocar, M., Cojocar, I.M., Silosi, I., and Vrabie, C.D. (2011). Gastrointestinal manifestations in systemic autoimmune diseases. *Maedica* *6*, 45–51.

Cole, M.B., Quach, H., Quach, D., Alice, B., Taylor, K.E., Barcellos, L.F., and Criswell, L.A. (2016). Epigenetic signatures of salivary gland inflammation in sjögren's syndrome. *Arthritis Rheumatol.* n/a-n/a.

Colquitt, B.M., Allen, W.E., Barnea, G., and Lomvardas, S. (2013). Alteration of genic 5-hydroxymethylcytosine patterning in olfactory neurons correlates with changes in gene expression and cell identity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 14682–14687.

Costa, Y., Ding, J., Theunissen, T.W., Faiola, F., Hore, T.A., Shliaha, P.V., Fidalgo, M., Saunders, A., Lawrence, M., Dietmann, S., et al. (2013). Nanog-dependent function of Tet1 and Tet2 in establishment of pluripotency. *Nature* *495*, 370–374.

## D

Dantec, C.L., Varin, M.-M., Brooks, W.H., Pers, J.-O., and Renaudineau, P.Y. and Y. (2012). Epigenetics and Sjogren's Syndrome.

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

Darwaza, A., Lamey, P.-J., and Connell, J.M.C. (1988). Hydrallazine-induced Sjögren's syndrome. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* *17*, 92–93.

Day, K., Waite, L.L., Thalacker-Mercer, A., West, A., Bamman, M.M., Brooks, J.D., Myers, R.M., and Absher, D. (2013). Differential DNA methylation with age displays both common and dynamic features across human tissues that are influenced by CpG landscape. *Genome Biol.* *14*, R102.

Deans, C., and Maggert, K.A. (2015). What do you mean, "epigenetic"? *Genetics* *199*, 887–896.

DeChiara, T.M., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1991). Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* *64*, 849–859.

Deltour, S., Chopin, V., and Leprince, D. (2005). Modifications épigénétiques et cancer. *médecine/sciences* *21*, 405–411.

Deshmukh, U.S., Nandula, S.R., Thimmalapura, P.-R., Scindia, Y.M., and Bagavant, H. (2009). Activation of innate immune responses through Toll-like receptor 3 causes a rapid loss of salivary gland function. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* *38*, 42–47.

Di Ruscio, A., Ebralidze, A.K., Benoukraf, T., Amabile, G., Goff, L.A., Terragni, J., Figueroa, M.E., De Figureido Pontes, L.L., Alberich-Jorda, M., Zhang, P., et al. (2013). DNMT1-interacting RNAs block gene specific DNA methylation. *Nature* *503*, 371–376.

Dimitriou, I.D., Kapsogeorgou, E.K., Abu-Helu, R.F., Moutsopoulos, H.M., and Manoussakis, M.N. (2002). Establishment of a convenient system for the long-term culture and study of non-neoplastic human salivary gland epithelial cells. *Eur. J. Oral Sci.* *110*, 21–30.

Ding, J., Zhang, W., Haskett, S., Pellerin, A., Xu, S., Petersen, B., Jandreski, L., Hamann, S., Reynolds, T.L., Zheng, T.S., et al. (2016). BAFF overexpression increases lymphocytic infiltration in Sjögren's target tissue, but only inefficiently promotes ectopic B-cell differentiation. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 169, 69–79.

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

Du, Q., Wang, Z., and Schramm, V.L. (2016). Human DNMT1 transition state structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 2916–2921.

## E

Eckhardt, F., Lewin, J., Cortese, R., Rakyan, V.K., Attwood, J., Burger, M., Burton, J., Cox, T.V., Davies, R., Down, T.A., et al. (2006). DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat. Genet.* 38, 1378–1385.

Ehrlich, M., Gama-Sosa, M.A., Huang, L.H., Midgett, R.M., Kuo, K.C., McCune, R.A., and Gehrke, C. (1982). Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res.* 10, 2709–2721.

Ehrlich, M., Norris, K.F., Wang, R.Y., Kuo, K.C., and Gehrke, C.W. (1986). DNA cytosine methylation and heat-induced deamination. *Biosci. Rep.* 6, 387–393.

Ehrlich, M., Zhang, X.-Y., and Inamdar, N.M. (1990). Spontaneous deamination of cytosine and 5-methylcytosine residues in DNA and replacement of 5-methylcytosine residues with cytosine residues. *Mutat. Res. Genet. Toxicol.* 238, 277–286.

Emamian, E.S., Leon, J.M., Lessard, C.J., Grandits, M., Baechler, E.C., Gaffney, P.M., Segal, B., Rhodus, N.L., and Moser, K.L. (2009). Peripheral blood gene expression profiling in Sjögren's syndrome. *Genes Immun.* 10, 285–296.

Emmerson, E., and Knox, S.M. Salivary gland stem cells: A review of development, regeneration and cancer. *Genesis* 56, e23211.

## F

Fang, M., Chen, D., and Yang, C.S. (2007). Dietary polyphenols may affect DNA methylation. *J. Nutr.* 137, 223S-228S.

Fang, M.Z., Wang, Y., Ai, N., Hou, Z., Sun, Y., Lu, H., Welsh, W., and Yang, C.S. (2003). Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res.* 63, 7563–7570.

Fang, M.Z., Chen, D., Sun, Y., Jin, Z., Christman, J.K., and Yang, C.S. (2005). Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARbeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 7033–7041.

- Fatemi, M., Hermann, A., Pradhan, S., and Jeltsch, A. (2001). The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *J. Mol. Biol.* *309*, 1189–1199.
- Feil, R., and Fraga, M.F. (2012). Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat. Rev. Genet.* *13*, 97–109.
- Feldmann, A., Ivanek, R., Murr, R., Gaidatzis, D., Burger, L., and Schübeler, D. (2013). Transcription factor occupancy can mediate active turnover of DNA methylation at regulatory regions. *PLoS Genet.* *9*, e1003994.
- Fellinger, K., Rothbauer, U., Felle, M., Längst, G., and Leonhardt, H. (2009). Dimerization of DNA methyltransferase 1 is mediated by its regulatory domain. *J. Cell. Biochem.* *106*, 521–528.
- Feng, S., Cokus, S.J., Zhang, X., Chen, P.-Y., Bostick, M., Goll, M.G., Hetzel, J., Jain, J., Strauss, S.H., Halpern, M.E., et al. (2010). Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 8689–8694.
- Ferreira, H.J., and Esteller, M. (2018). Non-coding RNAs, epigenetics, and cancer: tying it all together. *Cancer Metastasis Rev.* *37*, 55–73.
- Feske, S. (2009). ORAI1 and STIM1 deficiency in human and mice: roles of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in the immune system and beyond. *Immunol. Rev.* *231*, 189–209.
- Feske, S., Wulff, H., and Skolnik, E.Y. (2015). Ion channels in innate and adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* *33*, 291–353.
- Ficz, G., Branco, M.R., Seisenberger, S., Santos, F., Krueger, F., Hore, T.A., Marques, C.J., Andrews, S., and Reik, W. (2011). Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* *473*, 398–402.
- Figueroa, M.E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P.S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H.F., et al. (2010). Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* *18*, 553–567.
- Font, J., García-Carrasco, M., Ramos-Casals, M., Aldea, A.I., Cervera, R., Ingelmo, M., Vives, J., and Yagüe, J. (2002). The role of interleukin-10 promoter polymorphisms in the clinical expression of primary Sjögren's syndrome. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *41*, 1025–1030.
- Fox, R.I., and Fox, C.M. (2011). Sjögren's syndrome: Infections that may play a role in pathogenesis, mimic the disease, or complicate the patient's course. *Indian J. Rheumatol.* *6*, 13–25.
- Fox, R.I., and Liu, A.Y. (2006). Sjögren's syndrome in dermatology. *Clin. Dermatol.* *24*, 393–413.
- Fox, R.I., Luppi, M., Kang, H.I., and Pisa, P. (1991). Reactivation of Epstein-Barr virus in Sjögren's syndrome. *Springer Semin. Immunopathol.* *13*, 217–231.

Fraga, M.F. (2009). Genetic and epigenetic regulation of aging. *Curr. Opin. Immunol.* *21*, 446–453.

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., et al. (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 10604–10609.

Frank Lyko (2017). The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation | *Nature Reviews Genetics*.

Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* *176*, 231–241.

## G

Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I., and Illei, G.G. (2012). The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One* *7*, e30679.

Gallo, A., Jang, S.-I., Ong, H.L., Perez, P., Tandon, M., Ambudkar, I., Illei, G., and Alevizos, I. (2016). Targeting the Ca<sup>2+</sup> Sensor STIM1 by Exosomal Transfer of Ebv-miR-BART13-3p is Associated with Sjögren's Syndrome. *EBioMedicine* *10*, 216–226.

García-Carrasco, M., Ramos-Casals, M., Rosas, J., Pallarés, L., Calvo-Alen, J., Cervera, R., Font, J., and Ingelmo, M. (2002). Primary Sjögren syndrome: clinical and immunologic disease patterns in a cohort of 400 patients. *Medicine (Baltimore)* *81*, 270–280.

Gaudet, F., Hodgson, J.G., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J.W., Leonhardt, H., and Jaenisch, R. (2003). Induction of Tumors in Mice by Genomic Hypomethylation. *Science* *300*, 489–492.

Gestermann, N., Mekinian, A., Comets, E., Loiseau, P., Puechal, X., Hachulla, E., Gottenberg, J.-E., Mariette, X., and Miceli-Richard, C. (2010). STAT4 is a confirmed genetic risk factor for Sjögren's syndrome and could be involved in type 1 interferon pathway signaling. *Genes Immun.* *11*, 432–438.

Gomez, L.M., Anaya, J.-M., Gonzalez, C.I., Pineda-Tamayo, R., Otero, W., Arango, A., and Martín, J. (2005). PTPN22 C1858T polymorphism in Colombian patients with autoimmune diseases. *Genes Immun.* *6*, 628–631.

Gong, Y.-Z., Nititham, J., Taylor, K., Miceli-Richard, C., Sordet, C., Wachsmann, D., Bahram, S., Georgel, P., Criswell, L.A., Sibia, J., et al. (2014). Differentiation of follicular helper T cells by salivary gland epithelial cells in primary Sjögren's syndrome. *J. Autoimmun.* *51*, 57–66.

Gonzalo, V., Castellví-Bel, S., and Castells, A. (2007). MLH1 germ-line epimutations: is there strong evidence of its inheritance? *Gastroenterology* *133*, 1042–1044.

Gorelik, G.J., Yarlagadda, S., and Richardson, B.C. (2012). PKC $\delta$  OXIDATION CONTRIBUTES TO ERK INACTIVATION IN LUPUS T CELLS. *Arthritis Rheum.* *64*, 2964–2974.

Gottenberg, J.-E., Busson, M., Loiseau, P., Dourche, M., Cohen-Solal, J., Lepage, V., Charron, D., Miceli, C., Sibilia, J., and Mariette, X. (2004). Association of transforming growth factor beta1 and tumor necrosis factor alpha polymorphisms with anti-SSB/La antibody secretion in patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* *50*, 570–580.

Gottenberg, J.-E., Cagnard, N., Lucchesi, C., Letourneur, F., Mistou, S., Lazure, T., Jacques, S., Ba, N., Ittah, M., Lepajolec, C., et al. (2006). Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 2770–2775.

Gowher, H., and Jeltsch, A. (2001). Enzymatic properties of recombinant Dnmt3a DNA methyltransferase from mouse: the enzyme modifies DNA in a non-processive manner and also methylates non-CpA sites<sup>1</sup> Edited by J. Karn. *J. Mol. Biol.* *309*, 1201–1208.

Gu, T.-P., Guo, F., Yang, H., Wu, H.-P., Xu, G.-F., Liu, W., Xie, Z.-G., Shi, L., He, X., Jin, S., et al. (2011). The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature* *477*, 606–610.

Gudlur, A., Zhou, Y., and Hogan, P.G. (2013). STIM-ORAI interactions that control the CRAC channel. *Curr. Top. Membr.* *71*, 33–58.

Guelen, L., Pagie, L., Brassat, E., Meuleman, W., Faza, M.B., Talhout, W., Eussen, B.H., de Klein, A., Wessels, L., de Laat, W., et al. (2008). Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* *453*, 948–951.

Guibert, S., Forné, T., and Weber, M. (2012). Global profiling of DNA methylation erasure in mouse primordial germ cells. *Genome Res.* *22*, 633–641.

## H

Hackett, J.A., Dietmann, S., Murakami, K., Down, T.A., Leitch, H.G., and Surani, M.A. (2013). Synergistic mechanisms of DNA demethylation during transition to ground-state pluripotency. *Stem Cell Rep.* *1*, 518–531.

Haffner, M.C., Chaux, A., Meeker, A.K., Esopi, D.M., Gerber, J., Pellakuru, L.G., Toubaji, A., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C., Nelson, W.G., et al. (2011). Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers. *Oncotarget* *2*, 627–637.

Hahn, M.A., Qiu, R., Wu, X., Li, A.X., Zhang, H., Wang, J., Jui, J., Jin, S.-G., Jiang, Y., Pfeifer, G.P., et al. (2013). Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine and chromatin marks in Mammalian neurogenesis. *Cell Rep.* *3*, 291–300.

Hajkova, P. (2011). Epigenetic reprogramming in the germline: towards the ground state of the epigenome. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *366*, 2266–2273.

Hall, J.C., Casciola-Rosen, L., Berger, A.E., Kapsogeorgou, E.K., Cheadle, C., Tzioufas, A.G., Baer, A.N., and Rosen, A. (2012). Precise probes of type II interferon activity define the origin of

interferon signatures in target tissues in rheumatic diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 17609–17614.

Hand, A.R., and Ho, B. (1985). Mitosis and hypertrophy of intercalated duct cells and endothelial cells in the isoproterenol-treated rat parotid gland. *J. Dent. Res.* *64*, 1031–1038.

Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sada, S., Klotzle, B., Bibikova, M., Fan, J.-B., Gao, Y., et al. (2013). Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol. Cell* *49*, 359–367.

Harr, J.C., Luperchio, T.R., Wong, X., Cohen, E., Wheelan, S.J., and Reddy, K.L. (2015). Directed targeting of chromatin to the nuclear lamina is mediated by chromatin state and A-type lamins. *J. Cell Biol.* *208*, 33–52.

Hashimoto, H., Liu, Y., Upadhyay, A.K., Chang, Y., Howerton, S.B., Vertino, P.M., Zhang, X., and Cheng, X. (2012). Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Res.* *40*, 4841–4849.

Hauer, A.C., Finn, T.M., MacDonald, T.T., Spencer, J., and Isaacson, P.G. (1997). Analysis of TH1 and TH2 cytokine production in low grade B cell gastric MALT-type lymphomas stimulated in vitro with *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Pathol.* *50*, 957–959.

Hauk, V., Fraccaroli, L., Grasso, E., Eimon, A., Ramhorst, R., Hubscher, O., and Pérez Leirós, C. (2014). Monocytes from Sjögren's syndrome patients display increased vasoactive intestinal peptide receptor 2 expression and impaired apoptotic cell phagocytosis. *Clin. Exp. Immunol.* *177*, 662–670.

He, Y.-F., Li, B.-Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., Ding, J., Jia, Y., Chen, Z., Li, L., et al. (2011). Tet-Mediated Formation of 5-Carboxylcytosine and Its Excision by TDG in Mammalian DNA. *Science* *333*, 1303–1307.

Hertzog, P., Forster, S., and Samarajiwa, S. (2011). Systems biology of interferon responses. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* *31*, 5–11.

Heyn, H., Li, N., Ferreira, H.J., Moran, S., Pisano, D.G., Gomez, A., Diez, J., Sanchez-Mut, J.V., Setien, F., Carmona, F.J., et al. (2012). Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 10522–10527.

Hjelmervik, T.O.R., Petersen, K., Jonassen, I., Jonsson, R., and Bolstad, A.I. (2005). Gene expression profiling of minor salivary glands clearly distinguishes primary Sjögren's syndrome patients from healthy control subjects. *Arthritis Rheum.* *52*, 1534–1544.

Holliday, R., and Grigg, G.W. (1993). DNA methylation and mutation. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* *285*, 61–67.

Holsinger, F.C., and Bui, D.T. (2007). Anatomy, Function, and Evaluation of the Salivary Glands. In *Salivary Gland Disorders*, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 1–16.

Hu, X., and Ivashkiv, L.B. (2009). Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity* 31, 539–550.

Huang, Y., and Rao, A. (2014). Connections between TET proteins and aberrant DNA modification in cancer. *Trends Genet. TIG* 30, 464–474.

Hulkkonen, J., Pertovaara, M., Antonen, J., Lahdenpohja, N., Pasternack, A., and Hurme, M. (2001). Genetic association between interleukin-10 promoter region polymorphisms and primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 44, 176–179.

Huo, A.-P., Lin, K.-C., and Chou, C.-T. (2010). Predictive and prognostic value of antinuclear antibodies and rheumatoid factor in primary Sjögren's syndrome. *Int. J. Rheum. Dis.* 13, 39–47.

I

Igoe, A., and Scofield, R.H. (2013). Autoimmunity and Infection in Sjögren's Syndrome. *Curr. Opin. Rheumatol.* 25, 480–487.

Imanishi, T., Morinobu, A., Hayashi, N., Kanagawa, S., Koshiba, M., Kondo, S., and Kumagai, S. (2005). A novel polymorphism of the SSA1 gene is associated with anti-SS-A/Ro52 autoantibody in Japanese patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Rheumatol.* 23, 521–524.

Inoue, H., Mishima, K., Yamamoto-Yoshida, S., Ushikoshi-Nakayama, R., Nakagawa, Y., Yamamoto, K., Ryo, K., Ide, F., and Saito, I. (2012). Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of EBV reactivation as a risk factor for Sjögren's syndrome. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 4654–4662.

Iqbal, K., Jin, S.-G., Pfeifer, G.P., and Szabó, P.E. (2011). Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 3642–3647.

Issa, J.-P. (2014). Aging and epigenetic drift: a vicious cycle. *J. Clin. Invest.* 124, 24–29.

Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S.C., Collins, L.B., Swenberg, J.A., He, C., and Zhang, Y. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333, 1300–1303.

Ittah, M., Miceli-Richard, C., Eric Gottenberg, J.-, Lavie, F., Lazure, T., Ba, N., Sellam, J., Lepajolec, C., and Mariette, X. (2006). B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) is expressed under stimulation by interferon in salivary gland epithelial cells in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Res. Ther.* 8, R51.

J

Jaco, I., Canela, A., Vera, E., and Blasco, M.A. (2008). Centromere mitotic recombination in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 181, 885–892.



Jair, K.-W., Bachman, K.E., Suzuki, H., Ting, A.H., Rhee, I., Yen, R.-W.C., Baylin, S.B., and Schuebel, K.E. (2006). De novo CpG island methylation in human cancer cells. *Cancer Res.* *66*, 682–692.

Jeffries, M.A., and Sawalha, A.H. (2011). Epigenetics in systemic lupus erythematosus: leading the way for specific therapeutic agents. *Int. J. Clin. Rheumatol.* *6*, 423–439.

Jeltsch, A., Ehrenhofer-Murray, A., Jurkowski, T., Lyko, F., Reuter, G., Ankri, S., Nellen, W., Schaefer, M., and Helm, M. (2016). Mechanism and biological role of Dnmt2 in Nucleic Acid Methylation. *RNA Biol.* *0*, 00–00.

Ji, D., Lin, K., Song, J., and Wang, Y. (2014). Effects of Tet-induced Oxidation Products of 5-Methylcytosine on Dnmt1- and DNMT3a-mediated Cytosine Methylation. *Mol. Biosyst.* *10*, 1749–1752.

Jiang, C., Han, L., Su, B., Li, W.-H., and Zhao, Z. (2007). Features and Trend of Loss of Promoter-Associated CpG Islands in the Human and Mouse Genomes. *Mol. Biol. Evol.* *24*, 1991–2000.

Jintaridh, P., and Mutirangura, A. (2010). Distinctive patterns of age-dependent hypomethylation in interspersed repetitive sequences. *Physiol. Genomics* *41*, 194–200.

Johnson, D.A. (1984). Changes in rat parotid salivary proteins associated with liquid diet-induced gland atrophy and isoproterenol-induced gland enlargement. *Arch. Oral Biol.* *29*, 215–221.

Johnson, E.O., Skopouli, F.N., and Moutsopoulos, H.M. (2000). Neuroendocrine manifestations in Sjögren's syndrome. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* *26*, 927–949.

Jones, P.A., and Liang, G. (2009). Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat. Rev. Genet.* *10*, 805–811.

Jones, P.A., and Takai, D. (2001). The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* *293*, 1068–1070.

Jonsson, R., Vogelsang, P., Volchenkov, R., Espinosa, A., Wahren-Herlenius, M., and Appel, S. (2011). The complexity of Sjögren's syndrome: novel aspects on pathogenesis. *Immunol. Lett.* *141*, 1–9.

Jurkowska, R.Z., Jurkowski, T.P., and Jeltsch, A. (2011). Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* *12*, 206–222.

## K

Kallin, E.M., Rodríguez-Ubrea, J., Christensen, J., Cimmino, L., Aifantis, I., Helin, K., Ballestar, E., and Graf, T. (2012). Tet2 facilitates the derepression of myeloid target genes during CEBP $\alpha$ -induced transdifferentiation of pre-B cells. *Mol. Cell* *48*, 266–276.

Katsifis, G.E., Rekka, S., Moutsopoulos, N.M., Pillemer, S., and Wahl, S.M. (2009). Systemic and Local Interleukin-17 and Linked Cytokines Associated with Sjögren's Syndrome Immunopathogenesis. *Am. J. Pathol.* *175*, 1167–1177.

Katsiogiannis, S., Tenta, R., and Skopouli, F.N. (2015). Endoplasmic reticulum stress causes autophagy and apoptosis leading to cellular redistribution of the autoantigens Ro/Sjögren's syndrome-related antigen A (SSA) and La/SSB in salivary gland epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* *181*, 244–252.

Khalil, N. (1999). TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect.* *1*, 1255–1263.

Khare, T., Pai, S., Koncevicius, K., Pal, M., Kriukiene, E., Liutkeviciute, Z., Irimia, M., Jia, P., Ptak, C., Xia, M., et al. (2012). 5-hmC in the brain is abundant in synaptic genes and shows differences at the exon-intron boundary. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 1037–1043.

Kinney, S.M., Chin, H.G., Vaisvila, R., Bitinaite, J., Zheng, Y., Estève, P.-O., Feng, S., Stroud, H., Jacobsen, S.E., and Pradhan, S. (2011). Tissue-specific distribution and dynamic changes of 5-hydroxymethylcytosine in mammalian genomes. *J. Biol. Chem.* *286*, 24685–24693.

Kiripolsky, J., McCabe, L.G., and Kramer, J.M. (2017). Innate immunity in Sjögren's syndrome. *Clin. Immunol.* *182*, 4–13.

Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R.J., and Cheng, X. (1994). HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell* *76*, 357–369.

Ko, M., Bandukwala, H.S., An, J., Lamperti, E.D., Thompson, E.C., Hastie, R., Tsangaratou, A., Rajewsky, K., Koralov, S.B., and Rao, A. (2011). Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 14566–14571.

Konsta, O.D., Thabet, Y., Le Dantec, C., Brooks, W.H., Tzioufas, A.G., Pers, J.-O., and Renaudineau, Y. (2014). The contribution of epigenetics in Sjögren's Syndrome. *Front. Genet.* *5*, 71.

Konsta, O.D., Le Dantec, C., Charras, A., Cornec, D., Kapsogeorgou, E.K., Tzioufas, A.G., Pers, J.O., and Renaudineau, Y. (2016). Defective DNA methylation in salivary gland epithelial acini from patients with Sjögren's syndrome is associated with SSB gene expression, anti-SSB/LA detection, and lymphocyte infiltration. *J. Autoimmun.* *68*, 30–38.

Konttinen, Y.T., Platts, L.A., Tuominen, S., Eklund, K.K., Santavirta, N., Törnwall, J., Sorsa, T., Hukkanen, M., and Polak, J.M. (1997). Role of nitric oxide in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* *40*, 875–883.

Korman, B.D., Alba, M.I., Le, J.M., Alevizos, I., Smith, J.A., Nikolov, N.P., Kastner, D.L., Remmers, E.F., and Illei, G.G. (2008). Variant form of STAT4 is associated with primary Sjögren's syndrome. *Genes Immun.* *9*, 267–270.

Kramer, J.M., Klimatcheva, E., and Rothstein, T.L. (2013). CXCL13 is elevated in Sjögren's syndrome in mice and humans and is implicated in disease pathogenesis. *J. Leukoc. Biol.* *94*, 1079–1089.

Kriaucionis, S., and Heintz, N. (2009). The Nuclear DNA Base 5-Hydroxymethylcytosine Is Present in Purkinje Neurons and the Brain. *Science* *324*, 929–930.

Kumagai, S., Kanagawa, S., Morinobu, A., Takada, M., Nakamura, K., Sugai, S., Maruya, E., and Saji, H. (1997). Association of a new allele of the TAP2 gene, TAP2\*Bky2 (Val577), with susceptibility to Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* *40*, 1685–1692.

Kuster, J.E., Guarnieri, M.H., Ault, J.G., Flaherty, L., and Swiatek, P.J. (1997). IAP insertion in the murine *Lamb3* gene results in junctional epidermolysis bullosa. *Mamm. Genome* *8*, 673–681.

## L

Lagos, C., Carvajal, P., Castro, I., Jara, D., González, S., Aguilera, S., Barrera, M.-J., Quest, A.F.G., Bahamondes, V., Molina, C., et al. (2018). Association of high 5-hydroxymethylcytosine levels with Ten Eleven Translocation 2 overexpression and inflammation in Sjögren's syndrome patients. *Clin. Immunol.*

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* *409*, 860–921.

Lavoie, T.N., Stewart, C.M., Berg, K.M., Li, Y., and Nguyen, C.Q. (2011). Expression of Interleukin-22 in Sjögren's Syndrome: Significant Correlation with Disease Parameters. *Scand. J. Immunol.* *74*, 377–382.

Lawson, C.A., Donaldson, I.J., Bowman, S.J., Shefta, J., Morgan, A.W., Gough, A., Isaacs, J.D., Griffiths, B., Emery, P., Pease, C.T., et al. (2005). Analysis of the insertion/deletion related polymorphism within T cell antigen receptor beta variable genes in primary Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* *64*, 468–470.

Le Dantec, C., Varin, M.-M., Brooks, W.H., Pers, J.-O., Youinou, P., and Renaudineau, Y. (2012). Epigenetics and Sjögren's syndrome. *Curr. Pharm. Biotechnol.* *13*, 2046–2053.

Lee, C.-W., Wu, C.-H., Chiang, Y.-C., Chen, Y.-L., Chang, K.-T., Chuang, C.-C., and Lee, I.-T. (2018a). Carbon monoxide releasing molecule-2 attenuates *Pseudomonas aeruginosa*-induced ROS-dependent ICAM-1 expression in human pulmonary alveolar epithelial cells. *Redox Biol.* *18*, 93–103.

Lee, J., Lee, J., Kwok, S.-K., Baek, S., Jang, S.G., Hong, S.-M., Min, J.-W., Choi, S.S., Lee, J., Cho, M.-L., et al. (2018b). Janus kinase 1 inhibition suppresses interferon-induced B cell activating factor production in human salivary gland: potential therapeutic strategy for primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ.

Lee, S.-M., Choi, W.-Y., Lee, J., and Kim, Y.-J. (2015). The regulatory mechanisms of intragenic DNA methylation. *Epigenomics* *7*, 527–531.

Lee, W.J., Shim, J.-Y., and Zhu, B.T. (2005). Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. *Mol. Pharmacol.* *68*, 1018–1030.

- Lei, H., Oh, S.P., Okano, M., Jüttermann, R., Goss, K.A., Jaenisch, R., and Li, E. (1996). De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Dev. Camb. Engl.* *122*, 3195–3205.
- Lessard, C.J., Li, H., Adrianto, I., Ice, J.A., Rasmussen, A., Grundahl, K.M., Kelly, J.A., Dozmorov, M.G., Miceli-Richard, C., Bowman, S., et al. (2013). Variants at multiple loci implicated in both innate and adaptive immune responses are associated with Sjögren’s syndrome. *Nat. Genet.* *45*.
- Letterio, J.J., and Roberts, A.B. (1998). Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu. Rev. Immunol.* *16*, 137–161.
- Lev Maor, G., Yearim, A., and Ast, G. (2015). The alternative role of DNA methylation in splicing regulation. *Trends Genet.* *31*, 274–280.
- Li, W., and Liu, M. (2011). Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues. *J. Nucleic Acids* *2011*, 870726.
- Li, Y., Zhang, K., Chen, H., Sun, F., Xu, J., Wu, Z., Li, P., Zhang, L., Du, Y., Luan, H., et al. (2013). A genome-wide association study in Han Chinese identifies a susceptibility locus for primary Sjögren’s syndrome at 7q11.23. *Nat. Genet.* *45*, 1361–1365.
- Liapi, A., Horisberger, A., François, S., and Ribi, C. (2016). [Sjögren’s syndrome: when to suspect and how to confirm?]. *Rev. Med. Suisse* *12*, 698–702.
- Lindahl, T., and Wood, R.D. (1999). Quality Control by DNA Repair. *Science* *286*, 1897–1905.
- Lisi, S., Sisto, M., Lofrumento, D.D., and D’Amore, M. (2012). Altered I $\kappa$ B $\alpha$  expression promotes NF- $\kappa$ B activation in monocytes from primary Sjögren’s syndrome patients. *Pathology (Phila.)* *44*, 557–561.
- Lister, R., Mukamel, E.A., Nery, J.R., Urich, M., Puddifoot, C.A., Johnson, N.D., Lucero, J., Huang, Y., Dwork, A.J., Schultz, M.D., et al. (2013). Global Epigenomic Reconfiguration During Mammalian Brain Development. *Science* *341*, 1237905.
- Liu, Z., Xie, Z., Jones, W., Pavlovicz, R.E., Liu, S., Yu, J., Li, P., Lin, J., Fuchs, J.R., Marcucci, G., et al. (2009). Curcumin is a potent DNA hypomethylation agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *19*, 706–709.
- Loomis, R.J., Naoe, Y., Parker, J.B., Savic, V., Bozovsky, M.R., Macfarlan, T., Manley, J.L., and Chakravarti, D. (2009). Chromatin Binding of SRp20 and ASF/SF2 and Dissociation from Mitotic Chromosomes Is Modulated by Histone H3 Serine 10 Phosphorylation. *Mol. Cell* *33*, 450–461.
- López, V., Fernández, A.F., and Fraga, M.F. (2017). The role of 5-hydroxymethylcytosine in development, aging and age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* *37*, 28–38.

## M

Mackay, F., Woodcock, S.A., Lawton, P., Ambrose, C., Baetscher, M., Schneider, P., Tschopp, J., and Browning, J.L. (1999). Mice Transgenic for Baff Develop Lymphocytic Disorders along with Autoimmune Manifestations. *J. Exp. Med.* *190*, 1697–1710.

Madrigano, J., Baccarelli, A., Mittleman, M.A., Sparrow, D., Vokonas, P.S., Tarantini, L., and Schwartz, J. (2012). Aging and epigenetics: longitudinal changes in gene-specific DNA methylation. *Epigenetics* *7*, 63–70.

Madzo, J., Liu, H., Rodriguez, A., Vasanthakumar, A., Sundaravel, S., Caces, D.B.D., Looney, T.J., Zhang, L., Lepore, J.B., Macrae, T., et al. (2014). Hydroxymethylation at gene regulatory regions directs stem/early progenitor cell commitment during erythropoiesis. *Cell Rep.* *6*, 231–244.

Maiti, A., and Drohat, A.C. (2011). Thymine DNA Glycosylase Can Rapidly Excise 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine. *J. Biol. Chem.* *286*, 35334–35338.

Mamtani, M., Anaya, J.-M., He, W., and Ahuja, S.K. (2010). Association of copy number variation in the FCGR3B gene with risk of autoimmune diseases. *Genes Immun.* *11*, 155–160.

Manoussakis, M.N., and Kapsogeorgou, E.K. (2010). The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjögren’s syndrome. *J. Autoimmun.* *35*, 219–224.

Manoussakis, M.N., Boiu, S., Korkolopoulou, P., Kapsogeorgou, E.K., Kavantzias, N., Ziakas, P., Patsouris, E., and Moutsopoulos, H.M. (2007). 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*, 3977–3988.

Maria, N.I., Brkic, Z., Waris, M., van Helden-Meeuwssen, C.G., Heezen, K., van de Merwe, J.P., van Daele, P.L., Dalm, V.A.S.H., Drexhage, H.A., and Versnel, M.A. (2014). MxA as a clinically applicable biomarker for identifying systemic interferon type I in primary Sjögren’s syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* *73*, 1052–1059.

Mariani, C.J., Madzo, J., Moen, E.L., Yesilkanal, A., and Godley, L.A. (2013). Alterations of 5-hydroxymethylcytosine in human cancers. *Cancers* *5*, 786–814.

Mariani, C.J., Vasanthakumar, A., Madzo, J., Yesilkanal, A., Bhagat, T., Yu, Y., Bhattacharyya, S., Wenger, R.H., Cohn, S.L., Nanduri, J., et al. (2014). TET1-mediated hydroxymethylation facilitates hypoxic gene induction in neuroblastoma. *Cell Rep.* *7*, 1343–1352.

Mariette, X., Gozlan, J., Clerc, D., Bisson, M., and Morinet, F. (1991). Detection of Epstein-Barr virus DNA by in situ hybridization and polymerase chain reaction in salivary gland biopsy specimens from patients with Sjögren’s syndrome. *Am. J. Med.* *90*, 286–294.

Massagué, J. (2012). TGF $\beta$  signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 616–630.

Matsumoto, S., Kurimoto, T., Taketo, M.M., Fujii, S., and Kikuchi, A. (2016). The WNT/MYB pathway suppresses KIT expression to control the timing of salivary proacinar differentiation and duct formation. *Dev. Camb. Engl.* *143*, 2311–2324.

Matsumura, R., Umemiya, K., Kagami, M., Tomioka, H., Tanabe, E., Sugiyama, T., Sueishi, M., Nakajima, A., Azuma, M., Okumura, K., et al. (1998). Glandular and extraglandular expression of the Fas-Fas ligand and apoptosis in patients with Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Rheumatol.* *16*, 561–568.

Mavragani, C.P., Niewold, T.B., Moutsopoulos, N.M., Pillemer, S.R., Wahl, S.M., and Crow, M.K. (2007). Augmented interferon-alpha pathway activation in patients with Sjögren's syndrome treated with etanercept. *Arthritis Rheum.* *56*, 3995–4004.

Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R., and Haaf, T. (2000). Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* *403*, 501–502.

McClay, J.L., Aberg, K.A., Clark, S.L., Nerella, S., Kumar, G., Xie, L.Y., Hudson, A.D., Harada, A., Hultman, C.M., Magnusson, P.K.E., et al. (2014). A methylome-wide study of aging using massively parallel sequencing of the methyl-CpG-enriched genomic fraction from blood in over 700 subjects. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 1175–1185.

McGrath, J., and Solter, D. (1984). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* *37*, 179–183.

Melvin, J.E., Yule, D., Shuttleworth, T., and Begenisich, T. (2005). Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. *Annu. Rev. Physiol.* *67*, 445–469.

Miceli-Richard, C., Comets, E., Loiseau, P., Puechal, X., Hachulla, E., and Mariette, X. (2007). Association of an IRF5 gene functional polymorphism with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* *56*, 3989–3994.

Miceli-Richard, C., Gestermann, N., Ittah, M., Comets, E., Loiseau, P., Puechal, X., Hachulla, E., Gottenberg, J.-E., Lebon, P., Becquemont, L., et al. (2009). The CGGGG insertion/deletion polymorphism of the IRF5 promoter is a strong risk factor for primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* *60*, 1991–1997.

Michaud, E.J., Vugt, M.J. van, Bultman, S.J., Sweet, H.O., Davisson, M.T., and Woychik, R.P. (1994). Differential expression of a new dominant agouti allele (Aiapy) is correlated with methylation state and is influenced by parental lineage. *Genes Dev.* *8*, 1463–1472.

Miletich, I. (2010). Introduction to salivary glands: structure, function and embryonic development. *Front. Oral Biol.* *14*, 1–20.

Minor, E.A., Court, B.L., Young, J.I., and Wang, G. (2013). Ascorbate induces ten-eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine. *J. Biol. Chem.* *288*, 13669–13674.

Mitsias, D.I., Tzioufas, A.G., Veiopoulou, C., Zintzaras, E., Tassios, I.K., Kogopoulou, O., Moutsopoulos, H.M., and Thyphronitis, G. (2002). The Th1/Th2 cytokine balance changes with

the progress of the immunopathological lesion of Sjogren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* *128*, 562–568.

Morinobu, A., Kanagawa, S., Koshiba, M., Sugai, S., and Kumagai, S. (1999). Association of the glutathione S-transferase M1 homozygous null genotype with susceptibility to Sjögren's syndrome in Japanese individuals. *Arthritis Rheum.* *42*, 2612–2615.

Morva, A., Kapsogeorgou, E.K., Konsta, O.D., Moutsopoulos, H.M., and Tzioufas, A.G. (2013). OP0079 Salivary Gland Epithelial Cells (SGECS) Promote the Differentiation of B Cells. *Ann. Rheum. Dis.* *72*, A77–A77.

Moutsopoulos, H.M., Hooks, J.J., Chan, C.C., Dalavanga, Y.A., Skopouli, F.N., and Detrick, B. (1986). HLA-DR expression by labial minor salivary gland tissues in Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* *45*, 677–683.

Müller-Calleja, N., Manukyan, D., Canisius, A., Strand, D., and Lackner, K.J. (2017). Hydroxychloroquine inhibits proinflammatory signalling pathways by targeting endosomal NADPH oxidase. *Ann. Rheum. Dis.* *76*, 891–897.

Münzel, M., Globisch, D., and Carell, T. (2011). 5-Hydroxymethylcytosine, the sixth base of the genome. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *50*, 6460–6468.

Muskardin, T.L.W., and Niewold, T.B. (2018). Type I interferon in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* *14*, 214–228.

## N

Nabel, C.S., Jia, H., Ye, Y., Shen, L., Goldschmidt, H.L., Stivers, J.T., Zhang, Y., and Kohli, R.M. (2012). AID/APOBEC deaminases disfavor modified cytosines implicated in DNA demethylation. *Nat. Chem. Biol.* *8*, 751–758.

Nagao, Y., Hanada, S., Shishido, S., Ide, T., Kumashiro, R., Ueno, T., and Sata, M. (2003). Incidence of Sjögren's syndrome in Japanese patients with hepatitis C virus infection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *18*, 258–266.

Nakagawa, T., Lv, L., Nakagawa, M., Yu, Y., Yu, C., D'Alessio, A.C., Nakayama, K., Fan, H.-Y., Chen, X., and Xiong, Y. (2015). CRL4(VprBP) E3 ligase promotes monoubiquitylation and chromatin binding of TET dioxygenases. *Mol. Cell* *57*, 247–260.

Nakatani, T., Yamagata, K., Kimura, T., Oda, M., Nakashima, H., Hori, M., Sekita, Y., Arakawa, T., Nakamura, T., and Nakano, T. (2015). Stella preserves maternal chromosome integrity by inhibiting 5hmC-induced  $\gamma$ H2AX accumulation. *EMBO Rep.* *16*, 582–589.

Nakken, B., Jonsson, R., and Bolstad, A.I. (2001). Polymorphisms of the Ro52 gene associated with anti-Ro 52-kd autoantibodies in patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* *44*, 638–646.

Nandula, S.-R., Dey, P., Corbin, K.L., Nunemaker, C., Bagavant, H., and Deshmukh, U.S. (2013). Salivary Gland Hypofunction Induced by Activation of Innate Immunity is Dependent on Type I

Interferon Signaling. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* 42, 66–72.

Nannini, C., Jebakumar, A.J., Crowson, C.S., Ryu, J.H., and Matteson, E.L. (2013). Primary Sjogren's syndrome 1976-2005 and associated interstitial lung disease: a population-based study of incidence and mortality. *BMJ Open* 3, e003569.

Nestor, C.E., Ottaviano, R., Reddington, J., Sproul, D., Reinhardt, D., Dunican, D., Katz, E., Dixon, J.M., Harrison, D.J., and Meehan, R.R. (2012). Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes. *Genome Res.* 22, 467–477.

Nezos, A., Gravani, F., Tassidou, A., Kapsogeorgou, E.K., Voulgarelis, M., Koutsilieris, M., Crow, M.K., and Mavragani, C.P. (2015). Type I and II interferon signatures in Sjogren's syndrome pathogenesis: Contributions in distinct clinical phenotypes and Sjogren's related lymphomagenesis. *J. Autoimmun.* 63, 47–58.

Nguyen, C.Q., and Peck, A.B. (2013). The Interferon-Signature of Sjögren's Syndrome: How Unique Biomarkers Can Identify Underlying Inflammatory and Immunopathological Mechanisms of Specific Diseases. *Front. Immunol.* 4, 142.

Nguyen, C.Q., Hu, M.H., Li, Y., Stewart, C., and Peck, A.B. (2008). Salivary Gland Tissue Expression of Interleukin-23 and Interleukin-17 in Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum.* 58, 734–743.

Nordmark, G., Kristjansdottir, G., Theander, E., Eriksson, P., Brun, J.G., Wang, C., Padyukov, L., Truedsson, L., Alm, G., Eloranta, M.-L., et al. (2009). Additive effects of the major risk alleles of IRF5 and STAT4 in primary Sjögren's syndrome. *Genes Immun.* 10, 68–76.

Nordmark, G., Kristjansdottir, G., Theander, E., Appel, S., Eriksson, P., Vasaitis, L., Kvarnström, M., Delaleu, N., Lundmark, P., Lundmark, A., et al. (2011). Association of EBF1, FAM167A(C8orf13)-BLK and TNFSF4 gene variants with primary Sjögren's syndrome. *Genes Immun.* 12, 100–109.

Nossent, J.C., Lester, S., Zahra, D., Mackay, C.R., and Rischmueller, M. (2008). Polymorphism in the 5' regulatory region of the B-lymphocyte activating factor gene is associated with the Ro/La autoantibody response and serum BAFF levels in primary Sjogren's syndrome. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 47, 1311–1316.

O

Oda, M., Kumaki, Y., Shigeta, M., Jakt, L.M., Matsuoka, C., Yamagiwa, A., Niwa, H., and Okano, M. (2013). DNA methylation restricts lineage-specific functions of transcription factor Gata4 during embryonic stem cell differentiation. *PLoS Genet.* 9, e1003574.

Odobasic, D., Kitching, A.R., Yang, Y., O'Sullivan, K.M., Muljadi, R.C.M., Edgton, K.L., Tan, D.S.Y., Summers, S.A., Morand, E.F., and Holdsworth, S.R. (2013). Neutrophil myeloperoxidase regulates T-cell-driven tissue inflammation in mice by inhibiting dendritic cell function. *Blood* 121, 4195–4204.



Ogawa, N., Ping, L., Zhenjun, L., Takada, Y., and Sugai, S. (2002). Involvement of the interferon-gamma-induced T cell-attracting chemokines, interferon-gamma-inducible 10-kd protein (CXCL10) and monokine induced by interferon-gamma (CXCL9), in the salivary gland lesions of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* *46*, 2730–2741.

Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* *99*, 247–257.

Okashita, N., Kumaki, Y., Ebi, K., Nishi, M., Okamoto, Y., Nakayama, M., Hashimoto, S., Nakamura, T., Sugasawa, K., Kojima, N., et al. (2014). PRDM14 promotes active DNA demethylation through the ten-eleven translocation (TET)-mediated base excision repair pathway in embryonic stem cells. *Dev. Camb. Engl.* *141*, 269–280.

Orr, B.A., Haffner, M.C., Nelson, W.G., Yegnasubramanian, S., and Eberhart, C.G. (2012). Decreased 5-hydroxymethylcytosine is associated with neural progenitor phenotype in normal brain and shorter survival in malignant glioma. *PloS One* *7*, e41036.

Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., Dean, W., Reik, W., and Walter, J. (2000). Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr. Biol. CB* *10*, 475–478.

Ou, T.-T., Lin, C.-H., Lin, Y.-C., Li, R.-N., Tsai, W.-C., Liu, H.-W., and Yen, J.-H. (2008). IkappaBalpha promoter polymorphisms in patients with primary Sjögren's syndrome. *J. Clin. Immunol.* *28*, 440–444.

## P

Palomino-Morales, R.J., Diaz-Gallo, L.-M., Witte, T., Anaya, J.-M., and Martín, J. (2010). Influence of STAT4 polymorphism in primary Sjögren's syndrome. *J. Rheumatol.* *37*, 1016–1019.

Pan, Z., Xue, Z.-Y., Li, G.-F., Sun, M.-L., Zhang, M., Hao, L.-Y., Tang, Q.-Q., Zhu, L.-J., and Cao, J.-L. (2017). DNA Hydroxymethylation by Ten-eleven Translocation Methylcytosine Dioxygenase 1 and 3 Regulates Nociceptive Sensitization in a Chronic Inflammatory Pain Model. *Anesthesiol. J. Am. Soc. Anesthesiol.* *127*, 147–163.

Park, C.Y., Hoover, P.J., Mullins, F.M., Bachhawat, P., Covington, E.D., Raunser, S., Walz, T., Garcia, K.C., Dolmetsch, R.E., and Lewis, R.S. (2009). STIM1 Clusters and Activates CRAC Channels via Direct Binding of a Cytosolic Domain to Orai1. *Cell* *136*, 876–890.

Pastor, W.A., Pape, U.J., Huang, Y., Henderson, H.R., Lister, R., Ko, M., McLoughlin, E.M., Brudno, Y., Mahapatra, S., Kapranov, P., et al. (2011). Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. *Nature* *473*, 394–397.

Patel, R., and Shahane, A. (2014). The epidemiology of Sjögren's syndrome. *Clin. Epidemiol.* *6*, 247–255.

Peng, B., Ling, J., Lee, A.J., Wang, Z., Chang, Z., Jin, W., Kang, Y., Zhang, R., Shim, D., Wang, H., et al. (2010). Defective feedback regulation of NF- $\kappa$ B underlies Sjögren's syndrome in mice with mutated  $\kappa$ B enhancers of the I $\kappa$ B $\alpha$  promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 15193–15198.

Pérez, P., Kwon, Y.-J., Allende, C., Leyton, L., Aguilera, S., Molina, C., Labra, C., Julio, M., Leyton, C., and González, M.-J. (2005). 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.* *52*, 2751–2760.

Peric-Hupkes, D., and van Steensel, B. (2010). Role of the nuclear lamina in genome organization and gene expression. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *75*, 517–524.

Peronace, A.A., Davison, T.A., Houssay, A.B., and Perek, J. (1964). ALTERATIONS IN SUBMANDIBULAR AND RETROLINGUAL GLANDS FOLLOWING PARASYMPATHETIC DENERVATION IN RATS. *Anat. Rec.* *150*, 25–33.

Pers, J.-O., Daridon, C., Devauchelle, V., Jousse, S., Saraux, A., Jamin, C., and Youinou, P. (2005). BAFF overexpression is associated with autoantibody production in autoimmune diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1050*, 34–39.

Pertovaara, M., Lehtimäki, T., Rontu, R., Anttonen, J., Pasternack, A., and Hurme, M. (2004). Presence of apolipoprotein E epsilon4 allele predisposes to early onset of primary Sjögren's syndrome. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *43*, 1484–1487.

Pfaffeneder, T., Hackner, B., Truss, M., Münzel, M., Müller, M., Deiml, C.A., Hagemeyer, C., and Carell, T. (2011). The discovery of 5-formylcytosine in embryonic stem cell DNA. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *50*, 7008–7012.

Pinney, S.E. (2014). Mammalian Non-CpG Methylation: Stem Cells and Beyond. *Biology* *3*, 739–751.

Pirazzini, C., Giuliani, C., Bacalini, M.G., Boattini, A., Capri, M., Fontanesi, E., Marasco, E., Mantovani, V., Pierini, M., Pini, E., et al. (2012). Space/population and time/age in DNA methylation variability in humans: a study on IGF2/H19 locus in different Italian populations and in mono- and di-zygotic twins of different age. *Aging* *4*, 509–520.

Pollard, K.M., Cauvi, D.M., Toomey, C.B., Morris, K.V., and Kono, D.H. (2013). Interferon- $\gamma$  and systemic autoimmunity. *Discov. Med.* *16*, 123–131.

Prieur, and Quartier (2009). *Maladies systémiques et articulaires en rhumato pédiatrique - 2e ed* (Lavoisier).

Pringle, S., Wang, X., Verstappen, G.M.P.J., Terpstra, J.H., Zhang, C.K., He, A., Patel, V., Jones, R.E., Baird, D.M., Spijkervet, F.K.L., et al. Salivary Gland Stem Cells Age Prematurely in Primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheumatol.* *0*.

Proctor, G.B., and Asking, B. (1989). A comparison between changes in rat parotid protein composition 1 and 12 weeks following surgical sympathectomy. *Q. J. Exp. Physiol. Camb. Engl.* 74, 835–840.

Proctor, G.B., and Carpenter, G.H. (2007). Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 133, 3–18.

Putney, J.W. (2009). Capacitative calcium entry: from concept to molecules. *Immunol. Rev.* 231, 10–22.

## Q

Qin, B., Wang, J., Liang, Y., Yang, Z., and Zhong, R. (2013). The Association between TNF- $\alpha$ , IL-10 Gene Polymorphisms and Primary Sjögren's Syndrome: A Meta-Analysis and Systemic Review. *PLOS ONE* 8, e63401.

## R

Raghuraman, S., Donkin, I., Versteyhe, S., Barrès, R., and Simar, D. (2016). The Emerging Role of Epigenetics in Inflammation and Immunometabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 27, 782–795.

Ramos-Casals, M., Cervera, R., García-Carrasco, M., Vidal, J., Trejo, O., Jiménez, S., Costa, J., Font, J., and Ingelmo, M. (2000). Cytopenia and past human parvovirus B19 infection in patients with primary Sjögren's syndrome. *Semin. Arthritis Rheum.* 29, 373–378.

Ramos-Casals, M., Brito-Zerón, P., Sisó-Almirall, A., and Bosch, X. (2012). Primary Sjögren syndrome. *BMJ* 344, e3821.

Ramsahoye, B.H., Biniszkiwicz, D., Lyko, F., Clark, V., Bird, A.P., and Jaenisch, R. (2000). Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5237–5242.

Rasmussen, K.D., and Helin, K. (2016). Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes Dev.* 30, 733–750.

Rasmussen, A., Ice, J.A., Li, H., Grundahl, K., Kelly, J.A., Radfar, L., Stone, D.U., Hefner, K.S., Anaya, J.-M., Rohrer, M., et al. (2014). Comparison of the American-European Consensus Group Sjögren's syndrome classification criteria to newly proposed American College of Rheumatology criteria in a large, carefully characterised sicca cohort. *Ann. Rheum. Dis.* 73, 31–38.

Ravichandran, M., Jurkowska, R.Z., and Jurkowski, T.P. (2018). Target specificity of mammalian DNA methylation and demethylation machinery. *Org. Biomol. Chem.* 16, 1419–1435.

Reddy, K.L., Zullo, J.M., Bertolino, E., and Singh, H. (2008). Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature* 452, 243–247.

Riedel, S., Kraft, M., Kucharzik, T., Pauels, H.G., Tiemann, M., Steinbüchel, A., Domschke, W., and Lügering, N. (2001). CD4+ Th1-cells predominate in low-grade B-cell lymphoma of gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT type). *Scand. J. Gastroenterol.* 36, 1198–1203.

Robertson, K.D., and Wolffe, A.P. (2000a). DNA methylation in health and disease. *Nat. Rev. Genet.* 1, 11–19.

Robertson, K.D., and Wolffe, A.P. (2000b). DNA methylation in health and disease. *Nat. Rev. Genet.* 1, 11–19.

Rönnblom, L., and Alm, G.V. (2001). A Pivotal Role for the Natural Interferon  $\alpha$ -producing Cells (Plasmacytoid Dendritic Cells) in the Pathogenesis of Lupus. *J. Exp. Med.* 194, f59–f64.

Rönnblom, L., and Eloranta, M.-L. (2013). The interferon signature in autoimmune diseases. *Curr. Opin. Rheumatol.* 25, 248–253.

Rouso, E., Noel, E., Brogard, J.-M., Blicklé, J.-F., and Andrès, E. (2005). Paralysie faciale récidivante, syndrome de Gougerot-Sjögren primitif et carence en vitamine B12. *Presse Médicale* 34, 107–108.

Royer, B., Cazals-Hatem, D., Sibia, J., Agbalika, F., Cayuela, J.-M., Soussi, T., Maloisel, F., Clauvel, J.-P., Brouet, J.-C., and Mariette, X. (1997). Lymphomas in Patients With Sjögren's Syndrome Are Marginal Zone B-Cell Neoplasms, Arise in Diverse Extranodal and Nodal Sites, and Are Not Associated With Viruses. *Blood* 90, 766–775.

Rusakiewicz, S., Nocturne, G., Lazure, T., Semeraro, M., Flament, C., Caillat-Zucman, S., Sène, D., Delahaye, N., Vivier, E., Chaba, K., et al. (2013). NCR3/NKp30 contributes to pathogenesis in primary Sjögren's syndrome. *Sci. Transl. Med.* 5, 195ra96.

Russo, V.E.A., Riggs, A.D., and Martienssen, R.A. (1996). *Epigenetic mechanisms of gene regulation* (Cold Spring Harbour, NY : Cold Spring Harbour Laboratory Press).

Ruzov, A., Tsenkina, Y., Serio, A., Dudnakova, T., Fletcher, J., Bai, Y., Chebotareva, T., Pells, S., Hannoun, Z., Sullivan, G., et al. (2011). Lineage-specific distribution of high levels of genomic 5-hydroxymethylcytosine in mammalian development. *Cell Res.* 21, 1332–1342.

## S

Salomonsson, S., Larsson, P., Tengnér, P., Mellquist, E., Hjelmström, P., and Wahren-Herlenius, M. (2002). 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, 336–342.

Sandhya, P., Kurien, B.T., Danda, D., and Scofield, R.H. (2017). Update on Pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Curr. Rheumatol. Rev.* 13, 5–22.

Santos, F., Hendrich, B., Reik, W., and Dean, W. (2002). Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* 241, 172–182.

Schreck, R., Rieber, P., and Baeuerle, P.A. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* *10*, 2247–2258.

Schulze-Osthoff, K., Los, M., and Baeuerle, P.A. (1995). Redox signalling by transcription factors NF-kappa B and AP-1 in lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* *50*, 735–741.

Segawa, A., Shoi, N., and Yamashina, S. (1995). [Function of myoepithelial cells in salivary secretion: reevaluation of the expulsion theory]. *Kaibogaku Zasshi* *70*, 330–337.

Seisenberger, S., Peat, J.R., Hore, T.A., Santos, F., Dean, W., and Reik, W. (2013). Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *368*.

Sepúlveda, D., Barrera, M.-J., Castro, I., Aguilera, S., Carvajal, P., Lagos, C., González, S., Albornoz, N., Bahamondes, V., Quest, A.F.G., et al. (2018). Impaired IRE1 $\alpha$ /XBP-1 pathway associated to DNA methylation might contribute to salivary gland dysfunction in Sjögren's syndrome patients. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *57*, 1021–1032.

Sérandour, A.A., Avner, S., Oger, F., Bizot, M., Percevault, F., Lucchetti-Miganeh, C., Paliarne, G., Gheeraert, C., Barloy-Hubler, F., Péron, C.L., et al. (2012). Dynamic hydroxymethylation of deoxyribonucleic acid marks differentiation-associated enhancers. *Nucleic Acids Res.* *40*, 8255–8265.

Shearstone, J.R., Pop, R., Bock, C., Boyle, P., Meissner, A., and Socolovsky, M. (2011). Global DNA demethylation during mouse erythropoiesis in vivo. *Science* *334*, 799–802.

Shen, H., and Laird, P.W. (2013). Interplay between the Cancer Genome and Epigenome. *Cell* *153*, 38–55.

Shen, L., Wu, H., Diep, D., Yamaguchi, S., D'Alessio, A.C., Fung, A., Zhang, K., and Zhang, Y. (2013). Genome-wide analysis reveals TET- and TDG-dependent 5-methylcytosine oxidation dynamics. *Cell* *153*, 692–706.

Shiboski, S.C., Shiboski, C.H., Criswell, L.A., Baer, A.N., Challacombe, S., Lanfranchi, H., Schiødt, M., Umehara, H., Vivino, F., Zhao, Y., et al. (2012). American College of Rheumatology classification criteria for Sjögren's syndrome: a data-driven, expert consensus approach in the Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance cohort. *Arthritis Care Res.* *64*, 475–487.

Shimizu, S., Kurashige, Y., Nishimura, M., Yamazaki, M., Sato, J., Saitoh, M., Selimovic, D., and Abiko, Y. Involvement of toll-like receptors in autoimmune sialoadenitis of the non-obese diabetic mouse. *J. Oral Pathol. Med.* *41*, 517–523.

Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* *284*, 1835–1837.

- Sisto, M., Lisi, S., Lofrumento, D.D., Ingravallo, G., Maiorano, E., and D'Amore, M. (2011). A failure of TNFAIP3 negative regulation maintains sustained NF- $\kappa$ B activation in Sjögren's syndrome. *Histochem. Cell Biol.* *135*, 615–625.
- Smallwood, M.J., Nissim, A., Knight, A.R., Whiteman, M., Haigh, R., and Winyard, P.G. (2018). Oxidative stress in autoimmune rheumatic diseases. *Free Radic. Biol. Med.*
- Smith, Z.D., and Meissner, A. (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* *14*, 204–220.
- Snell, R.S., and Garrett, J.R. (1958). The effect of postganglionic sympathectomy on the structure of the submandibular and major sublingual salivary glands of the rat. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. Vienna Austria* *1948* *48*, 639–652.
- Song, C.-X., Szulwach, K.E., Fu, Y., Dai, Q., Yi, C., Li, X., Li, Y., Chen, C.-H., Zhang, W., Jian, X., et al. (2011). Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat. Biotechnol.* *29*, 68–72.
- Song, C.-X., Szulwach, K.E., Dai, Q., Fu, Y., Mao, S.-Q., Lin, L., Street, C., Li, Y., Poidevin, M., Wu, H., et al. (2013). Genome-wide profiling of 5-formylcytosine reveals its roles in epigenetic priming. *Cell* *153*, 678–691.
- Sonnenberg, G.F., Nair, M.G., Kirn, T.J., Zaph, C., Fouser, L.A., and Artis, D. (2010). Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *J. Exp. Med.* *207*, 1293–1305.
- Soto-Rojas, A.E., and Kraus, A. (2002). The Oral Side of Sjögren Syndrome. *Diagnosis and Treatment. A Review. Arch. Med. Res.* *33*, 95–106.
- Spachidou, M.P., Bourazopoulou, E., Maratheftis, C.I., Kapsogeorgou, E.K., Moutsopoulos, H.M., Tzioufas, A.G., and Manoussakis, M.N. (2007). 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*, 497–503.
- Spruijt, C.G., Gnerlich, F., Smits, A.H., Pfaffeneder, T., Jansen, P.W.T.C., Bauer, C., Münzel, M., Wagner, M., Müller, M., Khan, F., et al. (2013). Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell* *152*, 1146–1159.
- Stadler, M.B., Murr, R., Burger, L., Ivanek, R., Lienert, F., Schöler, A., van Nimwegen, E., Wirbelauer, C., Oakeley, E.J., Gaidatzis, D., et al. (2011). DNA-binding factors shape the mouse methylome at distal regulatory regions. *Nature* *480*, 490–495.
- Stroud, H., Feng, S., Morey Kinney, S., Pradhan, S., and Jacobsen, S.E. (2011). 5-Hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells. *Genome Biol.* *12*, R54.
- Sun, M., Song, C.-X., Huang, H., Frankenberger, C.A., Sankarasharma, D., Gomes, S., Chen, P., Chen, J., Chada, K.K., He, C., et al. (2013). HMGA2/TET1/HOXA9 signaling pathway regulates breast cancer growth and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 9920–9925.

Surani, M.A.H., Barton, S.C., and Norris, M.L. (1984). Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308, 548–550.

Suzuki, M.M., and Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat. Rev. Genet.* 9, 465–476.

Szulwach, K.E., Li, X., Li, Y., Song, C.-X., Wu, H., Dai, Q., Irier, H., Upadhyay, A.K., Gearing, M., Levey, A.I., et al. (2011a). 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat. Neurosci.* 14, 1607–1616.

Szulwach, K.E., Li, X., Li, Y., Song, C.-X., Han, J.W., Kim, S., Namburi, S., Hermetz, K., Kim, J.J., Rudd, M.K., et al. (2011b). Integrating 5-hydroxymethylcytosine into the epigenomic landscape of human embryonic stem cells. *PLoS Genet.* 7, e1002154.

## T

Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., et al. (2009). Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science* 324, 930–935.

Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335–376.

Talens, R.P., Christensen, K., Putter, H., Willemsen, G., Christiansen, L., Kremer, D., Suchiman, H.E.D., Slagboom, P.E., Boomsma, D.I., and Heijmans, B.T. (2012). Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Aging Cell* 11, 694–703.

Tan, L., Xiong, L., Xu, W., Wu, F., Huang, N., Xu, Y., Kong, L., Zheng, L., Schwartz, L., Shi, Y., et al. (2013). Genome-wide comparison of DNA hydroxymethylation in mouse embryonic stem cells and neural progenitor cells by a new comparative hMeDIP-seq method. *Nucleic Acids Res.* 41, e84.

Tandon, M., Perez, P., Burbelo, P.D., Calkins, C., and Alevizos, I. (2017). Laser microdissection coupled with RNA-seq reveal cell-type and disease-specific markers in the salivary gland of Sjögren's syndrome patients. *Clin. Exp. Rheumatol.* 35, 777–785.

Teschendorff, A.E., West, J., and Beck, S. (2013). Age-associated epigenetic drift: implications, and a case of epigenetic thrift? *Hum. Mol. Genet.* 22, R7–R15.

Thabet, Y., Le Dantec, C., Ghedira, I., Devauchelle, V., Cornec, D., Pers, J.-O., and Renaudineau, Y. (2013). Epigenetic dysregulation in salivary glands from patients with primary Sjögren's syndrome may be ascribed to infiltrating B cells. *J. Autoimmun.* 41, 175–181.

Tincani, A., Andreoli, L., Cavazzana, I., Doria, A., Favero, M., Fenini, M.-G., Franceschini, F., Lojcono, A., Nascimbeni, G., Santoro, A., et al. (2013). Novel aspects of Sjögren's syndrome in 2012. *BMC Med.* 11, 93.

Tsagaratou, A., Äijö, T., Lio, C.-W.J., Yue, X., Huang, Y., Jacobsen, S.E., Lähdesmäki, H., and Rao, A. (2014). Dissecting the dynamic changes of 5-hydroxymethylcytosine in T-cell development and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E3306-3315.

Tugnet, N., Rylance, P., Roden, D., Trela, M., and Nelson, P. (2013). Human Endogenous Retroviruses (HERVs) and Autoimmune Rheumatic Disease: Is There a Link? *Open Rheumatol. J.* *7*, 13–21.

Tzioufas, A.G., Tsonis, J., and Moutsopoulos, H.M. (2008). Neuroendocrine dysfunction in Sjögren's syndrome. *Neuroimmunomodulation* *15*, 37–45.

Tzioufas, A.G., Kapsogeorgou, E.K., and Moutsopoulos, H.M. (2012). Pathogenesis of Sjögren's syndrome: What we know and what we should learn. *J. Autoimmun.* *39*, 4–8.

## U

Ukai, H., Ishii-Oba, H., Ukai-Tadenuma, M., Ogiu, T., and Tsuji, H. (2003). Formation of an active form of the interleukin-2/15 receptor  $\beta$ -chain by insertion of the intracisternal A particle in a radiation-induced mouse thymic lymphoma and its role in tumorigenesis. *Mol. Carcinog.* *37*, 110–119.

Ulrey, C.L., Liu, L., Andrews, L.G., and Tollefsbol, T.O. (2005). The impact of metabolism on DNA methylation. *Hum. Mol. Genet.* *14 Spec No 1*, R139-147.

## V

Valinluck, V., and Sowers, L.C. (2007). Endogenous Cytosine Damage Products Alter the Site Selectivity of Human DNA Maintenance Methyltransferase DNMT1. *Cancer Res.* *67*, 946–950.

Varin, M.-M., Guerrier, T., Devauchelle-Pensec, V., Jamin, C., Youinou, P., and Pers, J.-O. (2012). In Sjögren's syndrome, B lymphocytes induce epithelial cells of salivary glands into apoptosis through protein kinase C delta activation. *Autoimmun. Rev.* *11*, 252–258.

Vijg, J., and Dollé, M.E.T. (2007). Genome instability: cancer or aging? *Mech. Ageing Dev.* *128*, 466–468.

Vitali, C., Bombardieri, S., Jonsson, R., Moutsopoulos, H.M., Alexander, E.L., Carsons, S.E., Daniels, T.E., Fox, P.C., Fox, R.I., Kassan, S.S., et al. (2002). Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann. Rheum. Dis.* *61*, 554–558.

Vogelsang, P., Brun, J.G., Oijordsbakken, G., Skarstein, K., Jonsson, R., and Appel, S. (2010). 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*, 1235–1238.



Wahl, S.M., Hunt, D.A., Wong, H.L., Dougherty, S., McCartney-Francis, N., Wahl, L.M., Ellingsworth, L., Schmidt, J.A., Hall, G., and Roberts, A.B. (1988). Transforming growth factor-beta is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *140*, 3026–3032.

Walsh, C.P., Chaillet, J.R., and Bestor, T.H. (1998). Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat. Genet.* *20*, 116–117.

Walters, M.T., Rubin, C.E., Keightley, S.J., Ward, C.D., and Cawley, M.I. (1986). A double-blind, cross-over, study of oral N-acetylcysteine in Sjögren's syndrome. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.* *61*, 253–258.

Wang, L., Zhang, J., Duan, J., Gao, X., Zhu, W., Lu, X., Yang, L., Zhang, J., Li, G., Ci, W., et al. (2014). Programming and inheritance of parental DNA methylomes in mammals. *Cell* *157*, 979–991.

Wang, R.Y.-H., Kuo, K.C., Gehrke, C.W., Huang, L.-H., and Ehrlich, M. (1982). Heat- and alkali-induced deamination of 5-methylcytosine and cytosine residues in DNA. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* *697*, 371–377.

Wang, Y., Yu, X., Song, H., Feng, D., Jiang, Y., Wu, S., and Geng, J. (2018a). The STAT-ROS cycle extends IFN-induced cancer cell apoptosis. *Int. J. Oncol.* *52*, 305–313.

Wang, Y., Wang, H., Yao, H., Li, C., Fang, J.-Y., and Xu, J. (2018b). Regulation of PD-L1: Emerging Routes for Targeting Tumor Immune Evasion. *Front. Pharmacol.* *9*.

Wang, Z.Y., Morinobu, A., Kanagawa, S., and Kumagai, S. (2001). Polymorphisms of the mannose binding lectin gene in patients with Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* *60*, 483–486.

Wangpaichitr, M., Kandemir, H., Li, Y., Wu, C., Nguyen, D., Feun, L., Kuo, M., and Savaraj, N. (2017). Relationship of Metabolic Alterations and PD-L1 Expression in Cisplatin Resistant Lung Cancer. *Cell Dev. Biol.* *6*.

Wells, H., and Peronace, A.A. (1967). Functional hypertrophy and atrophy of the salivary glands of rats. *Am. J. Physiol.* *212*, 247–251.

Wen, L., and Tang, F. (2014). Genomic distribution and possible functions of DNA hydroxymethylation in the brain. *Genomics* *104*, 341–346.

van der Wijst, M.G.P., Venkiteswaran, M., Chen, H., Xu, G.-L., Plösch, T., and Rots, M.G. (2015). Local chromatin microenvironment determines DNMT activity: from DNA methyltransferase to DNA demethylase or DNA dehydroxymethylase. *Epigenetics* *10*, 671–676.

Wildenberg, M.E., van Helden-Meeuwsen, C.G., van de Merwe, J.P., Drexhage, H.A., and Versnel, M.A. (2008). Systemic increase in type I interferon activity in Sjögren's syndrome: a putative role for plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *38*, 2024–2033.

Wildenberg, M.E., Welzen-Coppens, J.M.C., van Helden-Meeuwsen, C.G., Bootsma, H., Vissink, A., van Rooijen, N., van de Merwe, J.P., Drexhage, H.A., and Versnel, M.A. (2009). Increased frequency of CD16+ monocytes and the presence of activated dendritic cells in salivary glands in primary Sjögren syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 68, 420–426.

Williams, A.E.G., Choi, K., Chan, A.L., Lee, Y.J., Reeves, W.H., Bubb, M.R., Stewart, C.M., and Cha, S. (2016). Sjögren's syndrome-associated microRNAs in CD14+ monocytes unveils targeted TGF $\beta$  signaling. *Arthritis Res. Ther.* 18.

Williams, K., Christensen, J., and Helin, K. (2011). DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO Rep.* 13, 28–35.

Winrow, V.R., Winyard, P.G., Morris, C.J., and Blake, D.R. (1993). Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Br. Med. Bull.* 49, 506–522.

Winyard, P.G., Moody, C.J., and Jacob, C. (2005). Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends Biochem. Sci.* 30, 453–461.

Wolffe, A.P., and Guschin, D. (2000). Review: Chromatin Structural Features and Targets That Regulate Transcription. *J. Struct. Biol.* 129, 102–122.

Wong, C.C.Y., Caspi, A., Williams, B., Craig, I.W., Houts, R., Ambler, A., Moffitt, T.E., and Mill, J. (2010). A longitudinal study of epigenetic variation in twins. *Epigenetics* 5, 516–526.

Wossidlo, M., Nakamura, T., Lepikhov, K., Marques, C.J., Zakhartchenko, V., Boiani, M., Arand, J., Nakano, T., Reik, W., and Walter, J. (2011). 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat. Commun.* 2, 241.

Wu, Q., and Ni, X. (2015). ROS-mediated DNA methylation pattern alterations in carcinogenesis. *Curr. Drug Targets* 16, 13–19.

Wu, A.J., Chen, Z.J., Kan, E.C., and Baum, B.J. (1997). Interferon- $\gamma$ -induced JAK2 and STAT1 signalling in a human salivary gland cell line. *J. Cell. Physiol.* 173, 110–114.

Wu, H., D'Alessio, A.C., Ito, S., Wang, Z., Cui, K., Zhao, K., Sun, Y.E., and Zhang, Y. (2011). Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Genes Dev.* 25, 679–684.

Wu, H., Wu, X., Shen, L., and Zhang, Y. (2014). Single-base resolution analysis of active DNA demethylation using methylase-assisted bisulfite sequencing. *Nat. Biotechnol.* 32, 1231–1240.

Wyatt, G.R., and Cohen, S.S. (1953). The bases of the nucleic acids of some bacterial and animal viruses: the occurrence of 5-hydroxymethylcytosine. *Biochem. J.* 55, 774–782.

X

Xia, D., Deng, D., and Wang, S. (2003). Alterations of nitrate and nitrite content in saliva, serum, and urine in patients with salivary dysfunction. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* 32, 95–99.

Xia, J., Han, L., and Zhao, Z. (2012). Investigating the relationship of DNA methylation with mutation rate and allele frequency in the human genome. *BMC Genomics* 13, S7.

Xie, Q., Bai, Q., Zou, L.-Y., Zhang, Q.-Y., Zhou, Y., Chang, H., Yi, L., Zhu, J.-D., and Mi, M.-T. (2014). Genistein inhibits DNA methylation and increases expression of tumor suppressor genes in human breast cancer cells. *Genes. Chromosomes Cancer* 53, 422–431.

Xie, Q.W., Kashiwabara, Y., and Nathan, C. (1994). Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 269, 4705–4708.

## Y

Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F., and Wang, H. (2014). Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark. Res.* 2, 1.

Yearim, A., Gelfman, S., Shayevitch, R., Melcer, S., Glaiach, O., Mallm, J.-P., Nissim-Rafinia, M., Cohen, A.-H.S., Rippe, K., Meshorer, E., et al. (2015). HP1 Is Involved in Regulating the Global Impact of DNA Methylation on Alternative Splicing. *Cell Rep.* 10, 1122–1134.

Yin, R., Mao, S.-Q., Zhao, B., Chong, Z., Yang, Y., Zhao, C., Zhang, D., Huang, H., Gao, J., Li, Z., et al. (2013). Ascorbic acid enhances Tet-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 10396–10403.

Yoder, J.A., and Bestor, T.H. (1998). A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. *Hum. Mol. Genet.* 7, 279–284.

Yoder, J.A., Walsh, C.P., and Bestor, T.H. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet. TIG* 13, 335–340.

Yoshimoto, K., Tanaka, M., Kojima, M., Setoyama, Y., Kameda, H., Suzuki, K., Tsuzaka, K., Ogawa, Y., Tsubota, K., Abe, T., et al. (2011). Regulatory mechanisms for the production of BAFF and IL-6 are impaired in monocytes of patients of primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Res. Ther.* 13, R170.

Youinou, P., Saraux, A., and Pers, J.-O. (2012). B-lymphocytes govern the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13, 2071–2077.

Youn, J., Hwang, S.H., Cho, C.S., Min, J.K., Kim, W.U., Park, S.H., and Kim, H.Y. (2000). Association of the interleukin-4 receptor alpha variant Q576R with Th1/Th2 imbalance in connective tissue disease. *Immunogenetics* 51, 743–746.

Yu, C., Zhang, Y.-L., Pan, W.-W., Li, X.-M., Wang, Z.-W., Ge, Z.-J., Zhou, J.-J., Cang, Y., Tong, C., Sun, Q.-Y., et al. (2013). CRL4 complex regulates mammalian oocyte survival and reprogramming by activation of TET proteins. *Science* 342, 1518–1521.

Yu, M., Hon, G.C., Szulwach, K.E., Song, C.-X., Zhang, L., Kim, A., Li, X., Dai, Q., Shen, Y., Park, B., et al. (2012). Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome. *Cell* 149, 1368–1380.

Zampieri, M., Passananti, C., Calabrese, R., Perilli, M., Corbi, N., De Cave, F., Guastafierro, T., Bacalini, M.G., Reale, A., Amicosante, G., et al. (2009). Parp1 localizes within the Dnmt1 promoter and protects its unmethylated state by its enzymatic activity. *PloS One* 4, e4717.

Zampieri, M., Ciccarone, F., Calabrese, R., Franceschi, C., Bürkle, A., and Caiafa, P. (2015). Reconfiguration of DNA methylation in aging. *Mech. Ageing Dev.* 151, 60–70.

Zeng, M., Szymczak, M., Ahuja, M., Zheng, C., Yin, H., Swaim, W., Chiorini, J.A., Bridges, R.J., and Muallem, S. (2017). Correction of Ductal CFTR Activity Rescues Acinar Cell and Pancreatic and Salivary Gland Functions in Mouse Models of Autoimmune Disease. *Gastroenterology* 153, 1148–1159.

Zhang, Q., Wang, H.Y., Woetmann, A., Raghunath, P.N., Odum, N., and Wasik, M.A. (2006). STAT3 induces transcription of the DNA methyltransferase 1 gene (DNMT1) in malignant T lymphocytes. *Blood* 108, 1058–1064.

Zhao, Z., and Jiang, C. (2007). Methylation-Dependent Transition Rates Are Dependent on Local Sequence Lengths and Genomic Regions. *Mol. Biol. Evol.* 24, 23–25.

Zheng, L., Zhang, Z., Yu, C., Tu, L., Zhong, L., and Yang, C. (2009). Association between IFN- $\alpha$  and primary Sjogren's syndrome. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 107, e12-18.

Zhou, D., and McNamara, N.A. (2014). Macrophages: important players in primary Sjögren's syndrome? *Expert Rev. Clin. Immunol.* 10, 513–520.

Zhou, Y., Meraner, P., Kwon, H.T., Machnes, D., Oh-hora, M., Zimmer, J., Huang, Y., Stura, A., Rao, A., and Hogan, P.G. (2010). STIM1 gates the store-operated calcium channel ORAI1 in vitro. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 112–116.

Zhou, Y., Srinivasan, P., Razavi, S., Seymour, S., Meraner, P., Gudlur, A., Stathopoulos, P.B., Ikura, M., Rao, A., and Hogan, P.G. (2013). Initial activation of STIM1, the regulator of store-operated calcium entry. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 973–981.

Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T., and Henikoff, S. (2008). Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature* 456, 125–129.

**Titre :** Altérations du méthylome au cours du Syndrome de Gougerot Sjögren

**Mots clés :** Syndrome de Gougerot-Sjögren, cellules épithéliales, glande salivaire, méthylation de l'ADN, interféron

**Résumé :** Le syndrome sec de Gougerot Sjögren (SGS) est une maladie auto-immune chronique qui présente des dommages progressifs et irréversibles des glandes exocrines lacrymales et salivaires. Cette pathologie affecte entre 0.1 et 3 % de la population et est plus commune chez les femmes avec un ratio de 9 femmes pour 1 homme. Dans la glande salivaire, une infiltration lymphocytaire est observée et est associée avec la destruction de l'épithélium sécrétoire, qui joue un rôle central dans l'initiation et le développement du SGS. Le processus physiopathologique est loin d'être compris et semble dépendant de phénomènes épigénétiques. En effet, des perturbations importantes de la méthylation de l'ADN sont observées dans les cellules épithéliales en lien avec le niveau d'infiltration lymphocytaire des glandes salivaires.

L'objectif de ce travail est de mieux comprendre les changements épigénétiques au cours du SGS et en particulier les défauts de méthylation/déméthylation de l'ADN observés dans les Cellules Epithéliales de Glandes Salivaires (SGEC) et leurs rôles dans le développement de la pathologie.

Dans ce but, Une étude globale de la méthylation de l'ADN a été réalisée après culture cellulaire destinée à isoler les SGEC de patients SGS. La puce « human methylation 450k » d'Illumina utilisée couvre plus de 485 000 sites CpG du génome. Des analyses bioinformatiques nous ont permis d'obtenir un panel de gènes différenciellement méthylés. Nous avons ainsi mis en évidence l'importance de la voie calcique (déméthylée, connue pour avoir un impact sur la salivation) et de la voie WNT (hyperméthylée). De plus nous avons pu identifier une régulation interféron et montrer l'importance d'un changement du type d'interféron (I à II) lors de l'évolution vers un lymphome de type MALT. En outre, nous montrons qu'il existe une inter-relation forte entre les processus épigénétiques et les facteurs génétiques associés au SGS. Enfin la dernière partie de ce travail met en lumière l'implication d'un environnement inflammatoire dans le contrôle du processus de méthylation/déméthylation de l'ADN dans les cellules épithéliales.

Ainsi, les altérations du méthylome des SGECs pourraient contribuer à la pathophysiologie du SGS et à son évolution en un lymphome du MALT, ceci en lien avec son environnement inflammatoire.

**Title :** Methylome alterations during Sjögren's syndrome.

**Keywords :** Sjögren Syndrome, epithelial cells, salivary gland, DNA methylation, interferon

**Abstract :** Sjögren Syndrome (SjS) is a chronic autoimmune disease characterized by a progressive and irreversible damage of exocrine glands, particularly salivary and lacrimal glands. This pathology affects between 0.1 and 3% of the population and is more common in women with a ratio of 9 women for 1 man. In salivary glands, a lymphocytic infiltration is observed and associated with the destruction of the secretory epithelium, which plays a central role in initiation and development of the SjS. The process remains incompletely clarified and contains a strong epigenetic component. Indeed, important disturbances of the process of DNA methylation are observed in epithelial cells and they are linked with the level of lymphocyte infiltration in salivary glands.

The objective of this work is to better understand epigenetic changes during the SjS and in particular the DNA methylation/demethylation defects observed in Salivary Gland Epithelial Cells Epithelial (SGEC) and their roles in the pathology development.

For that purpose, a global study of DNA methylation was done on 12 patients SGECs with the Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina). The 450k HM allows to cover more than 485,000 CpG sites on the whole genome. Bioinformatic analysis allowed us to obtain genes panels which are differentially methylated during this pathological phenomenon. In an interesting way, we identified the potential involvement of the calcic (hypomethylated, known to impact salivation) and WNT pathways (hypermethylated). Besides we were able to identify interferon regulation and the shift from interferon type I to type II with mucosa associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma evolution. Furthermore, the simultaneous genomic-epigenomic analysis revealed significant associations between SjS-associated genetic risk factors and epigenetic modifications. Finally, the last part of this work highlights inflammatory environment involvement to control DNA methylation/demethylation in salivary gland epithelial cells.

Altogether, alterations of DNA methylation in SGEC may contribute to SjS pathophysiology and evolution to MALT and this in link with the inflammatory environment.