Rôle du TLR9 dans la maturation des lymphocytes B : implication dans la physiologie du syndrome de Gougerot-Sjögren

Thomas Guerrier

▶ **To cite this version:**

Thomas Guerrier. Rôle du TLR9 dans la maturation des lymphocytes B : implication dans la physiologie du syndrome de Gougerot-Sjögren. Médecine humaine et pathologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2012. Français. NNT : 2012BRES0044 . tel-00841375

HAL Id: tel-00841375

https://theses.hal.science/tel-00841375

Submitted on 4 Jul 2013

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.

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE
sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE
Mention : Biologie-Santé
École Doctorale SICMA

présentée par
Thomas Guerrier
Préparée au Laboratoire
Immunologie-Pathologie EA2216

Rôle du TLR9 dans la maturation des lymphocytes B. Implication dans la physiopathologie du syndrome de Gougerot-Sjögren.

Thèse soutenue le 21 juin 2012
devant le jury composé de :

Dominique WACHSMANN
PU, Université de Strasbourg / *Présidente*

Lionel PRIN
PU-PH, Université de Lille / *Rapporteur*

Ahmad FAILI
PU, Université de Rennes 1 / *Rapporteur*

Jacques-Olivier PERS
PU-PH, Université de Bretagne-Occidentale / *Examinateur*

Christophe JAMIN
MCU-PH, Université de Bretagne-Occidentale / *Directeur de thèse*

Remerciements

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Youinou pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, sa passion communicative et le soutien permanent qu'il apporte à ses étudiants.

Mes remerciements vont également à Christophe Jamin et Maryvonne Dueymes qui m'ont encadré, pour leur disponibilité et pour m'avoir aidé à toujours voir le bon côté des choses, mais aussi à Jacques-Olivier Pers et aux autres chercheurs du laboratoire : Yves Renaudineau, Ben et Sophie Hillion.

Je remercie les doctorants que j'ai pu côtoyer lors de cette thèse, tout particulièrement : Christelle, Jean-Eric, Laëtitia et Soizic pour leurs conseils, leur aide, tous ces moments passés ensemble.

Cette thèse n'aurait pas été la même sans les techniciennes : Annie, Nelly, Christine, Sylvie, ni sans les secrétaires : Simone et Geneviève. Je les remercie pour leur gentillesse et leur bonne humeur.

En outre, j'adresse mes remerciements à Madame Borgnis-Desbordes, Virginie Cogulet et l'ensemble du personnel de la pharmacie pour leur gentillesse et pour avoir facilité ma spécialisation en Immunologie.

Merci à Dominique Wachsmann, Lionel Prin et Ahmad Faili pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je tiens, par ailleurs, à exprimer ma reconnaissance à Jean Giaimis, Jacques Clot, Pierre Corbeau, Christian Hamel et Stéphane Delbecq pour m'avoir donné le goût de la recherche et de l'Immunologie.

Pour finir, je remercie ma famille pour leurs encouragements, ma mère, Robert, mon frère Sylvain. Enfin, une pensée à mon père.

Rôle du TLR9 dans la maturation des lymphocytes B. Implication dans la physiopathologie du syndrome de Gougerot-Sjögren.

Résumé : Le syndrome de Gougerot-Sjögren (SGS) est une maladie auto-immune systémique. Il se caractérise principalement par une infiltration lymphocytaire des glandes salivaires (GS) et lacrymales responsable d'une sécheresse buccale et oculaire. Par ailleurs, les Toll-like récepteurs (TLR) endosomaux – notamment le TLR9 qui reconnait l'acide désoxyribonucléique (ADN) microbien mais aussi, dans certaines conditions, l'ADN du soi – s'avèrent être importants pour l'activation des lymphocytes B (LB) lors du lupus, une maladie proche du SGS. Nos travaux montrent que la stimulation du TLR9 chez les LB transitionnels, des LB immatures fraichement émigrés de la moelle osseuse, favorise leur différenciation selon la voie des LB de la zone marginale, et entraine la sécrétion d'auto-anticorps. L'analyse des LB infiltrant les GS lors du SGS révèle que ce phénomène pourrait être impliqué dans la physiopathologie de cette maladie. De plus, nous montrons que LL37, un peptide produit dans les GS, pourrait participer à l'activation du TLR9 des LB transitionnels. Enfin, nous avons mis en évidence une inattendue expression du TLR9 à la surface des LB. Si l'étude des conséquences fonctionnelles de cette localisation reste à poursuivre, elle semble avoir un effet négatif sur la stimulation du TLR9 endosomal. En conclusion, ces résultats suggèrent que le TLR9 puisse être une nouvelle cible thérapeutique lors du SGS.

Mots clefs : TLR9, lymphocyte B, auto-immunité, syndrome de Gougerot-Sjögren

Impact of TLR9 activation on B cell differentiation. Consequences for Sjögren's syndrome pathophysiology.

Abstract: Primary Sjögren's syndrome (pSS) is a systemic autoimmune disease. It is mainly characterized by B cell and T cell infiltration in lacrimal and salivary glands (SG) responsible for eye and mouth dryness. In addition, endosomal Toll-like receptors (TLR) – especially TLR9 which recognizes microbial deoxyribonucleic acid (DNA) and also, under certain conditions, self DNA – are important for B cell activation during lupus, a disease close to pSS. Our work shows that TLR9 stimulation on transitional B cells, immature B cells freshly emigrated from bone marrow, promotes their differentiation into marginal zone B cell pathway and drives to auto-antibodies production. Analysis of infiltrating B cells in pSS SG reveals that this phenomenon might be involved in the pathogenesis of the disease. Furthermore, we show that LL37, a peptide produced in the SG, could participate in TLR9 activation of transitional B cells. Finally, we demonstrated an unexpected TLR9 expression on B cell surface. If the functional consequences of this localization remain to be more precisely evaluated, it seems that cell surface TLR9 has a negative effect on endosomal TLR9 stimulation. In conclusion, these results suggest TLR9 could be a new therapeutic target in case of pSS.

Key words: TLR9, B-cell, autoimmunity, Sjögren's syndrome

EA2216 : Immunologie-Pathologie
CHU Morvan BP 824
5 Av. Foch
29609 BREST Cedex

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES 4
TABLE DES ILLUSTRATIONS 10
ABREVIATIONS 14
INTRODUCTION 19
I. Les lymphocytes B 20
1. Ontogenèse des lymphocytes B 20
1.1. Lymphocytes B transitionnels 21
1.2. Lymphocytes B folliculaires 22
1.3. Lymphocytes B de la zone marginale 25
1.4. Lymphocytes B1 26
2. Les facteurs de transcription régulant l'ontogenèse des LB 26
3. Différentes fonctions des lymphocytes B 28
3.1. Sécrétion d'Ac : oui, mais pas seulement 28
3.2. Présentation d'antigènes 28
3.3. Sécrétion de cytokines et polarisation de la réponse 29
3.4. Lymphocytes B régulateurs 30
3.5. Lymphocytes B et genèse du tissu lymphoïde secondaire 30
3.6. Importance dans l'auto-immunité et applications thérapeutiques 30
3.7. Populations lymphocytaires et auto-immunité 31
II. Les Toll-like récepteurs 33
1. Présentation historique 33
2. Présentation structurale 33
3. Présentation fonctionnelle et ligands 34
3.1. Ligands de nature protéique 36
3.2. Ligands de nature lipidique 36
3.3. Ligands de nature glucidique 36
3.4. Ligands de nature nucléotidique 36
3.5. Ligands de nature synthétique 37
4. Voies de signalisation 39
4.1. Voies générales 39
4.2. Voies de signalisation du TLR9 41
5. Expression cellulaire et fonctions biologiques 42

5.1. Activation des cellules dendritiques 43
5.2. Activation des autres cellules de l'immunité innée 43
5.3. Activation des cellules de l'immunité adaptative 43
5.4. Activation des cellules non immunitaires 44
6. TLR et immunopathologie 44
6.1. Déficiences dans la voie de signalisation des TLR 44
6.2. Activation excessive ou inappropriée des TLR 47
7. Applications thérapeutiques 48
7.1. Agonistes 48
7.1.1. Infectiologie 48
7.1.2. Cancérologie 49
7.1.3. Allergie et asthme 49
7.2. Antagonistes 49
III. Les Toll-like récepteurs chez les lymphocytes B 52
1. Expression des TLR et sensibilité des différentes populations de LB aux ligands des TLR 52
2. Coopération TLR-BCR et autres coopérations 52
3. Fonctions des TLR chez les LB 54
3.1. Induction de réponses humorales efficaces 54
3.1.1. Réponses humorales T-dépendantes 54
3.1.2. Réponses humorales T-indépendantes 55
3.1.3. Induction et orientation de la commutation isotypique 56
3.2. Présentation d'Ag et orientation Th1 57
4. TLR, LB et maladies auto-immunes systémiques 58
4.1. *In vitro* : rôle des TLR dans la stimulation des LB auto-réactifs 58
4.2. *In vivo* : rôle des TLR dans la production d'auto-Ac 59
4.3. Conséquences fonctionnelles dans le lupus 60
4.4. Boucles d'amplification 61
4.5. Rôle des TLR dans la mise en place de la tolérance des LB 63
IV. Le syndrome de Gougerot-Sjögren 64
1. Définition et généralités 64
2. Physiopathologie 67
2.1. Introduction 67

2.2. L'infiltrat glandulaire 68
2.3. Les lymphocytes B dans le syndrome de Gougerot-Sjögren 69
2.3.1. Les lymphocytes B infiltrant les glandes salivaires 69
2.3.2. Les rôles pathogéniques des LB 71
2.4. Les TLR dans le syndrome de Gougerot-Sjögren 71
2.4.1. Introduction 71
2.4.2. Expression des TLR et des protéines impliquées dans leurs voies de signalisation par les cellules immunitaires 72
2.4.3. Expression fonctionnelle des TLR et des protéines impliquées dans leurs voies de signalisation par les cellules épithéliales des glandes salivaires 72
2.4.4. Relations entre BAFF et les TLR lors du SGS 73
OBJECTIFS 76
MATERIELS ET METHODES 79
I. Lignée cellulaire 80
II. Sources de cellules primaires, purifications cellulaires 80
1. Les LB d'amygdales 80
2. Les LB du sang périphérique de témoins sains 81
3. Les LB du sang de cordon 81
4. Tri cellulaire 81
III. Cultures cellulaires 82
1. Les milieux de culture 82
2. Cultures cellulaires et stimulations 82
IV. Cytofluorimétrie 83
1. Etude de l'expression de protéines 83
2. Etude de la prolifération 84
V. Analyse quantitative de l'expression d'ARNm 85
1. Extraction d'ARN 85
2. Retrotranscription-polymerase chain reaction quantitative (RT-PCRq) 86
VI. Dosage des immunoglobulines 87
VII. Détection des auto-Ac anti-nucléaires 88
VIII. Dosage de l'IL-6 88
IX. Immunofluorescence et microscopie confocale 88
X. Isolement des radeaux lipidiques 90

XI. Purification des proteines de surface 90
XII. Western-blot 90
XIII. Statistiques 91
RESULTATS 92
I. Expression du TLR9 chez les lymphocytes B infiltrant les glandes salivaires de patients atteints du syndrome de Gougerot-Sjögren 93
1. Introduction 93
1.1. Le phénotype des LB corrèle avec l'expression d'AID 94
1.2. Profil des facteurs de transcription dans les deux types d'infiltrats 97
2. Résultats 99
2.1. Expression du TLR9 au sein des différents infiltrats B 99
2.2. Expression du TLR9 par les LB autoréactifs dans les différents infiltrats B ... 99
II. Rôle du TLR9 dans la différenciation des lymphocytes B transitionnels 101
1. Introduction 101
2. Résultats 102
2.1. Puissante réponse proliférative des LB transitionnels suite à la stimulation du TLR9 102
2.2. Maturation spécifique des LB transitionnels suite à la stimulation du TLR9 105
2.3. Différenciation terminale des LB transitionnels suite à la stimulation du TLR9. 106
2.4. Réponse singulière des LB transitionnels à la stimulation du TLR9 107
III. Implication du peptide LL37 lors du syndrome de Gougerot-Sjögren 109
1. Introduction 109
2. Résultats 110
2.1. Expression du peptide LL37 au sein des glandes salivaires de patients atteints du syndrome de Gougerot-Sjögren 110
2.1.1. Profil d'expression de hCAP18/LL37 dans les glandes salivaires de malades et de témoins 110
2.1.2. Expression de hCAP18/LL37 par les cellules épithéliales et par des cellules CD16+ CD11b+ 111
2.1.3. Expression de hCAP18/LL37 à proximité des deux types d'infiltrats de LB 112

2.1.4. Présence d'agrégats LL37-ADN apoptotique dans les glandes salivaires de patients atteints du syndrome de Gougerot-Sjögren 113
2.2. LL37 permet la détection rapide des CpG-B par les LB transitionnels 114
IV. Expression du TLR9 à la surface des LB 116
1. Introduction 116
2. Résultats 117
2.1. Expression du TLR9 à la surface des LB 117
2.2. Colocalisation avec le BCR 119
2.3. Liaison à son ligand ? 121
2.4. Effets d'un *crosslink* du TLR9 de surface 122
DISCUSSION GENERALE 123
I. TLR9, différenciation des LB et SGS 124
1. Phénotype des LB infiltrant les glandes salivaires lors du syndrome de Gougerot-Sjögren et expression du TLR9 124
2. Rôle du TLR9 dans l'ontogenèse des LB 126
3. Implication du TLR9 lors du SGS 128
II. Implication du peptide LL37 lors du syndrome de Gougerot-Sjögren 133
III. Expression du TLR9 à la surface des LB 136
BIBLIOGRAPHIE 138
ANNEXES 151
Article n°1 : Role of toll-like receptors in primary Sjögren's syndrome with a special emphasis on B-cell maturation within exocrine tissues
Article n°2 : TLR9 drives the development of transitional B cells towards the marginal zone pathway and promotes autoimmunity
Article n°3 : Polarization of B effector cells in Sjögren's syndrome
Article n°4 : In Sjögren's syndrome, B lymphocytes induce epithelial cells of salivary glands into apoptosis through protein kinase C delta activation
Article n°5 : CpG ODN enhances the efficacity of rituximab in non-Hodgkin lymphoma
Article n°6 : TLR9 responses of B cells are repressed by intravenous immunoglobulin through the recruitement of phosphatase

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1 - Ontogenèse des lymphocytes B..... 21
Figure 2 - Le centre germinatif et les lymphocytes B folliculaires..... 24
Figure 3 - Les différents Toll-like récepteurs humains..... 34
Figure 4 - Les différentes classes d'oligodésoxynucléotides possédant des motifs CpG..... 38
Figure 5 - Structures moléculaires des oligodésoxynucléotides..... 39
Figure 6 - Voies de signalisation des Toll-like récepteurs..... 40
Figure 7 - Co-engagement récepteur du lymphocyte B-Toll-like récepteur, activation des lymphocytes B auto-immuns..... 59
Figure 8 - Co-engagement FcγRIIa-Toll-like récepteur, activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes..... 61
Figure 9 - Boucles d'amplification..... 62
Figure 10 - Rôles des TLR et des LB dans la physiopathologie du SGS..... 75
Figure 11 - Exemple d'histogramme de cytométrie obtenu à partir de LB marqués par le CFSE et ayant proliféré..... 85
Figure 12 - Double marquage par immunofluorescence des LB infiltrant les glandes salivaires lors du syndrome de Gougerot-Sjögren..... 94
Figure 13 - Expression de l'ARNm d'AID au sein des deux types d'infiltrats de LB présents dans les glandes salivaires lors du syndrome de Gougerot-Sjögren..... 95
Figure 14 - Agrégats de LB ne ressemblant pas aux centres germinatifs..... 96
Figure 15 - Etude, par RT-PCR quantitative, de l'expression de l'ARNm de facteurs de transcription au sein des deux types d'infiltrats de LB présents dans les glandes salivaires lors du syndrome de Gougerot-Sjögren..... 98
Figure 16 - Analyse de l'expression du TLR9 au sein des deux types d'infiltrats de LB présents dans les glandes salivaires lors du syndrome de Gougerot-Sjögren..... 100
Figure 17 - Phénotypage des LB de sang de cordon..... 103
Figure 18 - Prolifération des LB matures et des LB transitionnels..... 104
Figure 19 - Maturation spécifique des LB transitionnels..... 106
Figure 20 - Différenciation terminale des LB transitionnels et des LB matures..... 107
Figure 21 - Réponse des LB d'amygdales à la stimulation du TLR9..... 108

Figure 22 - Profil d'expression de hCAP18/LL37 dans les glandes salivaires de malades et de témoins. 110
Figure 23 - Au sein des glandes salivaires, hCAP18/LL37 est exprimé par les cellules épithéliales et par des cellules CD16+ CD11b+..... 111
Figure 24 - Expression de hCAP18/LL37 à proximité des deux types d'infiltrats de LB. 112
Figure 25 - Présence d'agrégats LL37-ADN apoptotique dans les glandes salivaires de patients atteints du syndrome de Gougerot-Sjögren. 113
Figure 26 - LL37 permet la détection rapide des CpG-B par les LB du sang de cordon..... 114
Figure 27 - Représentation schématique des résultats de l'équipe de Gregory Barton. 117
Figure 28 - Expression du TLR9 à la surface des LB. 118
Figure 29 - Colocalisation TLR9-BCR dans les radeaux lipidiques à la surface des LB d'amygdales.. 120
Figure 30 - TLR9 de surface et CpG-B..... 121
Figure 31 - Effets d'un *crosslink* du TLR9 de surface sur l'activation des LB d'amygdales. 122
Figure 32 - Analyse de l'expression des TLR3 et 7 au sein des deux types d'infiltrats de LB présents dans les glandes salivaires lors du syndrome de Gougerot-Sjögren. 129
Figure 33 - Expression du facteur de transcription T-bet. 131

TABLEAUX

Tableau 1 - Les Toll-like récepteurs humains et leurs ligands.. 35
Tableau 2 - Expression des Toll-like récepteurs. 42
Tableau 3 - Mortalité des souris déficientes en MyD88 par rapport aux souris sauvages en réponse à différentes infections expérimentales. 46
Tableau 4 - Quelques propriétés des classes et sous-classes d'Ig humaines. 56
Tableau 5 - Critères du groupe de consensus américano-européen pour le diagnostic du syndrome de Gougerot-Sjögren 65
Tableau 6 - Classification de l'infiltration lymphoïde des glandes salivaires accessoires selon Chisholm et Mason. 66
Tableau 7 - Anticorps utilisés en culture. 83
Tableau 8 - Anticorps utilisés en cytométrie. 84
Tableau 9 - Amorces utilisées pour la PCR quantitative. 87
Tableau 10 - Anticorps utilisés en ELISA. 87
Tableau 11 - Anticorps utilisés en immunofluorescence. 89
Tableau 12 - Anticorps utilisés en Western-blot. 91

ABREVIATIONS

AA : Acides Aminés

Ac: Anticorps

ADCC : Antibody Dependent Cell Cytotoxicity

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AECG : American European Consensus Group

Ag: Antigène

AID : activation-induced cytidine deaminase

AMM : autorisation de mise sur le marché

AP-1 : Activator Protein-1

APRIL : A Proliferation Inducing Ligand

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : ARN messager

BAFF : B cell-Activation Factor of the TNF Family

Bcl-6 : B-cell lymphoma-6

BCMA : B Cell Maturation Antigen

BCR : B Cell Receptor

Be : B effecteur

Blimp-1 : B-lymphocyte induced maturation protein-1

BR3 : BAFF Receptor

Btk : Bruton's tyrosine kinase

CD : Cellules Dendritiques

CDF : Cellules Dendritiques Folliculaires

CDm : Cellules Dendritiques myéloïdes

CDp : Cellules Dendritiques plasmacytoïdes

CD40L : CD40 Ligand

CE : Cellules épithéliales

CG : Centre Germinatif

CI : Complexes Immuns

CK18 : cytokératine 18

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

CpG : Cytosine-phosphate-Guanine

CpG-B : oligodésoxynucléotide contenant des motifs CpG non méthylés et appartenant à la classe B

DAMP : Damage-Associated Molecular Pattern

db : double brin

DD : Death Domain : Domaine de mort

EBV : Epstein-Barr virus

ELISA : enzyme-linked immunosorbent Assay

FR: Facteur Rhumatoïde

FT : Facteur de Transcription

GM-CSF : Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor

GS : Glande Salivaire

hCAP18 : human cathelicidin antimicrobial protein 18 KDa

HEL : Hen Egg Lysozyme

HMGB1 : high-mobility group box protein1

HPV : Human Papilloma Virus

HSG : Human Salivary Gland

HSP : Heat-Shock Protein

ICAM-1 : Intercellular Adhesion molecule-1

IFI : ImmunoFluorescence Indirecte

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IκBK :Inhibitor κB Kinase

IL : Interleukine

IRF : Interferon-Regulatory Factor

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

ITIM : Immunoreceptor tyrosine Inhibition Motif

KDa : kilodalton

KO : Knock Out

LB : Lymphocyte B

LB Fo : Lymphocyte B Folliculaire

LBm : Lymphocyte B mature

LB T1 : Lymphocyte B Transitionnel de type 1

LB T2 : Lymphocyte B Transitionnel de type 2

LB T3 : Lymphocyte B Transitionnel de type 3

LDL : Low Density Lipoprotein

LED : Lupus Erythémateux Disséminé

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

LPS : lypopolysaccharide

Leucine Rich Repeat : LRR

LT : Lymphocyte T

LTh : Lymphocyte T helper

MAI : Maladie Auto-Immune

MAP kinase : Mitogen-Activated Protein kinase

MyD88 : Myeloïd Differenciation primary-response protein 88

NEMO : NFκB Essential Modulator

NFAT: Nuclear Factor of Activated T-cells

NFκB : Nuclear Factor κB

NK : natural killer

ODN : oligodésoxynucléotide

OLS : Organe Lymphoïde Secondaire

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern

Pax-5 : Paired box-5

PBS : phosphate buffered saline

PI3K : Phosphoinositide 3 kinase

PKC: Protein Kinase C

PLCγ2 : Phospholipase Cγ2

PNN : Polynucléaire Neutrophile

poly(I:C) : Acide polyinosinique-polycytidylique

PR : Polyarthrite Rhumatoïde

PRR : Pattern Recognition Receptor

PTI : Purpura Thrombopénique Idiopathique

RAGE : receptor for advanced glycation end-products

RE : réticulum endoplasmique

RNP : ribonucleoprotein particle, particule ribonucléoprotéique

RP105 : protéine radioprotectrice de 105kD

SGS: Syndrome de Gougerot-Sjögren

S1P1 : Sphingosin-1-Phosphate Receptor 1

STAT: Signal Transducers and Activator of Transcription

SVF : sérum de veau fœtal

TACI : Transmembrane Activator and CAML Interactor

TAI : thyroïdites auto-immunes

TdT :Désoxynucléotidyl Transférase

TGF-β : Transforming Growth Factor-β

TIR : domaine Toll/IL-1R

TLR : Toll-like receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TRAF: TNF-Receptor Associated Factor

TRIF : TIR-domain-containing adaptor protein inducing interferon-β

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling

VIH : Virus de l'Immuno-déficience Humaine

XBP-1 : X-box binding protein-1

ZM : Zone Marginale

INTRODUCTION

I. Les lymphocytes B

Classiquement, les lymphocytes B (LB) sont présentés comme des cellules mononucléées, présentes dans le sang et les tissus lymphoïdes, qui participent aux réponses immunitaires adaptatives en sécrétant des anticorps (Ac) suite à la rencontre avec leur antigène (Ag) et à leur interaction avec les lymphocytes T (LT) CD4+ auxiliaires. Il s'agirait donc de cellules purement effectrices agissant sous le contrôle du LT CD4+, considéré comme le chef d'orchestre des réactions adaptatives. Cependant, comme nous allons le voir dans ce chapitre, les apports récents de la recherche scientifique ont permis de réévaluer l'importance et les fonctions du LB en général, et tout particulièrement au cours des réactions immunitaires auto-immunes, c'est-à-dire dirigées contre des Ag du soi.

1. Ontogenèse des lymphocytes B

In utero, la lymphopoïèse B débute dans le foie fœtal. Après la naissance, elle prend place dans la moelle osseuse, où, à partir d'une cellule souche lymphoïde, plusieurs stades se distinguent (lymphocyte pro-B, lymphocyte pré-B, LB immature), durant lesquels seront progressivement réarrangés les segments de gènes codant pour la partie variable de l'immunoglobuline (Ig). Ces réarrangements génétiques, dits primaires, permettent d'obtenir des Ig dirigées contre une très grande variété d'Ag. Une fois ces réarrangements terminés (soit au stade du LB immature), l'Ig pourra être exprimée à la membrane plasmique et constituera, avec d'autres protéines associées, le récepteur du lymphocyte B ou B cell receptor (BCR).

C'est au stade du LB immature que s'opère la première étape de contrôle de la tolérance au soi des LB. On parle aussi d'étape de sélection négative. Les LB auto-réactifs pourront y subirent quatre destins distincts :

- **l'édition du BCR** : cela consiste en un réarrangement secondaire des segments de gènes codant pour la région variable de l'Ig afin d'en modifier la spécificité,

- **la délétion clonale** : les LB possédant un BCR auto-réactif de forte affinité sont éliminés par apoptose,
- **l'anergie** : les LB ayant un BCR auto-réactif de faible affinité peuvent être maintenus en vie mais dans un état non activable appelé l'anergie,
- **l'échappement** à ces trois mécanismes de mise en place de la tolérance.

Cette étape de contrôle permet de faire chuter la fréquence des LB auto-immuns de 75% dans la population de LB immatures à 40% parmi les LB émigrant de la moelle osseuse, appelés LB transitionnels (Wardemann *et al.*, 2003).

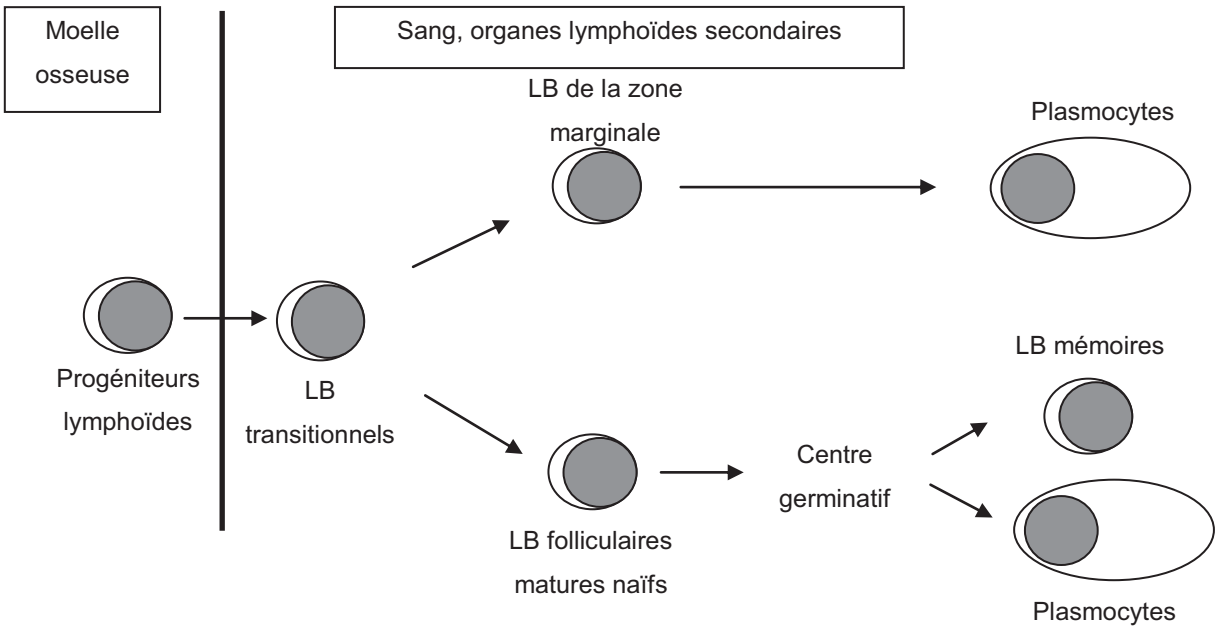

Figure 1 - Ontogenèse des lymphocytes B

1.1. Lymphocytes B transitionnels

Les LB transitionnels sont, par définition, des LB immatures situés en périphérie. C'est chez la souris qu'ils furent d'abord décrits sur les plans phénotypique et fonctionnel. Certains chercheurs distinguent même trois sous-populations : les LB T1, T2 et T3. Les LB de transition ont aussi été mis en évidence chez l'homme. En effet, différentes équipes ont identifié, dans le sang périphérique et tout particulièrement dans le sang de cordon, des populations de LB très proche des LB

transitionnels murins. Le phénotype de ces LB, autrement dit l'expression des marqueurs membranaires de différenciation, est le suivant :

- T1 : $CD24^{+++}$, $CD38^{+++}$, $CD10^{+}$, $CD21^{faible}$, $CD23^{faible}$, IgM^{fort}, IgD^{faible}, $CD44^{faible}$ et $BR3^{+}$,
- T2 : $CD24^{++}$, $CD38^{++}$, $CD10^{+/faible}$, $CD21^{fort}$, $CD23^{fort}$, IgM^{fort}, IgD^{fort}, $CD44^{fort}$ et $BR3^{fort}$ (Cariappa *et al.,* 2001; Suryani *et al.*, 2010).

Notons, ici, que les LB expriment leur Ig de surface sous deux isotypes différents (IgM et IgD) du LB transitionnel jusqu'aux LB du centre germinatif des organes lymphoïdes secondaires (OLS).

Les LB transitionnels, après avoir émigré de la moelle osseuse, rejoignent les OLS, principalement la rate, où ils subissent la deuxième étape de contrôle de la tolérance au soi. La fréquence des LB auto-immuns passe ainsi de 40% chez les LB transitionnels à 20% chez les LB matures naïfs (Wardemann *et al.*, 2003). Les LB transitionnels peuvent ensuite poursuivre leur maturation selon deux voies bien distinctes (Figure 1) : celle des LB folliculaires (Fo) ou celle des LB de la zone marginale (ZM).

Les éléments qui influencent le choix entre ces deux voies sont encore mal identifiés. Un de ces facteurs pourrait cependant être la force du signal perçu par le BCR. Pour preuve, chez la souris, le fait de moduler artificiellement l'intensité du signal perçu par le BCR perturbe la proportion de LB Fo et de LB de la ZM. Une diminution de cette intensité provoque une réduction de la population des LB Fo au profit des LB de la ZM, et inversement lors d'une augmentation de cette intensité (Cariappa *et al.*, 2001). Il existe vraisemblablement d'autres facteurs favorisant la différenciation dans la voie de la ZM. Parmi eux, la cytokine B cell-activation factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) semble jouer un rôle important, du moins chez la souris (Batten *et al.*, 2000).

1.2. Lymphocytes B folliculaires

Les LB Fo correspondent à la principale population de LB périphériques. Ils représentent 80 à 90% des LB spléniques. Les LB Fo naïfs recirculent en permanence,

via le sang et la lymphe, dans les différents OLS à la rencontre de l'Ag. Ils sont responsables des réactions immunitaires dépendantes des LT.

Les LB Fo peuvent être subdivisés en plusieurs sous-populations grâce à quelques marqueurs membranaires (Figure 2) dont l'expression évolue durant la différenciation lymphocytaire (Bohnhorst *et al.*, 2001) :

- les **LB folliculaires naïfs** appelés aussi LB matures 1 (**LBm1**) présentent le phénotype suivant : IgD^{+}, $CD38^{-}$. Suite à la rencontre avec l'Ag, dans la zone riche en LT des OLS, ils se différencient en :

- **LBm2** (IgD^{+}, $CD38^{+}$) qui donneront naissance soit à des plasmocytes (IgD^{-}, $CD38^{+++}$) de courte durée de vie sécrétant des IgM, soit aux :

- **LBm2'** (IgD^{+}, $CD38^{++}$), cellules fondatrices du centre germinatif (CG) ou follicule secondaire. Au sein de cette structure, caractéristique des réponses T-dépendantes, organisée autour des cellules dendritiques folliculaires, apparaissent les :

- **centroblastes** ou **LBm3** (IgD^{-}, $CD38^{++}$, $CD77^{+}$). Ces LB, situés dans la zone sombre du CG, perdent l'expression de l'IgD, subissent une intense prolifération, ainsi que des mutations somatiques sur les portions de gènes codant pour la partie variable du BCR qui modifient au hasard l'affinité du BCR. Cela génère des :

- **centrocytes** ou **LBm4** (IgD^{-}, $CD38^{++}$, $CD77^{-}$) ayant une affinité pour l'Ag augmentée ou diminuée. Ceux qui possèdent une forte affinité sont sélectionnés positivement grâce aux cellules dendritiques folliculaires présentatrices de l'Ag. Ce processus, associant l'apparition de mutations somatiques et la sélection des LB les plus affins, est appelé la maturation d'affinité. Il en résulte une augmentation globale de l'affinité des LB dirigés contre l'Ag qui est à l'origine du développement du CG. Un autre phénomène se déroule à ce stade : la commutation de classe ou d'isotype. L'Ig exprimée par les centrocytes change d'isotype (d'IgM, elle se transforme en IgG, voire en IgA ou IgE). Pour finir, notons que les centrocytes se situent dans la zone claire du CG et se différencient soit en plasmocytes à longue durée de vie, soit en LB mémoires précoces puis en LB mémoires.

- Les **plasmocytes** (IgD^{-}, $CD38^{+++}$) à longue durée de vie correspondent au stade ultime de différenciation des LB. Ils sont spécialisés dans la sécrétion d'Ac. Ils

migrent, pour la plupart, dans la moelle osseuse où ils perdureront, de quelques mois à de nombreuses années.

- Les **LB mémoires précoces** ou **eBm5** (early Bm5) (IgD^-, $CD38^+$) se transforment en **LB mémoires** ou **LBm5** (IgD^-, $CD38^-$) qui acquièrent l'expression du marqueur CD27. Les LB mémoires expriment une Ig de forte affinité dont l'isotype a été commuté. Ils recirculent dans l'organisme et se différencient rapidement en plasmocytes s'ils rencontrent leur Ag.

Cette réaction, au sein des CG, est dépendante des LT et plus particulièrement de l'interaction entre le CD40 ligand (CD40L) du LT CD4+ et le CD40 du LB (Grammer *et al.*, 2002).

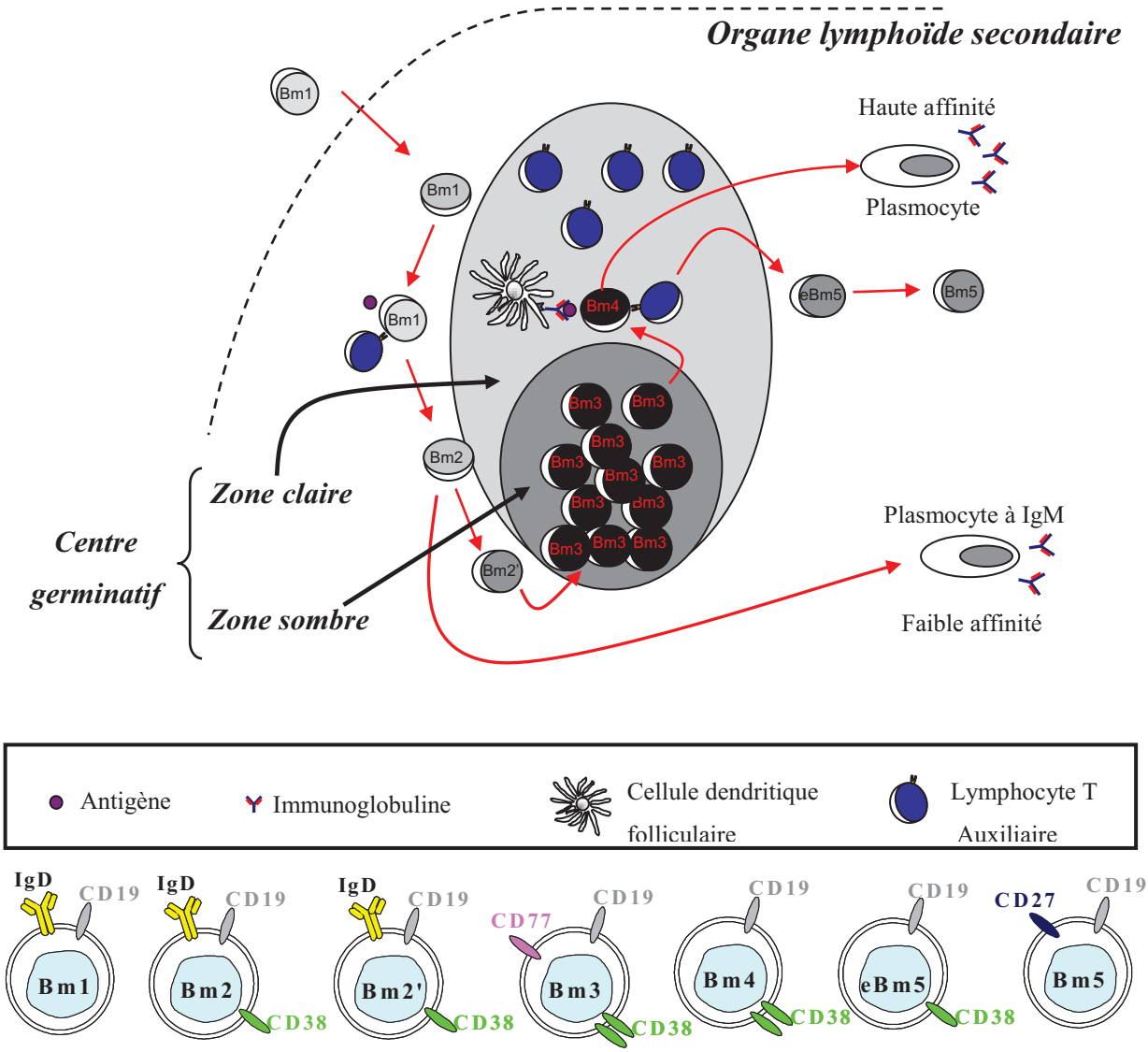

Figure 2 - Le centre germinatif et les lymphocytes B folliculaires.

Les LB Fo, considérés comme les LB classiques, jouent donc un rôle majeur dans les réactions immunitaires notamment par la production massive d'Ac monospécifiques, de haute affinité. Cependant, la mise place de cette réaction T-dépendante est longue. La sécrétion d'Ac ne devient significative qu'après une à deux semaines. D'autres populations de LB permettent de pallier cet inconvénient : les LB de la ZM et les lymphocytes B1.

1.3. Lymphocytes B de la zone marginale

Mac Neal (1929) a identifié une nouvelle structure splénique, la zone marginale qui sépare la pulpe rouge de la pulpe blanche. Elle renferme trois types cellulaires : des LB, des macrophages et des cellules stromales ou réticulaires. Les LB de la ZM représentent environ 10% des LB spléniques. Le flux sanguin entre dans la rate par le sinus marginal puis traverse la ZM pour ressortir par le sinus veineux avant de rejoindre la circulation. Ainsi, les LB de la ZM sont spécialisés dans la réponse aux agents pathogènes provenant de la circulation sanguine. Le Sphingosin-1-Phosphate Receptor 1 (S1P1) exprimé par les LB de la ZM et son ligand (la sphingosin-1-phosphate) sont essentiels à cette localisation. Pour preuve, l'injection d'un inhibiteur bloquant la fonction de S1P1 entraîne une mauvaise distribution des LB de la ZM. Ces derniers se retrouvent alors dans les follicules spléniques avec les LB Fo (Weller *et al.*, 2004).

Bien que les LB de la ZM aient été d'abord définis par leur localisation anatomique, ils possèdent des critères phénotypiques particuliers. Chez l'homme, ils sont $CD21^{fort}$, $CD23^{faible}$, IgM^{fort}, IgD^{faible}, $CD27^{+}$ et $CD1c^{fort}$.

La caractérisation de leur phénotype a permis de mettre en évidence la présence de LB de la ZM dans le sang périphérique et donc de démontrer que ces cellules sont capables de recirculer (Weller *et al.*, 2004).

Les LB de la ZM ont un répertoire antigénique relativement restreint, et sont responsables de la sécrétion rapide et T-indépendante d'Ac polyspécifiques et peu affins. Ces Ac sont principalement dirigés contre les Ag polysaccharidiques des bactéries encapsulées. Parce qu'ils sont polyspécifiques, ces Ac sont souvent

autoréactifs. Ces caractéristiques et leur localisation font des LB de la ZM une des premières lignes de défense vis-à-vis des agents pathogènes circulants dans le sang. On parle même de LB "innés" (Lopes-Carvalho *et al.*, 2004).

1.4. Lymphocytes B1

Les lymphocytes B1 sont caractérisés par l'expression du marqueur CD5 à leur surface, une capacité d'autorenouvellement, ainsi qu'une localisation préférentielle dans les cavités péritonéale et pleurale. Ils sont responsables de la production d'Ac polyréactifs, peu affins, souvent autoréactifs et principalement de type IgM. Cette production est T-indépendante, rapide et commence très tôt durant le développement. Par conséquent, ces LB représentent aussi des LB "innés", spécialisés quant à eux dans la réaction contre les agents infectieux pulmonaires ou digestifs (Browning, 2006).

Les lymphocytes B1 correspondent à une lignée bien distincte des lymphocytes B2 ou LB conventionnels qui regroupent les LB Fo et les LB de la ZM. En effet, ils possèdent des progéniteurs qui leur sont propres (Herzenberg *et al.*, 2006). Néanmoins, les LB2 sont capables, dans certaines conditions, d'exprimer CD5, suggérant que cette molécule peut aussi être le reflet d'un état d'activation des LB (Wortis *et al.*, 2001). Pour encore compliquer les choses, les LB1 ont été divisés en deux sous-populations : les B1a qui expriment CD5 et les B1b qui ne l'expriment pas mais qui présentent des caractéristiques similaires aux B1a. Les B1b sont identifiés grâce à leur faible expression du marqueur CD45RA (Herzenberg *et al.,* 2006; Kasaian *et al.*, 1992).

Pour finir, notons que les LB1 sont à l'origine des leucémies lymphoïdes chroniques.

2. Les facteurs de transcription régulant l'ontogenèse des LB

Tout d'abord, le facteur de transcription Paired box-5 (Pax-5) établit et maintient l'identité des LB jusqu'au plasmablastes en réprimant des gènes nécessaires

au développement d'autres lignages et ceux inadéquats pour les LB et en activant des gènes importants pour le lignage des LB (Du Roure, 2008).

Par ailleurs, Notch-2 représente un facteur primordial pour la différenciation en LB de la ZM. Notch-2 est un récepteur transmembranaire. Son activation induit une série de protéolyses dans le domaine transmembranaire, conduisant au relargage du domaine intracellulaire qui, après translocation dans le noyau, régule la transcription de gènes cibles. L'inactivation de Notch-2 chez les LB murins a montré que ce facteur de transcription ligand-dépendant est indispensable à la différenciation en LB de la ZM (Saito *et al.,* 2003; Tanigaki *et al.*, 2002).

B-cell lymphoma-6 (Bcl-6) est, lui, un facteur de transcription très fortement exprimé au sein des LB du CG. Son expression induite par la rencontre du LB avec son Ag est indispensable à la formation de ces CG. Bcl-6 est, par exemple, connu pour inhiber l'expression de gènes s'opposant à la prolifération ainsi que d'un gène permettant la différenciation plasmocytaire : B-lymphocyte induced maturation protein-1 (Blimp-1). Notons que Pax-5 contribue, lui aussi, à la répression de Blimp-1. En retour, Blimp-1 réprime l'expression de Bcl-6 et de Pax-5 mais active l'expression de X-box binding protein-1 (XBP-1), un autre facteur de transcription favorisant la différenciation en cellules sécrétrices d'Ac. La stabilité des programmes transcriptionnels des LB des CG et des plasmocytes repose sur la répression réciproque de Pax-5/Bcl-6 et de Blimp-1 (Du Roure, 2008). Un autre facteur de transcription important pour cette différenciation terminale en plasmocytes est Interferon-Regulatory Factor-4 (IRF-4). Chez les souris dont le gène IRF-4 a été invalidé, il n'y a pas de production de plasmocytes ni d'Ig dans le plasma (Mittrücker *et al.*, 1997).

Pour finir, notons que, dans les réponses T-indépendantes, les LB activés expriment plus fortement Blimp-1 expliquant en partie leur rapide différenciation en plasmocytes, sans formation de CG (Lindroth *et al.*, 2007).

3. Différentes fonctions des lymphocytes B

3.1. Sécrétion d'Ac : oui, mais pas seulement

L'étude de la physiopathologie des maladies auto-immunes (MAI) permet, non seulement de mieux comprendre ces pathologies complexes, et donc de découvrir de nouvelles approches thérapeutiques innovantes, mais aussi de mieux appréhender le fonctionnement normal du système immunitaire. Ainsi, les MAI systémiques comme le lupus érythémateux disséminé (LED), le syndrome de Gougerot-Sjögren (SGS) ou la polyarthrite rhumatoïde (PR) sont de remarquables modèles pour la compréhension des mécanismes de l'immunité. Les expériences qui suivent en sont un bel exemple.

Chez la souris MRL/lpr, un modèle murin de LED, le fait de supprimer les LB bloque le développement de la maladie (Chan *et al.*, 1998). Par conséquent, les LB participent aux mécanismes de cette maladie.

Au cours du LED et des MAI systémiques en général, la pathogénicité des LB a, historiquement, été attribuée à la production d'autoAc et à la formation de complexes immuns (complexes Ac-Ag) qui initient une cascade inflammatoire. Cependant, lors de l'expérience précédemment citée, il a été démontré que les LB sont également indispensables à l'hyperactivation des LT observée au cours du LED. De plus, une souris MRL/lpr possédant des LB fonctionnels présentant un BCR à leur membrane mais incapables de sécréter des Ac, développe la maladie bien que celle-ci soit légèrement atténuée (Chan *et al.*, 1999). Les LB sont donc essentiels au développement de la pathologie, indépendamment de la sécrétion d'autoAc. De façon plus générale, ces travaux montrent bien que les LB ne sont pas de simples cellules sécrétrices d'Ac, mais qu'elles ont d'autres fonctions capitales. De ce fait, leur rôle dans le système immunitaire est à réévaluer.

3.2. Présentation d'antigènes

Les LB sont capables d'internaliser spécifiquement leur Ag, via le BCR, de l'apprêter et d'en présenter efficacement des peptides aux LT. Pour exemple, un article

élégant (Yan *et al.*, 2006) a montré que la présentation antigénique effectuée par les LB active précocement les LT naïfs, avant même la mise en jeu des cellules dendritiques (CD) qui sont considérées comme des cellules spécialisées dans la présentation antigénique. De par cette fonction, les LB pourraient être impliqués dans l'initiation des réponses immunes et notamment auto-immunes.

Les LB1 et les LB de la ZM sont plus efficaces dans cette fonction que les LB Fo. Cela correspond bien à leur position intermédiaire entre l'immunité innée et adaptative (Attanavanich *et al.,* 2004; Mohan *et al.*, 1998). De plus, les LB de la ZM expriment fortement la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) non classique CD1. Cette protéine permet la présentation d'Ag particuliers (lipides, glycolipides) aux lymphocytes Natural Killer T (Makowska *et al.*, 1999).

3.3. Sécrétion de cytokines et polarisation de la réponse

Les LB sécrètent une grande variété de cytokines : interféron (IFN)-γ, Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α), interleukine(IL)-6, IL-10, IL-12 … Grâce à cette sécrétion, ils ont d'innombrables effets sur les cellules immunitaires et non immunitaires. Par exemple, ils peuvent ainsi participer aux phénomènes inflammatoires.

La polarisation est un phénomène très bien connu pour les LT auxiliaires (notés LTh pour LT "helpers"). Les LT CD4+ naïfs se polarisent en différentes sous-populations de LTh : principalement LTh1 et LTh2. C'est l'environnement cytokinique des LT CD4+ naïfs, lors de la rencontre avec l'Ag, qui régule le choix entre ces deux voies. Les LTh1 et les LTh2 diffèrent par les cytokines qu'ils sécrètent. Les LTh1 sécrètent de l'IFN-γ et de l'IL-2, et de cette manière polarisent la réaction immunitaire vers une réponse Th1 dite cellulaire, avec une mise en jeu des LT CD8+ cytotoxiques. Les LTh2, en produisant de l'IL-4, IL-13 …, orientent vers une réponse Th2 dite humorale, avec une importante production d'Ac.

Des études, chez la souris, montrent que les LB sont capables de polariser la réponse immunitaire comme les LT. Le LB naïf, activé par son Ag et en présence de cytokines Th1 ou Th2 produites par les LTh, peut se différencier en LB effecteur (Be),

respectivement de type Be1 ou Be2. De par leur profil cytokinique, ces LBe1 ou LBe2 polarisent, à leur tour, les LT CD4+ naïfs en LTh1 ou LTh2 (Harris *et al.*, 2000).

3.4. Lymphocytes B régulateurs

Là encore les recherches sur les LT ont précédé celles sur les LB. L'existence de LT régulant négativement les réactions immunitaires est désormais bien établie. Cependant, de nombreuses études chez la souris puis maintenant chez l'homme ont prouvé la présence de LB régulateurs. Ces derniers agiraient, entre autres, par l'intermédiaire de la sécrétion IL-10 et/ou de Transforming Growth Factor-β (TGF-β) (Fillatreau *et al.*, 2008).

3.5. Lymphocytes B et genèse du tissu lymphoïde secondaire

Le rôle des LB dans la genèse du tissu lymphoïde secondaire normal est bien établi. Les LB, en exprimant la lymphotoxine membranaire (LTα1β2), permettent la différenciation des CD folliculaires ainsi que la sécrétion, par ces dernières, de chimiokines responsables de la migration des LB et des LT vers les OLS. Le peuplement du tissu lymphoïde secondaire par les LT est donc B-dépendant.

Par ailleurs, les LB pourraient être impliqués dans la néogenèse de tissus lymphoïdes secondaires pathologiques observés lors des MAI (Jacquot *et al.*, 2006).

3.6. Importance dans l'auto-immunité et applications thérapeutiques

D'après les chapitres précédents, nous voyons que les LB jouent, manifestement, un rôle central dans le fonctionnement du système immunitaire, et donc dans son dysfonctionnement lors des MAI. Pour ce dernier point, c'est finalement un essai clinique qui a apporté un argument de poids à la communauté scientifique et qui a relancé l'intérêt porté aux LB dans les MAI. Cet essai clinique dans traitement de la PR relate la très nette efficacité du rituximab (MABTHERA®), un Ac anti-CD20 initialement développé pour lutter contre les lymphomes B (Edwards

et al., 2004). Le CD20 est un marqueur spécifique des LB. Ce traitement, relativement bien toléré, entraîne une déplétion importante, transitoire (6 à 12 mois) et partielle des LB. Seuls les LB immatures et les plasmocytes qui n'expriment pas le CD20 sont préservés. Lors de la réapparition des LB, la maladie peut redémarrer ou non. Une nouvelle cure de rituximab peut alors être envisagée.

Suite à ces résultats probants, l'efficacité du MABTHERA® a été évaluée (ou est en cours de l'être) dans de nombreuses autres MAI : le SGS, le LED, certaines vascularites, le purpura thrombocytopénique idiopathique … et même la sclérose en plaques, une MAI pourtant considérée comme dépendante des LT où le rituximab s'est révélé efficace (Browning, 2006; Hauser *et al.*, 2008).

Cependant, cette thérapeutique n'est pas parfaite, des approches plus ciblées pourraient être envisagées. Pour cela, l'étude et l'identification précise des sous-populations de LB incriminés semblent une voie intéressante.

3.7. Populations lymphocytaires et auto-immunité

Nous avons vu, dans le chapitre sur l'ontogenèse, que les LB étaient très hétérogènes. On peut donc légitimement se demander quelles sont les populations préférentiellement impliquées dans les MAI.

A ce titre sont souvent cités les LB "innés" (LB1 et LB de la ZM). D'une part, ces derniers sécrètent des Ac polyspécifiques fréquemment auto-réactifs, et d'autre part, ils sont capables de générer des réponses indépendantes des LT. Cela les rend susceptibles d'initier des réactions auto-immunes sans le concours des LT auto-réactifs, c'est-à-dire en s'affranchissant du contrôle de la tolérance au soi qui s'opère chez les LT.

Pour exemple, chez les modèles murins de MAI systémique, on observe souvent une expansion de la ZM (Nijnik *et al.*, 2006). Ainsi, chez la souris New Zealand Black/White ou NZB/W, qui développe une maladie proche du LED humain avec apparition d'une néphrite, on retrouve fréquemment des LB auto-réactifs anti-acide désoxyribonucléique (ADN) parmi la population de LB $CD1^{fort}$ de la ZM. L'implication de ces LB autoréactifs $CD1^{fort}$ dans la pathogenèse de la maladie et dans

la sécrétion d'auto-Ac a été confirmée notamment par l'utilisation d'un Ac déplétant anti-CD1 (Zeng *et al.*, 2000).

Lors d'une étude des LB infiltrant les glandes salivaires de patients atteints du SGS, qui est une MAI systémique touchant principalement les glandes exocrines, une forte proportion de LB correspondant aux LB transitionnels de type 2 et aux LB de la ZM a été montrée (Daridon *et al.*, 2006). Ainsi, une activation inappropriée des LB transitionnels, du fait de leur fréquente auto-réactivité (cf. partie I, chapitre 1.1), pourrait aussi participer à la rupture de tolérance au cours des MAI.

Les LB1 constituent une autre population potentiellement impliquée dans les processus auto-immuns. En effet, il a été mis en évidence que la déplétion des cellules B1 péritonéales chez des souris pré-autoimmunes NZB et NZB/W entraîne une diminution des taux d'Ac anti-ADN et réduit la néphrite (Murakami *et al.*, 1995). Par ailleurs, dans le modèle NZB/W, les LB1 montrent également un défaut de migration dans la cavité péritonéale et sont recrutés préférentiellement au niveau des organes cibles comme le rein (Ito *et al.*, 2004). Pour finir, on observe, chez l'homme, une augmentation du nombre de LB CD5+ (LB1a) au cours des MAI systémiques tels la PR et le SGS (Youinou *et al.*, 2006).

Les LB "innés" pourraient donc jouer un rôle important dans les MAI. A ce titre, il est intéressant de noter que les LB expriment des récepteurs de l'immunité innée : les Toll-like récepteurs (TLR) et que ces derniers ont été incriminés dans la physiopathologie des MAI.

II. Les Toll-like récepteurs

1. Présentation historique

Chez la drosophile, la protéine transmembranaire Toll (terme signifiant "épatant" ou "eurêka" en allemand) a d'abord été identifiée en 1988 par son implication dans la formation de l'axe dorsoventral lors du développement embryonnaire (Hashimoto *et al.*, 1988). Par la suite, Jules Hoffmann et son équipe montrèrent, en 1996, que les drosophiles déficientes en Toll étaient particulièrement sensibles aux infections fongiques. Cela permit de mettre en évidence le rôle de Toll dans l'immunité de la drosophile, et plus précisément dans la production de peptides antimicrobiens en réponse à une infection (Lemaitre *et al.*, 1996). Ces travaux ont valu à Jules Hoffmann le prix Nobel de Médecine 2011 qu'il partage avec Bruce Beutler et Ralph Steinman.

Une recherche de molécules homologues à Toll chez les mammifères a abouti à l'identification d'une famille de molécules apparentées, les Toll-like récepteurs (TLR).

2. Présentation structurale

Toll et les TLR sont des glycoprotéines transmembranaires de type I constituées d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire.

Le domaine extracellulaire est composé de motifs conservés riches en leucine : les LRR (Leucine Rich Repeat). Les études de modélisation et de cristallographie montrent que ces motifs confèrent au domaine extracellulaire des TLR une structure en "fer à cheval" dont la surface concave est directement impliquée dans la reconnaissance des ligands.

Le domaine intracellulaire contient une région conservée d'environ 200 acides aminés appelée : domaine Toll/IL-1R (TIR). Comme son nom l'indique, ce domaine

est présent chez les récepteurs des interleukines appartenant à la famille de l'IL-1. On parle même de superfamille TIR. Le domaine TIR permet la transduction du signal grâce à son interaction avec différentes protéines cytoplasmiques (Akira *et al.*, 2004).

3. Présentation fonctionnelle et ligands

Les TLR sont des récepteurs de l'immunité innée. Ils représentent la famille la mieux décrite des Pattern Recognition Receptors (PRR) et sont capables de reconnaître, de détecter une grande variété de motifs moléculaires microbiens : les Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMP). Cependant, les TLR peuvent aussi être activés par des molécules du soi libérées lors d'agressions ou d'altérations des tissus : les Damage-Associated Molecular Pattern (DAMP). Les TLR, tout comme les autres PRR, ont donc pour mission de générer un signal dit de danger. Ce signal de danger est non seulement nécessaire pour l'initiation d'une réponse immunitaire adaptative, mais il la module et l'oriente, par exemple vers une réponse de type Th1 ou Th2. Par conséquent, les TLR se situent à l'interface entre les deux types d'immunité : innée et acquise (Delneste *et al.,* 2007; Matzinger, 2002; Medzhitov *et al.*, 1997).

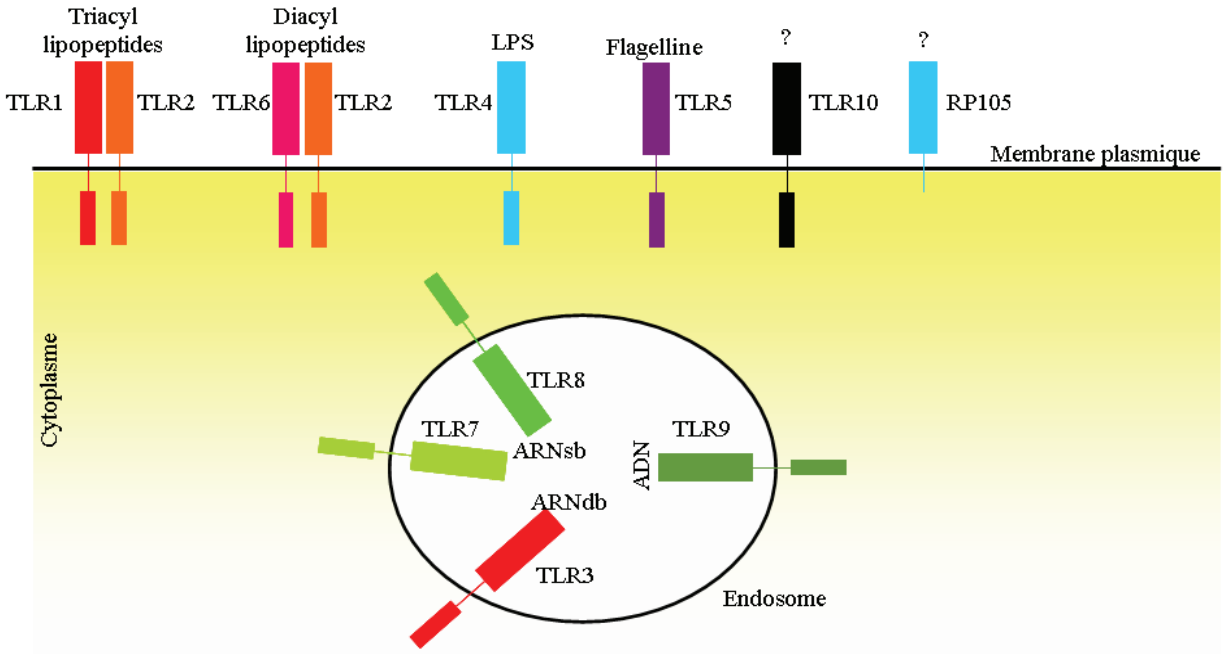

Figure 3 - Les différents Toll-like récepteurs humains. ARN simple brin (ARNsb), ARN double brin (ARNdb), lipopolysaccharide (LPS), protéine radioprotectrice de 105kD (RP105).

Actuellement, 10 TLR ont été identifiés chez l'homme (Figure 3) et 12 chez la souris. Il existe aussi RP105, une protéine radioprotectrice de 105kD présentant une grande homologie avec le TLR4 mais dépourvu de domaine TIR et dont la fonction reste controversée (Divanovic *et al.*, 2005). Les TLR reconnaissent des ligands de natures très différentes (Akira *et al.,* 2004; Delneste *et al.*, 2007; Kanzler *et al.*, 2007) (Tableau 1).

TLR	**Ligands exogènes**	**Ligands endogènes**	**Ligands synthétiques**
TLR1	triacyl-lipopeptides		
TLR2	lipopeptides, peptidoglycane (bactérie Gram +), OmpA (bactérie Gram -)	HSP70, fibronectine, acide hyaluronique, sulfate d'héparane, lipoprotéines de faible densité	
TLR3	ARN double brin (virus)	ARN	Poly(I:C)
TLR4	lipopolysaccharide (bactéries Gram -), zymosan (levures)	HSP70, HSP60 lipoprotéines de faible densité	
TLR5	flagelline (bactérie)		
TLR6	diacyl-lipopeptides (mycoplasme), Zymosan (levures)		
TLR7	ARN simple brin (virus)	ARN	imidazoquinolines
TLR8	ARN simple brin (virus)	ARN	imidazoquinolines
TLR9	ADN (motifs CpG déméthylés)	ADN	oligodésoxynucléotides CpG
TLR10	inconnu		

Tableau 1 - Les Toll-like récepteurs humains et leurs ligands. D'après (Akira *et al.,* 2004; Delneste *et al.*, 2007; Kanzler *et al.*, 2007). Heat-shock protein (HSP), acide polyinosinique polycytidylique (poly(I:C)).

3.1. Ligands de nature protéique

Le TLR5 reconnaît la flagelline, protéine majoritaire des flagelles bactériens. OmpA, une protéine importante de la paroi des bactéries Gram négatif active le TLR2.

Parmi les DAMP, peuvent être cités : la protéine de stress Heat-Shock Protein (HSP) 70 ainsi que certains fragments de fibronectine, une protéine de la matrice extracellulaire, qui se lient aux TLR2 et/ou TLR4.

3.2. Ligands de nature lipidique

En 1998, le groupe de Bruce Beutler a prouvé le rôle du TLR4 en tant que récepteur du lipopolysaccharide (LPS), constituant majeur de la paroi des bactéries Gram négatif (Poltorak *et al.*, 1998).

L'association du TLR2 avec le TLR1 ou avec le TLR6 permet la détection de triacyl-lipopeptides ou de diacyl-lipopeptides, respectivement.

3.3. Ligands de nature glucidique

Le TLR2 est capable de repérer le zymosan, un glucane présent dans la paroi des levures.

Quant aux ligands endogènes, nous pouvons citer l'acide hyaluronique et le sulfate d'héparane qui sont des glycoaminoglycanes de la matrice extracellulaire capables de stimuler le TLR4.

3.4. Ligands de nature nucléotidique

Le TLR9 est activé par de l'ADN possédant des motifs dinucléotidiques CpG (Cytosine-phosphate-Guanine) non méthylés sur la cytosine (Hemmi *et al.,* 2000; Krieg *et al.*, 1995). Ces motifs, rares dans l'ADN des mammifères, sont fréquents chez les agents infectieux tels que les bactéries, certains virus …

Les TLR7 et 8 sont stimulés par de l'acide ribonucléique (ARN) simple brin d'origine virale.

Le TLR3, quant à lui, reconnaît l'ARN double brin de certains virus.

Contrairement aux autres TLR, ces quatre TLR ne sont pas exprimés à la membrane plasmique des cellules mais dans les endosomes/lysosomes (Figure 3). A l'inverse des acides nucléiques microbiens, les acides nucléiques du soi n'ont normalement pas accès à ces compartiments. La localisation subcellulaire des TLR3, 7, 8 et 9 permet donc d'empêcher l'activation de ces TLR par les acides nucléiques de l'hôte (Barton *et al.*, 2006). La stimulation de ces TLR est, par conséquent, un processus à deux étapes : endocytose (étape limitante) et liaison aux TLR. Pour illustrer cette caractéristique, nous citerons l'exemple des protozoaires du genre Plasmodium, les agents du paludisme. Ils produisent un pigment : l'hémozoïne ainsi que différentes protéines responsables des accès fébriles caractéristiques de la maladie. On pensait que l'hémozoïne activait directement le TLR9 (Coban *et al.*, 2005), en fait il n'en est rien : des protéines qui lui sont associées permettent l'endocytose de l'ADN du parasite qui peut alors stimuler le TLR9 (Parroche *et al.,* 2007; Wu *et al.*, 2010) et ainsi provoquer certains symptômes de la maladie.

Pour finir, il apparaît que dans certains cas, l'ADN et l'ARN du soi peuvent, malgré tout, activer les TLR endosomaux et jouer, de ce fait, le rôle de DAMP.

3.5. Ligands de nature synthétique

Des ligands synthétiques des TLR ont été développés. Ces molécules sont ou bien des versions synthétiques des ligands naturels dont on a optimisé les propriétés pharmacologiques, ou bien de petites molécules chimiques issues de criblage pharmacologique.

Les plus connus sont ceux créés pour activer le TLR9 : les oligodésoxynucléotides (ODN) synthétiques possédant des motifs CpG non méthylés. Trois grandes classes d'ODN CpG (souvent notés tout simplement CpG) ont été décrites. Elles sont structurellement et fonctionnellement distinctes (Figure 4).

- La classe A (parfois appelée type D) : les CpG de cette classe possèdent des motifs poly-G (3, ou plus, guanines consécutives) ainsi qu'un palindrome. Grâce à ces caractéristiques, les CpG de classe A (CpG-A) s'assemblent pour former des nanoparticules.
- La classe B (ou type K) : les CpG-B ont été modifiés chimiquement afin de les rendre plus résistants aux nucléases. Leur "colonne vertébrale" n'est pas phosphodiester comme l'ADN naturel mais phosphorothioate : un atome d'oxygène est remplacé par un atome de soufre (Figure 5). Ces CpG ne forment pas de nanoparticules.
- La classe C : les CpG-C possèdent une structure intermédiaire, ils furent créés pour synthétiser les propriétés des deux classes précédentes (Krieg, 2006).

Nous reviendrons, par la suite, sur les propriétés fonctionnelles de ces trois classes de CpG.

Des molécules antagonistes à visée thérapeutique ont aussi été développées pour les TLR4, TLR7 et TLR9 (Kanzler *et al.*, 2007)

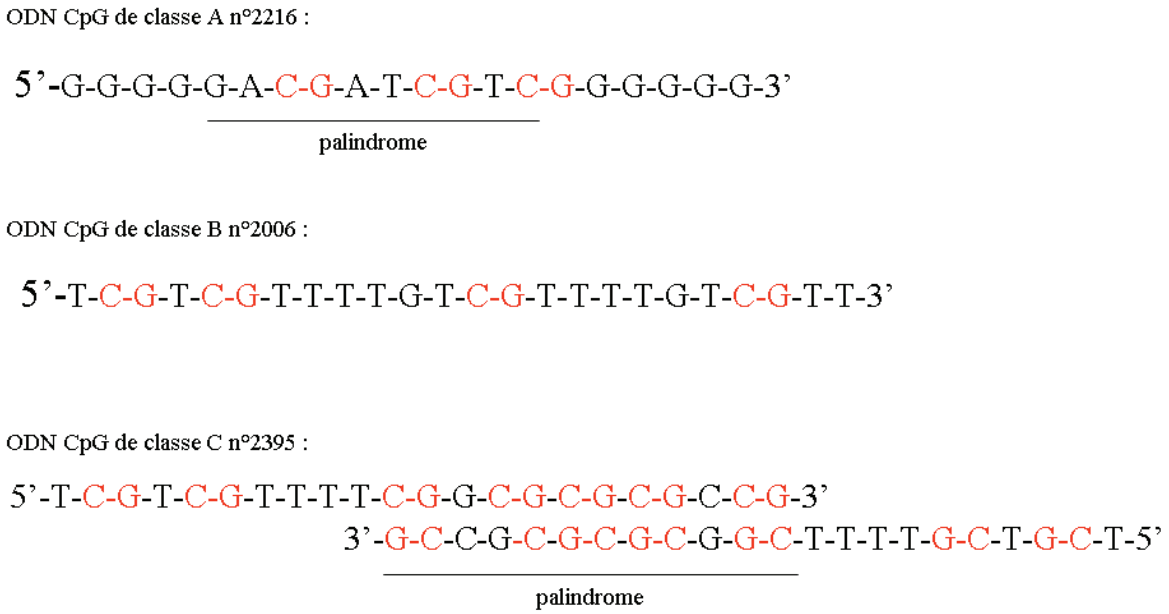

Figure 4 - Les différentes classes d'oligodésoxynucléotides possédant des motifs CpG (ODN CpG). Est présenté un exemple par classe d'ODN CpG. Les motifs CpG sont en rouge. Pour l'ODN CpG de classe C, est présenté un duplex d'ODN n°2395 formé grâce à la présence d'un palindrome en 3'. D'après (Krieg, 2006).

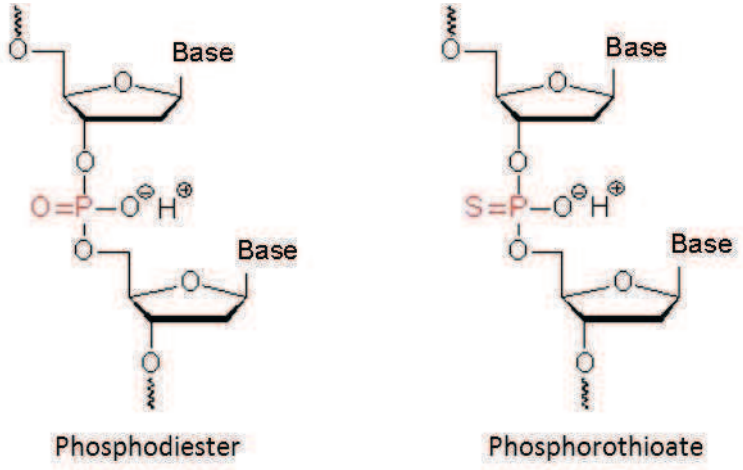

Figure 5 - Structures moléculaires des oligodésoxynucléotides.

4. Voies de signalisation

4.1. Voies générales

Les voies de signalisation des TLR sont particulièrement complexes. Elles varient selon le TLR, le type cellulaire … Cela permet d'apporter une réponse immunitaire adaptée à l'agent pathogène, au type de danger.

Les TLR s'associent en homodimères et en hétérodimères (TLR2/6 et TLR2/1). La liaison de l'agoniste induit une modification de conformation du dimère de TLR (Latz *et al.*, 2007). En découle le recrutement de différentes molécules adaptatrices intracellulaires possédant un domaine TIR. Parmi celles-ci, la protéine Myeloïd Differenciation primary-response protein 88 (MyD88) est la plus importante. Elle est nécessaire au fonctionnement de tous les TLR sauf le TLR3 et le TLR4. Pour ce dernier, la transduction du signal implique MyD88, mais il existe une voie alternative. MyD88 permet le recrutement et l'activation des enzymes IL-1R-Associated Kinase (IRAK)-1 et IRAK-4. Cela aboutit, après mise en jeu de nombreuses protéines intermédiaires, à :

- l'activation du facteur de transcription Nuclear Factor- κB (NF-κB), impliqué dans l'expression de nombreux gènes, notamment proinflammatoires,

- l'activation de certains facteurs de transcription de la famille des Interferon-Regulatory Factor (IRF),

- l'activation des Mitogen-Activated Protein (MAP) kinases qui activent à leur tour le facteur de transcription Activator Protein-1 (AP-1) (Figure 6).

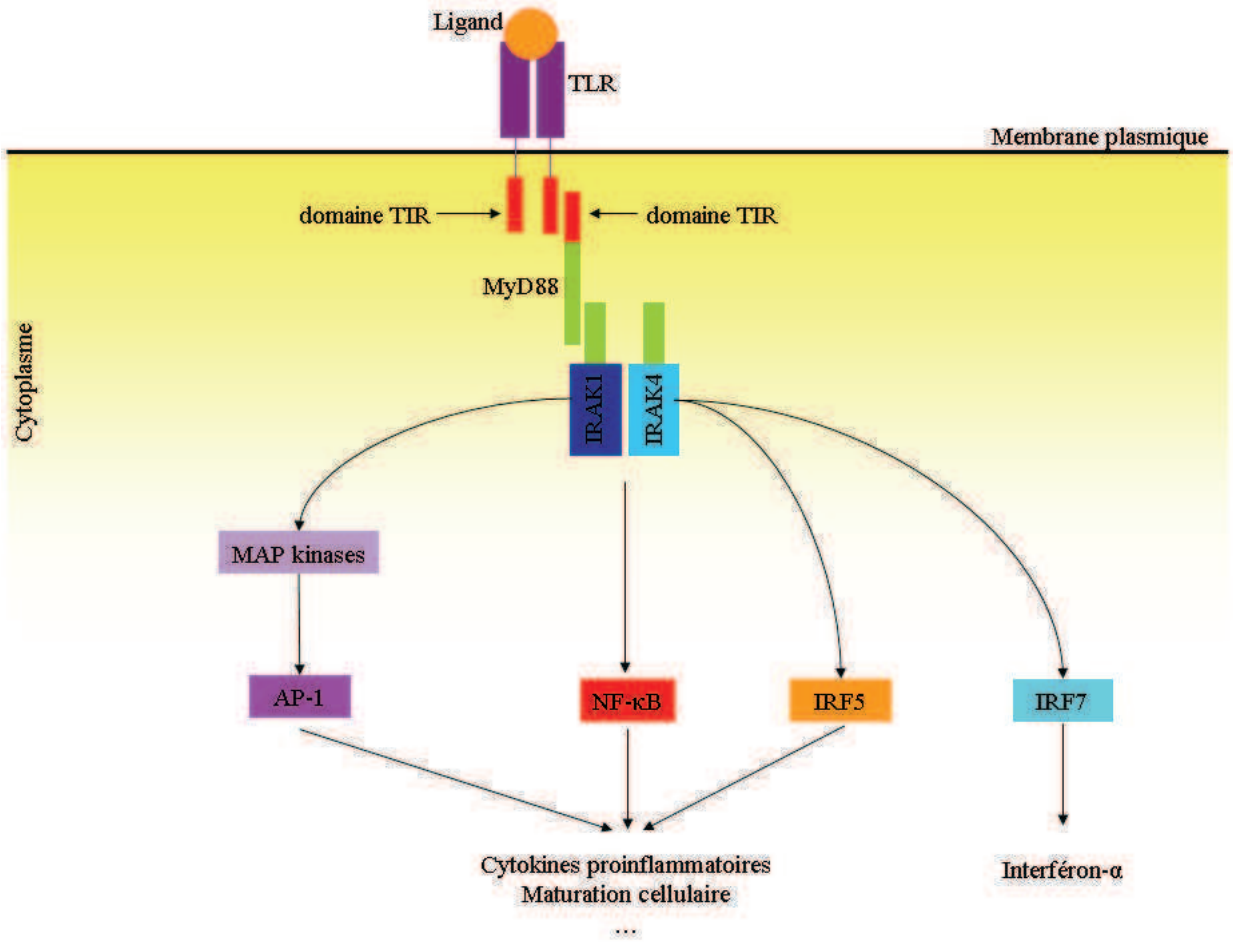

Figure 6 - **Voies de signalisation des Toll-like récepteurs.** Domaine Toll/IL-1R (TIR), Myeloïd Differenciation primary-response protein 88 (MyD88), IL-1R-Associated Kinase (IRAK), Mitogen-Activated Protein (MAP), Activator Protein-1 (AP-1), Nuclear Factor- κB (NF-κB), Interferon-Regulatory Factor (IRF).

La transduction du signal par le TLR3 et le TLR4 met en œuvre la protéine TIR-domain-containing adaptor protein inducing interferon-β (TRIF). Cette protéine adaptatrice à domaine TIR ne recrute ni IRAK-1 ni IRAK-4 mais provoque néanmoins :

- l'activation de NF-κB,

- l'activation de MAP kinases,

- l'activation de IRF3 qui se fixe sur le promoteur du gène de l'IFN-β (IFN de type I) et induit son expression (Akira *et al.,* 2004; Kawai *et al.*, 2007).

Notons qu'il existe une régulation spatio-temporelle des voies de signalisation du TLR4. Au début de la stimulation du TLR4, à la membrane, c'est MyD88 qui est mis en jeu. Ensuite, après l'internalisation du TLR4 et de son ligand dans le compartiment endosomal, TRIF prend le relai (Kagan *et al.*, 2008).

4.2. Voies de signalisation du TLR9

Pour l'activation du TLR9, deux phénomènes semblent être nécessaires. Une acidification du compartiment endosomal ainsi qu'un clivage du domaine extracellulaire de ce récepteur par différentes protéases dont les cathepsines (Ewald *et al.*, 2008).

Par ailleurs, il existe une étonnante régulation spatio-temporelle de la signalisation via ce TLR. Cela fut mis en évidence dans les CD plasmacytoïdes (CDp) qui sont des cellules spécialisées dans la réponse antivirale. Chez ces CDp, les CpG-A multimériques sont retenus dans les endosomes précoces grâce à un récepteur "scavenger" CXCL16 (Gursel *et al.*, 2006). Cette localisation permet l'activation, via le TLR9, de IRF7 qui est responsable de la production d'IFN de type I, notamment l'IFN-α (Honda *et al.*, 2005).

Du fait de leur structure monomérique, les CpG-B n'interagissent pas avec CXCL16 et se localisent préférentiellement dans les endosomes tardifs/lysosomes. La stimulation du TLR9 au niveau de ces compartiments intracellulaires n'active pas IRF7 mais IRF5. Il en résulte une sécrétion de cytokines proinflammatoires et une maturation des CDp (Asselin-Paturel *et al.*, 2005).

Les CpG-C, quant à eux, se localisent dans les deux types d'endosomes et induisent ainsi les deux types de réponse (Guiducci *et al.*, 2006).

Pour conclure, notons que les voies de signalisation des TLR sont finement contrôlées par de nombreux régulateurs négatifs afin de stopper la réponse le moment

venu et d'éviter l'apparition de réponses inflammatoires ou immunes excessives (Kawai *et al.*, 2007).

5. Expression cellulaire et fonctions biologiques

Les TLR sont exprimés par les cellules de l'immunité innée mais aussi par les cellules de l'immunité acquise (Tableau 2) ainsi que par des cellules n'appartenant pas au système immunitaire. Ils sont donc impliqués dans de nombreux processus d'activation.

Récepteur	**Lymphocytes B**	CD plasmacytoïdes	CD myéloïdes	monocytes	PNN	Cellules NK
TLR1	+	+/-	+	+ +	+ +	+
TLR2	+/-	-	+ +	+ +	+ +	+
TLR3	+/-	-	+ +	-	ND	+
TLR4	-	-	+	+ +	+ +	+
TLR5	+/-	-	+ +	+	ND	+
TLR6	+ +	+/-	+	+/-	+ +	+/-
TLR7	+ +	+ +	-	-	+	+
TLR8	+/-	-	+	+ +	+ +	+/-
TLR9	+ +	++	-	+/-	-	+
TLR10	+ +	+	-	-	-	+
RP105	+ +	+ +	+ +	+ +	ND	ND

Tableau 2 - Expression des Toll-like récepteurs. D'après (Barrat *et al.,* 2008; Bourke *et al.*, 2003; Chalifour *et al.*, 2004; Fugier-Vivier *et al.*, 1997; Hasan *et al.*, 2005; He *et al.*, 2010; Peng, 2005; Sivori *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2007). Cellules dendritiques (CD), polynucléaires neutrophiles (PNN), cellules natural killer (cellules NK), protéine radioprotectrice de 105 kD (RP105), ND : non déterminé, - : absence d'expression, +/- : expression faible, controversée ou seulement dans certaines sous-populations cellulaires, + : expression modérée, ++ : forte expression.

5.1. Activation des cellules dendritiques

Les CD sont des cellules présentatrices d'Ag professionnelles. Lorsqu'elles sont immatures, elles circulent en périphérie afin de détecter d'éventuels agents étrangers. Après contact avec les micro-organismes qu'elles phagocytent, les CD subissent une maturation. Elles migrent alors vers les OLS pour présenter aux LT naïfs les Ag issus des micro-organismes capturés. L'activation des TLR est largement impliquée dans ce processus de maturation. Leur stimulation provoque :

- une augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe II nécessaires à la présentation efficace de l'Ag aux LT CD4+,
- une augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation (CD80, CD86) nécessaires à l'activation des LT,
- la sécrétion de chimiokines qui attirent les cellules immunitaires,
- la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires : TNF-α, IL-6 …
- la sécrétion de cytokines orientant la réponse adaptative vers le type Th1 ou, plus rarement, vers le type Th2 (Didierlaurent *et al.,* 2004; Redecke *et al.*, 2004),
- la sécrétion d'IFN de type I, notamment d'IFN-α, qui joue un rôle majeur dans la réponse antivirale et dans certaines MAI systémiques. Il existe deux types de CD, les CD myéloïdes et les CD plasmacytoïdes. C'est la sollicitation du TLR7 ou du TLR9, chez ces dernières, qui est responsable de la sécrétion d'IFN-α (Delneste *et al.*, 2007).

5.2. Activation des autres cellules de l'immunité innée

La stimulation des TLR chez les monocytes/macrophages, les polynucléaires et les cellules NK induit une augmentation des activités cytotoxiques de ces cellules et la libération de divers médiateurs inflammatoires (Delneste *et al.*, 2007).

5.3. Activation des cellules de l'immunité adaptative

L'activation des TLR exprimés par les LB potentialise les réponses T-indépendantes et T-dépendantes. Pour ces dernières, elle apporte ce que Lanzavecchia

appelle un troisième signal — les deux autres signaux étant l'Ag et l'interaction avec les LT CD4+ — qui permet la mise en place d'une réponse humorale efficace (Pasare *et al.,* 2005; Ruprecht *et al.*, 2006). Nous reviendrons plus en détail sur le rôle des TLR chez les LB.

L'expression des TLR par les LT semble assez faible. Néanmoins, la sollicitation de ces récepteurs potentialise leur prolifération et leur sécrétion de cytokines (Kabelitz, 2007).

5.4. Activation des cellules non immunitaires

La stimulation des TLR chez les fibroblastes, les cellules épithéliales, endothéliales… aboutit à la sécrétion de cytokines, chimiokines et peptides antimicrobiens mais aussi à l'expression de molécules d'adhérence permettant le recrutement et la migration des cellules du système immunitaire.

Pour conclure, la mise en jeu des TLR au niveau de ces différents types cellulaires permet l'accomplissement de trois grandes fonctions :

- détecter la présence et le type de danger,
- mettre en œuvre une réponse immédiate,
- initier, moduler et orienter la réponse immunitaire adaptative (Kanzler *et al.*, 2007).

6. TLR et immunopathologie

6.1. Déficiences dans la voie de signalisation des TLR

Les souris, chez lesquelles le gène codant pour MyD88 est invalidé (Tableau 3), sont particulièrement susceptibles à de nombreuses infections expérimentales bactériennes, virales, parasitaires et fongiques (von Bernuth *et al.*, 2008). Cependant, les souris MyD88-/- ne présentent pas de troubles du développement embryonnaire ; contrairement au Toll de la drosophile, les TLR des mammifères ne sont donc pas impliqués dans l'embryogenèse.

Chez l'homme, une déficience en MyD88 a récemment été décrite chez neuf individus. Cette déficience est responsable de l'apparition, principalement dans les dix premières années de la vie, d'infections invasives à bactéries pyogènes encapsulées qui se sont révélées mortelles dans trois cas (von Bernuth *et al.*, 2008).

Il existe trois autres déficiences :

- Celle touchant IRAK-4, kinase nécessaire à la signalisation de tous les TLR sauf les TLR3 et 4. Elle provoque, chez les trente deux cas décrits, le même phénotype que la déficience en MyD88 (Picard *et al.*, 2003).
- Les déficiences en TLR3 et en UNC93B (protéine nécessaire au fonctionnement des TLR3, 7, 8 et 9). Elles sont associées à des encéphalites à HSV-1 (*Herpes simplex virus*) (Casrouge *et al.,* 2006; Zhang *et al.*, 2007).

Ainsi, contrairement à ce que l'on observait lors des infections expérimentales murines, les déficiences touchant les TLR chez l'homme donnent des déficits immunitaires restreints bien que mettant en jeu le pronostic vital. Comme le montrent les essais cliniques en vaccination (Krieg, 2006), l'implication des TLR humains est importante pour la mise en place de réponses immunitaires efficaces. Cependant, les études citées ci-dessus indiquent que, dans l'immunité *in natura*, le dysfonctionnement des TLR peut souvent être compensé, vraisemblablement par d'autres PRR.

Type de pathogènes	Pathogène	Mortalité
Bactérie Gram positif	*Staphylococcus aureus*	augmentée/inchangée
	Streptococcus agalacticae	augmentée/diminuée
	Streptococcus pneumoniae	augmentée
	Listeria monocytogenes	augmentée
Bactérie Gram négatif	*Anaplasma phagocytophilum*	inchangée
	Borrelia hermsii	augmentée
	Chlamydia pneumoniae	augmentée
	Citrobacter rodentium	augmentée
	Francisella novicida	augmentée
	Francisella tularenis	augmentée
	Neisseria meningitidis	diminuée
	Pseudomonas aeruginosa	augmentée/inchangée
Mycobactéries	*Mycobacterium avium*	augmentée
	Mycobacterium bovis	augmentée
	Mycobacterium tuberculosis	augmentée/inchangée
Virus	*Coxsackievirus*	diminuée
	Herpes simplex virus 1	augmentée
	Herpes simplex virus 2	augmentée
	Lymphocytic choriomeningitis virus	augmentée
	Murine cytomegalovirus	augmentée
	Reovirus	inchangée
	Vesicular stomatitis virus	augmentée
Parasites	*Cryptosporidium parvum*	augmentée
	Plasmodium berghei	diminuée
	Plasmodium chabaudi	inchangée
	Toxoplasma gondii	augmentée
	Trypanosoma brucei	augmentée
	Trypanosoma cruzii	augmentée
Champignons	*Aspergillus*	augmentée
	Candida albicans	augmentée
	Cryptococcus neoformans	augmentée
Nématodes	*Trichuris muris*	diminuée

Tableau 3 - Mortalité des souris déficientes en MyD88 par rapport aux souris sauvages en réponse à différentes infections expérimentales. D'après (von Bernuth *et al.*, 2008).

6.2. Activation excessive ou inappropriée des TLR

L'activation excessive ou inappropriée des TLR est impliquée dans diverses pathologies. Nous citerons les exemples suivants :

- L'élément clef déclenchant le choc septique à bactéries Gram négatif est la stimulation du TLR4 par le LPS.
- Les TLR participent aussi aux symptômes des infections chroniques. Ainsi, le TLR7 semble contribuer aux dysfonctionnements immunitaires observés lors de l'infection par le virus de l'immuno-déficience humaine (VIH) (Baenziger *et al.*, 2009).
- Les inflammations stériles, comme celle induite par la bléomycine, un agent anticancéreux, peuvent être médiées par les TLR (Jiang *et al.*, 2005).
- Lors de l'athérosclérose, l'activation du TLR4 par les lipoprotéines de faible densité (Low Density Lipoprotein, LDL) oxydées joue un rôle dans la pathogenèse (Bae *et al.*, 2009).

- Les maladies auto-immunes systémiques :

Le LED représente l'exemple archétypal de ces maladies. Il touche neuf femmes pour un homme. Sa prévalence est de un pour 2500 (Rahman *et al.*, 2008). Il est caractérisé par la production d'auto-Ac anti-Ag nucléaires et anti-particules ribonucléoprotéiques (RNP). Les symptômes de cette maladie sont particulièrement variés et polymorphes. La néphrite est une des atteintes les plus graves, elle peut aboutir à une insuffisance rénale chronique.

De nombreux articles ont mis en évidence le rôle des TLR7 et 9 dans la physiopathologie de cette maladie. La contribution de ces récepteurs expliquerait :

- pourquoi la perte de tolérance se limite principalement aux Ag contenant de l'ADN ou de l'ARN,
- l'hyperactivation des CDp et l'augmentation des taux plasmatiques d'IFN-α observées au cours de cette MAI (Christensen *et al.*, 2007).

7. Applications thérapeutiques

Les chercheurs travaillant dans le domaine des TLR se sont tout naturellement intéressés à la modulation pharmaceutique de l'activité de ces récepteurs. Certains d'entre eux travaillent désormais dans des sociétés (Dynavax Technologies, Coley Pharmaceuticals) dont le but est de développer des molécules agonistes ou antagonistes des TLR. Ces sociétés ont mis en place des partenariats avec les grands laboratoires pharmaceutiques (Pfizer, Sanofi-Aventis, Novartis, GlaxoSmithKline …). Actuellement, de nombreuses molécules sont en essais cliniques et certaines sont déjà en phase III.

7.1. Agonistes

La stimulation pharmaceutique des TLR est à l'étude dans trois domaines : l'infectiologie, la cancérologie et l'allergologie.

7.1.1. Infectiologie

Immunomodulation

L'utilisation d'agonistes des TLR3, 7, 8 et 9 pour le traitement d'infections, notamment virales, est prometteuse. Les essais cliniques en cours s'intéressent à l'hépatite C, l'hépatite B … (Kanzler *et al.*, 2007)

L'imiquimod (ALDARA®), un ligand du TLR7, possède déjà une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour le traitement topique des condylomes acuminés induits par le Human Papilloma Virus (HPV) ainsi que d'autres maladies cutanées.

Adjuvants en vaccination

Il s'agit de l'application thérapeutique la plus explorée. Contrairement à l'adjuvant actuellement utilisé, l'hydroxyde d'alumine $Al(OH)_3$ (alun), les CpG sont

particulièrement efficaces pour induire une réponse Th1 plus adaptée aux micro-organismes intracellulaires (Krieg, 2006).

7.1.2. Cancérologie

Les ligands synthétiques des TLR peuvent être utilisés en monothérapie. L'objectif est alors de stimuler le système immunitaire et donc la réponse anti-tumorale. De plus, dans certains cas, ils peuvent induire, par un mécanisme direct, l'apoptose des cellules tumorales. Les CpG provoquent, par exemple, l'apoptose des cellules de la leucémie lymphoïde chronique (Jahrsdörfer *et al.*, 2005).

Les agonistes des TLR sont aussi testés pour leur capacité à améliorer l'efficacité de vaccins thérapeutiques.

Enfin, ils sont essayés en association avec divers anticancéreux. Ils favorisent :

- la cytotoxicité cellulaire dépendante d'Ac due aux Ac monoclonaux comme le rituximab,
- le développement d'une réponse Th1 vis-à-vis d'Ag tumoraux relargués suite à l'action des médicaments cytotoxiques classiques (Kanzler *et al.*, 2007).

7.1.3. Allergie et asthme

Les allergies sont caractérisées par une réponse Th2 inappropriée vis-à-vis d'Ag environnementaux. Le but de la stimulation des TLR est d'induire la sécrétion de cytokines Th1 et ainsi d'inhiber la réponse Th2 à l'origine de la maladie.

Les CpG sont en essais pour la rhinite allergique où ils sont administrés avec l'allergène par voie nasale et pour l'asthme où ils sont administrés par voie respiratoire (Krieg, 2006).

7.2. Antagonistes

Des antagonistes du TLR4 sont en développement, notamment dans le cadre des chocs septiques à bactéries Gram négatif, des inhibiteurs du TLR2 le sont pour le traitement de diverses maladies inflammatoires (Hennessy *et al.*, 2010).

En vue d'une utilisation pour le traitement de MAI comme le LED, des ODN inhibant le TLR9 et/ou le TLR7 voire même les trois TLR 7, 8 et 9 ont été développés. Peter Lenert en propose une classification en trois groupes (Lenert, 2010).

- La classe B (*Broadly-active*) est constituée d'ODN simple brin ne formant pas de structures secondaires et inhibant les TLR ciblés quelle que soit la cellule qui les exprime.
- La classe R (*Restricted activity*) est composée d'ODN possédant un palindrome permettant leur dimérisation ou la formation d'"épingles à cheveux". Ces ODN ne sont efficaces chez les LB que lorsque le BCR est activé. Cela en fait de bons candidats pour cibler les LB dirigés contre des auto-Ag contenant des acides nucléiques.
- La classe G regroupe des ODN inhibiteurs possédant des motifs poly-G (3 guanines consécutives, ou plus). Ces motifs sont à l'origine de la formation d'agrégats et d'une perte de spécificité. En effet, les ODN de la classe G ne sont pas spécifiques des TLR mais agissent aussi sur différents membres de la famille *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT). Le motif répétitif $(TTAGGG)_n$ présent dans les télomères de chromosomes de mammifères appartient à cette classe.

Plusieurs ODN inhibiteurs sont en phase préclinique. Les résultats obtenus chez deux modèles murins du LED (la souris NZB/NZW F1 et la souris MRL/lpr) sont encourageants (Barrat *et al.,* 2008; Lenert, 2010). Par ailleurs, la description des déficiences fonctionnelles en TLR chez l'homme nous amène à penser que l'inhibition ciblée des TLR7, 8 et 9 n'entraînera pas de déficit immunitaire majeur (Casrouge *et al.,* 2006; von Bernuth *et al.*, 2008). IRS954/DV1179 et IMO-3100, deux ODN capables d'inhiber le TLR9 et le TLR7 sont, quant à eux, déjà en essais cliniques, l'un pour le traitement du LED et l'autre pour celui du psoriasis (Dunne *et al.*, 2011). Enfin, l'équipe de Franck Barrat a montré que la stimulation des TLR7 et 9 réduit l'activité thérapeutique des glucocorticoïdes (Guiducci *et al.*, 2010). Ces derniers étant largement prescrits lors du LED ou d'autres MAI, la co-administration d'ODN inhibiteurs devrait permettre une augmentation de l'efficacité des glucocorticoïdes.

L'hydroxychloroquine (PLAQUENIL®) est un médicament utilisé empiriquement dans le lupus depuis de nombreuses années. Il s'avère que cette molécule inhibe partiellement les TLR intracellulaires. Cette propriété est probablement responsable de son activité thérapeutique. Cependant, les mécanismes sous-jacents sont controversés. S'il a longtemps été admis que l'hydroxychloroquine agit en inhibant l'acidification des endosomes nécessaire à l'activation des TLR endosomaux, un article récent remet en question cette idée et apporte des arguments en faveur d'une inhibition par interaction directe de l'hydroxychloroquine avec les acides nucléiques (Kuznik *et al.*, 2011). Un nouveau dérivé chimique, le CPG-52364, est d'ailleurs en développement. Il semble être capable d'inhiber spécifiquement les TLR7, 8 et 9 et a montré une efficacité supérieure à l'hydroxychloroquine chez la souris lupique MRL lpr (Hennessy *et al.*, 2010).

III. Les Toll-like récepteurs chez les lymphocytes B

1. Expression des TLR et sensibilité des différentes populations de LB aux ligands des TLR

Les TLR exprimés par les LB humains sont les TLR1, 6, 7, 9, 10 et, à un plus faible niveau, le TLR2. L'équipe d'Andrea Cerutti a aussi détecté la présence du TLR3 et du TLR5 au sein de certains LB. L'expression du TLR8, quant à elle, est controversée (cf. tableau 2). Notons bien que, contrairement aux LB murins, les LB humains sont dépourvus de TLR4. Par conséquent, ils ne sont pas stimulables par le LPS (Barrat *et al.,* 2008; Bourke *et al.*, 2003; Chalifour *et al.*, 2004; Fugier-Vivier *et al.*, 1997; He *et al.*, 2010; Peng, 2005; Sivori *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2007).

Chez la souris, les LB1 et les LB de la ZM, bien qu'ils n'expriment pas plus les TLR que les LB Fo, sont plus sensibles aux ligands des TLR que ces derniers (Genestier *et al.*, 2007). Chez l'homme, les LB de la ZM sont aussi particulièrement sensibles à la stimulation des TLR (Bernasconi *et al.*, 2002).

Toujours chez l'homme, la stimulation des LB mémoires, par les TLR7 et 9, est beaucoup plus importante que celle des LB naïfs (Bekeredjian-Ding *et al.,* 2005; Bernasconi *et al.*, 2002). Cette différence pourrait s'expliquer par une plus forte expression des ARN messagers (ARNm) de ces TLR chez les LB mémoires (Bernasconi *et al.*, 2003). Cependant, cela n'a pas été confirmé au niveau protéique, une étude en cytofluorimètrie n'ayant pas mis en évidence de différence d'expression de la protéine TLR9 entre les LB naïfs et mémoires (Papadimitraki *et al.*, 2006).

2. Coopération TLR-BCR et autres coopérations

Chez l'homme, mis à part les CpG-B et les CpG-C, les ligands des TLR n'entraînent que peu d'activation des LB en l'absence d'engagement du BCR

(Bekeredjian-Ding *et al.,* 2005; Bekeredjian-Ding *et al.*, 2007). La sollicitation du BCR sensibilise les LB aux ligands des TLR grâce à différents mécanismes.

Pour les TLR intracellulaires, seuls les CpG-B, les CpG-C et les agonistes synthétiques des TLR7 et 8 peuvent être efficacement internalisés de façon non spécifique par les LB. Dans les autres cas, le BCR est, à ce jour, le seul récepteur connu pour permettre une endocytose efficiente des ligands des TLR intracellulaires par les LB (Lanzavecchia *et al.*, 2007). L'activation du BCR provoque aussi une relocalisation du TLR9 (et peut être des autres TLR intracellulaires) des endosomes précoces, où il se trouve à l'état basal, vers les endosomes tardifs où il co-localise avec le BCR, son Ag et donc, éventuellement, avec de l'ADN microbien (Chaturvedi *et al.,* 2008; O'Neill *et al.*, 2009). La stimulation du BCR permet, en outre, d'augmenter l'expression de l'ARNm de MyD88, TLR7, TLR9 et TLR10. Même si une confirmation au niveau protéique est nécessaire, cela suggère que l'engagement du BCR pourrait augmenter l'expression des TLR (Bernasconi *et al.,* 2003; Bourke *et al.*, 2003). Enfin, il semble exister une synergie entre les voies de signalisation du BCR et des TLR. Une stimulation simultanée des deux types de récepteurs permet, en effet, une hyperactivation des MAP kinases et de NF-κB (Busconi *et al.*, 2007).

Le signal transmis par le BCR n'est pas le seul qui coopère avec les TLR. Diverses cytokines potentialisent la stimulation des LB induite par les TLR. Par exemple :

- l'IFN-α amplifie l'action des ligands du TLR7 et permet une réponse efficace à ces derniers même en l'absence de stimulation du BCR (Bekeredjian-Ding *et al.,* 2005; Douagi *et al.*, 2009),
- malgré quelques résultats discordants, les cytokines BAFF et *a proliferation-inducing ligand* (APRIL), qui appartiennent à la famille du TNF, semblent coopérer avec les TLR (Darce *et al.,* 2007; Katsenelson *et al.*, 2007; Ng *et al.*, 2006),
- il a aussi été montré que la protéine *high-mobility group box protein1* (HMGB1), via l'engagement de son récepteur (*receptor for advanced glycation end-products* (RAGE)), augmente la stimulation des LB par le TLR9 (Tian *et al.*, 2007).

Ces trois co-stimulations TLR-cytokines semblent avoir une implication dans les MAI systémiques, nous y reviendrons par la suite.

Pour conclure, les TLR collaborent positivement avec un autre signal important pour le LB : l'interaction CD40-CD40L qui a lieu lors de la rencontre avec un LT auxiliaire (Bernasconi *et al.,* 2002; Gantner *et al.*, 2003).

3. Fonctions des TLR chez les LB

3.1. Induction de réponses humorales efficaces

3.1.1. Réponses humorales T-dépendantes

Les réponses humorales vis-à-vis des Ag protéiques nécessitent la participation des LT auxiliaires. Rappelons que les TLR provoquent la maturation des cellules présentatrices d'Ag, notamment les CD, et qu'ainsi, ils collaborent indirectement à l'activation des LT auxiliaires et donc des LB.

L'étude du rôle des TLR exprimés par les LB, lors des réponses T-dépendantes, a été réalisée chez des souris dont la déficience en MyD88 était restreinte aux LB. La vaccination de ces souris, avec de l'albumine humaine et du LPS, active les LT auxiliaires, mais n'est pas capable d'induire une réponse humorale efficace contrairement aux souris sauvages. Ces résultats prouvent que la stimulation directe des TLR des LB participe à l'établissement d'une réponse humorale T-dépendante optimale (Pasare *et al.*, 2005).

Ces données ont, par la suite, été nuancées. Les réponses dirigées contre les Ag T-dépendants répétitifs semblent pouvoir s'affranchir de l'engagement des TLR (Gavin *et al.*, 2006). D'autre part, l'adjuvant le plus utilisé, l'alun, ne met pas en jeu les TLR, il stimule d'autres PRR (Meyer-Bahlburg *et al.*, 2007). Ce qui suggère que les TLR ne sont pas les seuls PRR impliqués dans la mise en place des réponses humorales T-dépendantes (Lambrecht *et al.*, 2009).

Néanmoins, des expériences réalisées *in vitro* sur des LB humains ont confirmé que, outre les signaux transmis par le BCR et par l'interaction avec les LT auxiliaires, les TLR apportent un troisième signal nécessaire à l'induction optimale d'une prolifération des LB, d'une différenciation en plasmocytes et d'une sécrétion d'Ig (Gantner *et al.,* 2003; Ruprecht *et al.*, 2006).

3.1.2. Réponses humorales T-indépendantes

Les TLR collaborent également aux réponses humorales T-indépendantes de type I mais aussi de type II. Ainsi, ils estompent la délimitation entre ces deux types de réponses T-indépendantes.

Les réponses de type I, induites par de faibles doses de 4-hydroxy-3,5-dinitrophenyl (NNP)-LPS, mettent en jeu le TLR4 des LB murins (Lanzavecchia *et al.*, 2007). La présence de ligands des TLR au sein des Ag T-indépendants de type II, des polysaccharides répétitifs présents à la surface des bactéries encapsulées comme *Streptococcus pneumoniae*, semblent être nécessaire à l'immunogénicité de ces Ag (Sen *et al.*, 2005). Il est intéressant de rappeler, ici, que les LB de la ZM spécialisés dans la lutte contre les bactéries encapsulées sont particulièrement sensibles à la stimulation des TLR (Bernasconi *et al.*, 2002). De plus, chez l'homme, une déficience en TLR provoque une susceptibilité aux infections invasives par *S. pneumoniae* et d'autres bactéries encapsulées (von Bernuth *et al.*, 2008). Par conséquent, les TLR des LB de la ZM pourraient avoir un rôle primordial dans les réponses humorales vis-à-vis des Ag T-indépendants de type II.

3.1.3. Induction et orientation de la commutation isotypique

Fonction	IgM	IgD	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA1	IgA2	IgE
Passage transplacentaire	-	-	++	+	++	++	-		-
Liaison au récepteur poly-Ig épithélial	++	-	-	-	-	-	+++		-
Activation du complément (voie classique)	+++	-	++	+/-	++	-	-		-
Fixation aux mastocytes	-	-	+	+	+/-	-	-		+++
Neutralisation (toxines)	+	-	++	++	++	++	++		-
Opsonisation	-	-	+++	-	+	+	+		-
ADCC (NK)	-	-	++	-	-	-	-		-

Tableau 4 - Quelques propriétés des classes et sous-classes d'Ig humaines. Cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC), cellules natural killer (NK). D'après Revillard J-P. (2001). Immunologie, DeBoeck Université, Paris.

Il existe différents isotypes d'Ig, on parle aussi de classes et de sous-classes d'Ig. C'est la partie constante de l'Ig, notée Fc pour fraction cristallisable, qui définit l'isotype. Lors des réactions immunitaires, sont d'abord sécrétées des IgM. Ensuite, un phénomène appelé commutation isotypique peut avoir lieu, permettant la production des IgG voire des IgA ou des IgE, selon les cas. Ces isotypes d'Ig présentent des propriétés fonctionnelles différentes (Tableau 4).

La commutation de classe a, premièrement, été décrite comme dépendante des LT. Par la suite, il a été montré que, dans certaines conditions, ce phénomène pouvait se dérouler sans la participation des LT.

Les TLR des LB sont impliqués dans l'induction des commutations isotypiques T-dépendante et T-indépendante, mais aussi dans leur orientation vers un isotype plutôt qu'un autre. Ainsi, des études *in vitro* ont apporté la preuve que le TLR9 des LB

humains collabore à la commutation **T-dépendante** vers les isotypes IgG et IgA tandis qu'il inhibe la production d'IgE (Gantner *et al.,* 2003; Ruprecht *et al.*, 2006). Par ailleurs, d'autres études indiquent que les TLR des LB permettent une commutation **T-indépendante** vers les isotypes IgA, IgG1, IgG2 et IgG3 en association avec l'IL-10 et les cytokines BAFF ou APRIL. Par contre, dans ces études, le TLR9 semblent s'opposer aux effets positifs de l'IL-4 sur l'orientation vers les isotypes IgG4 et IgE (He *et al.,* 2004; He *et al.*, 2007).

De plus, chez la souris, la mobilisation du TLR9 des LB favorise la commutation **T-dépendante** vers l'isotype "Th1" IgG2a (correspondant à l'IgG1 humaine). T-bet, un facteur de transcription dont nous reparlerons, est nécessaire à ce phénomène. Inversement, l'activation du TLR9 des LB inhibe l'orientation vers les isotypes "Th2" IgE et IgG1 (correspondant à l'IgG4 humaine) indépendamment de T-bet (Jegerlehner *et al.,* 2007; Liu *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2003).

3.2. Présentation d'Ag et orientation Th1

Nous avons vu, dans la partie I chapitre 2.2, que les LB pouvaient présenter efficacement des Ag aux LT. Comme pour les CD, l'activation des TLR chez les LB entraîne une augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation CD80, CD86 et des molécules du CMH de classe II. Cela favorise une stimulation efficiente des LT (Bamba *et al.,* 2005; Jiang *et al.*, 2005).

En outre, la mobilisation du TLR9 provoque la sécrétion de diverses cytokines comme l'IL-6, l'IL-10, le TNF-α … mais aussi l'IL-12. Cette dernière permet aux LB d'orienter les LT naïfs vers le phénotype Th1 (Shirota *et al.,* 2002; Wagner *et al.*, 2004).

Ainsi, même si l'engagement du TLR9 des LB ne semble pas capable, à lui seul, d'induire un phénotype Be1 typique, il permet :

- l'induction de l'expression du facteur de transcription T-bet. Cette protéine est nécessaire au développement des LBe1, et, plus généralement, au développement d'une réponse Th1 (Peng, 2006),

- l'inhibition de la commutation vers les isotypes "Th2" (chez l'homme, IgE et IgG4),

- la sécrétion d'IL-12.

Tout cela participe à l'orientation vers une réponse Th1.

4. TLR, LB et maladies auto-immunes systémiques

4.1. *In vitro* : rôle des TLR dans la stimulation des LB auto-réactifs

Au cours des MAI systémiques comme le LED, les LB sécrètent des auto-Ac dirigés contre un panel restreint d'auto-Ag, en particulier des IgG et des Ag contenant de l'ADN ou de l'ARN. Les mécanismes expliquant cette restriction étaient, jusqu'alors, inconnus. Certains chercheurs avaient, néanmoins, supputé l'existence de récepteurs spécifiques des auto-Ag du LED autres que le BCR, dès les années 80s (Christensen *et al.*, 2007).

La première preuve *in vitro* que les TLR représentent des co-récepteurs du BCR permettant l'activation des LB auto-réactifs, fut apportée en 2002 par l'équipe d'Ann Marshak-Rothstein. Cette dernière a montré que :

- l'activation de LB anti-IgG par des complexes immuns (CI), c'est-à-dire des complexes Ac-Ag, n'est possible que si les CI contiennent de l'ADN du soi,

- le co-signal apporté par l'ADN est transmis par le TLR9 (Leadbetter *et al.*, 2002).

Ainsi, l'ADN de mammifère, lorsqu'il est concentré dans les endosomes grâce à l'endocytose déclenchée par le BCR, est capable d'activer le TLR9 malgré sa faible richesse en motifs CpG non méthylés.

Cette découverte a été élargie (Figure 7) :

- aux LB anti-ADN dont la stimulation est dépendante du TLR9 (Viglianti *et al.*, 2003),

- au TLR7 dont la mobilisation participe à l'activation des LB dont le BCR reconnaît des Ag associés à de l'ARN notamment les LB anti-Ig mis en présence de CI contenant de l'ARN (Lau *et al.*, 2005).

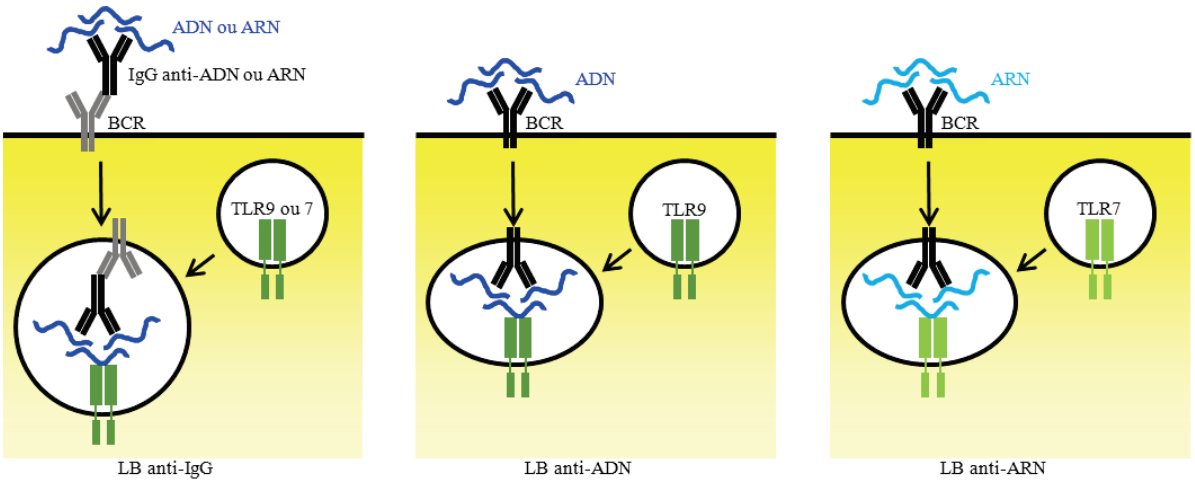

Figure 7 - Co-engagement récepteur du lymphocyte B-Toll-like récepteur, activation des lymphocytes B auto-immuns. Récepteur du lymphocyte B ou B cell receptor (BCR). D'après (Marshak-Rothstein, 2006).

4.2. *In vivo* : rôle des TLR dans la production d'auto-Ac

Chez différents modèles de souris lupiques, la déficience en TLR9 provoque une nette diminution des auto-Ac anti-Ag associés à l'ADN (Ac anti-nucléaires, Ac anti-chromatine, Ac anti-nucléosomes …) (Christensen *et al.,* 2006; Lartigue *et al.*, 2006). La raréfaction de ces auto-Ac est encore observée lorsque l'inactivation du TLR9 est restreinte aux LB (Christensen *et al.*, 2007). Par conséquent, chez les souris lupiques, le TLR9 contribue à l'activation des LB auto-immuns dirigés contre des Ag contenant de l'ADN selon un mécanisme intrinsèque aux LB. En outre, le TLR9 favorise la commutation vers l'isotype IgG2a qui est particulièrement impliqué dans la physiopathologie des MAI systémiques (Baudino *et al.,* 2006; Ehlers *et al.*, 2006).

De même, une déficience en TLR7 chez un modèle de souris lupique entraîne la disparition des auto-Ac anti-particules ribonucléoprotéiques (complexes

macromoléculaires de protéines et d'ARN) (Christensen *et al.*, 2006). De plus, il a été démontré qu'une surexpression du TLR7 est suffisante pour induire la production d'auto-Ac anti-particules ribonucléoprotéiques chez la souris normale (Deane *et al.*, 2007).

4.3. Conséquences fonctionnelles dans le lupus

En plus de leurs rôles sur la production d'auto-Ac, les TLR7 et 9 affectent le développement clinique de la maladie lupique. Cependant, sur ce point, les effets de l'inactivation de ces deux récepteurs divergent. La suppression du TLR7 conduit à une diminution de la lymphadénopathie, à une baisse de l'expression des marqueurs de l'activation des lymphocytes et des CDp, ainsi qu'à une réduction de l'atteinte rénale. Inversement, la déficience en TLR9 aggrave ces différents paramètres, suggérant un rôle régulateur du TLR9 (Christensen *et al.*, 2006).

Le TLR9 et le TLR7 possédant un profil d'expression et des voies de signalisation similaires, cette divergence a parue surprenante. D'autant plus que l'administration intrapéritonéale répétée de ligands du TLR9, tout comme celle de ligands du TLR7, déclenche ou aggrave la glomérulonéphrite lupique chez les souris génétiquement prédisposées (Anders *et al.,* 2004; Pawar *et al.*, 2006; Pawar *et al.*, 2006).

Par la suite, l'équipe de Mark Shlomchik a apporté des éclaircissements quant aux mécanismes de l'aggravation du lupus lors de la suppression du TLR9. Ces chercheurs ont, en effet, montré que l'exacerbation de la maladie observée lors du KO du TLR9 est dépendante du TLR7 (Nickerson *et al.*, 2010). Ainsi, le rôle régulateur du TLR9 pourrait passer par une inhibition du TLR7. Un phénomène de compétition, entre ces deux TLR, pour l'interaction avec UNC93B1, une protéine nécessaire à leur émigration du réticulum endoplasmique et donc à leur activation a justement été mis en évidence avec un biais favorable au TLR9 (Fukui *et al.,* 2009; Fukui *et al.*, 2011). En outre, il a été montré que les deux TLR interagissent physiquement, mais surtout que l'expression du TLR9 inhibe l'activation du TLR7, l'inverse n'étant pas vrai, et qu'il y a même une corrélation entre le niveau d'expression du TLR9 et le degré

d'inhibition du TLR7 (Wang *et al.*, 2006). Par conséquent, la suppression du TLR9 semble exacerber l'activation du TLR7 alors que l'inactivation du TLR7 n'a pas d'effet positif sur la stimulation du TLR9. L'effet régulateur du TLR9 ne serait alors pas lié à son état d'activation mais uniquement à son expression.

4.4. Boucles d'amplification

Les CI autoAc-autoAg contenant de l'ADN/ARN activent efficacement les CDp grâce au co-engagement d'un récepteur de la partie constante des IgG (FcγRIIa) et du TLR7 ou 9 (Figure 8). De cette activation résulte une importante sécrétion d'IFN-α (Barrat *et al.,* 2005; Means *et al.*, 2005). Il a été démontré que cette cytokine est impliquée dans la physiopathologie du lupus. L'augmentation de son taux plasmatique est, par ailleurs, corrélée à l'activité de la maladie. Elle facilite, entre autres, la stimulation des LB et tout particulièrement celle induite par les ligands du TLR7 (Bekeredjian-Ding *et al.*, 2005).

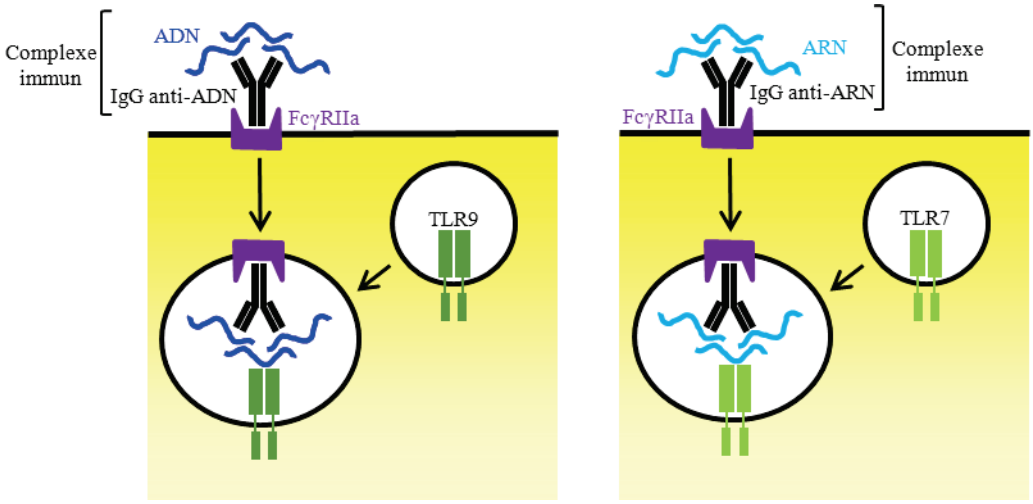

Figure 8 - Co-engagement FcγRIIa-Toll-like récepteur, activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes. Récepteur de type IIa de la fraction constante des IgG (FcγRIIa). D'après (Marshak-Rothstein, 2006).

Les CD myéloïdes (CDm) peuvent aussi être activées par les CI contenant de l'ADN/ARN (Christensen *et al.*, 2007). Cela permet :

- leur maturation donc la stimulation des LT,

- la sécrétion de cytokines comme BAFF qui favorise, par exemple, la stimulation des LB auto-réactifs par les TLR (Katsenelson *et al.*, 2007),

- la sécrétion de HMGB1, une protéine qui sensibilise les LB aux agonistes du TLR9 (Tian *et al.*, 2007).

Il existe donc différentes boucles d'amplification entre les LB, les CDp, les CDm et les LT (Figure 9). Et ce, via les CI contenant de l'ADN/ARN et les cytokines IFN-α, BAFF, HMGB1… Il en résulte une destruction tissulaire, et donc un relargage d'autoAg contenant de l'ADN/ARN, et par conséquent, la création d'un cercle vicieux. En apportant des ligands exogènes des TLR et/ou en provoquant des dommages tissulaires, les infections peuvent déclencher les MAI ou en aggraver l'évolution (Christensen *et al.*, 2007). Les TLR ont manifestement un rôle central dans l'initiation et le maintien du processus autoimmun. Cette classe de récepteurs représente donc une cible thérapeutique prometteuse dans le cadre du lupus voire d'autres MAI (cf. partie II, chapitre 7.2).

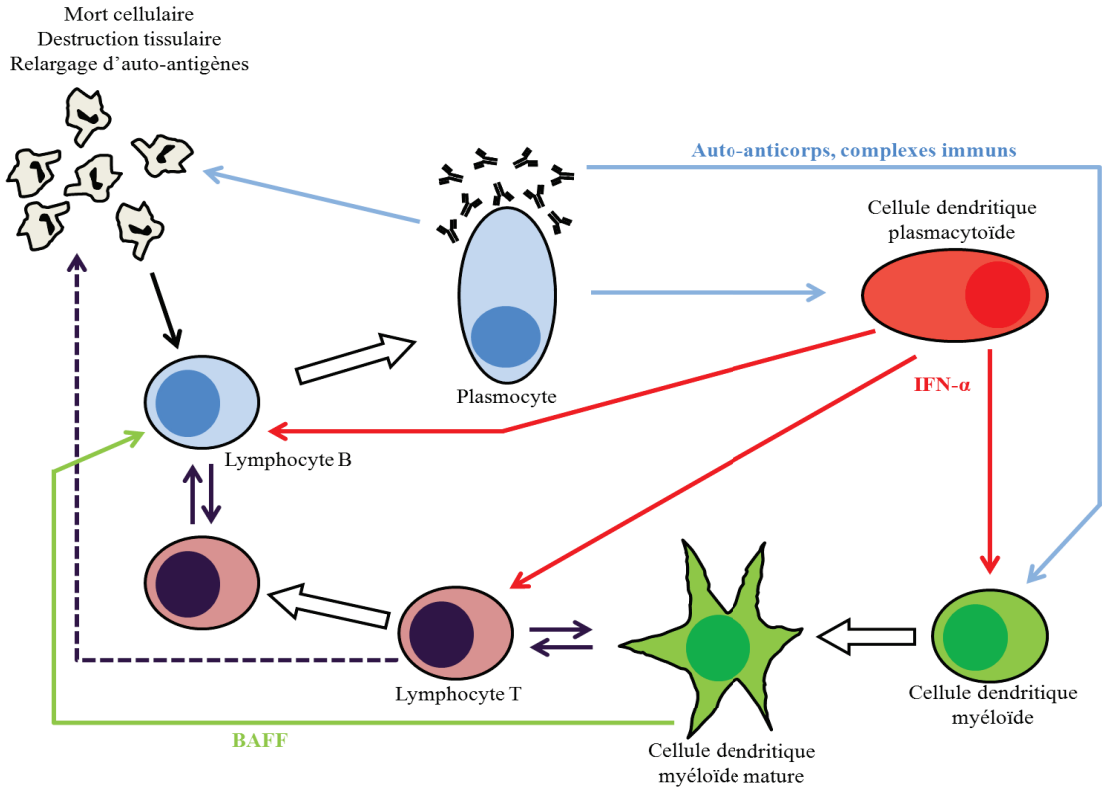

Figure 9 - **Boucles d'amplification.** B cell-activation factor of the tumor necrosis factor family (BAFF), interferon (IFN)-α. D'après (Christensen *et al.*, 2007).

4.5. Rôle des TLR dans la mise en place de la tolérance des LB

Pour conclure, nous évoquerons un article iconoclaste qui montre, chez l'homme, que la déficience fonctionnelle en TLR provoque une augmentation de la fréquence des LB autoréactifs parmi les LB naïfs. Les TLR semblent, par conséquent, participer aux mécanismes de mise en place de la tolérance des LB. Par contre, cet accroissement des LB autoimmuns ne s'accompagne pas de la sécrétion d'autoAc. Ce qui confirme que les TLR sont nécessaires à l'activation des LB autoréactifs. Ainsi, le co-engagement BCR-TLR aurait un rôle ambivalent. Il permettrait, chez les LB immatures, l'élimination des LB autoimmuns, alors que, chez les LB matures, il favoriserait la stimulation des LB autoréactifs (Isnardi *et al.*, 2008).

IV. Le syndrome de Gougerot-Sjögren

1. Définition et généralités

Le syndrome de Gougerot-Sjögren (SGS) est une MAI systémique dont la caractéristique principale est une inflammation chronique des glandes exocrines, tout particulièrement des glandes salivaires et lacrymales. Le nom de cette maladie rend hommage à deux médecins : le dermatologue français Henri Gougerot et l'ophtalmologue suédois Henrik Sjögren qui, les premiers, ont décrit cette affection. Ce syndrome est dit primitif lorsqu'il est isolé, il peut aussi être secondaire ou associé à une autre MAI systémique ou à une MAI spécifique d'organe.

La prévalence moyenne de la maladie oscille entre 0,2% et 3%. Comme la plupart des MAI, le SGS a une prédominance féminine, il touche 9 femmes pour 1 homme. Le SGS apparaît généralement vers 40-50 ans c'est-à-dire lors de la ménopause (Binard *et al.*, 2007).

Le SGS est une maladie complexe. Son étiologie, multifactorielle et mal connue, repose sur un terrain génétique défavorable qui interagit avec l'environnement.

La définition précise et donc le diagnostic du SGS primitif ont longtemps souffert de l'absence de critères diagnostiques précis et reconnus. Cela est désormais corrigé grâce aux critères (Tableau 5) développés et validés par le groupe de consensus américano-européen ou AECG (American European Consensus Group) (Vitali *et al.*, 2002).

1. Symptômes oculaires
Au moins l'un des trois critères ci-dessous
- sensation quotidienne, persistante et gênante d'yeux secs depuis plus de trois mois
- sensation fréquente de "sable dans les yeux"
- utilisation de larmes artificielles plus de trois fois par jour
2. Symptômes buccaux
Au moins l'un des trois critères ci-dessous
- sensation quotidienne de bouche sèche depuis plus de trois mois
- à l'âge adulte, épisodes récidivants ou permanents de gonflement parotidien
- consommation fréquente de liquides pour avaler les aliments secs
3. Signes objectifs d'atteinte oculaire
Au moins l'un des deux tests ci-dessous positif
- test de Schirmer ≤ 5 mm/5 min
- score de van Bijsterveld ≥ 4 (après examen au vert de Lissamine)
4. Signes objectifs d'atteinte salivaire
Au moins l'un des trois tests ci-dessous positif
- scintigraphie salivaire
- scintigraphie parotidienne
- flux salivaire sans stimulation ≤ 1,5 ml/15 min
5. Signes histologiques
- sialadénite sur la biopsie de glandes salivaires accessoires : au moins 1 foyer (agglomérat d'au moins 50 cellules mononucléées) par 4 mm^2 de tissu glandulaire
6. Auto-anticorps
Présence d'anticorps anti-SS-A (Ro) ou anti-SS-B (La)
Critères d'exclusion
- antécédents d'irradiation cervicale
- infection par le VHC ou le VIH
- lymphome préexistant
- sarcoïdose
- réaction du greffon contre l'hôte
- utilisation de médicaments anticholinergiques
Le diagnostic de syndrome de Gougerot-Sjögren primitif est porté devant :
- la présence de 4 items sur 6 avec présence obligatoire de l'item 5 ou de l'item 6, ou
- la présence de 3 des 4 items objectifs (items 3 à 6)
Le diagnostic de syndrome de Gougerot-Sjögren secondaire est porté devant la présence de l'item 1 ou 2 associé à deux des items 3, 4 et 5

Tableau 5 - Critères du groupe de consensus américano-européen pour le diagnostic du syndrome de Gougerot-Sjögren

Les symptômes de cette pathologie sont principalement une sécheresse oculaire (xérophtalmie), une sécheresse buccale (xérostomie), une fatigue chronique et des poly-arthralgies. Le SGS altère donc de façon importante la qualité de vie. D'un point de vue biologique, le SGS se caractérise par la présence d'auto-anticorps anti-nucléaires et tout particulièrement d'auto-anticorps dirigés contre deux ribonucléoprotéines : SS-A (Ro) et SS-B (La). Les facteurs rhumatoïdes sont aussi fréquemment détectés (50 à 70% des cas de SGS primitif) (Fox *et al.*, 1992). Histologiquement, le SGS se définit par la présence, sur la biopsie de glandes salivaires accessoires, d'un infiltrat lymphoïde nodulaire (Tableau 6).

Stade	Infiltrat pour 4 mm2 de tissu
0	Absence d'infiltrat
1	Infiltrat léger
2	Infiltrat moyen ou moins de 1 foyer*
3	1 foyer
4	Plus d'1 foyer

* Un foyer est un agglomérat de plus de 50 cellules mononucléées.

Tableau 6 - Classification de l'infiltration lymphoïde des glandes salivaires accessoires selon Chisholm et Mason. Seuls les stades 3 et 4 représentent un critère diagnostic du syndrome de Gougerot-Sjögren.

Concernant les complications, le SGS est la MAI au cours de laquelle l'augmentation du risque d'apparition d'un lymphome non hodgkinien est la plus importante : risque 44 fois plus grand que dans la population générale (Kassan *et al.*, 1978). Notons qu'il s'agit quasi exclusivement de lymphomes B et majoritairement de lymphomes de la zone marginale (comprenant les lymphomes du tissu lymphoïde associé aux muqueuses et les lymphomes monocytoïdes). Ces lymphomes se développent fréquemment dans les glandes salivaires (Voulgarelis *et al.*, 1999).

A ce jour, aucun traitement de fond capable de stopper le développement de la maladie n'est disponible. Néanmoins, et bien qu'il y ait des études contradictoires, l'hydroxychloroquine a une efficacité sur certains signes biologiques et pourrait avoir une efficacité sur les signes cliniques (Mariette, 2002). Mais c'est le rituximab qui semble être le traitement le plus prometteur. En effet, deux petits (faibles effectifs)

essais cliniques randomisés en double aveugle ont montré une efficacité du traitement précoce par le rituximab sur la fatigue et le syndrome sec. Deux essais de plus grande envergure sont en cours (Saraux, 2010).

Actuellement, le traitement du SGS est donc essentiellement symptomatique (Mariette, 2002).

2. Physiopathologie

2.1. Introduction

Le SGS est une maladie multifactorielle, quatre composantes peuvent être distinguées.

Une composante immunologique

La découverte dans la famille des malades d'autres MAI comme le LED, la PR ou les thyroïdites auto-immunes (TAI) est relativement fréquente. Cela suggère une prédisposition génétique, commune à plusieurs MAI, à une dérégulation du système immunitaire et à une perte du maintien de la tolérance au soi. La cible de cette perte de tolérance serait alors dictée par l'association d'autres facteurs notamment environnementaux.

Une composante épithéliale

La cellule cible, autrement dit la cellule épithéliale (CE), semble participer activement au processus autoimmun. Diverses anomalies intrinsèques et/ou extrinsèques sont, en effet, présentes : délocalisation de l'autoantigène SS-B (La) du noyau vers la membrane, acquisition d'un phénotype de cellule présentatrice d'antigène avec une augmentation de l'expression à la surface cellulaire des molécules du CMH et des molécules de co-stimulation CD80 et CD86, sécrétion de cytokines dont BAFF et de chimiokines (Manoussakis *et al.*, 2010). En outre, l'étude du modèle

murin NOD.scid suggère la présence d'anomalies pro-apoptotiques intrinsèques non induites par l'infiltrat lymphoïde (Masago *et al.*, 2001).

Une composante infectieuse

Une infection virale pourrait être à l'origine du SGS en déclenchant la maladie sur un terrain génétique favorable. Cette hypothèse est bien illustrée par l'étude des souris C57Bl/6-lpr/lpr génétiquement prédisposées à faire une MAI systémique qui développent une atteinte salivaire proche du SGS après avoir été infectées par le cytomégalovirus (CMV), un virus sialotrope (Fleck *et al.*, 1998). Chez l'homme, les principaux virus suspectés sont le virus d'Epstein-Barr (EBV), certains rétrovirus et les virus Coxsackie.

Une composante hormonale

Le SGS apparaît souvent lors de la ménopause et semble, en effet, être modulé par les hormones stéroïdiennes (Brennan *et al.*, 2003).

Nous allons, à présent, nous pencher sur les désordres immunologiques impliqués dans la pathogénie en nous intéressant tout d'abord à l'infiltrat lymphocytaire.

2.2. L'infiltrat glandulaire

L'infiltration des glandes exocrines, notamment des glandes salivaires, apparaît de manière lente et progressive ; lorsqu'elle est massive, elle peut représenter une très large proportion de la glande infiltrée.

Les macrophages, les CD notamment plasmacytoïdes (Gottenberg *et al.*, 2006) et les cellules NK peuvent être observés dans les infiltrats des glandes salivaires mais sont rares. Les cellules majoritaires sont les LT. 75% d'entre eux sont CD4+, les 25% restant sont CD8+. Les LB, quant à eux, représentent 20 à 30% des cellules de

l'infiltrat. Notons que la proportion de LB et de macrophages augmente avec la sévérité de l'infiltrat (Christodoulou *et al.*, 2010).

2.3. Les lymphocytes B dans le syndrome de Gougerot-Sjögren

De par leur nombre au sein des infiltrats, les LT ont longtemps été placés au cœur de la physiopathologie du SGS. Cependant, depuis quelques années, l'importance du rôle joué par les LB a été réévaluée. Nous évoquerons deux arguments. Premièrement, chez la souris transgénique pour BAFF qui développe une maladie semblable au LED puis semblable au SGS, le processus autoimmun résulte d'une altération de la tolérance au soi des LB et s'avère être indépendant des LT (Groom *et al.*, 2007). Deuxièmement, rappelons l'efficacité clinique de l'Ac anti-LB rituximab chez les patients atteints du SGS (cf. chapitre 1).

2.3.1. Les lymphocytes B infiltrant les glandes salivaires

Chez le modèle murin du SGS que représente la souris transgénique pour BAFF, des LB ayant un phénotype de LB de la ZM infiltrent les glandes salivaires (Groom *et al.*, 2002). De plus, le croisement avec une souris déficiente en lymphotoxine-β et par conséquent dépourvue de LB de la ZM aboutit à la disparition de la sialadénite. Cela suggère un rôle primordial des LB de la ZM dans le développement de cette sialadénite (Fletcher *et al.*, 2006). La présence de LB ayant un phénotype de type LB de la ZM a aussi été décrite dans les glandes salivaires (GS) de patients atteints d'un SGS (Daridon *et al.*, 2006). Par ailleurs, lors d'une déplétion des LB par traitement avec le rituximab, est observée une déplétion totale des LB circulants mais aussi des LB présents dans les GS. Durant la reconstitution, les premiers LB qui colonisent les GS ont un phénotype similaire aux LB T1 (Pers *et al.*, 2007). Des LB ayant un phénotype compatible avec les LB T2 ont aussi été identifiés (Daridon *et al.*, 2006). Il semblerait donc que, chez l'homme, ce ne sont pas les LB de la ZM qui infiltrent les GS mais des LB T qui vont se différencier *in situ* en LB de la ZM.

Si une différenciation en LB de la ZM semble possible, la différenciation en LB Fo ainsi que la formation de CG peut être envisagée puisque leur précurseur commun, le LB T2, est présent dans les GS. Effectivement, la présence de CG ectopiques est régulièrement et même abusivement décrite dans les GS au cours du SGS. Même si leur réelle présence n'a jamais été démontrée, plusieurs éléments décrits dans la littérature sont en faveur de leur existence. Des chimiokines comme CXCL13, CXCL12 et CCL21 sont exprimées par les CE au sein des GS au cours du SGS (Amft *et al.,* 2001; Barone *et al.*, 2005; Salomonsson *et al.*, 2003; Xanthou *et al.*, 2001). Ces chimiokines sont impliquées dans le homing des LB, des LT et des cellules dendritiques folliculaires (CDF) dans les OLS. Des CDF, bien qu'en faible nombre, sont aussi présentes dans les GS de patients atteints d'un SGS (Aziz *et al.*, 1997). L'équipe de Salomonsson décrit deux types d'infiltrats de LB : les CG+ (présents dans environ 17% des GS) et les CG-. Dans les CG+, ils mettent en évidence l'existence de LT, de CDF et de LB en prolifération $Ki67^{+}$. Alors que la majorité des CG- sont dépourvus de cellules en prolifération ou de CDF (Salomonsson *et al.*, 2003). Ces CDF formeraient un réseau similaire à celui observé dans les OLS (Jonsson *et al.*, 2008). Dans les 2 types d'infiltrats, les LT prédominent. De plus, les CG+ sont associés à la production locale d'auto-Ac anti-Ro (SS-A) et anti-La (SS-B) (Salomonsson *et al.*, 2003). L'expression de l'activation-induced cytidine deaminase (AID) a été mise en évidence au niveau du réseau de CDF (Bombardieri *et al.*, 2007), ce qui suggère la possibilité d'hypermutations somatiques et de commutation de classe. Beaucoup d'acteurs indispensables à la formation des CG sont présents dans les GS de certains patients atteints d'un SGS, mais la présence de LB du CG n'a jamais été démontrée.

La présence de LB mémoires CD27+ a été mise en évidence dans les GS (Daridon *et al.,* 2006; Hansen *et al.*, 2002). Leur présence peut être de diverses origines : ils peuvent être issus des éventuels CG ectopiques ou provenir de la circulation sanguine où les populations de eLBm5 et de LBm5 sont justement diminuées lors du SGS (Hansen *et al.*, 2002).

2.3.2. Les rôles pathogéniques des LB

Parmi les auto-Ac sécrétés lors du SGS, certains semblent concourir à la physiopathologie. Les Ac anti-récepteurs muscariniques M3 inhiberaient, par exemple, la jonction neuro-exocrine et participeraient ainsi à la diminution du fonctionnement des glandes exocrines (Sumida *et al.*, 2010). En outre, les Ac anti-Ag nucléaires sont susceptibles de former des CI contenant des acides nucléiques. Ces CI en stimulant les TLR endosomaux entraineraient la sécrétion de cytokines et de facteurs rhumatoïdes.

Les LB infiltrants les GS produisent des auto-Ac (Salomonsson *et al.*, 2003) mais aussi des cytokines. Nous avons, en effet, montré la présence au sein des infiltrats de Be1 exprimant IFNγ et de Be2 exprimant IL6, la présence de Be1 s'associant à la présence de LTh1 et celle de Be2 à la présence de LTh2 (cf. article n°3 en annexe). Les LB pourraient donc participer à la polarisation des LT CD4+ *in situ*.

Pour finir, les LB jouent un rôle direct dans l'apoptose des cellules épithéliales. Nous avons effectivement mis en évidence que les LB sont capables d'induire l'apoptose des CE selon un mécanisme qui met en jeu la protéine kinase C δ (cf. article n°4 en annexe).

2.4. Les TLR dans le syndrome de Gougerot-Sjögren

2.4.1. Introduction

Il existe de nombreux points communs entre le SGS et le LED. Comme le LED, le SGS est caractérisé par la présence :

- d'autoanticorps anti-antigènes nucléaires,
- d'une signature IFN, autrement dit d'une augmentation de l'expression des gènes induits par les IFN dans les GS et le sang (Emamian *et al.,* 2009; Gottenberg *et al.*, 2006; Hjelmervik *et al.*, 2005),
- d'une mise en jeu des CDp spécialisées dans la sécrétion d'IFNα, ces cellules ont été détectées dans les GS de malades mais pas dans les GS de témoins (Gottenberg *et al.*, 2006),
- d'une implication de BAFF (Mackay *et al.*, 2007),

- d'une initiation et/ou d'une aggravation de la maladie par des infections virales.

Cependant, le SGS présente une relative spécificité d'organes, certains auteurs voient donc le SGS comme un lupus des muqueuses. Comme dans le LED, il existe donc une probable mise en jeu des TLR, notamment endosomaux, chez les cellules immunitaires mais aussi chez les CE. Ces TLR pouvant être activés par des PAMP (acides nucléiques viraux) lors d'infections et/ou par des DAMP (corps apoptotiques, CI contenant des acides nucléiques du soi). Toutefois, l'implication des TLR dans le SGS est moins étudiée qu'elle ne l'est dans le LED.

2.4.2. Expression des TLR et des protéines impliquées dans leurs voies de signalisation par les cellules immunitaires

Il existe peu d'études s'intéressant à ce sujet. Il a, néanmoins, été montré une expression, chez les lymphocytes infiltrant les GS pathologiques, du TLR7, du TLR9 et d'IRF1, un facteur de transcription impliqué dans la voie de signalisation des TLR. Une augmentation de l'expression de l'ARNm de ces deux TLR et d'IRF1 au sein des cellules mononucléées du sang périphérique de malades a aussi été observée (Colonna, 2007; Zheng *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2010).

2.4.3. Expression fonctionnelle des TLR et des protéines impliquées dans leurs voies de signalisation par les cellules épithéliales des glandes salivaires

Lors du SGS, une augmentation de l'expression des protéines TLR2, 3, 4 et MyD88 a été mise en évidence par immunohistochimie chez les CE salivaires (Kawakami *et al.*, 2007). Cette augmentation a été confirmée par l'étude de l'expression de l'ARNm des TLR 2 et 4 (Spachidou *et al.*, 2007). Par ailleurs, les CE des canaux salivaires expriment aussi le TLR7 et le TLR9 (Zheng *et al.*, 2010). Lors du SGS, l'expression de ces deux TLR s'étend aux ilots épithéliaux et l'expression des gènes TLR8, TLR9 et IRF1 au sein des GS est augmentée (Gottenberg *et al.,* 2006; Hjelmervik *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2009). Enfin, le TLR3 est fortement exprimé dans de nombreuses CE. C'est aussi le cas chez les cellules salivaires qui semblent

l'exprimer à leur surface, contrairement à ce qui est décrit pour les cellules de l'immunité (Spachidou *et al.*, 2007).

Voyons à présent les conséquences fonctionnelles de l'activation de ces TLR. La stimulation par le poly(I:C), le ligand synthétique du TLR3, de la lignée cellulaire *Human Salivary Gland* ou, selon les paramètres étudiés, de CE salivaires non néoplasiques induit la sécrétion de chimiokines qui permettent le recrutement des LT ainsi que d'IL-6 et d'IFNβ (Kawakami *et al.,* 2007; Li *et al.*, 2010; Manoussakis *et al.*, 2010). Par conséquent, l'activation des TLR chez les CE salivaires pourrait initier l'infiltration lymphocytaire et le processus inflammatoire. Le poly(I:C), tout comme le peptidoglycane et le LPS, ligands respectivement des TLR2 et 4, augmentent aussi l'expression du CD54 (ICAM-1), du CD40 et des molécules du CMH-I à la surface des CE salivaires encourageant de ce fait la présentation d'Ag aux LT (Spachidou *et al.*, 2007). Enfin, le poly(I:C) est capable d'induire l'apoptose des CE. En outre, les cellules provenant de GS pathologiques s'avèrent plus sensibles à ce phénomène (Manoussakis *et al.*, 2010). De par ces différents effets, l'activation des TLR chez les CE salivaires semble donc participer à la physiopathologie du SGS.

Pour conclure, chez la souris NZB/NZW F1 femelle qui développe une MAI proche du SGS, la stimulation systémique du TLR3 par injections itératives de poly(I:C) diminue la sécrétion de salive puis accélère la sialadénite. Ces phénomènes s'accompagnant d'une augmentation de l'expression de chimiokines, d'IFN de type 1 et de cytokines proinflammatoires au sein des GS (Deshmukh *et al.,* 2009; Nandula *et al.*, 2011).

2.4.4. Relations entre BAFF et les TLR lors du SGS

BAFF est une cytokine appartenant à la famille du TNF. Cette cytokine a de nombreux effets sur les LB. Elle est surtout connue pour favoriser la survie des LB notamment des LB autoimmuns (Thien *et al.*, 2004), elle contribue aussi à leur maturation en LB de la ZM (Batten *et al.*, 2000). Plusieurs arguments indiquent qu'elle est impliquée dans la physiopathologie du SGS. Premièrement, l'étude de la souris transgénique pour BAFF a démontré que la surexpression de cette cytokine en

entrainant une perte de la tolérance des LB aboutit à l'apparition d'une MAI proche du SGS (Groom *et al.*, 2002). Deuxièmement, une augmentation de son taux plasmatique et de son expression au sein des GS est présente chez les malades, (Groom *et al.*, 2002).

Par ailleurs, il existe clairement des interconnexions entre BAFF et les TLR. Tout d'abord, la stimulation des TLR7 et 9 accroit l'expression d'un récepteur de BAFF, *Transmembrane Activator and CAML Interactor* (TACI), à la surface des LB murins (Groom *et al.,* 2007; Katsenelson *et al.*, 2007). Ce phénomène a aussi lieu chez l'homme mais uniquement dans les LB de la ZM (He *et al.*, 2010). Réciproquement, la stimulation des LB par BAFF augmente l'expression de l'ARNm des TLR3, 7 et 9 (Groom *et al.,* 2007; Xu *et al.*, 2007). Une coopération entre BAFF et le TLR9 chez les LB a, de plus, été observée par plusieurs équipes et sur différents paramètres : la survie, la prolifération, la sécrétion de cytokines, et d'Ig (He *et al.,* 2004; Katsenelson *et al.*, 2007; Ng *et al.*, 2006; Treml *et al.*, 2007). D'autre part, les relations entre BAFF et les TLR s'avèrent encore plus étroites qu'on ne l'imaginait jusqu'à récemment. Il a effectivement été démontré que TACI peut induire une voie de signalisation semblable à celle des TLR en interagissant directement avec MyD88 (He *et al.*, 2010).

Enfin, l'équipe de Cerutti a décrit dans les amygdales des interactions, mettant en jeu BAFF et les TLR, entre les LB et les CE. En effet, dans les cryptes amygdaliennes la stimulation du TLR3 des CE induit la sécrétion de BAFF et d'IL-10. Ces deux cytokines de concert avec les ligands du TLR3 induisent, chez les LB locaux, la commutation de classe et la sécrétion d'Ig. La stimulation du TLR3 des CE participe donc à l'activation locale des LB (Xu *et al.*, 2007). Les cellules épithéliales salivaires sont, elles aussi, capables de sécréter BAFF suite à leur activation par le poly(I:C) ou par le réovirus-1 (virus à ARNdb) (Ittah *et al.*, 2008). Au cours du SGS, pourrait donc se développer un processus similaire à celui décrit par Cerutti mais aussi à celui proposé par Shlomchik et Christensen dans le LED (cf. Figure 9) dans lequel sont impliqués les LB, les CE, les CDp, certains TLR, BAFF et les IFN (Figure 10).

Rappelons, pour finir, que le TLR3 est activé par de l'ARN double brin d'origine virale mais peut aussi être activé par de l'ARN issu de cellules en nécrose (Brentano *et al.*, 2005).

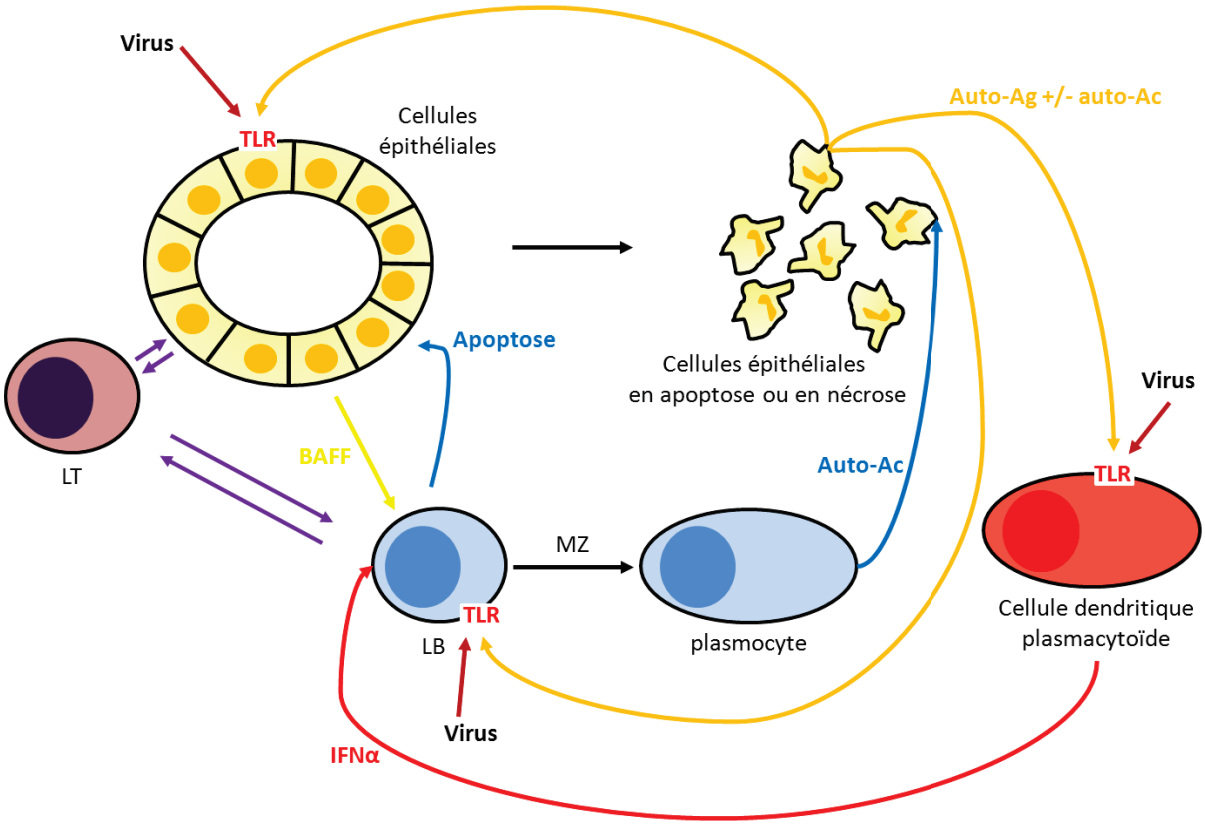

Figure 10 - Rôles des TLR et des LB dans la physiopathologie du SGS. La stimulation des TLR par des ligands microbiens ou endogènes entraine, chez les cellules épithéliales salivaires : la sécrétion de chimiokines, de cytokines proinflammatoires, l'expression de molécules impliquées dans la présentation d'Ag aux LT et l'apoptose, chez les cellules dendritiques plasmacytoïdes : la sécrétion d'IFN, chez les LB en association avec BAFF et l'IFNα : une sécrétion de cytokines, une présentation antigénique efficace, une prolifération, la maturation en plasmocytes et la sécrétion d'auto-Ac.

OBJECTIFS

Premièrement, comme nous avons pu le voir lors de l'introduction, les fonctions des LB au sein du système immunitaire s'avèrent beaucoup plus larges qu'on ne le pensait. De plus, ces cellules jouent un rôle essentiel au cours de diverses MAI systémiques.

Deuxièmement, la stimulation des TLR exprimés par les LB a d'innombrables effets et concourt au développement des réactions immunitaires. Le TLR9 qui reconnait l'ADN microbien mais aussi l'ADN du soi est un des TLR les plus fortement exprimés chez le LB. Il a également été impliqué dans la physiopathologie de certaines MAI systémiques. Cependant, le fonctionnement et les rôles du TLR9 chez les LB ne sont pas encore totalement élucidés.

Troisièmement, si le syndrome de Gougerot-Sjögren est une maladie auto-immune systémique dont la physiopathologie reste mal comprise, les effets thérapeutiques prometteurs d'un Ac anti-LB, le rituximab, suggère que les LB y jouent un rôle primordial. De plus, le SGS présente de nombreux points communs avec le LED : présence d'auto-Ac anti-Ag nucléaires, signature IFN … Ainsi, comme dans le lupus, il existe une probable mise en jeu des TLR, notamment endosomaux. Ces TLR, activables par des PAMP (acides nucléiques viraux) et/ou par des DAMP (corps apoptotiques, CI contenant des acides nucléiques du soi), pourraient agir de concert avec des anomalies intrinsèques (sensibilité à l'apoptose …) et/ou des infections des tissus épithéliaux concernés ainsi qu'avec BAFF. Toutefois, l'implication des TLR dans le SGS est peu étudiée.

Notre objectif a donc été d'étudier le rôle et le fonctionnement du TLR9 chez les LB humains, notamment dans le contexte du SGS.

Pour ce faire, nous avons tout d'abord étudié l'expression du TLR9 par les différents LB infiltrant les GS lors du SGS et spécialement chez les LB autoimmuns.

Ensuite, les LB transitionnels sont les premiers LB envahissant les GS au cours du SGS. De plus, ces LB transitionnels représentent une étape importante dans la maturation des LB : étape de contrôle périphérique de la tolérance et d'aiguillage soit vers les LB Fo, responsables des réponses humorales via la formation de CG, soit vers les LB de la ZM, responsables des réponses humorales sans formation de CG et de la

production d'Ac polyspécifiques et auto-immuns. Les facteurs régulant l'engagement du LB transitionnel vers une voie de différenciation ou l'autre sont mal connus. Nous avons donc examiné, à l'aide d'expériences *in vitro*, l'éventuel rôle du TLR9 dans l'activation et la maturation des LB transitionnels.

L'accès de l'ADN au TLR9 situé dans le compartiment endosomal semble être un facteur limitant. Normalement, l'ADN du soi n'est pas endocyté assez efficacement pour atteindre le TLR9. L'engagement du BCR est une des possibilités pour que cet ADN soit capable d'accéder au TLR9 et puisse le stimuler. Par ailleurs, LL37, un peptide initialement connu pour ses propriétés anti-microbiennes, en s'associant à l'ADN du soi le rend résistant aux nucléases, facilite son endocytose par certaines cellules et lui permet ainsi d'activer le TLR9. Ainsi, parallèlement à l'engagement du BCR, l'association au LL37 pourrait être un mécanisme permettant à l'ADN du soi d'accéder au TLR9 des LB et de le stimuler. Or, le LL37 est produit par les GS. Nous avons donc étudié le possible rôle du LL37 dans la physiopathologie du SGS.

Enfin, un TLR9 muté artificiellement pour être exprimé à la surface cellulaire s'est avéré très sensible à la stimulation par l'ADN du soi. Ainsi, une expression anormale du TLR9 à la surface des cellules pourraient participer au développement de MAI comme le SGS. Lors de nos études, nous avons observé une expression du TLR9 à la surface des LB. Par conséquent, nous avons cherché à analyser ce TLR9 de surface ainsi que son rôle.

MATERIELS ET METHODES

I. Lignée cellulaire

A été utilisée la lignée de fibroblastes murins NIH3T3 transfectés par le gène du CD40L humain.

II. Sources de cellules primaires, purifications cellulaires

1. Les LB d'amygdales

Les LB sont élués d'amygdales hypertrophiques d'enfants âgés de 2 à 15 ans. Ces amygdales sont broyées mécaniquement et les fragments sont tamisés à travers un filtre de 70 µm (BD Biosciences).

Les cellules d'amygdales sont suspendues dans du *Hank's balanced salt solution* (HBSS) (Cambrex Bioscience), puis séparées par centrifugation sur du Ficoll-Hypaque (Eurobio) à 450 g pendant 30 minutes (min). Les lymphocytes totaux sont récupérés à partir de l'anneau et comptés avant d'être déplétés en LT par la technique des rosettes.

Les rosettes : cette technique est basée sur le fait que les LT, par l'intermédiaire de leur molécule de surface CD2, ont la capacité de se fixer aux globules rouges de mouton (GRM). Une suspension de GRM (Eurobio) préparée à 2% dans du milieu RPMI 1640 (Invitrogen) est incubée volume à volume (V/V) avec les lymphocytes totaux (2.10^8 cellules pour 10ml de SVF) à 37°C pendant 10 min. Après 1 heure d'incubation dans la glace, la suspension est déposée sur Ficoll-Hypaque, puis centrifugée à 450 g pendant 35 min. Les LB de l'anneau sont alors récupérés et comptés, leur pureté est vérifiée par cytométrie.

2. Les LB du sang périphérique de témoins sains

L'isolement des cellules mononucléées du sang périphérique est réalisé à partir d'échantillons de sang de témoins sains. Le sang collecté est dilué de moitié avant d'être déposé sur Ficoll-Hypaque. Après centrifugation, les cellules mononucléées sont récupérées dans l'anneau, lavés en HBSS puis comptés. Les LB sont alors purifiés à l'aide du kit *Human B cell enrichment kit without CD43 depletion* EasySep® (StemCell Technologies). Grâce à un aimant et des billes magnétiques recouvertes par un panel d'Ac, ce kit permet l'élimination de toutes les cellules sauf des LB.

3. Les LB du sang de cordon

L'isolement des LB du sang de cordon est réalisé de la même façon que pour les LB du sang périphérique.

4. Tri cellulaire

Les tris cellulaires de sous-populations de LB sont réalisés sur un cytomètre ou cytofluorimètre de flux EPICS®ELITE (Beckman-Coulter).

Les tris de LB transitionnels et de LB matures sont effectués à partir de LB de sang de cordon grâce à trois marqueurs membranaires : CD3, CD24 et CD38. Les LB transitionnels sont $CD3^-$, $CD24^{fort}$, $CD38^{fort}$ alors que les LB matures sont $CD3^-$, $CD24^+$, $CD38^+$.

Les marquages sont réalisés sur 1 à 2.10^7 cellules. Les cellules sont incubées avec les Ac pendant 30 min à 4°C et à l'obscurité puis lavées en HBSS. Après chaque tri, les échantillons sont analysés afin de vérifier la pureté des cellules.

III. Cultures cellulaires

1. Les milieux de culture

Le Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) et le milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) (Cambrex Biowittaker^{TM}, Verviers/Belgium) sont utilisés avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (Invitrogen Life Technologies), 2mM de L-Glutamine (Invitrogen Life Technologies), 100 µg/ml de pénicilline et de 200 U/ml streptomycine (Panpharma, Fougères/France). Ainsi préparés, ils sont nommés DMEM complet et RPMI 1640 complet.

2. Cultures cellulaires et stimulations

Les LB sont cultivés dans du milieu RPMI complet, en plaques 96 puits à raison de 1 à 2.10^5 cellules par puits.

Concernant les cultures en présence de fibroblastes CD40L, les fibroblastes sont récupérés à partir de flasques et cultivés en plaques 96 puits dans du DMEM complet à une concentration finale de 7.10^5 cellules/ml. Après 24H, ils sont lavés 2 fois en *phosphate buffered saline* (PBS) (CryoBioSystem), traités à la mitomycine (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim/Germany) pendant 30 min, puis lavés 2 fois avec du DMEM complet et 1 fois avec du PBS. Les LB sont ensuite ajoutés sur les fibroblastes dans du RPMI 1640 complet.

Lors de ces cultures, les LB sont stimulés ou non par les agents suivants :

- ODN CpG de type B n°2006 (Invivogen, San Diego, CA/USA) préparés à une concentration finale de 0,25 µM,
- billes recouvertes d'Ac anti-IgM (Biorad) à 10µg/ml,
- IL-2 (Immunotools) à 100UI/ml.

Concernant l'étude de l'effet du peptide LL37, nous avons stimulés les LB par des CpG-B à 0,12µM et/ou le peptide LL37 à 4µM (Anaspec) pendant 15 minutes.

Suite à cette stimulation, les LB sont lavés 3 fois et incubés pendant 18 heures supplémentaires.

Concernant l'étude de l'effet d'un *crosslink* du TLR9 de surface, des Ac anti-IgG de souris, rat et/ou chèvre (Tableau 7) dilués à 10µg/ml dans du tampon carbonate/bicarbonate pH 9 sont incubés pendant une nuit à 4°C dans des puits (plaques 96 puits) afin de recouvrir le fond de ces derniers avec les Ac. Après des lavages, les Ac anti-TLR9 et/ou l'Ac anti-IgM/G (10µg/ml) sont incubés pendant 1 heure à 37°C dans les puits correspondants. Après avoir lavé les puits, les LB sont incubés pendant 24 heures en présence ou non de CpG-B.

Anticorps	Spécificité	Hôte	Isotype	Fournisseur
Anti-IgM/IgG	Homme	Chèvre	IgG	Jackson
Anti-TLR9	Homme	Souris	IgG1	Imgenex
Anti-TLR9	Homme	Rat	IgG2a	eBiosciences
Anti-IgG	Chèvre	Lapin	Fab'2	Jackson
Anti-IgG	Souris	Chèvre	Fab'2	Jackson
Anti-IgG	Rat	Ane	Fab'2	Jackson

Tableau 7 - Anticorps utilisés en culture.

IV. Cytofluorimétrie

1. Etude de l'expression de protéines

Pour analyser l'expression des marqueurs de surface sur les LB, les cellules sont récupérées et marquées par des Ac spécifiques couplés à des fluochromes (Tableau 8) selon la procédure standard. La détection des protéines intracellulaires est réalisée grâce à une étape préalable de fixation et de perméabilisation à l'aide du kit *Cytofix/Cytoperm*^{TM} *Fixation/Permeabilization Kit* (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA/USA). Les cellules ainsi marquées sont analysées avec le cytomètre EPICS XL (Beckman & Coulter, Villepinte/France). Les résultats de l'analyse sont étudiés avec le logiciel EXPO 32.

Anticorps	Spécificité	Hôte	Conjugué	Isotype	Fournisseur
Anti-CD3	Homme	Souris	FITC	IgG1	Immunotech
Anti-CD10	Homme	Souris	FITC	IgG1	Immunotech
Anti-CD19	Homme	Souris	PC7	IgG1	Immunotech
Anti-CD21	Homme	Souris	FITC	IgG1	Immunotech
Anti-CD23	Homme	Souris	FITC	IgG1	Immunotech
Anti-CD24	Homme	Souris	PE	IgG1	Immunotech
Anti-CD25	Homme	Souris	FITC	IgG1	
Anti-CD38	Homme	Souris	PC5	IgG1	Immunotech
Anti-IgD	Homme	Souris	FITC	IgG2a	Pharmingen
Anti-IgD	Homme	Souris	PE	IgG2a	Pharmingen
Anti-IgM	Homme	Lapin	FITC	Fab'2	Dako
Anti-Notch-2	Homme	Chèvre		IgG	R&D systems
Anti-TLR9	Homme	Souris	FITC	IgG1	Imgenex
Anti-IgG	Chèvre	Ane	FITC	Fab'2	Jackson
Isotype IgG1		Souris	FITC	IgG1	Immunotech
Isotype IgG1		Souris	PE	IgG1	Immunotech
Isotype IgG1		Souris	Biotine	IgG1	Immunotech
CpG-B			FITC		Invivogen

Tableau 8 - Anticorps utilisés en cytométrie. Isothiocyanate de fluorescéine (FITC), phycoérythrine (PE), phycoérythrine-cyanine-5 (PC5), phycoérythrine-cyanine-7 (PC7).

2. Etude de la prolifération

L'utilisation du marqueur fluorescent carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFDA, SE) (Molecular Probes) autorise l'évaluation de la prolifération des LB par cytométrie. Le CFDA, SE est lipophile, il est capable de traverser spontanément les membranes cellulaires. Il est transformé par les estérases cellulaires en carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) qui se fixe de manière covalente aux protéines intracellulaires. La fluorescence des cellules au repos est alors stable au cours du temps. Lorsque les cellules se divisent, le CFSE se répartit uniformément entre les deux cellules filles qui sont donc deux fois moins fluorescentes que la cellule mère. Ainsi, chaque division successive se traduit par la réduction d'un facteur deux de l'intensité de la fluorescence cellulaire. C'est cette diminution qui est appréciée par cytométrie.

Les LB sont mis en suspension dans du PBS-bovine serum albumin (BSA) (Sigma) 0,1% puis incubés avec du CFDA, SE 2µM pendant 10 min à 37°C et à

l'obscurité. Suite à deux lavages en RPMI-SVF 10% froid, le marquage est contrôlé et les cellules sont mises en culture. Après quatre jours de culture, le marquage CFSE est analysé par cytométrie afin d'évaluer la prolifération des cellules. Un exemple de profil de fluorescence caractéristique est présenté figure 11.

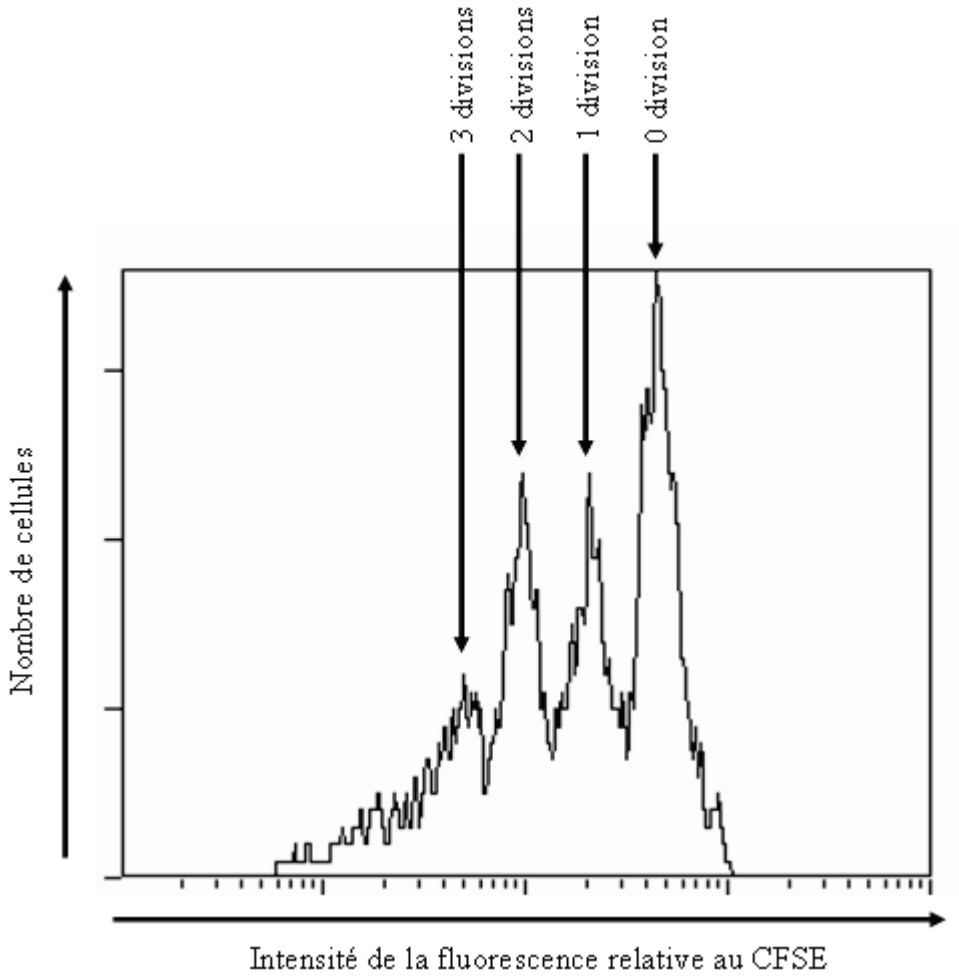

Figure 11 - Exemple d'histogramme de cytométrie obtenu à partir de LB marqués par le CFSE et ayant proliféré.

V. Analyse quantitative de l'expression d'ARNm

1. Extraction d'ARN

L'ARN total est extrait à l'aide du kit RNAble® (Eurobio) par une méthode dérivée de la technique de Chomczynski et Sacchi (1987) qui a été adaptée aux petites quantités de cellules (<10^6cellules). Les culots cellulaires sont repris dans 800µL de

tampon de lyse auxquels sont ajoutés 160µL de chloroforme. Le mélange est "vortexé" et laissé dans la glace pendant 15 min, puis centrifugé pendant 45 min à 12000g. Le surnageant contenant l'ARN est récupéré et précipité par deux volumes d'éthanol absolu pendant 2 heures ou une nuit à -20°C. Le précipitat d'ARN est collecté par une centrifugation de 15 min à 12000g. L'ARN est ensuite lavé deux fois avec de l'éthanol à 70%, séché à l'air libre puis repris dans de l'eau di-éthyl pyro-carbonate (DEPC) (Sigma). Cet ARN est enfin dosé par spectrophotométrie s'assurant d'un ratio DO 260nm/DO 280nm compris entre 1,6 et 1,9.

2. Retrotranscription-polymerase chain reaction quantitative (RT-PCRq)

Rétrotranscription : L'ADN complémentaire (ADNc) est synthétisé par la technique de "random priming" dans un volume final de 20µL. L'ARN (500ng à 1µg) est incubé avec 150 ng d'hexanucléotides (Invitrogen) et 0,5mM de dNTPs (Invitrogen) à 65°C pendant 5 min. Après une min de refroidissement dans la glace, 10mM de dithiothréitol (DTT), 100U de transcriptase inverse Superscript II (Invitrogen) et du tampon de réaction sont ajoutés à l'ARN. Après 10 min d'incubation à 25°C et 2 heures d'incubation à 42°C, l'enzyme est inactivée par 10 min à 75°C. Le mélange d'ADNc est conservé à -20°C.

PCR quantitative : La PCR quantitative en temps réel est réalisée en duplicat dans un mélange de 20µL contenant 50ng d'ADNc, 500nM de chaque amorce spécifique sens et anti-sens (Tableau 9), du tampon SYBR®Green à 1X (Applied biosystem), le tout ajusté à 20µL avec de l'eau pure. Pour chaque expérience, un témoin est réalisé ne contenant que de l'eau et le mélange réactionnel (amorces et SYBR®Green 1X). La PCR consiste en 2 min à 50°C, puis 3 min à 95°C, suivi de 40 cycles à 94°C 15 secondes, 60°C une min. L'expression des transcrits est exprimée par rapport à celle du transcrit de la GAPDH, il s'agit d'une expression relative.

TLR9 sens	TGAAGACTTCAGGCCCAACTG
TLR9 antisens	TGCACGGTCACCAGGTTGT
TLR7 sens	CACCAAAAGCGTGTTTTGAAATT
TLR7 antisens	TTGGTGGCTCCCCTGAAATA
TLR3 sens	CCCTTTGATTGCACGTGTGA
TLR3 antisens	TGTTGGTATGGGTCTCGTTAATCC
GAPDH sens	TGCACCACCAACTGCTTAGC
GAPDH antisens	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

Tableau 9 - Amorces utilisées pour la PCR quantitative.

VI. Dosage des immunoglobulines

La différenciation terminale en plasmocytes est déterminée en dosant les IgM et IgG sécrétées dans le surnageant après sept jours de culture. Ce dosage est réalisé par la technique enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA). Les puits de plaques ELISA sont recouverts d'Ac anti-IgM ou anti-IgG (Tableau 10). Les plaques sont lavées et saturées en PBS-BSA 3% puis incubées successivement avec :

- plusieurs dilutions des surnageants à doser ainsi que la gamme étalon,
- un Ac anti-IgM ou anti-IgG marqué à la *horse radish peroxidase* (HRP),
- le substrat de la HRP : le 1,2-phénylènediamine (OPD) (Dako) associé à de l'eau oxygénée (Gifrer). Il se développe alors une réaction colorée proportionnelle à la quantité d'IgM ou d'IgG contenue dans le surnageant. Cette réaction est stoppée par ajout d'acide sulfurique (Merck). Un spectrophotomètre d'absorption permet de mesurer à 492nm la densité optique de chaque puits et ainsi de calculer, grâce à la gamme étalon, la concentration des surnageants de culture en IgM ou IgG.

Anticorps	Spécificité	Hôte	Conjugué	Isotype	Fournisseur
Anti-IgG	Homme	Chèvre		Fab'2	Jackson
Anti-IgG	Homme	Lapin	HRP	Fab'2	Dako
Anti-IgM	Homme	Lapin		Fab'2	Dako
Anti-IgM	Homme	Lapin	HRP	Fab'2	Dako

Tableau 10 - Anticorps utilisés en ELISA.

VII. Détection des auto-Ac anti-nucléaires

Les Ac anti-nucléaires et anti-cytoplasme sont détectés par immunofluorescence indirecte. Des cellules appartenant à la lignée Hep2 issue d'un carcinome laryngé sont fixées et perméabilisées à l'aide d'une solution d'éthanol 20% et d'acétone 80% pendant 5 minutes. Les cellules sont alors incubées avec les surnageants de culture pendant 2 heures à température ambiante, lavées puis révélées en utilisant un Ac secondaire anti-Ig humaines marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Jackson). Les lames sont enfin analysées à l'aide d'un microscope à fluorescence (Zeiss).

VIII. Dosage de l'IL-6

Les surnageants à analyser sont collectés, les particules résiduelles sont éliminées par centrifugation puis ils sont conservés à –80°C. Le taux de l'IL-6 est mesuré par le kit EIA IL-6 (Beckman & Coulter). Le seuil de détection du kit est de 3 pg/ml.

IX. Immunofluorescence et microscopie confocale

Les biopsies d'amygdales ou de glandes salivaires accessoires sont incorporées dans du milieu de montage pour cryotomie (composé OCT, Miles Laboratories), subissent une congélation flash dans de l'isopentane puis sont conservées à -80°C. Des coupes de 4 à 10 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un cryostat et sont déposées sur des lames SuperFrost (Microm). Les coupes sont alors marquées par immunofluorescence ou conservées à -80°C.

Les coupes sont fixées et perméabilisées dans de l'acétone à 4°C pendant 10 minutes puis saturées dans une solution de PBS-BSA 1%. Après incubation avec les Ac primaires (Tableau 11), les coupes sont lavées, incubées avec les Ac secondaires et/ou la streptavidine conjugués à la FITC, à l'isothiocyanate de tetramethylrhodamine (TRITC) ou à la Rhodamine Red-X (RRX), puis de nouveau lavées. Après montage

entre lame et lamelle en utilisant le milieu Vectasheild (Vector Laboratories), les marquages sont analysés à l'aide d'un système d'imagerie confocale TCS-NT (Leica). Notons que les différents contrôles isotypiques réalisés se sont avérés négatifs.

L'ADN apoptotique est marqué par la technique *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling* (TUNEL) en utilisant le kit *In situ cell death detection kit, fluorescein* (Roche). Pour cette technique, les coupes sont fixées par de la paraformaldéhyde (PFA) 1% tamponnée puis perméabilisées par une solution de Triton X100 1% et de citrate de Na 1%.

Concernant l'étude du TLR9 de surface, le *crosslink* du BCR et les marquages sont réalisés en tubes de cytométrie, les cellules sont ensuite fixées par de la PFA 4% et déposées sur des lames à l'aide d'une cytocentrifugeuse. Afin de stimuler le BCR, les LB d'amygdales sont incubés à 4°C pendant 20 minutes avec un Ac de lapin anti-IgM (Tableau 11), lavés, incubés avec un Ac anti-IgG de lapin à 4°C pendant 20 minutes puis à 37°C durant 10 minutes.

Anticorps	Spécificité	Hôte	Conjugué	Isotype	Fournisseur
Anti-TLR9	Homme	Souris		IgG1	Imgenex
Anti-LL37	Homme	Souris		IgG1	Santa Cruz
Anti-LL37	Homme	Lapin		IgG	Santa Cruz
Anti-CD20	Homme	Lapin		IgG	Interchim
Anti-CD16	Homme	Souris	FITC	IgG1	Beckman-Coulter
Anti-CD11b	Homme	Souris	FITC	IgG1	Beckman-Coulter
Anti-CK18	Homme	Souris	FITC	IgG	Sigma
Anti-IgD	Homme	Lapin	FITC	Fab'2	Dako
9G4	Homme	Rat			Dr. Freda K, Stevenson, S Southampton, UK
Anti-IgM	Homme	Lapin			Dako
Toxine cholérique B			TRITC		Sigma
CpG-B			FITC		Invivogen
Anti-IgG	Souris	Ane	FITC	Fab'2	Jackson
Anti-IgG	Souris	Ane	RRX	Fab'2	Jackson
Anti-IgG	Lapin	Mouton			Sigma
Anti-IgG	Lapin	Ane	RRX	Fab'2	Jackson
Anti-IgG	Lapin	Ane	FITC	Fab'2	Jackson
Anti-IgG	Rat	Ane	biotine	Fab'2	Jackson
Streptavidine			TRITC		Jackson

Tableau 11 - Anticorps utilisés en immunofluorescence. tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC), Rhodamine Red-X (RRX).

X. Isolement des radeaux lipidiques

Les radeaux lipidiques ont été isolés en se basant sur leur insolubilité dans des détergeants non-ioniques et sur leur faible densité entrainant leur flottabilité sur un gradient discontinu de sucrose. A cette fin, le BCR de LB d'amygdales est stimulé ou non par un Ac anti-IgM selon la procédure décrite au chapitre précédent. Les LB sont alors lavés à 4°C avec du tampon TNE (Tris-HCl 25mM pH 7,5, NaCl 140 mM et EDTA 1mM), puis incubés pendant 30 minutes dans du tampon TNE contenant 1% de Triton X-100 et un cocktail d'antiprotéases (Sigma). 1 ml de surnageant est mélangé avec 1 ml de sucrose 85% puis délicatement recouvert de 3 ml de sucrose 35% et enfin de 1,5 ml de sucrose 5%. L'échantillon est alors centrifugé à 180000g pendant 17 heures à 4°C. 11 fractions sont prélevées du bas vers le haut, les dernières fractions correspondent donc aux radeaux lipidiques. Ces fractions sont analysées par western-blot.

XI. Purification des proteines de surface

Les protéines exprimées à la surface des LB d'amygdales ont été purifiées à l'aide du kit *Cell Surface Isolation Kit* (Pierce) en respectant les instructions du fabriquant.

XII. Western-blot

Les échantillons ont subi une électrophorèse selon la technique *SDS polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE), suivie par un transfert sur membrane PVDF (polyvinylidene difluoride). Les membranes ont été saturées pendant 1 heure à l'aide d'un tampon TBS-Tween20 0,1% contenant 5% de lait écrémé, incubées avec les Ac primaires (Tableau 12) ou la toxine cholérique B biotinylée puis avec les Ac secondaires conjugués à l'enzyme *Horse Radish Peroxydase* (HRP) et/ou la streptavidine-HRP et enfin révélées et analysées grâce au réactif ECL Advance (GE Healthcare) et au logiciel Quantity One (BioRad).

Anticorps	Spécificité	Hôte	Conjugué	Isotype	Fournisseur
Anti-TLR9	Homme	Rat		IgG2a	eBiosciences
Anti-CD20	Homme	Lapin		IgG	Interchim
Anti-β-actine	Homme	Souris		IgG1	Abcam
Anti-EEA1	Homme	Lapin		IgG	Abcam
Toxine cholérique B			biotine		Sigma
Anti-Chaine lourde IgM	Homme	Lapin	HRP	Fab'2	Dako
Anti-hCAP18/LL37	Homme	Souris		IgG1	Santa Cruz
Anti-IgG	Souris		HRP	Fab'2	Jackson
Anti-IgG	Rat		biotine	Fab'2	Jackson
Anti-IgG	Lapin		HRP	Fab'2	Jackson
Streptavidine			HRP		Amersham

Tableau 12 - Anticorps utilisés en Western-blot. *Horse Radish Peroxydase* (HRP).

XIII.Statistiques

Les comparaisons ont été réalisées avec le test de Student sur séries appariées. Lorsque $p<0,05$, la différence est considérée comme significative.

RESULTATS

I. Expression du TLR9 chez les lymphocytes B infiltrant les glandes salivaires de patients atteints du syndrome de Gougerot-Sjögren

1. Introduction

Le SGS est caractérisé par la présence d'infiltrats de lymphocytes au sein des glandes exocrines. Les LT y sont majoritaires mais le rôle des LB est désormais considéré comme déterminant dans la physiopathologie du SGS. Chez la souris transgénique pour BAFF qui développe une maladie proche du SGS, la présence de LB de la ZM envahissant les glandes salivaires a été décrite (Groom *et al.*, 2002). Chez les patients atteints par ce syndrome, l'existence de cellules en prolifération, l'expression de l'AID (Bombardieri *et al.*, 2007) et la présence de CDF au sein d'agrégats de LB infiltrant les GS suggère la présence de CG ectopiques (Salomonsson *et al.*, 2003).

Afin d'identifier les LB présents dans les GS lors du SGS, de confirmer l'existence de vrais CG ectopiques et d'en apprécier la fréquence, notre équipe de recherche a d'abord procédé à l'analyse phénotypique et transcriptionnelle de différents infiltrats B. Comme nous allons le voir, cette étude a permis de définir deux grands types d'infiltrats B : les CG réels qui sont rares et les agrégats de LB ayant un phénotype de LB transitionnels de type 2 (T2) ou de LB de la ZM.

Les TLR endosomaux sont suspectés d'être impliqués dans la physiopathologie du SGS, cependant, ils sont encore peu étudiés dans le cadre de cette maladie. Par conséquent, dans le but d'étudier l'éventuel rôle du TLR9, nous avons analysé son expression par les différents LB infiltrant les GS pathologiques, spécialement chez les LB autoimmuns. Ces travaux font l'objet de l'**article n°1** intitulé ***"Role of toll-like receptors in primary Sjögren's syndrome with a special emphasis on B-cell maturation within exocrine tissues"*** (cf. article n°1 en annexe).

1.1. Le phénotype des LB corrèle avec l'expression d'AID

Le phénotypage, par microscopie confocale, des LB infiltrant les échantillons de GS accessoires provenant de 40 patientes différentes a permis de distinguer deux grands types d'infiltrats :

- des structures ressemblant aux CG constituées de LB CD10+, CD21+, CD38+, IgD- entourés par des LB CD38- et IgD+ (figure 12A),
- des agrégats formés par des LB CD10+/-, CD21+, CD38+/-, IgD+ (figure 12B).

Notons que certains LB sont CD27+ ce qui suggère la présence de LB mémoires (figure 12) comme cela a déjà été évoqué (Daridon *et al.,* 2006; Hansen *et al.*, 2002).

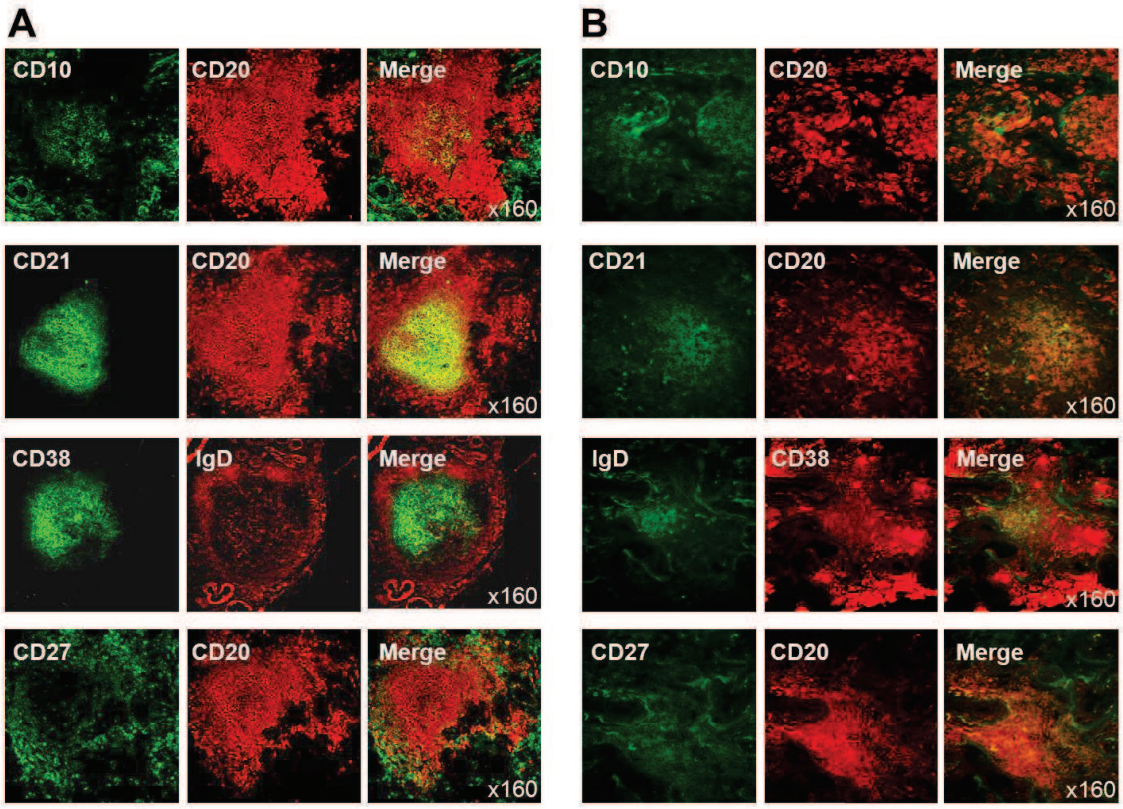

Figure 12 - Double marquage par immunofluorescence des LB infiltrant les glandes salivaires lors du syndrome de Gougerot-Sjögren. A : Structures ressemblant aux centres germinatifs. **B** : Agrégats de LB ne ressemblant pas aux centres germinatifs.

Grace à la microdissection laser associée à la RT-PCR quantitative, nous avons pu étudier l'expression de divers ARNm au sein des deux types d'infiltrats. L'expression d'AID, nécessaire aux hypermutations somatiques et à la commutation de classe, est une des caractéristiques des CG. Or, parmi les 11 échantillons étudiés, les 4 structures semblables aux CG expriment justement l'ARNm de l'AID contrairement aux 7 agrégats de LB ne ressemblant pas aux CG (figure 13).

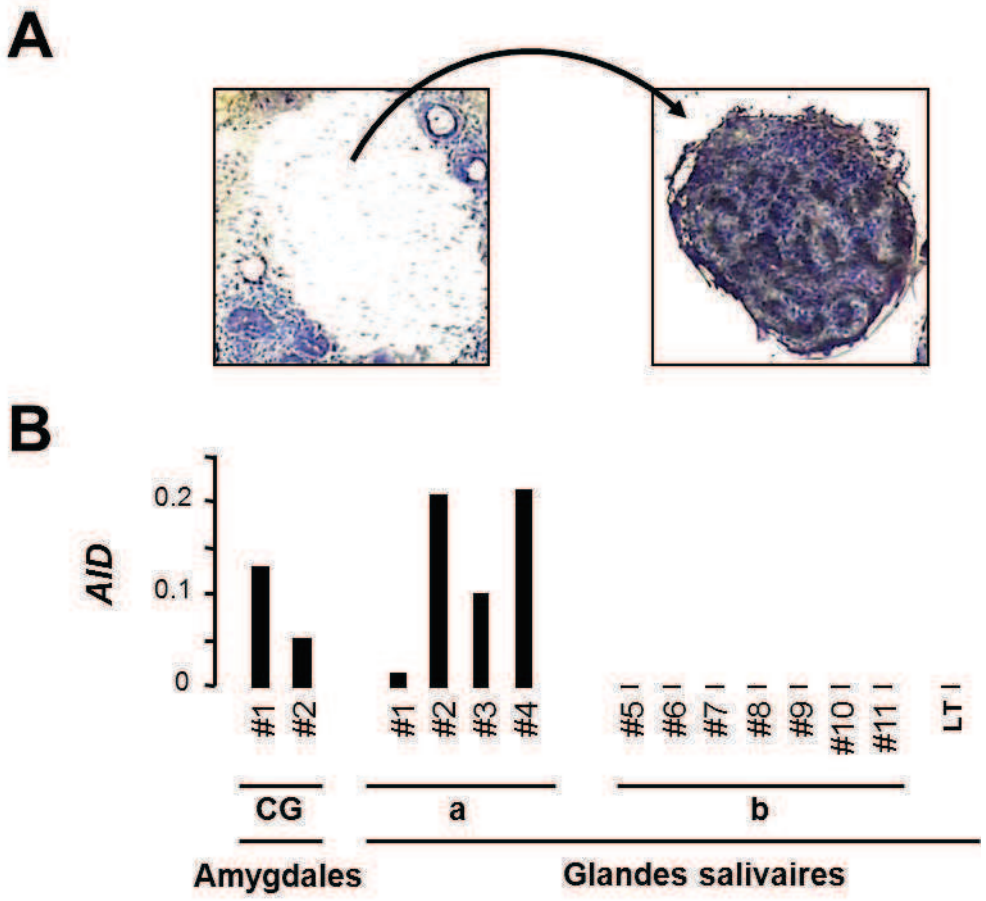

Figure 13 - Expression de l'ARNm d'AID au sein des deux types d'infiltrats de LB présents dans les glandes salivaires lors du syndrome de Gougerot-Sjögren. **A** : Exemple de la microdissection d'une structure semblable aux centres germinatifs. **B** : Expression d'AID déterminée par RT-PCR quantitative à partir des microdissections laser, **a** : structures ressemblant aux centres germinatifs, **b** : agrégats de LB ne ressemblant pas aux centres germinatifs, LT : infiltrat de LT utilisé comme contrôle.

Un phénotypage complémentaire des LB formant les agrégats ne ressemblant pas aux CG montre que ces cellules sont majoritairement, outre les marqueurs déjà évoqués : CD23+, IgM+ (figure 14A). Leur phénotype est donc compatible avec des LB T2 (cf. Introduction, partie I, chapitre 1.1).

La mise en évidence de cellules exprimant les deux marqueurs CD21 et CD35 suggèrent la présence de CDF au sein des deux types d'infiltrats (figure 14B) (Le Pottier *et al.*, 2009). Cela montre que la présence de CDF dans les infiltrats de LB n'est clairement pas un argument suffisant pour affirmer qu'il s'agit de CG ectopiques bien qu'elle soit nécessaire à leur développement.

La cytokine BAFF semble avoir un rôle important dans le SGS (cf. Introduction, partie IV, chapitre 2.4.4). Son expression a donc été recherchée et mise en évidence au sein des infiltrats de LB : par les LB eux même ainsi que par les LT situés à proximité (figure 14C).

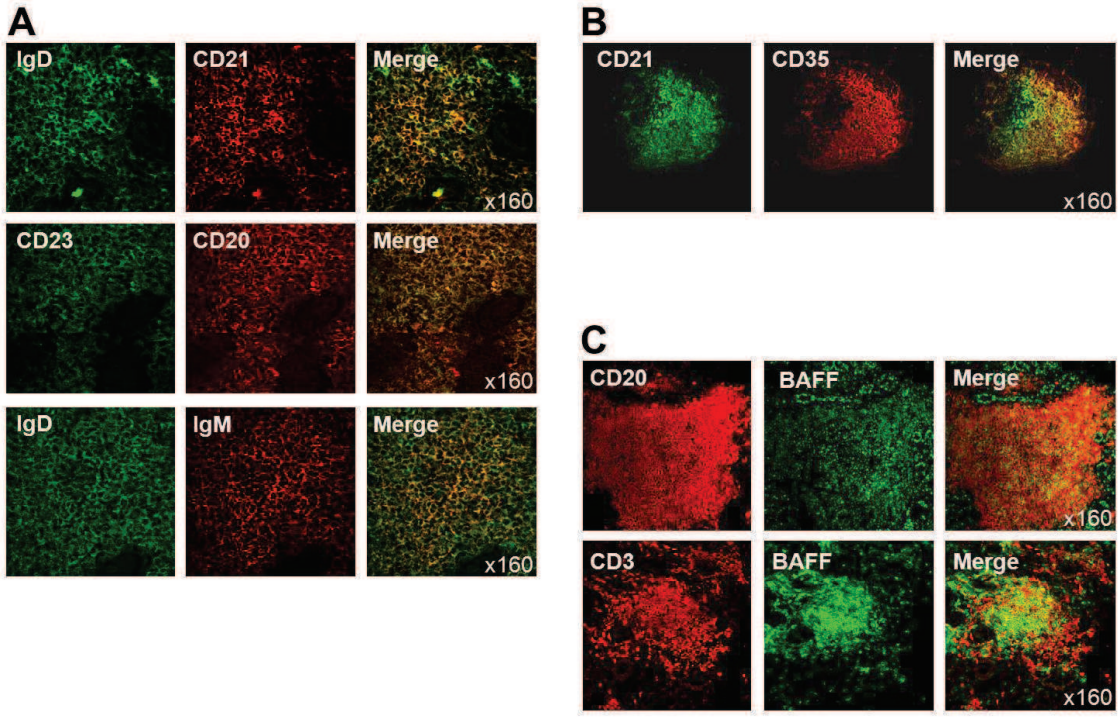

Figure 14 - Agrégats de LB ne ressemblant pas aux centres germinatifs. A : Ces LB expriment CD21, CD23, IgD et IgM. **B** : Sont présentes, au sein de ces infiltrats, des cellules dendritiques folliculaires CD21+ et CD35+. **C** : BAFF y est exprimé par les LB et par les LT situés à proximité.

1.2. Profil des facteurs de transcription dans les deux types d'infiltrats

Afin de mieux caractériser les deux types d'infiltrats observés, nous avons analysé, l'expression de l'ARNm de différents facteurs de transcription (FT) contrôlant la différenciation des LB : Pax-5 connu pour maintenir l'identité des LB, Bcl-6 surexprimé dans les LB des CG et décrit comme empêchant la maturation terminale en plasmocytes, IRF-4 et Blimp-1 permettant au contraire la différenciation en plasmocytes et enfin Notch-2 nécessaire à formation des LB de la ZM. Tout d'abord, les infiltrats étudiés n'expriment pas ou très faiblement CD3 contrairement à un infiltrat de LT utilisé comme contrôle (figure 15F). Cela montre bien que les infiltrats étudiés ne contiennent pas ou très peu de LT. Ensuite, les quatre structures semblables à des CG expriment fortement Pax-5 et surtout Bcl-6 alors qu'elles n'expriment pas ou relativement faiblement les autres FT (figure 15). Cela confirme qu'il s'agit bien de réels CG ectopiques. Les sept agrégats, quant à eux, expriment tous très faiblement Bcl-6, accréditant ainsi la dichotomie entre les deux types d'infiltrats. Par ailleurs, parmi les agrégats, quatre échantillons expriment fortement Notch-2 mais aussi IRF-4 et Blimp-1 (figure 15). Ces quatre infiltrats sont donc manifestement constitués par des LB de la ZM proches de la différenciation terminale en plasmocytes.

Ces observations ont été corroborées par l'analyse de l'expression d'autres gènes et notamment des récepteurs de facteurs chimiotactiques. En effet, les LB des CG sont connus pour exprimer fortement CXCR5, le récepteur de CXCL13, et faiblement Sphingosin-1-Phosphate Receptor 1 (S1P1). Tandis que les LB de la ZM expriment fortement S1P1 et plus faiblement CXCR5. Ces profils d'expression ont été retrouvés, respectivement, chez les quatre infiltrats correspondant aux CG réels et chez les quatre infiltrats correspondant à des LB de la ZM. Les trois infiltrats restants présentent un profil d'expression de CXCR5 et S1P1 similaires aux LB des CG mais expriment fortement BR3, ce qui est un argument supplémentaire pour affirmer qu'il s'agit de LB T2 (Le Pottier *et al.*, 2009).

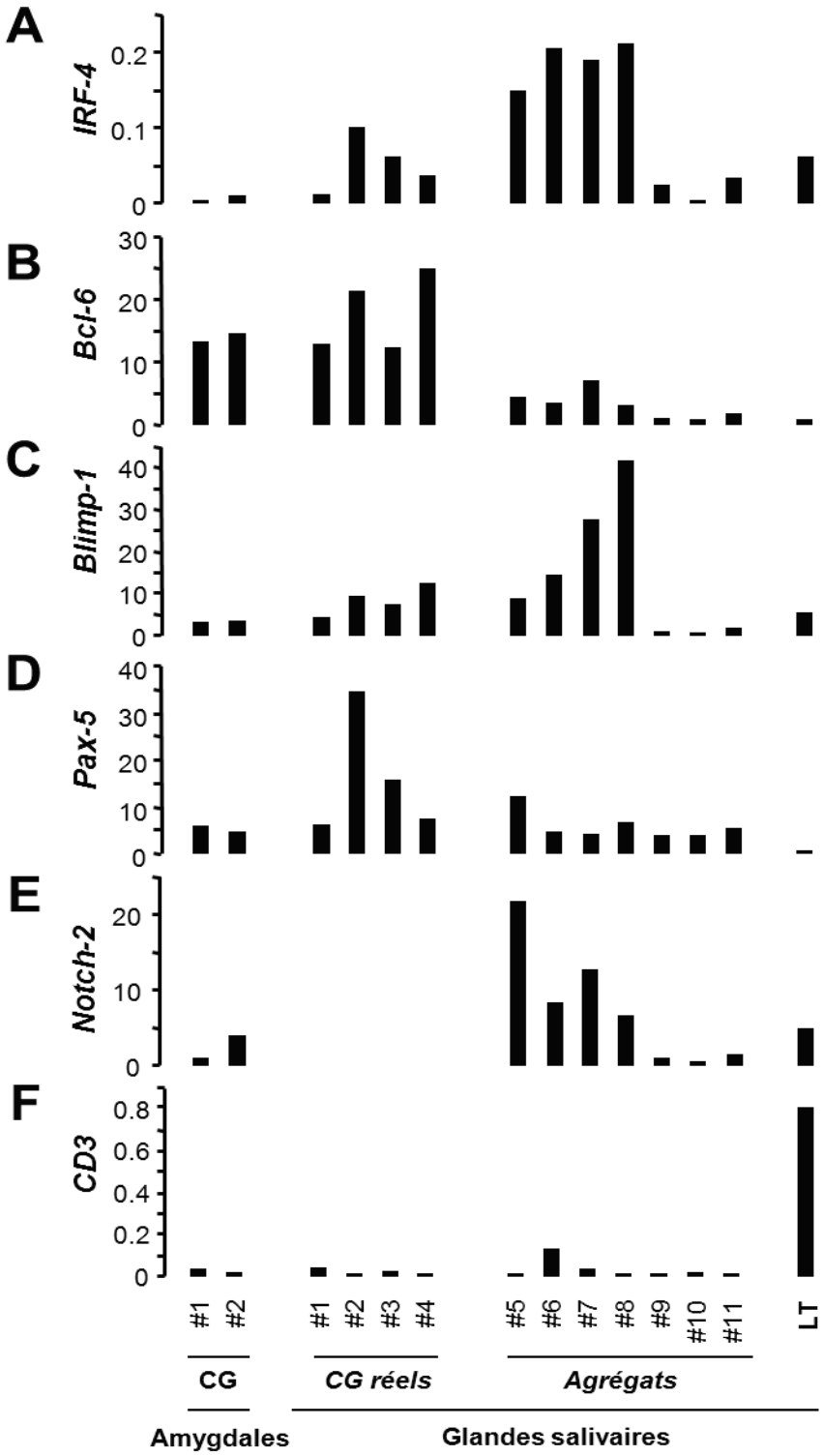

Figure 15 - Etude, par RT-PCR quantitative, de l'expression de l'ARNm de facteurs de transcription au sein des deux types d'infiltrats de LB présents dans les glandes salivaires lors du syndrome de Gougerot-Sjögren. Analyse de 14 échantillons obtenus par microdissection laser.

2. Résultats

2.1. Expression du TLR9 au sein des différents infiltrats B

Par RT-PCR quantitative à partir des infiltrats de LB micro-disséqués, nous avons montré une forte expression du TLR9 au sein des agrégats de LB T2 et de LB de la ZM contrairement aux CG réels et aux CG d'amygdales utilisés comme contrôle (figure 16A).

Par immunofluorescence, nous avons pu confirmer la faible expression de la protéine TLR9 par les LB des CG réels et des CG d'amygdales ainsi que sa forte expression par les LB des agrégats et les LB du manteau (figure 16B).

2.2. Expression du TLR9 par les LB autoréactifs dans les différents infiltrats B

Les LB dont le BCR est codé par le gène de la chaine lourde VH4.34, reconnus par l'Ac anti-idiotype 9G4 sont autoréactifs (Pugh-Bernard *et al.*, 2001). Dans les amygdales, ces LB sont exclus des CG et sont confinés dans la zone du manteau et dans la ZM. Au contraire, quelques LB 9G4+ autoréactifs peuvent être détectés dans les CG ectopiques présents dans les GS lors du SGS tandis que d'autres se situent en dehors des CG (figure 16C) (Le Pottier *et al.*, 2009). Ces observations suggèrent donc qu'il existe, lors du SGS, une défaillance au niveau du point de contrôle de la tolérance empêchant l'entrée des LB autoréactifs dans les CG. Cette défaillance semble être indépendante du TLR9 puisque les LB incriminés ne l'expriment pas ou peu.

Les LB 9G4+ sont aussi détectés dans les agrégats de LB et certains d'entre eux co-localisent avec le TLR9 (figure 16C). Il est donc possible voire probable que l'engagement du TLR9 contribue à l'activation et à la maturation de ces cellules en plasmocytes. Pour finir, les LB non-autoréactifs reconnus par l'Ac anti-idiotype LC1 sont, quant à eux, présents dans les CG des amygdales ainsi que dans les deux types d'infiltrats, comme montré précédemment (Le Pottier *et al.*, 2009) (données non montrées).

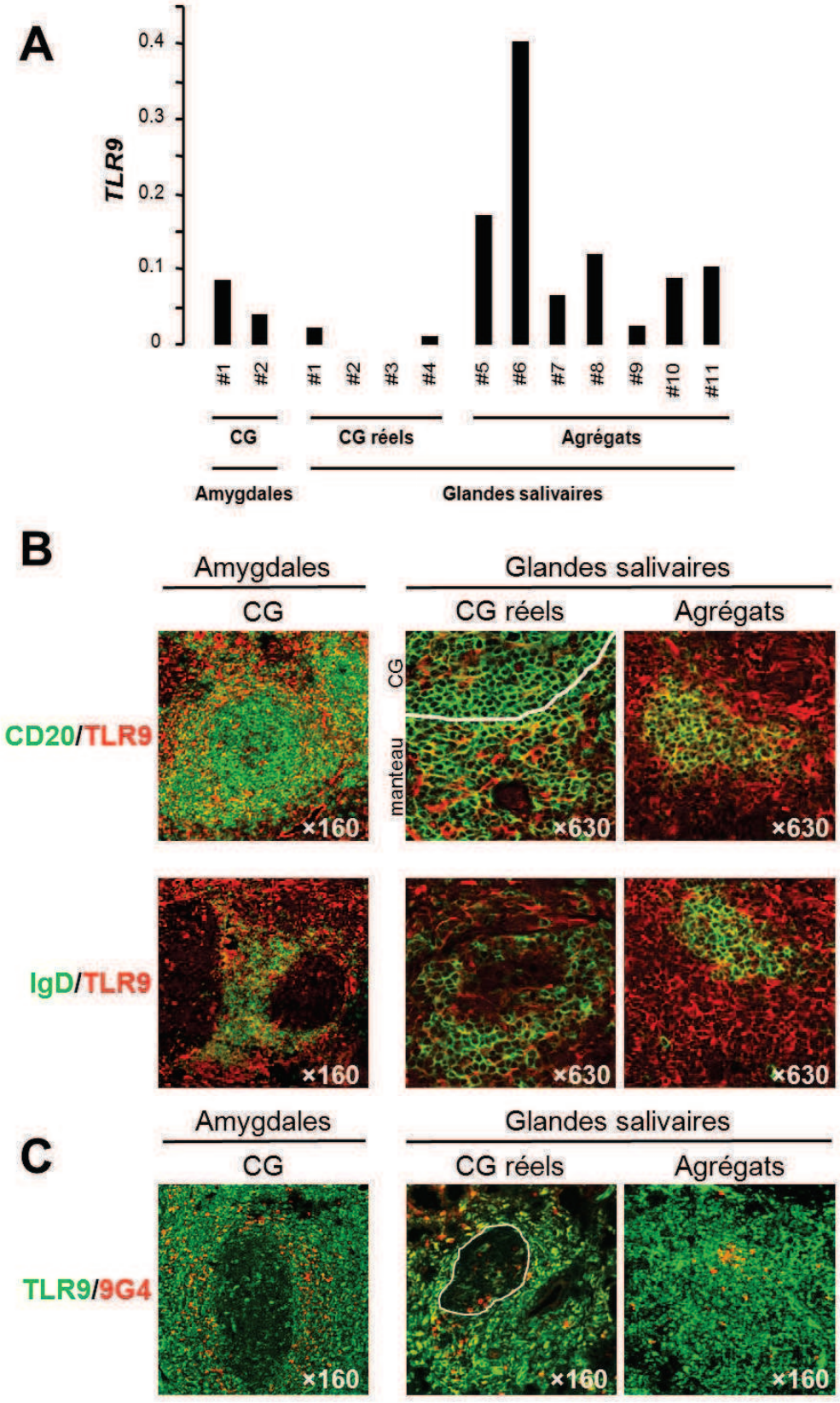

Figure 16 - Analyse de l'expression du TLR9 au sein des deux types d'infiltrats de LB présents dans les glandes salivaires lors du syndrome de Gougerot-Sjögren. **A** : RT-PCR quantitative à partir des échantillons issus des microdissections laser. **B** et **C** : Doubles marquages par immunofluorescence.

II. Rôle du TLR9 dans la différenciation des lymphocytes B transitionnels

1. Introduction

Si 40% des LB transitionnels s'avèrent être autoréactifs seulement 20% des LB matures naïfs le sont. Les LB transitionnels représentent donc une étape importante dans la mise en place de la tolérance (Wardemann *et al.*, 2003). Par ailleurs, les LB transitionnels représentent une étape d'aiguillage dans l'ontogenèse des LB. En fonction des stimuli qu'ils reçoivent, ils se différencient en LB Fo ou en LB de la ZM. Concernant les signaux permettant une orientation vers la voie des LB de la ZM, l'étude de modèles murins évoque le rôle de l'Ag, l'importance de l'intensité du signal transmis par le BCR et l'implication de BAFF (Batten *et al.,* 2000; Cariappa *et al.*, 2001). Cependant, ces signaux sont encore très mal connus.

D'abord décrits comme des récepteurs détectant la présence de molécules microbiennes, les TLR se sont révélés être capables de reconnaître des auto-Ag. Il n'est donc pas totalement surprenant que les signaux transmis par les TLR soient nécessaires à la mise en place de la tolérance des LB au niveau central, dans la moelle osseuse, et en périphérie. La stimulation des CDp dépendante des TLR favoriserait, en effet, la génération de LT régulateurs qui participent à l'élimination des LB autoréactifs (Isnardi *et al.*, 2008). Néanmoins, la stimulation directe des TLR exprimés par les LB, notamment le TLR9, est aussi largement décrite pour favoriser la prolifération et la différenciation terminale des LB, y compris des LB auto-immuns (Marshak-Rothstein, 2006).

Chez l'homme, les LB de la ZM sont décrits comme particulièrement sensibles aux ligands du TLR9 (Bernasconi *et al.*, 2002). Cela suggère que l'activation des TLR pourrait participer au développement des LB de la ZM. Les résultats décrits dans le précédent chapitre nous amène à penser que ceci pourrait être le cas dans les OLS mais aussi et tout particulièrement dans les glandes salivaires lors du SGS.

Par conséquent, nous avons cherché à évaluer cette hypothèse à l'aide d'expériences *in vitro*. Ces travaux font l'objet de l'**article 2** intitulé ***"TLR9 drives the development of transitional B cells towards the marginal zone pathway and promotes autoimmunity"*** (article sous presse, cf. article n°2 en annexe).

2. Résultats

2.1. Puissante réponse proliférative des LB transitionnels suite à la stimulation du TLR9

Dans le but d'évaluer l'éventuel rôle de la stimulation du TLR9 dans la différenciation des LB vers la voie des LB de la ZM, nous avons souhaité analyser la réponse des LB transitionnels à l'activation de ce récepteur. Les LB transitionnels, identifiés comme étant $CD24^{fort}$ et $CD38^{fort}$, sont particulièrement fréquents au sein du sang de cordon (Fig. 17A). Nous avons donc travaillé à partir de LB de sang de cordon chez lesquels nous avons définis deux populations : les LB transitionnels $CD24^{fort}$ $CD38^{fort}$ et les LB matures naïfs $CD24^{+}$ $CD38^{+}$. Le phénotypage de ces deux populations : $CD10^{+}$ $CD23^{-}$ IgM^{fort} pour les LB $CD24^{fort}$ $CD38^{fort}$ et $CD10^{-}$ $CD23^{+/-}$ IgM^{faible} pour les LB $CD24^{+}$ $CD38^{+}$ confirme le caractère transitionnel de la première et le caractère mature de la seconde (Fig. 17B). Notons que les deux populations expriment des niveaux similaires de TLR9 intracellulaire.

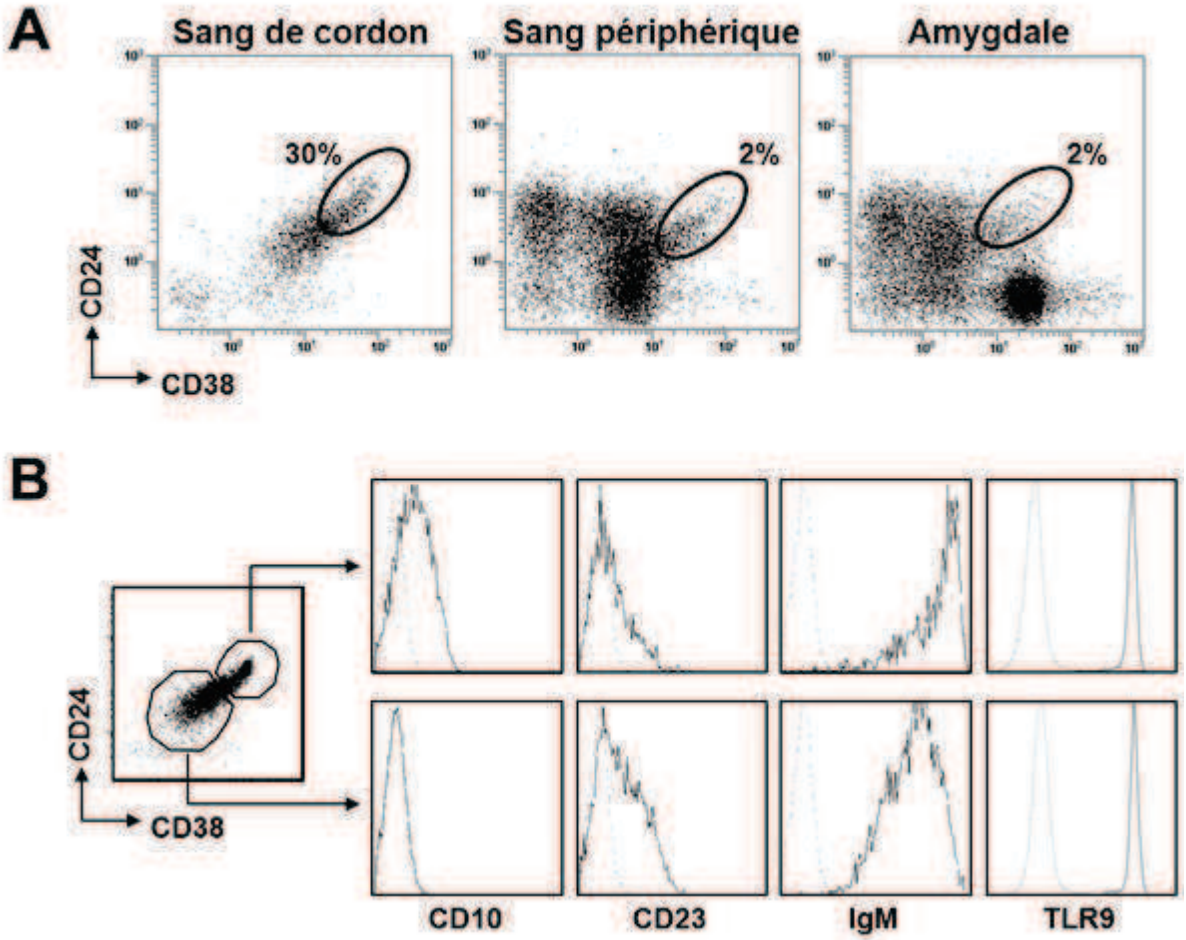

Figure 17 - Phénotypage des LB de sang de cordon. A : Proportion de LB transitionnels $CD24^{fort}$ $CD38^{fort}$ parmi les LB du sang de cordon, du sang périphérique et d'amygdales. **B** : Les LB du sang de cordon peuvent être séparés en 2 populations : les LB transitionnels $CD24^{fort}$ $CD38^{fort}$ $CD10^{+}$ $CD23^{-}$ IgM^{fort} et $TLR9^{+}$ et les LB matures $CD24^{+}$ $CD38^{+}$ $CD10^{-}$ $CD23^{+/-}$ IgM^{faible} et $TLR9^{+}$.

Les LB transitionnels et matures, triés à partir du sang de cordon (Fig. 18A), ont été stimulés par un ligand synthétique du TLR9 : un ODN CpG de type B. Après 4 jours de culture, la diminution du marqueur CFSE montre que les LB transitionnels prolifèrent suite à la stimulation du TLR9. Bien que le degré de réponse varie d'une expérience à l'autre, cette prolifération est semblable à celle observée chez les LB matures (Fig. 18B). L'activation combinée du BCR, du CD40 et du récepteur de IL-2, afin de mimer une stimulation T-dépendante, entraine aussi une prolifération similaire des 2 populations de LB (Fig. 18C). Cependant, le nombre de divisions ayant eu lieu est inférieur par rapport à la stimulation par le CpG. Ces premières expériences indiquent donc que les LB transitionnels et matures issus du sang de cordon prolifèrent de façon similaire en réponse à la stimulation du TLR9.

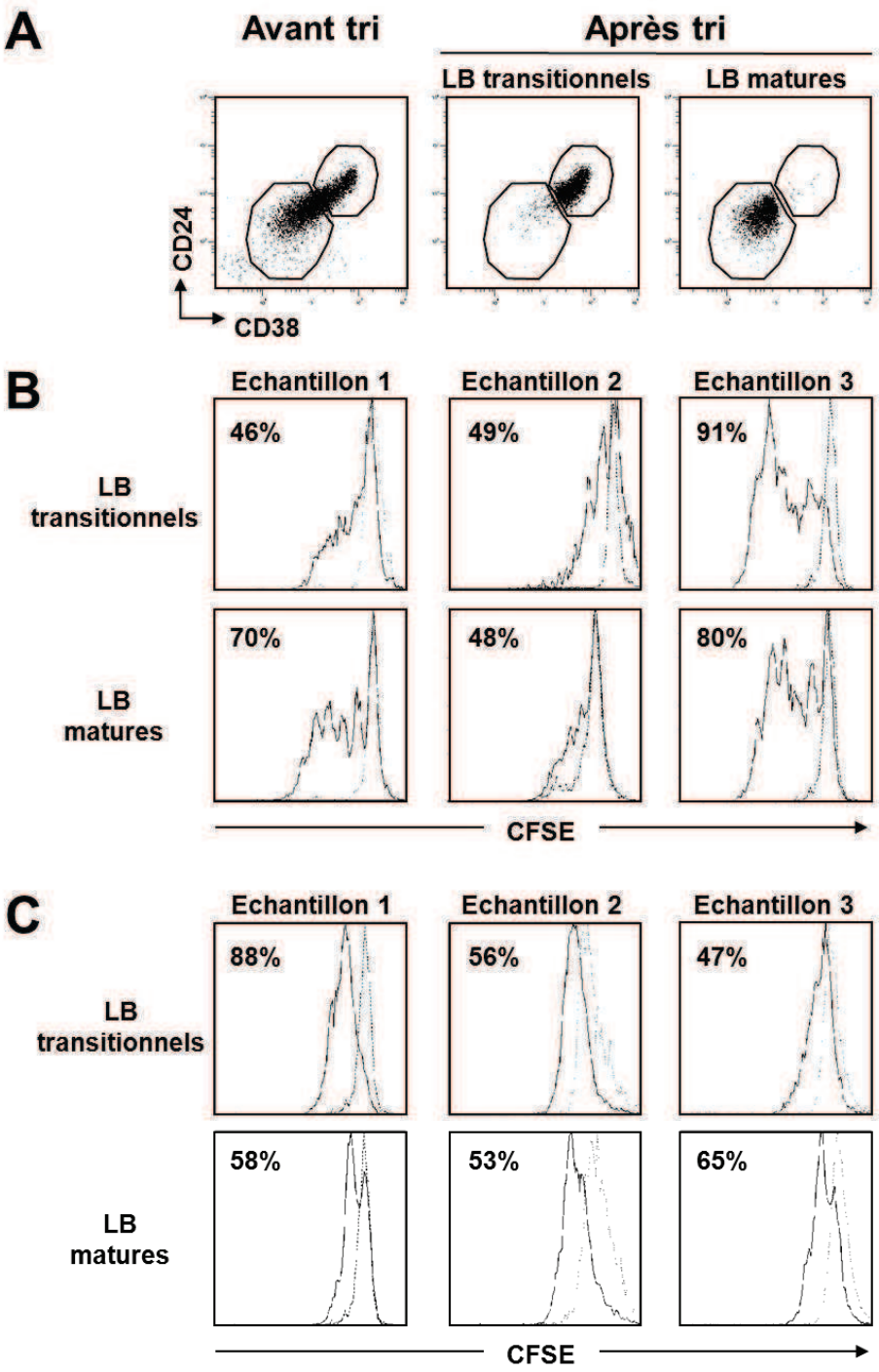

Figure 18 - Prolifération des LB matures et des LB transitionnels. **A** : Exemple représentatif d'un tri de LB transitionnels $CD24^{fort}$ $CD38^{fort}$ et de LB matures $CD24^{+}$ $CD38^{+}$ par cytométrie en flux à partir de LB de sang de cordon. **B** et **C** : Les LB triés ont été marqués avec la molécule CFSE et stimulés pendant 4 jours avec 0,25µM d'ODN CpG-B 2006 (**B**) ou avec 10µg/ml d'anti-IgM, 100UI/ml d'IL-2 en présence de fibroblastes exprimant CD40L (**C**). Les histogrammes en pointillés correspondent aux LB non stimulés. Les pourcentages indiquent la proportion de LB ayant proliférés.

2.2. Maturation spécifique des LB transitionnels suite à la stimulation du TLR9

Après deux jours de stimulation par l'ODN CpG de type B, l'état de maturation des LB transitionnels a été établi. Est observable une diminution de la densité du marqueur CD24 conduisant à l'apparition d'une sous-population de LB $CD24^{-}CD38^{+}$ (Fig. 19A). Ces cellules sont $CD21^{fort}$ $CD23^{faible}$ IgM^{fort} IgD^{faible} et Notch 2^{fort}. Il est intéressant de noter que les LB matures naïfs, eux, ne se différencient pas de la même manière suite à la stimulation du TLR9. Bien qu'une sous-population de LB $CD24^{-}$ $CD38^{+}$ apparait là aussi, cette dernière s'avère être $CD21^{faible}$ $CD23^{faible}$ IgM^{faible} IgD^{fort} and $Notch2^{faible}$. Ces résultats indiquent qu'en réponse à la stimulation du TLR9, les LB transitionnels donnent naissance à des LB semblables aux LB de la ZM, alors que les LB matures naïfs génèrent des LB comparables aux LB Fo. Par contre, lorsqu'on active les LB transitionnels selon la stimulation "T-dépendante", la sous-population induite $CD24^{-}$ $CD38^{+}$ possède un phénotype compatible avec des LB Fo, elle est en effet $CD21^{faible}$ $CD23^{faible}$ IgM^{fort} IgD^{fort}. C'est aussi le cas pour les LB matures naïfs stimulés dans les mêmes conditions, la population induite étant $CD21^{faible}$ $CD23^{+}$ IgM^{faible} IgD^{fort} (Fig. 19B). Ces observations suggèrent fortement que les LB transitionnels, contrairement aux LB matures naïfs, peuvent spécifiquement se différencier en LB de type LB de la ZM suite à la stimulation du TLR9, mais pas suite à l'activation simultanée du BCR, du CD40 et du récepteur de l'IL-2.

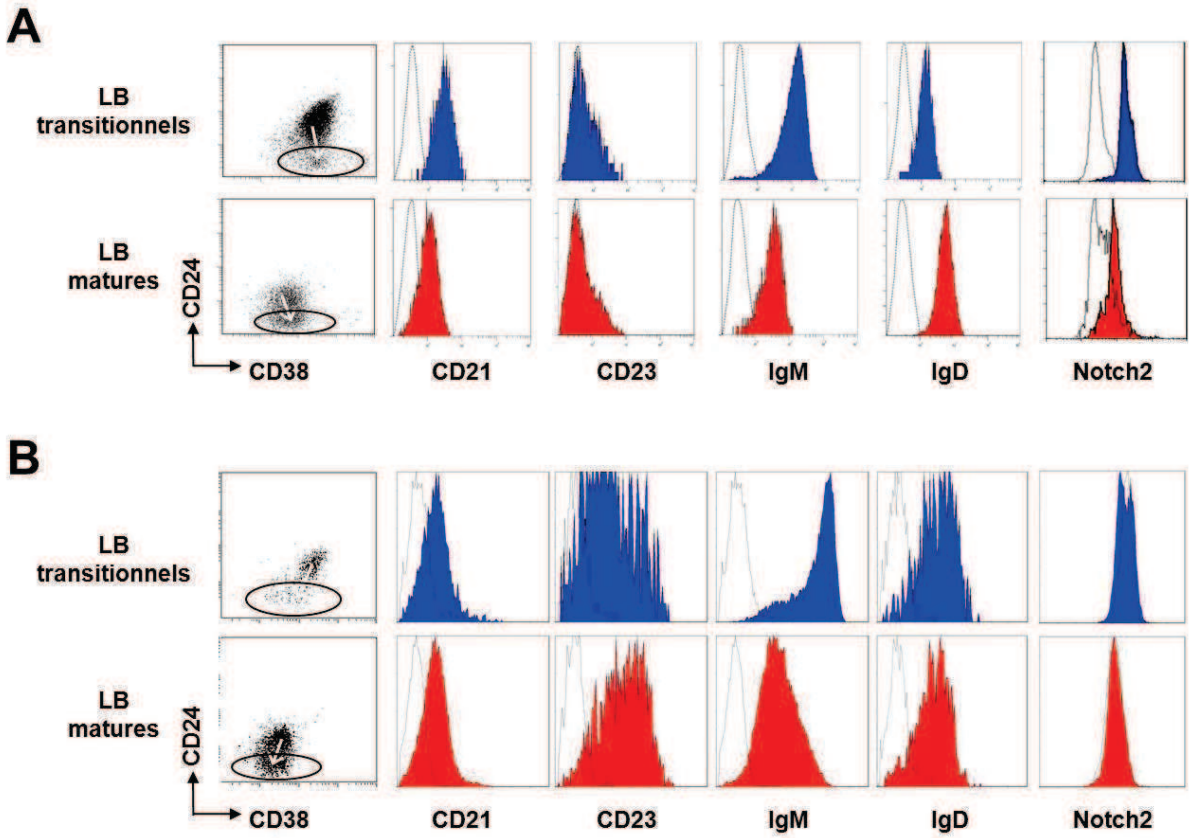

Figure 19 - Maturation spécifique des LB transitionnels. Des LB transitionnels $CD24^{fort}$ $CD38^{fort}$ et des LB matures $CD24^{+}$ $CD38^{+}$ ont été triés à partir de LB de sang de cordon puis stimulés par 0,25µM d'ODN CpG-B 2006 (**A**) ou avec 10µg/ml d'anti-IgM, 100UI/ml d'IL-2 en présence de fibroblastes exprimant CD40L (**B**). Après 48H, le phénotype de la population émergente $CD24^{-}$ $CD38^{+}$ a été déterminé. Sont montrés des exemples représentatifs d'expériences indépendantes où les histogrammes en pointillés correspondent aux isotypes.

2.3. Différenciation terminale des LB transitionnels suite à la stimulation du TLR9

Afin d'apprécier la différenciation terminale des LB stimulés, nous avons évalué la quantité d'Ac sécrétés après 7 jours de culture. Les LB transitionnels stimulés par l'ODN CpG-B se différencient en cellules sécrétrices d'Ac puisque des quantités élevées d'IgM sont retrouvées dans les surnageants de culture (Fig. 20A). De faibles taux d'IgG ayant été détectés, la stimulation du TLR9 chez les LB transitionnels semble induire la commutation de classe. La stimulation "T-dépendante", elle, n'entraîne que la production de faibles taux d'IgM et d'IgG.

Alors que les quantités d'Ac sécrétées par les LB transitionnels et par les LB matures naïfs sont similaires, leurs spécificités diffèrent. En effet, la recherche d'auto-

Ac par immunofluorescence indirecte sur cellules Hep2 montre que la fréquence d'Ac autoréactifs produits par les LB transitionnels stimulés par l'ODN CpG est supérieure à celle correspondant aux LB matures naïfs (Fig. 20B). Par ailleurs, lorsque les deux populations de LB sont stimulées par le CD40L, l'anti-IgM et l'IL-2, la production d'auto-Ac est indétectable.

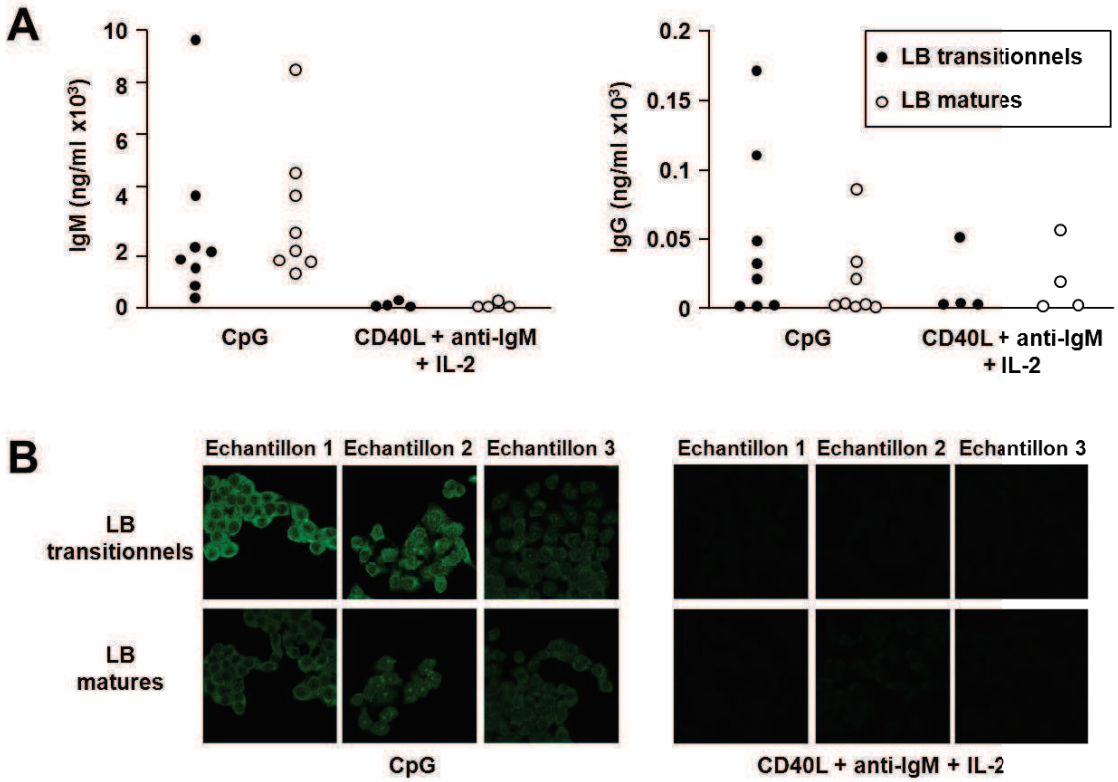

Figure 20 - Différenciation terminale des LB transitionnels et des LB matures. Des LB transitionnels $CD24^{fort}$ $CD38^{fort}$ et des LB matures $CD24^{+}$ $CD38^{+}$ ont été triés à partir de LB de sang de cordon puis stimulés pendant 7 jours par 0,25µM d'ODN CpG-B 2006 ou avec 10µg/ml d'anti-IgM, 100UI/ml d'IL-2 en présence de fibroblastes exprimant CD40L. **A** : La production d'IgM et d'IgG a été déterminée par ELISA. **B** : l'autoréactivité a été évaluée par immunofluorescence indirecte sur cellules Hep2.

2.4. Réponse singulière des LB transitionnels à la stimulation du TLR9

Pour s'assurer du caractère particulier de la réponse des LB transitionnels suite à l'engagement du TLR9, les expériences ont été renouvelées en utilisant des LB matures activés purifiés à partir d'amygdales. Contrairement aux LB transitionnels et aux LB matures naïfs, ces LB ne prolifèrent pas suite à la stimulation du TLR9 mais

seulement lors de la stimulation "T-dépendante" (Fig. 21A). Cependant, les deux types de stimulation entrainent l'apparition de cellules $CD24^{-}CD38^{+}$ (Fig. 21B). Dans les deux cas le phénotype de ces cellules est compatible avec des LB Fo. En effet, après stimulation par l'ODN CpG, ces LB sont $CD21^{+}$ $CD23^{high}$ IgM^{high} IgD^{+} et $Notch2^{-}$. Et après stimulation "T-dépendante", ils sont $CD21^{+}$ $CD23^{high}$ IgM^{low} IgD^{+} et $Notch2^{low}$. Enfin, concernant la différenciation terminale en cellules productrices d'Ac, les LB matures activés produisent des taux élevés d'IgM et d'IgG suite à la stimulation du TLR9 tandis que la stimulation du CD40, du BCR et du récepteur de l'IL-2 entraine la sécrétion de quantités d'IgG comparables mais de très faibles quantités d'IgM (Fig. 21C). En outre, aucun auto-Ac n'a pu être détecté par immunofluorescence (non montré).

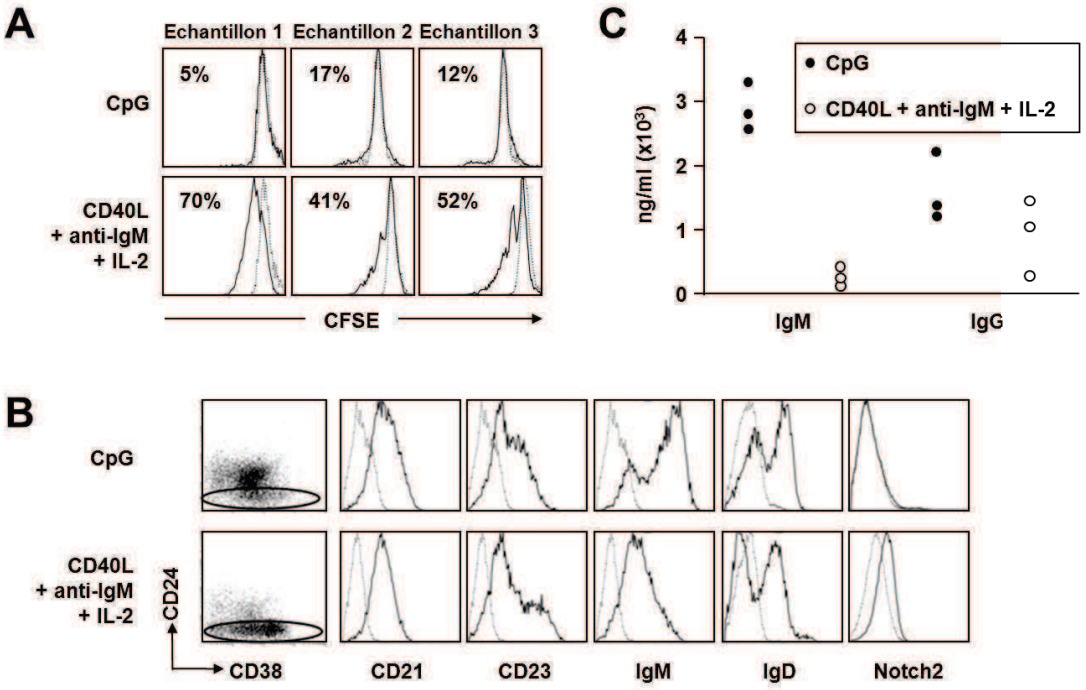

Figure 21 - Réponse des LB d'amygdales à la stimulation du TLR9. Des LB matures activés provenant d'amygdales ont été stimulés par 0,25µM d'ODN CpG-B 2006 ou avec 10µg/ml d'anti-IgM, 100UI/ml d'IL-2 en présence de fibroblastes exprimant CD40L. **A** : Les LB ont été marqués par la molécule CFSE puis stimulés pendant 4 jours, la réponse proliférative a été évaluée par dilution du marqueur CFSE. Les histogrammes en pointillés correspondent aux LB non stimulés. Les pourcentages indiquent la proportion de LB ayant proliférés. **B** : Après 2 jours de stimulation, le phénotype de la population émergente $CD24^{-}$ $CD38^{+}$ a été déterminé. Sont montrés des exemples représentatifs d'expériences indépendantes où les histogrammes en pointillés correspondent aux isotypes. **C** : Après 7 jours de culture, la production d'IgM et d'IgG a été déterminée par ELISA.

III. Implication du peptide LL37 lors du syndrome de Gougerot-Sjögren

1. Introduction

LL37 est un peptide antimicrobien appartenant à la famille des cathélicidines, il s'agit du seul membre de cette famille chez l'homme. Ce peptide de 37 acides aminés, dont la séquence commence par deux résidus leucine d'où son nom, est issu du clivage extracellulaire d'un précurseur : *human cathelicidin antimicrobial protein 18 KDa* (hCAP18) par des sérine-protéases, notamment la protéinase 3 (Sørensen *et al.*, 2001). Le précurseur du LL37 est produit en grandes quantités par les polynucléaires neutrophiles (PNN) mais est aussi sécrété par diverses cellules comme, par exemple, les kératinocytes et de nombreuses CE. La production du LL37 est régulée par divers stimuli infectieux ou inflammatoires. Comme la plupart des peptides antimicrobiens, il est cationique et amphiphile. Ces caractéristiques lui permettent d'interagir avec les membranes bactériennes typiquement chargées négativement, de les désorganiser et ainsi d'induire une lyse directe des bactéries (Gilliet *et al.*, 2008). Outre ces propriétés antibactériennes, LL37 est apparenté aux peptides "cheval de Troie", autrement dit, il est capable de former des agrégats avec l'ADN, d'induire une résistance de cet ADN aux nucléases et de permettre son endocytose en mettant en jeu les protéoglycanes et les radeaux lipidiques (Derossi *et al.,* 1998; Sandgren *et al.*, 2004). Et surtout, il a été montré que LL37 rend les acides nucléiques du soi immunostimulants en leur permettant d'atteindre le compartiment endolysosomal et en leur permettant ainsi d'activer les TLR7, 8 et 9 chez les CD. Ces propriétés semblent être impliquées dans la physiopathologie du psoriasis (Ganguly *et al.,* 2009; Lande *et al.*, 2007).

Nous savons l'importance probable des infections virales et des TLR endosomaux dans le SGS. Or, LL37 est présent dans les GS. Il y est notamment exprimé et sécrété par les CE canalaires (Woo *et al.*, 2003). Nous avons donc cherché

à analyser si ce peptide joue un rôle dans la physiopathologie du SGS et tout particulièrement dans l'activation du TLR9 des LB infiltrant les GS.

2. Résultats

2.1. Expression du peptide LL37 au sein des glandes salivaires de patients atteints du syndrome de Gougerot-Sjögren

2.1.1. Profil d'expression de hCAP18/LL37 dans les glandes salivaires de malades et de témoins

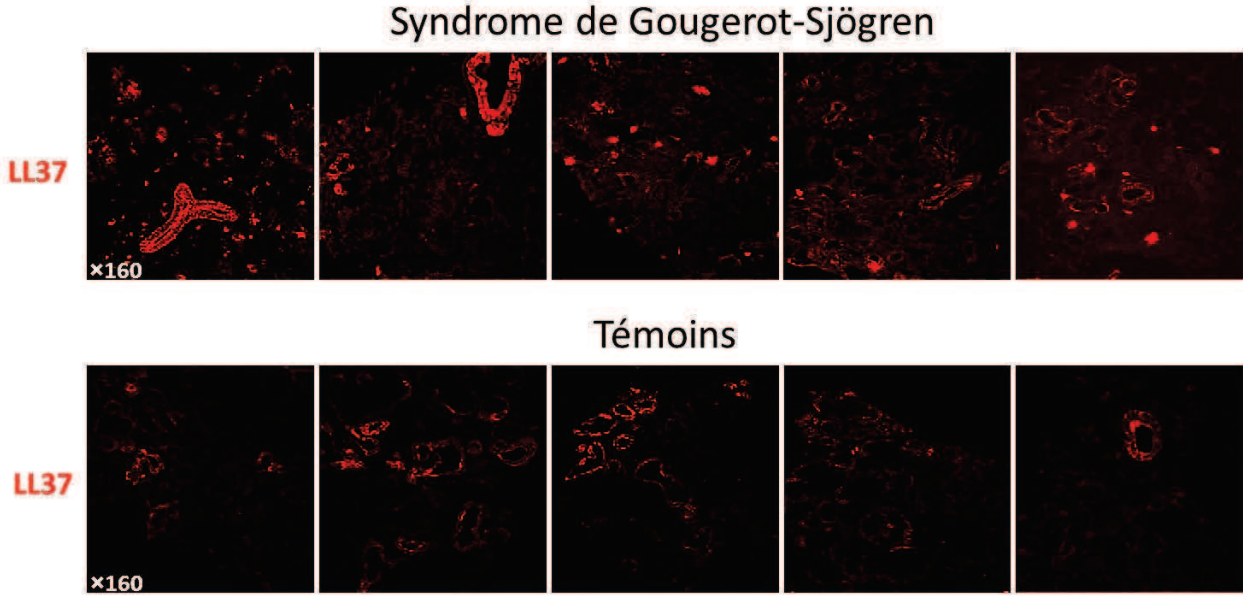

Figure 22 - Profil d'expression de hCAP18/LL37 dans les glandes salivaires de malades et de témoins. Marquage du LL37 effectué par immunofluorescence indirecte sur coupes de glandes salivaires.

Afin d'évaluer l'expression de hCAP18 et de sa forme active : LL37 au sein des GS de patients atteints du SGS, nous avons effectué des marquages par immunofluorescence sur des coupes de GS de malades et de témoins. Ces marquages montrent un profil d'expression différent lors du SGS par rapport aux témoins. En effet, si hCAP18/LL37 est exprimé chez les deux types de GS, nous pouvons observer, sur les coupes de GS de SGS, la présence de petites zones dispersées où hCAP18/LL37 est présent en fortes quantités (Fig. 22).

2.1.2. Expression de hCAP18/LL37 par les cellules épithéliales et par des cellules CD16+ CD11b+

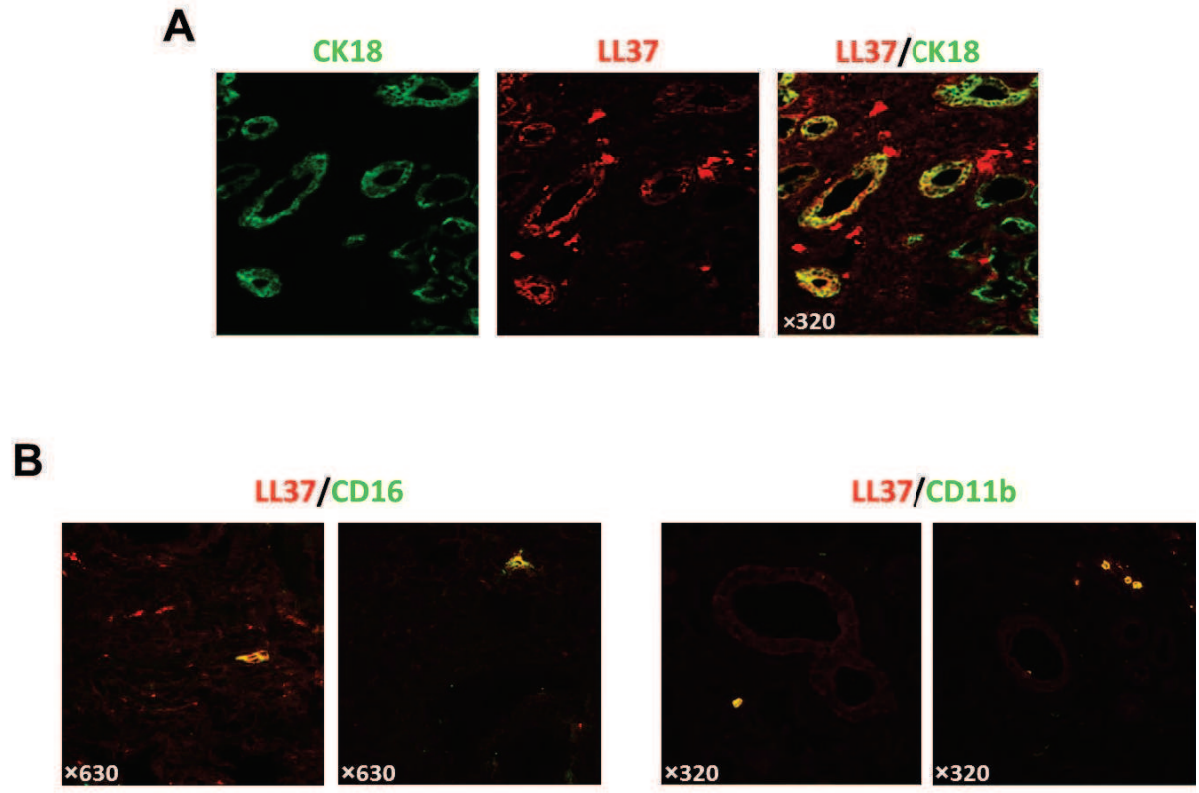

Figure 23 - Au sein des glandes salivaires, hCAP18/LL37 est exprimé par les cellules épithéliales et par des cellules CD16+ CD11b+. Marquages effectués par immunofluorescence indirecte et analysés par microscopie confocale.

Se pose alors la question des cellules qui produisent hCAP18/LL37 dans les GS lors du SGS. Pour y répondre nous avons effectué, en immunofluorescence, des doubles marquages analysés par microscopie confocale. Ainsi, à l'aide d'un marqueur des CE : la cytokératine 18 (CK18), nous confirmons que les CE des GS produisent hCAP18/LL37 (Fig. 23A). Nous avons aussi pu mettre en évidence une colocalisation des forts marquages hCAP18/LL37, observés uniquement lors du SGS, avec les marqueurs CD16 et CD11b (Fig. 23B). Les cellules qui expriment fortement hCAP18/LL37 dans les GS pathologiques sont donc des macrophages, des polynucléaires neutrophiles ou des cellules NK, les seules cellules connues pour exprimer ces deux marqueurs. Notons que contrairement aux polynucléaires neutrophiles, la présence de macrophages et de cellules NK dans les GS lors du SGS

est connue. En outre, parallèlement à la proportion des LB dans les infiltrats, la proportion de macrophages augmente avec la sévérité de l'infiltrat (Christodoulou *et al.*, 2010).

2.1.3. Expression de hCAP18/LL37 à proximité des deux types d'infiltrats de LB

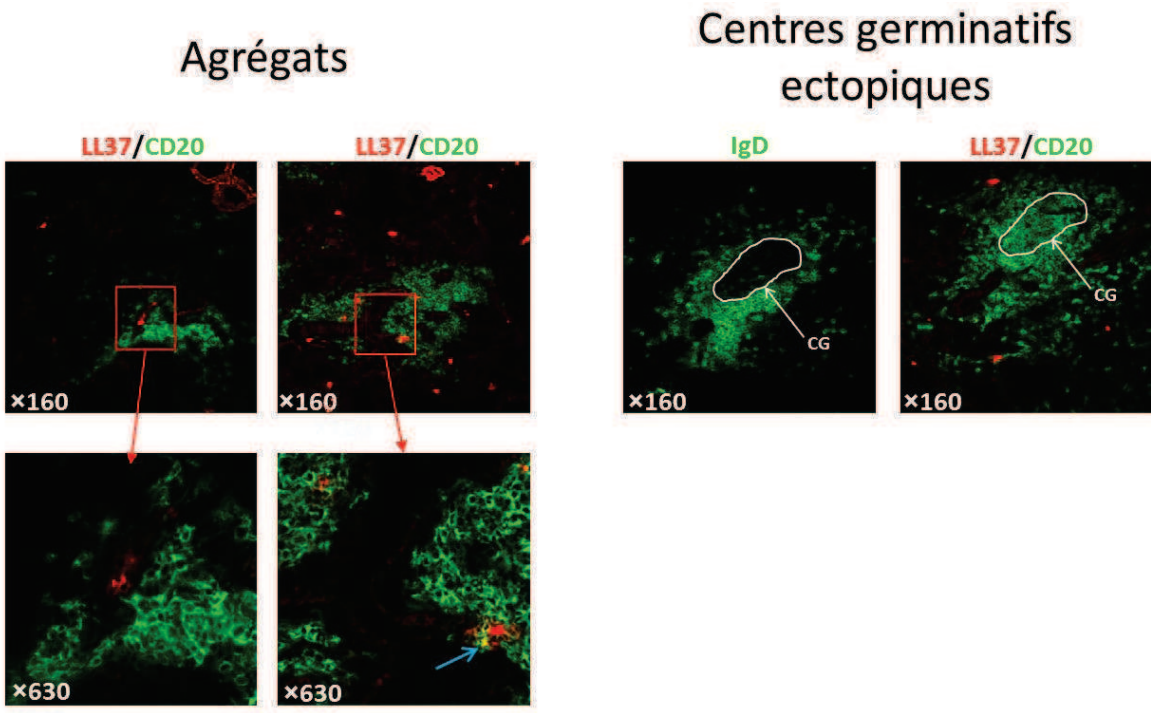

Figure 24 - Expression de hCAP18/LL37 à proximité des deux types d'infiltrats de LB. Le marquage IgD et le double marquage LL37-CD20 ont été effectués sur des coupes sériées. Le marquage IgD permet de localiser le centre germinatif (CG) délimité en blanc. La flèche bleue indique une colocalisation LL37-CD20.

Afin d'évaluer l'expression de hCAP18/LL37 au sein des infiltrats de LB, nous avons effectué des doubles marquages CD20-LL37. Ces marquages montrent que des zones où hCAP18/LL37 est fortement exprimé sont présentes à proximité des deux types d'infiltrats de LB : les agrégats et les CG ectopiques (Fig. 24). Cependant, concernant les CG ectopiques, remarquons que dans l'exemple présenté hCAP18/LL37 est situé à la périphérie du manteau. Nous avons aussi pu observer quelques rares colocalisations du LL37 avec le marqueur des LB : CD20. Ainsi, dans les GS pathologiques, les LB peuvent entrer en contact avec le peptide.

2.1.4. Présence d'agrégats LL37-ADN apoptotique dans les glandes salivaires de patients atteints du syndrome de Gougerot-Sjögren

Nous savons que des phénomènes d'apoptose ont lieu dans les GS lors du SGS (Herrera-Esparza *et al.*, 2008). En outre, nous avons observé, par microscopie confocale et à l'aide de la technique *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling* (TUNEL), des colocalisations entre LL37 et l'ADN apoptotique (Fig. 25). Par conséquent, des agrégats ADN apoptotique-LL37, susceptibles d'activer les cellules TLR9+ situées à proximité, semblent bien présents dans les GS pathologiques.

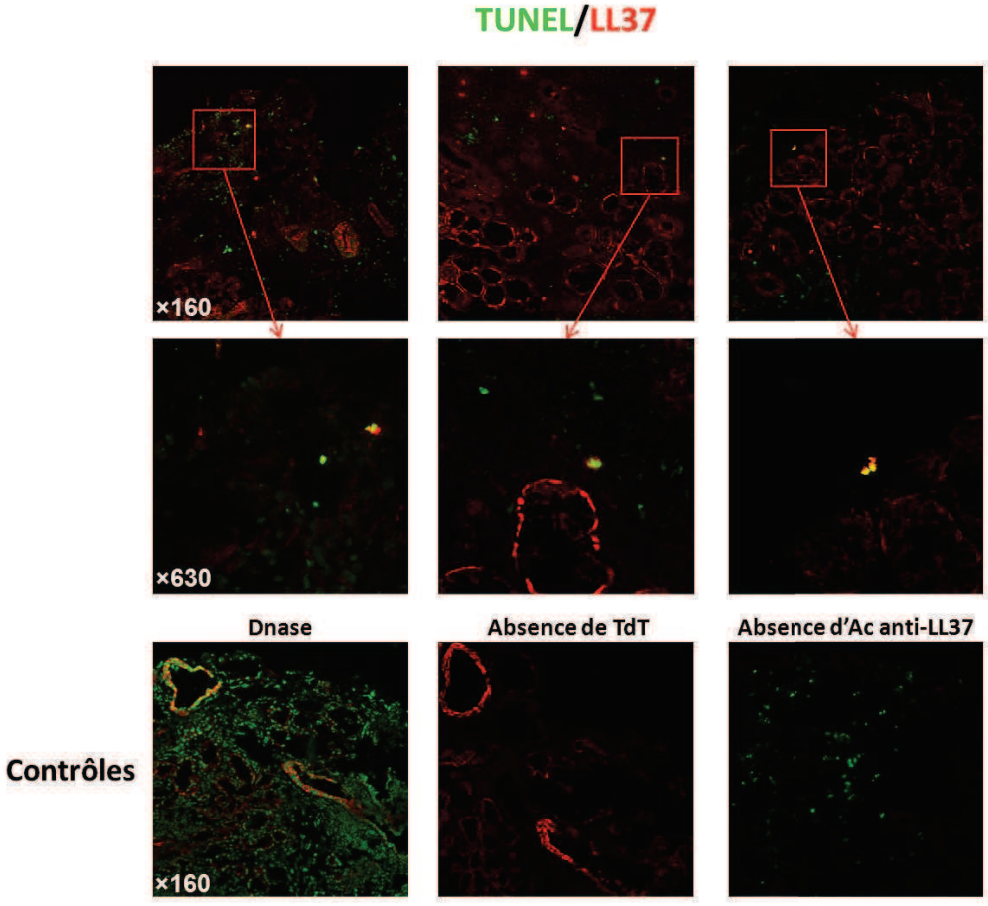

Figure 25 - Présence d'agrégats LL37-ADN apoptotique dans les glandes salivaires de patients atteints du syndrome de Gougerot-Sjögren. Marquages effectués à l'aide de la technique *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling* (TUNEL). Contrôle positif : traitement de la coupe par la DNase 1. Contrôles négatifs : absence de l'enzyme *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT), absence de l'anticorps (Ac) anti-LL37.

2.2. LL37 permet la détection rapide des CpG-B par les LB transitionnels

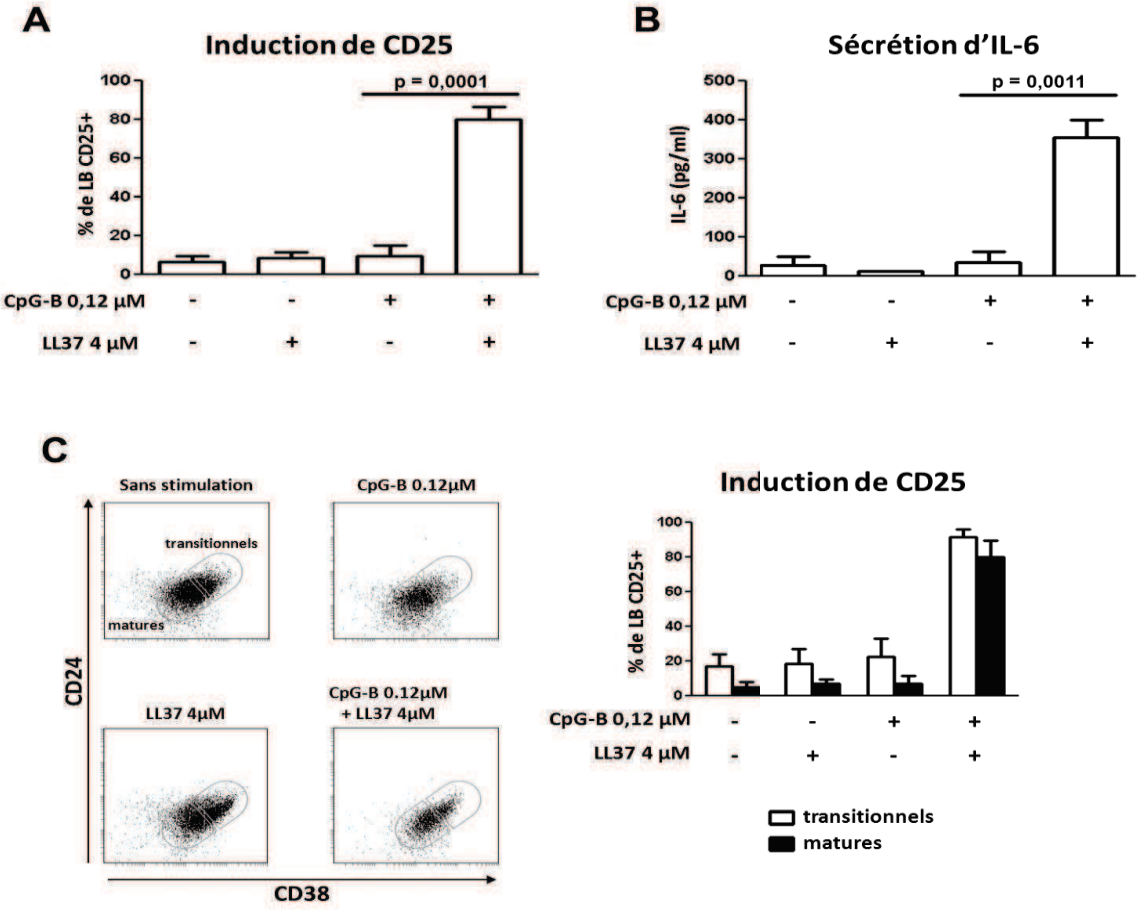

Figure 26 - LL37 permet la détection rapide des CpG-B par les LB du sang de cordon. 4 échantillons de LB de cordon ont été incubés pendant 15 minutes en présence de LL37 (4µM), CpG-B (0,12µM), LL37 (4µM) + CpG-B (0,12µM) ou sans traitement. Ensuite les LB ont été lavés 3 fois et incubés pendant 18H. **A** : Etude de l'expression du marqueur CD25 par cytométrie. **B** : Etude de la sécrétion d'IL-6 par ELISA. **C** : Etude de l'expression de CD25 par les LB transitionnels $CD24^{++}$ $CD38^{++}$ et par les LB matures $CD24^{+}$ $CD38^{+}$. Les tests statistiques (test de Student sur séries appariées) montrent une différence significative entre les stimulations par CpG-B seul et par CpG-B + LL37.

Nous avons vu en introduction que LL37 permet la stimulation des TLR7, 8 et 9 des CD par les acides nucléiques du soi. De plus, il a été montré que LL37 permet une détection rapide des CpG-B par les CDp et par les LB lorsqu'ils sont stimulés en présence des autres cellules mononucléées du sang périphérique (Hurtado *et al.*, 2010). Par ailleurs, et comme nous l'avons vu précédemment, les LB transitionnels semblent

être les LB qui infiltrent les GS lors du SGS, avant de s'y différencier en LB matures. Nous avons donc purifié des LB de sang de cordon, riches en LB transitionnels. Puis nous les avons stimulés par des CpG-B et/ou le peptide LL37 pendant 15 minutes. Suite à cette stimulation, les LB furent lavés 3 fois et incubés pendant 18 heures supplémentaires. L'analyse de l'expression du marqueur d'activation CD25 (Fig. 26A) et de la sécrétion d'IL-6 (Fig. 26B) a montré que LL37 permet une fixation rapide des CpG-B par les LB du sang de cordon et en conséquence une activation importante. En outre, l'étude de l'expression de CD25 chez les LB matures $CD24^{+}$ $CD38^{+}$ et chez les LB transitionnels $CD24^{++}$ $CD38^{++}$ nous permet d'affirmer que ce phénomène vaut pour ces deux populations de LB (Fig. 26C).

IV. Expression du TLR9 à la surface des LB

1. Introduction

Comme les autres TLR qui reconnaissent les acides nucléiques, le TLR9 est localisé dans le réticulum endoplasmique (RE) et les endolysosomes. L'activation de ce récepteur est dépendante de l'acidification des compartiments endosomaux. Cette acidification, outre un rôle direct sur l'interaction avec son ligand (Rutz *et al.*, 2004), permet le clivage du TLR9 qui semble être nécessaire à son activation (Ewald *et al.,* 2008; Park *et al.*, 2008). Cette expression intracellulaire et ce clivage localisé permettent de restreindre l'activation du TLR9 aux ligands capables d'atteindre les endolysosomes en quantités suffisantes, ce qui n'est normalement pas le cas de l'ADN du soi. En effet, alors qu'un TLR9 exprimé artificiellement à la membrane cellulaire n'est pas fonctionnel car non clivé, un TLR9 muté dans son domaine transmembranaire, exprimé à la surface des cellules et ne nécessitant pas de clivage pour être activé du fait de cette mutation, confère aux cellules qui l'expriment une sensibilité à l'ADN de mammifère (Barton *et al.,* 2006; Ewald *et al.*, 2008; Mouchess *et al.*, 2011). Ainsi, selon l'équipe de Barton, l'absence de TLR9 fonctionnel à leur surface permet aux cellules de discriminer l'ADN microbien de l'ADN du soi (Fig. 27). Cependant, des chercheurs ont montré une importante expression du TLR9 à la surface de CE intestinales et gastriques sans pour autant apporter de preuve irréfutable que ce TLR9 est fonctionnel (Lee *et al.,* 2006; Schmausser *et al.*, 2004). Par ailleurs, quelques équipes ont évoqué la présence du TLR9 à la surface des LB humains (Baiyee *et al.,* 2006; Dasari *et al.*, 2005; Eaton-Bassiri *et al.*, 2004). Nous avons donc cherché à confirmer cette expression du TLR9 à la membrane cellulaire des LB humains et à étudier son caractère fonctionnel.

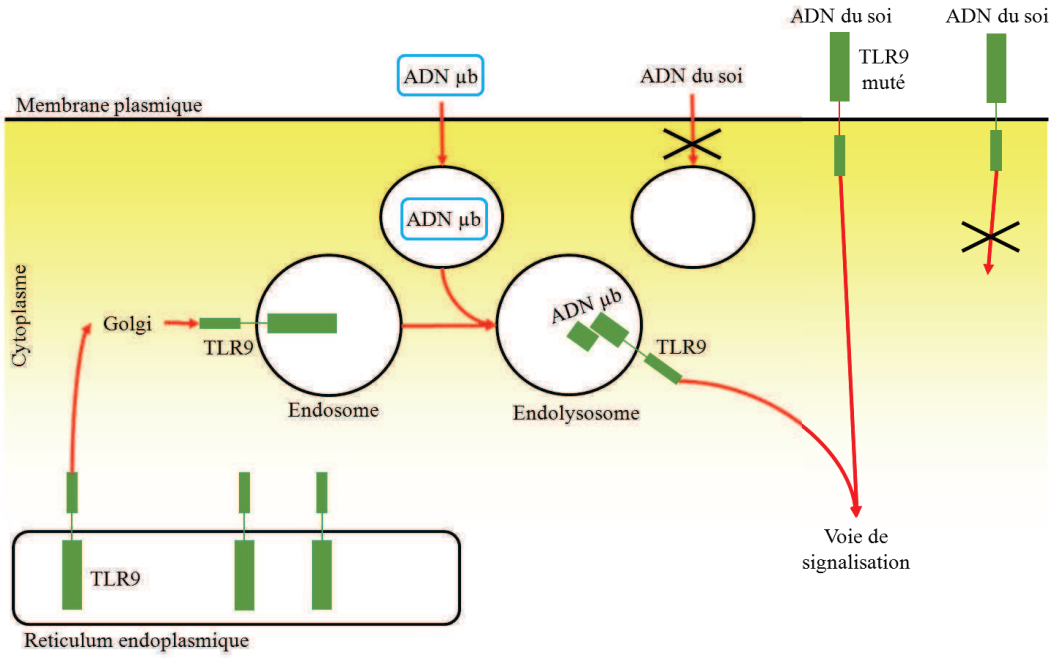

Figure 27 - Représentation schématique des résultats de l'équipe de Gregory Barton. (Barton *et al.,* 2006; Ewald *et al.*, 2008; Mouchess *et al.*, 2011)

2. Résultats

2.1. Expression du TLR9 à la surface des LB

Comme d'autres équipes (Baiyee *et al.,* 2006; Dasari *et al.*, 2005; Eaton-Bassiri *et al.*, 2004), nous avons mis en évidence par cytométrie la présence de TLR9 à la surface des LB du sang périphérique et des LB d'amygdales (Fig. 28A). Nous avons aussi détecté cette expression de surface chez les LB du sang de cordon : les LB transitionnels $CD24^{fort}$ $CD38^{fort}$ et les LB matures naïfs $CD24^{+}$ $CD38^{+}$ y expriment le TLR9 de surface à un niveau similaire.

Afin de confirmer la présence de TLR9 à la surface des LB, nous avons spécifiquement biotinylé les protéines exprimées à la surface des LB d'amygdales. Les protéines biotinylées ont ainsi pu être purifiées et analysées par western-blot (Fig. 28B). L'étude du *early endosome antigen 1* (EEA1) : un marqueur du compartiment endosomal, de la β-actine : un marqueur du cytoplasme, et du CD20 exprimé à la surface des LB, nous a permis de vérifier la pureté des protéines de surface ainsi isolées. Notons que la β-actine interagit avec le domaine intracellulaire de différentes

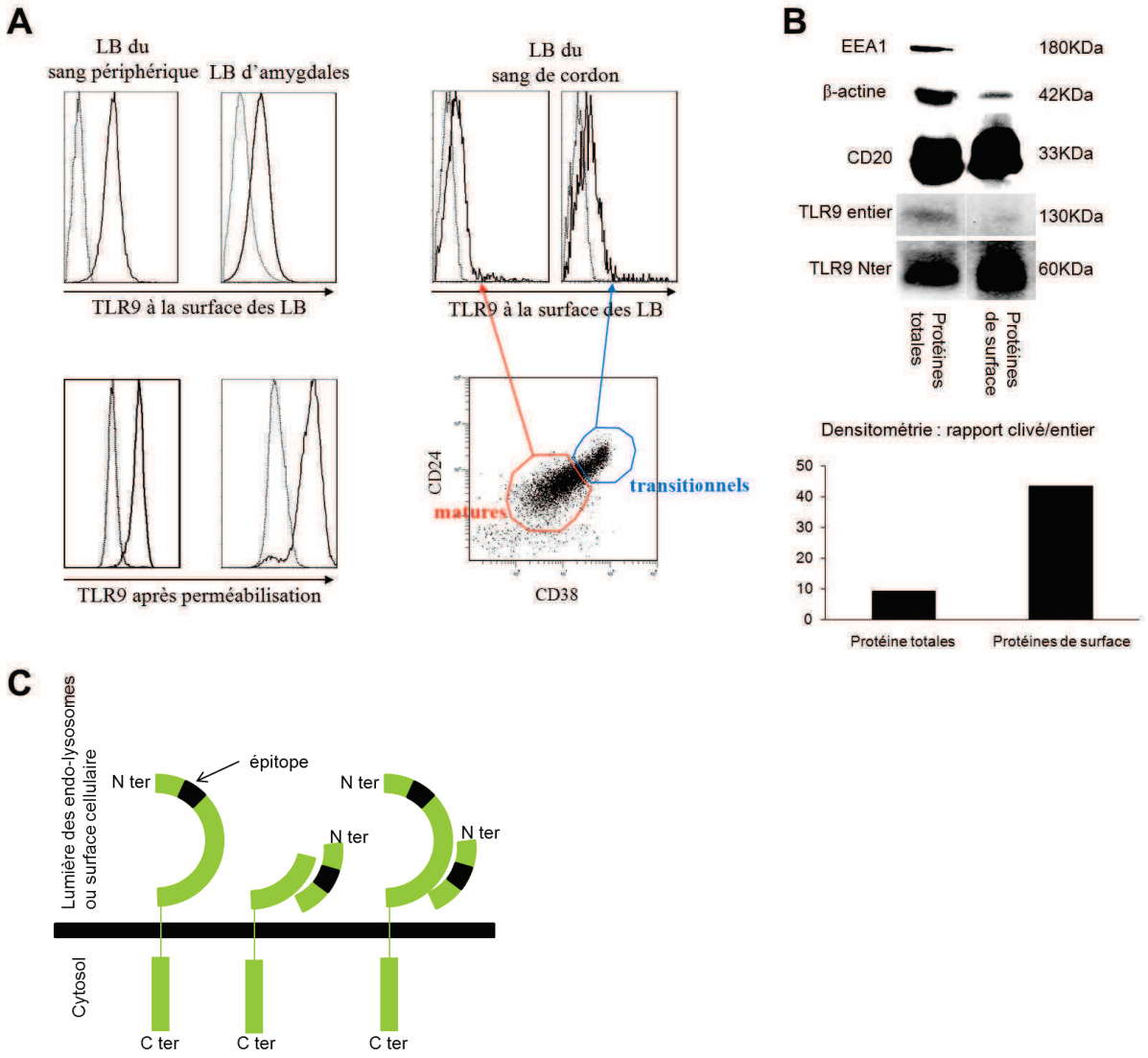

Figure 28 - Expression du TLR9 à la surface des LB. **A** : analyse par cytométrie, avec et sans perméabilisation des cellules, de l'expression du TLR9 chez les LB de différentes origines : amygdales, sang périphérique et sang de cordon. **B** : A partir de LB d'amygdales, les protéines de surface ont été purifiées par biotinylation sélective à l'aide du kit *Cell Surface Protein Isolation* (Pierce). L'analyse par western-blot confirme la pureté des protéines de surface et montre la présence, au sein de celles-ci, du TLR9 entier et de son fragment N terminal. L'analyse quantitative des bandes correspondant au TLR9 par densitométrie montre une proportion élevée de TLR9 clivé chez les protéines de surface par rapport aux protéines totales. **C** : Schéma représentant le TLR9 entier, les deux fragments issus du clivage, l'interaction du fragment N terminal (Nter) avec le TLR9 entier et avec le fragment C terminal (Cter) et la localisation de l'épitope reconnu par les Ac anti-TLR9 utilisés en cytométrie, en western-blot et pour le *crosslink* du TLR9 de surface.

protéines transmembranaires, la présence de cette protéine au sein des protéines de surface n'est donc pas anormale. Grace à cette technique, nous avons pu confirmer l'existence de TLR9 à la surface des LB. Les protéines de surface purifiées contenaient, en effet, le TLR9 entier (130 KDa) mais aussi et en quantités beaucoup plus importantes le fragment N-terminal (60 KDa) issu du clivage du TLR9. Il est important de noter que ce fragment est connu pour se lier de façon non covalente voire éventuellement par des ponts disulfures au TLR9 entier et/ou au fragment actif du TLR9 : le fragment C-terminal (Fig 28C). N'ayant pas trouvé d'Ac dirigés contre le fragment C-terminal efficaces, nous n'avons pas été en mesure de confirmer l'existence de ce fragment à la surface des LB. Néanmoins, nos résultats démontrent la présence de TLR9 entier mais aussi de TLR9 clivé donc potentiellement actif à la surface des LB. En outre, l'analyse des western-blots par densitométrie montre qu'à la surface cellulaire la proportion de TLR clivé est supérieure à celle observée chez les protéines totales (Fig. 28B).

2.2. Colocalisation avec le BCR

Lors de la stimulation des LB par des Ag, il y a une colocalisation du BCR et du TLR9 au sein du compartiment endosomal. De plus, cette colocalisation est nécessaire à l'hyperactivation des MAP kinases observée lors de la stimulation par des Ag contenant des ligands du TLR9 (Chaturvedi *et al.*, 2008). Nous avons donc cherché à savoir si le TLR9 colocalise ou non avec le BCR à la surface des LB. Pour cela nous avons purifié, à l'aide de gradients de sucrose, les radeaux lipidiques de LB d'amygdales dont nous avions stimulé ou non le BCR par un Ac anti-IgM (Fig. 29A). Rappelons que la toxine cholérique B se fixe au ganglioside GM1, un des constituants des radeaux lipidiques. Elle nous permet de vérifier que la fraction 11 contient bien les radeaux lipidiques. Certains LB d'amygdales étant activés, une faible proportion de la chaîne lourde de l'IgM est déjà présente dans les radeaux lipidiques sans qu'il y ait eu *crosslink* du BCR. Néanmoins, après *crosslink* du BCR, la proportion de cette chaine lourde présente dans les radeaux lipidiques augmente nettement. Il en est de même

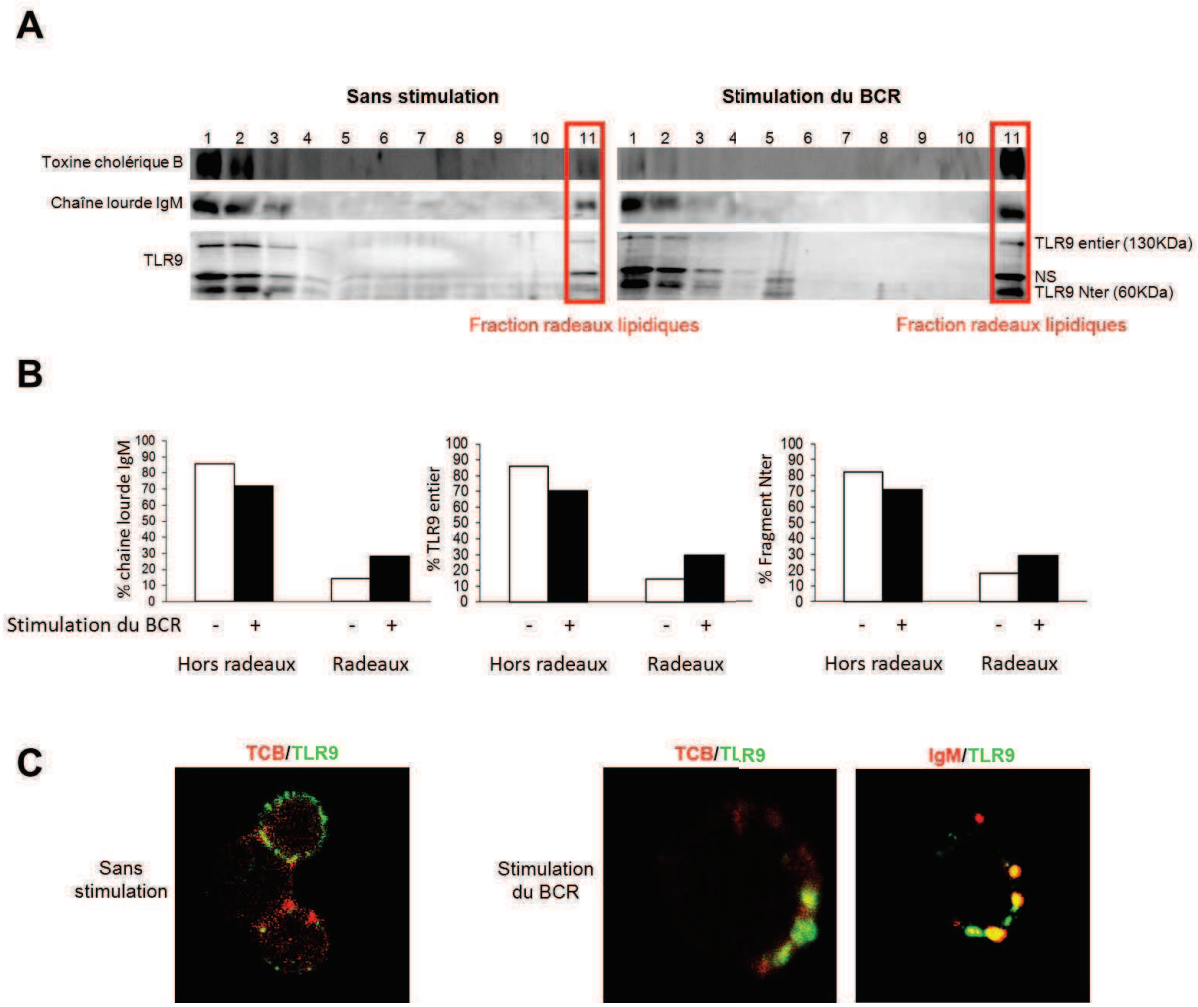

Figure 29 - Colocalisation TLR9-BCR dans les radeaux lipidiques à la surface des LB d'amygdales. **A** : Nous avons stimulé ou non l'IgM de membrane de LB d'amygdales, avons procédés à des gradients de sucrose et avons étudié par Western-blot les différentes fractions obtenues. La fraction 11 contient les radeaux lipidiques. **B** : Analyse densitométrique des western-blots. **C** : Doubles marquages IgM/TLR9 et Toxine cholérique B (TCB)/TLR9 sur des LB d'amygdales dont nous avons stimulé ou non le BCR. Les images ont été obtenues par microscopie confocale. NS : bande non spécifique.

pour le TLR9 entier et pour son fragment N terminal comme en atteste l'analyse densitométrique du western-blot (Fig. 29B).

Ces résultats ont été confirmés par microscopie confocale (Fig. 29C). En effet, après *crosslink* du BCR, le TLR9 de surface colocalise avec la toxine cholérique et avec l'IgM de membrane. Par conséquent, lorsque le BCR est stimulé, il semble bien y avoir une colocalisation du TLR9 de surface avec ce dernier au sein des radeaux lipidiques.

2.3. Liaison à son ligand ?

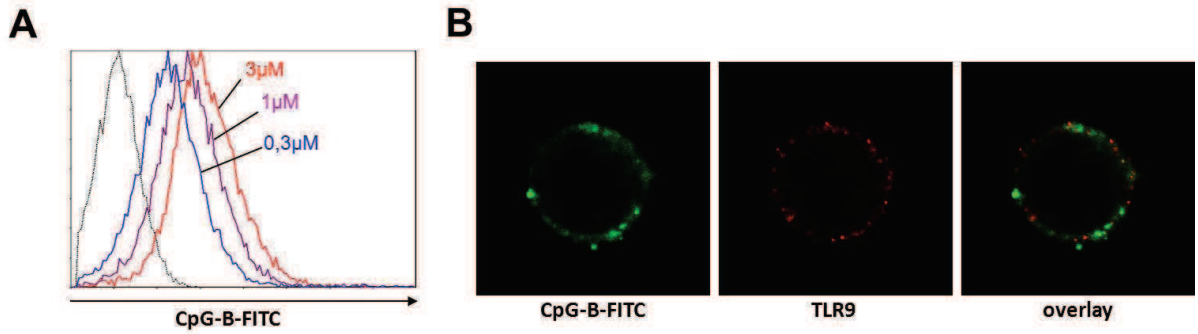

Figure 30 - TLR9 de surface et CpG-B. A : Liaison des CpG-B à la surface des LB d'amygdales. Les LB ont été incubés à 4°C avec trois concentrations de CpG-B-FITC puis ont été lavés et analysés par cytométrie. **B** : Les CpG-B-FITC incubés avec des LB d'amygdales à 4°C ne colocalisent pas avec le TLR9 de surface. Images obtenues par microscopie confocale.

Le ligand synthétique du TLR9 le plus couramment utilisé, le CpG-B, se fixe à la surface des LB d'amygdales de façon dose-dépendante (Fig. 30A) puis est rapidement endocyté. Cependant, la nature des interactions du CpG-B avec la membrane plasmique des LB est mal connue. La question de son éventuelle liaison au TLR9 de surface se pose donc naturellement. Nos résultats obtenus par microscopie confocale montrent une absence de colocalisation entre le CpG-B marqué par le fluorochrome FITC et le TLR9 exprimé à la surface des LB d'amygdales. Par conséquent, le TLR9 de surface apparaît comme incapable de lier son ligand (Fig. 30B).

2.4. Effets d'un *crosslink* du TLR9 de surface

Le ligand synthétique habituel du TLR9 ne se liant pas au TLR9 de surface, pour étudier les éventuels effets d'une stimulation de ce dernier, nous avons procédé à son *crosslink* à l'aide de deux Ac monoclonaux. L'étude de l'expression du marqueur d'activation CD25 chez les LB d'amygdales ne nous a pas permis de mettre en évidence un effet activateur du simple *crosslink* du TLR9 de surface (Fig. 31A). Etant donné que, lorsque le BCR est stimulé, le TLR9 de surface colocalise avec lui dans les radeaux lipidiques, son *crosslink* pourrait influer sur la stimulation du BCR. Nos résultats invalident, cependant, cette hypothèse. En effet, si la stimulation du BCR induit une légère surexpression du CD25, cette dernière n'est pas modifiée par un *crosslink* simultané du TLR9 de surface (Fig. 31A). Par contre, nous avons pu observer un effet inhibiteur du *crosslink* du TLR9 de surface sur l'activation induite par la stimulation du TLR9 endosomal (Fig. 31B).

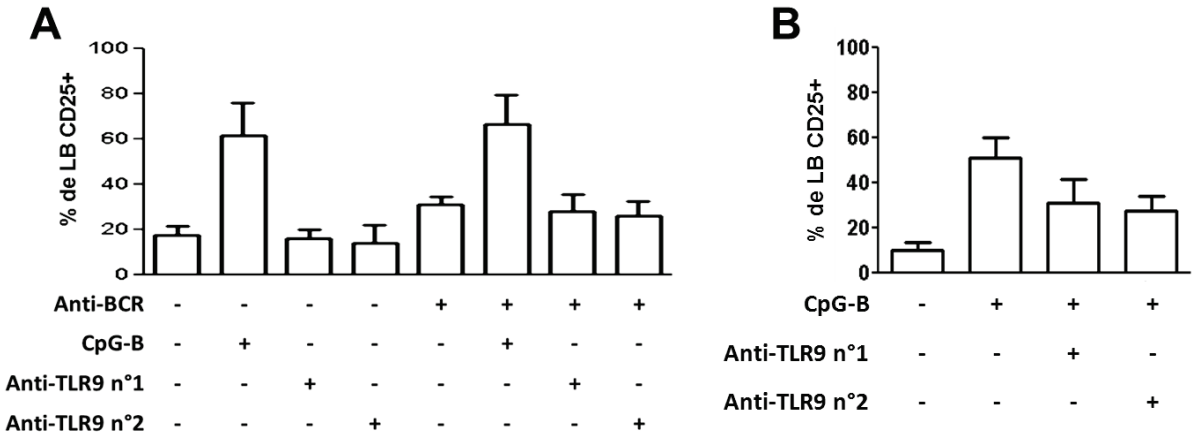

Figure 31 - Effets d'un *crosslink* du TLR9 de surface sur l'activation des LB d'amygdales. Etude de l'expression du marqueur d'activation CD25 par cytométrie. Les LB d'amygdales ont été incubés pendant 24 heures avec un Ac monoclonal murin anti-TLR9 (Ac n°1), un Ac monoclonal de rat anti-TLR9 (Ac n°2) ou le CpG-B à 0,25µM en présence ou non d'un Ac anti-BCR (**A**), en présence ou non du CpG-B à 0,25µM (**B**). Chaque Ac est à la concentration de 10µg/ml.

DISCUSSION GENERALE

I. TLR9, différenciation des LB et SGS

1. Phénotype des LB infiltrant les glandes salivaires lors du syndrome de Gougerot-Sjögren et expression du TLR9

Lors du SGS, certains infiltrats de LB présents dans les GS étaient dénommés CG ectopiques sans analyse phénotypique fine pour les caractériser. Notre étude montre qu'il existe bien, dans les GS, de vrais CG ectopiques présentant les mêmes caractéristiques phénotypiques et le même profil transcriptionnel que les CG de l'amygdale.

Cependant, les vrais CG ectopiques, nouvellement définis selon ces critères, sont extrêmement rares au sein des GS. En effet, parmi les 40 biopsies de GS accessoires de grade 3 ou 4 (selon la classification de Chisholm) que nous avons analysées, seules 4 présentaient ces caractéristiques. La majorité des LB infiltrés, constitués en agrégats, sont phénotypiquement proches des LB T2. Et contrairement aux CG ectopiques, parmi les sept agrégats, quatre expriment fortement :

- Notch-2 nécessaire à la différenciation en LB de la ZM,
- Blimp-1 et IRF-4, d'où la faible expression de Bcl6 et Pax-5, suggérant que ces LB sont des LB de la ZM proches de la différenciation terminale en plasmocytes.

Notons à ce titre que, dans les réponses T-indépendantes, les LB activés expriment plus fortement Blimp-1 expliquant en partie leur rapide différenciation en plasmocytes, sans formation de CG (Lindroth et Fernandez, 2007). Les trois autres agrégats ne présentent ni le profil des LB de la ZM ni celui des CG mais leur forte expression de BR3 suggère qu'il s'agit bien de LB T2. Ces résultats sont cohérents avec une étude du phénotype des LB infiltrants effectuée par cytométrie sur LB élués à partir des GS pathologiques. En effet, cette étude évoquait déjà la présence de LB T2 et de LB de la ZM (Daridon *et al.*, 2006).

Notons que nous n'avons pas observé de corrélation entre le type d'infiltrats et la présence de facteurs rhumatoïdes IgA, les taux sériques de BAFF ou des auto-Ac anti-SSA et anti-SSB (données non montrées). Il ne semble pas y avoir, non plus, de relations avec la durée de la maladie ou la présence de complications extraglandulaires.

De plus, notre étude montre que le TLR9 est fortement exprimé par les LB T2 ou de la ZM formant des agrégats alors qu'il est faiblement exprimé dans les CG ectopiques, comme c'est le cas dans les CG d'amygdales. Par ailleurs, grâce à l'Ac anti-idiotype 9G4 qui identifie des Ac auto-immuns codés par le gène de la chaine lourde VH4.34, nous avons mis en évidence la présence de LB autoréactifs au sein des deux types d'infiltrats. Dans les CG ectopiques, cette présence montre que le mécanisme visant à exclure les LB autoréactifs des CG est défectueux comme cela a été démontré lors du LED où les Ac VH4.34+ représentent une fraction significative des Ac anti-ADNdb natif (Cappione *et al.*, 2005). En outre, dans les agrégats et contrairement aux vrais CG, les LB VH4.34+ expriment fortement le TLR9.

Rappelons que, lors d'une déplétion des LB par traitement avec le rituximab, est observée une déplétion totale des LB circulants mais aussi des LB présents dans les GS. Durant la reconstitution, les premiers LB qui colonisent les GS ont un phénotype similaire aux LB T1 (Pers *et al.*, 2007). Comme dans la rate, il semblerait donc que ce ne sont pas des LB matures qui infiltrent les GS mais des LB transitionnels qui se différencient *in situ* en LB matures selon la voie de différenciation des LB Fo ou celle des LB de la ZM. Etant donnée l'analyse phénotypique et transcriptionnelle des LB infiltrant les GS, la différenciation en LB de la ZM semble être la voie majoritaire. Enfin, le profil d'expression du TLR9 nous amène à évoquer le possible rôle du TLR9 dans cette différenciation *in situ* et dans l'activation des LB autoréactifs ne formant pas de CG ectopiques.

2. Rôle du TLR9 dans l'ontogenèse des LB

Nous avons donc cherché à évaluer le rôle du TLR9 dans la maturation des LB transitionnels à l'aide d'expériences *in vitro*.

Lors de ces expériences, nous avons non seulement constaté que les LB transitionnels issus du sang de cordon expriment le TLR9, mais aussi qu'ils sont sensibles à sa stimulation comme cela a déjà été prouvé chez la souris (Ueda *et al.*, 2007). Nous avons, en effet, observé que l'engagement du TLR9 des LB transitionnels provoque leur prolifération et la sécrétion d'Ig. Nous avons également découvert que les CpG-B sont capables, chez ces cellules comme chez les LB matures naïfs du sang de cordon, d'induire une commutation vers l'isotype IgG.

En outre, nos résultats indiquent que la stimulation du TLR9 chez les LB transitionnels engendre une différenciation particulière, caractérisée par l'apparition d'un phénotype compatible avec celui des LB de la ZM : $CD21^{fort}$ $CD23^{faible}$ IgM^{fort} IgD^{faible} et Notch 2^{fort}, et aboutit à la production d'auto-Ac. Ce type de maturation n'est pas observé lors d'une stimulation "T-dépendante" des LB transitionnels ni lors de la stimulation du TLR9 de LB matures naïfs ou encore de LB d'amygdales. Par conséquent, cette orientation de la différenciation des LB est spécifique à la fois du type de stimulation et du stade de maturation des LB. Les LB transitionnels issus du sang de cordon et ceux issus du sang périphérique pouvant réagir différemment, il serait intéressant de confirmer nos résultats chez ces derniers. Néanmoins, l'activation du TLR9 des LB transitionnels semble jouer un rôle dans leur maturation en favorisant leur différenciation vers la voie des LB de la ZM. Autrement dit, des signaux de l'immunité innée favoriseraient le développement de LB "innés". Cet effet pourrait contribuer à la fréquence des LB anti-ADN parmi les LB de la ZM (Zeng *et al.*, 2000). Les LB transitionnels anti-ADN étant capables d'endocyter l'ADN grâce à leur BCR, et donc d'engager leur TLR9, ils seraient plus enclins à se différencier en LB de la ZM.

Les mécanismes moléculaires de l'effet du TLR9 sur la maturation des LB transitionnels restent à explorer. Les voies de signalisation du TLR9 sont-elles différentes chez les LB transitionnels comme c'est le cas pour celles du BCR

(Andrews *et al.*, 2009) ? La stimulation du TLR9 induit l'expression de Notch-2 selon quelles voies de signalisation ? Comment Notch-2 est-il activé dans ces conditions ? Voilà quelques questions parmi d'autres.

L'équipe de Ritta Carsetti a montré que la stimulation des LB de sang de cordon par des CpG-B entraine, chez une fraction d'entre eux, l'apparition d'un phénotype de LB mémoires à IgM ainsi que l'apparition de mutations somatiques dans les gènes des Ig (Aranburu *et al.,* 2010; Capolunghi *et al.*, 2008). Chez l'homme, les LB mémoires à IgM appartiendraient à la lignée des LB de la ZM (Weller *et al.*, 2004). Ainsi, ces travaux complètent et confirment nos résultats. La pertinence de ces informations obtenues *in vitro* vis-à-vis de la différenciation des LB *in vivo* semble être confirmée par de récents résultats de l'équipe de Claude Agnès Reynaud. En effet, l'analyse des LB de patients déficients en MyD88 ou en IRAK4, deux protéines indispensable à la voie de signalisation de l'ensemble des TLR sauf les TLR3 et 4, a mis en évidence une diminution marquée et durable au cours de la vie des LB mémoires à IgM (Reynaud *et al.*, 2012). Par conséquent, les TLR semblent bien impliqués dans le développement des LB de la ZM. Outre l'effet sur la différenciation des LB transitionnels, l'engagement des TLR *in vivo* est susceptible de participer à la prolifération des LB de la ZM et donc à leur auto-renouvèlement. D'autant plus que les LB de la ZM présentent une sensibilité accrue aux ligands des TLR (Bernasconi *et al.*, 2002). TACI, un des récepteurs de la cytokine BAFF, utilise aussi la voie de signalisation MyD88-IRAK4 (He *et al.*, 2010). De plus, BAFF favorise le développement des LB de la ZM chez la souris (Batten *et al.*, 2000). Il est donc possible que TACI joue un rôle dans le développement des LB de la ZM. TACI étant faiblement exprimé par les LB transitionnels (Cuss *et al.* 2006), son éventuelle implication aurait lieu chez les LB de la ZM. Enfin, la diminution des LB mémoires à IgM n'a pas été observée chez des patients déficients en UNCB93B1, une molécule nécessaire à l'activation des TLR endosomaux (Reynaud *et al.*, 2012). Cela suggère que le TLR9 n'est pas indispensable au développement des LB de la ZM et que d'autres TLR y participent aussi.

3. Implication du TLR9 lors du SGS

Dans les GS lors du SGS, la stimulation anormale du TLR9 par des ligands d'origine infectieuse et/ou endogène pourrait donc favoriser l'activation et la maturation *in situ*, selon la voie des LB de la ZM, des LB transitionnels fréquemment autoréactifs car n'ayant pas encore subi toutes les étapes de mise en place de la tolérance. De ce fait, cette stimulation anormale pourrait participer à la pathogenèse du SGS. D'autant plus que, chez la souris transgénique pour BAFF, les LB de la ZM semblent avoir un rôle primordial dans le développement de la sialadénite (Fletcher *et al.*, 2006).

Parmi les autres TLR endosomaux, le TLR8 est très faiblement exprimés par les différents LB infiltrants. Par contre, nous avons pu détecter une forte expression des ARNm du TLR7 et du TLR3 chez les LB de la ZM (agrégats n°5, 6, 7 et 8) (Fig. 32A). Le profil d'expression du TLR3 a été confirmé par immunofluorescence indirecte sur coupes de GS (Fig. 32B). Cette expression par certains LB infiltrants est intéressante car elle n'a qu'exceptionnellement été décrite chez les LB. Elle pourrait donc être induite par un facteur local. Par conséquent, ces deux TLR pourraient jouer un rôle dans l'activation locale des LB de la ZM. D'autant plus que, parmi les auto-Ac qui caractérisent le SGS, sont présents des Ac anti-RNP dont la production et les effets néfastes sont liés au TLR7 (Barrat *et al.,* 2005; Lau *et al.*, 2005) et pourraient l'être au TLR3. Bien que cela nécessite d'être confirmé, la faible expression relative des deux TLR chez les LB transitionnels (agrégats n°9, 10 et 11) suggère qu'ils ne sont probablement pas impliqués dans la maturation des LB transitionnels infiltrant les GS de SGS.

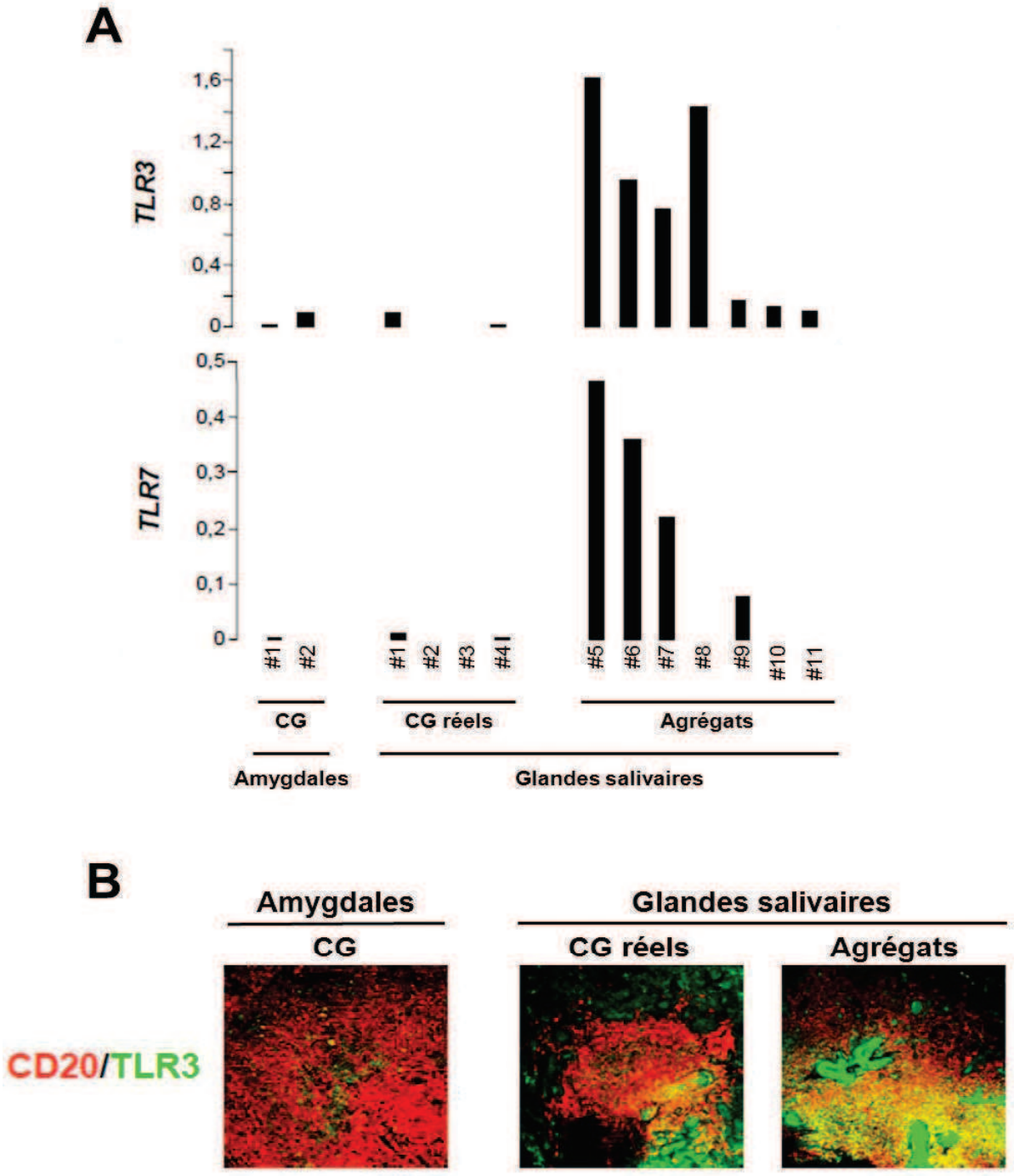

Figure 32 - Analyse de l'expression des TLR3 et 7 au sein des deux types d'infiltrats de LB présents dans les glandes salivaires lors du syndrome de Gougerot-Sjögren. **A** : RT-PCR quantitative à partir des échantillons issus des microdissections laser. **B** : Doubles marquages CD20-TRITC et TLR3-FITC par immunofluorescence sur coupes d'amygdale et de GS. L'amygdale est utilisée comme OLS de référence.

Le SGS est la MAI au cours de laquelle l'augmentation du risque d'apparition d'un lymphome non hodgkinien est la plus importante (Kassan *et al.*, 1978). Il s'agit quasi exclusivement de lymphomes B et majoritairement de lymphomes de la ZM. Ces lymphomes se développent fréquemment dans les GS (Voulgarelis *et al.*, 1999). Cela représente un argument supplémentaire quant à l'importance des LB de la ZM lors du SGS. Par ailleurs, il a récemment été démontré qu'une mutation de MyD88 (L256P) est impliquée dans la lymphomatogenèse (Ngo *et al.*, 2011). Cette mutation est retrouvée chez 9% des lymphomes du tissu lymphoïde associé à la muqueuse gastrique qui appartiennent aux lymphomes de la ZM. Elle est responsable de l'activation spontanée de la voie de signalisation des TLR. Ceci met en lumière les effets d'une dérégulation de la voie de signalisation des TLR et suggère que cette dérégulation puisse être impliquée dans l'apparition des lymphomes qui compliquent le SGS. Remarquons que BAFF pourrait aussi participer à la lymphomatogenèse. En effet, chez la souris transgénique pour BAFF qui développe les symptômes du SGS, une déficience en TNF entraine l'apparition de lymphomes semblables aux lymphomes de la ZM observés chez l'homme (Mackay *et al.*, 2007).

Nous avons montré que les LB ont un rôle direct dans la destruction du tissu des GS lors du SGS. Ils provoquent l'apoptose des CE salivaires en induisant la translocation de la protéine-kinase C δ dans le noyau de ces cellules (cf. article n°4 en annexe). Il serait intéressant d'analyser l'effet de la stimulation du TLR9 exprimé par les LB sur cette propriété.

Comme nous l'avons vu en introduction, T-bet est un facteur de transcription exprimé par les lymphocytes, suite à leur activation dans certaines conditions. Il est impliqué dans l'orientation des lymphocytes T et B vers un phénotype, respectivement, Th1 et Be1. Il a été prouvé, chez la souris tout du moins, qu'il aiguille la commutation vers un isotype "Th1" particulièrement pathogène lors des MAI systémiques: l'IgG2a (Baudino *et al.,* 2006; Peng *et al.*, 2003; Peng, 2006). Le LED et le SGS étant deux pathologies très proches, il est aussi intéressant de noter qu'une corrélation entre l'expression des gènes caractéristiques d'une réponse Th1 et l'activité de la maladie lupique a été décrite chez l'homme (Lit *et al.*, 2007). Il a également été

démontré que T-bet joue un rôle dans la physiopathologie du lupus (Peng *et al.*, 2002). Pour ce qui nous concerne, nous avons montré, par RT-PCR quantitative, que la co-stimulation du BCR et du TLR9 provoque chez les LB matures d'amygdales l'expression de ce facteur de transcription (Fig. 33). De plus, nous avons mis en évidence, dans les GS de SGS, la présence de LBe1 exprimant l'IFNγ (cf. article n°3 en annexe). Si cela reste à étudier plus en détails, la sollicitation du TLR9 pourrait donc concourir à l'apparition de LBe1 dans les GS lors du SGS.

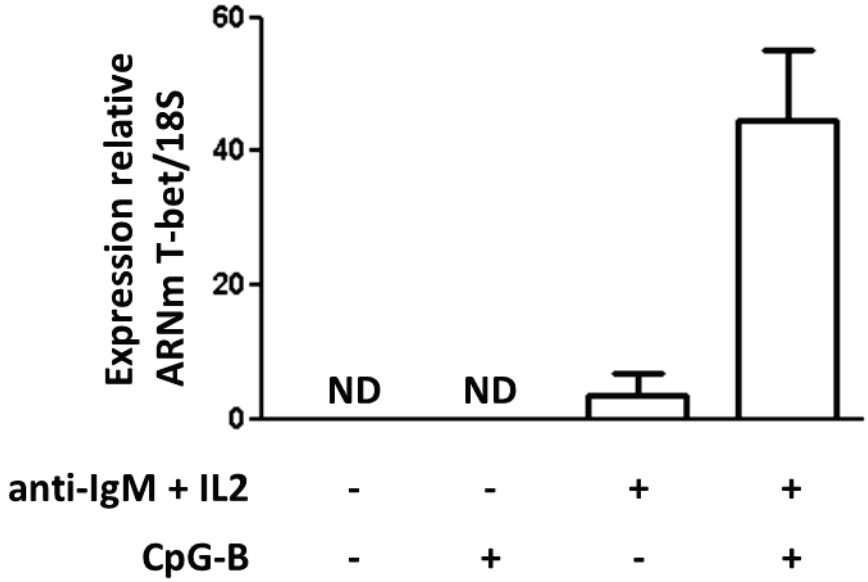

Figure 33 - Expression du facteur de transcription T-bet. Quantité d'ARNm de T-bet exprimée par rapport à celle d'ARN18S dans les LB matures d'amygdales après 18 heures de culture. Elle a été déterminée par RT-PCR quantitative (moyenne +/- écart-type de triplicats). CpG-B : 0,25µM de CpG-B n°2006, anti-IgM : 1µg/ml de billes recouvertes d'anticorps anti-IgM, IL-2 : 100UI/ml d'interleukine-2, ND : non détecté.

Enfin, nos travaux apportent, d'une part, des informations intéressantes quant à l'influence des agonistes pharmacologiques du TLR9 sur la physiologie des LB et, d'autre part, renforcent l'idée d'un intérêt thérapeutique des antagonistes du TLR9 dans le SGS.

L'utilisation d'agonistes du TLR9 pour le traitement de diverses pathologies comme, par exemple, les lymphomes non-hodgkiniens est à l'étude (cf. article n°5 en annexe). Cela nous amène à évoquer la nécessaire prudence quant à l'administration itérative de ces agonistes chez l'homme. Comme l'IFN-α, ces molécules pourraient, selon la voie d'administration et chez certains malades prédisposés, entraîner l'apparition ou l'aggravation de MAI comme le lupus ou le SGS (Krieg, 2006). Un cas de lupus cutané induit par l'application topique d'imiquimod, un ligand synthétique du TLR7, a déjà été décrit (Burnett *et al.*, 2010).

Si plusieurs ODN inhibiteurs sont en évaluation pour le traitement du LED ou du psoriasis (Dunne *et al.*, 2011), ce n'est pas encore le cas pour le SGS. Cependant, l'hydroxychloroquine qui inhibe partiellement les TLR intracellulaires (Kuznik *et al.*, 2011) a déjà montré une efficacité sur certains signes biologiques du SGS et semblerait avoir une efficacité sur les signes cliniques (Mariette, 2002). De plus, l'équipe de Franck Barrat a montré que la stimulation des TLR7 et 9 réduit l'activité thérapeutique des glucocorticoïdes (Guiducci *et al.*, 2010). Ces derniers étant prescrits lors du SGS ou d'autres MAI, la co-administration d'inhibiteurs devrait permettre de retrouver une sensibilité aux glucocorticoïdes.

A cet égard, nous avons récemment démontré que l'inhibition de la voie de signalisation du TLR9 est un des mécanismes d'action des Ig intraveineuses qui sont prescrites pour le traitement de nombreuses MAI (cf. article n°6 en annexe).

II. Implication du peptide LL37 lors du syndrome de Gougerot-Sjögren

A côté de ces effets bénéfiques dans la défense contre les agents infectieux tout particulièrement au niveau de la peau et des muqueuses, LL37 peut jouer un rôle délétère dans certaines MAI en augmentant les propriétés immunostimulantes des acides nucléiques du soi (Ganguly *et al.,* 2009; Lande *et al.*, 2007). Cette propriété repose sur la capacité de LL37 à former des agrégats avec les acides nucléiques et à favoriser la localisation de ces derniers dans le compartiment endosomal où sont exprimés les TLR3, 7, 8 et 9.

Nos résultats indiquent que cela pourrait être le cas au cours du SGS. Nous montrons, en effet, que LL37 est exprimé dans les GS lors du SGS mais aussi dans les GS de témoins. Cependant, le profil d'expression de LL37 y est différent : chez les témoins, seules les CE expriment le peptide alors que chez les malades, des cellules CD16+ CD11b+ exprimant fortement LL37 sont présentes à proximité immédiate des infiltrats de LB. Toujours chez les malades, nous avons aussi mis en évidence la présence d'agrégats LL37-ADN apoptotique. Enfin, nous montrons que LL37 permet une rapide détection du ligand synthétique du TLR9 : le CpG-B par les LB matures mais aussi par les LB transitionnels. Lors du SGS, nous avons vu que les LB transitionnels sont les LB qui infiltrent en premier les GS et qui s'y différencient. Ainsi, LL37 pourrait participer à la pathogenèse du SGS en favorisant la stimulation rapide du TLR9 des LB infiltrant les GS et donc leur activation aberrante.

Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser d'un point de vue quantitatif l'expression de LL37 dans les GS de témoins et de malades et d'étudier l'effet du LL37 sur l'activation des LB par de l'ADN viral ou par de l'ADN humain et en particulier par de l'ADN de SGS. En effet, comme dans le LED, il semblerait que l'ADN soit peu méthylé lors du SGS (Yin *et al.*, 2010). Ce qui augmente ses propriétés immunostimulantes (Hemmi *et al.*, 2000).

Chez les CDp, LL37 permet la rétention des ligands du TLR9 dans les endosomes précoces. Cette localisation induit une forte sécrétion d'IFNα mais une

faible sécrétion de cytokines pro-inflammatoires contrairement à l'activation du TLR9 dans les endosomes tardifs (Lande *et al.*, 2007). Une telle régulation spatiotemporelle influençant le profil cytokinique existe-t-elle chez les LB ? Cela reste à analyser.

Des CD notamment des CDp sont présentes dans les GS lors du SGS (Gottenberg *et al.*, 2006), le LL37 produit dans les GS pourrait donc promouvoir la sécrétion d'IFNα. De plus, LL37 favorise aussi la stimulation du TLR3 (Lai *et al.*, 2011). Ce TLR est exprimé par les CE salivaires et par certains LB infiltrant les GS (Fig. 32) (Kawakami *et al.*, 2007). En conséquence, il est possible que LL37 participe à l'activation de ces cellules par les ligands du TLR3.

Deux équipes de recherche ont récemment démontré le rôle de LL37, des PNN et des *neutrophil extracellular traps* (NET) dans la physiopathologie du LED (Garcia-Romo *et al.,* 2011; Lande *et al.*, 2011). Lorsque les PNN sont activés, ils peuvent subir la NETose, une mort cellulaire particulière qui aboutit à la formation de NET. Ces NET consistent en un réseau extracellulaire d'ADN décondensé auquel s'associent des agents anti-microbiens tel le LL37. Lors du LED, les PNN sont particulièrement enclins à former des NET qui, grâce à la présence de LL37, ont une grande capacité à activer le TLR9 des CDp. En outre, la présence chez les malades, en plus des Ac anti-ADN, d'autres Ac anti-NET (Ac anti-LL37, anti-*human neutrophil peptide*) suggère que les NET sont à l'origine ou au moins participent à la production de certains auto-Ac observés lors du LED, comme les Ac anti-ADN. A ces travaux, s'ajoutent ceux de l'équipe d'Andrea Cerutti qui montrent que, dans la rate, des PNN sont capables de favoriser le développement et l'activation des LB de la ZM (Puga *et al.*, 2012). Il a aussi été observé que ces PNN forment des structures semblables aux NET. Cependant, le rôle de ces structures, du LL37 et du TLR9 vis-à-vis du développement des LB de la ZM n'y a pas été étudié. En ce qui nous concerne, les cellules exprimant fortement hCAP18/LL37 dans les GS pathologiques sont CD16+ CD11b+. Un phénotypage complémentaire de ces cellules nous apparaît donc indispensable afin de déterminer s'il s'agit de polynucléaires neutrophiles, qui pourraient alors participer à la physiopathologie du SGS selon les mécanismes décrits ci-dessus.

Toutes ces données indiquent que LL37 pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de certaines MAI. Inversement, des chercheurs

envisagent d'utiliser ce peptide pour augmenter les effets des agonistes du TLR9 ou d'autres TLR endosomaux (Chuang *et al.*, 2009).

III. Expression du TLR9 à la surface des LB

L'absence du TLR9 actif à la surface des cellules est considérée comme un élément essentiel permettant la discrimination entre l'ADN microbien et l'ADN du soi. Cependant, nos résultats montrent la présence de TLR9 entier mais surtout de TLR9 clivé donc potentiellement actif à la surface des LB. En outre, comme le TLR9 endosomal, le TLR9 de surface colocalise avec le BCR lorsque ce dernier est activé. Cette colocalisation a lieu dans les radeaux lipidiques, ces structures membranaires spécialisées dans la transduction des signaux. Tous ces résultats indiquent que le TLR9 de surface pourrait être actif. Toutefois, le TLR9 de surface semble incapable d'interagir avec son ligand synthétique : le CpG-B. Néanmoins, nos observations effectuées par microscopie confocale méritent d'être confirmés par une seconde technique comme la co-immunoprécipition des CpG-B et du TLR9 de surface et par l'utilisation d'autres ligands du TLR9. Par ailleurs, la liaison du TLR9 avec ses ligands est décrite comme étant favorisée par l'acidité du milieu (Rutz *et al.*, 2004). Il est donc possible que le milieu extracellulaire ne soit pas assez acide pour permettre l'interaction du TLR9 de surface avec ses ligands connus. Partant, il serait intéressant d'évaluer la liaison du TLR9 de surface avec ses ligands en fonction du pH extracellulaire. Une autre possibilité est que le TLR9 de surface puisse lier d'autres ligands que le TLR9 endosomal. Pour finir, nos expériences de *crosslink* du TLR9 de surface ont un effet négatif sur la stimulation du TLR9 endosomal. Par conséquent, au lieu de favoriser l'activation des LB par l'ADN du soi, le TLR9 de surface pourrait avoir un rôle régulateur sur l'activation du TLR9 endosomal. Cette conclusion repose sur le fait que le TLR9 de surface ne semble pas lier les CpG-B et sur l'hypothèse que le crosslink du TLR9 par des Ac est effectivement capable d'entrainer son activation.

Toutefois, il n'est pas rare que la voie de signalisation induite diffère selon la localisation du récepteur. Chez les cellules épithéliales intestinales, la voie de signalisation induite par la stimulation du TLR9 au pôle apical est, par exemple, différente de celle engendrée par une activation du TLR9 au niveau basolatéral. La stimulation apicale aboutit à l'accumulation de IκB et de p105 polyubiquitinylés d'où

un blocage de l'activation du NFκB (Lee *et al.*, 2006). Il a aussi été montré que la voie de signalisation dépendante de MyD88 induite par l'activation du TLR4 à la membrane cellulaire est remplacée par une voie de signalisation dépendante de TRIF lorsque le TLR4 est endocyté avec son ligand (Kagan *et al.*, 2008). L'analyse de la voie de signalisation mise en jeu par le TLR9 de surface serait une avancée importante dans la compréhension de cette expression du TLR9 à la surface cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

Akira S & Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* (**2004**) 4: 499-511.

Amft N, Curnow SJ, Scheel-Toellner D et al. Ectopic expression of the B cell-attracting chemokine BCA-1 (CXCL13) on endothelial cells and within lymphoid follicles contributes to the establishment of germinal center-like structures in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* (**2001**) 44: 2633-2641.

Anders H, Vielhauer V, Eis V et al. Activation of toll-like receptor-9 induces progression of renal disease in MRL-Fas(lpr) mice. *FASEB J.* (**2004**) 18: 534-536.

Andrews SF & Rawlings DJ. Transitional B cells exhibit a B cell receptor-specific nuclear defect in gene transcription. *J. Immunol.* (**2009**) 182: 2868-2878.

Aranburu A, Ceccarelli S, Giorda E et al. TLR ligation triggers somatic hypermutation in transitional B cells inducing the generation of IgM memory B cells. *J. Immunol.* (**2010**) 185: 7293-7301.

Asselin-Paturel C & Trinchieri G. Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond. *J. Exp. Med.* (**2005**) 202: 461-465.

Attanavanich K & Kearney JF. Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. *J. Immunol.* (**2004**) 172: 803-811.

Aziz KE, McCluskey PJ & Wakefield D. Characterisation of follicular dendritic cells in labial salivary glands of patients with primary Sjögren syndrome: comparison with tonsillar lymphoid follicles. *Ann. Rheum. Dis.* (**1997**) 56: 140-143.

Bae YS, Lee JH, Choi SH et al. Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2. *Circ. Res.* (**2009**) 104: 210-8, 21p following 218.

Baenziger S, Heikenwalder M, Johansen P et al. Triggering TLR7 in mice induces immune activation and lymphoid system disruption, resembling HIV-mediated pathology. *Blood* (**2009**) 113: 377-388.

Baiyee EE, Flohe S, Lendemans S et al. Expression and function of Toll-like receptor 9 in severely injured patients prone to sepsis. *Clin. Exp. Immunol.* (**2006**) 145: 456-462.

Bamba H, Ishigaki H, Ishida H et al. B1-B cells are the main antigen presenting cells in CpG-ODN-stimulated peritoneal exudate cells. *Microbiol. Immunol.* (**2005**) 49: 89-95.

Barone F, Bombardieri M, Manzo A et al. Association of CXCL13 and CCL21 expression with the progressive organization of lymphoid-like structures in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* (**2005**) 52: 1773-1784.

Barrat FJ & Coffman RL. Development of TLR inhibitors for the treatment of autoimmune diseases. *Immunol. Rev.* (**2008**) 223: 271-283.

Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* (**2005**) 202: 1131-1139.

Barton GM, Kagan JC & Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat. Immunol.* (**2006**) 7: 49-56.

Batten M, Groom J, Cachero TG et al. BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J. Exp. Med.* (**2000**) 192: 1453-1466.

Baudino L, Azeredo da Silveira S, Nakata M et al. Molecular and cellular basis for pathogenicity of autoantibodies: lessons from murine monoclonal autoantibodies. *Springer Semin. Immunopathol.* (**2006**) 28: 175-184.

Bekeredjian-Ding I, Inamura S, Giese T et al. Staphylococcus aureus protein A triggers T cell-independent B cell proliferation by sensitizing B cells for TLR2 ligands. *J. Immunol.* (**2007**) 178: 2803-2812.

Bekeredjian-Ding IB, Wagner M, Hornung V et al. Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN. *J. Immunol.* (**2005**) 174: 4043-4050.

Bernasconi NL, Onai N & Lanzavecchia A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* (**2003**) 101: 4500-4504.

Bernasconi NL, Traggiai E & Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* (**2002**) 298: 2199-2202.

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

Bohnhorst JØ, Bjørgan MB, Thoen JE et al. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjögren's syndrome. *J. Immunol.* (**2001**) 167: 3610-3618.

Bombardieri M, Barone F, Humby F et al. Activation-induced cytidine deaminase expression in follicular dendritic cell networks and interfollicular large B cells supports functionality of ectopic lymphoid neogenesis in autoimmune sialoadenitis and MALT lymphoma in Sjögren's syndrome. *J. Immunol.* (**2007**) 179: 4929-4938.

Bourke E, Bosisio D, Golay J et al. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood* (**2003**) 102: 956-963.

Brennan MT, Sankar V, Leakan RA et al. Sex steroid hormones in primary Sjögren's syndrome. *J. Rheumatol.* (**2003**) 30: 1267-1271.

Brentano F, Schorr O, Gay RE et al. RNA released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via Toll-like receptor 3. *Arthritis Rheum.* (**2005**) 52: 2656-2665.

Browning JL. B cells move to centre stage: novel opportunities for autoimmune disease treatment. *Nat Rev Drug Discov* (**2006**) 5: 564-576.

Burnett TJ, English JC3 & Ferris LK. Development of subacute cutaneous lupus erythematosus associated with the use of imiquimod to treat actinic keratoses. *J Drugs Dermatol* (**2010**) 9: 1022-1024.

Busconi L, Bauer JW, Tumang JR et al. Functional outcome of B cell activation by chromatin immune complex engagement of the B cell receptor and TLR9. *J. Immunol.* (**2007**) 179: 7397-7405.

Capolunghi F, Cascioli S, Giorda E et al. CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. *J. Immunol.* (**2008**) 180: 800-808.

Cappione A3, Anolik JH, Pugh-Bernard A et al. Germinal center exclusion of autoreactive B cells is defective in human systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* (**2005**) 115: 3205-3216.

Cariappa A, Tang M, Parng C et al. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity* (**2001**) 14: 603-615.

Casrouge A, Zhang S, Eidenschenk C et al. Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science* (**2006**) 314: 308-312.

Chalifour A, Jeannin P, Gauchat J et al. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood* (**2004**) 104: 1778-1783.

Chan O & Shlomchik MJ. A new role for B cells in systemic autoimmunity: B cells promote spontaneous T cell activation in MRL-lpr/lpr mice. *J. Immunol.* (**1998**) 160: 51-59.

Chan OT, Hannum LG, Haberman AM et al. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J. Exp. Med.* (**1999**) 189: 1639-1648.

Chaturvedi A, Dorward D & Pierce SK. The B cell receptor governs the subcellular location of Toll-like receptor 9 leading to hyperresponses to DNA-containing antigens. *Immunity* (**2008**) 28: 799-809.

Christensen SR & Shlomchik MJ. Regulation of lupus-related autoantibody production and clinical disease by Toll-like receptors. *Semin. Immunol.* (**2007**) 19: 11-23.

Christensen SR, Shupe J, Nickerson K et al. Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity* (**2006**) 25: 417-428.

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

Chuang C, Monie A, Wu A et al. Treatment with LL-37 peptide enhances antitumor effects induced by CpG oligodeoxynucleotides against ovarian cancer. *Hum. Gene Ther.* (**2009**) 20: 303-313.

Coban C, Ishii KJ, Kawai T et al. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J. Exp. Med.* (**2005**) 201: 19-25.

Colonna M. TLR pathways and IFN-regulatory factors: to each its own. *Eur. J. Immunol.* (**2007**) 37: 306-309.

Cuss AK, Avery DT, Cannons JL et al. Expansion of functionally immature transitional B cells is associated with human-immunodeficient states characterized by impaired humoral immunity. *J Immunol.* (**2006**) 176: 1506-1516.

Darce JR, Arendt BK, Chang SK et al. Divergent effects of BAFF on human memory B cell differentiation into Ig-secreting cells. *J. Immunol.* (**2007**) 178: 5612-5622.

Daridon C, Pers J, Devauchelle V et al. Identification of transitional type II B cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* (**2006**) 54: 2280-2288.

Dasari P, Nicholson IC, Hodge G et al. Expression of toll-like receptors on B lymphocytes. *Cell. Immunol.* (**2005**) 236: 140-145.

Deane JA, Pisitkun P, Barrett RS et al. Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation. *Immunity* (**2007**) 27: 801-810.

Delneste Y, Beauvillain C & Jeannin P. [Innate immunity: structure and function of TLRs]. *Med Sci (Paris)* (**2007**) 23: 67-73.

Derossi D, Chassaing G & Prochiantz A. Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol.* (**1998**) 8: 84-87.

Deshmukh US, Nandula SR, Thimmalapura P et al. Activation of innate immune responses through Toll-like receptor 3 causes a rapid loss of salivary gland function. *J. Oral Pathol. Med.* (**2009**) 38: 42-47.

Didierlaurent A, Ferrero I, Otten LA et al. Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. *J. Immunol.* (**2004**) 172: 6922-6930.

Divanovic S, Trompette A, Atabani SF et al. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105. *Nat. Immunol.* (**2005**) 6: 571-578.

Douagi I, Gujer C, Sundling C et al. Human B cell responses to TLR ligands are differentially modulated by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* (**2009**) 182: 1991-2001.

Du Roure C. [Transcription factors, gatekeepers of cell identity]. *Med Sci (Paris)* (**2008**) 24: 700-702.

Dunne A, Marshall NA & Mills KHG. TLR based therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* (**2011**) 11: 404-411.

Eaton-Bassiri A, Dillon SB, Cunningham M et al. Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infect. Immun.* (**2004**) 72: 7202-7211.

Edwards JCW, Szczepanski L, Szechinski J et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* (**2004**) 350: 2572-2581.

Ehlers M, Fukuyama H, McGaha TL et al. TLR9/MyD88 signaling is required for class switching to pathogenic IgG2a and 2b autoantibodies in SLE. *J. Exp. Med.* (**2006**) 203: 553-561.

Emamian ES, Leon JM, Lessard CJ et al. Peripheral blood gene expression profiling in Sjögren's syndrome. *Genes Immun.* (**2009**) 10: 285-296.

Ewald SE, Lee BL, Lau L et al. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* (**2008**) 456: 658-662.

Fillatreau S, Gray D & Anderton SM. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nat. Rev. Immunol.* (**2008**) 8: 391-397.

Fleck M, Kern ER, Zhou T et al. Murine cytomegalovirus induces a Sjögren's syndrome-like disease in C57Bl/6-lpr/lpr mice. *Arthritis Rheum.* (**1998**) 41: 2175-2184.

Fletcher CA, Sutherland APR, Groom JR et al. Development of nephritis but not sialadenitis in autoimmune-prone BAFF transgenic mice lacking marginal zone B cells. *Eur. J. Immunol.* (**2006**) 36: 2504-2514.

Fox RI & Kang HI. Pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* (**1992**) 18: 517-538.

Fugier-Vivier I, de Bouteiller O, Guret C et al. Molecular cloning of human RP105. *Eur. J. Immunol.* (**1997**) 27: 1824-1827.

Fukui R, Saitoh S, Kanno A et al. Unc93B1 restricts systemic lethal inflammation by orchestrating Toll-like receptor 7 and 9 trafficking. *Immunity* (**2011**) 35: 69-81.

Fukui R, Saitoh S, Matsumoto F et al. Unc93B1 biases Toll-like receptor responses to nucleic acid in dendritic cells toward DNA- but against RNA-sensing. *J. Exp. Med.* (**2009**) 206: 1339-1350.

Ganguly D, Chamilos G, Lande R et al. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J. Exp. Med.* (**2009**) 206: 1983-1994.

Gantner F, Hermann P, Nakashima K et al. CD40-dependent and -independent activation of human tonsil B cells by CpG oligodeoxynucleotides. *Eur. J. Immunol.* (**2003**) 33: 1576-1585.

Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* (**2011**) 3: 73ra20.

Gavin AL, Hoebe K, Duong B et al. Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science* (**2006**) 314: 1936-1938.

Genestier L, Taillardet M, Mondiere P et al. TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J. Immunol.* (**2007**) 178: 7779-7786.

Gilliet M & Lande R. Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* (**2008**) 20: 401-407.

Gottenberg J, Cagnard N, Lucchesi C et al. Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (**2006**) 103: 2770-2775.

Grammer AC & Lipsky PE. CD154-CD40 interactions mediate differentiation to plasma cells in healthy individuals and persons with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* (**2002**) 46: 1417-1429.

Groom J, Kalled SL, Cutler AH et al. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. *J. Clin. Invest.* (**2002**) 109: 59-68.

Groom JR, Fletcher CA, Walters SN et al. BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *J. Exp. Med.* (**2007**) 204: 1959-1971.

Guiducci C, Gong M, Xu Z et al. TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus. *Nature* (**2010**) 465: 937-941.

Guiducci C, Ott G, Chan JH et al. Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *J. Exp. Med.* (**2006**) 203: 1999-2008.

Gursel M, Gursel I, Mostowski HS et al. CXCL16 influences the nature and specificity of CpG-induced immune activation. *J. Immunol.* (**2006**) 177: 1575-1580.

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

Harris DP, Haynes L, Sayles PC et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat. Immunol.* (**2000**) 1: 475-482.

Hasan U, Chaffois C, Gaillard C et al. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J. Immunol.* (**2005**) 174: 2942-2950.

Hashimoto C, Hudson KL & Anderson KV. The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* (**1988**) 52: 269-279.

Hauser SL, Waubant E, Arnold DL et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* (**2008**) 358: 676-688.

He B, Qiao X & Cerutti A. CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10. *J. Immunol.* (**2004**) 173: 4479-4491.

He B, Santamaria R, Xu W et al. The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nat. Immunol.* (**2010**) 11: 836-845.

He B, Xu W, Santini PA et al. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* (**2007**) 26: 812-826.

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* (**2000**) 408: 740-745.

Hennessy EJ, Parker AE & O'Neill LAJ. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics?. *Nat Rev Drug Discov* (**2010**) 9: 293-307.

Herrera-Esparza R, Bollain-y-Goytia J, Ruvalcaba C et al. Apoptosis and cell proliferation: the paradox of salivary glands in Sjögren's disease. *Acta Reumatol Port* (**2008**) 33: 299-303.

Herzenberg LA & Tung JW. B cell lineages: documented at last!. *Nat. Immunol.* (**2006**) 7: 225-226.

Hjelmervik TOR, Petersen K, Jonassen I et al. Gene expression profiling of minor salivary glands clearly distinguishes primary Sjögren's syndrome patients from healthy control subjects. *Arthritis Rheum.* (**2005**) 52: 1534-1544.

Honda K, Ohba Y, Yanai H et al. Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* (**2005**) 434: 1035-1040.

Hurtado P & Peh CA. LL-37 promotes rapid sensing of CpG oligodeoxynucleotides by B lymphocytes and plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* (**2010**) 184: 1425-1435.

Isnardi I, Ng Y, Srdanovic I et al. IRAK-4- and MyD88-dependent pathways are essential for the removal of developing autoreactive B cells in humans. *Immunity* (**2008**) 29: 746-757.

Ito T, Ishikawa S, Sato T et al. Defective B1 cell homing to the peritoneal cavity and preferential recruitment of B1 cells in the target organs in a murine model for systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* (**2004**) 172: 3628-3634.

Ittah M, Miceli-Richard C, Gottenberg J et al. Viruses induce high expression of BAFF by salivary gland epithelial cells through TLR- and type-I IFN-dependent and -independent pathways. *Eur. J. Immunol.* (**2008**) 38: 1058-1064.

Jacquot S & Boyer O. [Heterogeneity and function of human B lymphocytes]. *Med Sci (Paris)* (**2006**) 22: 1075-1080.

Jahrsdörfer B, Wooldridge JE, Blackwell SE et al. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides induce apoptosis of B cell chronic lymphocytic leukemia cells. *J. Leukoc. Biol.* (**2005**) 77: 378-387.

Jegerlehner A, Maurer P, Bessa J et al. TLR9 signaling in B cells determines class switch recombination to IgG2a. *J. Immunol.* (**2007**) 178: 2415-2420.

Jiang D, Liang J, Fan J et al. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat. Med.* (**2005**) 11: 1173-1179.

Jonsson MV & Skarstein K. Follicular dendritic cells confirm lymphoid organization in the minor salivary glands of primary Sjögren's syndrome. *J. Oral Pathol. Med.* (**2008**) 37: 515-521.

Kabelitz D. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* (**2007**) 19: 39-45.

Kagan JC, Su T, Horng T et al. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat. Immunol.* (**2008**) 9: 361-368.

Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM et al. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat. Med.* (**2007**) 13: 552-559.

Kasaian MT, Ikematsu H & Casali P. Identification and analysis of a novel human surface CD5- B lymphocyte subset producing natural antibodies. *J. Immunol.* (**1992**) 148: 2690-2702.

Kassan SS, Thomas TL, Moutsopoulos HM et al. Increased risk of lymphoma in sicca syndrome. *Ann. Intern. Med.* (**1978**) 89: 888-892.

Katsenelson N, Kanswal S, Puig M et al. Synthetic CpG oligodeoxynucleotides augment BAFF- and APRIL-mediated immunoglobulin secretion. *Eur. J. Immunol.* (**2007**) 37: 1785-1795.

Kawai T & Akira S. TLR signaling. *Semin. Immunol.* (**2007**) 19: 24-32.

Kawakami A, Nakashima K, Tamai M et al. Toll-like receptor in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome: functional analysis by human salivary gland cell line. *J. Rheumatol.* (**2007**) 34: 1019-1026.

Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* (**2006**) 5: 471-484.

Krieg AM, Yi AK, Matson S et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* (**1995**) 374: 546-549.

Kuznik A, Bencina M, Svajger U et al. Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. *J. Immunol.* (**2011**) 186: 4794-4804.

Lai Y, Adhikarakunnathu S, Bhardwaj K et al. LL37 and cationic peptides enhance TLR3 signaling by viral double-stranded RNAs. *PLoS One* (**2011**) 6: e26632.

Lambrecht BN, Kool M, Willart MAM et al. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr. Opin. Immunol.* (**2009**) 21: 23-29.

Lande R, Ganguly D, Facchinetti V et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* (**2011**) 3: 73ra19.

Lande R, Gregorio J, Facchinetti V et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* (**2007**) 449: 564-569.

Lanzavecchia A & Sallusto F. Toll-like receptors and innate immunity in B-cell activation and antibody responses. *Curr. Opin. Immunol.* (**2007**) 19: 268-274.

Lartigue A, Courville P, Auquit I et al. Role of TLR9 in anti-nucleosome and anti-DNA antibody production in lpr mutation-induced murine lupus. *J. Immunol.* (**2006**) 177: 1349-1354.

Latz E, Verma A, Visintin A et al. Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat. Immunol.* (**2007**) 8: 772-779.

Lau CM, Broughton C, Tabor AS et al. RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J. Exp. Med.* (**2005**) 202: 1171-1177.

Le Pottier L, Devauchelle V, Fautrel A et al. Ectopic germinal centers are rare in Sjogren's syndrome salivary glands and do not exclude autoreactive B cells. *J. Immunol.* (**2009**) 182: 3540-3547.

Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM et al. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* (**2002**) 416: 603-607.

Lee J, Mo J, Katakura K et al. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* (**2006**) 8: 1327-1336.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* (**1996**) 86: 973-983.

Lenert PS. Classification, mechanisms of action, and therapeutic applications of inhibitory oligonucleotides for Toll-like receptors (TLR) 7 and 9. *Mediators Inflamm.* (**2010**) 2010: 986596.

Li J, Jeong MY, Bae JH et al. Toll-like Receptor3-mediated Induction of Chemokines in Salivary Epithelial Cells. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* (**2010**) 14: 235-240.

Lindroth K & Fernández C. The role of Blimp-1 in the GC reaction: differential expression of Blimp-1 upon immunization with TD and TI antigens. *Immunol. Lett.* (**2007**) 113: 70-75.

Lit LC, Wong C, Li EK et al. Elevated gene expression of Th1/Th2 associated transcription factors is correlated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* (**2007**) 34: 89-96.

Liu N, Ohnishi N, Ni L et al. CpG directly induces T-bet expression and inhibits IgG1 and IgE switching in B cells. *Nat. Immunol.* (**2003**) 4: 687-693.

Lopes-Carvalho T & Kearney JF. Development and selection of marginal zone B cells. *Immunol. Rev.* (**2004**) 197: 192-205.

Mackay F, Groom JR & Tangye SG. An important role for B-cell activation factor and B cells in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol* (**2007**) 19: 406-413.

Makowska A, Faizunnessa NN, Anderson P et al. CD1high B cells: a population of mixed origin. *Eur. J. Immunol.* (**1999**) 29: 3285-3294.

Manoussakis MN & Kapsogeorgou EK. The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *J. Autoimmun.* (**2010**) 35: 219-224.

Manoussakis MN, Spachidou MP & Maratheftis CI. Salivary epithelial cells from Sjogren's syndrome patients are highly sensitive to anoikis induced by TLR-3 ligation. *J. Autoimmun.* (**2010**) 35: 212-218.

Mariette X. Current and potential treatments for primary Sjögren's syndrome. *Joint Bone Spine* (**2002**) 69: 363-366.

Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* (**2006**) 6: 823-835.

Masago R, Aiba-Masago S, Talal N et al. Elevated proapoptotic Bax and caspase 3 activation in the NOD.scid model of Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* (**2001**) 44: 693-702.

Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* (**2002**) 296: 301-305.

Means TK, Latz E, Hayashi F et al. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J. Clin. Invest.* (**2005**) 115: 407-417.

Medzhitov R & Janeway CAJ. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* (**1997**) 9: 4-9.

Meyer-Bahlburg A, Khim S & Rawlings DJ. B cell intrinsic TLR signals amplify but are not required for humoral immunity. *J. Exp. Med.* (**2007**) 204: 3095-3101.

Mittrücker HW, Matsuyama T, Grossman A et al. Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* (**1997**) 275: 540-543.

Mohan C, Morel L, Yang P et al. Accumulation of splenic B1a cells with potent antigen-presenting capability in NZM2410 lupus-prone mice. *Arthritis Rheum.* (**1998**) 41: 1652-1662.

Mouchess ML, Arpaia N, Souza G et al. Transmembrane mutations in Toll-like receptor 9 bypass the requirement for ectodomain proteolysis and induce fatal inflammation. *Immunity* (**2011**) 35: 721-732.

Murakami M, Yoshioka H, Shirai T et al. Prevention of autoimmune symptoms in autoimmune-prone mice by elimination of B-1 cells. *Int. Immunol.* (**1995**) 7: 877-882.

Nandula S, Scindia YM, Dey P et al. Activation of innate immunity accelerates sialoadenitis in a mouse model for Sjögren's syndrome-like disease. *Oral Dis* (**2011**) 17: 801-807.

Ng LG, Ng C, Woehl B et al. BAFF costimulation of Toll-like receptor-activated B-1 cells. *Eur. J. Immunol.* (**2006**) 36: 1837-1846.

Ngo VN, Young RM, Schmitz R et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* (**2011**) 470: 115-119.

Nickerson KM, Christensen SR, Shupe J et al. TLR9 regulates TLR7- and MyD88-dependent autoantibody production and disease in a murine model of lupus. *J. Immunol.* (**2010**) 184: 1840-1848.

Nijnik A, Ferry H, Lewis G et al. Spontaneous B cell hyperactivity in autoimmune-prone MRL mice. *Int. Immunol.* (**2006**) 18: 1127-1137.

O'Neill SK, Veselits ML, Zhang M et al. Endocytic sequestration of the B cell antigen receptor and toll-like receptor 9 in anergic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (**2009**) 106: 6262-6267.

Papadimitraki ED, Choulaki C, Koutala E et al. Expansion of toll-like receptor 9-expressing B cells in active systemic lupus erythematosus: implications for the induction and maintenance of the autoimmune process. *Arthritis Rheum.* (**2006**) 54: 3601-3611.

Park B, Brinkmann MM, Spooner E et al. Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat. Immunol.* (**2008**) 9: 1407-1414.

Parroche P, Lauw FN, Goutagny N et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (**2007**) 104: 1919-1924.

Pasare C & Medzhitov R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* (**2005**) 438: 364-368.

Pawar RD, Patole PS, Ellwart A et al. Ligands to nucleic acid-specific toll-like receptors and the onset of lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* (**2006**) 17: 3365-3373.

Pawar RD, Patole PS, Ellwart A et al. Ligands to nucleic acid-specific toll-like receptors and the onset of lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* (**2006**) 17: 3365-3373.

Peng SL. Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* (**2005**) 17: 230-236.

Peng SL. The T-box transcription factor T-bet in immunity and autoimmunity. *Cell. Mol. Immunol.* (**2006**) 3: 87-95.

Peng SL, Li J, Lin L et al. The role of T-bet in B cells. *Nat. Immunol.* (**2003**) 4: 1041; author reply 1041.

Peng SL, Szabo SJ & Glimcher LH. T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (**2002**) 99: 5545-5550.

Pers J, Devauchelle V, Daridon C et al. BAFF-modulated repopulation of B lymphocytes in the blood and salivary glands of rituximab-treated patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* (**2007**) 56: 1464-1477.

Picard C, Puel A, Bonnet M et al. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* (**2003**) 299: 2076-2079.

Poltorak A, He X, Smirnova I et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* (**1998**) 282: 2085-2088.

Puga I, Cols M, Barra CM et al. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat. Immunol.* (**2012**) 13: 170-180.

Pugh-Bernard AE, Silverman GJ, Cappione AJ et al. Regulation of inherently autoreactive VH4-34 B cells in the maintenance of human B cell tolerance. *J. Clin. Invest.* (**2001**) 108: 1061-1070.

Rahman A & Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* (**2008**) 358: 929-939.

Redecke V, Häcker H, Datta SK et al. Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J. Immunol.* (**2004**) 172: 2739-2743.

Reynaud C, Descatoire M, Dogan I et al. IgM memory B cells: a mouse/human paradox. *Cell. Mol. Life Sci.* (**2012**) 69: 1625-1634.

Ruprecht CR & Lanzavecchia A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur. J. Immunol.* (**2006**) 36: 810-816.

Rutz M, Metzger J, Gellert T et al. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur. J. Immunol.* (**2004**) 34: 2541-2550.

Saito T, Chiba S, Ichikawa M et al. Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* (**2003**) 18: 675-685.

Salomonsson S & Wahren-Herlenius M. Local production of Ro/SSA and La/SSB autoantibodies in the target organ coincides with high levels of circulating antibodies in sera of patients with Sjögren's syndrome. *Scand. J. Rheumatol.* (**2003**) 32: 79-82.

Salomonsson S, Jonsson MV, Skarstein K et al. Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* (**2003**) 48: 3187-3201.

Sandgren S, Wittrup A, Cheng F et al. The human antimicrobial peptide LL-37 transfers extracellular DNA plasmid to the nuclear compartment of mammalian cells via lipid rafts and proteoglycan-dependent endocytosis. *J. Biol. Chem.* (**2004**) 279: 17951-17956.

Saraux A. The point on the ongoing B-cell depleting trials currently in progress over the world in primary Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev* (**2010**) 9: 609-614.

Schmausser B, Andrulis M, Endrich S et al. Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in Helicobacter pylori infection. *Clin. Exp. Immunol.* (**2004**) 136: 521-526.

Sen G, Khan AQ, Chen Q et al. In vivo humoral immune responses to isolated pneumococcal polysaccharides are dependent on the presence of associated TLR ligands. *J. Immunol.* (**2005**) 175: 3084-3091.

Shirota H, Sano K, Hirasawa N et al. B cells capturing antigen conjugated with CpG oligodeoxynucleotides induce Th1 cells by elaborating IL-12. *J. Immunol.* (**2002**) 169: 787-794.

Sivori S, Falco M, Della Chiesa M et al. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (**2004**) 101: 10116-10121.

Spachidou MP, Bourazopoulou E, Maratheftis CI et al. 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.* (**2007**) 147: 497-503.

Sumida T, Tsuboi H, Iizuka M et al. Functional role of M3 muscarinic acetylcholine receptor (M3R) reactive T cells and anti-M3R autoantibodies in patients with Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev* (**2010**) 9: 615-617.

Suryani S, Fulcher DA, Santner-Nanan B et al. Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells. *Blood* (**2010**) 115: 519-529.

Sørensen OE, Follin P, Johnsen AH et al. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* (**2001**) 97: 3951-3959.

Tanigaki K, Han H, Yamamoto N et al. Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells. *Nat. Immunol.* (**2002**) 3: 443-450.

Thien M, Phan TG, Gardam S et al. Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity* (**2004**) 20: 785-798.

Tian J, Avalos AM, Mao S et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat. Immunol.* (**2007**) 8: 487-496.

Treml LS, Carlesso G, Hoek KL et al. TLR stimulation modifies BLyS receptor expression in follicular and marginal zone B cells. *J. Immunol.* (**2007**) 178: 7531-7539.

Ueda Y, Liao D, Yang K et al. T-independent activation-induced cytidine deaminase expression, class-switch recombination, and antibody production by immature/transitional 1 B cells. *J. Immunol.* (**2007**) 178: 3593-3601.

Viglianti GA, Lau CM, Hanley TM et al. Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity* (**2003**) 19: 837-847.

[Vitali2002] Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. . 2002.

Voulgarelis M, Dafni UG, Isenberg DA et al. Malignant lymphoma in primary Sjögren's syndrome: a multicenter, retrospective, clinical study by the European Concerted Action on Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum.* (**1999**) 42: 1765-1772.

Wagner M, Poeck H, Jahrsdoerfer B et al. IL-12p70-dependent Th1 induction by human B cells requires combined activation with CD40 ligand and CpG DNA. *J. Immunol.* (**2004**) 172: 954-963.

Wang J, Shao Y, Bennett TA et al. The functional effects of physical interactions among Toll-like receptors 7, 8, and 9. *J. Biol. Chem.* (**2006**) 281: 37427-37434.

Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A et al. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* (**2003**) 301: 1374-1377.

Weller S, Braun MC, Tan BK et al. Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* (**2004**) 104: 3647-3654.

Woo J, Jeong JY, Hwang YJ et al. Expression of cathelicidin in human salivary glands. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* (**2003**) 129: 211-214.

Wortis HH & Berland R. Cutting edge commentary: origins of B-1 cells. *J. Immunol.* (**2001**) 166: 2163-2166.

Wu X, Gowda NM, Kumar S et al. Protein-DNA complex is the exclusive malaria parasite component that activates dendritic cells and triggers innate immune responses. *J. Immunol.* (**2010**) 184: 4338-4348.

Xanthou G, Polihronis M, Tzioufas AG et al. "Lymphoid" chemokine messenger RNA expression by epithelial cells in the chronic inflammatory lesion of the salivary glands of Sjögren's syndrome patients: possible participation in lymphoid structure formation. *Arthritis Rheum.* (**2001**) 44: 408-418.

Xu W, He B, Chiu A et al. Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nat. Immunol.* (**2007**) 8: 294-303.

Yan J, Harvey BP, Gee RJ et al. B cells drive early T cell autoimmunity in vivo prior to dendritic cell-mediated autoantigen presentation. *J. Immunol.* (**2006**) 177: 4481-4487.

Yin H, Zhao M, Wu X et al. Hypomethylation and overexpression of CD70 (TNFSF7) in CD4+ T cells of patients with primary Sjögren's syndrome. *J. Dermatol. Sci.* (**2010**) 59: 198-203.

Youinou P, Hillion S, Jamin C et al. B lymphocytes on the front line of autoimmunity. *Autoimmun Rev* (**2006**) 5: 215-221.

Zeng D, Lee MK, Tung J et al. Cutting edge: a role for CD1 in the pathogenesis of lupus in NZB/NZW mice. *J. Immunol.* (**2000**) 164: 5000-5004.

Zhang S, Jouanguy E, Ugolini S et al. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* (**2007**) 317: 1522-1527.

Zheng L, Yu C, Zhang Z et al. Expression of interferon regulatory factor 1, 3, and 7 in primary Sjögren syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* (**2009**) 107: 661-668.

Zheng L, Zhang Z, Yu C et al. Expression of Toll-like receptors 7, 8, and 9 in primary Sjögren's syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* (**2010**) 109: 844-850.

von Bernuth H, Picard C, Jin Z et al. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* (**2008**) 321: 691-696.

ANNEXES

Article n°1

Role of toll-like receptors in primary Sjögren's syndrome with a special emphasis on B-cell maturation within exocrine tissues

Journal of Autoimmunity, 2012

Journal of Autoimmunity xxx (2012) 1–8

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Autoimmunity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jautimm

Role of toll-like receptors in primary Sjögren's syndrome with a special emphasis on B-cell maturation within exocrine tissues

Thomas Guerrier [a], Laëtitia Le Pottier [a], Valérie Devauchelle [a,b], Jacques-Olivier Pers [a,b], Christophe Jamin [a,b,*], Pierre Youinou [a,b]

[a] EA2216 Immunology & Pathology and IFR 148 ScinBioS, Université Européenne de Bretagne, Université de Brest, Brest, France
[b] CHRU Morvan, Brest, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 26 January 2012
Accepted 28 January 2012

Keywords:
Sjögren's syndrome
B lymphocyte
Toll-like receptor

ABSTRACT

Be they follicular cells within the germinal centers (GCs) or marginal zone (MZ), all naïve mature B lymphocytes need tonic signaling to stay alive. We reasoned that the same holds true for those B lymphocytes that proliferate in the salivary glands (SGs) of patients with primary Sjögren's syndrome. Based on B cell infiltration, 11 SGs and three tonsil samples were selected for further examination. Tissue sections were stained using CD20 combined with CD10, CD21, CD27, CD38 or IgD. They were also laser-microdissected for quantitative RT-PCR of transcription factors, GC-specific activation-induced cytidine deaminase (*AID*) and TLR9. Some B cell aggregates proved to be real GCs according to their membrane markers, whereas others were clusters of transitional type II B cells. These contained mRNAs for *Notch-2* and *Blimp-1,* but not for *Pax-5, Bcl-6* and *AID*. Unanticipated was the finding of mRNAs for TLR9 in these clusters of MZ B-cells, but not in the real GCs. Not only do TLR9 deliver sufficiency of tonic signaling to keep B cells alive, but they also confer autoreactive B cells with an MZ-like phenotype. Thus, TLRs might be targets for forthcoming biotherapies.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Autoimmune epithelitis [1], designated Sjögren's syndrome (SS), is hallmarked by a disruption of acinar and ductal structures, the subsequent lymphocytic infiltration of lacrimal and salivary glands (SGs) and their ensuing dryness [2]. This presents alone as primary SS, or associated with other connective tissue diseases as secondary SS. Some controversy persists over which type of lymphocytes prevails [3], borne out by the view, for years, that T cells are competent in their own to initiate the syndrome [4]. Since then, B cells have attracted interest, since, beyond the production of antibodies (Abs) they accomplish various tasks [5–7].

An approach to assigning these functions to B-cell subsets is to analyze their ontogeny. Immature B cells exit the bone marrow, settle in secondary lymphoid organs and progress through sequencial stages. They are first $CD21^{\pm}CD23^{\pm}IgM^{++}$ $IgD^{\pm}$ [8] and delineated as transitional type 1 B lymphocytes (BT1). Upon B cell antigen (Ag) receptor (BCR) engagement, they undergo apoptosis, while, in the absence of Ag, they escape negative selection, evolve to BT2 cells, and turn $CD21^{+++}CD23^{\pm}IgM^{++}IgD^{++}$ [9]. The first step is spontaneous, but further progression requires B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) binding to the third receptor (BR3) on B lymphocytes [10]. Autoreactive BT2 cells are ineffective, relative to the remainder, in their ability to enter the follicles (FOs) where their maturation is assisted by BAFF. The possibility thus arises that autoreactive B cells, including those harboring the idiotype recognized by the 9G4 monoclonal Ab (mAb), circumvent this checkpoint. The fate of B cells is thus determined by the affinity of their BCRs to local Ags, prior to transcription factor (TF) commitment. A weak signal favors expression of Notch-2 receptors, increases the density of BR3, confines the cells to the marginal zone (MZ), suppresses Bcl-6 and activates IRF-4 [11]. In contrast, should the affinity be strong, BT2 cells migrate to the FO, where Bcl-6 is upregulated, Pax-5 brought into play, and germinal centers (GCs) initiated. As a result, the activation-induced cytidine deaminase (*AID*) gene is transcribed, and promotes somatic mutations and recombinations. Simultaneously, BR3 expression diminishes, functional inhibition of Pax-5 permits maturation of plasma cells (PCs), alongside silencing Bcl-6, and Blimp-1 supports their generation [12].

Given their propensity to be activated in the MZ, preventing autoreactive B cells from colonizing this site is essential. Thus,

* Corresponding author. Immunology & Pathology, Brest University Medical School Hospital, 5 Av Foch, BP824, F29609 Brest, France. Tel.: +33 298 22 33 84; fax: +33 298 22 38 47.
E-mail address: christophe.jamin@univ-brest.fr (C. Jamin).

0896-8411/$ – see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jaut.2012.01.016

Please cite this article in press as: Guerrier T, et al., Role of toll-like receptors in primary Sjögren's syndrome with a special emphasis on B-cell maturation within exocrine tissues, Journal of Autoimmunity (2012), doi:10.1016/j.jaut.2012.01.016

virus-induction of BAFF [13], or transfection of cDNA for BAFF into mice [14] result in SS with MZ B cells accumulated in SGs [15]. Another result sustaining this view is that BT2 and MZ B cells [16] aggregate in SGs [17]. Local excess production of BAFF by T [18] and B cells [19], coupled with TLR ligation [20], may be central to altered differentiation of B cells.

1.1. Role of TLRs in salivary glands

TLRs are activated following binding of pathogen-associated molecular pattern, called PAMP molecules, such as viral nucleic acid that can bind to TLR7 or bacterial unmethylated DNA that bind to TLR9. They can also be activated by damage-associated molecular pattern, called DAMP molecules, originated from apoptotic bodies or self nucleic acid-containing immune complex [21,22].

Few data are today available regarding the expression of TLRs in the SGs. It has been shown that infiltrated lymphocytes within SGs of Sjögren's patients express TLR7, TLR8 and TLR9 [23]. They also express the IRF1 transcription factor activated in the TLR signalling pathways [24]. mRNA for TLR7, TLR9 and IRF1 have been detected in the peripheral blood cells of the patients [25]. These observations imply that lymphoid cells could be activated by TLRs in situ, following release of DAMP molecules from apoptotic bodies of epithelial cells [26].

Epithelial cells themselves express high level of TLR2 and TLR4 mRNA [27] associated with increased level of the proteins MyD88, TLR2, TLR3, and TLR4 [28]. Epithelial cells can thus be activated by lipopeptides from gram-positive bacteria, dsRNA from viruses or LPS from gram-negative bacteria, respectively. Intracellular TLRs such as TLR7 and TLR9 are also detected in ductal epithelial cells [23]. During the development of the diseases, epithelial islands are induced to increase TLR7 and TLR9 expression, while TLR8, TLR9 and the IRF1 transcription factor are upregulated in SGs [29,30].

It is interesting to note that, in contrast to lymphoid cells, epithelial cells from SGs highly expressed TLR3 that can be detected on the cell surface [27] suggesting that they may be strickingly sensitive to stimulation by viruses PAMP. Thus, activation of epithelial SG cell lines after TLR3 stimulation with the ligand polyI:C induces secretion of chimiokines [31] allowing the recruitment of T lymphocytes [28] and the production of IL-6 and IFN-β that may contribute to the pathogenesis of SS [32]. Other TLRs such as TLR2 and TLR4 stimulated with peptidoglycans and LPS increase expression of the CD54 adhesion molecule, CD40 coactivation molecule and HLA-I on the surface of salivary epithelial cells thus facilitating antigen presentation to T lymphocytes [27]. Moreover, TLR3 stimulation can trigger epithelial cells into apoptosis. Those from SGs of SS patients appear highly sensitive to this phenomenon confirming the role of TLRs in the pathophsyiology of SS [33]. This hypothesis is reinforced by the observation made in the female NZB/NZW F1 mice. Systemic stimulation of TLR3 by injection of polyI:C in this mouse model for Sjögren-like syndrome, diminishes saliva secretion and accelerates sialoadenitis [34]. These clinical manifestations and loss of SG function are associated with increased expression of chimiokines, of type I IFN, and of pro-inflammatory cytokines within the SGs [35].

1.2. Effects of TLRs on B-cell maturation

As mentioned above, BAFF belongs to the TNF family. Described as a key element to rescue self-reactive B cells from peripheral deletion [15], BAFF contributes also to their maturation into MZ B cells [36]. Overexpression of BAFF in mice has been shown to cause B cell tolerance breakdown leading to autoimumne manifestations close to SS [37]. Furthermore, elevated levels of BAFF in plasma and in SGs of SS patients have been described indicating that BAFF may take part of the pathophysiology of SS due to its role on B cell activation [38]. However, recent reports now suggest that TLRs may play a role in the BAFF-dependent consequences on B-cell maturation. Thus, stimulations of TLR7 and TLR9 in mice up-regulates one of the BAFF receptor on B cell surface, called Transmembrane Activator and CAML Interactor (TACI) [39]. Consequently, cooperation between BAFF and TLR signalling pathways promote autoimmune manifestations [20]. In humans, MZ B cells seems to be specific target of TACI and TLR activation signals that trigger immunoglobulin class switching [40]. Reciprocally, activation of B lymphocytes following BAFF stimulation is associated with increased expression of mRNA for TLR3, TLR7 and TLR9 [20]. Epithelial cells appear as important B-cell partner that may induce immunoglobulin class switching through a TLR-inducible signalling program [41]. In fact, TLR3 stimulation on epithelial cells induces secretion of BAFF and production of IL-10. Together, these cytokines act synergistically with TLR3 ligands to trigger IgG and IgA class switching and immunoglobulin secretion. Locally, epithelial cells may thus participate to the final differentiation of infiltrated B cells. Because epithelial cells from SGs of SS patients have been shown to secrete high level of BAFF following TLR3 stimulation with polyI:C or with dsRNA virus [13], it can be hypothesized that BAFF and TLR signallings may be involved together in B-cell maturation process leading to the production of self-reactive antibodies during the course of SS.

Furthermore, B-cell maturation can also be influenced by BAFF and TLR9 cooperation. First, TLR9 stimulation preferentially increases expression of TACI on follicular and MZ B cells. Consequently, BAFF enhances cell survival [42]. Similarly, TLR4 stimulation up-regulates TACI but only on MZ B cells. Survival of these cells is thus preferentially achieve following TLR9- and TLR4-stimulated signals. TLR9 ligands such as CpG-ODN not only increased TACI expression on the surface of murine MZ B cells but also increased BAFF-mediated immunoglobulin secretion [39]. TLR9 is likely to play important role in terminal differentiation of B cells into antibody-secreting cells. This T-cell independent immunoglobulin response is also efficient in human B cells [43]. CpG-DNA can thus initiate class-switching and together with BAFF signals, induces immunoglobulin production. CpG-DNA released during infections may exacerbate autoimmune responses by stimulating autoreactive B cells to switch from IgM into pathogenic IgG isotype.

Yet, there are no clues to how TLR9 would contribute to SS. In this family of pattern recognition receptors [44], it is an endosomal sensor for unmethylated CpG. Interestingly, CpG-responding B cells are particularly common in the MZ B cell population [45]. Because CpG drives BT2 to the production of Abs [46], TLR9 is central to the pathogenesis of autoimmunity [47], and emerges as a candidate mechanism for promoting the maturation of BT2 into SGs. The primary focus of the present work was to explore this hypothesis.

2. Materials and methods

2.1. Patients and controls

SG biopsy specimens were collected from 40 female patients, ranging in age from 31 to 72 years, and fulfilling the American-European Consensus Group criteria for the diagnosis of SS [48]. Clinical details were available, and a particular note of the presence of extraglandular complications was made. None of them suffered from associated lymphoma, nor were they taking steroids or immunosuppressive drugs. Three children undergoing routine tonsillectomy, aged 5, 9, and 14 years, supplied the tonsils used as lymphoid organs for comparisons with the SG biopsies. All patients and donors' parents gave informed consent, and the study was approved by our Ethics Committee.

Please cite this article in press as: Guerrier T, et al., Role of toll-like receptors in primary Sjögren's syndrome with a special emphasis on B-cell maturation within exocrine tissues, Journal of Autoimmunity (2012), doi:10.1016/j.jaut.2012.01.016

2.2. Serological tests

The isotype-specific in-house ELISAs for IgM, IgG, and IgA rheumatoid factor (RF) have previously been described [49], as well as our assay for BAFF [50]. The antinuclear Abs were screened by an in-house immunofluorescence (IF) test, and anti-Ro/sicca syndrome (SS) A and anti-La/SSB identified by commercial ELISA kits (BioMedical Diagnostics).

2.3. IF staining of SGs and tonsils

Biopsy specimens were embedded in OCT (Miles Laboratories), snap-frozen in isopentane, and stored at −80 °C. Serial 10 μm-thick sections from patients' SGs and controls' tonsils were mounted onto poly-L-lysine-coated slides. To locate GC-like structures, the sections were stained with a HistoGene microdissection kit. This device enables distinguishing MZ B cells from GC-like B cells. Eleven of 40 SG specimens were selected for further analysis based on the presence of B-cell clusters, and the absence of clonal expansion by RT-PCR, as described elsewhere [17].

For analysis of mounted sections, mAbs were purchased from Beckman-Coulter, unless specified otherwise. The first layer of the two-color IF staining was rabbit anti-CD20 Ab (Interchim), plus fluorescence isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD10, anti-CD21, anti-CD23, or anti-CD27 (BD Biosciences) murine mAbs. After a 40-min incubation, the second layer Ab consisted of tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)-conjugated donkey anti-rabbit Ab (Jackson) in donkey serum-containing phosphate-buffered saline. The definition of GCs [51] relies on the presence of FO dendritic cells (FDCs) identified as such by the presence of CD21 and CD35.

FITC-conjugated rabbit anti-human IgD Ab (Dakopatts) was combined with anti-IgM or anti-CD38 mAb plus Alexa Fluor 594-conjugated donkey anti-mouse Ab (Jackson). In parallel, anti-CD20 and anti-CD3 mAbs were associated with rabbit anti-BAFF, and anti-CD20 and anti-IgD mAbs were combined with mouse anti-TLR9 (Imgenex). These were developed either with TRITC-conjugated donkey anti-mouse Ab plus FITC-conjugated donkey anti-rabbit Ab, or with FITC-conjugated donkey anti-mouse Ab plus TRITC-conjugated donkey anti-rabbit Ab (Jackson).

Autoreactive B cells inside GCs and throughout the MZ [11] were tracked with the 9G4 mAb (provided by Dr. Freda K, Stevenson, S Southampton, UK), and the proportion of other VH4 gene family-positive B cells evaluated with anti-idotype LC1 mAb (provided by Dr. Rizgar A Mageed, London, UK). 9G4 staining was associated with TLR9-positive cells using combination with anti-TLR9 mAb. The tissues were fixed with 4% *p*-formaldehyde, washed, and covered with coverslips (Vector). Images were obtained using an Ar/Kr laser and analyzed with a TCS-NT confocal imaging system (Leica). Control rat IgG plus TRITC-conjugated donkey anti-rat Ab and control mouse IgG plus FITC-conjugated donkey anti-mouse Ab did not induce background fluorescence. A threshold for each channel (red and green) was set using Image J 1.410 freeware (National Institutes of Health).

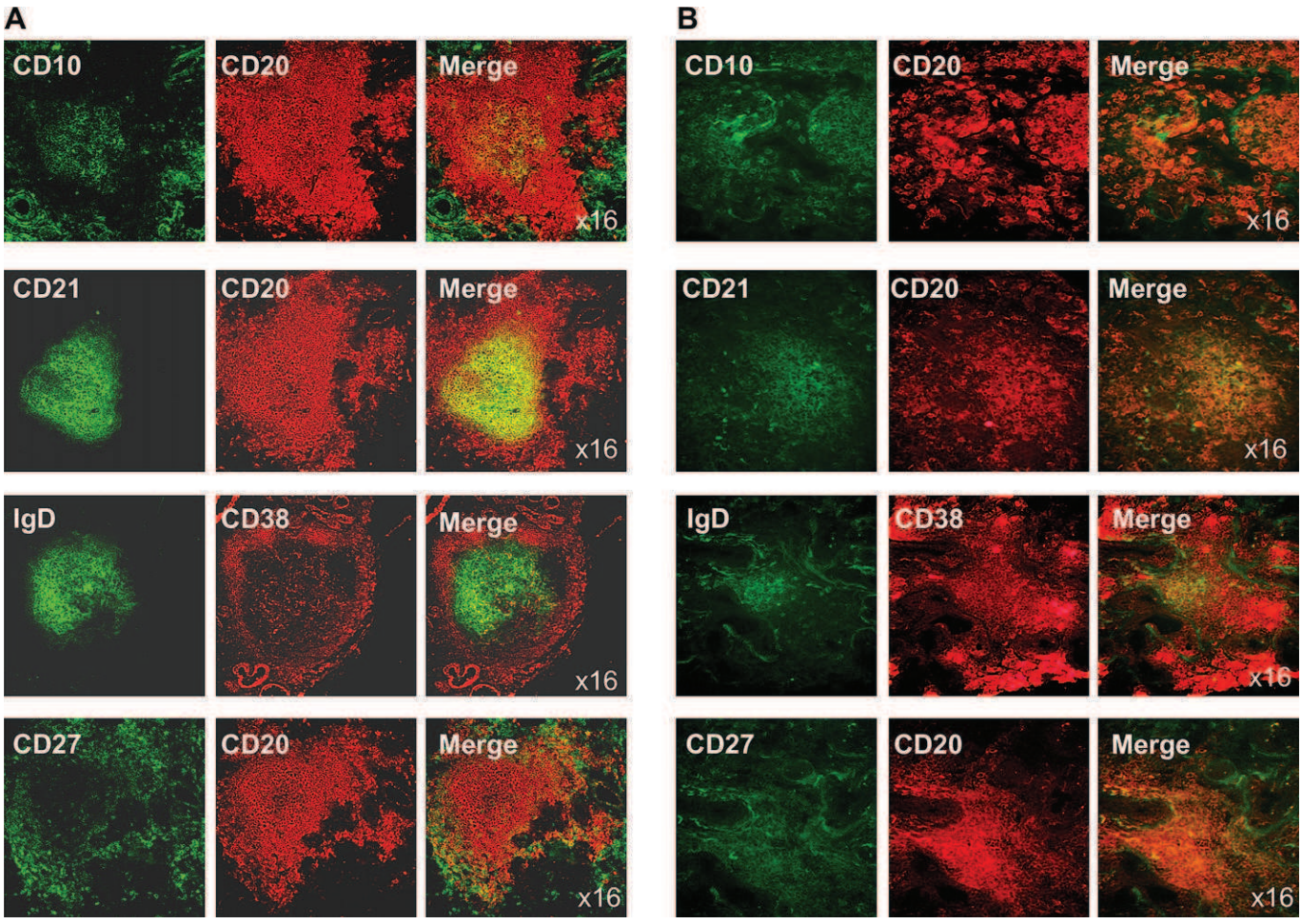

Fig. 1. Two-color immunofluorescence staining of B cells from: A- GC-like structures and B- aggregates of B cells in the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome.

Please cite this article in press as: Guerrier T, et al., Role of toll-like receptors in primary Sjögren's syndrome with a special emphasis on B-cell maturation within exocrine tissues, Journal of Autoimmunity (2012), doi:10.1016/j.jaut.2012.01.016

2.4. Quantitative RT-PCRs

All infiltrates of interest were microdissected using the Veritas system (Arcturus). Total mRNA was extracted with a PicoPure RNA isolation kit and amplified with a TransPlex whole transcriptome amplification kit (Sigma). Transcripts for AID, Pax-5, CD3, IRF-4, Bcl-6, Blimp-1, Notch-2, and TLR9 were quantified by RT-PCR using the TaqMan gene expression master mix (Applied Biosystems). The primer sets used have been previously [17] described in detail. Relative levels of gene expression were measured by quantitative RT-PCR with SYBR Green master mix reagent in an ABI PRISM 7000 sequence detection system according to the manufacturer's instructions. The number of threshold cycles (Ct) was counted using the ΔΔCt method, with GAPDH transcripts as an internal control.

3. Results

3.1. The phenotype of B cells correlates with the expression of AID

Phenotypes of the B cell infiltrates of SGs from four patients were similar to the conventional GC B cells in tonsils, in that these CD20-positive lymphocytes expressed CD10, CD21 and CD38, and resided in a cluster of IgD^+ B cells (see ref [17] and Fig. 1A). The B cell phenotype of the remaining seven samples was $CD10^-CD38^+CD21^+$. They represented characteristic BT2 cells (Fig. 1B). Of note, some cells were positive for CD27, suggesting that they might be memory B cells. We failed to correlate these patterns with the presence of IgA-RF, anti-SSA and/or anti-SSB Ab titers and serum levels of BAFF (data not shown). Neither could we show any relationship with the disease duration or any extraglandular complication.

In fact, functional GCs are sites of AID-dependent somatic hypermutation. To be confirmed as such, the microdissected GC-like structures (Fig. 2A) were subjected to quantitative RT-PCR to detect mRNA for AID. Interestingly, the four GC-resembling clusters contained AID mRNAs, and the seven GC-nonresembling clusters did not (Fig. 2B). In brief, two tonsillar samples, and four of 11 GC-like structure-containing SG specimens included AID^+ B cells. These latter were referred to as real GCs, whereas seven did not and were referred to as aggregates. As previously described by us [17] and others [16,51], $CD21^+CD35^+$ FDCs were also found in GCs, as well as in aggregates.

3.2. Profile of TFs in B cells from real GCs and aggregates

To substantiate this dichotomy, the cells from conventional GCs tonsils and from real GCs of SGs were compared to those of aggregates for the expression of transcripts for TFs including IRF-4, Bcl-6, Blimp-1, Pax-5 and Notch-2, with CD3 as a negative control (see ref [17] and Fig. 3). Pax-5 maintains B cell identify, Bcl-6 prevents untimely maturation, and IRF-4 enables differentiation of B cells into PCs. Naïve and memory B cells express low levels of

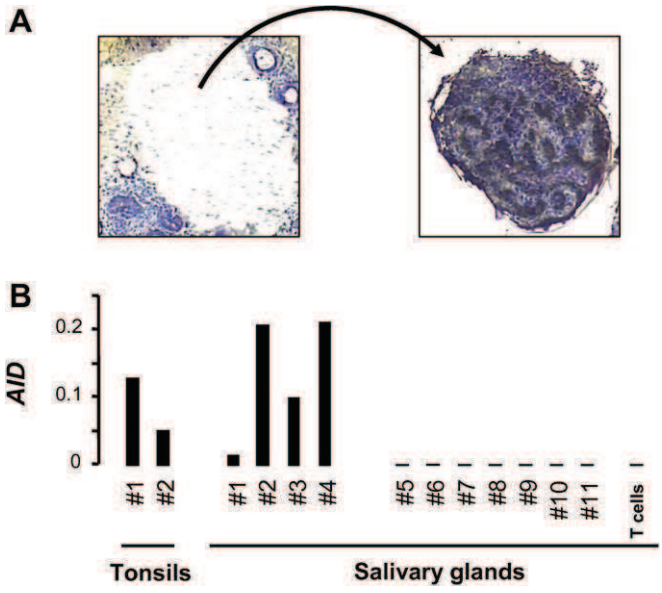

Fig. 2. Microdissection of a GC-like structure. A- The salivary gland section is shown with the microdissected GC. B- Levels of mRNAs for AID, as determined by quantitative RT-PCR in tonsils, real GCs and B cell aggregates.

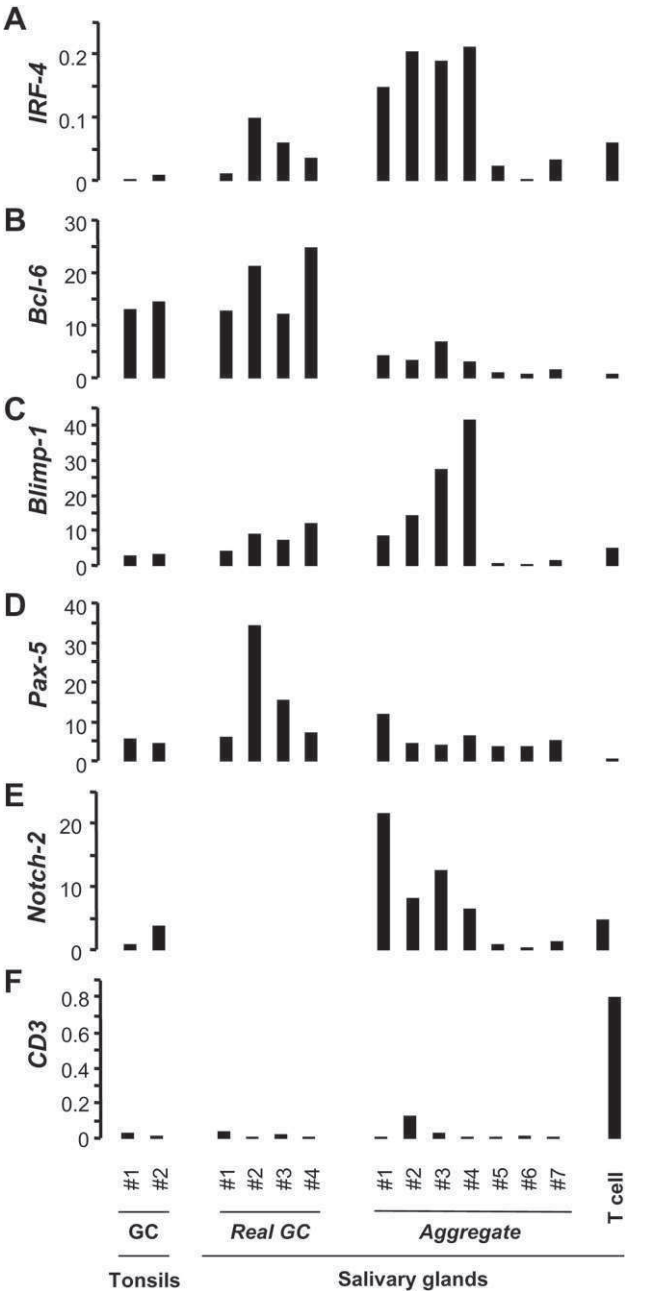

Fig. 3. Quantitative RT-PCR analysis of transcription factors in real GCs and B cell aggregates from salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome.

Please cite this article in press as: Guerrier T, et al., Role of toll-like receptors in primary Sjögren's syndrome with a special emphasis on B-cell maturation within exocrine tissues, Journal of Autoimmunity (2012), doi:10.1016/j.jaut.2012.01.016

Bcl-6, in contrast to FO B cells that up-regulate it throughout the GC passage. Bcl-6 and Pax-5 transcripts (Fig. 3B and D), and, to a lesser degree, IRF-4 (Fig. 3A) were mainly expressed in the four real GCs, supporting their classification.

In contrast, the seven aggregates contained more mRNAs for IRF-4 and Blimp-1 (Fig. 3A and C) than of Bcl-6 and Pax-5 (Fig. 3B and D). However, only some of our specimens showed high levels of mRNAs for Blimp-1 and IRF-4, suggesting that PCs were not prevented from emerging in the remaining. In the seven aggregates, the Notch-2 TF predominated in four infiltrates (Fig. 3E). This TF is involved in the final stages of MZ B cell maturation. Its weak expression implies that, because of the low Bcl-6 and Pax-5 expression, as opposed to the high Blimp-1 and IRF-4 expression, these B cells are ready to differentiate into MZ-like B cells and/or into PCs.

3.3. Most B lymphocytes resemble BT2 and MZ cells

The majority of SG-infiltrating B lymphocytes expressed CD21, CD23, IgD and IgM, thus being reminiscent of BT2 cells (Fig. 4A). A minority of them were found positive for CD35 (Fig. 4B) suggesting the presence of follicular dendritic-like cells, but, as described elsewhere [17,19], all harbored the BAFF protein (see ref [19] and Fig. 4B). Clusters of BT2 cells were also surrounded with BAFF-containing T lymphocytes (Fig. 4C).

3.4. Detection of TLR9 in the SGs

Based on the suggestion that TLR9 may be required for MZ B-cell development [52], and the finding that some 40% of transitional B lymphocytes are autoreactive [53], we speculated that their differentiation into MZ B cells might be encouraged by engagement of the TLRs. Such was the case, and quantitative RT-PCR of microdissected B-cell structures detected transcripts for TLR9 in the clusters of aggregated MZ B cells, but neither in the GCs, nor in the tonsil GCs (Fig. 5A). This dichotomy was confirmed by the predominant expression of TLR9 in the aggregates over the real GCs (Fig. 5B).

In tonsillar tissues, autoreactive VH4.34^{+} B cells recognized by the 9G4 mAb are precluded from entering the GCs and are confined in the follicular mantle [17]. In contrast, some autoreactive 9G4-recognized B cells can be detected within the GC-like structures of SGs (Fig. 5C), while others are found outside the GCs but did not co-localized with the weak TLR9-positive cells. These observations suggest that there is a defective tolerance checkpoint unable to restrict autoreactive B cells entering the GCs that might be independent on TLR9. In aggregated MZ B cells of SGs, VH4.34^{+} cells can be detected and some co-localized with TLR9. It is thus likely that TLR9 engagement might contribute to the maturation of these cells into autoantibody producing cells in the SGs. As previously shown [17], other non-autoreactive VH4^{+} B cells recognized by the LC1 mAb were observed in the GC-like structures as well as in the aggregates (data not shown).

4. Discussion

In patients with primary SS, immature B lymphocytes exit the blood through interactions of their CXCR5 [54] with CXCL13 [55], and their CD6 receptors with activated leukocyte cell adhesion molecules [56] in the exocrine tissues. There, they get organized as aggregates [17] or GCs [57], but need tonic signalling to stay alive in either cases. Do their BCR play a role in this process? Some B cells may indeed have been selected by earlier encounter with autoAgs in the circulation. However, innate and adaptive immune responses are linked by TLRs [58], and differential expression of TLR9 isoforms suggests alternative variants in anti-self B cells [59]. Thus, misguided responses can lead to autoimmune pathology [60].

Signaling in these cells is critical for further development. They proceed sequentially from BT1 to BT2, and to mature B cells [14].

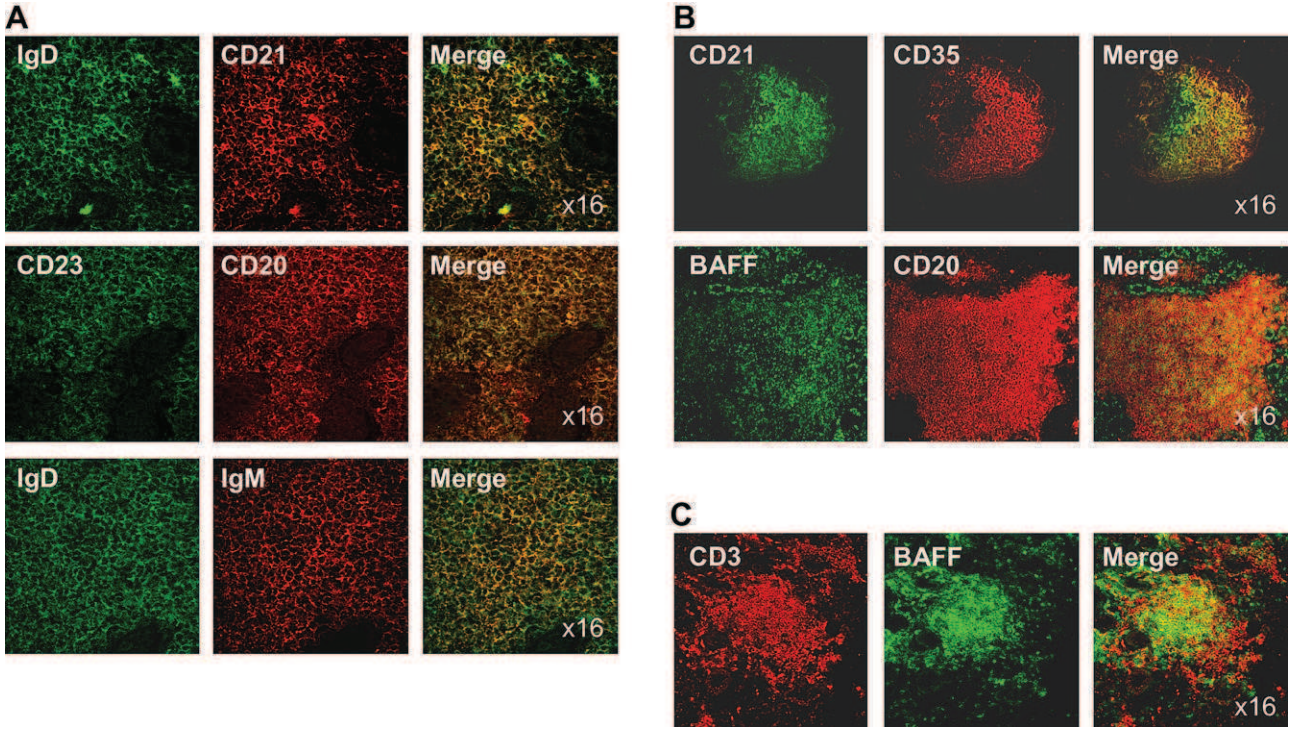

Fig. 4. Infiltrated B cells with the phenotype of transitional type 2 lymphocytes. A- These B cells express CD21, CD23 and IgM. B- A minority are positive for CD35, but all synthesize BAFF. C- Clusters of these B cells are surrounded with BAFF-producing T lymphocytes.

Please cite this article in press as: Guerrier T, et al., Role of toll-like receptors in primary Sjögren's syndrome with a special emphasis on B-cell maturation within exocrine tissues, Journal of Autoimmunity (2012), doi:10.1016/j.jaut.2012.01.016

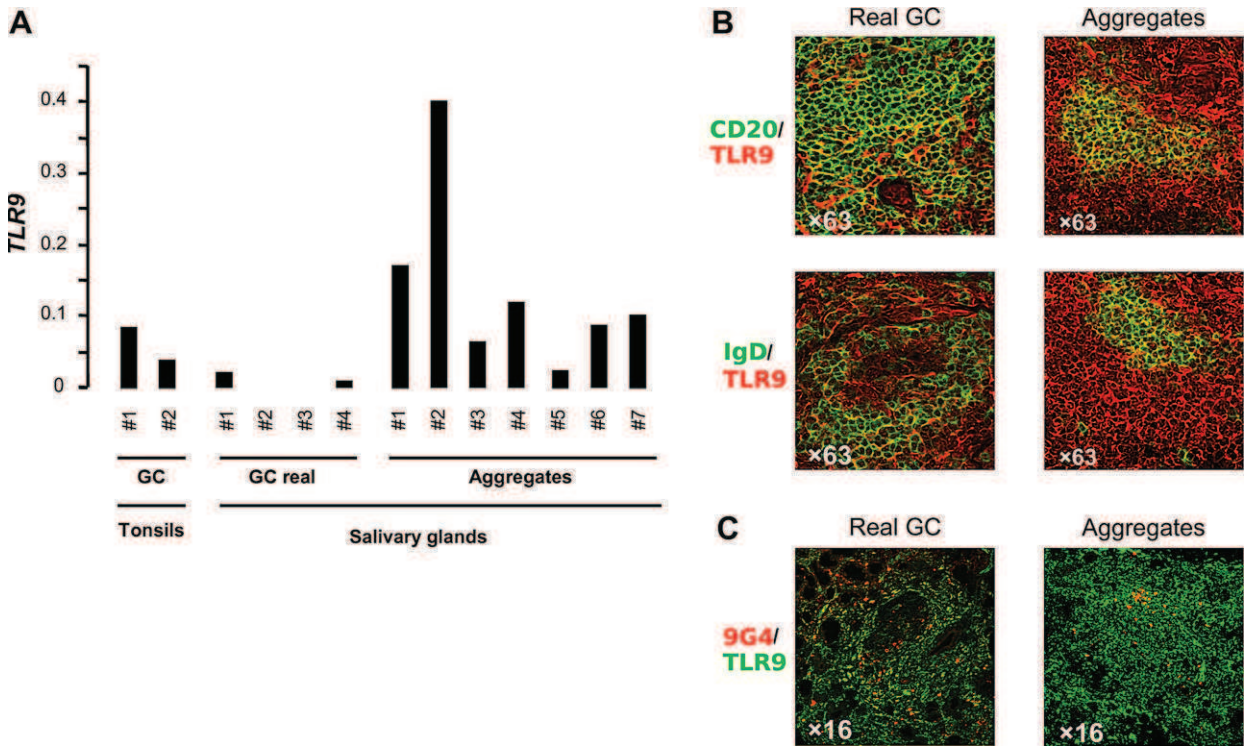

Fig. 5. Detection of TLR9 in the salivary glands. A- quantitative RT-PCR. B- CD20 and IgD staining of TLR9-positive B cells in real GCs and aggregates of B lymphocytes. C- The anti-idiotype 9G4 monoclonal antibody predominates in the aggregates over the GCs, along with TLR9.

Undeniably, FO and MZ B-cell subsets are strongly influenced by signals from autoAgs and the cytokine milieu. Particular specificities have been claimed to be chosen into the MZ [61], such as excess of SSA and SSB [62], and the impact of local BAFF shown to be influential [10,15,20]. Our data suggests that TLR ligands assist in the positive selection of self-reactive B cells, confirming that BAFF-transgenic mice require immune signals through TLRs for B cell activation [20].

In contrast to the mortal effect of BCR cross-linking, activation of TLR9 favors further differentiation of BT2. However, it remains to be elucidated as to how such engagement takes place. For this to occur, a caveat is that TLR9 needs to be accessible to CpG, unless B cells harbour receptors for CpG on their surface [63], or that TLR9 is translocated to the plasma membrane (Guerrier et al., *manuscript in preparation*). The autoimmune epithelitis proponents [1] have since provided evidence that the disease may be triggered by coxsackie virus [64] or retrovirus [65] infection of epithelial cells. As a consequence, anti-microbial agents may be released at damaged surfaces, where they prevent invasion of the host. Among these, is a peptide called LL-37 because it begins with two leucines and consists of 37 amino-acid residues [66]. It binds extra-cellular self-DNA fragments [67], and the resulting complexes get into the B cells *via* surface proteoglycans and their lipid rafts. With these observations in mind, our belief is that LL-37 might all the more contribute to the engagement of TLR9 into B cells, and thereby to their transformation into MZ B cells, that this peptide is overexpressed in the SGs of patients with primary SS (Guerrier et al., *manuscript in preparation*).

One may conclude that, not only do the TLRs deliver a tonic signal to keep B lymphocytes alive, but they also confer those autoreactive B cells with an MZ-like phenotype. This is an area worthy of pursuit in the future. Such might indeed become a target for treatment of primary SS. For example, intravenous immunoglobulin (IVIg) has shown promise in the treatment of autoimmune diseases [68–70]. As highlighted by Perl [71], the question arises as to whether blockade of TLR9 ameliorates the clinical features of these diseases? In this respect, we have ourselves reported the binding of sialic acid-expressing IgG from IVIg preparations to the lectin CD22 expressed on B cells [72], and one step further, established that TLR9 is implicated in this process [73].

Acknowledgments

Thomas Guerrier is supported by a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale. We are grateful to Dr. Freda K Stevenson (University of Southampton, UK) and Dr. Rizgar A Mageed (William Harvey Research Institute, London, UK) for kindly providing reagents. Thanks are also due to Geneviève Michel and Simone Forest for their help with the typing of the manuscript.

References

[1] Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome: autoimmune epithelitis. Clin Immunol Immunopathol 1994;72:162–5.
[2] Jonsson R, Bolstad AI, Brokstad KA, Brun JG. Sjögren's syndrome: a plethora of clinical and immunological phenotypes with a complex genetic background. Ann N Y Acad Sci 2007;1108:433–47.
[3] Voulgarelis M, Tzioufas AG. Pathogenetic mechanisms in the initiation and perpetuation of Sjögren's syndrome. Nat Rev Rheumatol 2010;6:529–37.
[4] Adamson 3rd TC, Fox RI, Frisman DM, Howell FV. Immunohistologic analysis of lymphoid infiltrates in primary Sjögren's syndrome using monoclonal antibodies. J Immunol 1983;130:203–8.
[5] Youinou P, Taher TE, Pers JO, Mageed RA, Renaudineau Y. B lymphocyte cytokines and rheumatic autoimmune disease. Arthritis Rheum 2009;60:1873–80.
[6] Youinou P, Devauchelle V, Pers JO. Significance of B cells and B cell clonality in Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2010;62:2605–10.
[7] Youinou P, Pers JO. Disturbance of cytokine networks in Sjögren's syndrome. Arthritis Res Ther 2011;13:227–37.
[8] Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. Blood 2005;105:4390–8.

[9] Carsetti R, Köhler G, Lamers MC. Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. J Exp Med 1995;181:2129–40.
[10] Youinou P, Pers JO. The late news on baff in autoimmune diseases. Autoimmun Rev 2010;9:804–6.
[11] Pugh-Bernard AE, Silverman GJ, Cappione AJ, Villano ME, Ryan DH, Insel RA, et al. Regulation of inherently autoreactive VH4-34 B cells in the maintenance of human B cell tolerance. J Clin Invest 2001;108:1061–70.
[12] Dent AL, Shaffer AL, Yu X, Allman D, Staudt LM. Control of inflammation, cytokine expression by Bcl-6. Science 1997;276:589–92.
[13] Ittah M, Miceli-Richard C, Lebon P, Pallier C, Lepajolec C, Mariette X. Induction of BAFF by viral infection is a general phenomenon, but the types of viruses and mechanisms depend on cell type. J Innate Immun 2011;3:200–7.
[14] Groom J, Kalled SL, Cutler AH, Olson C, Woodcock SA, Schneider P, et al. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. J Clin Invest 2002;109:59–68.
[15] Thien M, Phan TG, Gardam S, Amesbury M, Basten A, Mackay F, et al. Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and MZ niches. Immunity 2004;20:785–98.
[16] Daridon C, Pers JO, Devauchelle V, Martins-Carvalho C, Hutin P, Pennec YL, et al. Identification of transitional type II B cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2006;54:2280–8.
[17] Le Pottier L, Devauchelle V, Fautrel A, Daridon C, Saraux A, Youinou P, et al. Ectopic germinal centers are rare in Sjögren's salivary glands and do not exclude autoreactive B cells. J Immunol 2009;182:3540–7.
[18] Lavie F, Miceli-Richard C, Quillard J, Roux S, Leclerc P, Mariette X. Expression of BAFF (BLyS) in T cells infiltrating labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. J Pathol 2004;202:496–502.
[19] Daridon C, Devauchelle V, Hutin P, Le Berre R, Martins-Carvalho C, Bendaoud B, et al. Aberrant expression of BAFF by B lymphocytes infiltrating the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2007;56:1134–44.
[20] Groom JR, Fletcher CA, Walters SN, Grey ST, Watt SV, Sweet MJ, et al. BAFF and MyD88 signals promote a lupus-like disease independent of T cells. J Exp Med 2007;204:1959–71.
[21] Hurst J, von Landenberg P. Toll-like receptors and autoimmunity. Autoimmun Rev 2008;7:204–8.
[22] Papadimitraki ED, Bertsias GK, Boumpas DT. Toll like receptors and autoimmunity: a critical appraisal. J Autoimmun 2007;29:310–8.
[23] Zheng L, Zhang Z, Yu C, Yang C. Expression of Toll-like receptors 7, 8, and 9 in primary Sjögren's syndrome. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2010;109:844–50.
[24] Zheng L, Yu C, Zhang Z, Yang C, Cai X. Expression of interferon regulatory factor 1, 3, and 7 in primary Sjögren syndrome. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009;107:661–8.
[25] Colonna M. TLR pathways and IFN-regulatory factors: to each its own. Eur J Immunol 2007;37:306–9.
[26] Varin MM, Guerrier T, Devauchelle-Pensec V, Jamin C, Youinou P, Pers JO. In Sjögren's syndrome, B lymphocytes induce epithelial cells of salivary glands into apoptosis through protein kinase C delta activation. Autoimmun Rev; 2011 Oct 7 [Epub ahead of print].
[27] Spachidou MP, Bourazopoulou E, Maratheftis CI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG, et al. 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 2007;147:497–503.
[28] Kawakami A, Nakashima K, Tamai M, Nakamura H, Iwanaga N, Fujikawa K, et al. Toll-like receptor in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome: functional analysis by human salivary gland cell line. J Rheumatol 2007;34:1019–26.
[29] Hjelmervik TO, Petersen K, Jonassen I, Jonsson R, Bolstad AI. Gene expression profiling of minor salivary glands clearly distinguishes primary Sjögren's syndrome patients from healthy control subjects. Arthritis Rheum 2005;52:1534–44.
[30] Gottenberg JE, Cagnard N, Lucchesi C, Letourneur F, Mistou S, Lazure T, et al. Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:2770–5. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:5242.
[31] Li J, Jeong MY, Bae JH, Shin YH, Jin M, Hang SM, et al. Toll-like Receptor3-mediated induction of chemokines in salivary epithelial cells. Korean J Physiol Pharmacol 2010;14:235–40.
[32] Manoussakis MN, Kapsogeorgou EK. The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. J Autoimmun 2010;35:219–24.
[33] Manoussakis MN, Spachidou MP, Maratheftis CI. Salivary epithelial cells from Sjogren's syndrome patients are highly sensitive to anoikis induced by TLR-3 ligation. J Autoimmun 2010;35:212–8.
[34] Deshmukh US, Nandula SR, Thimmalapura PR, Scindia YM, Bagavant H. Activation of innate immune responses through Toll-like receptor 3 causes a rapid loss of salivary gland function. J Oral Pathol Med 2009;38:42–7.
[35] Nandula SR, Scindia YM, Dey P, Bagavant H, Deshmukh US. Activation of innate immunity accelerates sialoadenitis in a mouse model for Sjögren's syndrome-like disease. Oral Dis 2011;17:801–7.
[36] Batten M, Groom J, Cachero TG, Qian F, Schneider P, Tschopp J, et al. BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. J Exp Med 2000;192:1453–66.
[37] Chiorini JA, Cihakova D, Ouellette CE, Caturegli P. Sjögren syndrome: advances in the pathogenesis from animal models. J Autoimmun 2009;33:190–6.
[38] Varin MM, Le Pottier L, Youinou P, Saulep D, Mackay F, Pers JO. B-cell tolerance breakdown in Sjögren's syndrome: focus on BAFF. Autoimmun Rev 2010;9:604–8.
[39] Katsenelson N, Kanswal S, Puig M, Mostowski H, Verthelyi D, Akkoyunlu M. Synthetic CpG oligodeoxynucleotides augment BAFF- and APRIL-mediated immunoglobulin secretion. Eur J Immunol 2007;37:1785–95.
[40] He B, Santamaria R, Xu W, Cols M, Chen K, Puga I, et al. The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. Nat Immunol 2010;11:836–45.
[41] Xu W, He B, Chiu A, Chadburn A, Shan M, Buldys M, et al. Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. Nat Immunol 2007;8:294–303.
[42] Treml LS, Carlesso G, Hoek KL, Stadanlick JE, Kambayashi T, Bram RJ, et al. TLR stimulation modifies BLyS receptor expression in follicular and marginal zone B cells. J Immunol 2007;178:7531–9.
[43] He B, Qiao X, Cerutti A. CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10. J Immunol 2004;173:4479–91.
[44] Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A. A role for TLR in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. Blood 2003;101:4500–4.
[45] Brummel R, Lenert P. Activation of marginal zone B cells from lupus mice with type A(D) CpG-ODN. J Immunol 2005;174:2429–34.
[46] Capolunghi F, Cascioli S, Giorda E, Rosado MM, Plebani A, Auriti C, et al. CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. J Immunol 2008;180:800–8.
[47] Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. Nat Rev Immunol 2006;6:823–35.
[48] Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. Ann Rheum Dis 2002 Jun;61:554–8.
[49] Bendaoud B, Pennec YL, Lelong A, Le Noac'h JF, Magadur G, Jouquan J, et al. IgA-containing immune complexes in the circulation of patients with primary Sjögren's syndrome. J Autoimmun 1991;4:177–84.
[50] Le Pottier L, Bendaoud B, Renaudineau Y, Youinou P, Pers JO, Daridon C. New ELISA for B cell-activating factor. Clin Chem 2009;55:1843–51.
[51] Xanthou G, Tapinos NI, Polihronis M, Nezis IP, Margaritis LH, Moutsopoulos HM. CD4 cytotoxic and dendritic cells in the immunopathologic lesion of Sjögren's syndrome. Clin Exp Immunol 1999;118:154–63.
[52] Karlsson MC, Guinamard R, Bolland S, Sankala M, Steinman RM, Ravetch JV. Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone. J Exp Med 2003;198:333–40.
[53] Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. Science 2003;301:1374–7.
[54] Sfriso P, Oliviero F, Calabrese F, Miorin M, Facco M, Contri A, et al. Epithelial CXCR3-B regulates chemokines bioavailability in normal, but not in Sjogren's syndrome, salivary glands. J Immunol 2006;176:2581–9.
[55] Barone F, Bombardieri M, Rosado MM, Morgan PR, Challacombe SJ, De Vita S, et al. CXCL13, CCL21, and CXCL12 expression in salivary glands of patients with Sögren's syndrome and MALT lymphoma. J Immunol 2008;180:5130–40.
[56] 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 Sjögren's syndrome. J Autoimmun 2010;35:336–41.
[57] Theander E, Vasaitis L, Baecklund E, Nordmark G, Warfvinge G, Liedholm R, et al. Lymphoid organisation in labial salivary gland biopsies is a possible predictor for the development of malignant lymphoma in primary Sjögren's syndrome. Ann Rheum Dis 2011;70:1363–8.
[58] Bourke E, Bosisio D, Golay J, Polentarutti N, Mantovani A. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. Blood 2003;102:956–63.
[59] McKelvey KJ, Highton J, Hessian PA. Cell-specific expression of TLR9 isoforms in inflammation. J Autoimmun 2011;36:76–86.
[60] Green NM, Marshak-Rothstein A. Toll-like receptor driven B cell activation in the induction of systemic autoimmunity. Semin Immunol 2011;23:106–12.
[61] Carey JB, Moffatt-Blue CS, Watson LC, Gavin AL, Feeney AJ. Repertoire-based selection into the marginal zone compartment during B cell development. J Exp Med 2008;205:2043–52.
[62] Scofield RH, Asfa S, Obeso D, Jonsson R, Kurien BT. Immunization with short peptides from the 60-kDa Ro antigen recapitulates the serological and pathological findings as well as the salivary gland dysfunction of Sjögren's syndrome. J Immunol 2005;175:8409–14.
[63] Burton MF, Steel PG. The chemistry and biology of LL-37. Nat Prod Rep 2009;26:1572–84.
[64] Triantafyllopoulou A, Tapinos N, Moutsopoulos HM. Evidence for coxsackievirus infection in primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2004;50:2897–902.
[65] Sipsas NV, Gamaletsou MN, Moutsopoulos HM. Is Sjögren's syndrome a retroviral disease? Arthritis Res Ther 2011;13:212.
[66] Zanetti M, Del Sal G, Storici P, Schneider C, Romeo D. The cDNA of the neutrophil antibiotic Bac5 predicts a pro-sequence homologous to a cysteine

Please cite this article in press as: Guerrier T, et al., Role of toll-like receptors in primary Sjögren's syndrome with a special emphasis on B-cell maturation within exocrine tissues, Journal of Autoimmunity (2012), doi:10.1016/j.jaut.2012.01.016

proteinase inhibitor that is common to other neutrophil antibiotics. J Biol Chem 1993;268:522–6.
[67] Sandgren S, Wittrup A, Cheng F, Jönsson M, Eklund E, Busch S, et al. The human antimicrobial peptide LL-37 transfers extracellular DNA plasmid to the nuclear compartment of mammalian cells via lipid rafts and proteoglycan-dependent endocytosis. J Biol Chem 2004;279: 17951–6.
[68] Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S, Bayry J. The antiinflammatory IgG. N Engl J Med 2008;359:307–9.
[69] Lemieux R, Bazin R, Néron S. Therapeutic intravenous immunoglobulins. Mol Immunol 2005;42:839–48.
[70] Zandman-Goddard G, Blank M, Shoenfeld Y. IVIg in systemic lupus erythematosus: from the bench to the bedside. Lupus 2009;18:884–8.
[71] Perl A. Emerging new pathways of pathogenesis and targets for treatment in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. Curr Opin Rheumatol 2009;21:443–7.
[72] Séïté JF, Cornec D, Renaudineau Y, Youinou P, Mageed RA, Hillion S. IVIg modulates BCR signaling through CD22 and promotes apoptosis in mature human B lymphocytes. Blood 2010;116:1698–704.
[73] Séïté JF, Guerrier T, Cornec D, Jamin C, Youinou P, Hillion S. TLR9 responses of B cells are repressed by intravenous immunoglobulin through the recruitment of phosphatase. J Autoimmun 2011;37:190–7.

Please cite this article in press as: Guerrier T, et al., Role of toll-like receptors in primary Sjögren's syndrome with a special emphasis on B-cell maturation within exocrine tissues, Journal of Autoimmunity (2012), doi:10.1016/j.jaut.2012.01.016

Article n°2

TLR9 drives the development of transitional B cells towards the marginal zone pathway and promotes autoimmunity

Sous presse dans Journal of Autoimmunity, 2012

Journal of Autoimmunity xxx (2012) 1–7

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Autoimmunity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jautimm

TLR9 drives the development of transitional B cells towards the marginal zone pathway and promotes autoimmunity

Thomas Guerrier [a], Pierre Youinou [a,b], Jacques-Olivier Pers [a,b], Christophe Jamin [a,b,*]

[a] EA2216 Immunologie et Pathologie, IFR148 ScInBioS, Université de Brest et Université Européenne de Bretagne, Brest, France
[b] CHRU de Brest, Brest, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 May 2012
Accepted 20 May 2012

Keywords:
B lymphocytes
Toll-like receptor
Marginal zone
Autoreactivity

ABSTRACT

Maturation of B cells depends on environmental stimuli. Peripheral immature B cells develop into follicular pathway when antigenic stimulation is combined with T cell signals. Here, we wished to identify stimuli contributing to the development into marginal zone B cells known to be involved in autoimmune response. We found that TLR9 stimulation of transitional B cells induces proliferation and specific maturation into CD24$^-$ CD38$^+$ CD21^{high} CD23^{low} IgM^{high} IgD^{low} and Notch2^{high} B cells characteristics of marginal zone B cells. Terminal differentiation into antibody-secreting cell associated with isotype switch commitment is also triggered which leads to a striking production of autoantibodies. Interestingly, mature B cells do not differentiate into marginal zone pathway following TLR9 stimulation, nor do transitional B cells under antigenic and T cell combined signals. These results suggest that transitional B cells are specifically sensitive to TLR9 stimulation to produce autoreactive marginal zone B cells.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The B cell tolerance processes are aimed at controlling the reaction of the immune system to antigen (Ag) that may induce inappropriate response. This concerns mainly the responses to auto-Ag, i.e. the control of autoimmunity, but also the responses to exo-Ag such as allergens or in case of tissue transplantation. The original concept of tolerance developed by Burnett very wisely suggested that forbidden clones were neonatally deleted due to their recognition of self-Ag [1]. In fact, immune tolerance is based on much more diversified mechanisms, especially as some autoreactive clones are not eliminated and participate in the immune system's homeostasis.

Mechanisms operated in the bone marrow are referred to as central tolerance while those performed in secondary lymphoid organs are called peripheral tolerance. The former are based on specific checkpoints that control the B cell ontogenesis and avoid the emergence of potentially dangerous autoreactive B-cell clones in the periphery. The latter resort to peripheral checkpoints and to particular subtypes of lymphocytes to regulate inappropriate or exacerbated immune responses.

In the bone marrow, progression into the B cell ontogenesis is dependent on cell surface expression of functional immunoglobulins. Synthesis of these proteins follows the rearrangements of V_H, D_H and J_H genes encoding the variable domain of the heavy chain, and of V and J genes encoding the variable domain of the light chain, based upon the activity of both recombination activating gene (RAG) 1 and RAG2 enzymes [2]. A first checkpoint occurs at the pre-B cell stage, where a cytoplasmic heavy chain is produced. It associates with a pseudo-light chain constituted by the association of λ5 and V-preB proteins [3]. If considered as functional due to appropriate interaction with stromal cells of the bone marrow [4], the pre-B cell clones progress into the ontogenesis until a complete immunoglobulin called B cell receptor (BCR) is expressed on the surface of immature B cells. At this stage, a second important checkpoint takes place. When a non-functional or autoreactive BCR is produced, a mechanism for the genetic correction, called receptor editing, based on RAG1 and RAG2 re-expression is induced [5]. New rearrangements mainly affecting the light chain genes are initiated to synthesize novel light chain and amend the Ag specificities. Secondarily, if receptor editing failed to promote non-autoreactive B cell clones, autoreactive immature B cells are deleted by apoptosis [6]. This second tolerance checkpoint reduces the self-reactive B cell pool from 75% of newly formed B cells to 7% of the immature B cells [7].

In the periphery, transitional B cells migrate into secondary lymphoid organs in which they differentiate into follicular B cells to

* Corresponding author. Laboratory of Immunology, Brest University Medical School Hospital, BP 824, F 29609 Brest, France. Tel.: +33 2 98 22 33 84.
E-mail address: christophe.jamin@univ-brest.fr (C. Jamin).

0896-8411/$ – see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jaut.2012.05.012

develop germinal center reactions or into marginal zone (MZ) B cells expressing high level of Notch2 [8]. Before entrance into germinal center, modulation of the BCR affinity can arise. Due to interaction with T cells, B cells are activated and can be induced to express CD5 [9] that facilitates re-expression of RAG1 and RAG2 enzymes [10]. This process called receptor revision promotes novel immunoglobulin chain rearrangements [11]. It is an important checkpoint that control BCR affinity likely to facilitate the development of efficient germinal center reactions [12]. Within germinal centers, a second peripheral checkpoint based on interactions with follicular helper T cells and dendritic cells evaluates BCR affinity of B cells following the somatic hypermutation that occurs during the proliferation phase. In case of decreased affinity or autoreactivity, Fas-dependent apoptosis with T cell contact eliminates inefficient or harmful B-cell clones, while survival signals provided by follicular dendritic cells positively select B-cell clones harboring high affinity and non-autoreactive BCR. Overall, the peripheral tolerance checkpoints further reduce the self-reactive B cell pool to less than 5% of the mature B cells. BAFF signals [13], but also CD40L and HLA–II interaction with Treg cells [14] have been shown to be able to affect these peripheral selection process.

Whilst signals that control the follicular B cell development have been extensively studied, the differentiation of MZ B cells remains incompletely resolved. From murine models, the role of Ag and the strength of BCR signals have generated a broad consensus [15]. This resulted in speculative hypotheses of the immature B cell fate to explain the MZ B cell developmental pathway in relation to the follicular B cell differentiation [16]. Then, transitional B cells have been deemed an important crossroad for maturation into follicular B cell pathway or into MZ B cells [17].

Originally described as receptors that bind microbial antigens, Toll-like receptors (TLR) are able to bind auto-Ag as well [18]. It is therefore not surprising that innate TLR-dependent pathways are required for efficient central and peripheral tolerance checkpoint. TLR signals may thus prevent autoreactive B lymphocytes from entering the mature naive B cell compartment [19]. It is speculated that TLR stimulation from pDC leads to educate Treg cells that accordingly counter select autoreactive B cells. However, direct stimulation of TLR on B cells, and specifically TLR9, can also activate proliferation and terminal differentiation either when activated alone [20] or when combined with other signals such as interleukins [21], BAFF [22] or CD40L [23].

In humans, MZ B cells are believed to be extremely sensitive to CpG-DNA stimulation from microbial origin [24]. They proliferate and differentiate into plasmablasts producing antibacterial but also natural antibodies. This suggests that TLR signals might participate in the development of MZ B cells. Furthermore, the presence of transitional immature B cells and MZ B cells is of relevance within infiltrates of salivary glands from patients with Sjögren's syndrome (SS) [25–27]. TLR9 expression in these infiltrated B cells [28] strongly supports the idea that TLR9 signals might participate in the MZ B cell development and differentiation from immature transitional B cells. The current work aims to evaluate this hypothesis.

2. Materials and methods

2.1. Isolation of cells

Cord blood and tonsils were collected after obtaining informed consent. The tissues were minced up and filtered to remove tissue fragments and clumps. Cord blood samples and tonsillar cell suspensions were layered onto Ficoll-Hypaque and centrifuged. Mononuclear cells were incubated with neuraminidase-treated sheep red blood cells and T cells depleted by a second round of centrifugation. All preparations were >95% pure.

2.2. Flow cytometry

All mAb were purchased from Beckman Coulter, unless otherwise specified. We used FITC-conjugated anti-CD1c, anti-CD10, anti-CD21, anti-CD23, anti-IgD (BD Biosciences), and anti-IgM (Dako), PE-conjugated anti-CD24, PE-cyanin 5-conjugated anti-CD38, and PE-cyanin 7-conjugated anti-CD19 for cell surface staining.

Intracellular staining for Notch2 and TLR9 were performed after permeabilization of the cells using cytofix/cytoperm permeabilization kit (BD Biosciences) with goat anti-human Notch2 (R&D Systems) revealed using FITC-conjugated donkey anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) and biotinylated anti-human TLR9 (Imgenex) revealed using PE-cyanin 7-conjugated streptavidin, respectively.

Cells were examined on FC500 flow cytometer (Beckman Coulter) and the results analyzed with CXP analysis software (Beckman Coulter).

2.3. Cell culture

Transitional B cells and mature naive B cells from cord blood were identified as $CD24^{high}$ $CD38^{high}$ and $CD24^{+}$ $CD38^{+}$, respectively, and sorted on Epics Altra flow cytometer (Beckman Coulter). Sorted B cells as well as B cells purified from tonsils were cultured in RPMI1640 medium (Invitrogen Life Technologies) supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, 200 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin. For stimulation, B cells were seeded at 5×10^5 cells/ml in the presence of 0.25 μM CpG-ODN 2006 (Cayla-InvivoGen), or on 5×10^5 NIH-3T3 fibroblasts transfected or not with human CD40L gene and treated with mitomycin C, in the presence of 10 μg/ml anti-IgM-coated beads (Irvine Scientific) and 100 UI/ml rIL-2 (ImmunoTools).

2.4. Proliferation assay

Freshly isolated B cells were labeled with 5 μM CFSE before stimulation. B cell proliferation was evaluated by flow cytometry on FC500 (Beckman Coulter) measuring the decrease in MFI of CFSE.

2.5. ELISA

Secreted Igs were detected at day 7. Briefly, 96-well plates were coated overnight at 4 °C with 10 μg/ml purified goat anti-human Ig (Jackson). After washing with PBS-Tween 0.05% and 1 h blocking with PBS-BSA 3%, plates were incubated for 1 h at 37 °C with the supernatants of cultured cells. After washing, plates were incubated for 1 h at 37 °C with peroxidase-conjugated goat anti-human Ig (Dako) followed by incubation with *O*-phenylenediamine. The absorbance was measured at 492 nm.

2.6. Immunofluorescence analysis

Anti-nuclear and anti-cytoplasmic antibodies were detected by indirect immunofluorescence (IIF) analysis. Hep-2 cells were permeabilized and fixed in 20% ethanol plus 80% acetone for 5 min. Cells were then incubated with the supernatants of cultured cells for 2 h at room temperature, washed, and revealed using FITC-conjugated anti-human Ig (Jackson). Slides were mounted in glycerol and examined with an Axioplan fluorescence microscope (Zeiss).

Please cite this article in press as: Guerrier T, et al., TLR9 drives the development of transitional B cells towards the marginal zone pathway and promotes autoimmunity, Journal of Autoimmunity (2012), doi:10.1016/j.jaut.2012.05.012

2.7. Immunofluorescence staining of tonsils

Biopsy specimens were embedded in OCT (Miles Laboratories), snap-frozen in isopentane, and stored at −80 °C. Ten μm-thick sections were mounted onto poly-L-lysine-coated slides. Double-staining procedures were performed as previously described [27,29]. Briefly, FITC-conjugated rabbit anti-human IgD (Dako) was combined with mouse anti-human TLR9 (Imgenex). They were developed with FITC-conjugated donkey anti-rabbit (Jackson) plus tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)-conjugated donkey anti-mouse (Jackson). Autoreactive B cells were tracked with the 9G4 rat Ab [30,31], kindly provided by Dr Rizgar A Mageed [32,33]. It was combined with either FITC-conjugated rabbit anti-human IgD (Dako) or FITC-conjugated mouse anti-human TLR9 (Imgenex). They were developed with biotinylated donkey anti-rat (Jackson) associated with TRITC-conjugated streptavidin, plus either FITC-conjugated donkey anti-rabbit (Jackson) or FITC-conjugated donkey anti-mouse (Jackson). The tissues were fixed with 4% paraformaldehyde and analyzed with a TCS-NT confocal imaging system (Leica). Controls rabbit IgG with FITC-conjugated donkey anti-rabbit, mouse IgG with either FITC-conjugated or TRITC-conjugated donkey anti-mouse, and rat IgG with biotinylated donkey anti-rat plus TRITC-conjugated streptavidin did not reveal background fluorescence.

3. Results

3.1. Autoreactive B cells are excluded from germinal centers

The presence of autoreactive B cells within germinal centers of tonsils was assessed by immunofluorescence staining using the 9G4 mAb that recognized the $V_H4.34^+$ associated idiotype frequently expressed by autoreactive B cells [30]. We observed that $V_H4.34^+$ B cells were confined to the MZ and excluded from the IgD-negative germinal center structures (Fig. 1). Interestingly, TLR9-positive B cells were also restricted outside the germinal centers (Fig. 2A) and contained autoreactive $V_H4.34^+$ B cells (Fig. 2B). These observations suggest that B cells outside germinal centers might be sensitive to TLR9 stimulation, among which autoreactive B cells would be activated into MZ.

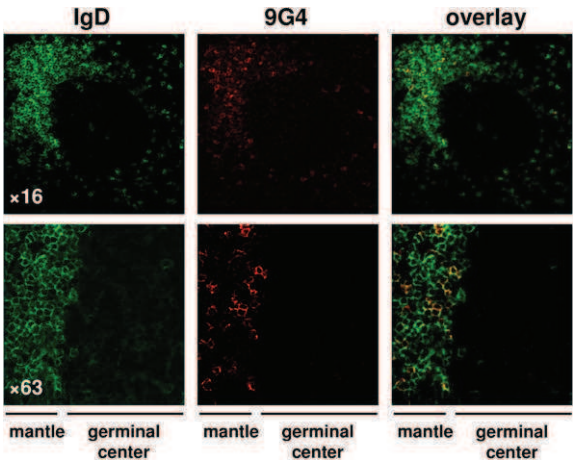

Fig. 1. *$V_H4.34^+$ B cells are excluded from germinal center structures.* Germinal centers from tonsils were stained with FITC-conjugated rabbit anti-IgD and the rat 9G4 mAb revealed with TRITC-conjugated anti-rat Ig. Representative example is shown (original magnification, ×16 for the upper row and ×63 for the lower row).

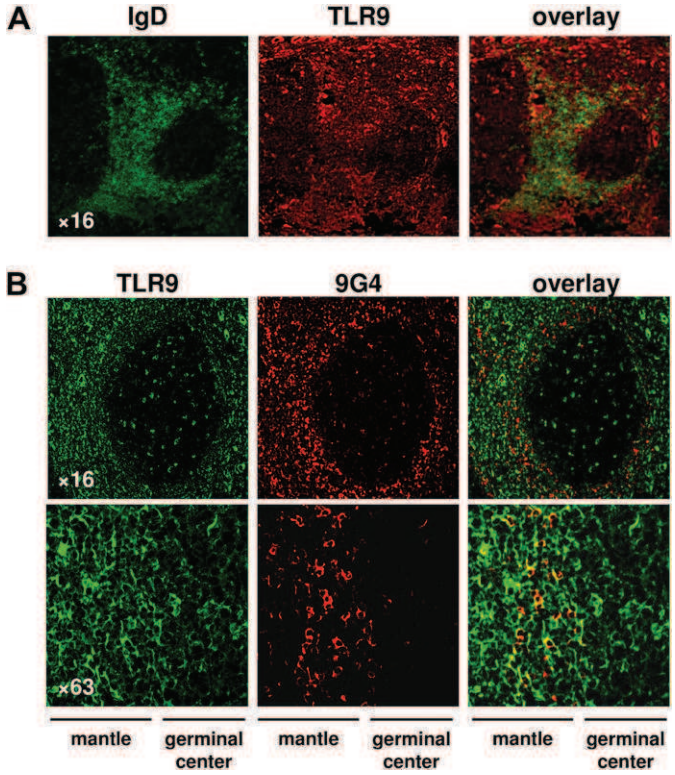

Fig. 2. *TLR9 is predominantly expressed by B cells outside germinal centers.* A. Germinal centers from tonsils were stained with FITC-conjugated rabbit anti-IgD and mouse anti-TLR9 mAb revealed with TRITC-conjugated anti-mouse Ig. Representative example is shown (original magnification, ×16). B. Germinal centers were stained with mouse anti-TLR9 mAb and the rat 9G4 mAb revealed with FITC-conjugated anti-mouse Ig and TRITC-conjugated anti-rat Ig, respectively. Representative example is shown (original magnification, ×16 for the upper row and ×63 for the lower row).

3.2. Potent proliferative response of transitional B cells to TLR9 stimulation

In order to evaluate the role of TLR9 stimulation in the differentiation of B cells towards the MZ pathway, we wished to assess the response of transitional B cells. This latter population (Fig. 3A) identified as $CD24^{high}$ $CD38^{high}$ B cells [34,35] was $CD10^+$ $CD23^-$ and IgM^{high} while mature naive B cells were $CD24^+$ $CD38^+$ $CD10^-$ $CD23^{low}$ and IgM^{low} (Fig. 3B). Both populations expressed similar level of intracellular TLR9.

Transitional and mature B cells were sorted from cord blood (Fig. 4A) and stimulated with type B CpG-ODN. Transitional B cells proliferated in response to TLR9 stimulation. Frequencies of proliferating cells were closed to those observed with mature naive B cells, although the extent of the responses could vary from one experiment to another (Fig. 4B). Furthermore, at least three division cycles were induced after 4 days of stimulation with CpG-ODN, whilst the response was lower following activation with combined CD40L, anti-IgM Abs and IL-2. Thus, transitional B cells as well as mature naive B cells displayed only one or two division cycles after 4 days (Fig. 4C). These preliminary experiments indicate that transitional and mature naive B cells from cord blood proliferated similarly in response to TLR9 stimulation.

3.3. Specific maturation of transitional B cells induced by TLR9 stimulation

After two days of stimulation with CpG-ODN, the maturation status of transitional B cells was established. There was

Please cite this article in press as: Guerrier T, et al., TLR9 drives the development of transitional B cells towards the marginal zone pathway and promotes autoimmunity, Journal of Autoimmunity (2012), doi:10.1016/j.jaut.2012.05.012

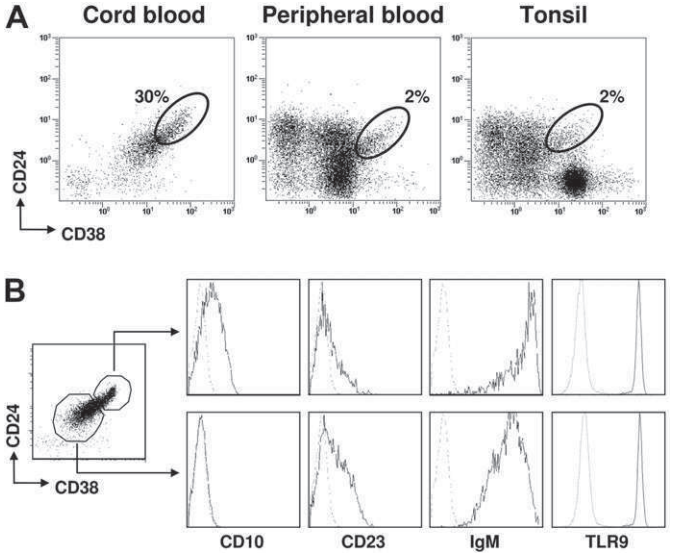

Fig. 3. *Phenotyping of transitional B cells*. A. Frequency of transitional B cells identified as CD24^{high} and CD38^{high} in cord blood, peripheral blood and tonsil. B. Purified from cord blood, CD19-gated B cells could be divided into transitional CD24^{high} CD38^{high} B cells phenotyped as CD10^{+} CD23^{-} IgM^{high} and TLR9^{+}, and mature naive B cells present as CD24^{+} CD38^{+} CD10^{-} CD23$^{+/-}$ IgM^{low} and TLR9^{+}.

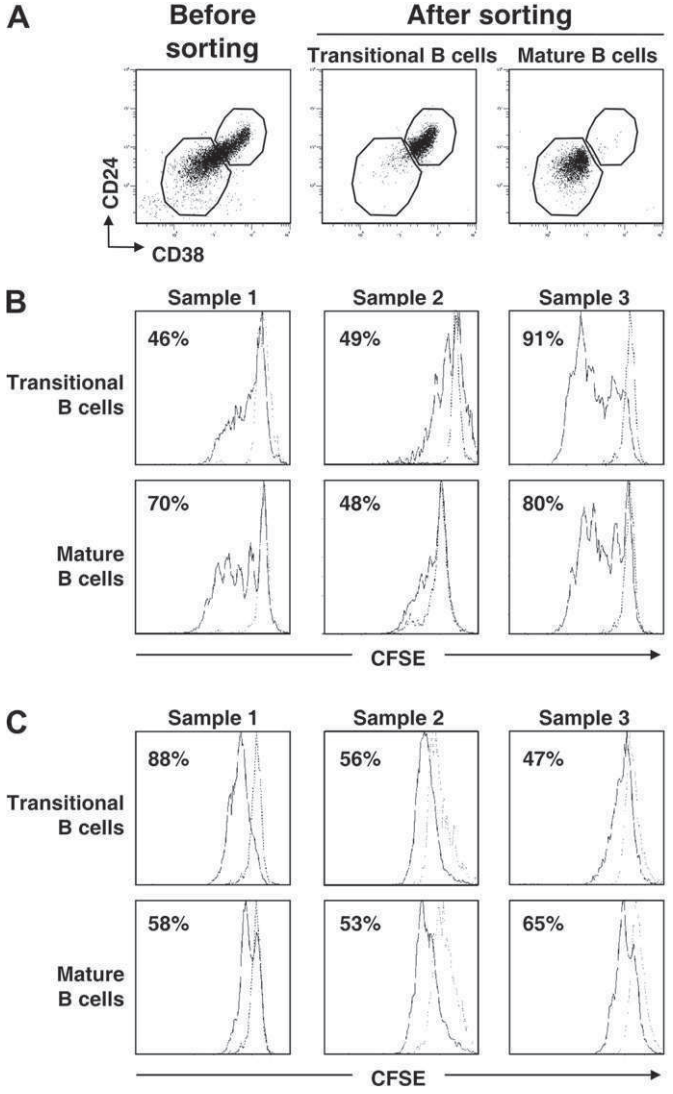

Fig. 4. *The proliferative response of cord blood B cells*. (A) Transitional CD24^{high} CD38^{high} B cells and mature CD24^{+} CD38^{+} naive B cells were sorted by flow cytometry for *in vitro* stimulation. B cells were stained with CFSE and stimulated for 4 days with 0.25 μM CpG-ODN 2006 (B) or with 10 μg/ml anti-IgM and 100 UI/ml rIL-2 on CD40L-transfected fibroblasts (C). The proliferative response was evaluated on flow cytometer by the dilution of CFSE expression. Representative experiments are shown where dotted histograms correspond to CFSE staining of unstimulated cells.

a downregulation of the density of CD24 and CD38 molecules leading to the emergence of a subpopulation of CD24^{-} CD38^{+} B cells (Fig. 5A). These cells were CD21^{high} CD23^{low} IgM^{high} IgD^{low} and Notch2^{high}. Interestingly, mature naive B cells did not differentiate similarly following CpG-ODN activation. Though a subpopulation of CD24^{-} CD38^{+} B cells also appeared, they were CD21^{low} CD23^{low} IgM^{low} IgD^{high} and Notch2^{low}. These results suggested that MZ-like B cells can arise from transitional B cells in response to TLR9 stimulation, whereas follicular-like B cells arose from mature naive B cells. In contrast, when transitional B cells were stimulated with CD40L, anti-IgM and IL-2, the induced CD24^{-}CD38^{+} subpopulation displayed a follicular-like phenotype, as did those from mature naive B cells (Fig. 5B). The former were CD21^{low} CD23^{low} IgM^{high} IgD^{high} and CD1c^{+}, and the latter CD21^{low} CD23^{+} IgM^{low} IgD^{high} and CD1c^{+}. These observations strongly imply that transitional B cells, but not mature naive B cells, can specifically develop into MZ-like B cells in response to TLR9 stimulation, but not in response to CD40, BCR and IL2-R.

3.4. Terminal differentiation of transitional B cells following TLR9 stimulation

To go further in depth, we assessed the antibody production of transitional B cells stimulated with CpG-ODN. Following a 7-day period, stimulated B cells differentiated into antibody-producing cells with elevated amount of IgM found in the supernatants (Fig. 6A). TLR9 stimulation also triggered isotype switching since low levels of IgG were detected. It should be noted that mature naive B cells were sensitive to TLR9 activation as well, that led mainly to the production of IgM and few IgG. In contrast, transitional and mature naive B cells stimulated with CD40L, anti-IgM and IL-2 produced lower levels of IgM and of IgG.

However, antibody specificity determined by immunofluorescence staining of Hep2 cells was strikingly different between transitional and mature naive B cells. A higher frequency of autoantibodies was produced by CpG-ODN-stimulated transitional B cells compared with mature naive B cells (Fig. 6B). Furthermore, autoantibodies were barely undetectable when transitional B cells or mature B cells were stimulated with CD40L, anti-IgM and IL-2 stimulation.

3.5. Singular response of transitional B cells to TLR9 stimulation

To assess the peculiar response of transitional B cells after engagement of TLR9, experiments were repeated with mature activated B cells purified from tonsils. In contrast with transitional and mature naive B cells, they did not proliferate in response to CpG-ODN stimulation but proliferated following stimulation with CD40L, anti-IgM and IL-2 (Fig. 7A). It is noteworthy that TLR9 stimulation led to the appearance of CD24^{-} CD38^{+} activated B cells with follicular-like phenotype since they were CD21^{+} CD23^{high} IgM^{high} IgD^{+} CD1c^{low} and Notch2^{-} (Fig. 7B). CD40, BCR and IL-2R stimulation induced also CD24^{-} CD38^{+} B cells with a related phenotype CD21^{+} CD23^{high} IgM^{low} IgD^{+} CD1c^{low} and Notch2^{-}. Furthermore, the terminal differentiation into antibody-producing

Please cite this article in press as: Guerrier T, et al., TLR9 drives the development of transitional B cells towards the marginal zone pathway and promotes autoimmunity, Journal of Autoimmunity (2012), doi:10.1016/j.jaut.2012.05.012

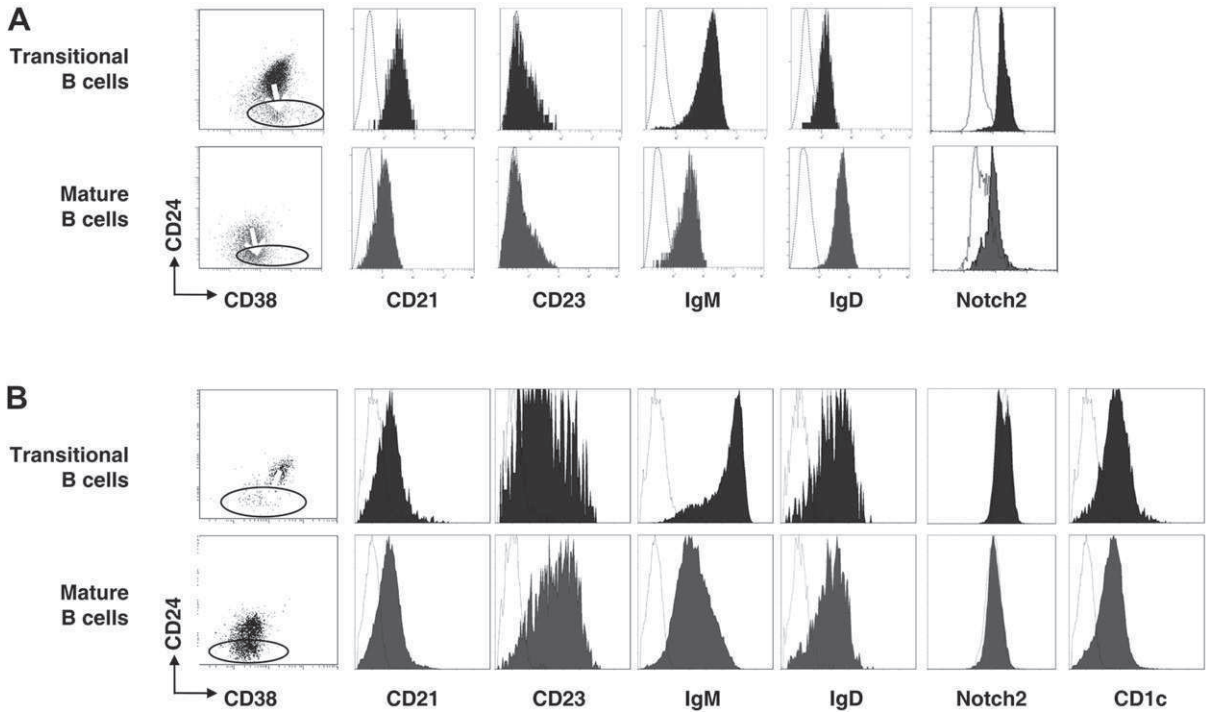

Fig. 5. *The specific maturation of transitional B cells*. Transitional CD24^{high} CD38^{high} B-cells and mature CD24^{+} CD38^{+} naive B cells were sorted form cord blood and stimulated with 0.25 μM CpG-ODN 2006 (A) or with 10 μg/ml anti-IgM and 100 UI/ml rIL-2 on CD40Lfib-transfected roblasts (B). After two days, the phenotype of the emerging CD24^{-} CD38^{+} population was determined. Representative experiments are shown where dotted histograms correspond to isotype controls.

cells was distinct. Thus, mature activated B cells produced elevated levels of IgM and especially high levels of IgG following TLR9 stimulation (Fig. 7C) whereas CD40L, anti-IgM and IL-2 stimulation triggered very low levels of IgM but similar amount of IgG. Moreover, neither polyreactivity nor autoreactivity could be detected (not shown). All in all, the results indicate that TLR9 stimulation gives rise to a specific activation response from transitional B cells towards the MZ pathway that can neither be generated from mature naive or activated B cells nor with co-stimulation of CD40 and the BCR.

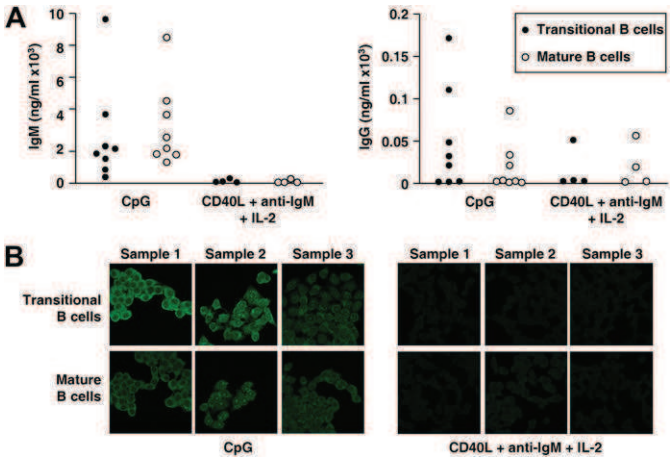

Fig. 6. *The terminal differentiation of cord blood B cells*. Transitional CD24^{high} CD38^{high} B cells and mature CD24^{+} CD38^{+} naive B cells were sorted and stimulated for 7 days with 0.25 μM CpG-ODN 2006 or with 10 μg/ml anti-IgM and 100 UI/ml rIL-2 on CD40L-transfected fibroblasts. A. The production of IgM and IgG were determined by ELISA. Eight independent experiments are shown. B. Polyreactivity was evaluated by immunofluorescence staining of Hep2 cells. Representative experiments are shown.

4. Discussion

This work reveals that TLR9 stimulation can activate transitional B cells to differentiate into antibody-secreting cells through the development of MZ-like B cells. Interestingly, mature B cells can also respond to TLR9 stimulation but through the development of follicular-like B cells. It appears that peripheral B cells at the immature transitional stage are especially sensitive to differentiate into MZ B cells when TLR9 signaling is engaged.

We demonstrate that TLR9 activation of transitional and mature cord blood B cells induces survival signals, up-regulates expression of activation markers and triggers a proliferative response followed by terminal differentiation associated with switch commitment for the secretion of IgM and IgG. In contrast, tonsillar mature B cells are less sensitive to TLR9 stimulation. Thus, they do not proliferate, which is consistent with other observations [36]. It has been shown that memory B cells express higher level of TLR9 mRNA compared with naive B cells [37]. However, this cannot be what causes the differential sensitivity to TLR9 stimulation since similar TLR9 protein expression has been then described [38].

Moreover, human peripheral blood B cells poorly respond to TLR stimulation without BCR co-engagement [39]. It has been suggested that BCR stimulation sensitizes B cells to TLR signaling [40], likely due to an efficient endocytosis of intracellular TLR ligands [41], and to increased TLR and MyD88 mRNA up-regulation [42]. Here, we observed that, as previously perceived in mice [43], transitional B cells are particularly sensitive to respond to TLR9 stimulation without BCR co-activation, with a specific differentiative development into MZ B cells. Curiously, this stimulation enables the striking production of polyreactive antibodies that could account for the elevated frequency of self-reactive B cells detected within the MZ [44]. Thus, anti-DNA transitional B cells have the ability to endocytosize DNA and then to engage TLR9 that promotes their differentiation in the MZ. Such characterization is

Please cite this article in press as: Guerrier T, et al., TLR9 drives the development of transitional B cells towards the marginal zone pathway and promotes autoimmunity, Journal of Autoimmunity (2012), doi:10.1016/j.jaut.2012.05.012

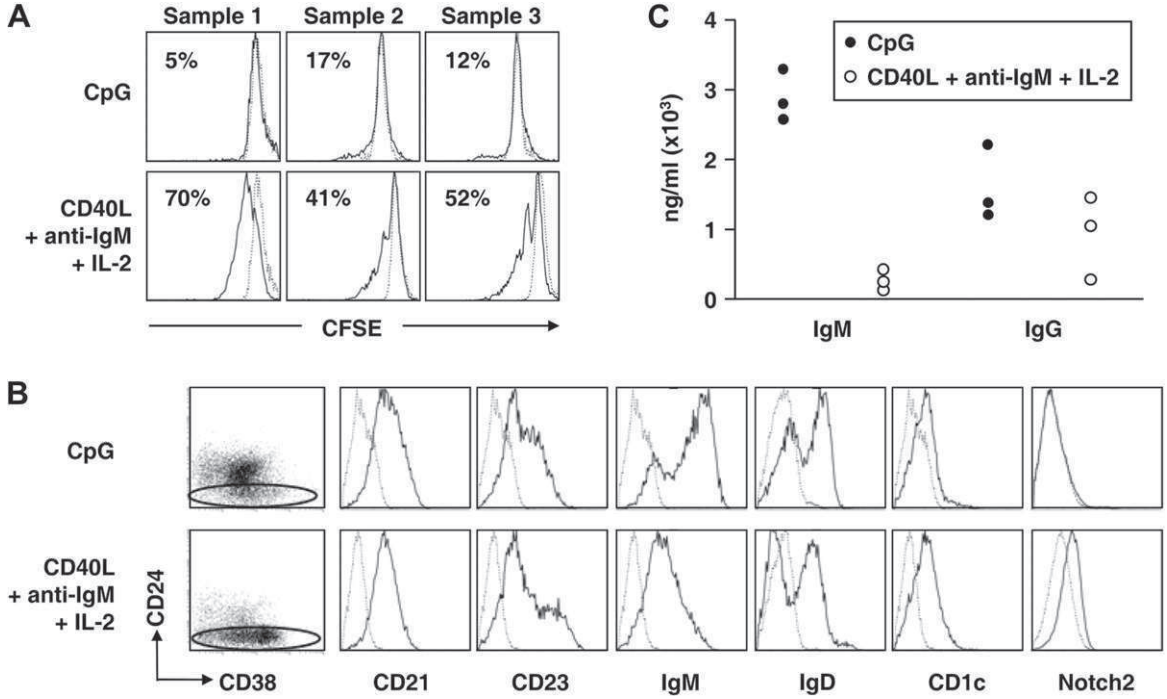

Fig. 7. *TLR9 stimulation does not influence the response of mature activated tonsillar B cells.* B cells from tonsils were stimulated with 0.25 μM CpG-ODN 2006 or with 10 μg/ml anti-IgM and 100 UI/ml rIL-2 on CD40L-transfected fibroblasts. A. After 4 days the proliferative response was evaluated by dilution of CFSE expression in preliminary CFSE-stained cells. Representative experiments are shown where dotted histograms correspond to CFSE staining of unstimulated cells. B. The phenotype of the emerging $CD24^{-}$ $CD38^{+}$ population was determined after two days. Representative experiments are shown where dotted histograms correspond to isotype controls. C. After 7 days, the production of IgM and IgG were determined by ELISA. Three independent experiments are shown.

specific of TLR9 since co-activation of BCR, CD40 and IL2-R induces differentiation of transitional B cells into follicular pathway with low production of polyreactive antibodies.

This raises the possibility that aberrant stimulation of TLR9 in autoimmune disease patients could increase the development of MZ B cells qualified to participate to the pathogenesis [45]. This hypothesis is substantially supported by our recent observations in the salivary glands of SS patients. The majority of infiltrated B cells is aggregated and comprised of transitional-like and MZ-like B cells [27]. These populations express high level of IRF-4 and Notch-2 mRNA but not Bcl-6 [29]. IRF-4 is a transcriptional factor which negatively regulates the Bcl-6-dependent germinal center response [46], whereas Notch-2 is indispensable for the development of transitional B cells into MZ B cells [47]. The presence of TLR9 on aggregated B cells might thus be an important component for the differentiation of transitional B cells into autoantibody secreting MZ B cells [28]. Furthermore, MZ B cells present higher sensitivity to TLR ligands than follicular B cells in mice [48] but also in humans [24] where they are involved in response to encapsulated bacteria. Because deficiency in TLR increases infections to *S. pneumoniae* and other encapsulated bacteria [49], TLR on MZ B cells might also play an important role in type II-independent humoral responses. Moreover, TLR9-dependent activation of autoreactive B cells is associated with a switch to pathogenic IgG2a [50] while TLR9 deficiency in lupus mice down-regulates the production of auto-antibodies directed against DNA-associated Ags [51]. The decreased production of autoantibodies is much more striking when the deficiency of TLR9 is restricted to B cells [52]. These *in vivo* observations strengthened the notion that MZ B cells contribute to the pathophysiology of autoimmune diseases especially following TLR9 activation.

The transitional B cells in infiltrates of salivary glands from SS patients are highly sensitive to TLR9 signaling, and therefore prone to survive and to differentiate into autoreactive MZ B cells. This raises the question as to whether TLR9 antagonist could be beneficial for these patients [53]. In this respect, we have recently observed that intravenous immunoglobulin can inhibit TLR9 response of B cells [54]. This unexpected effect can be seen as promising in the treatment of such autoimmune diseases [55]. Finally, we are delighted to contribute to this issue which honors Professor Pierre Youinou. Pierre has been not only an outstanding research scientist, but a great mentor to more than a generation of physicians and bench researchers. We note that this is part of the Journal's effort to honor outstanding autoimmunologists and have included recognition of Yehuda Shoenfeld, Ian Mackay, Susumu Ikehara, Noel Rose, Chella David and Haralampos Moutsopoulos. These issues not only honor the contributions, but also have been a vehicle to provide timely reviews of critical issues in autoimmunity [56–61].

Acknowledgments

This work was supported by the Institut Français de Recherche Odontologique. Thomas Guerrier received a grant by the Fondation pour la Recherche Médicale. We are grateful to Dr. Rizgar A Mageed (William Harvey Research Institute, London, UK) and Dr. Freda K. Stevenson (University of Southampton, London, UK) for kindly providing reagents. We also thank Geneviève Michel and Simone Forest for typing this manuscript.

References

[1] Burnet FM. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. CA Cancer J Clin 1976;26:119–21.
[2] Hillion S, Rochas C, Youinou P, Jamin C. Expression and reexpression of recombination activating genes: relevance to the development of autoimmune states. Ann N Y Acad Sci 2005;1050:10–8.

[3] Tsubata T, Reth M. The products of pre-B cell-specific genes (lambda 5 and VpreB) and the immunoglobulin mu chain form a complex that is transported onto the cell surface. J Exp Med 1990;172:973–6.
[4] Gauthier L, Rossi B, Roux F, Termine E, Schiff C. Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:13014–9.
[5] Nemazee D. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. Nat Rev Immunol 2006;6:728–40.
[6] Hillion S, Rochas C, Devauchelle V, Youinou P, Jamin C. Central and peripheral RAG protein re-expression: underestimate mechanisms of tolerance? Scand J Immunol 2006;64:185–9.
[7] Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. Science 2003;301:1374–7.
[8] Le Pottier L, Devauchelle V, Pers JO, Jamin C, Youinou P. The mosaic of B-cell subsets (with special emphasis on primary Sjogren's syndrome). Autoimmun Rev 2007;6:149–54.
[9] Youinou P, Jamin C, Lydyard PM. CD5 expression in human B-cell populations. Immunol Today 1999;20:312–6.
[10] Hillion S, Saraux A, Youinou P, Jamin C. Expression of RAGs in peripheral B cells outside germinal centers is associated with the expression of CD5. J Immunol 2005;174:5553–61.
[11] Hillion S, Dueymes M, Youinou P, Jamin C. IL-6 contributes to the expression of RAGs in human mature B cells. J Immunol 2007;179:6790–8.
[12] Hillion S, Youinou P, Jamin C. Peripheral expression of RAG in human B lymphocytes in normal and pathological conditions is dependent on interleukin-6. Autoimmun Rev 2007;6:415–20.
[13] Lesley R, Xu Y, Kalled SL, Hess DM, Schwab SR, Shu HB, et al. Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. Immunity 2004;20:441–53.
[14] Herve M, Isnardi I, Ng YS, Bussel JB, Ochs HD, Cunningham-Rundles C, et al. CD40 ligand and MHC class II expression are essential for human peripheral B cell tolerance. J Exp Med 2007;204:1583–93.
[15] Pillai S, Cariappa A, Moran ST. Marginal zone B cells. Annu Rev Immunol 2005; 23:161–96.
[16] Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. Nat Rev Immunol 2002;2:323–35.
[17] Carsetti R, Rosado MM, Wardmann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. Immunol Rev 2004;197:179–91.
[18] Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. Nat Rev Immunol 2006;6:823–35.
[19] Isnardi I, Ng YS, Srdanovic I, Motaghedi R, Rudchenko S, von Bernuth H, et al. IRAK-4- and MyD88-dependent pathways are essential for the removal of developing autoreactive B cells in humans. Immunity 2008;29:746–57.
[20] Capolunghi F, Cascioli S, Giorda E, Rosado MM, Plebani A, Auriti C, et al. CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. J Immunol 2008;180:800–8.
[21] Huggins J, Pellegrin T, Felgar RE, Wei C, Brown M, Zheng B, et al. CpG DNA activation and plasma-cell differentiation of CD27- naive human B cells. Blood 2007;109:1611–9.
[22] He B, Qiao X, Cerutti A. CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10. J Immunol 2004;173:4479–91.
[23] Poeck H, Wagner M, Battiany J, Rothenfusser S, Wellisch D, Hornung V, et al. Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. Blood 2004;103:3058–64.
[24] Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. Science 2002; 298:2199–202.
[25] Groom J, Kalled SL, Cutler AH, Olson C, Woodcock SA, Schneider P, et al. Association of BAFF/BLyS over expression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome. J Clin Invest 2002;109:59–68.
[26] Harris NL. Lymphoid proliferations of the salivary glands. Am J Clin Pathol 1999;111:S94–103.
[27] Daridon C, Pers JO, Devauchelle V, Martins-Carvalho C, Hutin P, Pennec YL, et al. Identification of transitional type II B cells in the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum 2006;54:2280–8.
[28] Guerrier T, Le Pottier L, Devauchelle V, Pers JO, Jamin C, Youinou P. Role of toll-like receptors in primary Sjogren's syndrome with a special emphasis on B-cell maturation within exocrine tissues. J Autoimmun; 2012. doi:10.1016/j.jaut.2012.01.016.
[29] Le Pottier L, Devauchelle V, Fautrel A, Daridon C, Saraux A, Youinou P, et al. Ectopic germinal centers are rare in Sjogren's syndrome salivary glands and do not exclude autoreactive B cells. J Immunol 2009;182:3540–7.
[30] Pugh-Bernard AE, Silverman GJ, Cappione AJ, Villano ME, Ryan DH, Insel RA, et al. Regulation of inherently autoreactive VH4-34 B cells in the maintenance of human B cell tolerance. J Clin Invest 2001;108:1061–70.
[31] Cappione 3rd A, Anolik JH, Pugh-Bernard A, Barnard J, Dutcher P, Silverman G, et al. Germinal center exclusion of autoreactive B cells is defective in human systemic lupus erythematosus. J Clin Invest 2005;115:3205–16.
[32] Mageed RA, MacKenzie LE, Stevenson FK, Yuksel B, Shokri F, Maziak BR, et al. Selective expression of a VHIV subfamily of immunoglobulin genes in human CD5+ B lymphocytes from cord blood. J Exp Med 1991;174: 109–13.
[33] Deane M, Mackenzie LE, Stevenson FK, Youinou PY, Lydyard PM, Mageed RA. The genetic basis of human VH4 gene family-associated cross-reactive idiotype expression in CD5+ and CD5- cord blood B-lymphocyte clones. Scand J Immunol 1993;38:348–58.
[34] Palanichamy A, Barnard J, Zheng B, Owen T, Quach T, Wei C, et al. Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy. J Immunol 2009;182:5982–93.
[35] Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. Blood 2005; 105:4390–8.
[36] Gantner F, Hermann P, Nakashima K, Matsukawa S, Sakai K, Bacon KB. CD40-dependent and -independent activation of human tonsil B cells by CpG oligodeoxynucleotides. Eur J Immunol 2003;33:1576–85.
[37] Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A. A role for toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. Blood 2003;101:4500–4.
[38] Papadimitraki ED, Choulaki C, Koutala E, Bertsias G, Tsatsanis C, Gergianaki I, et al. Expansion of toll-like receptor 9-expressing B cells in active systemic lupus erythematosus: implications for the induction and maintenance of the autoimmune process. Arthritis Rheum 2006;54:3601–11.
[39] Bekeredjian-Ding IB, Wagner M, Hornung V, Giese T, Schnurr M, Endres S, et al. Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN. J Immunol 2005;174:4043–50.
[40] Bekeredjian-Ding I, Inamura S, Giese T, Moll H, Endres S, Sing A, et al. Staphylococcus aureus protein A triggers T cell-independent B cell proliferation by sensitizing B cells for TLR2 ligands. J Immunol 2007;178:2803–12.
[41] Lanzavecchia A, Sallusto F. Toll-like receptors and innate immunity in B-cell activation and antibody responses. Curr Opin Immunol 2007;19:268–74.
[42] Bourke E, Bosisio D, Golay J, Polentarutti N, Mantovani A. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. Blood 2003;102:956–63.
[43] Ueda Y, Liao D, Yang K, Patel A, Kelsoe G. T-independent activation-induced cytidine deaminase expression, class-switch recombination, and antibody production by immature/transitional 1 B cells. J Immunol 2007;178: 3593–601.
[44] Zeng D, Lee MK, Tung J, Brendolan A, Strober S. Cutting edge: a role for CD1 in the pathogenesis of lupus in NZB/NZW mice. J Immunol 2000;164:5000–4.
[45] Nijnik A, Ferry H, Lewis G, Rapsomaniki E, Leung JC, Daser A, et al. Spontaneous B cell hyperactivity in autoimmune-prone MRL mice. Int Immunol 2006;18:1127–37.
[46] Teng Y, Takahashi Y, Yamada M, Kurosu T, Koyama T, Miura O, et al. IRF4 negatively regulates proliferation of germinal center B cell-derived Burkitt's lymphoma cell lines and induces differentiation toward plasma cells. Eur J Cell Biol 2007;86:581–9.
[47] Saito T, Chiba S, Ichikawa M, Kunisato A, Asai T, Shimizu K, et al. Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. Immunity 2003;18:675–85.
[48] Genestier L, Taillardet M, Mondiere P, Gheit H, Bella C, Defrance T. TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. J Immunol 2007;178: 7779–86.
[49] von Bernuth H, Picard C, Jin Z, Pankla R, Xiao H, Ku CL, et al. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. Science 2008;321:691–6.
[50] Ehlers M, Fukuyama H, McGaha TL, Aderem A, Ravetch JV. TLR9/MyD88 signaling is required for class switching to pathogenic IgG2a and 2b autoantibodies in SLE. J Exp Med 2006;203:553–61.
[51] Lartigue A, Courville P, Auquit I, Francois A, Arnoult C, Tron F, et al. Role of TLR9 in anti-nucleosome and anti-DNA antibody production in lpr mutation-induced murine lupus. J Immunol 2006;177:1349–54.
[52] Christensen SR, Shlomchik MJ. Regulation of lupus-related autoantibody production and clinical disease by Toll-like receptors. Semin Immunol 2007; 19:11–23.
[53] Perl A. Emerging new pathways of pathogenesis and targets for treatment in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. Curr Opin Rheumatol 2009;21:443–7.
[54] Seite JF, Guerrier T, Cornec D, Jamin C, Youinou P, Hillion S. TLR9 responses of B cells are repressed by intravenous immunoglobulin through the recruitment of phosphatase. J Autoimmun 2011;37:190–7.
[55] Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S, Bayry J. The antiinflammatory IgG. N Engl J Med 2008;359:307–9.
[56] Moutsopoulos HM. A lifetime in autoimmunity. J Autoimmun 2010;35:171–5.
[57] Miyagawa F, Gutermuth J, Zhang H, Katz SI. The use of mouse models to better understand mechanisms of autoimmunity and tolerance. J Autoimmun 2010; 35:192–8.
[58] Manoussakis MN, Kapsogeorgou EK. The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. J Autoimmun 2010;35:219–24.
[59] Tsuda M, Torgerson TR, Selmi C, Gambineri E, Carneiro-Sampaio M, Mannurita SC, et al. The spectrum of autoantibodies in IPEX syndrome is broad and includes antimitochondrial autoantibodies. J Autoimmun 2010;35: 265–8.
[60] Gershwin ME, Shoenfeld Y. Chella David: a lifetime contribution in translational immunology. J Autoimmun 2011;37:59–62.
[61] Behrens M, Smart M, Luckey D, Luthra H, Taneja V. To B or not to B: role of B cells in pathogenesis of arthritis in HLA transgenic mice. J Autoimmun 2011; 37:95–103.

Please cite this article in press as: Guerrier T, et al., TLR9 drives the development of transitional B cells towards the marginal zone pathway and promotes autoimmunity, Journal of Autoimmunity (2012), doi:10.1016/j.jaut.2012.05.012

Article n°3

Polarization of B effector cells in Sjögren's syndrome

Autoimmunity Reviews, 2007

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Autoimmunity Reviews 6 (2007) 427–431
AUTOIMMUNITY REVIEWS
www.elsevier.com/locate/autrev

Polarization of B effector cells in Sjögren's syndrome ☆

Capucine Daridon, Thomas Guerrier, Valérie Devauchelle, Alain Saraux, Jacques-Olivier Pers, Pierre Youinou *

Laboratory of Immunology, Brest University Medical School Hospital, Brest, France
Unit of Rheumatology, Brest University Medical School Hospital, Brest, France

Received 3 November 2006; accepted 13 January 2007
Available online 8 February 2007

Abstract

Analysis of salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome has yielded conflicting results with respect to T helper (Th)1/Th2 polarization. This balance might parallel the progress of the local lesions. B-cells are now taking center stage in this disease. They can also be primed to differentiate into two cytokine-production pathways, dubbed B effector (Be) 1 and Be2 cells. This is discussed in the light of our recent finding that Be1 accompany Th1, while Be2 accompany in the tissue lesions.
© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cytokine; Sjögren's syndrome; B-lymphocyte

Contents

1. Polarized effector Th1 and Th2 cells . . . 428
   1.1. Definitions . . . 428
   1.2. Regulatory circuits . . . 428
   1.3. T-cell polarization and autoimmunity . . . 428
2. Production of cytokines by B-cells . . . 429
   2.1. Definitions . . . 429
   2.2. Regulatory circuits . . . 429
   2.3. B-cell polarization and autoimmunity . . . 430
3. Sjögren's syndrome as an example . . . 430
   3.1. Th1/Th2 cell subset distribution . . . 430
   3.2. Be1/Be2 cell subset distribution . . . 430
Take-home messages . . . 430
Acknowledgement . . . 430
References . . . 431

☆ The works mentioned in this review paper were supported by grants from the Association Française du Gougerot-Sjögren et autres syndromes secs, and from the Institut Français pour la Recherche Odontologique.
* Corresponding author. Laboratory of Immunology, Brest University Medical School Hospital, BP 824, F29609 Brest Cedex, France. Tel.: +33 298 22 33 84; fax: +33 298 22 38 47.
E-mail address: Youinou@univ-brest.fr (P. Youinou).

1568-9972/$ - see front matter © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.autrev.2007.01.010

Primary Sjögren's syndrome (SS) is an autoimmune exocrinopathy affecting lacrimal and salivary glands (SG), and causing xerophtalmia and xerostomia [1]. Features of the significance of T-lymphocytes are so suggestive that these cells have been viewed as competent in their own right, with B-lymphocytes confined to antibody (Ab) production. Owing to their wide range of proinflammatory properties, cytokines have been inserted into the framework of primary SS as a T-cell disease. However, their expression at the messenger RNA (mRNA) level in the SG and in terms of protein in the peripheral blood (PB) has yielded conflicting results.

A host of recently-published data has also unraveled new insights into the biology of B-cells, so that it is now believed that their part is more important than originally thought in the play [2]. The ever-growing variety of B-cell subsets raises the issue as to which of these subsets underpins the autoimmune traits in SS [3]. Meanwhile, particular emphasis has been placed on the cytokines generated by B-cells [4]. These are likely to serve as effectors of some B-cell functions, as numerous autocrine and paracrine effects of B-cell-derived cytokines on B-cells have been described. They can solicit their own help from T-cells [5], and even influence the outcome of T-cell responses. For example, they are required for T-cell activation in rheumatoid synovium [6] and T-cell-mediated damages in insulin-dependent diabetes mellitus [7].

Thus, the coordinated release of cytokines in primary SS deserves consideration. Rituximab treatment with anti-CD20 Ab has proved effective in depleting B-cells from the PB [8] and the SG [9], and brought up the following issue: is the production of cytokines by T-cells orchestrated by B-cell-derived cytokines in primary SS?

1. Polarized effector Th1 and Th2 cells

1.1. Definitions

The T helper (Th)1/Th2 paradigm rests on discrete cytokine profiles [10]. These two subpopulations develop from a non-committed population of naïve CD4+ T-cells. Once positioned in the Th1 pathway, these cells make, among others, interferon (IFN)-γ and interleukin (IL)-2, evoke delayed-type hypersensitivity and, in the mouse, favor class-switch recombination to IgG2a. On the other hand, Th2 cells hallmarked, among others, by IL-4 and IL-6, drive B-cell-mediated responses and, in the mouse, increase the production of IgG1 and IgE [11]. Most of these differences have, however, been gleaned from early studies that relied on mouse models and cultured cells.

1.2. Regulatory circuits

Either CD4+ T-cell subpopulation down-regulates the other through antagonistic activities of respective cytokines. The current model posits that IL-12 secretion by macrophages and dendritic cells induces differentiation of Th1 effector cells, whereas IL-4 promotes the development of Th2 effector cells. This can be T-cell-derived or released by CD4+ Natural Killer-like cells or basophiles.

In fact, the interplay of IL-12 with IFN-γ and IL-27 activates a number of transcription factors (TF). Insertion of IFN-γ into its receptor on naïve T-cells triggers the recruitment of the signal-transducer and activator of transcription (STAT)-1, which up-regulates the expression of T-bet, a recently-described member of the T-box family of TF [12]. Likewise, activation of naïve T-cells by STAT-1 *via* IL-27 regulates T-bet expression. This induces IFN-γ gene transcription and augments the expression of the IL-12 receptor β2 subunit, rendering T-cells fully responsive to IL-12. In turn, IL-12 recruits and translocates STAT-4 to the nucleus where IFN-γ gene transcription is encouraged.

A symmetrical model has been put forth: GATA-3 and IL-6 are other TF that induces polarization of naïve T-cells into the Th2 pathway [13]. T-bet/GATA-3 ratio has thus been proposed as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations [14]. Recent experiments have, however, challenged this simplistic dichotomy [15]. CD4+ T-cells from T-bet−/− mice are skewed toward Th2 differentiation by high endogenous GATA-3 levels. Furthermore, these mice exhibit normal Th1 differentiation, provided GATA-3 levels are reduced at on early stage by anti-IL-4 Ab blockade. Hence, T-bet proceeds by down-regulating GATA-3, rather than by up-regulating IFN-γ. Conversely [16], GATA-3 might dampen down STAT-4, and not-IL-12 receptor β2 chain or T-bet, and thereby suppress Th1 development.

1.3. T-cell polarization and autoimmunity

The lineage commitment is of crucial importance with respect to susceptibility to these disorders. Th1 responses have long been associated with nonorgan-specific autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis. One step further, a growing literature accumulates evidence for pathogenic roles of T-bet in autoimmunity. In contrast, Th2 cells might predominate in systemic lupus erythematosus (SLE). For example, T-bet is essential for the progression of some of autoimmune states, such as experimental autoimmune encephalomyelitis [17], so that

it could be a therapeutic target in autoimmune disease [18].

2. Production of cytokines by B-cells

2.1. Definitions

A number of cytokines are produced by activated B-cells. These include proinflammatory molecules, (*viz* IL-1, IL-6, tumor necrosis factor and lymphotoxin-α), hematopoietic growth factors [*viz* granulocyte-colony stimulating factor (CSF), granulocyte-macrophage-CSF, macrophage-CSF and IL-7], and immunosuppressive cytokines (*viz* transforming growth factor β1 and IL-10). There is, however, a need for an accurate dissection of cytokine production by B-cell subpopulations [4].

B-cells can also be primed to differentiate into two cytokine-secreting B-cell subsets after culture with antigen (Ag) and effector T-cells [19]. These newly-polarized B-cells have been dubbed B effector (Be)1 whose signature is IFN-γ and IL-2 in the presence of Th1 cells, and Be2 whose signature is IL-4 and IL-6 in the presence of Th2 cells. In fact, this Th1 phenotype may have been imprinted by Be1 cells, while the Th2 phenotype may have been directed by Be2 cells. Thus, activated Th cells modulate the B-cell response, and vice-versa, in the course of cognate T-cell/B-cell contacts.

2.2. Regulatory circuits

B-lymphocytes derived cytokines affect the function of these cells through autocrine and paracrine networks. Cells of each pathway may thus release cytokines that serve as their own growth factors, in a sort of feed-forward loop.

Similar factors that influence the differentiation of naïve T-cells into IFN-γ-producing Th1 cells have been

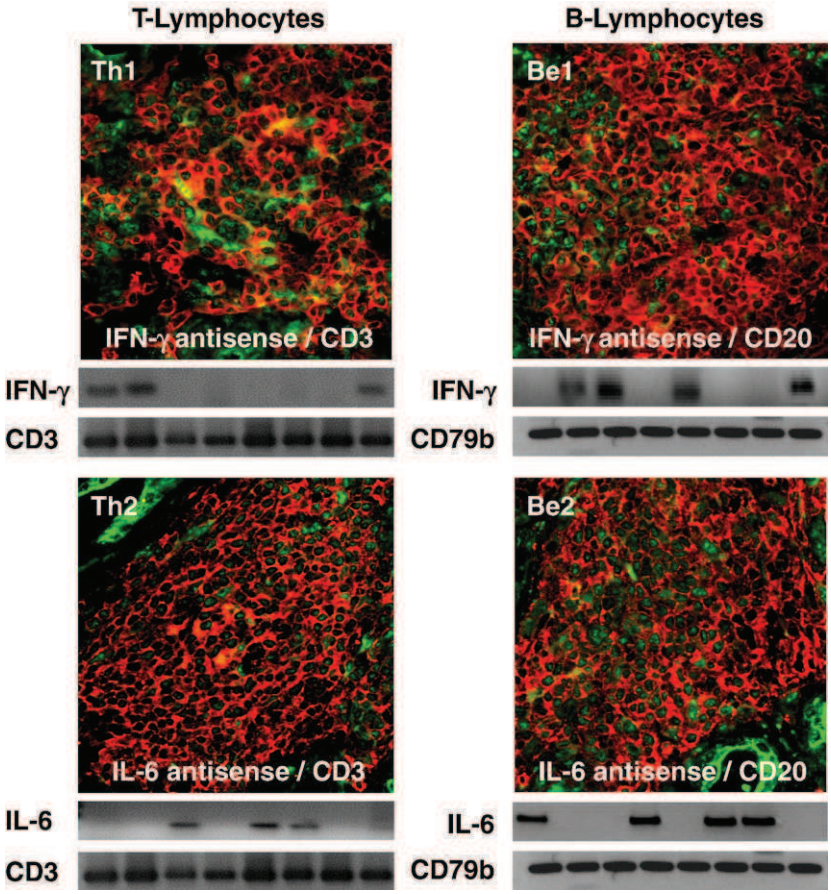

Fig. 1. B effector (Be)1 and Be2 are present in the salivary glands (SG) of patients with primary Sjögren's syndrome. The transcripts for interferon (IFN)-γ and for interleukin (IL)-6 were visualized by *in situ* hybridization, while CD3 and CD19 were identified by indirect immunofluorescence. Reverse transcriptase–polymerase chain reactions of these hallmark cytokines were coupled with CD3 and CD79 for T-lymphocytes and B-lymphocytes, respectively in single cells eluted from the SG.

reported to induce B-cells to secrete IFN-γ [20], though activation of STAT-4, of which the phosphorylation may be triggered by IL-12 [20]. The cytokine environment in which B-cells are to be primed is crucial. Th1 have long been regarded as a requirement to initiate IFN-γ production by developing Be1 lymphocytes, but the latter cells can act as Ag-presenting cells and provide all the signals for Th1 differentiation from naïve T-cells, including the Ag [21]. This depends on T-bet, but occurs in the absence of STAT-1 through to IL-12 pathway. Interactions between CD154 on Th1 cells and CD40 on B-cells are not required for Be1 differentiation, because inclusion of CD154-blocking Ab in co-cultures of T-and B-cells has no impact of the development of Be1 cells. In return [22] the development of IL-4 producing Be2 cells is controlled by IL-4, IL-4 receptor α and Th2 cells. This is instrumental, in view of the production of IL-4 by germinal center B-cells [23], that might direct T-cells to the Th2 pathway.

2.3. B-cell polarization and autoimmunity

There is all likelihood that Be1 cells accompany Th1 cells infiltrating the target organs of some autoimmune diseases. The same holds true for Th2 and Be2 cells. There is only one study of the distribution of circulating B-cells in SLE [24]. This appeared to be absolutely normal.

3. Sjögren's syndrome as an example

3.1. Th1/Th2 cell subset distribution

Expression on type-1 and type-2 cytokines at the mRNA level in the SG, or in terms of protein products levels in the PB has yielded conflicting results in primary SS. There have been claims for Th1 polarization using *in situ* hybridization [25], and evidence has been provided for Th2 cytokines [26] using reserve transcriptase (RT) polymerase chain reactions (PCR). Such discrepancies might be assigned to differences in the severity of the disease [27]. Lymphocytes infiltrating the SG are capable of secreting both Th1 and Th2 cytokines, and the balance between them shifts in favor of Th1 with high infiltration score. This observation has been recently confirmed through IFN-γ and IL-4 gene polymorphisms [28].

3.2. Be1/Be2 cell subset distribution

Several studies have examined B-cell cytokine synthesis in primary SS. These are essential in autoAb production. IL-6 which stimulates the final stages of B-lymphocyte maturation and abounds in autoimmune states, such as SLE [29] and primary SS [30], is an appealing candidate. Given the constitutive expression of its receptors, IL-6 could be involved in autocrine loops, and thereby part of dysregulation of the B-cell activity could well be independent of T-cells.

Interestingly, distinct profiles of primary SS patients with ectopic GC have been revealed by higher levels of IL-4 and other Be2 cytokines, compared with those patients without ectopic GC [31]. Do Be1 and Be2 cells regulate the autoimmune response in the SG of patients with primary SS? As an attempt to address this issue [32], we have analyzed tissue sections by *in situ* hybridization (Fig. 1). Transcripts for IFN-γ were the clue for Th1 and Be1 cells, and transcripts for IL-6 that for Th2 and Be2 cells. The lineage of these lymphocytes was identified using anti-CD3 or anti-CD19 Abs. The presence of Be1 and Be2 cells was associated with Th1 and Th2, respectively. This finding was confirmed by RT-PCR of single-cell preparations of B- and T-lymphocytes eluted from the SG. Thus Be1 and Be2 cells may serve as initiators of T-cell polarization. IL-6-producing Be2 cells should populate the GC which are present in the SG.

Aberrant polarization of B-cells may have implications for therapeutic intervention. B-cell ablative treatments have proved effective in primary SS. However, there is still a long way to go before targeting specifically Be1 or Be2 cells in autoimmune diseases.

Take-home messages

- Interleukin — IL)-12 induces differentiation of T helper (Th) cells into Th1, and IL-4 favors the Th2 pathway.
- A symmetrical model has been put forth with T-bet as a transcription factor (TF) for Th1 and GATA-3 as a TF for Th2.
- B-cells can also differentiate into Th1-like B effector (Be) 1 cells or into Th2-like Be2 cells.
- Primary Sjögren's syndrome (SS) seems to be a Th1-cell disease.
- Be1 and Be2 cells have been identified in the salivary glands of patients with primary SS.
- Aberrant polarization of B-cells may have implications for therapeutic intervention.

Acknowledgement

We gratefully acknowledge Simone Forest for excellent secretarial assistance.

References

[1] Tzioufas AT, Youinou P, Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome. In: Maddison PJ, Isenberg DA, Woo P, Glass DN, editors. Oxford Textbook of Rheumatology, vol 2. Oxford: Oxford Medical Publications; 1998. p. 1301–17.

[2] Youinou P, Daridon C, Steinfeld S, Pers JO. A case for B-cells in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. Trends Immunol in press.

[3] Le Pottier L, Devauchelle V, Pers JO, Jamin C, Dueymes M, Youinou P. The mosaic of B-cell subsets (with special emphasis on primary Sjögren's syndrome). Autoimmun Rev 2007;6: 149–54.

[4] Pistoia V. Production of cytokines by human B cells in health and disease. Immunol Today 1997;18:343–50.

[5] Stockinger B, Zal T, Zal A, Gray D. B cells solicit their own help from T cells. J Exp Med 1996;183:891–9.

[6] Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, Goronzy JJ, Weyand CM. T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. J Immunol 2001;167:4710–8.

[7] Falcone M, Lee J, Patstone G, Yeung B, Sarvetnick N. B lymphocytes are crucial antigen-presenting cells in the pathogenic autoimmune response to GAD65 antigen in nonobese diabetic mice. J Immunol 1998;161:1163–8.

[8] Pijpe J, van Imhoff GW, Spijkervet FK, Roodenburg JL, Wolbink GJ, Mansour K, et al. Rituximab treatment in patients with primary Sjogren's syndrome: an open-label phase II study. Arthritis Rheum 2005;52:2740–50.

[9] Devauchelle V, Pennec Y, Morvan J, Pers JO, Daridon C, Jousse S, et al. Improvement of Sjögren's syndrome after two infusions of rituximab. Arthritis Care Res in press.

[10] Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). Ann Allergy Asthma Immunol 2000;85:9–18.

[11] Peng SL, Szabo SJ, Glimcher LH. T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:5545–50.

[12] Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. Cell 2000;100:655–69.

[13] Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. Cell 1997;89:587–96.

[14] Chakir H, Wang H, Lefebvre DE, Webb J, Scott FW. T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3. J Immunol Methods 2003;278:157–69.

[15] Usui T, Preiss JC, Kanno Y, Yao ZJ, Bream JH, O'Shea JJ, et al. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. J Exp Med 2006;203:755–66.

[16] Usui T, Nishikomori R, Kitani A, Strober W. GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. Immunity 2003;18:415–28.

[17] Nath N, Prasad R, Giri S, Singh AK, Singh I. T-bet is essential for the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. Immunology 2006;118:384–91.

[18] Weigmann B, Neurath MF. T-bet as a possible therapeutic target in autoimmune disease. Expert Opin Ther Targets 2002;6:619–22.

[19] Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T-cells. Nat Immunol 2000;1:475–82.

[20] Durali D, de Goer de Herve MG, Giron-Michel J, Azzarone B, Delfraissy JF, Taoufik Y. In human B cells, IL-12 triggers a cascade of molecular events similar to Th1 commitment. Blood 2003;102:4084–9.

[21] Harris DP, Goodrich S, Gerth AJ, Peng SL, Lund FE. Regulation of IFN-gamma production by B effector 1 cells: essential roles for T-bet and the IFN-gamma receptor. J Immunol 2005;174:6781–90.

[22] Harris DP, Goodrich S, Mohrs K, Mohrs M, Lund FE. Cutting edge: the development of IL-4-producing B-cells (B effector 2 cells) is controlled by IL-4, IL-4 receptor alpha, and Th2 cells. J Immunol 2005;175:7103–7.

[23] Johansson-Lindbom B, Borrebaeck CA. Germinal center B-cells constitute a predominant physiological source of IL-4: implication for Th2 development in vivo. J Immunol 2002;168:3165–72.

[24] Amel Kashipaz MR, Huggins ML, Lanyon P, Robins A, Powell RJ, Todd I. Assessment of Be1 and Be2 cells in systemic lupus erythematosus indicates elevated interleukin-10 producing CD5+ B cells. Lupus 2003;12:356–63.

[25] Boumba D, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Cytokine mRNA expression in the labial salivary gland tissues from patients with primary Sjogren's syndrome. Br J Rheumatol 1995;34:326–33.

[26] Ohyama Y, Nakamura S, Matsuzaki G, Shinohara M, Hiroki A, Fujimura T, et al. Cytokine messenger RNA expression in the labial salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum 1996;39:1376–84.

[27] Mitsias DI, Tzioufas AG, Veiopoulou C, Zintzaras E, Tassios IK, Kogopoulou O, et al. The Th1/Th2 cytokine balance changes with the progress of the immunopathological lesion of Sjogren's syndrome. Clin Exp Immunol 2002;128:562–8.

[28] Pertovaara M, Antonen J, Hurme M. Th2 cytokine genotypes are associated with a milder form of primary Sjogren's syndrome. Ann Rheum Dis 2006;65:666–70.

[29] Cross JT, Benton HP. The roles of interleukin-6 and interleukin-10 in B cell hyperactivity in systemic lupus erythematosus. Inflamm Res 1999;48:255–61.

[30] Szodoray P, Alex P, Jonsson MV, Knowlton N, Dozmorov I, Nakken B, et al. Distinct profiles of Sjogren's syndrome patients with ectopic salivary gland germinal centers revealed by serum cytokines and BAFF. Clin Immunol 2005;117:168–76.

[31] 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.

[32] Youinou P, Daridon C, Saraux A, Devauchelle V, Pers JO. Is B-cell the conductor of the lymphocyte orchestra in the salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome? Clin Exp Rheumatol 2006;24:491–2.

Article n°4

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

Autoimmunity Reviews, 2012

ARTICLE IN PRESS
AUTREV-01158; No of Pages 7

Autoimmunity Reviews xxx (2011) xxx–xxx

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Autoimmunity Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/autrev

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

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

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

ARTICLE INFO

Available online xxxx

Keywords:
Sjögren's syndrome
B lymphocyte
Apoptosis
Epithelial cells

ABSTRACT

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

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction . . . 0
2. Material and methods . . . 0
2.1. Cell preparations . . . 0
2.2. Co-culture of B- and T-lymphocytes with HSG cells . . . 0
2.3. Stimulation of HSG cells . . . 0
2.4. Immunofluorescence staining for PKCδ location . . . 0
2.5. Subcellular proteome extraction . . . 0
2.6. Immunofluorescence staining of SGs . . . 0
2.7. Statistical analysis . . . 0
3. Results . . . 0
3.1. Apoptosis of HSG cells in the presence of B and T lymphocytes . . . 0
3.2. B lymphocyte-induced apoptosis of HSG cells is not mediated by Fas/FasL . . . 0
3.3. B lymphocyte-induced apoptosis of HSG cells implies translocation of PKCδ location into the nucleus . . . 0
3.4. Nucleus translocation of PKCδ induces H2B phosphorylation . . . 0
3.5. PKCδ in the nucleus of those ECs which are surrounded by B lymphocytes . . . 0
4. Discussion . . . 0
Take-home messages . . . 0
Acknowledgments . . . 0
References . . . 0

1. Introduction

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

* Corresponding author at: Laboratory of Immunology, Brest University Medical School Hospital, BP824, F-29609, Brest, France. Tel.: +33 298 22 33 84; fax: +33 298 22 38 47.
E-mail address: youinou@univ-brest.fr (P. Youinou).

1568-9972/$ – see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.autrev.2011.10.005

Please cite this article as: Varin M-M, et al, In Sjögren's syndrome, B lymphocytes induce epithelial cells of salivary glands into apoptosis through protein kinase C delta activation, Autoimmun Rev (2011), doi:10.1016/j.autrev.2011.10.005

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

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

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

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

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

2. Material and methods

2.1. Cell preparations

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

Tonsils were collected from five children undergoing routine tonsillectomy, and their mononuclear cells isolated by a 30-minute 1800-rpm centrifugation on Ficoll Hypaque (PAA, Pasching, Austria). These were then incubated with neuraminidase-treated sheep red blood cells for 90 min at 4 °C, layered onto Ficoll-Hypaque and centrifuged for another 30 min at 1800 rpm. B and T lymphocytes were isolated from sheep red blood cells using ACK solution, and T lymphocytes further-purified using the Easy-Sep human T lymphocyte enrichment kit (StemCell Technologies, Grenoble, France).

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

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

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

2.3. Stimulation of HSG cells

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

2.4. Immunofluorescence staining for PKCδ location

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

2.5. Subcellular proteome extraction

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

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

Please cite this article as: Varin M-M, et al, In Sjögren's syndrome, B lymphocytes induce epithelial cells of salivary glands into apoptosis through protein kinase C delta activation, Autoimmun Rev (2011), doi:10.1016/j.autrev.2011.10.005

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

2.6. Immunofluorescence staining of SGs

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

2.7. Statistical analysis

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

3. Results

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

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

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

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

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

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

3.4. Nucleus translocation of PKCδ induces H2B phosphorylation

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

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

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

4. Discussion

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

Please cite this article as: Varin M-M, et al, In Sjögren's syndrome, B lymphocytes induce epithelial cells of salivary glands into apoptosis through protein kinase C delta activation, Autoimmun Rev (2011), doi:10.1016/j.autrev.2011.10.005

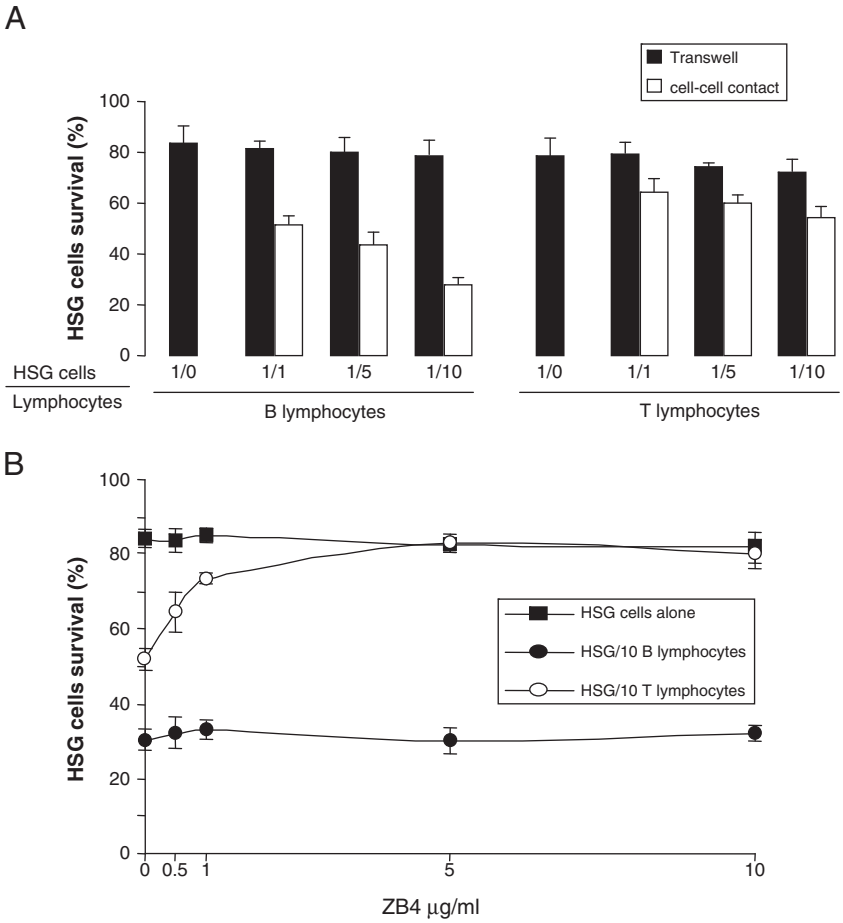

Fig. 1. B lymphocyte-induced apoptosis of epithelial cells from human salivary glands (HSGs) is not mediated by Fas–FasL interactions A — HSG cells and purified B or T lymphocytes from five tonsils were co-cultured for 24 h at different ratios: 1 HSG cell for 0, 1, 5 or 10 B or T lymphocytes. Apoptosis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

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

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

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

Furthermore, B lymphocytes act as APCs [28], behave as autophagic cells to bridge the gap between innate and adaptive responses [29] and regulate the formation of germinal centers (GCs) via the production of lymphotoxins [30]. In the SGs of patients with SS, they settle as aggregates and conventional GCs that do not exclude autoreactive B lymphocytes [31]. As a consequence, these cells hold promise as the therapeutic targets.

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

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

Please cite this article as: Varin M-M, et al, In Sjögren's syndrome, B lymphocytes induce epithelial cells of salivary glands into apoptosis through protein kinase C delta activation, Autoimmun Rev (2011), doi:10.1016/j.autrev.2011.10.005

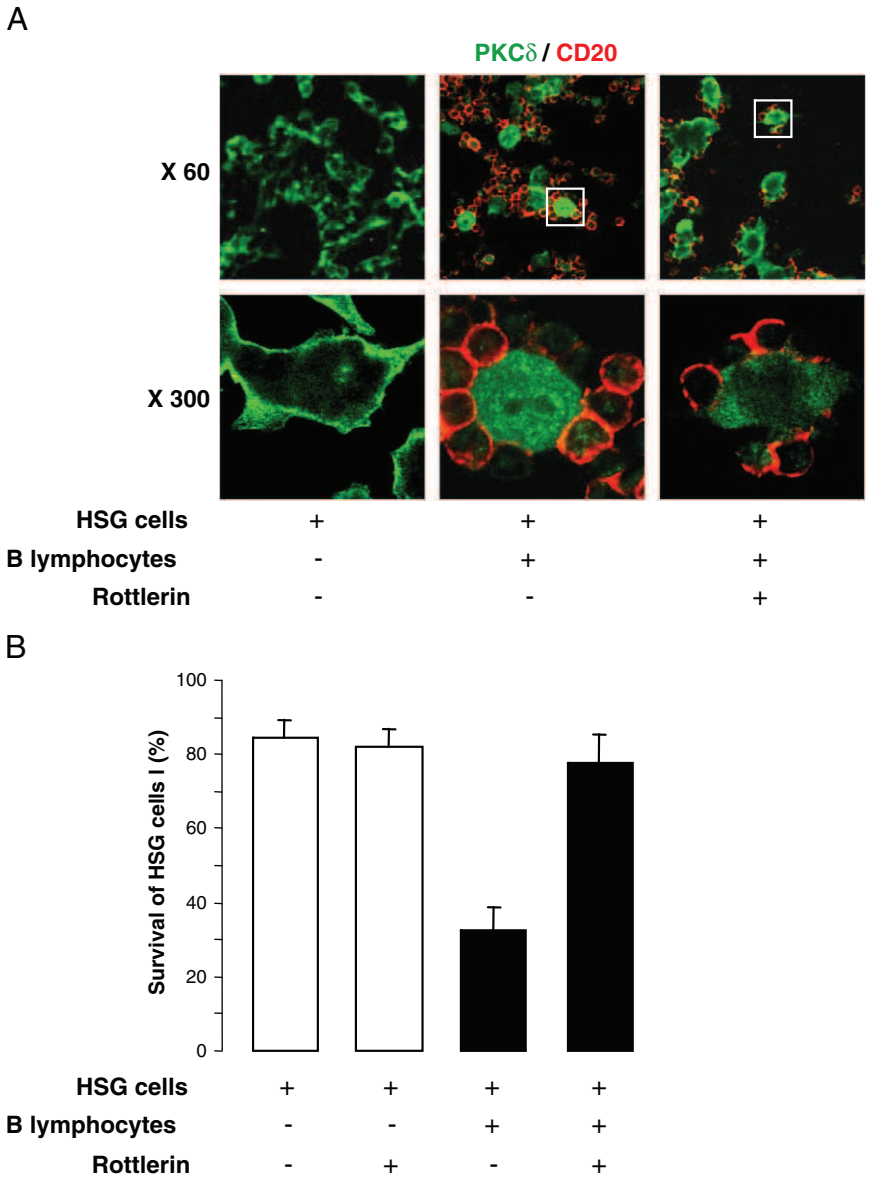

Fig. 2. B lymphocytes-initiate apoptosis of HSG cells through the translocation of PKC-δ into the nucleus. A — These cells were stained in green by FITC-anti-PKCδ mAb and B lymphocytes in red by TRITC-anti-CD20 pAb. To block translocation of PKCδ into the nucleus, HSG cells were pretreated with 50 μM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

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

Take-home messages

- The epithelial cells of exocrine glands from patients with Sjögren's syndrome are induced into apoptosis by B lymphocytes.
- The results of transwell experiments indicate that cell–cell contacts are absolutely necessary to reproduce this damage.
- Intra-glandular apoptosis is not accounted for by Fas–Fas ligand interactions.
- Once translocated into the nucleus, the pyruvate kinase C delta induces phosphorylation on histones H2B.

Acknowledgments

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

References

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

Please cite this article as: Varin M-M, et al, In Sjögren's syndrome, B lymphocytes induce epithelial cells of salivary glands into apoptosis through protein kinase C delta activation, Autoimmun Rev (2011), doi:10.1016/j.autrev.2011.10.005

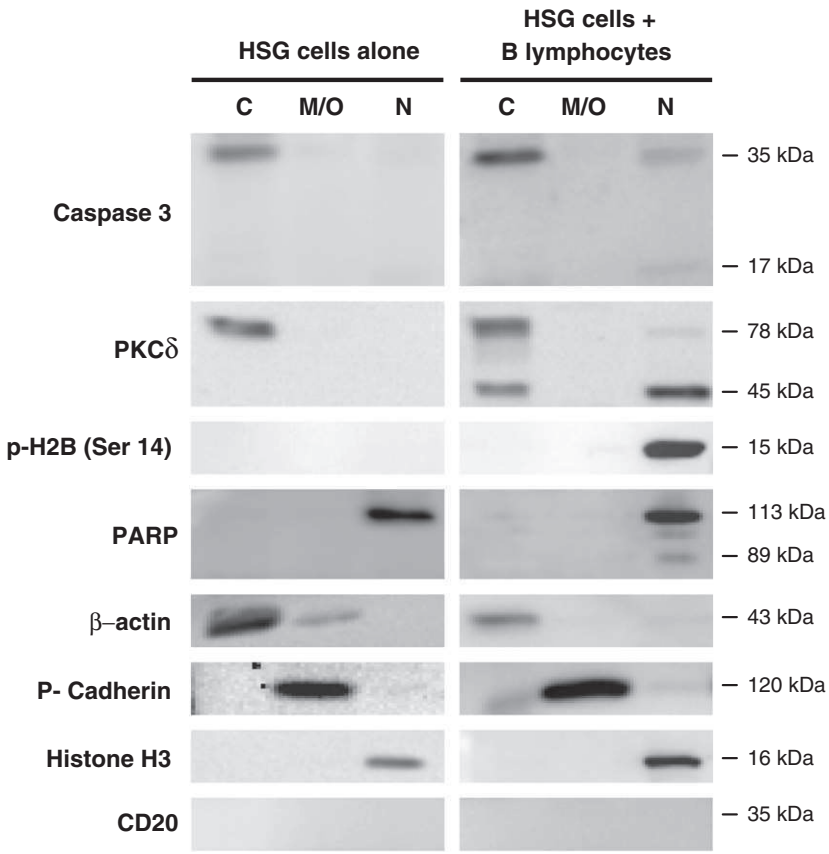

Fig. 3. PKCδ activation induces phosphorylation of histone H2B on serine 14. Subcellular fractionation of lysates from HSG cells alone or co-cultured with B lymphocytes was performed to isolate cytosol (C), membrane and organelles (M/O) and nucleus (N). Prior to lysis, HSG cells were negatively separated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

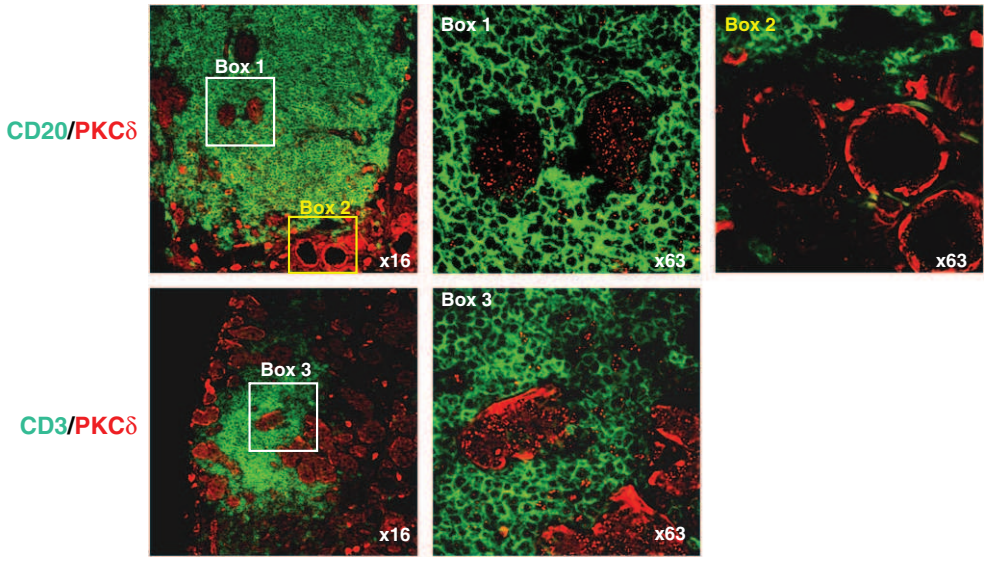

Fig. 4. PKCδ has a nuclear location in ductal epithelial cells when surrounded by B lymphocyte-infiltrates. PKCδ was stained in red, while B T lymphocytes were stained in green, using anti-CD20, and anti-CD3 mAbs, respectively. Original magnification ×16. Boxed areas at 16× magnification are shown on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

[2] Youinou P, Pers JO. The international symposium on Sjögren's syndrome in Brest: the "top of the tops" at the "tip of the tips". Autoimmun Rev 2010;9:589–90.
[3] Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome: autoimmune epithelitis. Clin Immunol Immunopathol Aug 1994;72(2):162–5.
[4] Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome. J Autoimmun 2010;34:400–7.
[5] Talal N, Bunim JJ. The development of malignant lymphoma in the course of Sjögren's syndrome. Am J Med 1964;36:529–40.
[6] Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. Annu Rev Immunol 2002;20:323–70.
[7] Youinou P, Devauchelle-Pensec V, Pers JO. Significance of B cells and B cell clonality in Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2010;62:2605–10.

Please cite this article as: Varin M-M, et al, In Sjögren's syndrome, B lymphocytes induce epithelial cells of salivary glands into apoptosis through protein kinase C delta activation, Autoimmun Rev (2011), doi:10.1016/j.autrev.2011.10.005

[8] Manganelli P, Fietta P. Apoptosis and Sjögren syndrome. Semin Arthritis Rheum 2003;33:49–65.
[9] Matsumura R, Umemiya K, Goto T, et al. IFNγ and TNFα induce Fas expression and anti-Fas-mediated apoptosis in a salivary ductal cell line. Clin Exp Rheumatol 2000;18:311–8.
[10] Matassa AA, Kalkofen RL, Carpenter L, Biden TJ, Reyland ME. Inhibition of PKC-alpha induces a PKC-delta-dependent apoptotic program in salivary epithelial cells. Cell Death Differ 2003;10:269–77.
[11] Blass M, Kronfeld I, Kazimirsky G, Blumberg PM, Brodie C. Tyrosine phosphorylation of PKCδ is essential for its apoptotic effect in response to etoposide. Mol Cell Biol 2002;22:182–95.
[12] Yoshida K. PKCδ signaling: mechanisms of DNA damage response and apoptosis. Cell Signal 2007;19:892–901.
[13] Cross T, Griffiths G, Deacon E, et al. PKCδ is an apoptotic lamin kinase. Oncogene 2000;4:2331–7.
[14] Hu Y, Liu Z, Yang SJ, Ye K. Acinus-provoked PKCδ isoform activation is essential for apoptotic chromatin condensation. Cell Death Differ 2007;14:2035–46.
[15] Ajiro K. Histone H2B phosphorylation in mammalian apoptotic cells. An association with DNA fragmentation. J Biol Chem 2000;275:439–43.
[16] Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R. European study group on classification criteria for Sjögren's syndrome. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. Ann Rheum Dis 2002;61:554–8.
[17] Daniels TE. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's syndrome. Assessment as a diagnostic criterion in 362 suspected cases. Arthritis Rheum 1984;27:147–56.
[18] Datta R, Banach D, Kojima H, et al. Activation of the CPP32 protease in apoptosis induced by 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and other DNA-damaging agents. Blood 1996;88:1936–43.
[19] Fernandez-Capetillo O, Allis CD, Nussenzweig A. Phosphorylation of histone H2B at DNA double-strand breaks. J Exp Med 2004;199:1671–7.
[20] Darmon AJ, Ley TJ, Nicholson DW, Bleackley RC. Cleavage of CPP32 by granzyme B represents a critical role for granzyme B in the induction of target cell DNA fragmentation. J Biol Chem 1996;271:21709–12.
[21] Atkinson EA, Barry M, Darmon AJ, et al. Cytotoxic T lymphocyte-assisted suicide. Caspase 3 activation is primarily the result of the direct action of granzyme B. J Biol Chem 1998;273:21261–6.
[22] Limesand KH, Barzen KA, Sanders LA, et al. Characterization of rat parotid and submandibular acinar cell apoptosis in primary culture. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2003;39:170–7.
[23] Waterman SA, Gordon TP, Rischmueller M. Inhibitory effects of muscarinic receptor autoantibodies on parasympathetic neurotransmission in Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2000;43:1647–54.
[24] Pérez P, Goicovich E, Alliende C, et al. Differential expression of matrix metalloproteinases in labial salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2000;43:2807–17.
[25] Pérez P, Kwon YJ, Alliende C, et al. Increased acinar damage of salivary glands of patients with Sjögren's syndrome is paralleled by simultaneous imbalance of matrix metalloproteinase 3/tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and matrix metalloproteinase 9/tissue inhibitor of metalloproteinases 1 ratios. Arthritis Rheum 2005;52:2751–60.
[26] Jimenez F, Aiba-Masago S, Al Hashimi I, et al. Activated caspase 3 and cleaved PARP in salivary epithelium suggest a pathogenetic mechanism for Sjögren's syndrome. Rheumatology (Oxford) 2002;41:338–42.
[27] Youinou P, Taher TE, Pers JO, Mageed RA, Renaudineau Y. B lymphocyte cytokines and rheumatic autoimmune disease. Arthritis Rheum 2009;60:1873–80.
[28] Harvey BP, Quan TE, Rudenga BJ, Roman RM, Craft J, Mamula MJ. Editing antigen presentation: antigen transfer between human B lymphocytes and macrophages mediated by class A scavenger receptors. J Immunol 2008;181:4043–51.
[29] Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. Science 2010;327:291–5.
[30] Vinuesa CG, Cook MC. The molecular basis of lymphoid architecture and B cell responses: implications for immunodeficiency and immunopathology. Curr Mol Med 2001;1:689–725.
[31] Le Pottier L, Devauchelle V, Fautrel A, et al. Ectopic germinal centers are rare in Sjogren's syndrome salivary glands and do not exclude autoreactive B cells. J Immunol 2009;182:3540–7.
[32] Saraux A. The point on the ongoing B-cell depleting trials currently in progress over the world in primary Sjögren's syndrome. Autoimmun Rev 2010 Jul;9(9):609–14.
[33] Tobón GJ, Saraux A, Pers JO, Youinou P. Emerging biotherapies for Sjögren's syndrome. Expert Opin Emerg Drugs 2010;15:269–82.
[34] Pers JO, Devauchelle V, Daridon C, et al. BAFF-modulated repopulation of B lymphocytes in the blood and salivary glands of rituximab-treated patients with Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2007;56:1464–77.
[35] Silverman GJ, Weisman S. Rituximab therapy and autoimmune disorders: prospects for anti-B cell therapy. Arthritis Rheum 2003;48:1484–92.
[36] Eisenberg R. Update on rituximab. Ann Rheum Dis 2005;64:iv55–7.
[37] Gürcan HM, Keskin DB, Stern JN, Nitzberg MA, Shekhani H, Ahmed AR. A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases. Int Immunopharmacol 2009;9:10–25.
[38] Mecklenbräuker I, Kalled SL, Leitges M, Mackay F, Tarakhovsky A. Regulation of B-cell survival by BAFF-dependent PKCδ-mediated nuclear signalling. Nature 2004;431:456–61.
[39] Varin MM, Le Pottier L, Youinou P, Saulep D, Mackay F, Pers JO. B-cell tolerance breakdown in Sjögren's syndrome: focus on BAFF. Autoimmun Rev 2010;9:604–8.
[40] Daridon C, Devauchelle V, Hutin P, et al. Aberrant expression of BAFF by B lymphocytes infiltrating the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2007;56:1134–44.

Please cite this article as: Varin M-M, et al, In Sjögren's syndrome, B lymphocytes induce epithelial cells of salivary glands into apoptosis through protein kinase C delta activation, Autoimmun Rev (2011), doi:10.1016/j.autrev.2011.10.005

Article n°5

CpG ODN enhances the efficacity of rituximab in non-Hodgkin lymphoma

Ann. N.Y. Acad. Sci., 2009

CpG ODN Enhances the Efficacy of Rituximab in Non-Hodgkin Lymphoma

Virginie Buhé, Thomas Guerrier, Pierre Youinou, Christian Berthou and Séverine Loisel

EA2216 "Immunology and Pathology" IFR148, Université de Bretagne Occidentale and Université Européenne de Bretagne, Brest, France

The anti-CD20 monoclonal antibody rituximab (RTX) has been applied to the therapy of B-cell proliferative disease, but a number of factors, such as the expression level of its target antigen, modulate its efficacy. Since unmethylated CpG-containing DNA sequences activate members of the immune systems, including B lymphocytes, their benefit to RTX treatment was determined on human lymphoma B-cell line cells. These Daudi cells expressed high endosomal level of the CpG Toll-like receptor 9, but CpG had effects neither on the viability, nor on the proliferation of the cells. In contrast, there appeared to be an increase in the expression of CD20, resulting in a higher efficiency of RTX for the killing of malignant Daudi cells.

Key words: **CpG ODN; rituximab; TLR9; lymphoma; cytotoxicity**

Introduction

The anti-CD20 chimeric monoclonal antibody (mAb) rituximab (RTX) is currently being used both alone and combined with chemotherapy to treat B-cell non-Hodgkin lymphomas (NHL).[1,2] Despite promising results in these diseases, it appeared that 50% of patients were nonresponders, and, even worse, the disease started again to progress in the remaining 50% responders.[3]

RTX-induced cytotoxicity is ascribed to several mechanisms, including complement-dependent cytotoxicity (CDC),[4] Ab-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC),[5] and increased apoptosis.[6] Consequently, there is a need for setting new strategies aimed at enhancing the efficacy of mAb treatment.

Interaction of cytidine-phosphorothioate guanine (CpG) with Toll-like receptor 9 (TLR9) participates in the innate immune response. These motifs are frequent in bacterial DNA but not in mammalian DNA. They are currently under investigation as adjuvants for therapy against infection and cancer.[7,8] CpG oligodeoxynucleotides (ODN) are synthetic DNA sequences that mimic bacterial DNA, and deliver potent immunostimulatory effects on immune cells. B cells express high levels of TLR9 and respond to bacterial DNA, as well as synthetic CpG ODN. The resulting potential of CpG ODN as therapeutic agents has been demonstrated, and clinical trials are in progress in humans.

The aim of this study was to determine *in vitro* the effects of CpG ODN 2006 on RTX efficiency on a human NHL B-cell line. Our results showed that Daudi cells expressed high endosomal levels of TLR9. Interestingly, CpG ODN 2006 had no effect on the viability and proliferation of Daudi cell line, whilst CpG ODN 2006 led to an increase in the expression of the target of RTX-based therapy resulting in a better efficiency of RTX.

Address for correspondence: Pierre Youinou, Laboratory of Immunology and Pathology, Brest University Medical School BP824, 29609 Brest, France. Voice/fax: +33298223028. youinou@univ-brest.fr

Contemporary Challenges in Autoimmunity: Ann. N.Y. Acad. Sci. 1173: 858–864 (2009).
doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04615.x © 2009 New York Academy of Sciences.

Material and Methods

CpG ODN and Antibodies

Purified, single-stranded, phosphorothioated CpG ODN 2006 (5′-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3′) containing four CpG motifs was synthesized by Sigma-Proligo. Lipopolysaccharide levels were less than 1 ng/mg in ODN, as assessed by the *Limulus* assay (Biowhittaker). In all experiments, CpG ODN 2006 was used at the concentration of 1.3 μM, and incubated 60 h.

RTX was provided by Roche Laboratory, and added to the medium for 4 h. Its working concentration (half maximal effective concentration, EC50) had previously been determined by testing a wide range of concentrations.

The other Abs used were fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-CD20 (Beckman-Coulter), FITC-anti-TLR9 (Imgenex), unlabeled anti-CD20 (Serotec), anti-β-actin (Sigma) and a polyclonal horseradish peroxydase (HRP)-conjugated goat antimouse Ab (DakoCytomation).

Cell Culture

The Daudi lymphoma cell line was purchased from the American Type Tissue Culture Collection. The cells were maintained at 3×10^5 cells/mL in RPMI 1640 (Lonza) supplemented by 20% heat-inactivated fetal calf serum (Invitrogen) and 2 mM L-glutamine (Lonza). All cultures were incubated at 37°C under a 5% CO_2 humidified atmosphere. For analysis, they were incubated in complete medium containing 20% normal human serum (NHS) heat inactivated or not. Cells were seeded 12 h before CpG ODN stimulation in 24-well culture plate at 8×10^4 cells per well.

Fluorescence-activated Cell Sorter (FACS) Analysis

Following a 60-h stimulation with CpG ODN, the cells were washed and stained with FITC-anti-CD20, FITC-anti-TLR9, or appropriate isotype controls. For intracellular TLR9 expression, the cells were permeabilized with 0.5% saponin in phosphate-buffered saline for 30 min and stained with FITC-conjugated anti-TLR9 Ab. Cell death was detected using the FITC-annexin V/propidium iodide (PI) kit, according the manufacturer's instruction (Beckman-Coulter). The number of CD20 molecules expressed on Daudi cells was determined using Qifikit, also according to the manufacturer's instruction (DakoCytomation). Then, cell suspension was analyzed by FACS on an Epics XL4 FACS machine (Beckman-Coulter).

Proliferation Assay

Cells were previously stained with 5 μM carboxyfluorescein diacetate, succimidyl ester, as recommended by the manufacturer (Molecular Probes), seeded in 24-well plate at 1×10^5 cells per well, and incubated with 1.3 μM of CpG ODN 2006. In one well, cell proliferation was inhibited by actinomycineD (Sigma) at a final concentration of 1 μM. Cells were then incubated for 5 days, and proliferation measured by FACS.

Western Blot (WB) Procedure

A number of 2×10^6 cells were incubated with 20 μL lysis buffer (1% Triton X100, 50 mM Tris HCl pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM $NaVO_4$) containing 1 mL of a protease inhibitor cocktail (Sigma) for 30 min at 4°C. Samples were centrifuged at 14,000 *g* for 30 min at 4°C. Supernatants were harvested and stored at −80°C until use. After boiling in sodium dodecyl sulphate buffer for 5 min, equal amounts of proteins were loaded per lane on a 10% polyacrylamide gel. After electrophoresis separation, proteins were transferred to a nitrocellulose sheet. After saturation with Tris Buffered Saline (TBST: 137 mM NaCl, 20 mM Tris base) containing 0.1% Tween 20 and 5% nonfat dry milk overnight at 4°C, the membrane was incubated with mouse

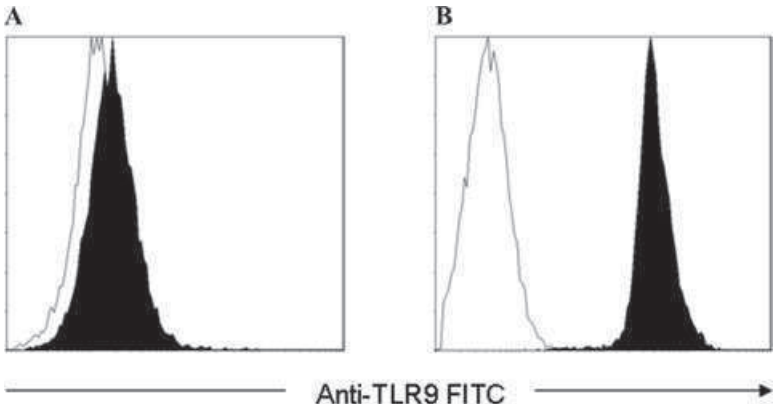

Figure 1. Expression of TLR9 in Daudi cells. Cells were incubated in medium with and without 1.3 μM CpG ODN for 60 h. (**A**) Extracellular TLR9. (**B**) Total TLR9 expression (both extracellular and intracellular expression): cells were permeabilized before staining with anti-TLR9 (black histogram) or isotype control (white histogram) antibody for 30 min at 4°C.

antihuman CD20 or mouse antihuman β-actin Abs diluted in TBST 1% nonfat dry milk at 1:40000 and 1:100, respectively, for 1 h. After three washes, the membrane was incubated for 1 h with HRP-polyclonal goat antimouse Ab diluted in TBST at 1:2000 and 1:8000, respectively for CD20 and β-actin labeling. The membrane was revealed using the enhanced chemiluminescence-plus detection kit, as recommended by the manufacturer (Amersham).

Statistical Analysis

Results were expressed as mean ± SD, and pair-wise comparisons made using the Wilcoxon test.

Results

FACS of TLR9 Expression

The receptor for bacterial DNA is TLR9. To verify if Daudi cell line cells are suitable for *in vitro* cell-based assays devised to characterize the enhancing effects of CpG ODN 2006 in combination with RTX, we measured the extra and intracellular expression of TLR9. The effect of CpG ODN on expression of its own recognition receptor in Daudi cells was then determined. In a first series of experiments, Daudi cells were incubated with and without CpG ODN. FACS was used to measure the expression of extracellular and intracellular TLR9 expression was modified following culture with CpG ODN (Fig. 1). Untreated cells showed limited surface expression of TLR9 (Fig. 1A) whereas that of endosomal level of TLR9 was elevated (Fig. 1B). TLR9 expression was not modified by CpG ODN.

CpG ODN 2006 has no Cytotoxic Effect on Daudi Cells

Given that CpG ODN induce a strong proliferation of human B cells,[9] the impact of CpG ODN 2006 on the cell survival of malignant B cells in cultured was evaluated. Cells were exposed to CpG ODN for 60 h, and apoptosis and necrosis measured with FITC-annexin V and PI. FACS analysis (Fig. 2B) ensured that CpG ODN did not favor apoptosis and necrosis rates (7.4% total cell death for untreated cells *versus* 8.7% for CpG ODN-treated cells). These results indicate that CpG ODN has no direct cytotoxic effect on Daudi cells.

To evaluate proliferation of Daudi cells in response to CpG ODN, they were labeled

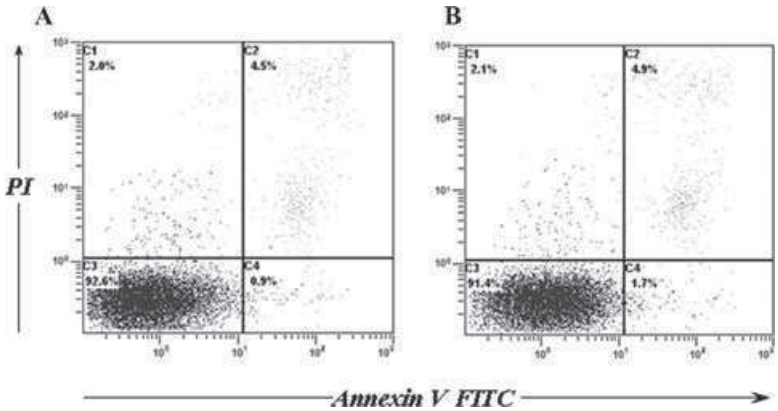

Figure 2. Effect of CpG ODN 2006 on Daudi cell death. Cells were collected 60 h after stimulation with 1.3 μM of CpG ODN. Cell death was quantified by flow cytometry after staining with annexin V FITC and propidium iodide (PI) to detect early apoptotic and necrotic cells respectively. Viable cells are Annexin V FITC $^{-}$/PI^{-}. These data are representative for untreated cells without (**A**) and with (**B**) CpG ODN 2006.

with CFSE, and cultured for 60 h in complete medium with and without CpG ODN. There was a decreasing CFSE mean fluorescence intensity of cells after CpG ODN stimulation, compared to cells blocked by actinomycin (Fig. 3). However, there were no differences with untreated cells. Thus, CFSE labeling experiments revealed an absence of CpG-induced repression of the proliferation of Daudi cells. Taken together, these results suggest that CpG ODN 2006 increases neither cell death, nor proliferation of Daudi cells.

CpG ODN 2006 Increases Surface Expression of CD20

Rather than resulting in apoptosis, ADCC and CDC mediate the lysis of tumor cells by RTX. The B cell marker CD20 served as a target for mAb therapy in different types of B-cell NHLs. It thus stands to reason that enhancing the density of CD20 on target, could improve its efficiency. We showed first that CD20 expression was increased by CpG ODN (Fig. 4A). Estimation of CD20 density on Daudi cells

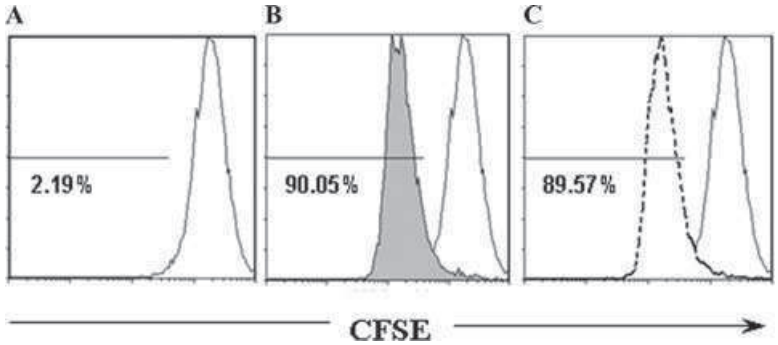

Figure 3. Effect of CpG ODN 2006 on Daudi cell proliferation. CFSE stained cells were cultured for 5 days and proliferation was analysed by flow cytometry. (**A**) Actinomycin treated cells (white histogram), (**B**) untreated cells (shaded histogram) and (**C**) CpG ODN-treated cells (white histogram, dotted line) were compared.

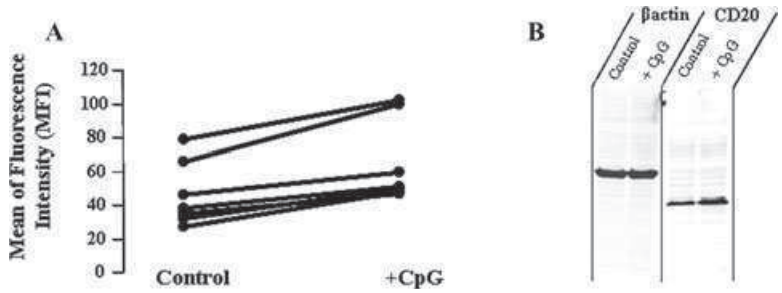

Figure 4. Modulation of the RTX target CD20 density by CpG ODN 2006. CD20 expression studied by flow cytometry (**A**) wherein cells were stained with FITC-conjugated anti-CD20, or with appropriate isotype control; and by Western blot analysis (**B**), wherein CD20 and β-actin expressions were detected by mouse anti-CD20 and anti-β-actin primary antibody, respectively and revealed by a polyclonal HRP-conjugated goat antimouse. (Control: untreated cells; +CpG: CpG ODN 2006 treated cells.)

indicates that CpG ODN stimulation induce about 34% increase in the number of of CD20 molecules, compared to untreated cells (data not shown). WB analysis confirmed that exposure to CpG ODN increased the density of CD20 (Fig. 4B).

Enhancer Effect of CpG ODN 2006 on RTX-induced Cell Death

We evaluated *in vitro* the enhancing effect of CpG ODN 2006 on RTX activity. We first tested a wide range of concentrations (0–16 μg/mL) in order to fix the EC50. Daudi cells were incubated at 8×10^4/mL 60 h with and without CpG ODN, followed by RTX for another 4 h. As evaluated by FACS, the optimal concentration of RTX to obtain EC50 was about 0.7 μg/mL (Fig. 5).

Finally, we measured the CpG ODN-induced increase in the RTX-mediated cell death. Daudi cells were incubated in culture medium containing NHS, non-heat-inactivated to preserve CDC (Fig. 6A). There was a significant increase of RTX-induced cell death by 12% ($P < 0.05$). To distinguish apoptosis from CDC, we incubated Daudi cells with CpG ODN in medium containing NHS, heat-inactivated to prevent CDC. Data showed that exposure to CpG ODN induced a significant increase of 9% of apoptosis mediated by RTX ($P < 0.05$). These results suggest that CpG ODN enhances RTX-induced direct apoptosis and not CDC.

Discussion

Studies on the enhancing effects of immunostimulatory CpG ODN on RTX activity represent a timely field of experimental and applied immunology. Our data showed that CpG ODN 2006 could enhance its efficiency in the killing of human NHL cell line cells.

Ligation of TLR heralds a danger to the immune system. Activation of tumor cells via TLR may render them more visible for innate

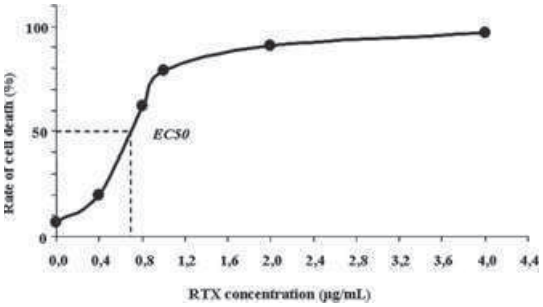

Figure 5. Dose-response curve for RTX. Daudi cells were maintained 60 h in culture and incubated an additional 4 h with a wide range of RTX concentrations. Cell death (both apoptosis and necrosis) was determined by flow cytometric analysis. Half maximal effective concentration (EC50) value determinated was 0.7 μg/mL.

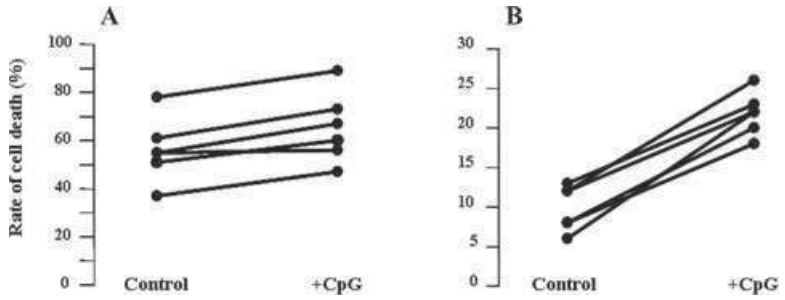

Figure 6. Modulation of RTX induced cell death by CpG ODN 2006. Daudi cells were incubated 60 h in medium containing non-heat-inactivated NHS (**A**) or heat-inactivated NHS (**B**) with (+CpG) or without (control) CpG ODN and RTX added for an additional 4 h. Cell death (both apoptosis and necrosis) was determined by flow cytometry after staining with annexin V FITC and plus propidium iodide. (Data represent six independent experiments.)

and acquired immunity. One of the 11 TLRs thus far identified in mammals, TLR9, recognizes CpG dinucleotides present in bacterial DNA, as well as synthetic CpG ODN.[10] B-cell malignancies express a limited set of TLR, including TLR9,[11] although Burkitt lymphoma cell line cells express high levels of TLR9.[12,13] In agreement with these previous results, we showed that Daudi cells endosomes contain high amounts of TLR9.

Studies had shown that CpG ODN induce activation and proliferation of human B cells,[14] so it is important to address the issue of whether malignant B-cell proliferation is induced by CpG ODN. This was not the case, as CpG ODN 2006 did not stimulate or inhibit proliferation, which would limit its clinical utility. Interestingly, it has no direct cytotoxic effects on Daudi cells.

CpG ODNs are promising molecules that could be used to activate or sustain the functions of immune cells.[15] They could increase antigen presentation by upregulating costimulatory (CD86, CD80) and activation (CD40) markers in B lymphocytes.[16] It is relevant to this issue that an increase in the expression of CD40 was induced when Daudi cells were stimulated with CpG ODN 2006 (data not shown). Importantly, we show that CpG ODN increases membrane expression of CD20. These changes induced by CpG ODN contribute to the potential of therapeutic treatment of human B-cell malignancies with mAbs.

In conclusion, our results suggest CpG ODN has potential as an effective immunotherapeutic agent in a variety of B-cell lymphomas. The mechanisms used by CpG ODN to improve RTX-induced lysis are under investigations. Such adjuvants to "conventional" biotherapies have become a burning issue.[17] The current policy is indeed to amplify the effects of known treatments.

Acknowledgments

This work was supported by "ROCHE", the "Comités 22, 29, 35 et 72 de la Ligue Nationale contre le Cancer," and the association "Céline et Stéphane," "Franck et Stéphane," "ARHOPH and INCa (Institut National du Cancer; MAb IMPACT network). Virginie Buhé was granted by Brest Métropole Océane.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Hainsworth, J.D., H.A. Burris, 3rd, L.H. Morrissey, *et al*. 2000. Rituximab monoclonal antibody as initial systemic therapy for patients with low-grade non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **95:** 3052–3056.
2. Czuczman M.S., A.J. Grillo-López, C.A. White, *et al*. 1999. Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric

anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* **17:** 268–276.
3. McLaughlin, P., A.J. Grillo-Lopez, B.K. Link, *et al*. 1998. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapse indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J. Clin. Oncol.* **16:** 2825–2833.
4. Harjunpaa, A., S. Junnikkala and S. Meri. 2000. Rituximab therapy of B-cell lymphomas: direct complement killing is superior to cellular effector mechanisms. *Scand. J. Immunol.* **51:** 634–641.
5. Reff, M.E., K. Carner, K.S. Chambers, *et al*. 1994. Depletion of B cells *in vivo* by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* **83:** 435–445.
6. Shan, D., J.A. Ledbetter & O.W. Press. 1998. Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood* **91:** 1644–1652.
7. Kanzler, H., F.J. Barrat, E.M. Hessel, *et al*. 2007. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat. Med.* **13:** 552–559.
8. Papadimitraki, E.D., G.K. Bertsias, D.T. Boumpas. 2007. Toll like receptors and autoimmunity: A critical appraisal. *J. Autoimmun.* **29:** 310–318.
9. Hartmann, G. & A.M. Krieg. 2000. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J. Immunol.* **164:** 944–953.
10. Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, *et al*. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408:** 740–745.
11. Hornung, V., S. Rothenfusser, S. Britsch, *et al*. 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1–10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* **168:** 4531–4537.
12. Bourke, E., D. Bosisio, J. Golay, *et al*. 2003. The Toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood* **102:** 956–963.
13. Henault, M., L.N. Lee, G.F., Evans, *et al*. 2005. The human Burkitt lymphoma cell line Namalwa represents a homogenous cell system characterized by high levels of Toll-like receptor 9 and activation by CpG oligonucleotides. *J. Immunol. Methods.* **300:** 93–99.
14. Hartmann, G., R.D. Weeratna, Z.K. Ballas, *et al*. 2000. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.* **164:** 1617–1624.
15. Krieg, A.M. 2006. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **5:** 471–484.
16. Hanten J.A., J.P. Vasilakos, C.L. Riter, *et al*. 2008. Comparison of human B cell activation by TLR7 and TLR9 agonists. *BMC Immunol.* **9:** 39–54.
17. Barchet W., V. Wimmenauer, M. Schlee, *et al*. 2008. Accessing the therapeutic potential of immunostimulatory nucleic acids. *Curr. Opin. Immunol.* **20:** 389–395.

Article n°6

TLR9 responses of B cells are repressed by intravenous immunoglobulin through the recruitement of phosphatase

Journal of Autoimmunity, 2011

Journal of Autoimmunity 37 (2011) 190–197

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Autoimmunity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jautimm

TLR9 responses of B cells are repressed by intravenous immunoglobulin through the recruitment of phosphatase☆

Jean-François Séité [a,b], Thomas Guerrier [a,b], Divi Cornec [a,b], Christophe Jamin [a,b], Pierre Youinou [a,b,*], Sophie Hillion [a,b]

[a] Université Européenne de Bretagne, France
[b] Brest University Medical School Hospital, Brest, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 April 2011
Received in revised form
16 May 2011
Accepted 18 May 2011

Keywords:
Intravenous immunoglobulin
B lymphocyte
TLR9
Autoimmune diseases

ABSTRACT

One way for intravenous Ig (IVIg) to affect responses of the B cells might be to operate through their TLR7 and TLR9. We confirm the ability of TLR agonists to induce CD25 expression in B cells. For this to occur, sialylated Fc-gamma of IgG included in the IVIg preparation are required. As a result, IVIg suppresses TLR-induced production of the proinflammatory IL-6, but not that of the anti-inflammatory IL-10. That is, IVIg mimics the effects of the MyD88 inhibitor. Finally, as we previously showed that IVIg induces CD22 to recruit the inhibitory SHP-1, we established that this enzyme was also involved in IVIg-induced inhibition of TLR9 signaling. This is the first report to demonstrate such a mechanism underlying the negative impact of IVIg on B lymphocytes.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Intravenous Ig (IVIg), has shown promise in the treatment of various autoimmune diseases [1–3]. This preparation of plasma-derived human IgG, modulates the responses of B lymphocytes, depending on whether these cells are activated or not. Therefore, the ensuing cellular response could vary. There is Ab production when B cells are CD40-stimulated [4], whereas apoptosis develops when they are stimulated through their B cell antigen (Ag) receptor (BCR) [5]. IVIg could interfere with B lymphocyte functions through a multitude of pathways, including the FcγR IIb [6], and through interactions [7] of sialic acid (SA) terminating polysaccharides, with lectin CD22, which is a negative regulator of B cell responses. This possibility is supported by the recent finding [8] that CD22 is involved in the TLR as well as the BCR pathways.

TLRs comprise a family of widely-expressed immune receptors of the innate and the adaptative immune systems [9]. Of the 10 different TLRs identified in humans, TLR3 binds to dsRNA, TLR7 as well as TLR8 bind to ssRNA, while TLR9 binds not only to unmethylated CpG motifs in viral and bacterial DNA, but also to synthetic non-methylated CpG-containing oligodesoxynucleotides. These ligands are collectively referred to as immunostimulatory sequences (ISS). Based on the nature of the triggering signals and aimed at ensuring homeostasis, the immune system through TLRs polarizes towards effective responses to pathogens or favors tolerance to self-components [10–12].

But inappropriate TLR signaling may also contribute to pathophysiology. Aberrant TLR3 ligation participates to the activation of programmed-cell death in salivary epithelial cells from Sjögren's syndrome patients [13]. Furthermore, TLR9 stimulation may exacerbate B cell hyperactivity, and thereby favors the synthesis of anti-dsDNA Ab in SLE [14]. In this respect, several investigators have cast TLR9 with a leading part in the play of B cell-mediated autoimmunity, following activation by self DNA [15]. A defect in MyD88, an adaptor molecule for TLR pathways, abrogates autoAb synthesis in MRL/*lpr* mice [16], whereas deficiencies in TLR7 and TLR9 inhibit the production of anti-dsDNA Abs in NZB/W mice T and attenuate nephropathy in pristine-induced lupus like mice [17]. This leaves open the question of how mammalian DNA, which is not an efficient ligand for TLR9 [18], stimulates B cells through TLR9-mediated signaling. The possibility exists that coengagement of the BCR somehow relaxes the stringency of TLR9 recognition for canonical and/or hypomethylated CpG motifs. Apoptotic chromatin may be also responsible, because, when relapsed in inflammatory context, it is enriched in hypomethylated, and hence stimulatory CpG motifs. In reality, irrespective of their sources, all these CpG-containing sequences could synergize and generate B cell hyperactivity, and

☆ Supported by the Conseil Régional de Bretagne, and by Dr Jamila Filipecki, director of CSL Behring, France.

* Corresponding author. Laboratory of Immunology, Brest University Medical School Hospital, BP824, F-29609 Brest, France. Tel.: +33 298 22 33 84; fax: +33 298 22 38 47.
E-mail address: youinou@univ-brest.fr (P. Youinou).

0896-8411/$ – see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jaut.2011.05.014

ultimately lead to autoimmune states. Thus, inhibitors of TLR9 would be valuable to understand TLR9-mediated responses, and potentially as agents to treat such autoimmune diseases [19].

TLR activation of B cells up-regulates the expression of activation markers, induces proliferation [20], cytokine secretion, terminal differentiation and finally Ig secretion. TLR expression varies from one B cell subset to another [21]. In marked contrast to TLR1 and TLR3, it is recognized that TLR7 and TLR9 are present in all B cell subpopulations. The fine-tuning of the signal mediated through TLRs in human B cells has not been totally elucidated. Several reviews have touched on this topic recently [22,23], and mentioned that two pathways downstream governed by MyD88. On the one hand, NFκB is the major transcription factor in the production of proinflammatory cytokines and the upregulation of inflammatory mediators, such as chemokine receptors. On the other hand, there is an alternative pathway that involves phosphatidyl inositol-kinase, and triggers another phosphatase-dependent cascade to regulate TLR signaling [24]. This pathway also recruits the toll-interacting protein (Tollip) [25], and the IL-1 receptor-associated kinase (IRAK)-M [26], which are both negative regulators, or censors, of the TLRs.

To gain further insight into how IVIg regulates responses of B cells, and successfully improves autoimmune diseases, we have investigated the capacity of IVIg to modulate TLR7- and TLR9-mediated activation of B cells. We present evidence that IVIg down-regulates TLR9-mediated activation in B cells. Most notably, our experiments demonstrate that IVIg reduces CD25 level expression in human B cell subpopulations, inhibits proinflammatory cytokine production, chemokine secretion, and upregulation of their receptors. Finally, we discovered that the molecular mechanism responsible for the downregulation of TLR9-mediated B cell activation by IVIg requires recruitment of SHP-1. This finding motivates further investigations into how IVIg reacts with phosphatases. Whether such strategy could be promoted in the treatment of autoimmune diseases remains to be determined.

1. Materials and methods

1.1. Preparation of B cells and culture

MNCs were prepared from tonsils or peripheral blood by Ficoll-Hypaque centrifugation. T-cells were rosetted, and the resultant B cell-enriched suspensions were recovered. Their purity was confirmed by FACS analysis, using fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD19 and PE-conjugated anti-CD5 mAbs, both from Beckman-Coulter (Villepinte, France). The B cell-enriched preparations contained 98% B lymphocytes. All cell cultures were carried out at 37 °C in RPMI-1640 medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, 200 U/ml penicillin and 1 μg/ml streptomycin. Supernatants were collected and stored at −80 °C for cytokine production analysis. This research was approved by the Institutional Review Board at the Brest University Medical School Hospital and informed consent of the patients' parents was obtained according to the Declaration of Helsinki.

TLR-mediated activation was achieved using 0.5 μM CpG against tcg-tcg-ttt-tgt-cgt-ttt-gtc-gtt (InvivoGen, San Diego, CA) for TLR9, 1 μg/ml resiquimod (InvivoGen, Toulouse, France), referred to as CL097 thereafter, for TLR7 and TLR8, 100 ng/ml LPS for TLR4, 10 μg/ml polyinosinic:polycytidylic acid (poly (I:C)) or 100 ng/ml of the macrophage-activating lipopeptide − 2 kDa for TLR3. All TLR ligands were added to the medium 15 min before the addition of IVIg, in order to avoid association with IVIg prior to their internalization into B cells.

Phosphatase inhibition activity was achieved by treating the cells with 25 μM of pervanadate (Sigma–Aldrich, St Louis, MO) during 3 h, and specific SHP-1/-2 inhibition carried out using 200 μM 8-hydroxy-7 (6 sulfonaphtalen-2-yl) diazenyl-quinoline 5 sulfonic acid disodium salt (NSC-87877) (Sigma–Aldrich) during 30 min at 37 °C.

MyD88 was inhibited by treating cells with 0.25 mM MyD88 homodimerization inhibitory peptide (DRQIKIWFQNRRMKWKK RDVLPGT) (Imgenex, San Diego, CA) for 6 h at 37 °C. Inhibition specificity was checked with a control peptide (DRQIKIWFQ NRRMKWKK) under the same conditions.

1.2. IVIg preparations

IVIg preparations were purchased from the Laboratoire du Fractionnement Biologique (Les Ulis, France), and dissolved in serum-free RPMI-1640 medium to a concentration of 100 mg/ml. SA-IgG was purified from the bulk of IVIg preparations by lectin-affinity chromatography using a *Sambucus nigra* agglutinin (SNA) agarose column (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Enrichment of the eluate was confirmed by Western blotting (WB) with biotinylated SNA at 4 μg/ml and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin.

For preparing Fab and Fc fragment, IVIg preparations were digested with 2 mg/ml papain in 0.04 M cystein–PBS for 6 h at 37 °C. The resulting Fab and Fc parts were separated from the undigested IVIg using a Sepharose S300 column, and the Fc fragments further separated from the Fab fragments on a protein G column. All purification steps were carried out using a fast protein liquid chromatography system (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Purity of the fragments was assessed by WB using Abs specific either for Fab or for Fc. Heat-aggregated IVIg were obtained by heating monomeric IVIg for 30 min at 63 °C. In some experiments, Herceptin® (Genentech, South San Francisco, CA) was used at 20 mg/ml as a control for high concentrations of Ig.

1.3. Dosage of cytokines

IL-6, IL-10, IFN-γ were quantified in supernatants using ELISAs according to BD Biosciences' instructions (San Diego, CA). The detection limits of IL-6, IL-10, IFN-γ using this protocol were 3 pg/ml, 2 pg/ml and 0.08 IU/ml, respectively.

1.4. RNA extraction and quantitative RT-PCR

Total mRNA was extracted using the RNAble method (Eurobio, Paris, France), and cDNA synthesized by reverse transcription in 20 μl with Superscript II RNase H-RT (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Quantitative RT-PCRA was conducted in 20 μl mixtures containing 50 ng template cDNA, 1× Sybr Green PCR Master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), and 500 nM of each primer.

The used primers were GACTTGCCTGGTGAAAA-TCATCACTG plus GGGTCAGGGGTGGTTATTGCATC for IL-6, GGCTACCACATCCAA GGAA-GGCAG plus CCAATTACAGGGCCTCGAAAGAG-TC for 18S, TGGGCCGACT-GAACATCA plus CGGG-TCATGCCGTAATTCTT for Tollip, and CTCGGAA-TTTCTCTGCCAAG plus GTGG-GAGGATCTTCA GCAAA for IRAK-M.

Of note, IL-10 and IFN-γ mRNA expression were studied in a Taqman assay. All assays included a negative control which consisted of the reaction mixture with no template, and the mixture with 18S rRNA primers as an internal control. Comparison of cycle thresholds was completed with the $2^{-\Delta ct}$ method using 18S as an internal control.

1.5. FACS analyses

B cell activation was measured by FACS, using FITC-conjugated mouse anti-CD25 mAb (Dako, Glostrup, Denmark), PE-conjugated

mouse anti-CD40 mAb (Beckman-Coulter), PE-cy5 conjugated mouse anti-HLA-DR mAb (Beckman-Coulter) and FITC-conjugated mouse anti-TLR9 mAb (Imgenex). For TLR9 staining, cells were permeabilized with Cytofix/Cytoperm kit according to BD Biosciences. Data were collected using an XL cytometer (Beckman-Coulter) and analyzed using EXPO32™ program. Percentages and mean fluorescence intensities (MFIs) were evaluated.

1.6. Western blotting

Total B cell protein extracts were prepared with 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM NaF, 2 mM EDTA, 40 μM sodium orthovanadate, protease inhibitor cocktail (Sigma–Aldrich) and 1% Brij 96 for 1 h at 4 °C under rotation. For selective nuclear/cytoplasmic protein extraction, the cells were lysed in 25 mM Hepes medium, 5 mM KCl, 0.5 mM MgCl2 and 1% NP40 buffer for 15 min at 4 °C. After centrifugation, the cytoplasmic protein fractions were collected. Then, the nuclei were lysed with 25 mM Hepes, 10% sucrose, 350 mM NaCl and 0.01% NP40 buffer for 1 h at 4 °C. After centrifugation, the nuclear fractions were collected to be further processed.

Lysates were analyzed on 10% SDS–PAGE. Separated proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane, and quenched with 5% non-fat milk in PBS or with 5% of BSA for 1 h at room temperature, and then incubated with primary Ab for 1–6 h, depending on the Ab used. Primary antibodies were rabbit anti-CXCR4 Ab, mouse anti-CXCR5 mAb, rabbit anti-histone H3 Ab and mouse anti-β-actin mAb (all from Abcam, Cambridge, England), rabbit anti-c-Rel Ab, (Millipore, Temecula, CA), rabbit anti-Rel A and mouse anti-phospho IκBα Abs, the latter two Abs from Cell Signaling (Danvers, MA).

HRP-conjugated sheep anti-mouse, as well as HRP-conjugated donkey anti-rabbit Abs were obtained from GE Healthcare (Chalfont St Gilles, England). They were diluted 1/40,000 in 1% non-fat milk protein containing 0.05% Tween in PBS. Bound Abs were revealed using an ECL kit (GE Healthcare).

1.7. Reporter gene assays

To determine the effect of IVIg on NFκB activity after CpG-mediated TLR9 stimulation, B cells were transfected with an NFκB-dependent luciferase reporter system (SABiosciences, Frederick, MD). Transfected B cells were stimulated for 16 h with 0.25 μM CpG and/or 20 mg/ml IVIg (or BSA as a control) and lysed. Luciferase activities of lysates were determined using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) and normalized on the basis of protein concentration.

1.8. Statistical analysis

We used Graph Pad Prom Software to establish statistical analysis. Study of variance and 2-tailed paired Student's *t*-test were chosen to determine the significance of differences between sample means. Significance refers to difference from the controls, unless otherwise indicated.

2. Results

2.1. IVIg inhibits TLR9 and TLR7-mediated B cell activation in culture

We first wanted to confirm the ability of TLR agonists to induce CD25 expression in B cells without BCR engagement and T-cell help. To this end, tonsil B cells were stimulated for 16 h with increasing amounts of ISS for TLR9, or CL097 for TLR7/8. Concentrations of 0.5 μM for ISS, and 1 μg/ml of CL097 provided the best induction of CD25 on viable cells (Fig. 1A). Thus, not all B cells respond to TLR-mediated CD25 induction.

These results of these pilot experiments led us to further analyze the potent effect of IVIg on this B cell activation. We added 20 mg/ml of IVIg for 16 h (Fig. 1B) and showed that this quantity of IVIg inhibited the induction of CD25 by 43% through TLR9 ($p < 0.01$), and 59% through TLR7/8 ($p < 0.001$). Activation of B cell ligation of TLR4 by LPS, or TLR3 by poly (I:C) did not induce the expression of CD25. To check other activation markers, we looked for an increase in the MFI of CD40 following TLR activation (Fig. 1C). We observed that IVIg inhibited CD40 upregulation on B cells of TLR9 by 38.6% ($p < 0.001$) and TLR7/8 by 34.6% ($p < 0.001$).

One step further, since it has recently been claimed that mouse IVIg could interfere with Ag presentation [27], we examined the

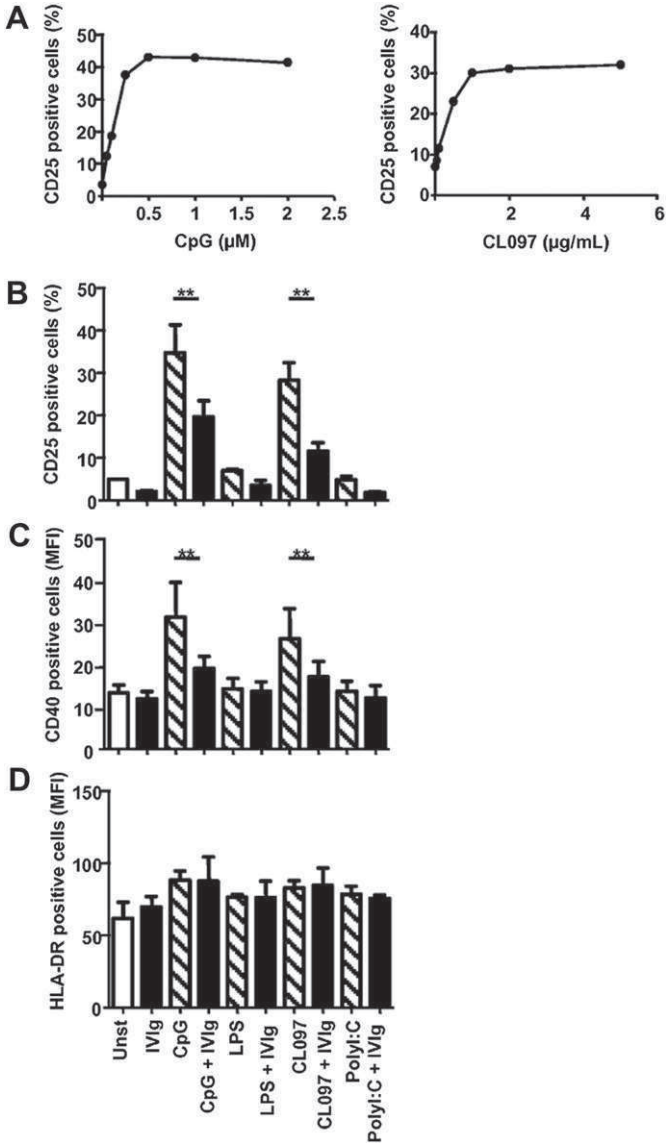

Fig. 1. IVIg inhibits TLR-mediated activation of B cells. (A) Tonsillar B cells were stimulated for 16 h with increasing concentrations of TLR9 and TLR7 agonists and CD25 upregulation analyzed with FITC-anti-CD25 mAb. Data are representative of three independent experiments. Purified B cells were then stimulated for another 16 h, with or without 20 mg/ml IVIg, and with different TLR agonists: ISS for TLR9, LPS for TLR4, CL097 for TLR7 and Poly (I:C) for TLR3,. Then CD25 (B), CD40 (C) and HLA-DR (D) upregulation were shown by FACS on viable cells. Mean ± SD values from five independent experiments, *: $p < 0.01$ vs cells cultured with ISS or CL097 alone.

modulation of HLA-DR expression by IVIg induced in tonsil B cells through TLR. No effects were seen (Fig. 1D). These negative results suggest that TLR agonists, in the absence of BCR triggering or T-cell help, induce B cell activation though CD25 and CD40 upregulation, and that IVIg could inhibit this TLR-mediated activation.

2.2. IVIg uses its Fc fraction to reverse TLR-mediated activation

Monomeric IgG predominates in IVIg preparations, over small proportions of dimeric and polymeric IgG. To know which components of IVIg suppress the TLR9 signals, B cells were cultured with subfractions of IgG, or with herceptin, a humanized anti-HER2 mAb with no anti-B cell activity, used at the same concentration as IVIg. Although IVIg could bind non-specifically to CpG, the controls Fab and herceptin had little effect on CD25 inhibition compared with IVIg ($p < 0.01$). In contrast, the Fc fraction exerted similar inhibition as aggregated IVIg (Fig. 2A). Interestingly, 1 mg/ml SA-IgG produced inhibition equivalent to that of 20 mg/ml total IgG.

To discount the possibility that IVIg attaches to TLR agonists before they get into the cells, we pre-treated tonsil B lymphocytes with ISS or CL097 5, 10 or 20 min prior to their incubation with IVIg. IgG was not inhibitory through the binding of CpG in our culture, and IVIg inhibited TLR-mediated activation of B cells even if they had been pre-treated by ISS or CL097 (Fig. 2B). Moreover, pre-treatment of cells by IVIg for several hours and its removal, did not prevent TLR-mediated activation (Fig. 2B). These results support the view that IVIg needs to be present continuously with the B cells to be effective. The rest of the experiments were carried out by pre-incubation the cells with agonists.

2.3. IVIg suppresses TLR-induced production of proinflammatory cytokines

Based on the fact that CpG stimulates B cell production of cytokines [27] which polarizes T-cell response, we analyzed the pattern of such mediators by activating B cells with ISS or CL097 until induction of IL-6, IFN-γ and IL-10 mRNA.

ISS induced mRNAs for IL-6 and IL-10, (Fig. 3A and data not shown), as well as the related cytokine proteins (Fig. 3B). Such was not the case for IFN-γ. When IVIg was added to the cultures, IL-6 production was inhibited by 74% ($p < 0.01$) at the transcriptional level, and by 89% at the protein level at 20 h ($p < 0.01$). These reductions are the functional consequences of IVIg-mediated suppression of TLR9 signaling. Similar results were obtained with CL097 activation of B cells. BSA served as a non-specific control of high-protein concentration by comparing the rate of IL-6 inhibition with the same concentration as IVIg. In addition to IL-6 secretion, IL-10 induction by ISS was inhibited by IVIg, suggesting that inhibition of IL-6 secretion was not a consequence of an IL-10 upregulation and that IVIg does not enhance the production of IL-10 in B cells.

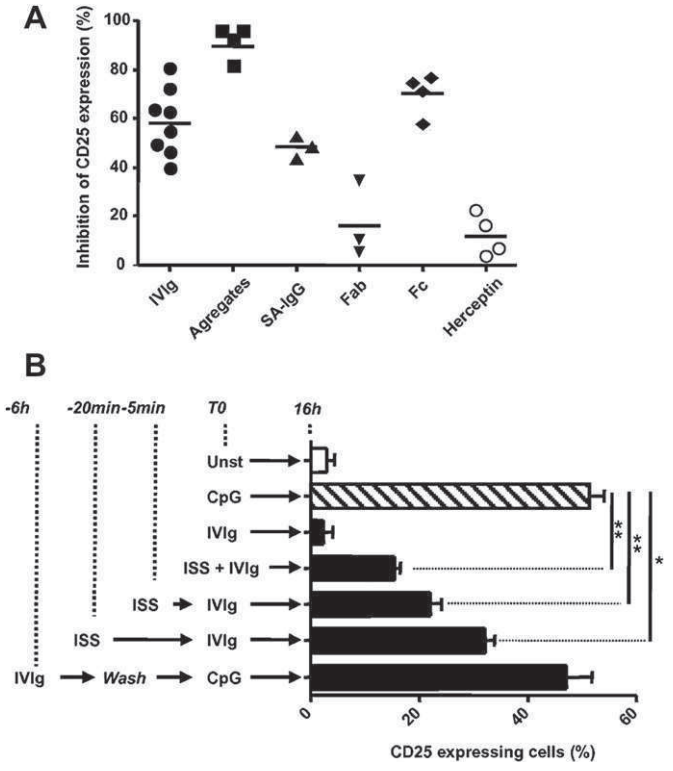

Fig. 2. TLR9 inhibition operates through the Fc and needs continuous presence in the culture. (A) IVIg preparations were digested with 2 mg/ml papain. The Fab (▼) and Fc (◆) fragments were separated using a Sepharose S300 column and a protein G column respectively. Sialylated IVIg (IVIg SA+) (▲) was prepared using *Sambucus nigra* agglutinin affinity chromatography. B cells were then incubated for 16 h with the different subfractions of IVIg (●) in presence of 1 μM CpG and inhibition of CD25 upregulation was calculated vs control culture without any IVIg. Herceptin (○) was used at 20 mg/ml as control for the high quantity of protein. (B) Cells were pre-incubated for 5 or 20 min with CpG before addition of IVIg and after 16 h of culture CD25 upregulation was analyzed by FACS. In the last experiment, B cells were pre-incubated for 6 h with 20 mg/ml IVIg before washing and subsequent ISS stimulation for 16 h.

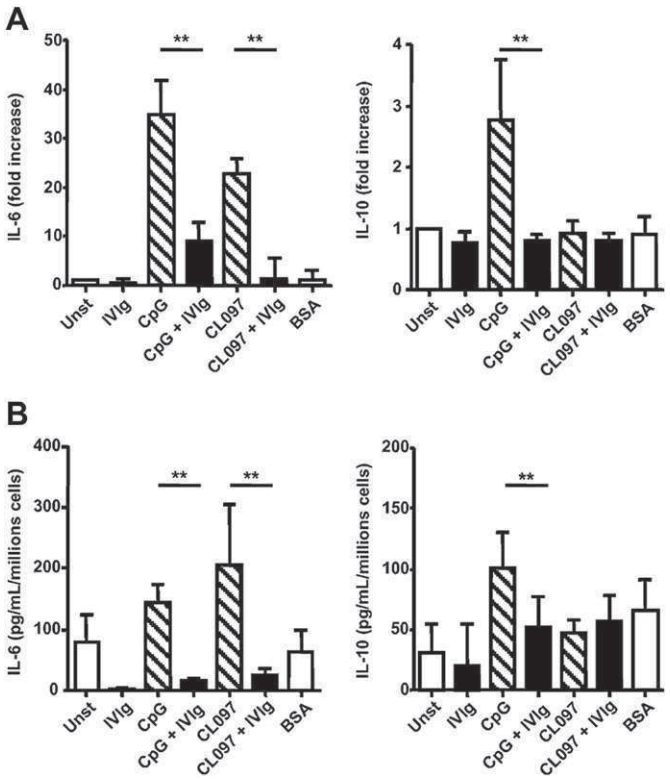

Fig. 3. IVIg suppresses cytokine induction mediated by TLR9 and TLR7 activation. (A) Purified B cells were stimulated with 0.5 μM CpG or 1 μg/ml CL097 for 6 h with or without 20 mg/ml IVIg. Cells were then harvested and RNA isolated from cell lysates. Quantitative RT-PCR for IL-6, IL-10 and IFN-γ mRNA were performed, using 18S RNA analysis as internal control. Data are representative of the fold-increase of mRNA relative to the control cells in medium alone. (B) Production of IL-6, IL-10 and IFN-γ in culture supernatants after 24 h of culture was quantified by ELISA. Data in A and B are the mean ± SD of three to six independent experiments and the statistical significance of student *t*-test **: $p < 0.01$.

2.4. IVIg mimics the effects of MyD88 inhibitor by suppressing TLR-induced B cell activation

Following stimulation with ISS, TLRs dimerize, recruit MyD88, and propagate intracellular signal transduction, culminating in the activation of NFκB [23]. Translocation of p65 and c-Rel into the nucleus promotes the activation of the NFκB target genes, such as IL-6 [28]. To understand how IVIg may inhibit TLR-mediated B cell activation, we investigated the effects of the modulation of NFκB factors in B cells, following treatment by ISS and/or IVIg.

First, we followed in tonsil B cells the kinetics of IκBα phosphorylation after ISS stimulation in the presence or absence of 20 mg/mL IVIg. ISS induced a strong upregulation of IκBα phosphorylation at 5 min that decreased at 15 and 60 min. Incubation of B cells with IVIg (Fig. 4A) totally suppressed this upregulation and decreased the basal phosphorylation of IκBα ($p < 0.05$ vs β-actin). Hence, to observe the consequences of the suppression of IκBα degradation, WB analysis was performed on nuclear extracts from B cells, and the expression of c-Rel and Rel-A (p65) examined by immunoblot following TLR9 activation (Fig. 4B). There appeared that ISS promoted the translocation of p65 into the nucleus at 1–3 h of stimulation. IVIg treatment abrogated this upregulation as well as the control Myd88 protein (Fig. 4B lane 7). To ensure that IVIg could suppress NFκB activation in a functionally-related manner, we applied the NFκB-dependent luciferase reporter assay. As shown in Fig. 4C, IVIg inhibited the activation of the NFκB transcription factor complex leading to the functional suppression of TLR9-mediated activation of NFκB-related genes in the same way as with the MyD88 protein inhibitor ($p < 0.01$ vs control).

Finally, to further confirm that the downmodulation of B cell activation was mediated by this IVIg-dependent suppression of the MyD88 pathway, we evaluated by FACS the CD25 expression, following activation in presence of 20 mg/ml IVIg or 2.5 μM of the MyD88 protein inhibitor (Fig. 4D). In B cells, IVIg disrupted the MyD88 activation pathway of CD25 upregulation, mimicking the synthetic peptide inhibitor that suppressed MyD88 dimerization and the subsequent IκBα phosphorylation and finally NFκB translocation into the nucleus.

2.5. Downmodulation of the TLR9 pathway by IVIg is not mediated by TLR censors

Excessive and prolonged activation of innate immunity is always harmful and occasionally fatal, owing to severe tissue damage. TLR regulation is mediated through multiple processes, including downregulation of TLR [29], or recruitment of negative regulators as IRAK-M [26] Tollip [25], or the suppressor of cytokine signaling-1 [30]. Although the precise control of TLR9-mediated pathway is elusive, particularly in B cells, sharing of downstream sequences by many TLRs may allow investigation of their modulation using IVIg. We next analyzed if the treatment by IVIg upregulated IRAK-M or Tollip. Incubation of B cells with IVIg did not upregulate these negative regulators of the TLR pathway that are not responsible for dampening down the TLR9 response (Fig. 5A). On the other hand,

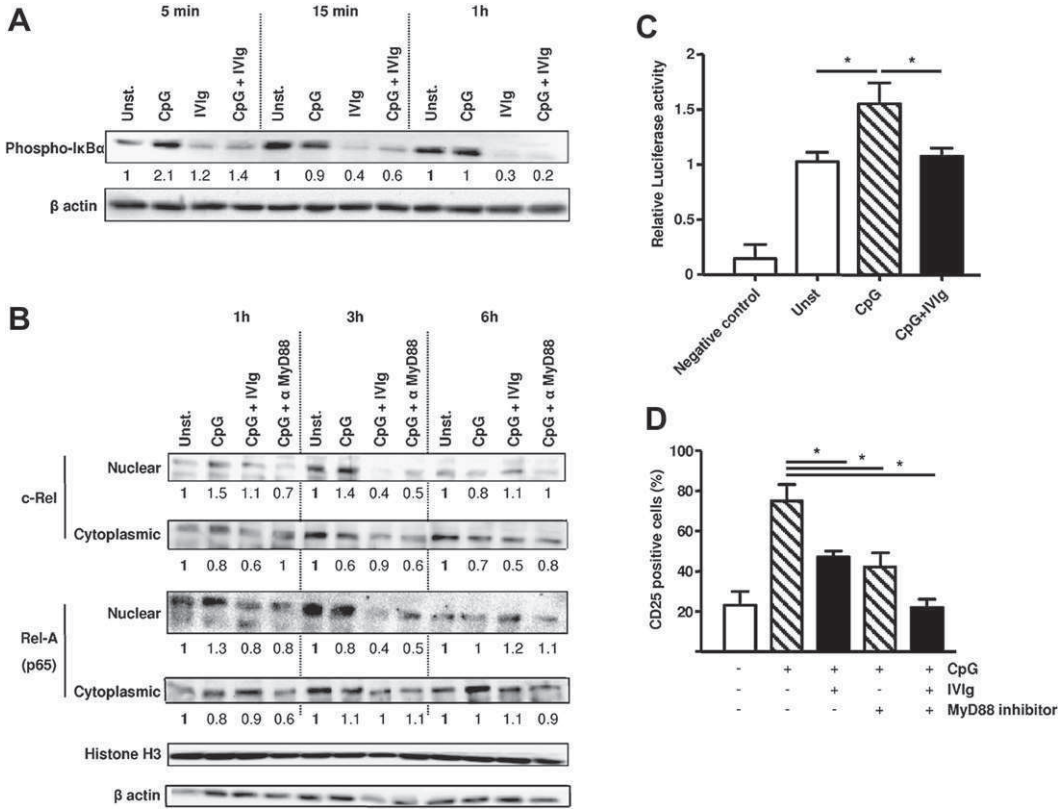

Fig. 4. IVIg inhibits NFκB translocation to the nucleus of TLR9-driven B cells. (A) Peripheral B cells were incubated for 5, 15 or 60 min with ISS, IVIg alone or both, and proteins extracted and prepared for WB using anti-phospho IκBα Ab. The ratios indicate the relative density of the bands normalized to β-actin. (B) Purified B cells were cultured for 1, 3 and 6 h with ISS in the presence or absence of 20 mg/ml IVIg or with 0.25 mM MyD88. Selective nuclear proteins were fractionated and the lysate analyzed in a WB using anti-p65 and anti-c-Rel mAb. Values given are the relative density of the bands normalized histone H3 for the nuclear fraction. Data are representative of three separate experiments. (C) B cells were transfected with the NFκB-dependent luciferase reporter system and stimulated with ISS with or without IVIg or MyD88 pre-incubation and then lysed. Luciferase activities were determined and normalized on the basis of protein concentration. Graphs show means and SD, *: $p < 0.05$. (D) The physiological consequences of NFκB disruption were analyzed through CD25 upregulation after 16 h of culture at peripheral B cells with CpG in the presence or absence of IVIg. Data are representative of three independent experiments. Graphs show means and SD *: $p < 0.05$.

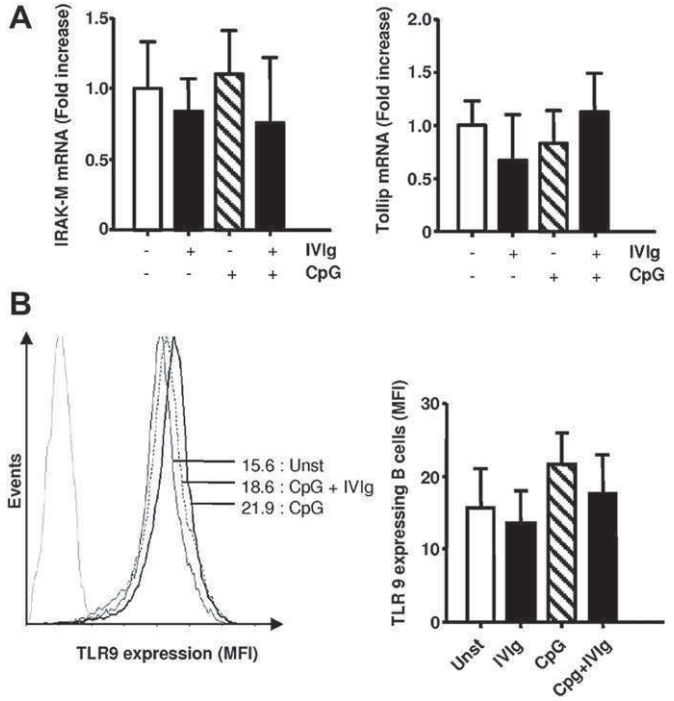

Fig. 5. Downregulation of TLR9-mediated B cell activation is independent of TLR censors. (A) After 6 h of tonsillar B cell activation by CpG in the presence or absence of IVIg, mRNA for Tollip and IRAK-M were measured by quantitative RT-PCR. Data represent the fold-increase relative to 18S RNA. Cells cultured in medium alone represent the control value 1. (B) Measurement of TLR9 expression following CpG activation with or without IVIg in normal B cells. Data represent five independent experiments. Dotted lines denote isotype control, thin lines specific staining of TLR9 in B cells, solid lines TLR9 staining after CpG activation, and dashed lines TLR9 staining after CpG activation in the presence of IVIg.

IVIg-induced modulation of TLR9 expression in B cells was marginal (Fig. 5B).

2.6. Recruitment of phosphatase by IVIg to regulate TLR9 activation

Previous studies have demonstrated that, following recognition of CpG-rich sequences, TLR9 initiates dimerization of MyD88 that subsequent activate phosphorylation of IRAK1 and IRAK4, leading to the phosphorylation of IκBα and its degradation by the ubiquitin-proteasome system that releases NFκB subunits to the nucleus. These different kinases could be modulated by recruiting a number of phosphatases. For example, experiments in SHIP-deleted mice showed significantly elevated production of proinflammatory cytokines in response to TLR agonists [31].

To assess if phosphatases are involved in IVIg-induced inhibition of TLR9 signaling, we pre-treated B cells for 3 h with 25 μM of the phosphatase inhibitor pervanadate, and we analyzed the consequences on IκBα phosphorylation (Fig. 6A). ISS stimulation upregulate IκBα phosphorylation that could be abrogated by IVIg treatment. But, when phosphatase activity was inhibited, there was no regulation of the IκBα phosphorylation. Thus, it made sense to measure the effect of a specific SHP-1 inhibitor NSC87-877 on NFκB modulation and CD25 expression (Fig. 6 B and C). The luciferase-dependent assay showed that IVIg no longer suppressed the CpG dependent-upregulation of NFκB-dependent luciferase activity when SHP-1 was inhibited, suggesting that IVIg regulation of NFκB translocation comes from the modulation of the kinase activity by SHP-1. In the same manner, the inhibitor of SHP-1 prevented IVIg suppression of CD25 upregulation that confirmed the recruitment of phosphatase by IVIg is required to suppress the phosphorylation cascade following ISS-TLR9 binding.

Taken together, these data suggest that IVIg could reprogram the B cell response to TLR9 by reducing the activation and expression of proinflammatory cytokines through SHP-1 recruitment.

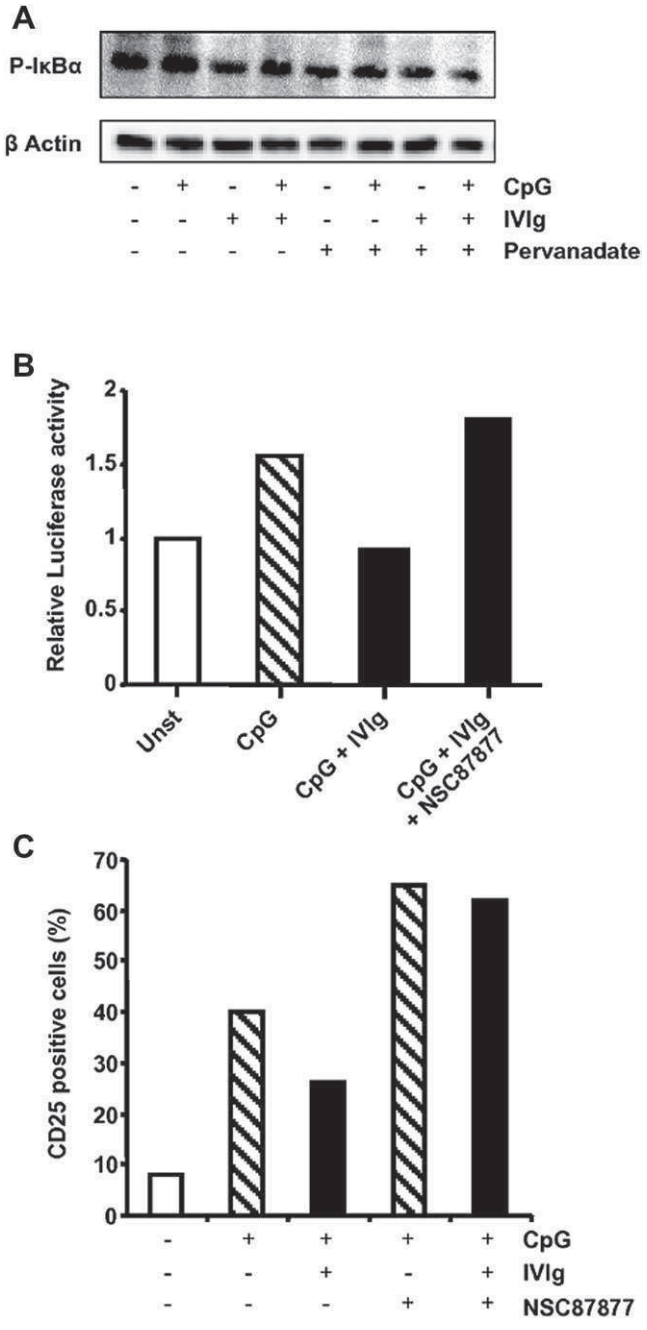

Fig. 6. Phosphatase recruitment in IVIg regulation of TLR9 activation. (A) Purified peripheral B cells pre-treated with 25 μM pervanadate were stimulated with ISS in the presence or absence of IVIg for 5 min. Cells were harvested, and extracts analyzed by blot using an anti-phosphorylated IκBα. Values given are the relative density of the bands normalized to β-actin. Data are representative of three separate experiments. (B) B cells were transfected with a NFκB-dependent luciferase reported system and pre-treated with 200 μM NSC87-877 the SHP-1-specific inhibitor before CpG activation in presence or absence of IVIg. Luciferase activities were determined as described. (C) CD25 modulation was assessed by FACS analysis, 16 h after ISS activation of peripheral B cells pre-treated with 200 μM NSC87-877.

3. Discussion

This study establishes that IVIg could regulate TLR9 and TLR7/8 activation of mature human B cells. Although it has been suggested that TLR activation contributes to the autoimmune process [32], only a few studies have addressed the role of TLRs in human B lymphocyte function. Human and murine B cells express TLR7 and TLR9. The former can be activated with specific DNA, and the latter by RNA sequence motifs. It has been suggested that only few B cell subsets respond to TLR9 stimulation [33]. Indeed, memory and naïve B cells differentially respond to TLR7 and TLR9 stimulation with type-I IFN being required for TLR7-mediated polyclonal B cell expansion and differentiation into Ig-producing plasma cells. This is not the case for TLR9-mediated B cell activation [10]. TLRs have been endowed with a role in the differentiation of transitional B cells into plasma cells [34], and also in the secretion of IL-10, IL-6 and IL-8 [21].

While B cells are generally considered poor cytokine markers, there is evidence that TLR-mediated cytokine responses by B cells promote or control an ongoing immune response. This holds true for IL-6 and IL-10 [35]. We show herein that their induction through TLR activation could be abrogated by IVIg. This is an effective therapeutic agent in a variety of autoimmune diseases that are dependent of autoAbs, such as idiopathic thrombopenic purpura, myasthenia gravis, experimental acute arthritis, or autoimmune diseases where B cells are clearly involved, such as SLE, dermatomyositis or Sjögren's syndrome. Blocking of FcγR-mediated function has been established in mouse models but the action of IVIg on autoAb-producing cells never been elucidated. We and others have shown that the fate of B cells is influenced by IVIg. The affected functions include IgG production [4], modulation of BCR-mediated signaling, apoptosis or activation [5,36]. Here we demonstrate for the first time that the third signal required for activation of human naïve B cells is abolished by IVIg [37]. It is known that TLR stimulation delivers a signal that synergizes with BCR triggering and/or T-cell help, resulting in the induction of sustained proliferation and Ab production. Abnormal or over-stimulation of TLR9 and TLR7 in a disease setting could provide B cell activation that would sustain the autoimmune process and promote systemic inflammation.

Normally, self-derived nucleic acids do not activate innate immune response. The intracellular localization of TLR7 and TLR9 is important for avoiding contact with extracellular self-nucleic acids [38]. It is possible that many safeguards are overcome in autoimmune disorders. For example, when self-derived nucleic acids form complexes with endogenous proteins, they might become resistant to nucleases and gain access to endosomal TLRs which, in turn, maintain autoimmune processes. Moreover, self-nucleic acids or nucleoproteins that bind to autoAbs can be internalized through FcγRIIa receptors on dendritic cells and delivered to TLR7- and TLR9-containing vesicles [39]. Alternatively they could bind to BCRs and be internalized for the activation of these TLRs [14], which would contribute to the activation of autoreactive B cells. This synergy between the BCR and TLR9 enhances the proliferative response of B cells to CpG DNA [40,41]. The strict relationship between BCRs and CpG receptor pathways on self-reactive B cells has not yet been elucidated. The Ag-specific effect may simply result from the BCR serving as a passive focusing device to deliver CpG DNA to intracellular TLR9 mentioned as the none specific signal hypothesis. Alternatively, synergy between BCR and TLR9 may enhance B cell activation and cytokine production by those B cells that specifically recognize a DNA complex through their BCR. Given the high frequency of DNA-binding B cells in the repertoire, it might be expected that polyclonal anti-DNA Ab secretion is a common feature of the immune system [42].

Multiple mechanisms that negatively regulate TLR9 signaling have been described from downmodulation of TLR receptors [43] to upregulation of TLR censors [44]. Here, we show that pre-incubation for several hours with IVIg alone did not prevent TLR9-mediated B cell activation. Cells need the continuous presence of IVIg to ensure a complete inhibition of TLR9 signaling. This was also rapidly induced but transient, possibly due to the prompt internalization of IVIg in B cells [45]. We have anticipated that IVIg modulates the level of TLR or induces the expression of a signaling inhibitor with fast kinetics that suppress TLR signaling. However, IVIg does not regulate TLR9 levels and induces neither Tollip nor IRAK-M mRNA.

MyD88 is associated with IRAK1 and IRAK4, and these kinases mediate a sequential phosphorylation cascade. This depends on a complex series of phosphorylations that initially activate this kinase and leads to the phosphorylation, and degradation by a proteasome-dependent process of IκBα. This latter event liberates NFκB factor to translocate into the nucleus. SHP-1 exerts an effect on this cascade [46–48]. There occurs a dramatic increase of TLR2- and TLR9- dependent-production of TNF, IL-1β and IL-6 in SHP-1-deficient splenocytes. As demonstrated, we used chemical inhibitors of phosphatase activity and specially of SHP-1 to avoid his recruitment by IVIg ligation on B cells. And we were enable to observe any regulation mediated by IVIg. It may be possible that IVIg modulate the balance between phosphorylation and dephosphorylation in the TLR cascade pathway through the enhancement of SHP-1 recruitment. These experiments confirm that IVIg interact with inhibitory molecules on B cells and increase their inhibitory effects through phosphatase activity.

Recruitment of this phosphatase by IVIg could be mediated by a number of receptors, such as CD22 [7], Siglec G [49] and FcγRIIb [50]. As this stage, we do not know which receptor(s) is (are) involved, but we know that polyclonal IgG interacts with B cells and enhances SHP-1 recruitment dampening down the TLR9 response. CD22 appear a good candidate as we already demonstrated in a BCR-stimulation system and we shown in Fig. 2 that low concentration of SA-IVIg could down regulated TLR9-induced activation as well as high dose of whole IVIg. SHP-1 has been shown to be a critical negative regulator of the NFκB pathway through the inhibition of phosphorylation of IκBα [51]. In the present work, the reporter assay reveals that abolishment of SHP-1 activity through NSC87-877 inhibitor increases dramatically the activation of NFκB-dependent genes (Fig. 6).

IVIg, through the action of SHP-1mediated IκBα dephosphorylation, prevents p65 translocation and activation of proinflammatory cytokines. This is also the first report to establish a negative control of TLR signaling in B cells by SHP-1, giving new insights into the understanding, and offering tools with which to study the control of B cell responses in a number of pathogenic processes from B cell malignancies to autoimmune diseases.

Authorship

Jean-François Séité and Thomas Guerrier designed and performed research; Divi Cornec provided clinical samples and analyzed data; Christophe Jamin interpreted data and wrote the paper; Pierre Youinou designed research and edited the paper; Sophie Hillion designed research, interpreted data and wrote the paper.

Acknowledgements

Professor Peter M Lydyard (Westminster University, London, United-Kingdom) is gratefully acknowledged for helping us with

the English version of the manuscript. The secretarial assistance of Simone Forest and Geneviève Michel is appreciated.

References

[1] Lemieux R, Bazin R, Néron S. Therapeutic intravenous immunoglobulins. Mol Immunol 2005;42:839–48.
[2] Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S, Bayry J. The antiinflammatory IgG. N Engl J Med 2008;359:307–9.
[3] Zandman-Goddard G, Blank M, Shoenfeld Y. IVIg in systemic lupus erythematosus: from the bench to the bedside. Lupus 2009;18:884–8.
[4] de Grandmont MJ, Racine C, Roy A, Lemieux R, Néron S. IVIg induces the *in vitro* differentiation of human B lymphocytes and the secretion of IgG. Blood 2003;101:3065–73.
[5] Prasad NK, Papoff G, Zeuner A, Bonnin E, Kazatchkine MD, Ruberti G, et al. Therapeutic preparations of normal polyspecific IgG (IVIg) induce apoptosis in human lymphocytes and monocytes: a novel mechanism of action of IVIg involving the Fas apoptotic pathway. J Immunol 1998;161:3781–90.
[6] McGaha TL, Karlsson MC, Ravetch JV. FcgammaRIIB deficiency leads to autoimmunity and a defective response to apoptosis in Mrl–MpJ mice. J Immunol 2008;180:5670–9.
[7] Séïté JF, Cornec D, Renaudineau Y, Youinou P, Mageed RA, Hillion S. IVIg modulates BCR-signaling through CD22 and promotes apoptosis in mature human B lymphocytes. Blood 2010;116:1698–704.
[8] Kawasaki N, Rademacher C, Paulson JC. CD22 regulates Adaptive and innate immune responses of B cells. J Innate Immun; 2010 Dec 17.
[9] Janeway Jr CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol 2002;20:197–216.
[10] Duramad O, Fearon KL, Chang B, Chan JH, Gregorio J, Coffman RL, et al. Inhibitors of TLR9 act on multiple cell subsets in mouse and man in vitro and prevent death in vivo from systemic inflammation. J Immunol 2005;174:5193–200.
[11] Marta M, Meier UC, Lobell A. Regulation of autoimmune encephalomyelitis by Toll-like receptors. Autoimmun Rev 2009;8:506–9.
[12] Round JL, O'Connell RM, Mazmanian SK. Coordination of tolerogenic immune responses by the commensal microbiota. J Autoimmun 2010;34:220–5.
[13] Manoussakis MN, Spachidou MP, Maratheftis CI. Salivary epithelial cells from Sjogren's syndrome patients are highly sensitive to anoikis induced by TLR-3 ligation. J Autoimmun 2010;35:212–8.
[14] Viglianti GA, Lau CM, Hanley TM, Miko BA, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. Immunity 2003;19:837–47.
[15] Christensen SR, Shupe J, Nickerson K, Kashgarian M, Flavell RA, Shlomchik MJ. TLR7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. Immunity 2006;25:417–28.
[16] Sadanaga A, Nakashima H, Akahoshi M, Masutani K, Miyake K, Igawa T, et al. Protection against autoimmune nephritis in MyD88-deficient MRL/*lpr* mice. Arthritis Rheum 2007;56:1618–28.
[17] Summers SA, Hoi A, Steinmetz OM, O'Sullivan KM, Ooi JD, Odobasic D, et al. TLR9 and TLR4 are required for the development of autoimmunity and lupus nephritis in pristane nephropathy. J Autoimmun 2010;35:291–8.
[18] Messina JP, Gilkeson GS, Pisetsky DS. Stimulation of *in vitro* murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. J Immunol 1991;147:1759–64.
[19] Graham KL, Lee LY, Higgins JP, Steinman L, Utz PJ, Ho PP. Treatment with a TLR inhibitory CpG-ODN delays and attenuates lupus nephritis in NZB/W mice. Autoimmunity 2010;43:140–55.
[20] Bekeredjian-Ding IB, Wagner M, Hornung V, Giese T, Schnurr M, Endres S, et al. Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells *via* type-I interferon. J Immunol 2005;174:4043–50.
[21] Hanten JA, Vasilakos JP, Riter CL, Neys L, Lipson KE, Alkan SS, et al. Comparison of human B cell activation by TLR7 and TLR9 agonists. BMC Immunol 2008;9:39–54.
[22] O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in TLR signalling. Nat Rev Immunol 2007;7:353–64.
[23] Gay NJ, Gangloff M, Weber AN. TLRs as molecular switches. Nat Rev Immunol 2006;6:693–8.
[24] Fukao T, Koyasu S. PI3K and negative regulation of TLR signaling. Trends Immunol 2003;24:358–63.
[25] Li T, Hu J, Li L. Characterization of Tollip protein upon LPS challenge. Mol Immunol 2004;41:85–92.
[26] Kobayashi K, Hernandez LD, Galán JE, Janeway Jr CA, Medzhitov R, Flavell RA. IRAK-M is a negative regulator of TLR signaling. Cell 2002;110:191–202.
[27] Aubin E, Lemieux R, Bazin R. Indirect inhibition of *in vivo* and *in vitro* T-cell responses by intravenous immunoglobulins due to impaired antigen presentation. Blood 2010;115:1727–34.
[28] Poeck H, Wagner M, Battiany J, Rothenfusser S, Wellisch D, Hornung V, et al. Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and Ig production in the absence of T-cell help. Blood 2004;103:3058–64.
[29] Ziegler-Heitbrock HW, Wedel A, Schraut W, Ströbel M, Wendelgass P, Sternsdorf T, et al. Tolerance to LPS involves mobilization of NFκB with predominance of p50 homodimers. J Biol Chem 1994;269:17001–4.
[30] Nakagawa R, Naka T, Tsutsui H, Fujimoto M, Kimura A, Abe T, et al. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. Immunity 2002;17:677–87.
[31] Sly LM, Rauh MJ, Kalesnikoff J, Song CH, Krystal G. LPS-induced upregulation of SHIP is essential for endotoxin tolerance. Immunity 2004;21:227–39.
[32] Kim WU, Sreih A, Bucala R. Toll-like receptors in systemic lupus erythematosus: prospects for therapeutic intervention. Autoimmun Rev 2009;8:204–8.
[33] Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T, et al. Quantitative expression of TLR1-10 mRNA in cellular subsets of human PBMCs and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. J Immunol 2002;168:4531–47.
[34] Capolunghi F, Cascioli S, Giorda E, Rosado MM, Plebani A, Auriti C, et al. CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. J Immunol 2008;180:800–8.
[35] Choe J, Choi YS. IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells. Eur J Immunol 1998;28:508–15.
[36] Kessel A, Peri R, Haj T, Snir A, Slobodin G, Sabo E, et al. IVIg attenuates TLR9 activation in B cells from SLE patients. J Clin Immunol; 2010 Oct 5.
[37] Ruprecht CR, Lanzavecchia A. TLR stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. Eur J Immunol 2006;36:810–6.
[38] Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of TLR9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. Nat Immunol 2006;7:49–56.
[39] Means TK, Latz E, Hayashi F, Murali MR, Golenbock DT, Luster AD. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. J Clin Invest 2005;115:407–17.
[40] Krieg AM, Yi AK, Matson S. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. Nature 1995;374:546–9.
[41] Goeckeritz BE, Flora M, Witherspoon K, Vos Q, Lees A, Dennis GJ, et al. Multivalent cross-linking of membrane Ig sensitizes murine B cells to a broader spectrum of CpG-containing ODN motifs, including their methylated counterparts, for stimulation of proliferation and Ig secretion. Int Immunol 1999;11:1693–700.
[42] Herlands RA, Christensen SR, Sweet RA, Hershberg U, Shlomchik MJ. T cell-independent and TLR-dependent antigen-driven activation of autoreactive B cells. Immunity 2008;29:249–60.
[43] Santiago-Raber ML, Baudino L, Izui S. Emerging roles of TLR7 and TLR9 in murine SLE. J Autoimmun 2009;33:231–8.
[44] Shen W, Stone K, Jales A, Leitenberg D, Ladisch S. Inhibition of TLR activation and up-regulation of IL-1R-associated kinase-M expression by exogenous gangliosides. J Immunol 2008;180:4425–32.
[45] Proulx DP, Aubin E, Lemieux R, Bazin R. Spontaneous internalization of IVIg in activated B cells. Immunol Lett 2009;124:18–26.
[46] An H, Hou J, Zhou J, Zhao W, Xu H, Zheng Y, et al. Phosphatase SHP-1 promotes TLR- and RIG-I-activated production of type-I IFN by inhibiting the kinase IRAK1. Nat Immunol 2008;9:542–50.
[47] An H, Zhao W, Hou J, Zhang Y, Xie Y, Zheng Y, et al. SHP-2 phosphatase negatively regulates the TRIF adaptor protein-dependent type IFN and proinflammatory cytokine production. Immunity 2006;25:919–28.
[48] Miyake A, Murata Y, Okazawa H, Ikeda H, Niwayama Y, Ohnishi H, et al. Negative regulation by SHPS-1 of TLR-dependent proinflammatory cytokine production in macrophages. Genes Cells 2008;13:209–19.
[49] Jellusova J, Wellmann U, Amann K, Winkler TH, Nitschke L. CD22 × Siglec-G double-deficient mice have massively increased B1 cell numbers and develop systemic autoimmunity. J Immunol 2010;184:3618–27.
[50] Bruhns P, Vely F, Malbec O, Fridman WH, Vivier E, Daeron M. Molecular basis of the recruitment of the SH2 domain-containing inositol 5-phosphatases SHIP1 and SHIP2 by FcγRIIB. J Biol Chem 2000;275:37357–64.
[51] Massa PT, Wu C. Increased inducible activation of NFκB and responsive genes in astrocytes deficient in the protein tyrosine phosphatase SHP-1. J Interferon Cytokine Res 1998;18:499–507.