



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ph N 2001/14
Double

T/PH/1

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I

2001

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

Le syndrome de Gougerot-Sjögren :
utilisation de la RMN et de la modélisation moléculaire
en vue d'une nouvelle approche thérapeutique.

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement

le lundi 26 mars 2001

pour obtenir

le Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie

par **Zouhair EL HILALI**

Membres du jury

Président : M. Alain NICOLAS, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Nancy.

Juges : M. Manh Thong CUNG, Directeur de recherche au CNRS.
Mme Chantal FINANCE, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Nancy.
Mme Christine HEMMERLIN, Ingénieur de Recherche au CNRS.



BU PHARMA-ODONTOL



D

104 057488 4

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I

2001

DB 24656



FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

Le syndrome de Gougerot-Sjögren :
utilisation de la RMN et de la modélisation moléculaire
en vue d'une nouvelle approche thérapeutique.

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement

le lundi 26 mars 2001

pour obtenir

le Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie

par **Zouhair EL HILALI**

Membres du jury

Président : M. Alain NICOLAS, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Nancy.

Juges : M. Manh Thong CUNG, Directeur de recherche au CNRS.
Mme Chantal FINANCE, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Nancy.
Mme Christine HEMMERLIN, Ingénieur de Recherche au CNRS.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

FACULTE DE PHARMACIE

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY I

Membres du personnel enseignant

Doyen : Mme Chantal FINANCE

Vice Doyen : Mme Anne ROVEL

DOYENS HONORAIRES

M. BERNANOSE André

M. VIGNERON Claude

PROFESSEURS HONORAIRES

Mlle BESSON Suzanne

Mlle GIRARD Thérèse

M. LECTARD Pierre

M. MIRJOLET Marcel

M. PIERFITTE Maurice

PROFESSEUR EMERITE

M. LOPPINET Vincent

PROFESSEURS

M.	ASTIER Alain	Pharmacie Clinique
M.	ATKINSON Jeffrey	Pharmacologie
M.	BAGREL Alain	Biochimie fondamentale et clinique, Biotechnologies
Mlle	BATT Anne Marie	Toxicologie
M.	BLOCK Jean Claude	Santé et Environnement
M.	BONALY Roger	Biochimie microbienne
Mme	CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie Cardiovasculaire
Mme	FINANCE Chantal	Microbiologie moléculaire
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Biomathématiques, Biophysique et Audioprothèse
Mlle	GALTEAU Marie Madeleine	Biochimie
M.	HENRY Max	Biologie végétale
M.	HOFFMAN Maurice	Pharmacie clinique
M.	JACQUE Michel	Pharmacodynamie
M.	LABRUDE Pierre	Physiologie
M.	LALLOZ Lucien	Chimie organique
M.	LEROY Pierre	Physico-chimie appliquée à la formulation pharmaceutique
M.	MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M.	MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M.	MARTIN Jean Armand	Chimie minérale et Minéralogie
M.	MORTIER François	Pharmacognosie
M.	NICOLAS Alain	Chimie analytique et Bromatologie
M.	REGNOUF DE VAINS Jean Bernard	Chimie Thérapeutique
Mme	SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie - Parasitologie
M.	SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie
M.	SIEST Gérard	Chimie Biologique
M.	SIMON Jean Michel	Droit et Economie de la Santé
M.	VIGNERON Claude	Hématologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M.	BONNEAUX François	Chimie Thérapeutique
M.	CATAU Gérald	Pharmacodynamie
M.	CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M.	CHILLON Jean Marc	Pharmacologie
M.	COLLIN Jean François	Pôle européen
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M.	DUCOURNEAU Joël	Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Mme	FAIVRE-FIORINA Béatrice	GBM - Hématologie
M.	FERRARI Luc	Biochimie
Mle	FONS Françoise	Biologie Végétale et Mycologie
Mme	FUZELLIER Marie Claude	Pharmacognosie
M.	GANTZER Christophe	Virologie
M.	GIBAUD Stéphane	Pharmacie Clinique
Mme	HASENFRATZ-SAUDER Marie Paule	Biologie Végétale
Mle	HINZELIN Françoise	Biologie végétale et Pharmacognosie
M.	HUMBERT Thierry	Interactions moléculaires
Mle	IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
M.	JORAND Frédéric	Santé et Environnement
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie Galénique
Mme	LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme	LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme	MARCHAL-HEUSSLER Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MONAL Jean Louis	Chimie Thérapeutique
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDIAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PICHON Virginie	Biophysique
Mme	POCHON Marie France	Chimie analytique
Mme	ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
M.	VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme	WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

ASSISTANTS

Mme	BEAUD Mariette	Biologie Cellulaire
Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Botanique
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie
Mme	PAVIS Annie	Parasitologie
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacodynamie

PROFESSEUR ASSOCIE

Mme	GRISON Geneviève	Pratiques officinales
-----	------------------	-----------------------

PROFESSEUR AGREGÉ

M.	COCHAUD Christophe	Anglais
----	--------------------	---------

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur Alain NICOLAS
Professeur de Chimie Analytique

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Nous tenons à vous remercier pour votre aimable concours tout au long de ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de notre respect et de notre profonde reconnaissance.

A NOTRE DIRECTEUR DE THESE

Monsieur **Manh Thong CUNG**
Directeur de Recherche au CNRS

Vous nous avez accueilli au sein du
Laboratoire de Chimie Physique
Macromoléculaire.

Vos précieux conseils ont permis de guider
ce travail.

Veillez trouver ici l'expression de notre
gratitude et de notre admiration.

A NOTRE JUGE

Madame Chantal FINANCE
Doyen de la Faculté de Pharmacie de Nancy

Pour l'honneur que vous nous avez fait en acceptant de participer à notre jury de Thèse.

Nous vous remercions pour votre disponibilité au cours de ce travail et pour vos précieux conseils.

Veillez trouver ici l'expression de notre considération et de notre profond respect.

A NOTRE JUGE

Madame Christine HEMMERLIN
Ingénieur de Recherche au CNRS

Pour avoir également accepté de juger avec intérêt cette Thèse.

Nous avons été touché par votre soutien au cours de ce travail ainsi que par votre gentillesse.

Soyez assurée de notre sincère reconnaissance et de toute notre sympathie.

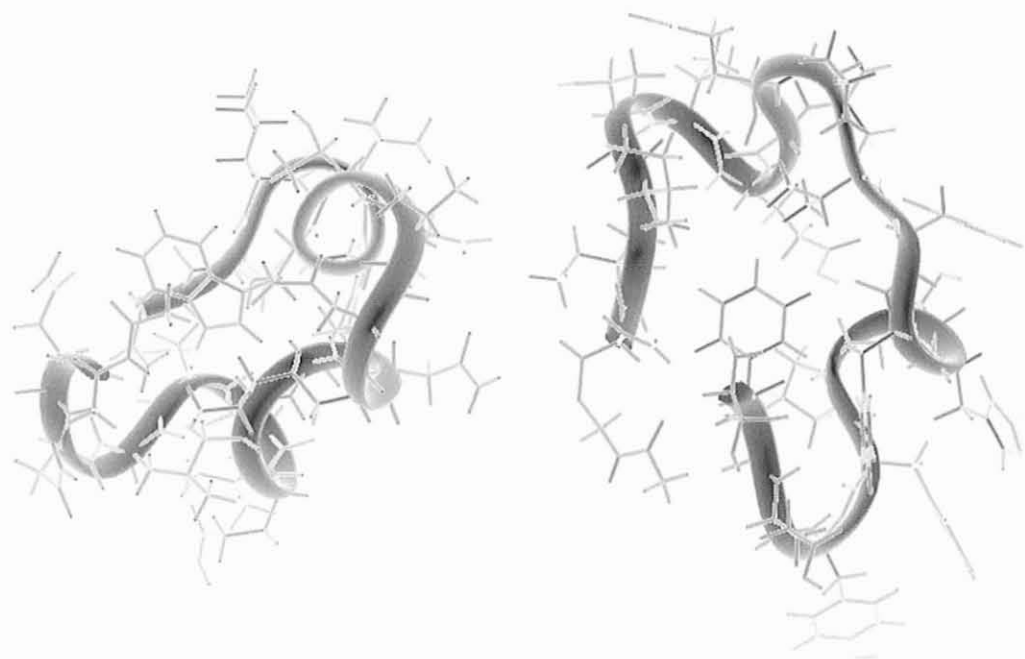
1^{ERE} PARTIE : LA MALADIE DE GOUGEROT-SJÖGREN

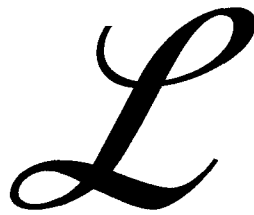
A.	INTRODUCTION	5
	<i>I. DEFINITION</i>	5
	<i>II. CONTROVERSE AUTOUR DE LA DEFINITION DU SYNDROME DE SJÖGREN</i>	7
B.	EPIDEMIOLOGIE	12
C.	PHYSIOPATHOLOGIE	15
	<i>I. INTRODUCTION</i>	15
	<i>II. LES LESIONS PATHOLOGIQUES ET LEUR ENVIRONNEMENT</i>	16
	<i>III. ROLE DES CELLULES EPITHELIALES</i>	18
	<i>IV. AUTOANTIGENES / AUTOANTICORPS</i>	22
	IV.1. STRUCTURES ET FONCTIONS DE RO/SSA ET DE LA/SSB	23
	IV.2. IMPLICATION PATHOLOGIQUE	24
	IV.3. DETECTION DES ANTICORPS	26
	<i>V. APOPTOSE</i>	29
	<i>VI. ROLE DES VIRUS</i>	34
	VI.1. LES VIRUS DU GROUPE HERPES	35
	VI.2. LES RETROVIRUS	35
	VI.3. LE VIRUS DE L'HEPATITE C	36
	<i>VII. NOUVELLES APPROCHES, RECEPTEURS MUSCARINIQUES</i>	37
	VII.1. PHYSIOLOGIE DE LA SECRETION	37
	VII.2. DYSFONCTIONNEMENT DU TISSU GLANDULAIRE	39
	<i>VIII. SUSCEPTIBILITE GENETIQUE</i>	40
	<i>IX. RESUME</i>	41
D.	CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET EXAMENS DIAGNOSTIQUES	45
	<i>I. MANIFESTATIONS EXOCRINIENNES</i>	46
	I.1. ATTEINTE DES GLANDES LACRYMALES	46

I.1.1.	Test de Schirmer	47
I.1.2.	Test de la coloration au rose Bengale	49
I.2.	ATTEINTE DES GLANDES SALIVAIRES	50
I.2.1.	Symptômes cliniques	50
I.2.2.	Explorations complémentaires	54
I.3.	AUTRES ATTEINTES VISCERALES	56
II.	<i>MANIFESTATIONS SYSTEMIQUES</i>	57
II.1.	MANIFESTATIONS ARTICULAIRES	58
II.2.	MANIFESTATIONS PULMONAIRES	58
II.3.	MANIFESTATIONS RENALES	58
II.4.	MANIFESTATIONS NEUROLOGIQUES	59
II.5.	MANIFESTATIONS VASCULAIRES	59
III.	<i>FATIGUE ET FIBROMYALGIE</i>	60
IV.	<i>ANOMALIES BIOLOGIQUES ET IMMUNOLOGIQUES</i>	61
V.	<i>LYMPHOME</i>	62
VI.	<i>FEMMES ENCEINTES</i>	64
E.	EVOLUTION ET THERAPEUTIQUE	65
I.	<i>TRAITEMENT DES MANIFESTATIONS GLANDULAIRES</i>	65
I.1.	YEUX SECS	65
I.2.	TRAITEMENTS POUR BOUCHE SECHE.	67
I.3.	NOUVELLES APPROCHES DE LA STIMULATION DES FONCTIONS SALIVAIRES ET LACRYMALES DANS LE SYNDROME DE GOUGEROT-SJÖGREN	68
II.	<i>APPROCHES DE LA THERAPIE POUR LES MANIFESTATIONS SYSTEMIQUES</i>	69
F.	CONCLUSION	71
2^{EME} PARTIE : ANALYSE STRUCTURALE PAR RMN ET MODELISATION		
<u>MOLECULAIRE DES PEPTIDES COMPLEMENTAIRE ET NON-</u>		
<u>COMPLEMENTAIRE DU PEPTIDE LA/SSB, EPITOPE</u>		
<u>AUTOANTIGENE DES LYMPHOCYTES B</u>		
		72
A.	INTRODUCTION / EXPOSE DU PROBLEME	73
B.	RAPPELS SUR LA STRUCTURE DES PEPTIDES	77

I.	CONFORMATION DU SQUELETTE PEPTIDIQUE	77
II.	CARTE CONFORMATIONNELLE	78
C.	RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE	80
I.	ACQUISITION DES DONNEES	80
II.	ATTRIBUTION DES SIGNAUX	80
III.	EFFET DE LA TEMPERATURE	87
D.	ANALYSE CONFORMATIONNELLE	89
I.	CONTRAINTES ANGULAIRES	89
II.	CONTRAINTES DE DISTANCE	95
II.1.	QUANTIFICATION DES EFFETS NOE	95
II.2.	DIAGRAMME DES EFFETS NOE	97
E.	MODELISATION MOLECULAIRE	103
I.	DESCRIPTION DE LA METHODE	103
II.	LA MINIMISATION D'ENERGIE	104
III.	LE RECUIT SIMULE ET LA DYNAMIQUE MOLECULAIRE	105
F.	DISCUSSION	106
I.	PEPTIDE COMPLEMENTAIRE	106
I.1.	DETERMINATION DES STRUCTURES TERTIAIRES	106
I.2.	LIAISONS HYDROGENE INTRAMOLECULAIRES	109
II.	PEPTIDE NON COMPLEMENTAIRE	114
II.1.	DETERMINATION DES STRUCTURES TERTIAIRES	114
II.1.1.	Famille F	117
II.1.2.	Famille O	118
II.2.	LIAISONS HYDROGENE INTRAMOLECULAIRES	119
G.	CONCLUSION	122
	CONCLUSION GENERALE	124
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	127

Introduction générale





l'histoire du syndrome de Gougerot-Sjögren (SGS) remonte à environ 112 ans [1]. Elle a commencé à la fin de l'ère victorienne (1888) mais n'a pris son véritable envol que vers les années 80. Entre temps, le monde scientifique manquait d'éléments pour déterminer les causes de cette pathologie et d'une manière plus générale de toute autre maladie auto-immune. C'est uniquement au cours de ces deux dernières décennies, quand des percées majeures au niveau des connaissances ont été réalisées (notamment sur le cycle cellulaire, l'exploration fonctionnelle, l'immunologie, l'activation cellulaire, l'apoptose...), que des voies se sont enfin ouvertes vers la compréhension de certains mécanismes pathogéniques de cette maladie.

Aujourd'hui encore, ce syndrome reste controversé. Ses symptômes sont nombreux et leurs méthodes de diagnostic variées. Il en a résulté de nombreux systèmes de classification [2-9]. Ce manque d'uniformité dans les critères conduit à une confusion dans la pratique clinique et dans les publications scientifiques. Par exemple, l'incidence d'une maladie particulière en association avec le SGS (comme un lymphome) ou les réponses à une thérapie particulière sont directement affectées par l'inclusion et l'exclusion de certains critères pour le groupe étudié.

Pour remédier à cela, des tentatives sont en cours pour essayer d'unifier les différents critères et avoir un seul système de classification international. En attendant, les professionnels de la santé doivent traiter les études publiées sur le sujet avec précaution en analysant les différences entre critères diagnostics d'inclusion et d'exclusion.

D'autre part, étant donné le nombre élevé et varié des symptômes, ce syndrome reste difficile à diagnostiquer. Les patients risquent par conséquent de voir différents médecins spécialistes. Il est toutefois impératif d'identifier les personnes atteintes de cette maladie en vue de prévenir toute implication des

organes extra-glandulaires et de rassurer les autres qui n'ont pas de preuves d'un désordre systémique. Par exemple, prenons le cas d'un individu se plaignant de sécheresse oculaire. Ce symptôme peut être dû au SGS, mais il pourrait, tout simplement, être le résultat d'une augmentation générale du nombre d'heures de travail passées devant l'écran d'un ordinateur dans un environnement faible en humidité ou encore d'une prise médicamenteuse.

Il est important que le pharmacien s'informe auprès du patient de tous ses traitements, et, dans le cas du SGS, qu'il soit familiarisé avec les médicaments prescrits aussi bien par le rhumatologue, que le dentiste, l'ophtalmologue, l'oto-rhino-laryngologiste, le dermatologue, le pneumologue, le neurologue, le gynécologue ou tout autre thérapeute pouvant rencontrer les patients souffrant de cette maladie.

Le pharmacien peut aussi jouer un rôle central dans cette maladie pour tout ce qui est relatif aux soins du patient : son rôle de coordinateur entre les différents praticiens est essentiel d'autant plus que certains spécialistes pourraient avoir moins d'expérience devant les besoins thérapeutiques particuliers de ces patients. Ainsi, certains médicaments prescrits (psychotropes...) pourraient notamment exacerber les symptômes de sécheresse, l'une des plus grandes caractéristiques de cette maladie.

Dans la première partie de ce travail, nous définirons le syndrome de Gougerot-Sjögren. Nous listerons ensuite les critères pour son diagnostic, décrirons son épidémiologie, discuterons les conditions de survenue de la maladie, aborderons enfin l'évaluation des symptômes et les options de traitement actuel. Dans une seconde partie, nous traiterons d'une nouvelle approche de traitement et nous détaillerons notre contribution, via la modélisation moléculaire, à la concrétisation potentielle de cette nouvelle voie.

*1^{ère} partie : La maladie
de
Gougerot-Sjögren*

A. Introduction

I. Définition

Le syndrome de Gougerot-Sjögren est une **maladie auto-immune inflammatoire chronique de cause inconnue**. Elle est souvent caractérisée par une diminution de la sécrétion des glandes lacrymales, déterminant une **xérophtalmie**, et par une réduction de la sécrétion des glandes salivaires, responsable d'une **xérostomie**, d'où la dénomination de "syndrome sec" souvent utilisée [10-12].

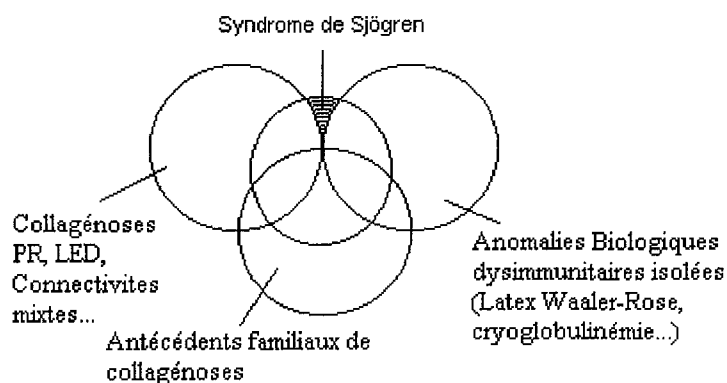


Figure 1. Le syndrome de Gougerot-Sjögren : syndrome-carrefour au sein des collagénoses. [13]

Le SGS est lié à l'infiltration lympho-plasmocytaire des glandes exocrines, notamment salivaires et lacrymales, mais aussi de nombreux autres organes, expliquant le polymorphisme clinique de cette affection. En effet, chez plus d'un tiers des patients, la maladie peut inclure des sites extra-glandulaires affectant les reins, les poumons, les vaisseaux sanguins et le foie [14].

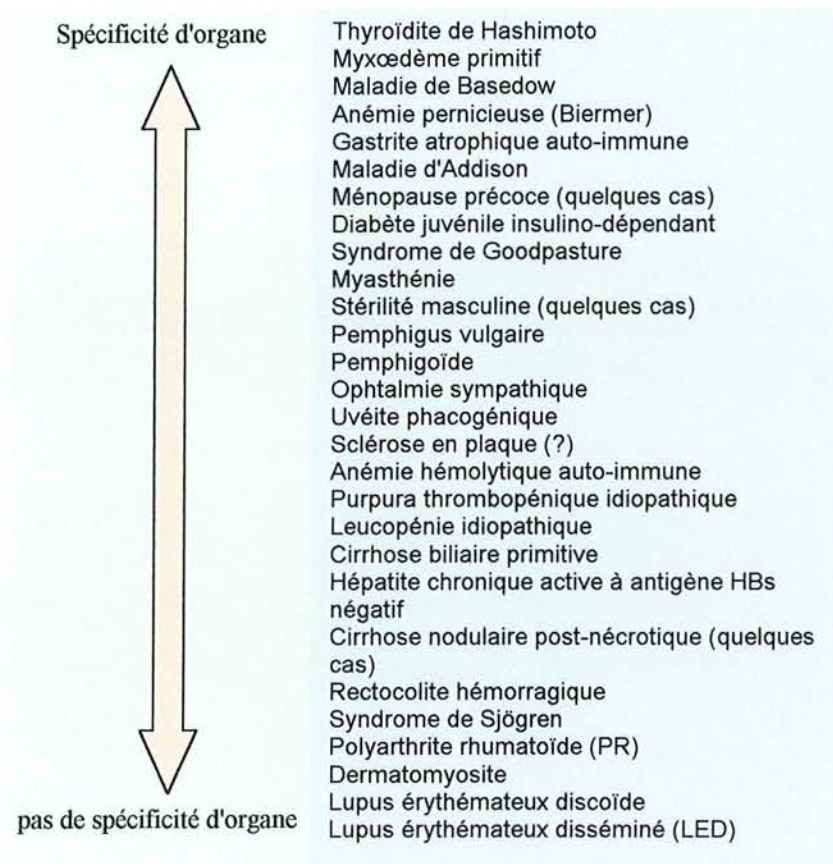


Figure 2. Eventail des maladies auto-immunes [15].

Ce syndrome lympho-exocrinien peut survenir seul : il s'agit alors du *syndrome de Gougerot-Sjögren primitif* ou pSS. Dans d'autres cas, il est associé à une autre connectivite ou maladie auto-immune : il s'agit alors du *syndrome de Gougerot-Sjögren secondaire* ou sSS (Tab.1). Des différences cliniques, sérologiques et immunogénétiques existent entre ces deux variétés de SGS.

Par ailleurs, le SGS constitue un syndrome carrefour d'une part au sein des collagénoses (Fig.1), d'autre part au sein des maladies auto-immunes (Fig.2) et enfin entre les maladies auto-immunes et les syndromes lymphoprolifératifs. En effet, une proportion significative de patients est susceptible de développer des affections lymphoprolifératives malignes, comme le lymphome à cellules B suite à une expansion clonale des lymphocytes B [8].

Tableau I. Circonstances au cours desquelles le syndrome de Gougerot-Sjögren secondaire est possible [16].

- *Il est classique dans :*
 - la polyarthrite rhumatoïde
 - le lupus érythémateux disséminé
 - la sclérodermie systémique (forme CREST)
- *Il est fréquent dans :*
 - la polymyosite/dermatomyosite
 - la cirrhose biliaire primitive
 - la thyroïdite
 - la connectivite mixte
- *Il est possible dans :*
 - le diabète juvénile insulino-dépendant
 - l'artérite temporale de Horton
 - le SIDA

II. Controverse autour de la définition du syndrome de Sjögren

Tout au long de son histoire, le SGS est resté une pathologie controversée. Son étude est compliquée par les manifestations cliniques diverses, les résultats variés des différents laboratoires de recherche et le manque de critères de diagnostic bien définis et acceptés communément. Il existe cependant quelques signes majeurs dans cette maladie :

- Une accumulation des cellules lymphoïdes dans les glandes exocrines,
- une baisse fonctionnelle de l'activité sécrétoire exocrine qui en résulte (avec une xérostomie et une xérophtalmie encore appelée **kérato-conjonctivite sèche** ou KCS),

- et une production d'autoanticorps.

Différents ensembles de critères de classification ont été proposés par le passé pour le SGS [2-7]. Ils ont généralement été formulés par des experts sur la base de leurs expériences cliniques ou dérivent de données recueillies dans un seul centre. Aucun d'entre eux n'est utilisé de façon unanime par la communauté scientifique [17]. Ces différents tests diagnostics sont résumés dans le tableau II.

De cette table, il ressort qu'une biopsie des glandes salivaires accessoires (minor salivary glands) est l'examen incontournable pour l'établissement du diagnostic d'un SGS. Dans la pratique, cela requiert un prélèvement sans gravité d'une glande salivaire au niveau de la lèvre inférieure. Cependant, l'inconfort relatif généré par cette biopsie limite parfois son utilisation. Le diagnostic est alors basé uniquement sur d'autres signes et symptômes caractéristiques ainsi que sur la présence d'autoanticorps antinucléaires.

<i>Symptômes subjectifs et tests diagnostiques</i>	Daniels TE et al. [2]	Manthorpe R et al. [3]	Skopouli FN et al. [4]	Fox RI et al. [5]	Homma M et al. [6]
<i>Symptômes oculaires subjectifs</i>	-	-	+	-	-
<i>Evaluation objective oculaire</i>					
Test de Schirmer I	+	+	+	+	+
Test au Rose Bengale	+	+	+	+	+
Test du temps de rupture du film lacrymal	+	+	-	-	-
Test à la Fluorescéine	-	-	+	+	+
<i>Symptômes oraux subjectifs</i>	-	-	+	+	-
<i>Evaluation des glandes salivaires</i>					
Mesure du flux salivaire avant stimulation	-	+	-	+	-
Mesure du flux salivaire après stimulation	-	-	+	+	+
Sialographie parotidienne	-	-	-	-	+
Scintigraphie des glandes salivaires	-	+	-	-	-
<i>Glande salivaire accessoire</i>					
Histopathologie	+	+	+	+	+
<i>Autoanticorps</i>					
Facteur rhumatoïde	-	-	-	+	-
Anticorps antinucléaires	-	-	-	+	-
Anticorps anti-Ro ou anti-La	-	-	-	+	-

(+) inclus ou (-) non inclus dans l'ensemble de critères. * considéré comme condition *sine qua non* pour la classification.

Tableau II. Comparaison de différents ensembles de critères de classification proposés avant 1990.

Nous observons aussi dans le tableau II que, même si la composante xérophtalmique du SGS est relativement bien définie, les critères de classification de la composante orale sont controversés.

Pour ces raisons, un groupe de chercheurs européens a entrepris, entre 1988 et 1996, une étude multicentrique durant laquelle de nouveaux critères de classification ont été définis et validés (*Tab.III*) **[8,9,18]**. Rapidement, ces critères européens ont été très largement acceptés pour classer les patients présentant un pSS ou un sSS. Ils sont aujourd'hui parmi les plus utilisés. Ils devraient, par ailleurs, conduire à un plus grand accord sur l'incidence de ce syndrome.

En analysant le tableau III, nous remarquons que le facteur rhumatoïde et les anticorps antinucléaires, autres que les anti-SSA ou anti-SSB, sont exclus des nouveaux critères. Ces marqueurs ont été évoqués auparavant par les autres groupes de classification mais aussi dans d'autres études après 1996 **[19]**.

Notons également que ces critères se limitent, pour les tests sérologiques, à la présence ou l'absence d'anti-SSA ou anti-SSB, sans spécifier ni la méthode de recherche, ni la concentration d'anticorps minimale à obtenir.

-
- I – Symptômes oculaires : Une réponse positive à au moins l'une des 3 questions.
1. *Avez-vous eu, quotidiennement, d'une manière persistante, des troubles de sécheresse oculaire durant plus de 3 mois ?*
 2. *Avez-vous une sensation récurrente de sable ou de gravier dans les yeux ?*
 3. *Utilisez-vous des larmes artificielles plus de 3 fois par jour ?*
- II – Symptômes oraux : Une réponse positive à au moins l'une des 3 questions.
1. *Avez-vous eu une sensation quotidienne de bouche sèche durant plus de 3 mois ?*
 2. *Avez-vous eu, étant adulte, des gonflements persistants ou récurrents des glandes salivaires ?*
 3. *Consommez-vous fréquemment des boissons pour vous aider à avaler les aliments secs ?*
- III – Signes oculaires : preuve objective de l'implication oculaire définie par un résultat positif pour au moins un des deux tests suivants :
- Test I de Schirmer (= 5 mm en 5 minutes)[§].*
- Score au Rose Bengale (= 4 selon le système d'évaluation van Bijsterveld)*
- IV – Histopathologie : nombre de foyers = 1 dans une biopsie de glande salivaire accessoire (un foyer est défini comme un agglomérat d'au moins 50 cellules mononuclées : le nombre de foyers est défini pour 4 mm² de tissu glandulaire)
- V – Implication des glandes salivaires : une preuve objective d'implication des glandes salivaires définie par un résultat positif pour au moins un des trois tests diagnostiques suivants :
- Scintigraphie salivaire*
- Sialographie parotidienne*
- Mesure du flux salivaire avant stimulation (= 1,5 ml en 15 minutes)[§]*
- VI – Autoanticorps : présence dans le sérum des autoanticorps suivants :
- Anticorps anti-Ro(SSA) ou anti-La(SSB), ou les deux.*
- REGLES DE CLASSIFICATION : *Chez les patients sans aucune maladie potentielle associée, la présence de 4 parmi les 6 critères est révélatrice de pSS.*
- Chez les patients avec une maladie associée (pour l'instant une autre connectivite), la présence des critères I et II plus 2 des 3 critères III, IV, V est révélatrice de sSS.*
- CRITERES D'EXCLUSION : *Lymphome préexistant, SIDA, sarcoïdose, maladie du greffon contre l'hôte ou une sialoadenose. Usage d'antidépresseurs, d'antihypertenseurs, de neuroleptiques ou de médicaments parasympholytiques.*
- [§] Comme il a été démontré que ce test peut être abaissé chez des sujets normaux après 60 ans, il devrait être exclu des critères ou considéré comme non fiable pour un diagnostic de SGS chez les sujets âgés.
-

Tableau III. Les critères de classification européens validés pour le SGS.

B. Epidémiologie

L'épidémiologie du SGS n'a pas été étudiée de façon systématique. De plus, l'évaluation de sa prévalence n'est pas une tâche aisée. Il convient, en effet, d'insister sur le manque de consensus international, notamment sur sa définition.

D'après l'OMS, la prévalence du SGS est inconnue [20]. Pour certains auteurs, il est considéré comme l'une des maladies auto-immunes les plus répandues. Il viendrait au deuxième rang des maladies auto-immunes, derrière la polyarthrite rhumatoïde (PR) (prévalence 1% [19]) ; mais devant le lupus érythémateux disséminé (LED) (prévalence 0,03% [19]) [11]. Il reste cependant une pathologie peu connue et moins étudiée que le LED par exemple.

Selon les critères utilisés, la prévalence du pSS varie de 0,04% à 4,8%. Cette variabilité importante de la fréquence estimée (plus d'un facteur 100 !) est en partie due aux différences entre les critères de classification utilisés, mais aussi à la différence entre l'âge des groupes étudiés et aux différentes méthodes employées pour apprécier l'hypofonctionnement salivaire et lacrymal. Un autre problème qui rend la comparaison difficile entre les études, est que les recommandations des divers ateliers (workshops) établissant des critères objectifs pour les tests ne sont pas toujours strictement suivies [21]. En effet, la biopsie de glandes salivaires est parfois considérée comme non éthique lors d'une étude (à la différence d'un diagnostic). De plus, elle n'est pas toujours acceptée par des patients à qui on demande de répondre à l'étude... D'autres facteurs peuvent aussi entrer en jeu comme la prise de certains médicaments ou encore le tabagisme [19].

Une étude épidémiologique récente en Suède, a estimé la prévalence du pSS dans la population adulte à 2,7%, une autre à 0,77% en Chine [20]. Aux Etats-Unis, il y a 10 ans, on estimait le nombre de patients atteints de SGS à moins de 100 000. Aujourd'hui, les estimations de sa prévalence varient entre 500 000 et 2 millions. Malgré cela, ce syndrome reste sous-diagnostiqué [22]. Le temps moyen entre le début des symptômes et le diagnostic est de 8 à 9 ans. Le SGS a été trouvé dans presque tous les grands pays du globe, et la distribution géographique des cas apparaît être relativement uniforme. Il affecte, comme la plupart des maladies auto-immunes, typiquement les femmes, avec plus de 90% des cas. Il survient généralement durant la quatrième ou la cinquième décennie de leur vie. Des cas isolés de SGS chez les enfants ont été signalés [23].

Outre la maladie, il a été démontré que l'âge des patients diagnostiqués selon la classification de Copenhague [3] influence certains de ces symptômes, comme les manifestations subjectives qui sont plus fréquentes chez les jeunes patients ou ceux d'âge moyen que chez les patients plus âgés [24].

D'autres études ont observé que l'expression immunologique, elle aussi, diffère dans des groupes d'âges variés. Des sous-groupes de patients ont ainsi été suggérés. En effet, des descriptions initiales ont attiré l'attention sur le manque d'anomalies immunologiques et sérologiques dans le groupe de personnes âgées atteintes de pSS. Plus tard, plusieurs enquêtes sur la population pédiatrique ont montré que les jeunes patients avaient une positivité des anticorps plus grande que celle des patients adultes. Lors d'une étude récente, il a été démontré que les patients adultes atteints de pSS, avec un début de maladie avant l'âge de 35 ans, avaient une fréquence plus grande d'autoanticorps et un risque de survenue de lymphomes plus élevé que les patients avec un début tardif de la maladie [24]. L'âge du début de la maladie a ainsi une valeur pronostique.

D'autres chercheurs ont trouvé par ailleurs que les patients séropositifs anti-SSA/SSB atteints de pSS avaient un début de maladie plus précoce (en moyenne 39 ans) que les patients séronégatifs (50 ans). Pour résumer, le jeune patient atteint de pSS aurait une prévalence plus grande de maladie immunologiquement active, comme indiqué par une fréquence plus grande

d'autoanticorps, que le patient plus âgé. En outre, puisque des études ont montré que la présence d'autoanticorps est associée aux manifestations extra-glandulaires dans le pSS, nous pouvons avancer que les jeunes patients auraient une fréquence plus élevée de ces manifestations que les patients adultes [24].

Par ailleurs, en plus de l'âge, le sexe du patient pourrait influencer la survenue ou non d'un certain nombre de symptômes. En effet, selon une étude récente, les femmes atteintes de SGS auraient des concentrations d'anticorps antinucléaires significativement plus élevées que les hommes et se plaindraient plus souvent de fatigue. Il n'y aurait pas de différences supplémentaires entre les 2 sexes pour les autres manifestations extra-glandulaires [25].

Enfin, en ce qui concerne le sSS, sa prévalence chez les sujets atteints de LED varie de 8 à 30% selon les études. Un nombre plus élevé a été observé chez les sujets atteints de PR où la prévalence de ceux qui ont en plus un SS varie de 31% selon une étude grecque à 55% dans des données espagnoles [19].

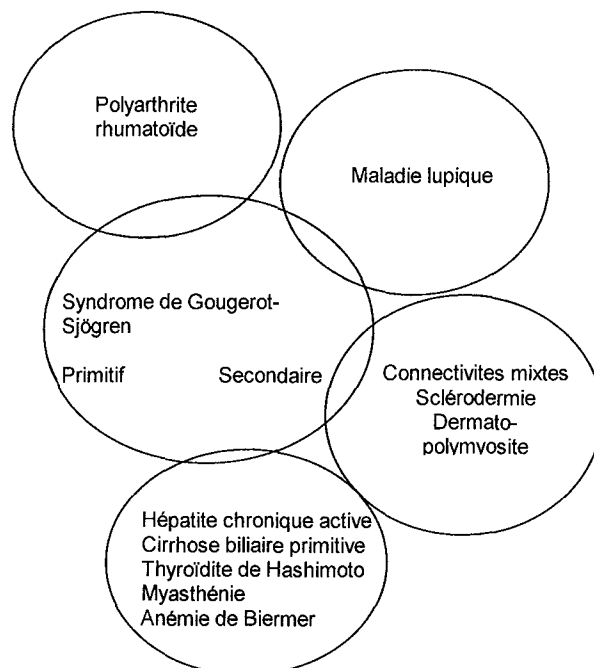


Figure 3. SGS : associations [11].

C. Physiopathologie

I. Introduction

Parler de la pathogénie de la maladie de Gougerot-Sjögren n'est pas simple. En effet, à l'instar de sa définition, les différents chercheurs ne sont, ici aussi, pas d'accord sur les mécanismes à l'origine de cette pathologie. Par exemple, si certains pensent que la diminution de la production salivaire est une conséquence directe de la destruction des glandes qui la sécrètent, d'autres observations révèlent que la xérostomie pourrait précéder toute destruction massive de tissu glandulaire acineux (Fig.4). Il y aurait donc un composé qui viendrait inhiber spécifiquement la sécrétion salivaire. L'atrophie du tissu glandulaire ne serait, par conséquent, que le résultat (et non plus la cause !!) de la perte de cette fonction sécrétoire [26].

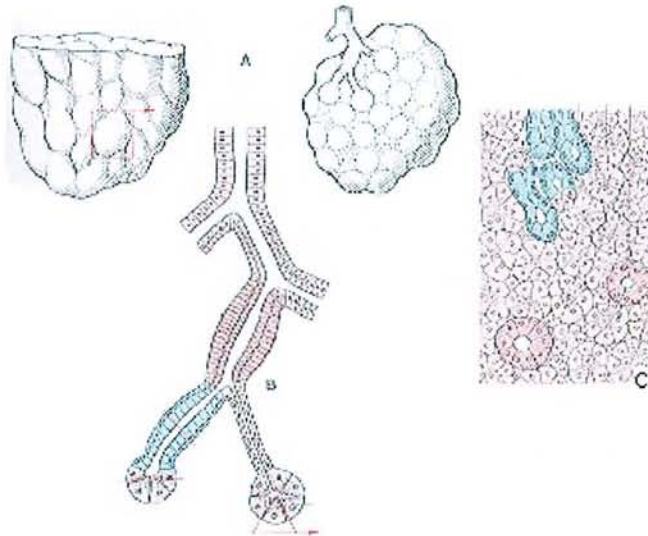


Figure 4. Structure des glandes salivaires. Plusieurs acini sont réunis par un tissu conjonctif en lobules glandulaires (A,B). Un exemple de la structure microscopique d'un lobule d'une glande salivaire se trouve en C [27].

En dépit de ces divergences, tout le monde s'accorde, néanmoins, à dire que le processus pathogénique de cette maladie est complexe, très probablement multi-factoriel et implique différentes molécules et cellules du système immunitaire organisées en un réseau inextricable d'interactions. Nous tâcherons, dans ce qui va suivre, de détailler les différents acteurs intervenant dans ce processus avant d'essayer dans un dernier chapitre de les regrouper pour bâtir un schéma d'ensemble.

II. Les lésions pathologiques et leur environnement

La pathologie principale du SGS concerne les glandes exocrines, surtout salivaires. L'histologie de la parotide ou encore des glandes sous-maxillaires (Fig.5) est reflétée par celle des glandes salivaires accessoires (GSA). Les biopsies de ces dernières sont indicatrices.

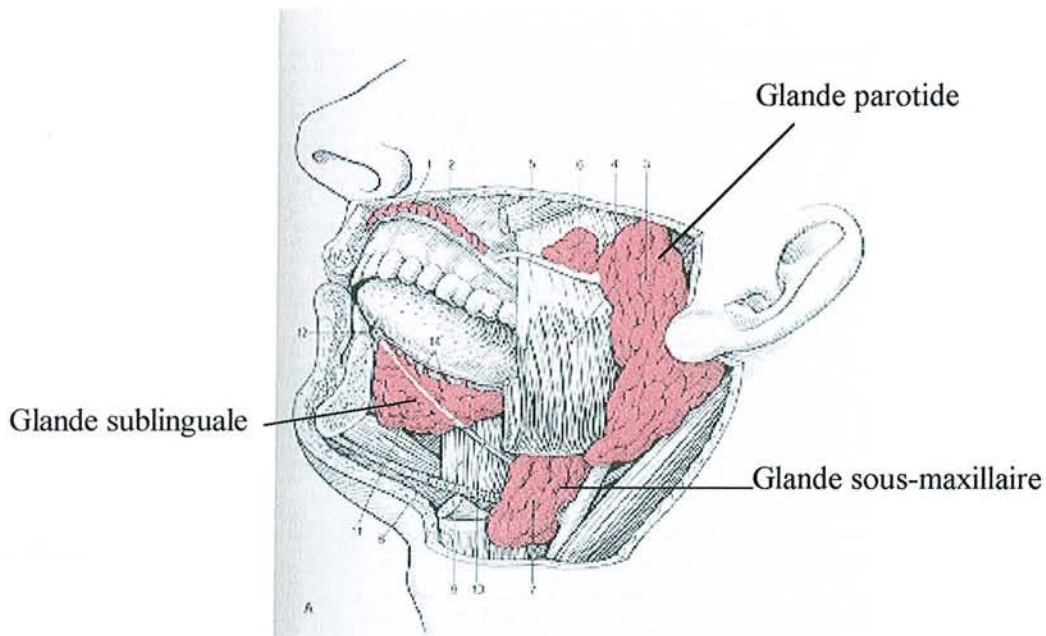


Figure 5. Représentation des principales glandes salivaires.

Les premières étapes de l'infiltration lymphocytaire, retrouvée dans le SGS, impliqueraient des changements au niveau des cellules endothéliales de la paroi des veinules post-capillaires des glandes sécrétoires. Ces cellules sont activées et expriment un ensemble de molécules d'adhésion. Une variété de cytokines et de chémokines (molécules attirant les lymphocytes) est libérée dans le milieu. Les cellules T CD4+ de la circulation sanguine adhèrent à cet endothélium. Cette adhésion se fait notamment grâce à la molécule LFA-1 (Lymphocyte Function Associated molecule). Cette intégrine est une glycoprotéine qui, avec son ligand ICAM-1 (Molécule d'Adhérence InterCellulaire-1), joue un rôle important dans la migration leucocytaire lors de l'inflammation. Les cellules T s'infiltrent donc dans la glande. Elles sont activées et libèrent l'IFN γ , l'IL-1, et le TNF- α (molécules qui aident à l'activation des cellules endothéliales et qui vont auto-entretenir le système) [15]. Cet infiltrat de cellules mononucléées va s'étendre progressivement et finira par remplacer le tissu fonctionnel [12]. D'ailleurs, l'histologie des glandes salivaires accessoires, lors de ce syndrome, est très spécifique (Fig.6).

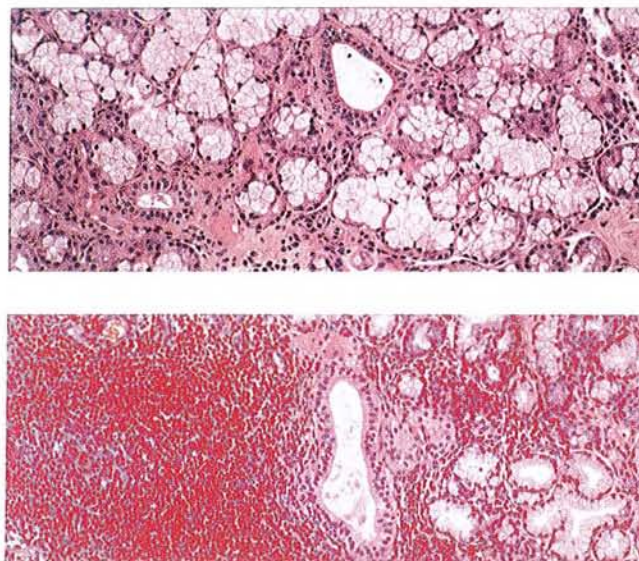


Figure 6. Histologie d'une glande salivaire lors d'un syndrome de Sjögren.
En haut : la glande normale ne présente pas d'infiltration lymphocytaire.
En bas : lors d'un syndrome de Sjögren, il y a un infiltrat important de cellules mononucléées autour des canaux excréteurs.

L'analyse des cellules infiltrantes révèle que la majorité est composée de lymphocytes T. Ces derniers expriment sur leur surface la molécule d'adhésion LFA-1. Ils sont, par ailleurs, dans 60-70% des cas, des lymphocytes T CD4+ (lymphocytes T auxiliaires). Ces cellules sont en majorité pourvues d'antigènes de maturation (la molécule CD29 est exprimée et le complexe CD45RA transformé en CD45RO) et de marqueurs d'activation (antigènes HLA de classe II et récepteurs de l'interleukine 2). Il s'agit donc de lymphocytes mémoires activés [16].

Des cellules B activées sont également trouvées dans la biopsie de la glande. Leur activation polyclonale explique notamment l'hypergammaglobulinémie, souvent présente dans ce syndrome, ou encore la sécrétion de nombreux anticorps. Ces immunoglobulines sont caractérisées par la prédominance des isotypes IgG et IgM, au contraire des cellules B des glandes salivaires normales où l'isotype IgA est majoritaire [28].

Enfin, les monocytes, les macrophages (qui sont l'une des principales Cellules Présentatrices de l'Antigène ou CPA) et les cellules Natural Killer (NK) sont peu présentes au sein des lésions. Concernant ces cellules tueuses naturelles, des chercheurs pensent que des troubles de leur activité pourraient être un des éléments expliquant la fréquence relative des maladies lymphoïdes malignes au cours de cette affection [11].

III. Rôle des cellules épithéliales

Le déficit en cellules spécialisées dans la présentation de l'antigène (monocytes, macrophages) au niveau des lésions pathologiques lors du SGS, a relancé les recherches. En effet, il est important d'identifier les cellules qui joueraient un tel rôle dans le cas de SGS et de comprendre comment les différents acteurs interagissent et communiquent au niveau de ces lésions. Pour la première question, beaucoup pensent à un rôle des cellules épithéliales. Pour la seconde, les recherches se sont tout naturellement orientées vers les

différentes interleukines. Des données intéressantes sur la production de ces cytokines depuis les glandes salivaires de patients atteints de SGS ont pu être recueillies (*Tab.IV*).

	IL1 β	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IFN- γ	TNF- α	TGF- β
Cellules T	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellules épithéliales	+	-	-	+	-	-	+	-

Tableau IV. Profil de la production de cytokines par les infiltrats des lymphocytes T et par les cellules épithéliales dans les biopsies des glandes salivaires accessoires chez les patients atteints de SGS [14].

Nous remarquons dans ce tableau que l'IL-1 β et l'IL-6 sont aussi exprimées par les cellules épithéliales des glandes salivaires accessoires. Ceci est un argument en faveur de la participation active de ces cellules à la réponse inflammatoire, plutôt que d'être des cibles passives. D'autres études révèlent, par ailleurs, que ces cellules expriment des molécules du complexe majeur d'Histocompatibilité de classe II (CMH II). Cette expression permettrait aux cellules épithéliales de présenter l'antigène aux cellules T CD4+ infiltrantes, amplifiant ainsi et perpétuant les réactions immunitaires au sein des GSA [14]. Les lymphocytes T reconnaissent l'antigène associé aux molécules du CMH grâce à leur récepteur TCR (T Cell Receptor).

Cependant, lors de l'interaction entre les cellules T et les CPA, d'autres molécules sont nécessaires pour la transformation des lymphocytes. Ces molécules ont pour fonction de délivrer, conjointement au TCR, un cosignal d'activation appelé "deuxième signal". En l'absence de ce deuxième signal, les cellules T exposées à l'antigène seraient soit inactivées, ce qui aboutirait à un état de tolérance spécifique des cellules T auxiliaires désigné sous le nom d'"anergie clonale", soit auto-détruites (*Fig.7*) [29]. Les plus puissantes molécules de costimulation sont B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86). Ces protéines sont exprimées de façon constitutive ou induite sur de nombreuses CPA. Ce sont des ligands de molécules membranaires des lymphocytes T : CD28 et son

homologue CTLA-4 dont l'expression est augmentée au cours de l'activation des lymphocytes T. La stimulation par la voie de CD28 prolonge et augmente la production de l'IL-2 (responsable de la prolifération des cellules T), et celle d'autres cytokines [15].

Or, justement, des études immunohistochimiques des biopsies de GSA chez des patients atteints du SGS ont révélé que les molécules B7-1 et B7-2 étaient exprimées par les cellules épithéliales, tandis que CD28 a été localisé dans les infiltrats des lymphocytes T. L'expression de ces molécules de costimulation, dans les biopsies des GSA chez un groupe de patients contrôle, était négative [14,30].

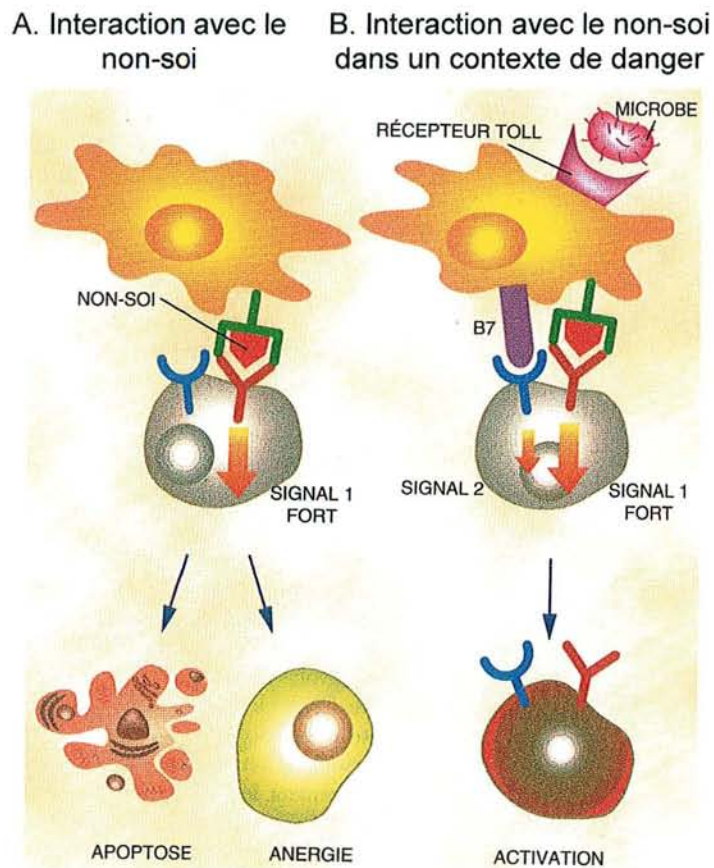


Figure 7. Une interaction de haute affinité entre les récepteurs d'un lymphocyte et le non-soi (A) transmet un signal fort (signal 1), qui, s'il est seul, entraîne l'autodestruction du lymphocyte ou son inactivation (anergie). En revanche, quand le lymphocyte reçoit non seulement un premier signal fort, mais aussi un second signal (B), qui lui est transmis par la cellule dendritique lorsqu'elle détecte un danger, le lymphocyte est activé et se transforme en combattant [29].

Enfin, d'autres chercheurs ont pensé à un rôle du monoxyde d'azote dans le SGS [31]. En effet, NO, avec le $TNF\alpha$, fait partie des nombreux mécanismes cytotoxiques dont disposent les cellules myéloïdes. Des études ont révélé que les cellules épithéliales acineuses et ductales des glandes salivaires expriment l'iNOS (iNOS : inducible nitric oxide synthase) sous l'action d'un certain nombre de cytokines (dont $IFN\gamma$, IL-1, $TNF\alpha$). Cette enzyme est responsable de la conversion de L-arginine en NO et L-citrulline. Il en résulte une augmentation de la production de NO dans les GSA des patients atteints de SGS.

Au vu de tous ces résultats, il devient clair que les cellules épithéliales des glandes exocrines affectées présentent des propriétés d'activation cellulaire (comme l'expression de proto-oncogènes (*c-myc*) ou encore de cytokines pro-inflammatoires). De même, elles acquièrent des capacités de présentation d'antigène, avec une expression inappropriée d'HLA-DR et de molécules de costimulation. Elles jouent par conséquent un rôle dans le processus pathogénique de la maladie de Gougerot-Sjögren.

Propriétés des cellules épithéliales

Production de cytokines (IL-1 β , IL-6, $TNF-\alpha$)

Expression d'iNOS

Expression d'HLA-DR

Expression de proto-oncogènes (*c-myc*)

Expression de molécules de costimulation (B7-1, B7-2)

Expression d'autoantigènes (La/SSB, α -fodrine)

Expression de molécules reliées à l'apoptose (Fas, FasL, Bax)

Expression de facteurs de régénération (pS2)

Tableau V. Propriétés des cellules épithéliales des biopsies des glandes salivaires accessoires chez les patients atteints de SGS. (FasL : ligand Fas) [14].

IV. Autoantigènes / Autoanticorps

La réponse anticorps dans le SGS est essentiellement dirigée contre deux antigènes. Ces derniers sont deux ribonucléoprotéines connues sous les noms de SSA (Sjögren's Syndrome A) et de SSB [32-36]. Ils correspondent respectivement dans l'ancienne nomenclature à Ro et La. De nombreux autres anticorps ont néanmoins été décrits au cours du SGS : le facteur rhumatoïde, présent surtout dans le syndrome sec associé à la polyarthrite rhumatoïde (60% des cas), les anticorps anti-cellules pariétales de l'estomac (20% des observations), les anticorps anti-canaux excréteurs des glandes salivaires (environ 50% des cas) ou encore tout dernièrement des anticorps anti- α fodrine, des anticorps anti-CD4 et des anticorps anti-*Helicobacter pilori*. [11,14,37-39].

La présence d'autoanticorps anti-Ro/SSA et anti-La/SSB chez des patients atteints du SGS a été décrite depuis 1975 [35]. Si les anti-Ro/SSA sont présents chez 30 à 50% des patients atteints de lupus systémique, ces anticorps précipitants sont, par contre, plus fréquents dans le SGS et sont retrouvés chez 50 à 90% des sujets. Nous les retrouvons aussi chez 10-20% des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde. Les anticorps anti-La/SSB sont, eux, présents dans approximativement les mêmes proportions chez les patients qui souffrent du SGS, mais à un degré moindre chez les patients atteints de lupus érythémateux systémique (18-25%). *Ainsi, ces derniers autoanticorps semblent être plus spécifiques du SGS que les anti-Ro/SSA [40].*

Bien que l'origine de ces autoantigènes ne soit pas claire, leur site de production semble être les glandes exocrines affectées. En effet, certaines études ont démontré que les GSA des patients atteints de pSS, avec une sérologie anti-La positive, sont un site d'expression de l'ARNm de La/SSB. C'est là une preuve qu'il existe une synthèse active de cet antigène au sein de ces organes, par rapport à des patients souffrant de sialadénites non spécifiques par

exemple [41]. Quant aux autoanticorps, ils sont présents sur les lieux de l'inflammation. Des chercheurs ont, en effet, retrouvé des anti-Ro/SSA et des anti-La/SSB dans le cytoplasme de cellules plasmiques infiltrant les GSA, et la salive de ces patients est riche en anticorps anti-La [41].

La production d'autoanticorps *in situ*, avec la surexpression d'ARNm de La/SSB, laisse à penser qu'ils sont produits après une stimulation antigénique.

IV.1. Structures et fonctions de Ro/SSA et de La/SSB

La molécule Ro/SSA, initialement localisée dans le cytoplasme, contient au moins deux composants protéiques de masse moléculaire de 52 kDa et 60 kDa en association non covalente avec un petit ARN cytoplasmique. Cet ARN est en fait, selon les cas, l'un des quatre ARN de 83 à 112 nucléotides, appelés hYARN (human cYtoplasmic RNA). De plus, ces ARN sont formés par l'ARN polymérase III et possèdent tous une chaîne polyuracile à l'extrémité 3' terminale. Le motif antigénique reconnu par les anticorps semble être porté par la partie protéique de la molécule car une digestion par une ARNase ne semble pas altérer son activité. La fonction biologique de la protéine Ro/SSA n'est pas très comprise [42-47].

La protéine La/SSB a, quant à elle, une masse moléculaire de 46,7 kDa et peut être associée à tous les transcrits de l'ARN polymérase III, y compris l'hYARN. Cet antigène joue un rôle dans plusieurs fonctions biosynthétiques comme la transcription ou la conservation d'ARNm. Il est notamment impliqué dans la liaison avec des ARN viraux d'adénovirus ou du virus d'Epstein-Barr (EBV). Il intervient également dans l'expression de certains gènes du poliovirus ou du VIH. Ainsi, il a été démontré que l'infection d'un certain nombre de lignées cellulaires comme les cellules HeLa ou Vero avec des adénovirus, cytomegalovirus ou encore HSV (Herpes Simplex Virus), multipliait, par un facteur de 2 à 15, l'expression de la protéine La/SSB. En outre, cette protéine peut être transportée activement du noyau vers le cytoplasme et *vice versa*,

grâce à une séquence spécifique appelée séquence de localisation nucléaire (Nuclear Localization Sequence : NLS), pour accomplir son rôle physiologique dans la transcription. Elle joue le rôle de facteur de terminaison de transcription pour l'ARN polymérase III et de navette, transportant des ARN du noyau vers le cytoplasme. Selon certains chercheurs, le complexe Ro/SSA est associé, au moins d'une manière transitoire, à la protéine La/SSB [28,35,41,47-49].

L'implication directe des autoanticorps anti-Ro/SSA et anti-La/SSB dans le mécanisme pathogénique du SGS n'a pas encore été démontrée. Toutefois, des observations indirectes laissent supposer qu'ils auraient un rôle non négligeable.

IV.2. Implication pathologique

Les autoanticorps IgG et IgM anti-Ro/SSA et anti-La/SSB sont retrouvés plus communément chez des personnes touchées par le pSS, atteintes précocement, avec une évolution plus longue de la maladie. D'ailleurs, chez ces dernières, on retrouve souvent une inflammation des glandes parotides et/ou des autres glandes salivaires principales et les biopsies de leurs GSA montrent des infiltrations lymphocytaires intenses. De plus, ces patients présentent fréquemment les manifestations systémiques de la maladie avec une hypergammaglobulinémie, une vasculite ou encore une cryoglobulinémie [50].

Cette présence a aussi été corrélée avec d'autres symptômes spécifiques de maladies auto-immunes, comme une photosensibilisation ou une néphrite sévère dans le cas d'un lupus érythémateux disséminé (LED) ou un bloc auriculo-ventriculaire (BAV) dans le cas d'un lupus néonatal [43]. Cependant, le rôle de ces autoanticorps dans la pathogénie demeure obscur.

Parmi les tentatives d'explication, De Wilde et ses collaborateurs [51] ont montré que l'antigène La/SSB, présent à la fois dans les cellules conjonctives et épithéliales acineuses du SGS, est redistribué. Migrant du nucléole, au

nucléoplasme et jusqu'au cytoplasme, il est souvent localisé sur la membrane cellulaire acineuse chez les patients atteints de SGS. D'autres études ont, par ailleurs, démontré que l'irradiation à la lumière ultraviolette ou l'infection virale - voire encore l'apoptose- pouvaient causer la translocation de ces autoantigènes [40]. L'expression aberrante de La/SSB, par exemple, sur les membranes cellulaires n'implique, par elle-même, aucune fonction physiologique de la protéine. Par contre, elle devrait provoquer une réponse immunitaire locale dirigée contre La/SSB, conduisant à l'initiation de la synthèse d'autoanticorps. Ainsi, l'expression de ces antigènes par les cellules épithéliales acineuses (du moins pour La/SSB), de même que leur association avec les molécules HLA II au sein des glandes salivaires, vont stimuler les cellules B présentes à ce niveau, produisant ainsi des autoanticorps et provoquant l'inflammation et la destruction de ces glandes salivaires. Ceci confirme que le SGS est une **épithélite auto-immune [41]**.

En outre, chez les patients atteints de SGS, la production d'autoanticorps est chronique et continue. Il y a donc, nécessairement, perpétuation de cette réponse immunitaire initiée. Le système immunitaire a besoin, selon toute vraisemblance, d'une grande source d'autoantigènes. Pour atteindre un taux critique de ces derniers, il est probable qu'une nouvelle synthèse se met en place dans les cellules épithéliales et mononucléaires des glandes exocrines affectées, comme n'importe quelle autre protéine nouvellement synthétisée. Cependant, les mécanismes responsables de ce phénomène sont inconnus. Certaines hypothèses sont quand même avancées. Premièrement, la synthèse active de la protéine peut être le résultat d'une régénération cellulaire rapide dans la lésion immunopathologique. En effet, Kong et ses collaborateurs ont démontré que les cellules épithéliales dans le cas du pSS présentent un pourcentage significatif d'apoptose et de marqueurs de régénération, comme la protéine pS2 [52]. Deuxièmement, La/SSB est complexé avec tous les transcrits cellulaires de l'ARN polymérase III, y compris l'hYARN et plusieurs transcrits viraux. Les virus (et spécialement les rétrovirus) sont aussi suspectés d'être des agents étiologiques dans la pathogenèse du pSS. A partir de là, des demandes accrues de La/SSB par la machinerie de réplication virale, conduiraient à une

synthèse accrue d'ARNm de La/SSB, spécialement par les cellules infectées. Cependant, les protéines Ro/SSA, sélectivement liées aux hYARN, ne seraient pas produites en grandes quantités. Par conséquent, si des virus sont inclus dans la pathogénie du SGS, ils ne sont pas les seuls en cause. Les autoanticorps anti-Ro/SSA, qui ne possèdent pas la même spécificité vis-à-vis de la maladie en comparaison avec les anti-La/SSB, pourraient être synthétisés, après expression et présentation de Ro/SSA, dans d'autres tissus et cellules, comme les kératinocytes ou des lymphocytes périphériques, via des mécanismes impliqués dans la mort cellulaire programmée [41].

Enfin, il convient de signaler qu'en 1987, Gaither et ses collaborateurs avaient mis en évidence la présence de ces autoanticorps dans les sérums d'individus en bonne santé. Ils en ont conclu que ces molécules existaient normalement dans l'organisme où elles sont contrôlées par des lymphocytes T suppresseurs. La perte de cette fonction, suite à un stimulus, provoquerait la transition de l'état "normal" à l'expression de la maladie, avec activation et expansion de clones produisant ces anticorps [47].

IV.3. Détection des anticorps

C'est seulement depuis ces trente dernières années que l'on détecte la présence des autoanticorps IgG et IgM anti-Ro/SSA et La/SSB dans l'étude du SGS.

La technique traditionnellement utilisée est celle de l'immunodiffusion double (ID) en gélose (méthode d'Ouchterlony) (Fig. 8) [53].

Immunodiffusion double

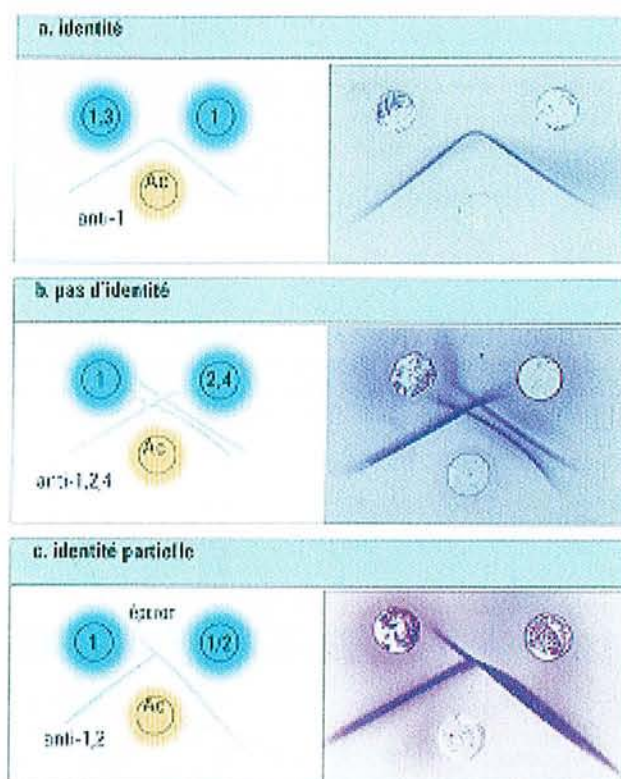


Figure 8. Immunodiffusion double (ID) : Des puits sont creusés dans les gels, puis remplis d'antigène ou d'anticorps qui vont diffuser ; quand ils se rencontrent, ils se combinent et précipitent au point d'équivalence en formant une ligne de précipitation. Schématiquement, trois situations peuvent être observées. Dans la réaction (a), les arcs de précipitations formés par l'anticorps et les deux antigènes sont en continuité, ce qui indique que l'anticorps a précipité des antigènes identiques dans chaque préparation (épitope 1). Cela n'implique pas que les antigènes soient nécessairement identiques ; ils ne sont identiques que dans la mesure où l'anticorps ne peut révéler la différence. Dans la réaction (b) l'anticorps reconnaît trois antigènes différents qui forment trois arcs de précipitation différents. Dans la réaction (c) les antigènes portent l'épitope 1 mais un seul antigène possède un épitope supplémentaire 2. Une ligne d'identité est obtenue avec l'anti-épitope 1, avec en plus un éperon où l'anti-épitope 2 a réagi avec le second épitope, indiquant par-là une identité partielle entre les antigènes.

Lors de manifestations cliniques, la plupart des données concernant ces autoanticorps ont été obtenues par ce procédé. Ceci explique pourquoi dans beaucoup d'études, leur présence est indiquée d'une manière qualitative. L'ID est une méthode simple, peu onéreuse, spécifique, mais qui présente un

manque de sensibilité. Heureusement, le développement des techniques de purification des antigènes nucléaires a rendu possible la détection de ces anticorps par des méthodes immuno-enzymatiques de type ELISA [54,55] (Fig.9). Cette dernière présente en outre l'avantage d'être beaucoup plus sensible, semi-quantifiable et de détecter les anticorps non précipitants. L'immunodiffusion double d'Ouchterlony demeure, néanmoins, la plus spécifique. D'autres approches sont également employées comme l'immunofluorescence indirecte, la cytométrie de flux ou encore l'immunoblot [35,49].

Grâce à ces nouvelles techniques, nous savons que, dans le SGS, la réponse autoanticorps dominante est de type IgG (dans le sérum : 5-8 µg/ml (certains chercheurs ont trouvé 11000 µg/ml d'anti-SSB ! [36])) suivie des types IgM (2-3 µg/ml) puis IgA (0,5-1,0 µg/ml). La spécificité de l'épitope des autoanticorps IgA est presque la même que celle d'IgG et d'IgM. Chez des individus sains, IgA est l'isotype principal produit localement par la muqueuse buccale. Les anticorps de cette dernière participent à la lutte contre les virus et les bactéries, protégeant ainsi la muqueuse et le reste du système [28].

En plus de ces désordres sériques, il existe des modifications dans la glycosylation de certaines immunoglobulines. En effet, au cours du SGS, les IgG et IgA sériques présentent des anomalies significatives de leurs glycoformes. La quantité d'IgG sans acide sialique est anormalement élevée chez les malades, alors qu'IgA1 et IgA2 semblent être hyper-sialylées. Cela pourrait être le résultat d'un dysfonctionnement de certaines enzymes : les sialyltransférases. Le mécanisme de cette dysrégulation des enzymes mérite d'être identifié [56,57].

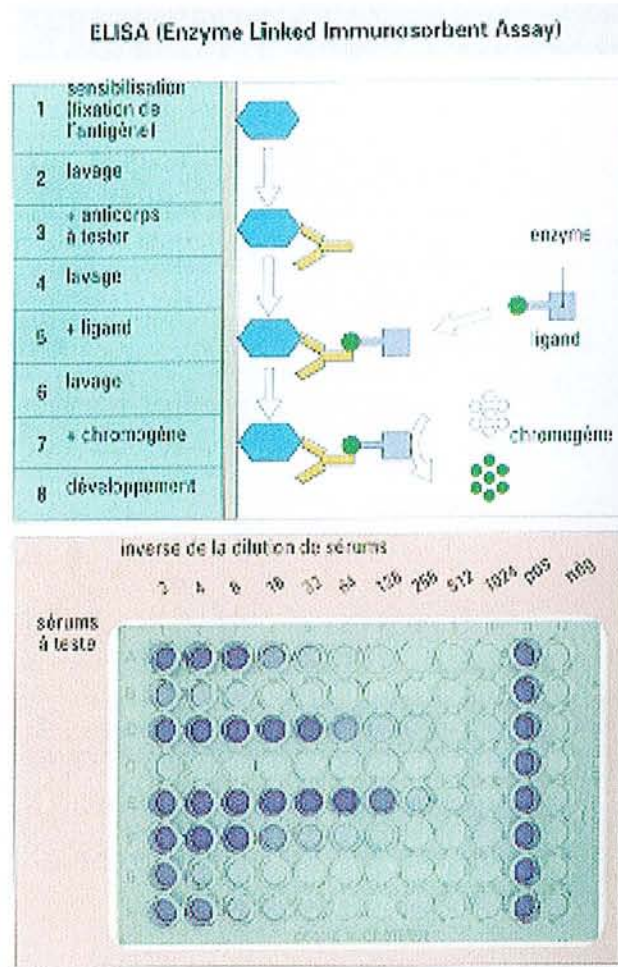


Figure 9. Test ELISA : Un ligand couplé à une enzyme vient se fixer sur l'anticorps à doser et, après lavage, est révélé par l'addition d'un chromogène, substrat incolore activé par la portion enzymatique du ligand pour donner un produit coloré. La quantité d'anticorps est déterminée à partir de la mesure de l'absorbance des puits de la plaque, due à l'apparition du produit coloré.

V. Apoptose

Nous avons vu dans le chapitre précédent comment, un certain nombre de molécules antigéniques de l'organisme, était responsable de la réaction immunitaire dans le syndrome de Gougerot-Sjögren. La question qui vient à l'esprit est : comment ces ribonucléoprotéines intracellulaires sont-elles

transférées sur la membrane cellulaire pour être présentées au système immunitaire ? Deux mécanismes possibles, et probablement interactifs, ont été étudiés : l'apoptose et l'infection virale.

L'apoptose est un mécanisme inné de Suicide Cellulaire Programmé (SCP). Elle est invoquée dans des situations biologiques diverses, allant du développement embryonnaire à la suppression d'une malignité et la régulation de populations de cellules immunitaires. Par ailleurs, l'apparence morphologique d'une cellule apoptotique est, entre autres, caractérisée par une condensation nucléaire et le développement de corps apoptotiques (*fig.10*) [29].

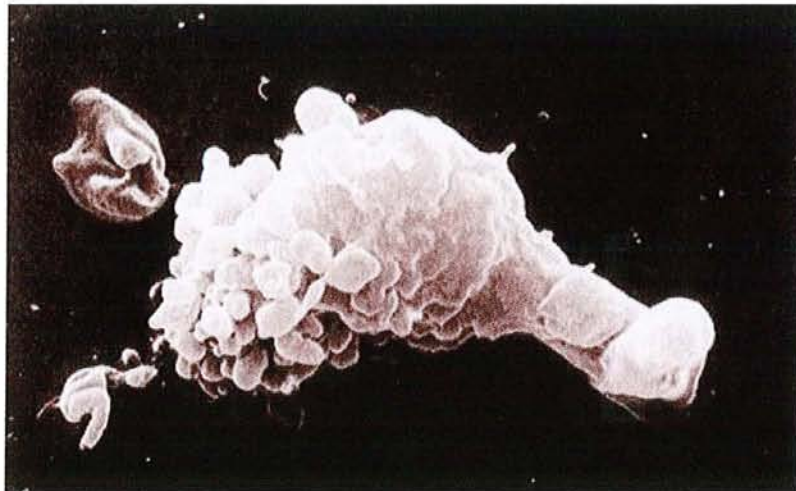


Figure 10. Cette cellule est en train de se suicider. Elle fragmente son contenu (dont le noyau) et forme de petits ballonnets (les corps apoptotiques).

Durant l'apoptose, il y a une augmentation de l'activité de certaines protéases dans la cellule qui peut conduire à un clivage de plusieurs protéines (dont des protéines du cytosquelette comme la fodrine). Les produits de dégradation enzymatique peuvent jouer un rôle d'autoantigène et provoquer une réponse auto-immune dans le SGS. En plus, l'apoptose pourrait être responsable de la translocation d'un autoantigène intracellulaire à la surface des corps apoptotiques et son exposition au système immunitaire. En fait, des études ont montré que Ro/SSA était localisé dans des corps apoptotiques et serait ainsi devenu immunogénique [14].

L'induction et la régulation de l'apoptose est un processus complexe. En effet, un certain nombre de molécules de surface cellulaire (récepteur du facteur de nécrose des tumeurs (TNF-R), Fas), de protéines intracellulaires (famille *Bcl-2*, *p53*, *c-myc*) et d'enzymes (caspases, protéine kinases, sphingomyélinases, phosphatases...), y sont impliquées [58].

L'expression de Fas (CD95) et de son ligand (FasL) a été étudiée au niveau des glandes salivaires des patients atteints de pSS [52,59]. Ainsi, il a été trouvé une surexpression de l'antigène Fas sur les cellules épithéliales des glandes salivaires et une surexpression de FasL dans les cellules T infiltrantes suggérant un mécanisme d'apoptose via l'interaction Fas/FasL. Par ailleurs, une autre analyse révèle que les cellules épithéliales acineuses et ductales présentent un taux élevé de mortalité programmée au cours du SGS, à la différence des lymphocytes infiltrants dont l'apoptose est inhibée et qui ne montrent qu'un taux limité [60,61]. La raison du blocage de ce processus serait, d'une part, l'existence des cytokines (IL-2, IL-10), des molécules d'adhésion, de costimulation et d'oxyde d'azote [62] ; et d'autre part, la présence du proto-oncogène suppresseur *Bcl-2*. Ce dernier acteur est le prototype d'une famille d'oncogènes qui agissent sur l'apoptose. Cette famille contient au moins 23 membres, dont 12 (*Bcl-2* et *Bcl-x_L*) inhibent les cascades de l'apoptose, alors que les 11 autres (*Bcl-x_S*, *Bax*, *Bak*) l'activent (Fig.11). Si *Bcl-2* ne se manifeste que chez un faible pourcentage de cellules épithéliales lors du SGS, il est, par contre, surexprimé dans les lymphocytes infiltrants. Cela explique la moindre extension de l'apoptose au sein de cette dernière population, qui pourra survivre et perpétuer la réaction auto-immune. *Bcl-2* aurait, en outre, un rôle potentiel dans la lymphoprolifération des cellules B, et la prédisposition des patients atteints de SGS à développer des lymphomes [63]. Par ailleurs, nous retrouvons la protéine *Bax* au sein des cellules épithéliales acineuses.

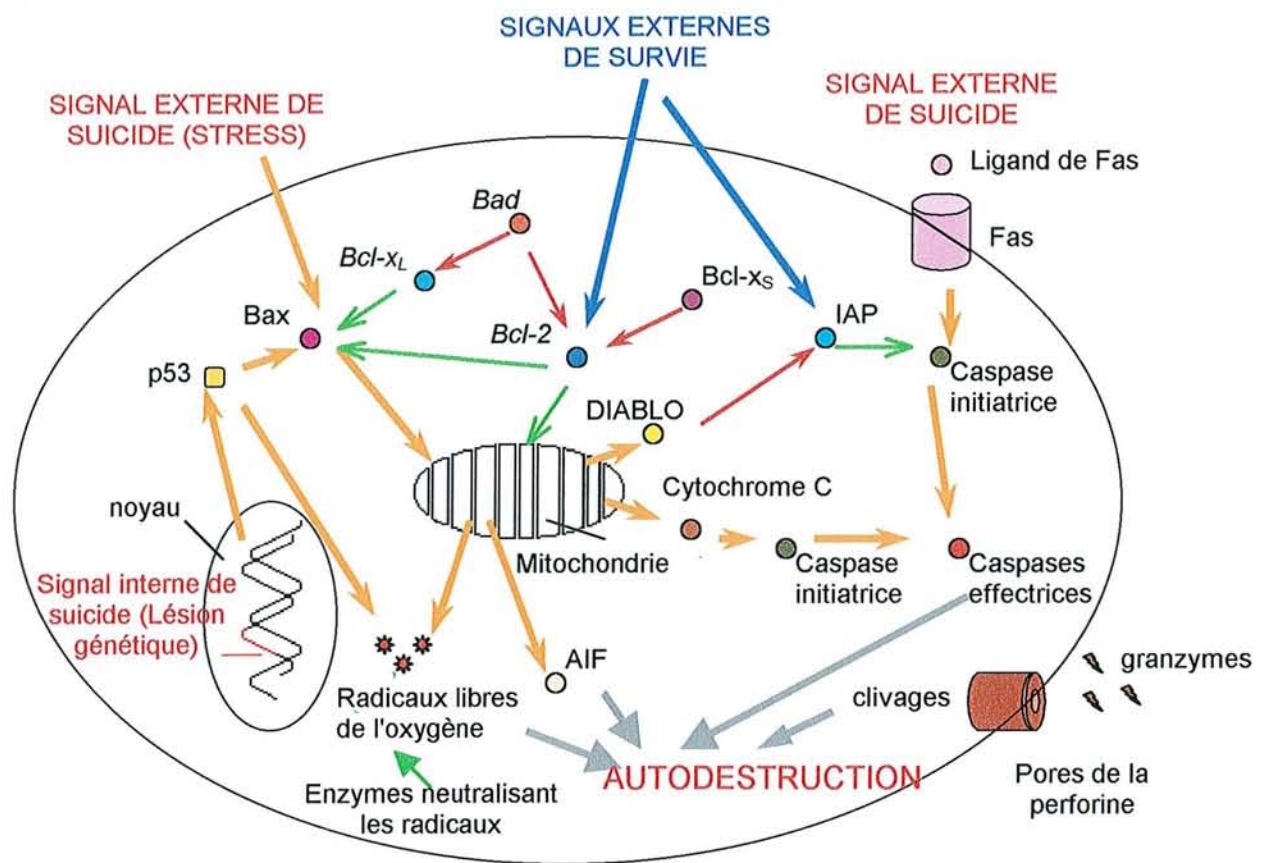


Figure 11. Le déclenchement de l'autodestruction est contrôlé par des mécanismes complexes. La cellule reçoit des signaux externes de suicide (flèche orange) et des signaux de survie (flèches bleues). Les signaux externes de suicide sont soit des signaux indiquant un stress, soit la liaison, sur le récepteur Fas, de son ligand spécifique, soit encore des mécanismes cytotoxiques via la perforine et les granzymes. A l'intérieur de la cellule, les différents maillons de la chaîne de réponse peuvent être activés (flèches oranges) ou inhibés (flèches rouges quand l'apoptose est favorisée et flèches vertes quand la survie cellulaire est favorisée). Parmi les molécules schématisées, Bax est un activateur du suicide alors que, Bcl-2 est un inhibiteur. Il agit en se liant à Bax pour l'empêcher de continuer son action. Bad ou Bcl-x_S pourront, eux, se lier à Bcl-2 et l'empêcher de s'associer à Bax. AIF est un facteur induisant l'apoptose ; les IAP, des inhibiteurs [14,29,63].

Ce mécanisme d'apoptose est observé également dans d'autres maladies auto-immunes comme la thyroïdite d'Hashimoto. L'analyse *in vitro* des cellules épithéliales indique, dans ce cas, que la cytokine proinflammatoire IL-1 β induit l'expression du récepteur Fas sur les cellules thyroïdiennes qui expriment déjà le

FasL. Cependant, ces voies d'apoptose ne sont pas les seules à exister au cours du SGS.

D'autres mécanismes de destruction cellulaire (cellules cytotoxiques, perforines) pourraient, en effet, survenir dans cette maladie, comme cela est indiqué par l'augmentation de l'expression de la perforine et des granzymes A et B dans les biopsies de glandes salivaires chez les patients atteints du syndrome de Sjögren [14,60,63,64]. La perforine et les granzymes constituent un second chemin extrinsèque pour l'apoptose. La perforine est un médiateur cytolytique produit par les lymphocytes tueurs. Elle y est, notamment, stockée et est libérée par des granules cytoplasmiques. Elle est, de plus, partiellement analogue aux composants terminaux du Complexe d'Attaque Membranaire (MAC) du complément et produit des pores, jusqu'à 20 nm de diamètre, sur les membranes cibles. Parallèlement à la perforine, des sérine-protéinases, appelées granzymes, sont aussi excrétées dans le milieu. La granzyme B entre, par exemple, dans le cytoplasme de la cellule cible, via les pores occasionnés par la perforine, et induit une apoptose par clivage de certaines protéines. En résumé, la perforine et les granzymes agissent d'une manière synergique sur une voie endogène de l'apoptose, avec comme résultat la dissolution de la membrane nucléaire de la cellule cible et la fragmentation de l'ADN. Les lymphocytes CD8 cytotoxiques activés, dispersés dans les infiltrats, libèrent des perforine et granzymes et pourraient, ainsi, jouer un rôle significatif dans la perpétuation de l'apoptose de la cellule épithéliale.

Ces différentes voies d'apoptose semblent fonctionner ensemble pour provoquer la mort des cellules épithéliales. Il existe toutefois un mécanisme défensif des cellules épithéliales pour contrer ce phénomène comme cela peut être pressenti par l'expression de certains marqueurs de régénération comme la protéine pS2 [52]. Il faut, de plus, signaler que cette protéine est induite par des œstrogènes, connus par ailleurs comme étant des inhibiteurs de l'apoptose [14]. Comme le SGS est une pathologie typiquement féminine, le rôle des hormones sexuelles vient compliquer davantage les mécanismes.

Enfin, en cas de SGS, des concentrations élevées de métalloprotéinases de matrice ont été observées. Elles provoqueraient une dégradation de l'interaction des cellules épithéliales avec leur matrice extra-cellulaire (relation nécessaire à la survie cellulaire). Ces enzymes pourraient ainsi contribuer à l'induction de l'apoptose des cellules épithéliales, à la formation et à la libération d'un certain nombre d'antigènes [63].

VI. Rôle des virus

Les maladies rhumatismales ont longtemps été considérées comme la conséquence d'agents environnementaux sur un fond de susceptibilité génétique. La présence d'anticorps antiviraux et le mimétisme moléculaire entre les antigènes viraux et les autoantigènes sont souvent cités pour renforcer cette hypothèse [65,66]. Ainsi, par exemple, une homologie entre l'épitope auto-immun de l'antigène La/SSB et la protéine virale gag du VIH, a été démontrée [14]. En plus, la translocation de La/SSB du noyau vers le cytoplasme puis la membrane cellulaire peut être induite, *in vitro*, après infection virale. Il serait donc possible que la réponse auto-immune dans le SGS soit due à une réaction croisée des anticorps dirigés à l'origine contre d'autres protéines ou autoantigènes humains ou viraux. Dans le cas du syndrome de Sjögren, l'étiologie virale a été suspectée d'autant plus du fait de la fréquence du portage viral dans la cavité oropharyngée.

Au cours de la dernière décennie, l'attention s'est focalisée sur trois types de virus pouvant être associés ou impliqués dans l'étiologie du SGS : le virus d'Epstein-Barr (EBV) et certains autres virus du groupe herpès, les rétrovirus et le virus de l'hépatite C (VHC).

VI.1. Les virus du groupe herpès

Plusieurs groupes de chercheurs ont exploré cette voie. Ainsi, comme nous l'avons déjà vu, il a été démontré que l'infection de certaines lignées cellulaires, comme les cellules Vero, avec des cytomégalovirus, provoquait une augmentation de La/SSB de 2 à 15 fois [49]. En plus, il existe une réactivité croisée des anticorps anti-La/SSB avec les ARN Eber 1 et Eber 2 synthétisés par le virus Epstein-Barr (EBV). Un autre argument en faveur de l'implication de EBV est qu'il est présent, chez l'adulte normal, à l'état latent dans l'oropharynx, siège de sa réplication active durant la primo-infection. Une réponse lymphocytaire T anormale contre EBV sur ce site de latence pourrait aboutir à la formation d'un infiltrat lymphoïde et, secondairement, à la destruction des glandes salivaires [67]. Néanmoins, il n'y a toujours pas de preuves directes quant à une éventuelle implication du cytomégalovirus, de EBV ou encore du virus Herpès 6 (HHV6 : Human Herpes Virus 6) dans le SGS. Les résultats des études restent peu concluants, voire contradictoires [68].

VI.2. Les rétrovirus

L'idée d'une éventuelle association entre rétrovirus et syndrome de Sjögren est née de l'observation de certains patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et qui présentaient des anomalies cliniques et histologiques très semblables à celles observées dans le syndrome de Sjögren. Ainsi 2 à 5% des individus infectés par VIH-1 présentent une infiltration lymphocytaire diffuse des glandes salivaires et d'autres organes (poumon, foie, rein...). Cependant, la majorité de ces lymphocytes infiltrants sont des cellules T CD8+ et, de plus, les anticorps anti-Ro/SSA et anti-La/SSB sont absents [68].

Par ailleurs, chez des patients atteints de SGS et indemnes de toute infection par VIH, des anticorps dirigés contre la protéine p24 gag du VIH ont été retrouvés dans environ 30% des cas, en l'absence d'anticorps contre les autres protéines du VIH. En fait, il s'agissait probablement d'une réaction croisée entre ces anticorps et un épitope présent sur la protéine p24 dénaturée par Western blot et absent sur la protéine naïve, comme le suggérait l'absence de réactivité en utilisant la méthode de radio-immunoprécipitation [67].

Par conséquent, ces observations ne peuvent pas constituer un argument en faveur d'une infection rétrovirale à l'origine du syndrome de Sjögren.

VI.3. *Le virus de l'hépatite C*

Une relation possible entre le SGS et le virus de l'hépatite C a été évoquée en 1992. En effet, une infection chronique au VHC pourrait mimer les grandes figures cliniques et histologiques du pSS [69]. De plus, le tropisme salivaire de HCV est bien démontré : ce virus est présent dans la salive d'environ la moitié des malades ayant une virémie plasmatique [67]. Cependant les autoanticorps habituellement retrouvés dans le syndrome de Sjögren sont absents dans le sérum des patients porteurs d'une hépatite chronique associée à VHC.

En outre, il faut souligner la fréquence des sérologies VHC faussement positives en utilisant des tests ELISA chez des patients atteints du syndrome de Sjögren : la prévalence des anticorps anti-VHC varie entre 14 et 19% [69]. Ces fausses positivités sont probablement en rapport avec l'hypergammaglobulinémie fréquemment observée chez les patients atteints de SGS [67].

Ainsi, à ce jour, les arguments en faveur d'un lien de causalité entre SGS et VHC sont minces.

VII. Nouvelles approches, récepteurs muscariniques

Les raisons de la baisse des sécrétions salivaires et oculaires sont, en fait, complexes et pas complètement élucidées. Ainsi, le degré de xérostomie des patients atteints de SGS ne peut pas être complètement expliqué par l'extension de la destruction glandulaire. En effet, lors de l'évaluation de biopsies de GSA de patients atteints depuis un long moment de ce syndrome, seulement la moitié des structures acineuses était détruite [70]. L'autre moitié des cellules glandulaires est encore détectée. L'épithélium sécrétoire restant devrait alors fonctionner même à un niveau sous-optimal. De plus, à supposer qu'il existe un lien entre la diminution du flux salivaire et des sialadénites, la baisse du premier n'est pas corrélée à l'augmentation du nombre des secondes. Ces observations indiquent qu'il y aurait un dysfonctionnement du tissu glandulaire résiduel. Pour l'expliquer, il faut d'abord savoir comment il fonctionne.

VII.1. *Physiologie de la sécrétion*

La production de larmes ou de salive requiert une interaction des fonctions nerveuses, vasculaires et sécrétoires (*fig.12*). Ainsi, en réponse à une irritation de la muqueuse buccale ou cornéenne, les nerfs afférents remontent vers des régions spécifiques du système nerveux. Ces zones reçoivent aussi d'autres signaux corticaux suite à des stimuli comme le goût, l'odeur, l'anxiété ou encore la dépression. Une fois ces différentes données intégrées et analysées, les nerfs cholinergiques efférents conduisent l'influx vers les glandes lacrymales et salivaires. Enfin, au niveau des terminaisons nerveuses, l'acétylcholine est libérée et stimule les récepteurs localisés dans les cellules glandulaires. De plus, un autre signal, cette fois-ci transmis par des nerfs adrénergiques efférents, circule entre le système nerveux central et les vaisseaux sanguins locaux. Ces derniers doivent être plus perméables pour devenir une source pour les glandes qui y "pompe" leurs eaux et leurs nutriments.

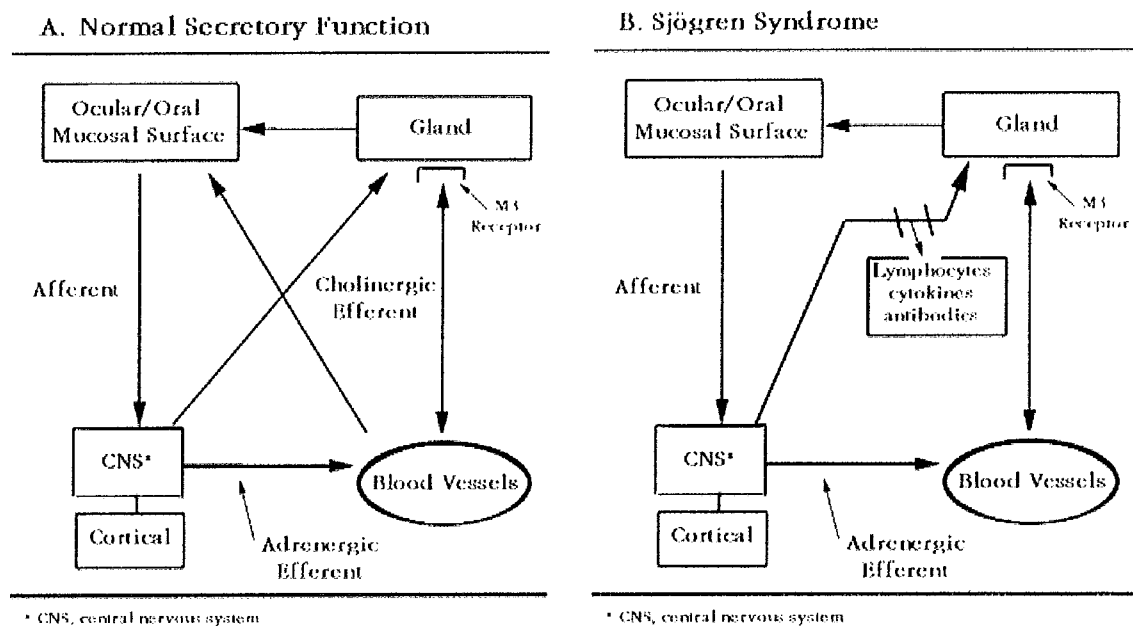


Figure 12. (A) Un "circuit" qui contrôle normalement le flux lacrymal
(B) Interruption de ce circuit en cas de SGS.

Grâce à des études par microscopie électronique, des chercheurs ont remarqué que le nombre de récepteurs au niveau glandulaire est plus grand que le nombre de terminaisons nerveuses. Cet excès a été expliqué comme un mécanisme d'amplification du signal nerveux, l'acétylcholine pouvant stimuler plusieurs récepteurs consécutivement. D'un point de vue thérapeutique, ces derniers seront disponibles pour la stimulation par des analogues de l'acétylcholine.

Les récepteurs à acétylcholine sont, cependant, divisés en récepteurs nicotiques et muscariniques. De plus, il existe au moins 5 types de récepteurs du genre muscarinique. Pour les fonctions glandulaires lacrymales et salivaires, le récepteur muscarinique M3 est le plus important. Sa stimulation génère une augmentation des sécrétions lacrymales et salivaires. En comparaison, le récepteur M2 est trouvé dans les tissus cardiaques et sa stimulation conduit à des changements dans le rythme cardiaque. Ainsi, la capacité d'un agoniste à stimuler sélectivement le récepteur M3 (sans stimuler M2) sera un objectif dans la thérapie du SGS.

VII.2. Dysfonctionnement du tissu glandulaire

Un dysfonctionnement du tissu glandulaire résiduel peut survenir pour plusieurs raisons. Ainsi, certains facteurs immunologiques peuvent influencer la diminution des flux salivaire et lacrymal. Parmi eux, il y a des cytokines comme l'IL-1 et le TNF- α , dont il a été démontré qu'ils inhibaient la réponse lacrymale basale et stimulée. En outre, le traitement des cellules avec l'IFN- γ et le TNF- α produit une réponse similaire à l'induction de la mort cellulaire programmée [71]. Mais, au-delà de l'apoptose, ces cytokines sont aussi des substances agissant sur les circuits neuro-sécrétoires, inhibant la libération de l'acétylcholine par les nerfs locaux et la réponse à ce neurotransmetteur par les cellules épithéliales.

Par ailleurs, une réponse auto-immune contre le récepteur muscarinique M3 a été détectée dans les sérums de patients atteints de SGS. Une preuve expérimentale a permis de découvrir que ces anticorps peuvent empêcher une réponse adéquate des glandes à une stimulation neuronale [72]. Ces anti-récepteurs M3 feraient donc partie des facteurs impliqués dans la physiopathologie de la sécheresse. De plus, d'autres études ont indiqué que ces anticorps sont dirigés contre un site de liaison agoniste de l'acétylcholine à la surface cellulaire ; ils interfèrent avec la capacité d'agonistes du récepteur muscarinique (comme le carbachol ou la pilocarpine) à activer la cascade aboutissant à la sécrétion salivaire [73]. Si nous avons à l'esprit que l'introduction de ces autoanticorps, *in vivo*, n'induit pas l'augmentation de la destruction des cellules épithéliales via l'apoptose, nous pouvons conclure que l'interaction de l'anticorps anti-M3 avec son récepteur conduit à une quiescence fonctionnelle des tissus exocrines plutôt qu'à une agression destructive [71].

VIII. Susceptibilité génétique

Comme de nombreuses autres maladies auto-immunes, les facteurs génétiques contribuent à la pathogénie et au développement du SGS. Cependant, pour cette maladie, ils sont multifactoriels et les résultats obtenus suggèrent une transmission autosomale dominante mais surtout la responsabilité d'allèles HLA [74]. En effet, il a été démontré que les molécules du CMH de classe II sont produites anormalement et précocement à la surface des cellules épithéliales des glandes salivaires et lacrymales lors du SGS. Toutefois, d'autres études montrent qu'il existe des prédispositions génétiques différentes chez les sujets atteints du syndrome de Sjögren isolé, et chez ceux ayant un sSS [13]. Ainsi, les antigènes les plus fréquemment associés au pSS sont HLA-B8 et HLA-DR3, mais il n'y a pas de consensus sur un locus HLA unique pour cette maladie dans les différentes populations [50,74,75]. La forme associée à la polyarthrite rhumatoïde est, par contre, plutôt liée au phénotype HLA-DR4 [11].

En outre, les patients atteints de SGS et porteurs des antigènes HLA-B8, DR3 et DRw52 ou encore du génotype hétérozygote HLA-DRB1*15-*03 ont des formes plus sévères que les autres, tant du point de vue clinique (manifestations extra-glandulaires ou hématologiques par exemple) qu'histologique [50,62,76]. De plus, la fréquence plus élevée d'allergies aux médicaments et autres manifestations allergiques observées chez les patients atteints de SGS pourrait être liée au HLA-DR3 [77].

Enfin, certaines études insistent sur un rôle combiné d'HLA-DR2 et DR3 dans la production d'anti-Ro et d'anti-La en cas de SGS, alors que d'autres évoquent plutôt un rôle du locus HLA-DQ et particulièrement d'hétérozygotes DQ1/DQ2 dans la production de ces anticorps. Il est également rapporté que la présence d'anti-Ro/SSA est plutôt associée avec l'halotype DR2/DQ1 [35,50,78]. Il reste cependant beaucoup à apprendre sur le contrôle génétique détaillé de

ces anticorps, et le CMH n'est pas le seul locus impliqué, capable d'affecter la production de ces auto-anticorps. Les différences de spécificité d'anti-Ro/SSA peuvent aussi être influencées par les gènes des régions V des immunoglobulines et par les gènes des récepteurs des cellules T [44].

IX. Résumé

L'étiologie du SGS est complexe, notamment à cause du début insidieux de la maladie qui fait qu'elle est déjà bien développée quand on la découvre. De nombreuses pistes ont été explorées. En effet, les chercheurs ont évoqué des facteurs génétiques, viraux ou encore hormonaux. D'autres ont même pensé au métabolisme de la vitamine D qui pourrait y être impliqué [79]. Il reste, cependant, beaucoup de chemin à parcourir avant d'en connaître tous les mécanismes.

Parmi les différents acteurs concernés par la pathogénie du SGS, les cellules épithéliales des glandes salivaires accessoires des patients atteints de SGS semblent jouer un rôle dominant, car elles peuvent présenter les peptides antigéniques à leur surface, attirer les cellules T et influencer sur la réaction auto-immune. Par ailleurs, les cellules T peuvent reconnaître des antigènes spécifiques et devenir réactives alors qu'avec les cellules épithéliales, elles produisent des cytokines conduisant à la perpétuation de la réaction inflammatoire, et même à l'activation des cellules B (Fig.14). L'apoptose des cellules épithéliales dans le SGS semble être la cause majeure de décès cellulaire et un mécanisme possible pour expliquer la présentation de l'antigène par ces cellules.

Actuellement, plusieurs chercheurs parlent d'un modèle de pathogénie en deux étapes comme pour la thyroïdite d'Hashimoto (Fig.13). La première étape, indépendante des lymphocytes, serait probablement causée par des anomalies de régulation de l'apoptose ou une sensibilité augmentée à celle-ci dans

l'épithélium. Elle conduirait notamment à la mort des cellules épithéliales, provoquant ainsi une diminution des sécrétions glandulaires et la génération de protéines autoantigéniques qui vont induire la synthèse d'autoanticorps sériques (anti-Ro/SSA, anti-La/SSB).

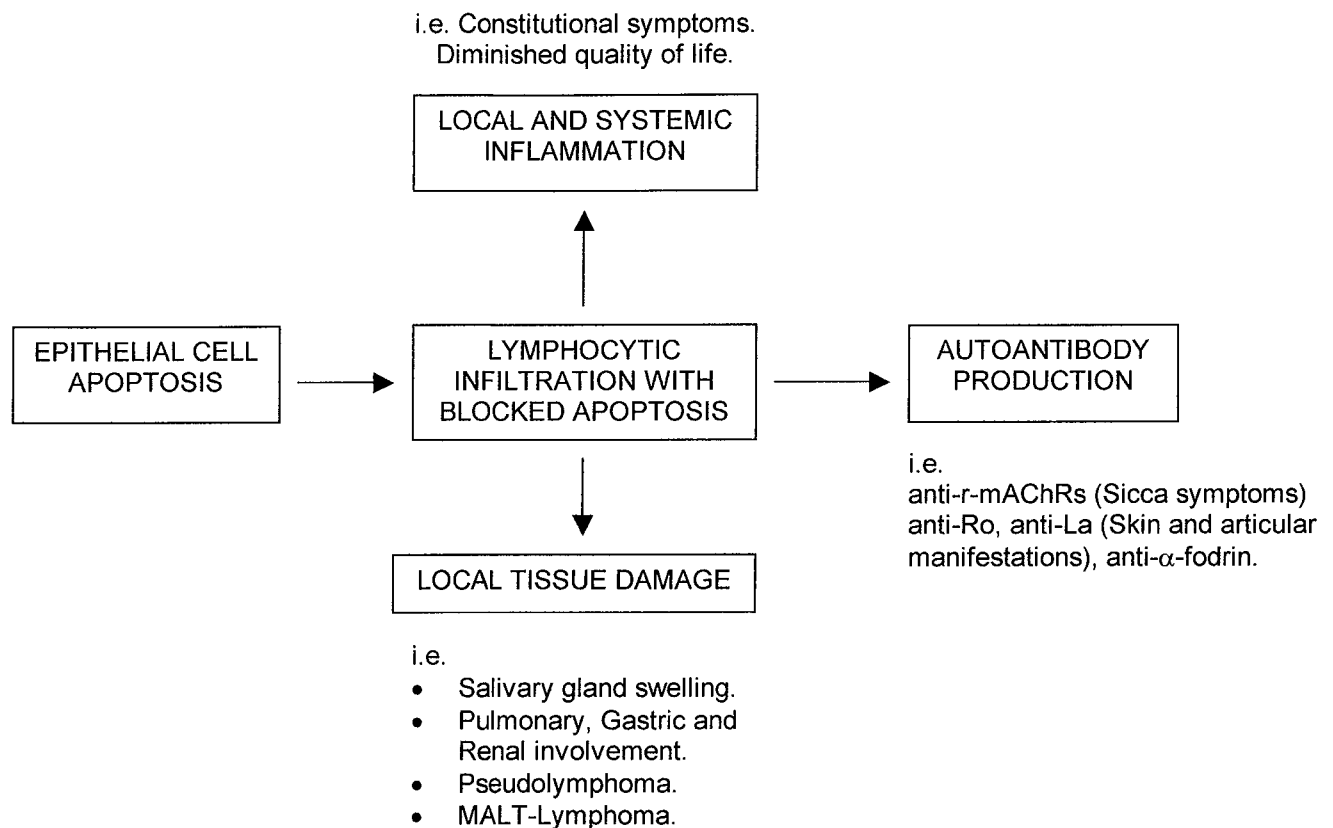


Figure 13. Le modèle à deux étapes de la physiopathologie du SGS. (*anti-r-mAChRs : anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur M3 de l'acétylcholine, chez les rongeurs*) [62].

La seconde phase dépendrait des lymphocytes et serait associée à une inhibition de l'apoptose dans les lymphocytes glandulaires infiltrants, à l'opposé de l'apoptose rencontrée dans le tissu épithélial acineux. Pendant cette étape, il y aurait une infiltration lymphocytaire et une agression auto-immune au cours de laquelle une destruction glandulaire progressive et une incapacité fonctionnelle surviennent. Le système immunitaire, au lieu d'aider à la combattre, propagerait la maladie par son incapacité à tempérer son action. Les anticorps anti-récepteur

muscarinique M3 de l'acétylcholine, qui sont aussi considérés parmi les facteurs impliqués dans la physiopathologie de la sécheresse, seraient aussi retrouvés durant cette étape.

Cependant, même dans ce modèle qui répond à certaines questions, le stimulus initial pouvant altérer la balance entre la vie et la mort et conduire les cellules épithéliales et les lymphocytes T à une réaction auto-immune demeure inconnu.

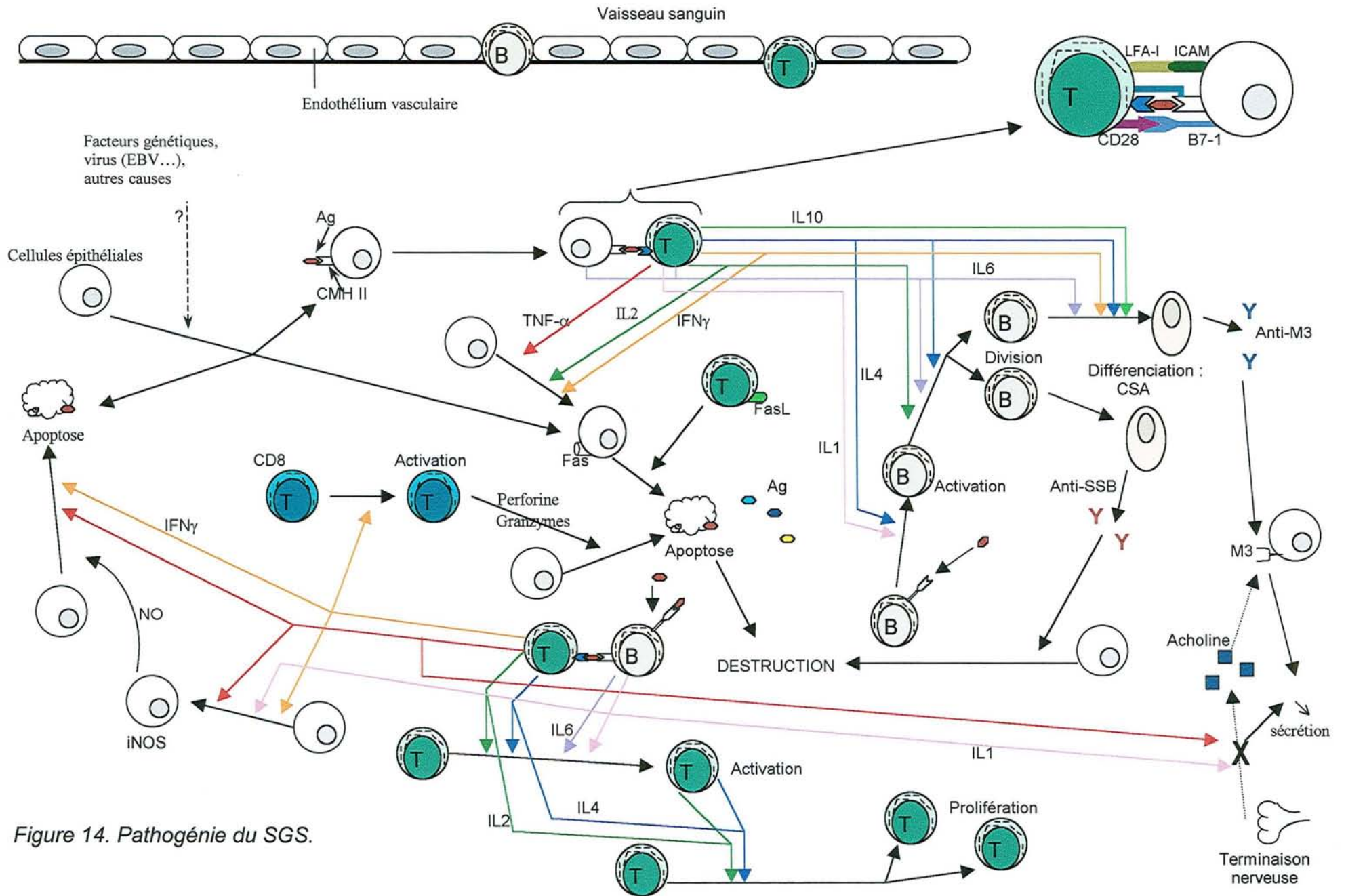
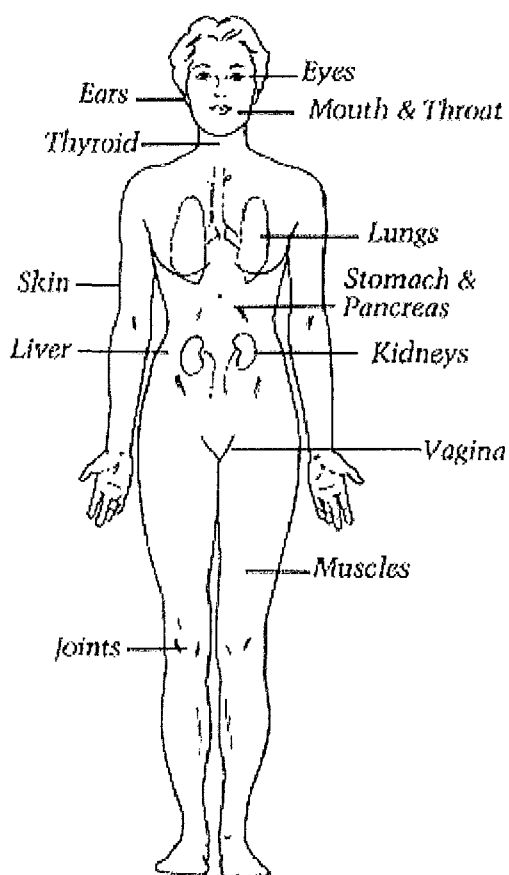


Figure 14. Pathogénie du SGS.

D. *Caractéristiques cliniques et examens diagnostiques*

Comme le lupus, le SGS peut endommager les organes vitaux de l'organisme avec des symptômes pouvant s'aggraver, rester tels quels ou évoluer vers une rémission de la maladie. Chez certaines personnes, les symptômes vont uniquement se limiter aux yeux et bouche sèches, alors que chez d'autres, il y aura une alternance de périodes avec des manifestations sévères (incluant des symptômes systémiques comme le syndrome de Raynaud ou d'autres manifestations pulmonaires ou nerveuses) et d'autres sans gravité (Fig.15).



Areas that may be affected by Sjögren's syndrome.

Figure 15. Localisations pouvant être affectées par le syndrome de Sjögren.

Si la xérophtalmie et la xérostomie sont les deux symptômes les plus fréquents, le SGS peut atteindre tellement d'autres organes qu'il conduit à de nombreuses consultations. Il est à la fois nécessaire de cerner cette maladie dans sa globalité pour ne pas donner des traitements qui peuvent soulager un symptôme mais en aggraver un autre ; et d'écarter toutes les autres causes pouvant simuler un "faux" syndrome de Gougerot-Sjögren et dues à d'autres maladies ou souvent à une prise médicamenteuse.

I. Manifestations exocriniennes

I.1. Atteinte des glandes lacrymales

La xérophtalmie, consécutive à l'atteinte des glandes lacrymales, détermine une kérato-conjonctivite sèche (KCS), souvent cliniquement latente, ce qui explique que ce syndrome soit considéré, à tort, comme rare [80]. L'interrogatoire permet de découvrir des brûlures oculaires, une impression de corps étranger dans les yeux, des paupières "collées" au réveil ou encore des conjonctivites à répétition. Ces symptômes résultent du frottement accru lors du passage de la paupière au-dessus de la surface oculaire. Ils sont souvent apaisés par l'instillation de larmes artificielles utilisées par beaucoup de patients avant même d'aller consulter. Ces symptômes sont, cependant, peu spécifiques de cette maladie.

1.1.1. Test de Schirmer

La diminution de la sécrétion lacrymale est mise en évidence par un test de Schirmer anormal. Ce test est effectué avec une bande de papier buvard calibrée dont une extrémité est placée dans le cul-de-sac lacrymal inférieur (*Fig.16*). Le volume du flux lacrymal est apprécié par la longueur du papier buvard humidifiée au bout de 5 minutes. Le test est considéré comme pathologique lorsque moins de 5 à 8 mm de papier sont imbibés.



Figure 16. Le flux lacrymal mesuré par le test de Schirmer.

Il s'agit toutefois d'un test grossier comportant de faux positifs et de faux négatifs. Sa sensibilité augmente, néanmoins, quand il est effectué à deux reprises [81]. Chez le sujet âgé, son interprétation est difficile à cause de la réduction physiologique des sécrétions. Il reste cependant simple et utile comme élément de dépistage lorsque le diagnostic de SGS est soupçonné.

Il existe, en fait, plusieurs variantes de ce test. Les critères d'interprétation seront différents selon que l'on utilise telle ou telle variante. Ainsi, nous pouvons avoir des tests (Schirmer I) avec ou sans anesthésique local. La présence de ce dernier cause moins d'irritation pour le patient mais provoque une diminution des sécrétions.

De plus, il existe aussi un test avec stimulation du réflexe de la glande nasolacrymale (Schirmer II). Il est réalisé en insérant doucement l'extrémité d'un coton-tige dans le nez pour effleurer le méat ethmoïde. Ce test peut aider à

différencier deux catégories de patients. En effet, chez ceux atteints de SGS, les glandes lacrymales sont détruites par l'infiltrat lymphocytaire. Elles ne vont alors pas répondre à une stimulation. Par contre, les patients présentant une kératoconjonctivite sèche sans être atteints par le SGS, ont un larmoiement de base faible mais une capacité normale à réagir au réflexe nasolacrymal. [82].

Hyposécrétion lacrymale

Alacrymie héréditaire, congénitale

Lésions acquises des glandes et canaux

Atrophie et/ou obstruction après :

- Brûlure chimique
- Radiothérapie faciale

Inflammation conjonctivale (trachome, pemphigus)

Sarcoïdose

Affections neurologiques (V et VII^e paires)

Toxiques et médicaments

Parasympatholytiques

Neuroleptiques

Fluor

Hypolacrymie sénile

Kératoconjonctivites sèches

Localisations conjonctivales de dermatoses bulleuses :

During-Brocq

Ectodermose pluri-orificielle

Epidermolyse bulleuse

Pseudo-pemphigus oculaire

Tableau VI. Autres causes des hyposécrétions lacrymales et des kératoconjonctivites sèches [83].

1.1.2. Test de la coloration au rose Bengale

Cette épreuve consiste à instiller dans l'œil une solution de rose Bengale qui colore sélectivement les cellules de la conjonctive et de la cornée, lésées par la maladie. Ce colorant permet ainsi grâce à un examen à la lampe à fente, de visualiser les zones sèches. En effet, au niveau de la "zone d'exposition" (entre les deux paupières), l'évaporation du film est plus rapide et la sécheresse peut être prolongée et sévère. Par conséquent, des érosions peuvent survenir. Ce test sert à dépister les ulcérations débutantes et montre parfois une kératite filamenteuse caractéristique (Fig. 17). Ce colorant ne devrait pas être laissé dans l'œil du patient pendant une période prolongée car il peut mener à une irritation locale.

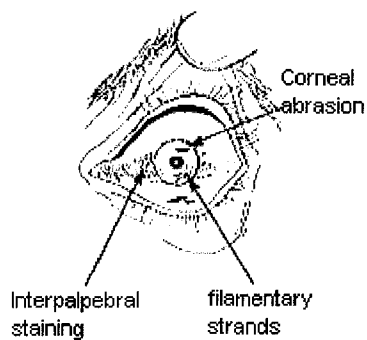


Figure 17. Coloration au rose Bengale démontrant des anomalies des surfaces conjonctivales et cornéennes.

Outre la perturbation quantitative, le film lacrymal peut aussi présenter des anomalies qualitatives. En effet, les larmes contiennent habituellement des lipides qui aident à la stabilité du film et retardent son évaporation. Dans le cas d'un SGS, les glandes de Meibomius produisant ces lipides et la surface cornéenne deviennent inflammées, provoquant ainsi une blépharite. De plus, la perte de production lipidique va exacerber la xérophtalmie. Les cliniciens apprécient la stabilité du film lacrymal au biomicroscope. Le temps de rupture (break up time), qui est normalement de 12 à 15 secondes, est généralement inférieur à 10 secondes pour un SGS. D'autres examens enfin peuvent être effectués. L'évaluation du taux de lysozyme dans les larmes a été proposée car il s'avère qu'il est souvent diminué.

Enfin, les verres de contact, particulièrement les souples et perméables aux gaz, peuvent contribuer aux abrasions cornéennes parce que le film adéquat de larme peut ne pas être disponible pour effacer les substances étrangères emprisonnées sous les lentilles. Ainsi, les patients qui en portent devraient les enlever la nuit et devraient être avertis du risque d'abrasions cornéennes.

1.2. Atteinte des glandes salivaires

1.2.1. Symptômes cliniques

La diminution de la sécrétion salivaire est souvent cliniquement latente en cas de SGS peu évolué. A l'interrogatoire, le médecin peut retrouver une simple gêne à la mastication, parfois associée à des troubles du goût [84]. A une phase tardive, l'hyposialie est évidente, déterminant une xérostomie très importante : les malades doivent s'humecter la bouche en permanence surtout pour avaler de la nourriture. Ils se lèvent la nuit à cause de la nycturie qui se développe ou pour boire à cause de la sécheresse buccale. Ces patients sont obligés de prendre de l'eau avec eux tout le temps ou de sucer sans cesse des bonbons.

La xérostomie peut entraîner de véritables glossodynies avec troubles fonctionnels extrêmement importants, notamment pour l'élocution [83]. L'examen buccal met en évidence la sécheresse des muqueuses, qui sont vernissées, avec une langue dépapillée et une chéilite (*Fig. 18*).

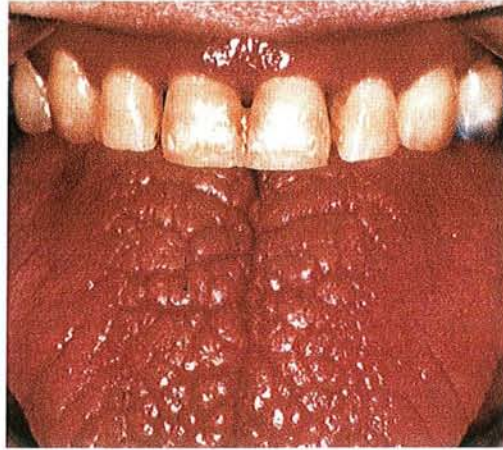


Figure 18. Langue "crocodilienne" d'un patient présentant le syndrome de Sjögren.

Il y a des différences importantes entre les micro-environnements oraux et oculaires. En effet, l'œil est un milieu "propre" (non colonisé) tandis que, dans la bouche, résident un grand nombre de micro-organismes aérobies et anaérobies. Aussi, les types de glycoprotéines, d'agents anti-bactériens ou encore de cytokines trouvés dans le film lacrymal, sont-ils sensiblement différents de ceux trouvés dans la salive. Ces différences expliquent pourquoi, dans le SGS, les infections oculaires se produisent d'une manière relativement rare à l'exception de la blépharite, alors que le tarissement salivaire est souvent associé à une augmentation de candidoses (*Fig.19*) et de bactéries cariogéniques [85]. Ces dernières font que les patients souffrant du SGS sont prédisposés à la perte d'émail et aux caries dentaires, en particulier à la base des dents (*Fig.20*). C'est une forme particulièrement agressive d'affaiblissement dentaire qui peut réellement causer l'amputation de la couronne de la dent en l'entourant au niveau du collet, menant ainsi à sa rupture.

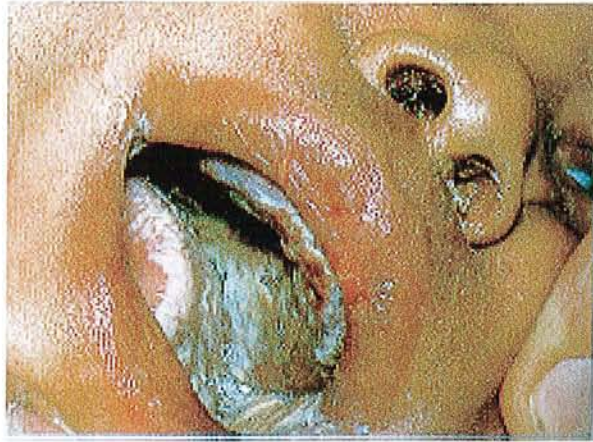


Figure 19. Candidose buccale.

Une conséquence de ces remarques est que la prochaine génération de larmes artificielles, de salives artificielles et de dentifrices pourrait contenir des mucines ou stimuler leur production.

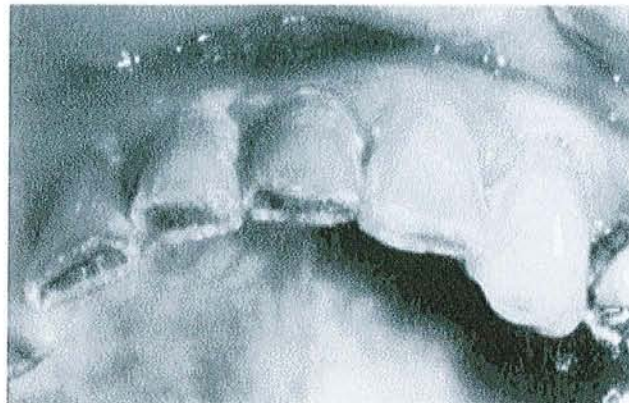


Figure 20. Émail dentaire diminué chez un patient présentant un syndrome de Sjögren.

Dans environ la moitié des cas, il existe une hypertrophie des glandes salivaires touchant le plus souvent les parotides [10]. Cette tuméfaction peut être aiguë, intermittente ou chronique, donnant alors au patient un faciès en poire ou en "écureuil" (Fig.21). Ce symptôme n'est cependant pas spécifique du SGS et il faut être vigilant dans le diagnostic en tenant compte de toutes les autres causes possibles (Tab.VII) [83].

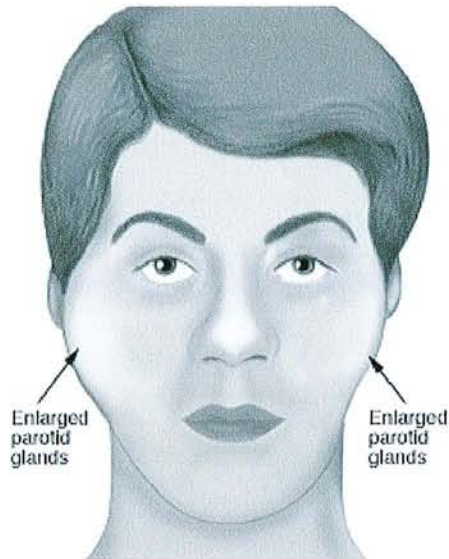


Figure 21. Hypertrophie des glandes parotidiennes lors du SGS.

Tuméfactions parotidiennes

Causes infectieuses

- Virales : oreillons, coxsackies, cytomégalovirus
- Bactériennes, notamment tuberculose
- Sialadénite chronique
- Actinomycose, histoplasmosis

Causes systémiques

- Sarcoïdose
- Maladie coéliquaue
- Fibrose kystique du pancréas
- Sialadénose

Causes nutritionnelles

- Cirrhoses hépatiques
- Hyperlipoprotéinémie
- Diabète sucré
- Malnutrition chronique
- Déficits vitaminiques A, B6, C

Affections tumorales

- Tumeur mixte de la parotide
- Lymphomes malins et leucémie lymphoïde chronique
- Cystadénolymphome

Tableau VII. Principales causes des tuméfactions parotidiennes [83].

1.2.2. Explorations complémentaires

Plusieurs tests peuvent être utilisés pour confirmer l'atteinte des glandes salivaires. Parmi eux, il y a la mesure du flux salivaire, avant et/ou après stimulation par du jus de citron. Ce test, censé confirmer l'insuffisance de sécrétion salivaire, est peu utilisé en pratique car soumis à de larges variations individuelles, y compris chez les personnes "saines". En effet, même si un faible taux de flux salivaire est objectivement établi, il n'y a pas de raisons pour définir à 100% une anormalité chez un patient. De plus, cette diminution n'est pas spécifique, si on prend en compte les effets de plusieurs médicaments (*Tab.VIII*) ou de certaines maladies chroniques autres que le SGS (*Tab.IX*). En outre, il existe des patients atteints de SGS qui ne présentent pas de symptômes de bouche sèche **[37,70]**.

D'autres chercheurs préconisent plutôt la mesure du flux parotidien (spontané et stimulé). Apparemment, cette mesure serait meilleure que la précédente mais elle reste peu utilisée et surtout beaucoup moins puissante que la biopsie des glandes salivaires pour le diagnostic du SGS **[70]**.

D'autres examens peuvent être effectués. Ainsi, la xérostomie peut être objectivée par le "test au sucre", mesurant le temps nécessaire à la fonte d'un sucre n°4 mis sous la langue (normale < 5 min) **[83]**. Il est également possible de doser, dans la salive, le taux de la β -2 microglobuline qui peut être augmenté (>1000 μ g/L). Une élévation majeure de ce taux devrait faire chercher une transformation maligne. Le taux du lysozyme peut aussi être augmenté et les IgG, habituellement absentes de la salive, sont souvent retrouvées.

En plus des dosages, les praticiens peuvent aussi se servir des techniques d'imagerie médicale comme la scintigraphie salivaire séquentielle au technétium. Cette technique est cependant peu spécifique dans le SGS. La sialographie est aussi utilisée. Elle permet d'objectiver des anomalies du parenchyme glandulaire. C'est une technique très sensible (presque aussi sensible que la biopsie des glandes salivaires labiales). Elle a cependant l'inconvénient d'être invasive ce qui pourrait exacerber le processus

inflammatoire ou induire des surinfections [86]. Récemment, des chercheurs ont introduit l'ultrasonographie dans le diagnostic et le suivi de patients atteints de SGS. Cette méthode quantitative s'est révélée très intéressante pour évaluer l'implication des glandes salivaires. Elle peut remplacer les deux techniques précédentes [86,87].

Psychotropes :

- Phénothiazines,
- Hypnotiques
- Antidépresseurs (Imipraminiques, Sérotoninergiques, IMAO)
- Anxiolytiques (Hydroxyzine)

Antihypertenseurs

- β -bloquants
- Antihypertenseurs d'action centrale (Clonidine, Méthyl dopa)
- Antihypertenseurs vasodilatateurs (α -bloquants)

Inhibiteurs calciques (Diltiazem)

Antispasmodiques anticholinergiques

Myorelaxants antispastiques (Baclofène)

Antiparkinsoniens (agonistes dopaminergiques)

Décongestionnants (pseudoéphedrine)

Antihistaminiques anticholinergiques

Antiémétiques (Imipraminiques, Oxybutinine)

Tableau VIII. Médicaments pouvant simuler un syndrome de Sjögren [83].

Enfin, le meilleur moyen diagnostique du SGS est histologique. La biopsie des glandes salivaires principales n'est pratiquement jamais utilisée. En revanche, on réalise des biopsies des glandes salivaires accessoires prélevées, le plus souvent, sur la lèvre inférieure. Ce geste sans gravité montre des lésions caractéristiques du SGS (Fig.6). Il permet en outre une appréciation du pronostic selon le degré de destruction des acini et l'importance de la prolifération lymphoplasmocytaire. Dans les formes évoluées, on peut constater une fibrose plus ou moins importante.

Cet examen est la méthode la plus spécifique pour confirmer le diagnostic de SGS. Sa sensibilité peut, par contre, être diminuée dans le cas d'un patient

fumeur. Le tabac peut aussi influencer négativement la recherche d'anti-Ro/SSA et anti-La/SSB dans le sang [88].

En fonction de l'importance et du nombre des follicules, une cotation semi-quantitative en cinq stades a été proposée par Chisholm :

- Stade 0 : glande normale ;
- Stade 1 : infiltrat léger ;
- Stade 2 : infiltrat moyen comportant moins d'un foyer pour 4 mm² ;
- Stade 3 : 1 foyer pour 4 mm² ;
- Stade 4 : plus d'un foyer pour 4 mm²
(un foyer est défini par l'agrégat de plus de 50 cellules mononuclées).

Les stades 3 et 4 sont pratiquement spécifiques du SGS [11,40].

1.3. Autres atteintes viscérales

Il arrive parfois que d'autres glandes exocrines soient atteintes. Ainsi, la sécheresse du nez, de l'oropharynx postérieur, du larynx et du tractus respiratoire peut provoquer une épistaxis, une dysphonie, une otite moyenne récidivante, une trachéo-bronchite ou une pneumonie [10]. De plus, une pancréatite aiguë ou chronique, une hépatopathie et une gastrite atrophique, volontiers associée à des anticorps anti-cellules pariétales gastriques, peuvent s'observer.

La muqueuse vaginale est également sèche, et les femmes se plaignent souvent de dyspareunie. Ce problème, relativement commun dans le cas du SGS, n'est pas souvent exprimé au médecin parce que la femme est embarrassée. Pourtant, il peut être facilement diminué avec des lubrifiants topiques et un traitement œstrogénique local (chez les patientes plus âgées). Comme les femmes sont peu souvent disposées à évoquer ce sujet, il est essentiel que le praticien initie cette discussion.

Xérostomie

Affections congénitales

- Aplasia des glandes salivaires principales
- Dysfonctionnement
- Imperforation des canaux salivaires

Atteinte organique des glandes salivaires

- Parotidectomie et évidement sous-maxillaire
- Radiothérapie cervico-faciale
- Parotidites et sous-maxillites virales

Déficits transitoires

Déshydratation cellulaire (diabète, fièvre...)

Médicaments :

- Parasympatholytiques (belladone, atropine, anti-parkinsoniens)
- Opiacés
- Psychotropes
- Réserpine, clonidine
- β -bloquants

Déficits chroniques

Asialies neurologiques :

- Sclérose En Plaques
- Diabète insipide post-traumatique
- Parkinson

Intoxication médicamenteuse chronique

Tableau IX. Principales causes des asialies.

II. Manifestations systémiques

Fréquentes, parfois au premier plan de la scène clinique, elles posent bien évidemment le problème de les rapprocher de la présence d'un SGS et de leur autonomie fondée sur l'élimination de toute autre vascularite associée (lupus par exemple). Leur survenue semble influencer sur le devenir du patient avec une mortalité globale augmentée par rapport aux patients atteints de SGS sans avoir les symptômes qui vont à présent être décrits **[89]**.

II.1. Manifestations articulaires

Les patients présentant le syndrome de Sjögren développent des symptômes extra-glandulaires semblables à ceux que présentent les patients dans d'autres maladies rhumatismales, en particulier le lupus érythémateux disséminé. Ils développent des arthralgies de type inflammatoire qui peuvent évoluer en polyarthrite. En général, cette dernière est non érosive, non destructrice, ce qui permet au fil de l'évolution la distinction avec la polyarthrite rhumatoïde. Ceci est très important d'autant que les malades ont très souvent un niveau élevé de facteur rhumatoïde circulant.

II.2. Manifestations pulmonaires

Elles sont dominées par la fibrose interstitielle diffuse et par la pneumonie interstitielle lymphocytaire. Des épanchements pleuraux ont aussi été retrouvés. Il peut exister des infections pulmonaires à répétition secondaires à la diminution des sécrétions muqueuses.

Certains chercheurs pensent qu'une détérioration au niveau pulmonaire pourrait précéder l'apparition d'autres signes du SGS, mais un suivi à long terme (10 ans) de maladie pulmonaire chez des patients atteints de pSS a été rassurant **[90,91]**.

II.3. Manifestations rénales

Liées à l'infiltration lymphocytaire, elles sont dominées par l'acidose tubulaire rénale **[92]**. Une néphrocalcinose (Fig.22) et une lithiase peuvent également s'observer. La glomérulopathie dans les formes primitives du SGS est rare, sauf lorsqu'il y a une cryoglobulinémie associée. Il s'agit alors d'une glomérulonéphrite par complexes immuns.



Figure 22. Néphrocalcinose dans le syndrome de Gougerot-Sjögren.

II.4. Manifestations neurologiques

Elles seraient de deux types en fonction de l'infiltrat mononucléé ou neutrophile. Les observations neurologiques les plus fréquentes sont des neuropathies périphériques sensitivo-motrices ou des atteintes sensibles du trijumeau. Les troubles centraux font, quant à eux, l'objet de plusieurs publications et leur présence dans le SGS varie de "très fréquentes" à "inexistantes" [93-95]. Des troubles psychiatriques sont parfois observés, avec des états d'anxiété, de dépression, d'irritabilité... Ils ne sont pas tous secondaires aux handicaps fonctionnels [83,96].

II.5. Manifestations vasculaires

20% des malades atteints du syndrome de Sjögren primaire se plaignent d'un syndrome de Raynaud et 25% d'une vascularite. Un purpura hyperglobulinémique (Fig.23) ou cryoglobulinémique, reflétant le dépôt de complexes immuns, peut être observé.



Figure 23. Syndrome primaire de Sjögren. Cette éruption purpurique est caractéristique et ressemble à la macroglobulinémie de Waldenström.

III. Fatigue et fibromyalgie

Un symptôme commun de syndrome de Sjögren est la fatigue. La fatigue peut être débilitante et n'est pas souvent prise au sérieux par le médecin traitant ou par la famille du patient. Il est important de déterminer si la fatigue résulte d'un processus inflammatoire, d'un déséquilibre hormonal, ou de problèmes non immunitaires et/ou non hormonaux. La fatigue liée à une maladie immunitaire est généralement attribuée à l'action nerveuse centrale de cytokines tels qu'IL-1 ou TNF. En outre, les patients présentant le syndrome de Sjögren ont une fréquence plus élevée d'hypothyroïdisme qui peut être une cause hormonale. Les causes non immunitaires et/ou non hormonales sont, quant à elles, mal comprises.

La fatigue est généralement associée à une fibromyalgie et peut être plus fréquente chez les patients présentant le syndrome de Sjögren. La grande fréquence des plaintes de sécheresse chez les patients souffrant de fibromyalgie sans être atteints par Sjögren (par exemple des biopsies de glandes salivaires normales) suggère que des zones du système nerveux central sont peut-être impliquées dans la fibromyalgie. Les conséquences de cette dernière peuvent être encore aggravées par de mauvaises habitudes de sommeil. Par exemple,

dans le SGS, les nuits se trouvent souvent perturbées par des réveils fréquents liés à la sécheresse buccale. Ces patients se réveillent pour boire puis se lèvent encore pour uriner. Ce cycle peut être répété plusieurs fois par nuit et la multiplication de ces sommeils interrompus peut prédisposer à la fibromyalgie.

IV. Anomalies biologiques et immunologiques

Nous retrouvons un syndrome inflammatoire, avec augmentation de la vitesse de sédimentation globulaire, parfois une anémie et une leucopénie. Plus évocatrice est la constatation d'une hyperprotidémie parfois majeure avec syndrome d'hyperviscosité. L'électrophorèse sérique objective une forte hypergammaglobulinémie polyclonale. Un composant monoclonal doit être systématiquement recherché. Il ne traduit pas toujours l'existence d'un lymphome car des gammopathies monoclonales bénignes peuvent être observées dans le cas d'un SGS. Cependant, lorsqu'un lymphome est soupçonné, la biopsie d'une adénopathie ou d'une glande salivaire accessoire permet le diagnostic et montre en général une prolifération maligne de lymphocytes B. La survenue possible d'un lymphome nécessite une surveillance rigoureuse du taux de $\beta 2$ microglobuline dans le sérum (son élévation devrait attirer l'attention).

Sur le plan immunologique, en plus de l'excès d'immunoglobulines, l'existence d'une hypocomplémentémie, de complexes immuns circulants ou de cryoglobulinémie sont autant d'anomalies rencontrées. Cette dernière est le plus souvent de type mixte, mais elle peut aussi être monoclonale : elle est alors volontiers associée à une prolifération lymphoïde maligne.

Mais, lors du SGS, nous constatons surtout une forte apparition d'autoanticorps dont les anticorps antinucléaires. Les anti-SSA/Ro et surtout les anti-SSB/La, plus spécifiques de la maladie, ont été évoqués auparavant. Leur présence est bien corrélée avec celle du facteur rhumatoïde. Ce dernier est nettement plus fréquent dans les SGS secondaires à la polyarthrite rhumatoïde (60% des cas)

que dans les formes primitives. On peut donc se demander s'il ne s'agit pas plus d'un épiphénomène de la polyarthrite rhumatoïde que d'une manifestation liée au syndrome sec [11].

Enfin, la pièce sécrétoire étudiée par El Kaissouni, Béné et Faure pourrait être proposée comme un nouveau marqueur diagnostique du SGS. Cette glycoprotéine est normalement synthétisée par certaines cellules épithéliales et assure le transport des immunoglobulines IgA ou IgM polymériques depuis la lamina propria vers les sécrétions. Cette étude a montré une grande corrélation entre le SGS et la surexpression de cette pièce sécrétoire dans les cellules épithéliales acineuses des glandes salivaires [97,98].

V. Lymphome

Le SGS est une maladie auto-immune bénigne en général mais qui, pour certains patients, peut être fatale. En effet, les malades présentent un risque accru de développer un lymphome, une macroglobulinémie de Waldenström ou encore une hyperactivité lymphoïde (pseudo-lymphome) (Tab.X) [99,100].

Le terme "pseudo-lymphome" a été employé pour décrire un patient qui a les symptômes cliniques du lymphome (sueurs nocturnes, lymphadénopathie) mais qui ne montre pas de lymphome franc sur les biopsies. Au cours du pseudo-lymphome, les lymphocytes B ont une sécrétion polyclonale mais l'infiltrat lymphocytaire, observé dans les biopsies, est principalement composé de cellules T auxiliaires. Les lymphomes sont, quant à eux, généralement composés de lymphocytes B monoclonaux. Ces pseudo-lymphomes peuvent guérir ou évoluer vers un lymphome.

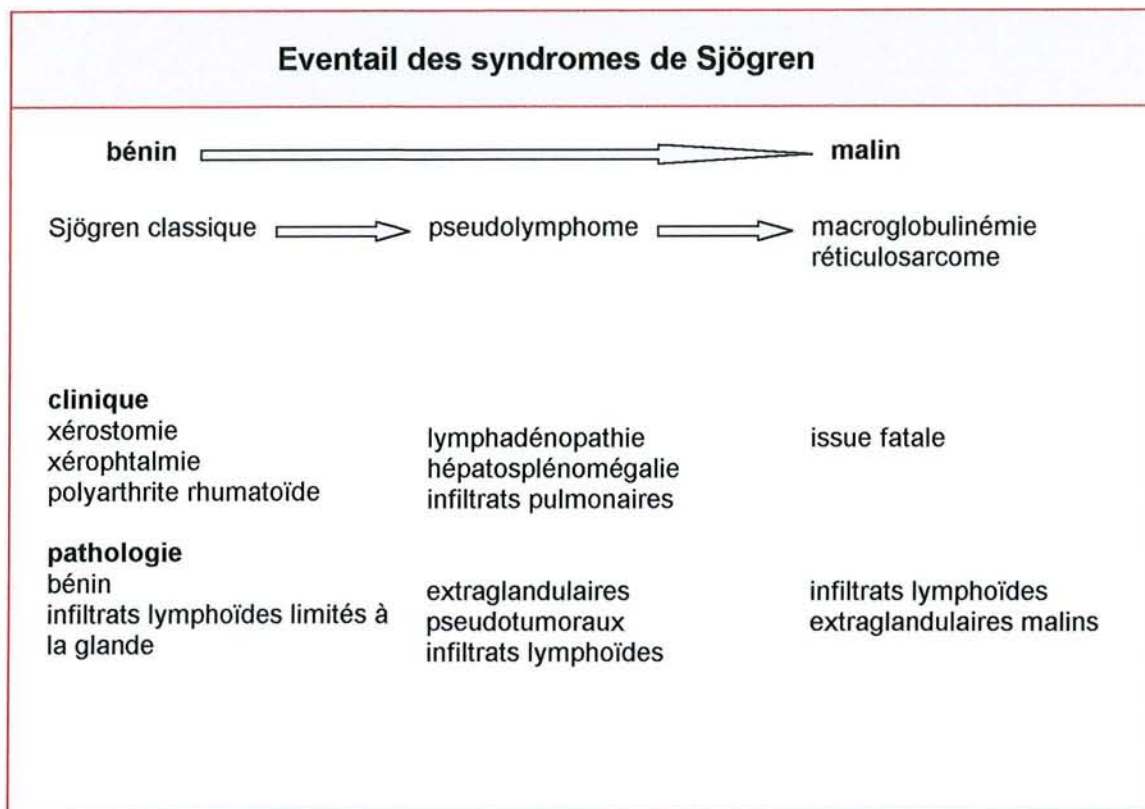


Tableau X. Eventail des syndromes de Sjögren [12].

Les lymphomes, quant à eux, constituent une complication classique mais heureusement rare du SGS. Leur apparition est certainement favorisée par le déficit cellulaire T et l'hyperactivité lymphocytaire B qui finit par isoler un clone tumoral. Le risque de développer un lymphome est donc apparemment relié à la sévérité de la lymphoprolifération associée au SGS [101].

Le risque relatif de développer un lymphome non hodgkinien pour un patient atteint de SGS est d'environ 40 [102]. Plusieurs facteurs de risque ont été signalés. Certains sont dus aux éléments intrinsèques de la maladie comme la tuméfaction parotidienne ; d'autres aux agents extrinsèques auxquels les patients sont exposés comme une irradiation de la parotide pour le traitement de leurs glandes salivaires ou une prise de médicaments cytotoxiques.

VI. Femmes enceintes

On a observé que le lupus néonatal est une complication fœtale beaucoup plus fréquente chez les patientes enceintes souffrant de SGS. Ceci serait le résultat d'un transfert actif des anticorps anti-SSA, à travers le placenta, pendant le second trimestre de la grossesse. Dans la circulation fœtale, on suppose que ces anticorps initient une inflammation du myocarde. Cette dernière pourrait endommager définitivement le système de conduction cardiaque et aboutir à un bloc cardiaque congénital, souvent à la fin du second ou au début du troisième trimestre **[45]**.

Le lupus néonatal peut aussi se manifester par une dermatite qui survient après la naissance. Le rash disparaît avec le temps, les anticorps maternels finissant par être métabolisés **[35]**.

E. Evolution et thérapeutique

La thérapie du syndrome de Gougerot-Sjögren demeure empirique et symptomatique. En effet, comme son étiologie reste inconnue, la thérapeutique s'attache à corriger le syndrome sec avec des traitements locaux (pour les yeux, la bouche et autres surfaces sèches) et à apporter des soins pour les composantes auto-immunes systémiques telles que la vasculite, et pour les symptômes non spécifiques tels que les désordres de fatigue ou de sommeil.

I. Traitement des manifestations glandulaires

I.1. Yeux secs

Les larmes artificielles (*Tab.XI*) sont le principal soutien du traitement pour les yeux secs. Ces agents sont, néanmoins, limités par leur courte durée d'action. Au cours de ces dernières années, de nouvelles formulations ont été proposées pour des études cliniques avec différentes concentrations en électrolytes (pour mimer la composition des larmes) et des tampons bicarbonates. Ces derniers sont censés interagir avec les mucines et former un gel mucines-bicarbonates qui aura, comme conséquence, une protection accrue de la surface oculaire. Les premiers résultats de ces études sont encourageants **[103]**.

Les larmes artificielles sont conditionnées de deux manières : avec ou sans conservateurs. Quelques-uns de ces excipients (notamment les dérivés mercuriels) ont un effet irritant sur l'œil chez certains patients souffrant de

xérophtalmie, d'autant plus qu'ils ne sont pas dilués par les larmes du patient et restent à une concentration relativement élevée. Il faudra alors changer de produit, ou mieux, utiliser des larmes artificielles sans conservateurs actuellement disponibles en unidoses.

Lors de l'évaluation des larmes artificielles, il est nécessaire de déterminer si la goutte reste suffisamment longtemps ou si elle est immédiatement évacuée après son instillation dans l'œil. Si tel est le cas, une préparation plus visqueuse devra alors être utilisée. Néanmoins, ces produits peuvent causer un brouillard visuel et sont à utiliser avec prudence chez les conducteurs et utilisateurs de machine.

Produits à faible viscosité		
<i>Sans conservateur</i>		
UNILARM®		
<i>Avec conservateurs</i>		
LARMES ARTIFICIELLES®	DIALENS®	LIQUIFILM®
Produits à haute viscosité		
<i>Sans conservateur</i>		
LACRYVISC UNIDOSES®	LACRYPOS UNIDOSES®	CELLUVISC UNIDOSES®
<i>Avec conservateurs</i>		
DULCILARMES®	GEL-LARMES®	LACRYVISC®
LACRIGEL®	LACRINORM®	LACRYPOS®
DACRYOLARMES®		

Tableau XI. Produits de suppléance lacrymale.

Le volume des larmes sur la surface oculaire reflète leur taux de production versus leur taux de pertes à la fois par évaporation et par drainage par les canaux lacrymaux. Une occlusion à ce niveau peut être effectuée par l'ophtalmologiste, chez les patients présentant une sécheresse oculaire sévère, en utilisant temporairement des bouchons en collagène, en matières plastiques ou plus durablement par une cautérisation. Cette intervention peut aider certains patients en réduisant la fréquence d'utilisation des larmes artificielles. Plus rarement, les chirurgiens peuvent utiliser une blépharorrhaphie latérale qui a pour but de rétrécir la fente palpébrale et diminuer l'évaporation lacrymale. Mais,

avant d'utiliser ces procédures lourdes, le patient peut tout simplement essayer des lunettes à chambre humide ou des verres protecteurs contre les effets desséchants du vent.

Enfin, d'autres études sont actuellement en cours pour tester des stimulateurs locaux. Ainsi, un dérivé de la bromhexine (N-cyclohexyl-N-méthyl-2-phenylethylamine, HCl) utilisé habituellement comme agent fluidifiant (Bisolvon®) aurait des effets bénéfiques en favorisant une sécrétion lacrymale et salivaire. D'autres substances comme la ciclosporine-A à 2% dans de l'huile d'olive (traitement de la KCS) ou le 3-isobutyl-1-méthylxanthine, un stimulateur de l'AMPc (diminution de la coloration au rose bengale, c'est-à-dire des zones sèches), sous forme de collyres, font également l'objet d'essais cliniques [103]. D'autres chercheurs, en partant de la constatation que le SGS touche principalement les femmes, ont émis l'hypothèse que la déficience androgénique serait un facteur étiologique critique dans la survenue du syndrome des yeux secs. Un traitement androgénique de la surface oculaire pourrait alors favoriser les fonctions des glandes lacrymales et meibomiennes. Le résultat démontre que les androgènes régulent ces deux fonctions, et suggère qu'une administration topique d'androgènes pourrait servir comme thérapie efficace pour le traitement des yeux secs lors d'un SGS [104].

1.2. Traitements pour bouche sèche.

Le traitement de la xérostomie est difficile. En effet, en plus de la sécheresse chronique, les patients risquent de développer des caries dentaires ou encore des candidoses. Aussi, la démarche thérapeutique adoptée devra-t-elle avoir plusieurs objectifs :

- Une bonne hygiène buccale pour prévenir les caries dentaires, en évitant de prendre des produits sucrés et en utilisant des dentifrices et des bains de bouche au fluor pour aider à retarder la perte d'émail.

- Minimiser l'inconfort buccal par l'utilisation de substituts salivaires. Ainsi, le patient pourra prendre du Sulfarlem S25[®] ou Artisial[®]. Des prises fréquentes de gorgées d'eau et l'utilisation de chewing-gum sans sucre pour stimuler la sécrétion sont parfois suffisantes pour soulager la xérostomie.

Par ailleurs, chez certaines patientes, la sécheresse des sinus conduit à une respiration par la bouche pendant la nuit, renforçant ainsi la sécheresse buccale. S'appliquer donc à laisser les sinus ouverts peut grandement aider à atténuer les symptômes buccaux. Un rinçage doux, avec par exemple une solution saline diluée, destinée à enlever les sécrétions de mucus sec, peut s'avérer utile. Enfin, pour les candidoses buccales, l'amphotéricine B (Fungizone[®]) ou la Nystatine (Mycostatine[®]) sont les traitements de choix.

1.3. Nouvelles approches de la stimulation des fonctions salivaires et lacrymales dans le syndrome de Gougerot-Sjögren

Nous avons vu, en abordant la physiologie de la sécrétion, qu'il y avait un excès de récepteurs M3 disponibles pour la stimulation par des analogues de l'acétylcholine. C'est ainsi qu'il a été trouvé que l'administration de pilocarpine (analogue oral de l'acétylcholine) augmentait le confort des patients avec une xérostomie consécutive à un SGS **[105]**. Cette molécule paraît efficace pour une administration au long court et semble bénéfique pour réduire les symptômes de la xérostomie, même si le taux de sécrétion des glandes salivaires ne semble pas augmenter. Les effets secondaires les plus fréquents sont une sueur accrue et une intolérance gastro-intestinale, qui sont généralement contrôlés en diminuant les doses. La dose optimale, qui est la moins susceptible de donner des effets secondaires, est de 5 mg, 4 fois par jour **[106]**. Plus récemment, la cévimeline (autre analogue oral de l'acétylcholine qui montre plus de spécificité vis-à-vis du récepteur M3 que la pilocarpine) a été étudiée et a conduit à des résultats favorables **[107,108]**. Cette molécule a une durée de

fixation sur le récepteur M3 plus grande que celle de la pilocarpine et des essais cliniques suggèrent que, pour les symptômes oculaires, elle est plus bénéfique.

II. Approches de la thérapie pour les manifestations systémiques

L'approche de la thérapeutique dans le cadre des manifestations systémiques chez le patient atteint de SGS est complexe. En effet, si les corticostéroïdes sont efficaces dans ce syndrome [109,110], comme dans d'autres maladies auto-immunes, notamment lors d'une implication rénale (glomérulonéphrite), pulmonaire (lésions interstitielles), d'une vasculite ou encore en usage local (pour diminuer l'inflammation de la surface conjonctivale), leurs effets secondaires limitent leur dose thérapeutique et leur durée de traitement. Dans le cas de leur utilisation chez des patientes enceintes avec des preuves de détresse fœtale et des risques de bloc cardiaque néonatal, le traitement à la dexaméthasone est préféré à celui à la prednisone car la dexaméthasone passe à travers le placenta et ne requiert pas d'activation métabolique.

Un autre traitement a lui aussi été souvent cité dans différentes publications car il est utilisé pour la polyarthrite rhumatoïde, autre maladie auto-immune [111-113]. Il s'agit de l'hydroxychloroquine (Plaquenil®). Cependant, l'efficacité de cette molécule est controversée. Si certains la préconisent pour les arthralgies ou l'anémie à raison de 5-7 mg/kg/j, d'autres ne lui trouvent aucun bénéfice clinique dans le cas d'un SGS.

Les patients seront aussi amenés à prendre des anti-inflammatoires non stéroïdiens, notamment pour les myalgies. Cependant, ces patients ont apparemment une plus grande fréquence d'intolérance gastro-intestinale. Ceci pourrait résulter de la déficience du flux salivaire (normalement plusieurs litres par jour) qui neutralise l'acidité gastrique qui contribue aux symptômes de reflux gastro-œsophagien parfois observé dans le SGS.

Enfin, le malade doit proscrire toute drogue à effets anti-cholinergiques (phénothiazines, anti-spasmodiques...), et bien entendu, en raison de la possibilité d'évolution lymphomateuse, les immunodépresseurs, et plus particulièrement les agents alkylants (Endoxan, Chloraminophene) doivent, eux aussi, si possible, être évités.

F. Conclusion

Le syndrome de Gougerot-Sjögren est un désordre immunitaire systémique largement inconnu dans la pratique clinique, et souvent sous diagnostiqué. Deux raisons principales à cela :

- les symptômes sont variables et souvent non spécifiques,
- la prévalence de cette maladie, sa pathogenèse, son développement ainsi que son impact sur la qualité de vie des patients sont encore mal compris **[114]**.

Cette pathologie complexe n'a pas trouvé de traitement curatif efficace. Jusqu'à présent, les praticiens se sont contentés de traiter les symptômes à défaut de pouvoir traiter la cause. Cette médication uniquement symptomatique a révélé ses limites. Aujourd'hui, les chercheurs se tournent vers une nouvelle approche, considérant la pathologie dans sa globalité. De nombreuses voies sont explorées. Ainsi, certains investigateurs pensent que le SGS est d'origine virale et évaluent l'efficacité d'antiviraux dans cette maladie **[115]**. D'autres se tournent vers la voie immunologique poursuivant deux orientations majeures :

- empêcher la destruction des cellules épithéliales,
- stimuler les récepteurs muscariniques, pour augmenter la sécrétion des cellules épithéliales non détruites.

*2^{ème} partie : Analyse
structurale par RMN et
modélisation
moléculaire des peptides
complémentaire et non-
complémentaire du
peptide La/SSB, épitope
autoantigène des
lymphocytes B*

A. Introduction / Exposé du problème

Par les recherches actuelles, les scientifiques tentent de trouver un remède véritablement spécifique et curatif pour traiter le syndrome de Gougerot-Sjögren. Parmi les voies d'investigation, nous avons vu précédemment que l'on pouvait s'attaquer à la machinerie immunitaire qui se dérègle au cours de cette maladie. Ainsi, par exemple, un groupe de chercheurs a essayé avec succès d'inhiber, *in vitro*, la production du $TNF\alpha$ induite par la métalloprotéinase de matrice 9 en introduisant de l'ADNc srlkB α [116].

D'autres stratégies peuvent cependant être imaginées :

- Réguler la réponse immunitaire pour induire une tolérance ou une anergie des cellules B et T autoréactives,
- Bloquer cette réponse en empêchant les autoanticorps nocifs d'exercer leur action. Deux démarches sont envisageables :
 1. Séparer les autoanticorps anti-La/SSB du sérum des patients par plasmaphérèse sur résine, obtenue par greffage de molécules capables de complexer fortement et sélectivement ces anticorps. La méthode pourrait s'appliquer aussi bien aux anti-Ro/SSA mais nous ne parlerons dans ce qui va suivre que de La/SSB et de son anticorps, plus spécifique du SGS,
 2. Développer des anticorps anti-idiotypiques capables d'interagir avec les autoanticorps nocifs présents lors du SGS. En effet, à partir d'un ARN1 (Fig.24) codant pour un autoantigène La/SSB des cellules B, on peut déduire un ARN2 complémentaire. Cet ARN2 code pour un peptide qui, en théorie, est complémentaire à cet autoantigène. Nous appellerons ce peptide complémentaire : peptide cpl, alors que l'autoantigène

est appelé ncpl ou peptide non complémentaire. La démarche thérapeutique sera alors d'injecter à des rats ce peptide cpl pour obtenir des anticorps anti-idiotypiques issus de la réaction immunitaire. Ces derniers devraient logiquement, une fois administrés à l'Homme, réagir avec les autoanticorps du patient, les empêchant ainsi d'exercer leur effet nocif.

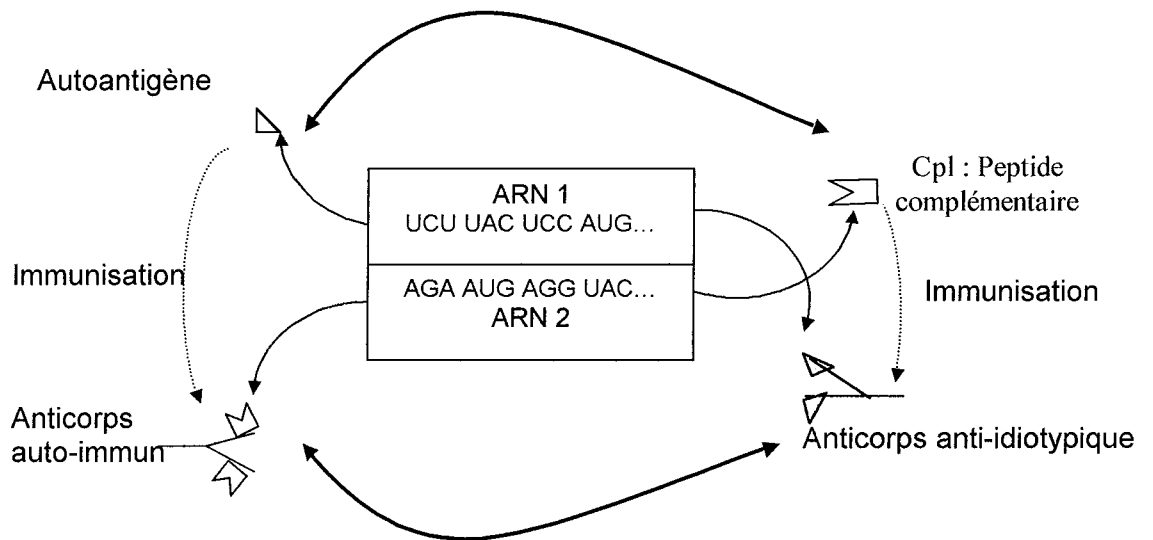


Figure 24. Schéma de la relation des ARN complémentaires entre eux et des peptides (unités de reconnaissance) qu'ils génèrent ainsi que des anticorps induits par ces unités [117].

Pour ces deux dernières approches, la modélisation moléculaire couplée à la RMN permet d'étudier les peptides antigéniques afin d'engendrer des composés superactifs (c'est à dire ayant une plus grande affinité vis-à-vis des autoanticorps) capables de bloquer spécifiquement la réponse auto-immune. En effet, dans l'organisme, les peptides sont rapidement dégradés par des protéases. La connaissance de la structure tridimensionnelle du peptide antigénique est donc indispensable à la génération d'analogues pseudo-peptidiques mimant efficacement une conformation donnée et ayant une demi-vie accrue vis-à-vis des protéases.

Il est toutefois difficile, dans bon nombre de cas, et même si on connaît la structure du peptide actif, de concevoir des analogues superactifs. Ainsi, par exemple, lors d'une étude sur la myasthénie, menée par le groupe de recherche du Dr CUNG (UMR7568 CNRS-INPL) sur le peptide MIR (Main Immunogenic Region) : pour obtenir une meilleure affinité vis-à-vis des autoanticorps, la partie N terminale devait être structurée sous forme d'un repliement β alors que la partie C terminale devait rester flexible pour entrer dans le site actif avant de se structurer ultérieurement [118,119]. Introduire une séquence pseudo-peptidique pour que le produit ne soit pas reconnu par les protéases peut également s'avérer une opération complexe.

Lors d'études précédentes, des chercheurs du Laboratoire de Biochimie de l'Université d'Ioannina (Grèce) ont pu identifier et synthétiser l'épitope peptidique 289-308 La/SSB, autoantigène des cellules B [120,121]. Il s'agit d'un peptide de 20 résidus que nous appellerons par la suite peptide non complémentaire ou ncpl, ayant comme séquence : Ac-Ala¹-Asn²-Asn³-Gly⁴-Asn⁵-Leu⁶-Gln⁷-Leu⁸-Arg⁹-Asn¹⁰-Lys¹¹-Glu¹²-Val¹³-Thr¹⁴-Trp¹⁵-Glu¹⁶-Val¹⁷-Leu¹⁸-Glu¹⁹-Gly²⁰-NH₂.

Ce peptide est codé par une séquence d'ARN dont la séquence complémentaire code pour un autre peptide qui sera désigné peptide complémentaire (cpl289) et qui aura comme séquence : Ser¹-Phe²-Glu³-Tyr⁴-Phe⁵-Pro⁶-Ser⁷-His⁸-Phe⁹-Phe¹⁰-Val¹¹-Pro¹²-Glu¹³-Leu¹⁴-Glu¹⁵-Val¹⁶-Thr¹⁷-Ile¹⁸-Ile¹⁹-Cys²⁰(Acm)-NH₂.

Le peptide cpl289 a été greffé sur le support SOC_n (Sequential Oligopeptide Carrier [122]) pour induire des anticorps anti-idiotypiques. Ce travail est en cours au laboratoire d'immunologie du professeur H.M. MOUTSOPOULOS, Athènes (Grèce).

Nous nous proposons, lors de ce travail, de déterminer la structure tridimensionnelle des peptides complémentaire et non complémentaire. Nous commencerons par un rappel sur les conformations pouvant être adoptées par un peptide. Nous développerons ensuite les deux étapes principales d'une analyse structurale :

- L'attribution des résonances protoniques du peptide à partir des expériences COSY, TOCSY et NOESY ; l'estimation des distances interprotoniques (à partir des corrélations NOE) et des contraintes angulaires (à partir des constantes de couplage $^3J_{\text{NH}\alpha}$) nécessaires à la construction du modèle moléculaire.
- La construction de la structure tridimensionnelle à partir des données RMN en utilisant les techniques de modélisation moléculaire.

Nous terminerons enfin par une analyse des résultats avant de conclure.

B. Rappels sur la structure des peptides

Les protéines et les peptides résultent du couplage, par des liaisons amides, d'une série de groupes amines et carboxyles d'acides α -aminés. Le nombre, la nature chimique et l'ordre d'enchaînement de ces résidus α -aminés sont des paramètres importants, influençant les propriétés biologiques extrêmement diversifiées des peptides qu'ils composent. Toutefois, d'autres facteurs entrent aussi en jeu. Ainsi, la façon dont sont disposées dans l'espace certaines fonctions chimiques peut jouer un rôle décisif. Il est donc capital de connaître les propriétés conformationnelles de ces molécules, *a priori* assez flexibles, que sont les peptides.

I. Conformation du squelette peptidique

La conformation du squelette peptidique est caractérisée par trois angles rotationnels ϕ , ψ et ω respectivement définis par les atomes autour des liaisons $N-C^\alpha$, $C^\alpha-CO$ et $CO-N$ (Fig.25).

Par convention, les angles ϕ et ψ varient de -180° à 180° ; les valeurs $\phi = \psi = 180^\circ$ étant celles de la chaîne étirée.

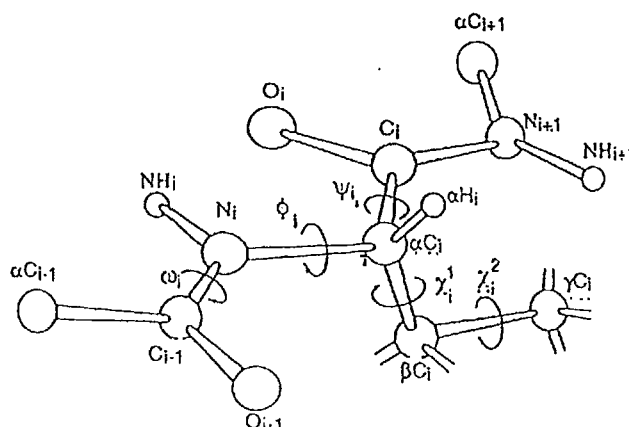


Figure 25. Définition des angles dièdres d'une unité peptidique utilisant la nomenclature standard définie par la commission IUPAC-IUB pour les atomes et les angles de torsion [123].

En raison du caractère partiellement double de la liaison amide, l'angle ω ne prend que des valeurs proches de $\omega=0^\circ$, correspondant à la disposition cis de l'enchaînement peptidique, ou de $\omega=180^\circ$, correspondant à la disposition trans (Fig.26).

Lorsque le peptide est constitué d'acides aminés classiques, la différence d'enthalpie libre entre les deux conformations ($\Delta G_0 > 4 \text{ Kcal mol}^{-1}$) est telle que l'enchaînement est totalement trans. Par contre, lorsqu'intervient un résidu proline ou des acides aminés N-substitués, la différence d'enthalpie libre entre les deux conformations diminue, et il existe le plus souvent un équilibre entre les dispositions cis et trans. Nous pouvons trouver aussi la disposition cis dans certains peptides cycliques.

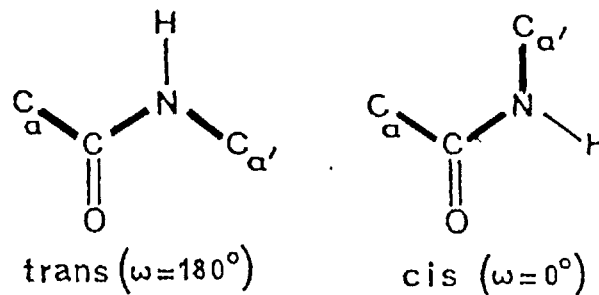


Figure 26. Représentation des deux dispositions cis et trans de l'enchaînement peptidique.

II. Carte conformationnelle

A priori, le squelette peptidique peut adopter un nombre infini de conformations, définies par des couples d'angles de torsion (ϕ, ψ). Cependant, beaucoup de ces conformations sont exclues par des recouvrements stériques

défavorables d'atomes. Grâce à l'analyse conformationnelle, une carte représentant les régions permises a été proposée par Ramachandran (Fig.27).

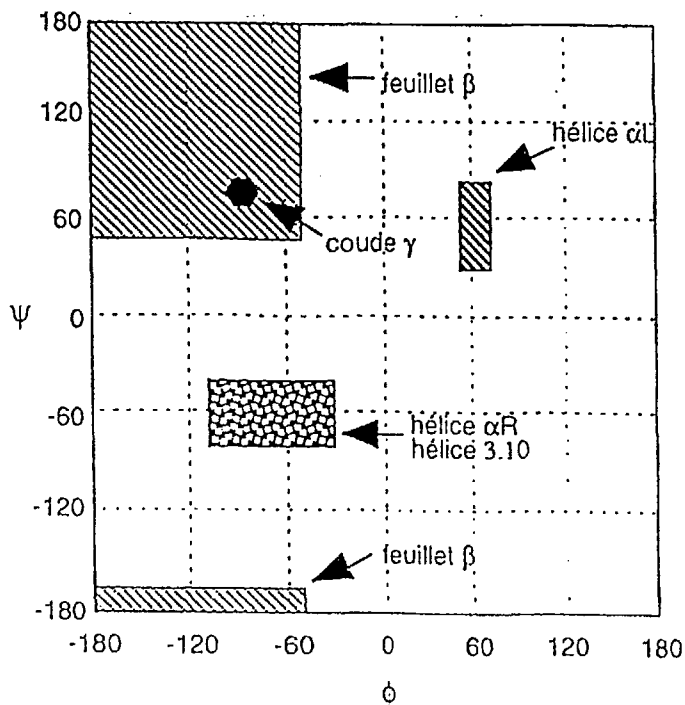


Figure 27. Principales régions (ϕ, ψ) permises pour les résidus peptidiques (sauf Pro et Gly) représentées sur la carte conformationnelle de Ramachandran [124].

Nous voyons par exemple qu'une conformation avec $\phi = 0^\circ$ et $\psi = 0^\circ$ ne peut physiquement pas exister.

C. Résonance magnétique nucléaire

I. Acquisition des données

L'avènement de la RMN à haute résolution a été un bond majeur dans l'étude des peptides et des protéines. Ainsi, de nombreux renseignements sur la structure (conformations et interactions moléculaires) des peptides en solution ont pu être obtenus. Néanmoins, la présence d'un même résidu plusieurs fois dans le peptide, et celle de résidus très proches dans le même peptide font que les spectres RMN sont relativement complexes du fait de la superposition des signaux issus de protons de même nature.

Toutes les expériences ont été réalisées avec un spectromètre RMN Bruker DRX-600 MHz. L'analyse des données a été effectuée sur une station Silicon Graphics, gérée par le système d'exploitation UNIX, en utilisant le logiciel Bruker XWINNMR.

II. Attribution des signaux

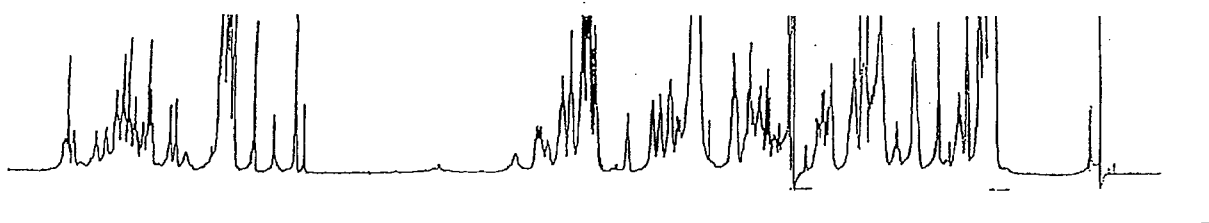


Figure 28. Spectre RMN protonique 1D du peptide complémentaire en solution dans le DMSO.

D'après la figure 28, il paraît évident qu'une attribution complète et univoque de ce spectre est impossible au premier abord du fait de sa complexité. Ainsi, il a été nécessaire de faire appel aux techniques de RMN à deux dimensions. Il en est de même pour le spectre du peptide non complémentaire.

Une expérience à deux dimensions est constituée par l'enregistrement d'une succession de spectres à une dimension utilisant une séquence RMN composée de plusieurs périodes. Le résultat d'une expérience de RMN à deux dimensions est représenté sur la figure 29 sous forme d'une carte bi-dimensionnelle.

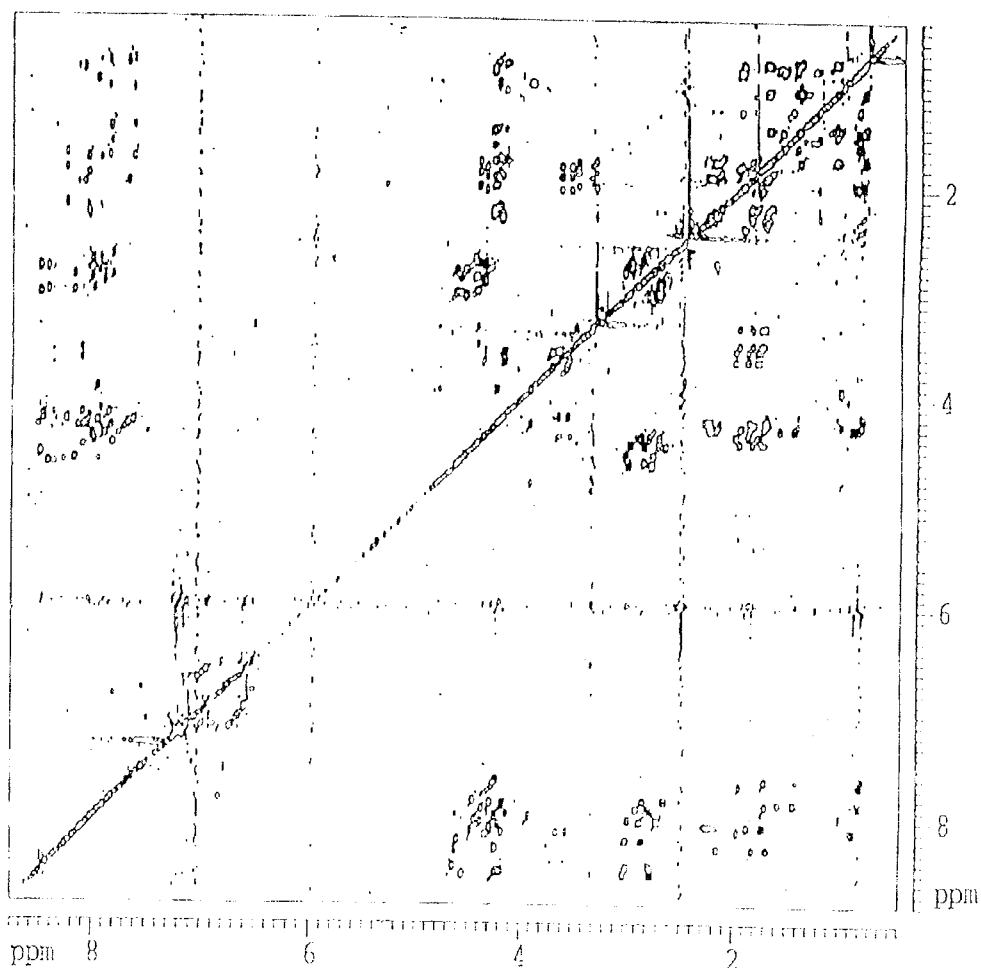


Figure 29. Carte des corrélations TOCSY du peptide complémentaire dans le DMSO.

Les résultats se présentent sous forme d'une carte carrée où la présence d'un signal aux coordonnées x, y matérialise soit l'existence d'une constante de couplage scalaire entre deux protons correspondant à des déplacements chimiques x et y (expérience COSY, TOCSY ou HOHAHA...), soit l'existence d'un couplage spatial dipôle-dipôle c'est à dire d'un effet NOE (expérience NOESY, ROESY).

L'expérience $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (CORrelation SpectroscopY) [123] permet d'établir les corrélations des protons entre eux à l'intérieur d'un même résidu acide aminé par l'intermédiaire de leur couplage scalaire vicinal à travers trois liaisons comme par exemple les corrélations : NH/H $^\alpha$, H $^\alpha$ /H $^\beta$, H $^\beta$ /H $^\gamma$... ou par l'intermédiaire de leur couplage scalaire géminale à travers deux liaisons (H $^\alpha$ /H $^\alpha$ avec Gly, H $^\beta$ /H $^\beta$, H $^\gamma$ /H $^\gamma$...).

L'intensité des pics de corrélations est proportionnelle à la valeur de la constante de couplage.

Nous pouvons aussi effectuer une expérience COSY relayée pour générer des corrélations à plus longue distance NH/H $^\beta$ ou H $^\alpha$ /H $^\gamma$...

L'expérience TOCSY (TOTAL CORRELATED SPECTROSCOPY) ou HOHAHA (HOMONUCLEAR HARTMANN HAHN) fournit les corrélations complètes des protons au sein d'un même résidu qui sont relayées par les constantes de couplage scalaire. En effet, lorsqu'un proton H $^\alpha$ est couplé en même temps aux deux protons NH et H $^\beta$, nous observons un pic de corrélation entre les signaux RMN de ces deux derniers (le proton H $^\alpha$ sert de relais d'aimantation aux deux protons NH et H $^\beta$). Nous pouvons de la même manière observer des relais à plus longue distance NH/H $^\gamma$, NH/H $^\delta$...

L'expérience $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY (NUCLEAR OVERHAUSER ENHANCEMENT SPECTROSCOPY) est utilisée pour déterminer les corrélations dipolaires qui s'effectuent par l'échange d'aimantation à travers les couplages dipôle-dipôle (effet overhauser nucléaire : NOE). Elle renseigne ainsi sur la proximité dans l'espace entre deux protons distants de moins de 5 Å L'effet NOE qui est

inversement proportionnel à la puissance 6 de la distance inter-protonique décroît très vite lorsque les deux protons s'éloignent l'un de l'autre.

La présence d'effet NOE entre le proton H^α d'un résidu (i) et celui de la fonction NH du résidu suivant (i+1), due à leur proximité à travers l'espace, permet le séquençage de la chaîne peptidique.

En général, pour un peptide au delà d'une séquence composée de cinq à six résidus (dans notre cas, nous en avons vingt), il est difficile avec la séquence COSY de remonter à l'attribution directe des protons H^β , H^γ et H^δ de chacun des résidus concernés à cause de la superposition de leurs signaux. Nous avons eu recours systématiquement à l'expérience TOCSY (Fig30).

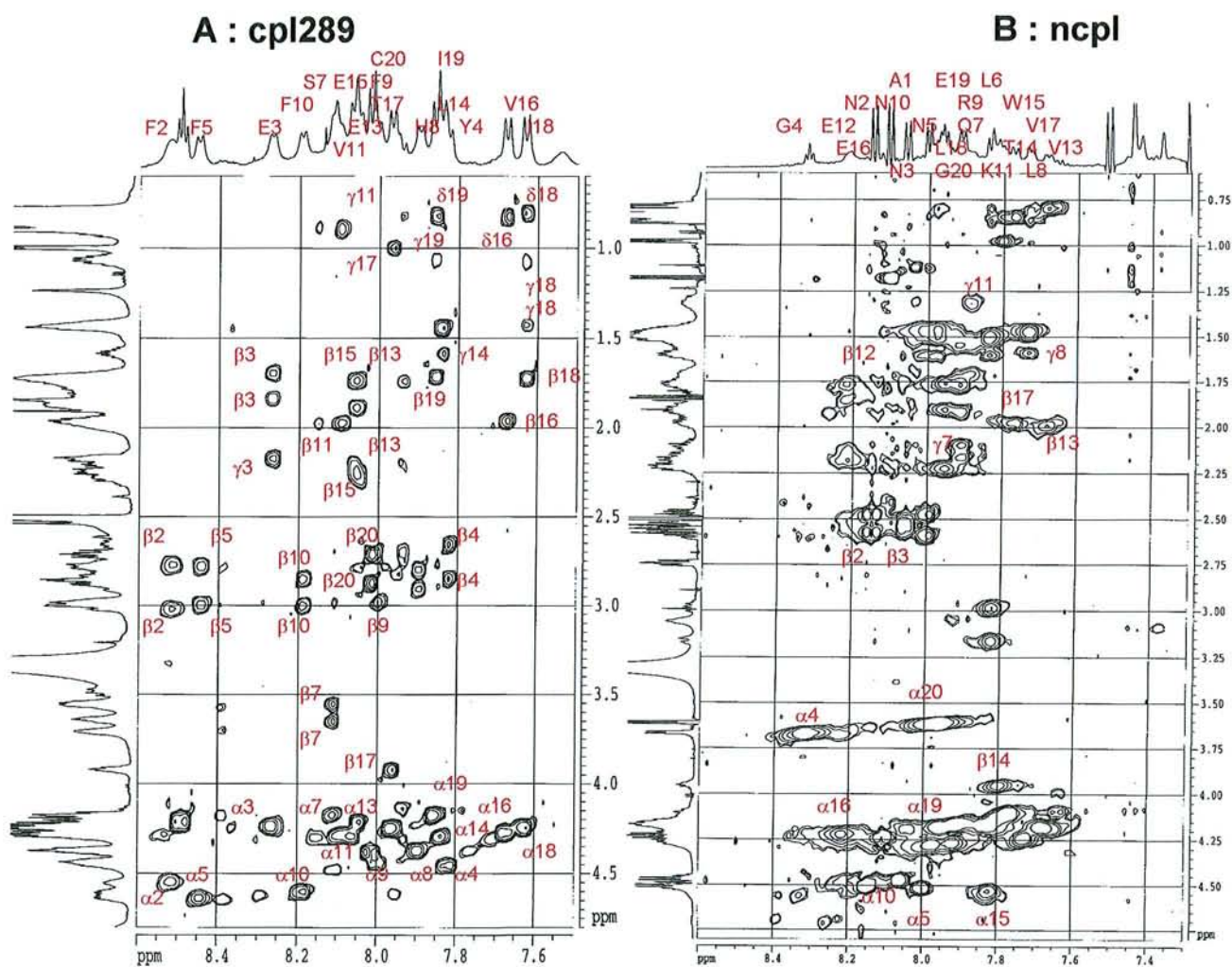


Figure 30. Spectre TOCSY des peptides cpl289 (A) et ncpl (B) en solution dans le DMSO avec étalement de la région NH/CH $^\alpha$. Attribution des signaux protoniques des spectres des peptides.

Prenons l'exemple du peptide cpl289 : si certains systèmes de spins sont facilement identifiables (résidus Tyr⁴, Ser⁷, His⁸), les résidus Glu, Ile, Phe, Val..., figurent plusieurs fois à différentes positions de l'enchaînement des acides aminés et sont donc plus difficilement analysables. En plus, même si nous arrivons à identifier leur système de spins, nous ne pourrions pas indexer les résidus.

De même, pour le peptide non complémentaire, nous n'avons pas pu avec l'expérience TOCSY seule, attribuer d'une manière précise tous les résidus sur la carte car certains ont leurs pics de corrélation superposés ou d'autres comme Asn, Glu, Leu, Gly et encore Val sont présents plusieurs fois dans la séquence peptidique. Nous avons donc utilisé la séquence NOESY pour effectuer l'attribution séquentielle et pour distinguer les systèmes de spins de deux résidus identiques.

L'effet NOE est un mécanisme de relaxation croisée qui a lieu lorsqu'il existe un couplage dipolaire (à travers l'espace) entre deux spins. L'irradiation de l'un des spins par un champ magnétique se répercute sur le second entraînant une modification de son aimantation.

L'attribution séquentielle des signaux est effectuée sur les deux parties agrandies de la carte NOE (*Fig.31,32,34 et 35*) en suivant les corrélations C^αH_i / NH_i et C^αH_i / NH_{i+1} (*Fig.31 et 32*) d'une part et les corrélations NH_i / NH_{i+1} (*Fig.34 et 35*) d'autre part. Nous avons tracé quelques lignes de connectivités à titre d'exemple.

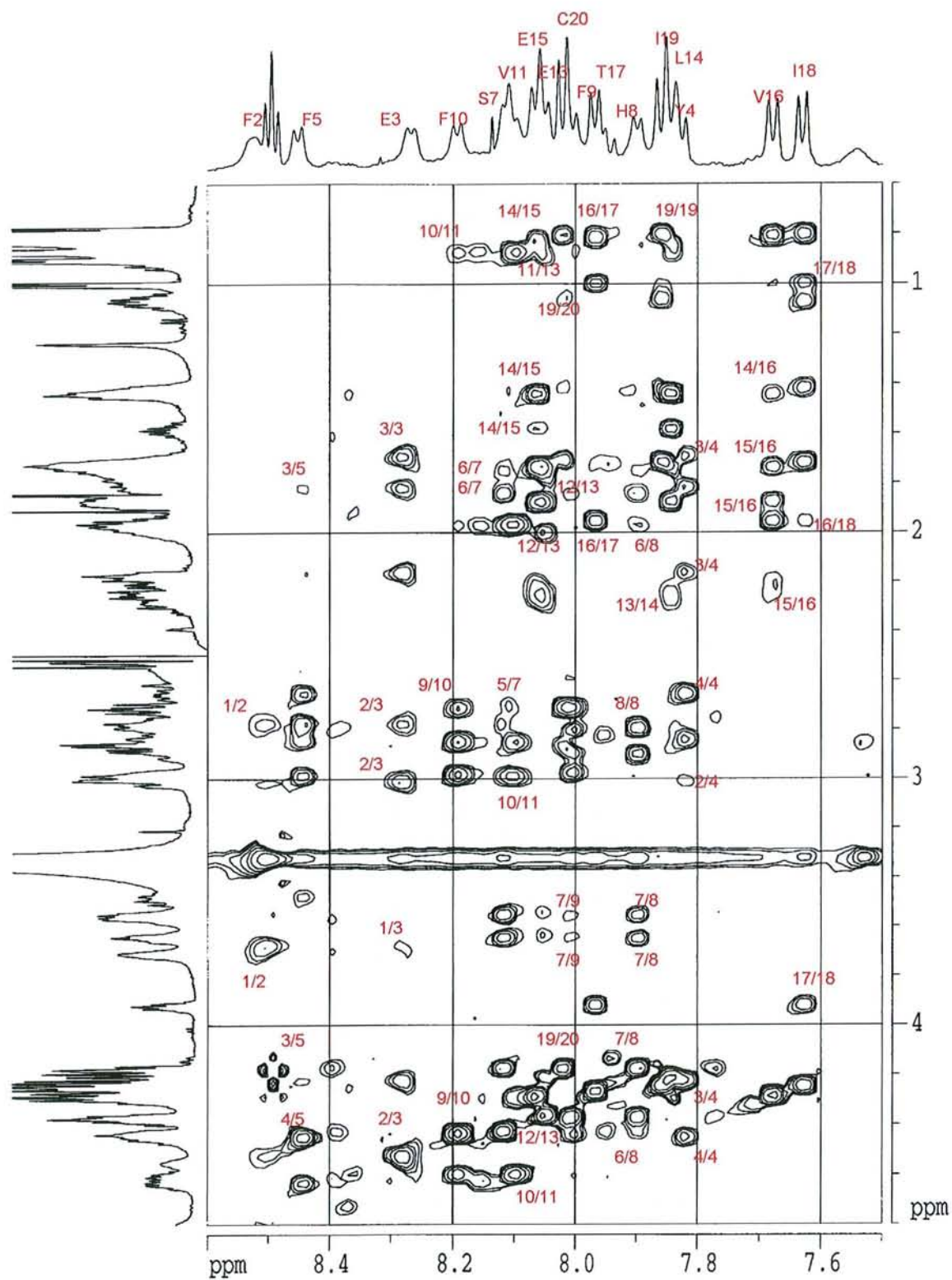


Figure 31. Expansion de la partie NH/CH^a de la carte de corrélations NOESY du cpl289 dans le DMSO.

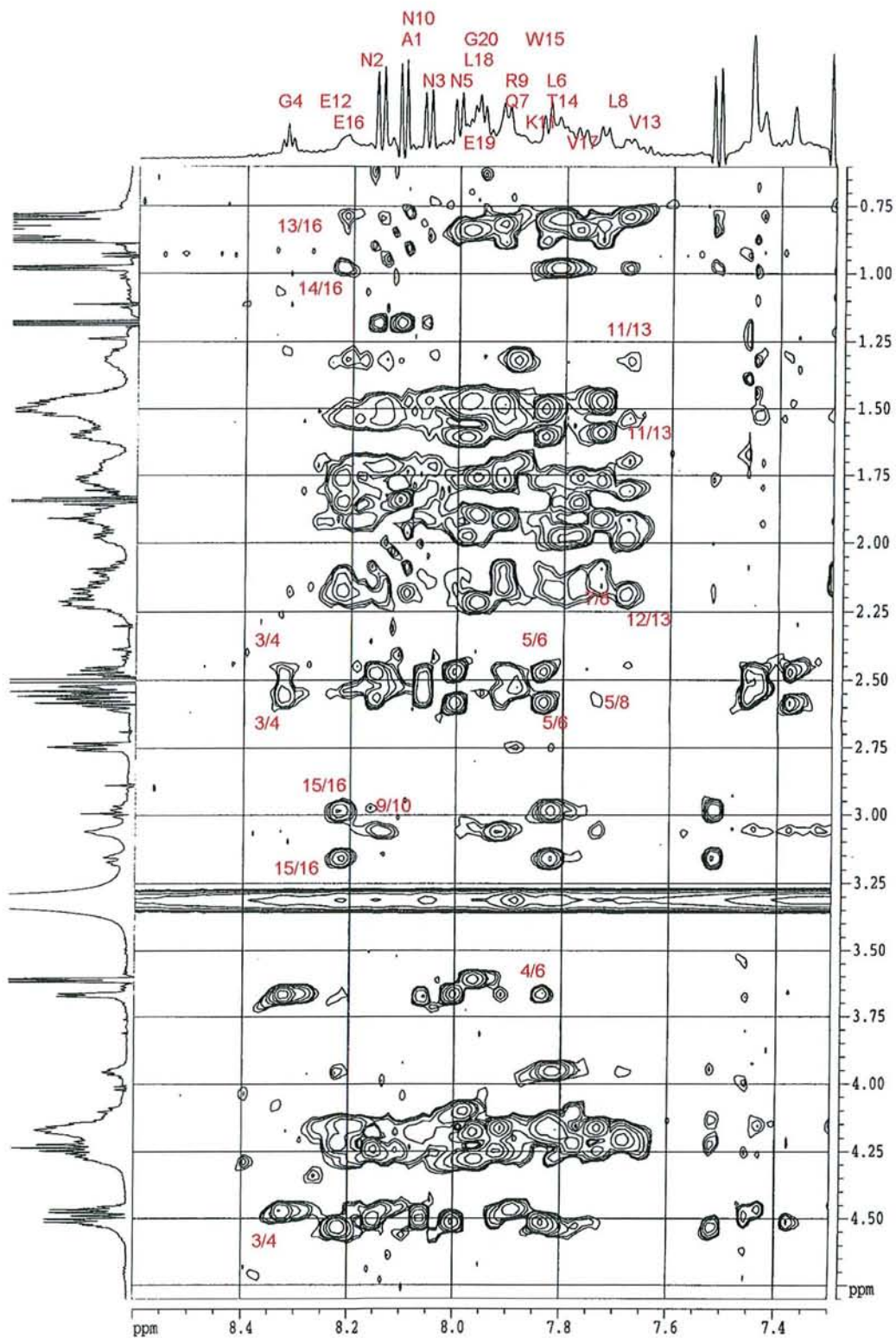


Figure 32. Expansion de la partie NH/CH² de la carte de corrélations NOESY du ncpl dans le DMSO.

III. Effet de la température

Les liaisons hydrogène inter ou intramoléculaires induisent sur les protons amide, qui y participent, des déblindages importants. Lorsque la température est augmentée, les liaisons hydrogène intermoléculaires avec le solvant sont rompues plus rapidement que les liaisons hydrogène intramoléculaires, ce qui entraîne une plus forte variation du déplacement chimique δ des protons amide solvatés. Il est empiriquement admis à ce jour que, dans un milieu aprotique fort comme le DMSO, une variation $\Delta\delta/\Delta T$ inférieure à -3.10^{-3} ppm/K, en valeur absolue, caractérise une liaison hydrogène intramoléculaire et le proton amide responsable est dit " protégé du solvant ".

Les déplacements chimiques issus de l'attribution séquentielle ainsi que les $\Delta\delta/\Delta T$ sont regroupés dans les tableaux XII et XIII.

Résidu	$\Delta\delta/\Delta T$	NH	C $^{\alpha}$ H	C $^{\beta}$ H	C $^{\gamma}$ H	C $^{\delta}$ H	CH _{aromatique}
Ser ¹							
Phe ²		8,52	4,53	2,78 / 3,02			
Glu ³	$-6,9.10^{-3}$	8,27	4,22	1,7 / 1,82	2,14		
Tyr ⁴	$-4,7.10^{-3}$	7,82	4,45	2,66 / 2,84			6,62 / 6,95
Phe ⁵	$-7,2.10^{-3}$	8,44	4,64	2,78 / 2,98			7,25
Pro ⁶			4,43	1,85 / 1,97	1,75	3,32 / 3,48	
Ser ⁷	$-7,2.10^{-3}$	8,11	4,18	3,54 / 3,65			
His ⁸	$-1,3.10^{-3}$	7,9	4,38	2,8 / 2,91			6,55 / 6,77
Phe ⁹	$-5,6.10^{-3}$	8,00	4,6	2,71 / 2,98			7,15
Phe ¹⁰	$-5,0.10^{-3}$	8,19	4,42	2,84 / 2,99			7,2
Val ¹¹	$-5,2.10^{-3}$	8,09	4,29	1,98	0,88		
Pro ¹²			4,37	1,78 / 2,01	1,78 / 1,88	3,55 / 3,64	
Glu ¹³	$-5,1.10^{-3}$	8,05	4,22	1,74 / 1,88	2,25		
Leu ¹⁴	$-4,7.10^{-3}$	7,84	4,3	1,44	1,58	0,86	
Glu ¹⁵	$-4,6.10^{-3}$	8,07	4,28	1,74 / 1,88	2,25		
Val ¹⁶	$-3,9.10^{-3}$	7,67	4,3	1,96	0,8		
Thr ¹⁷	$-6,1.10^{-3}$	7,97	4,27	3,94	1		
Ile ¹⁸	$-3,1.10^{-3}$	7,62	4,26	1,72	1,08 / 1,42	0,8	
Ile ¹⁹	$-4,4.10^{-3}$	7,86	4,16	1,72	1,06 / 1,4	0,8	
Cys ²⁰	$-5,5.10^{-3}$	8,02	4,38	2,72 / 2,88			

Tableau XII. Déplacements chimiques δ (ppm) et valeurs de $\Delta\delta/\Delta T$ pour chacun des protons du peptide cpl289.

Résidu	$\Delta\delta/\Delta T$	NH	C $^{\alpha}$ H	C $^{\beta}$ H	C $^{\gamma}$ H	C $^{\delta}$ H	N $^{\delta}$ H, N $^{\epsilon}$ H et CH _{aromatique}
Ala ¹	-4,78.10 ⁻³	8,11	4,23	1,17			
Asn ²	-4,62.10 ⁻³	8,15	4,5	2,48 / 2,59			7,01 / 7,46
Asn ³	-4,10.10 ⁻³	8,06	4,46	2,5 / 2,58			6,96 / 7,44
Gly ⁴	-4,44.10 ⁻³	8,32	3,67				
Asn ⁵	-3,15.10 ⁻³	8,0	4,51	2,47 / 2,6			6,99 / 7,38
Leu ⁶	-2,60.10 ⁻³	7,84	4,16	1,5	1,6	0,85	
Gln ⁷	-3,26.10 ⁻³	7,91	4,16	1,78 / 1,92	2,1 / 2,17		6,81 / 7,29
Leu ⁸	-3,17.10 ⁻³	7,73	4,29	1,48	1,59	0,83	
Arg ⁹	-5,2.10 ⁻³	7,94	4,27	1,56 / 1,73	1,45	3,05	
Asn ¹⁰	-4,78.10 ⁻³	8,1	4,48	2,43 / 2,56			6,98 / 7,43
Lys ¹¹	-3,50.10 ⁻³	7,88	4,17	1,54 / 1,71	1,3	1,52	
Glu ¹²	-3,29.10 ⁻³	8,2	4,22	1,8 / 1,86	2,18		
Val ¹³	-2,87.10 ⁻³	7,67	4,19	2,0	0,8		
Thr ¹⁴	-3,61.10 ⁻³	7,8	4,13	3,95	0,98		
Trp ¹⁵	-2,29.10 ⁻³	7,82	4,53	2,98 / 3,17			7,13 / 7,52
Glu ¹⁶	-3,17.10 ⁻³	8,22	4,25	1,77 / 1,85	2,16		
Val ¹⁷	-4,96.10 ⁻³	7,77	4,1	1,97	0,85		
Leu ¹⁸	-4,60.10 ⁻³	7,98	4,27	1,46	1,61	0,8	
Glu ¹⁹	-4,48.10 ⁻³	7,96	4,18	1,76 / 1,9	2,23		
Gly ²⁰		7,97	3,60				

Tableau XIII. Déplacements chimiques δ (ppm) et valeurs de $\Delta\delta/\Delta T$ pour chacun des protons du peptide non complémentaire.

Nous pouvons d'ores et déjà remarquer que le proton amidique du résidu His⁸ pour le peptide cpl289 et ceux des résidus Leu⁶, Val¹³ et Trp¹⁵ pour le peptide non complémentaire, devraient être impliqués dans des liaisons hydrogène qui stabiliseraient la structure de ces deux peptides.

D. Analyse conformationnelle

Cette analyse est essentielle. En effet, c'est grâce à elle que nous pouvons introduire des contraintes qui vont nous aider à remonter à la structure tridimensionnelle du peptide, en utilisant la modélisation moléculaire.

I. Contraintes angulaires

Lorsque deux protons sont séparés par moins de trois liaisons, le signal RMN de chacun d'eux est dédoublé par la présence de l'autre. L'écart entre les deux composantes du doublet est appelé constante de couplage vicinal. Ce phénomène a pour origine la circulation électronique dans le système H-X-Y-H. Karplus a établi une relation entre les constantes de couplage vicinal 3J et l'angle dièdre θ formé par les deux plans H-X-Y et X-Y-H d'un enchaînement H-X-Y-H [126,127]. Cette équation s'écrit :

$$^3J(\theta) = A\cos 2\theta - B\cos\theta + C.$$

Pour la liaison HN-C $^{\alpha}$ H, nous utiliserons une relation du type de Karplus étalonnée par Cung et Coll. [128] :

$$^3J(\text{HN-C}^{\alpha}\text{H}) = 4,3\cos 2\theta - 2,9\cos\theta + 4,3$$

L'angle dièdre θ est lui-même relié à l'angle rotationnel ϕ par la relation :

$\theta = |\phi - 60|$ pour un résidu de configuration L (sauf Gly) (Fig.33).

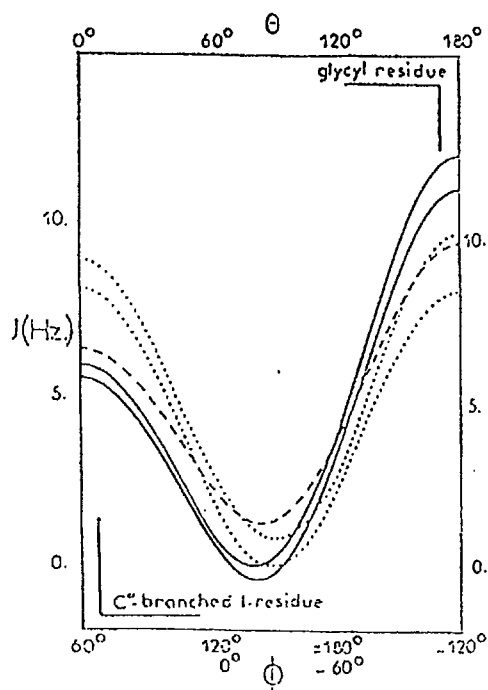


Figure 33. Courbe de Karplus [126].

Les constantes de couplage $^3J_{N\alpha}$ ont été mesurées directement sur les spectres 1D et les valeurs des angles θ et des angles ϕ ont été estimées ensuite. D'après la relation $\theta = |\phi - 60^\circ|$, pour une valeur de θ , deux valeurs de ϕ sont possibles. Elles sont négatives dans notre cas car tous les résidus sont de configuration L.

Etant donné la superposition de plusieurs pics du spectre 1D du peptide non complémentaire, plusieurs constantes $^3J_{N\alpha}$ ont été difficiles à obtenir avec précision. C'est la raison pour laquelle il manque des valeurs dans le tableau XV.

Ces valeurs ont été résumées dans les tableaux suivants où nous avons également fait figurer les valeurs des angles ϕ obtenus par le calcul de dynamique moléculaire.

Résidu	³ J (Hz)	θ (°) Karplus	φ (°) Karplus	φ (°) Discover
Ser ¹				
Phe ²	6,5	136	-76 / -164	-134 ± 11
Glu ³	7,3	140	-80 / -160	-101 ± 10
Tyr ⁴	8,1	145	-85 / -155	-97 ± 29
Phe ⁵	7,8	143	-83 / -157	-144 ± 7
Pro ⁶				
Ser ⁷	6,8	137	-77 / -163	-103 ± 1
His ⁸	7,4	141	-81 / -159	-117 ± 5
Phe ⁹	8,3	146	-86 / -154	-159 ± 7
Phe ¹⁰	7,6	142	-82 / -158	-73 ± 12
Val ¹¹	8,3	146	-86 / -154	-163 ± 2
Pro ¹²				
Glu ¹³	8,6	148	-88 / -152	-105 ± 1
Leu ¹⁴	9,3	152	-92 / -148	-81 ± 12
Glu ¹⁵	8,1	144	-84 / -156	-73 ± 4
Val ¹⁶	8,7	148	-88 / -152	-88 ± 12
Thr ¹⁷	8,2	145	-85 / -155	-112 ± 19
Ile ¹⁸	8,6	148	-88 / -152	-88 ± 1
Ile ¹⁹	9,1	151	-91 / -149	-77 ± 9
Cys ²⁰	8,3	146	-86 / -154	-151 ± 11

Tableaux XIV et XV. Valeurs moyennes des angles φ estimées par la relation de type de Karplus et par le calcul de dynamique moléculaire avec le logiciel Discover pour les peptides cpl (XIV-haut) et ncpl (XV-bas).

Résidu	³ J (Hz)	θ (°) Karplus	φ (°) Karplus	φ (°) Discover
Ala ¹	7	138	-78 / -162	-86 ± 6
Asn ²	7,7	142	-82 / -158	-86 ± 9
Asn ³	7,5	141	-81 / -159	-139 ± 14
Gly ⁴	5,8			135 ± 39
Asn ⁵	7,3	140	-80 / -160	-72 ± 16
Leu ⁶	7,7	142	-82 / -158	-64 ± 7
Gln ⁷	7,2	140	-80 / -160	-78 ± 8
Leu ⁸	7,5	141	-81 / -159	-86 ± 4
Arg ⁹				-125 ± 21
Asn ¹⁰				-98 ± 20
Lys ¹¹	7,1	139	-79 / -161	-128 ± 13
Glu ¹²				-89 ± 18
Val ¹³	6	133	-73 / -167	-157 ± 8
Thr ¹⁴	5,9	132	-72 / -168	-96 ± 27
Trp ¹⁵				-72 ± 8
Glu ¹⁶				-75 ± 13
Val ¹⁷	8,5	147	-87 / -153	-94 ± 20
Leu ¹⁸				-109 ± 22
Glu ¹⁹				-96 ± 16
Gly ²⁰	5,7			-177 ± 25

A partir des constantes de couplage ${}^3J_{N\alpha}$, nous avons pour chaque résidu deux valeurs possibles pour l'angle ϕ autour de -80° (structure repliée) ou -160° (structure étirée).

Dans le cas général, lorsque la mesure de la constante de couplage ${}^3J_{N\alpha}$ n'est pas possible ou peu précise à cause de l'élargissement des signaux NH, on introduit dans le calcul de modélisation moléculaire comme contrainte angulaire pour l'angle ϕ correspondant, une fourchette de $(-170^\circ ; -10^\circ)$ de façon à interdire au calcul de trouver des valeurs positives pour l'angle ϕ (sauf dans le cas de la Gly où les valeurs positives et négatives sont également valables).

D'après l'étude précédente (*Tab.XIV et XV*) et comme nous disposons de deux valeurs possibles pour l'angle ϕ , nous avons introduit comme contrainte angulaire la fourchette réduite de $(-175^\circ ; -60^\circ)$ de façon à ne pas léser l'une ou l'autre des deux valeurs.

Ce changement nous servira à rechercher l'ensemble des conformations capables de satisfaire, au moins partiellement, les contraintes de RMN. Si cet ensemble forme une famille cohérente avec les données expérimentales, nous pourrions conclure à l'existence d'une conformation unique largement majoritaire.

Nous avons également imposé dans le fichier des contraintes angulaires des peptides étudiés que l'angle ω soit de $\pm 180^\circ$ pour avoir uniquement la configuration trans, comme on la rencontre de façon dominante dans les peptides et les protéines naturels. Ayant trouvé des connectivités $d_{\alpha\delta(i,i+1)}$ (Figure 37), nous avons étendu cette dernière contrainte aux résidus Pro du peptide cpl289.

Sans ces contraintes, les calculs de dynamique moléculaire pourraient aboutir à des valeurs de l'angle ω proche de zéro, c'est à dire correspondant à la forme cis de la liaison amide que nous aurions pu identifier grâce à la présence de la corrélation $d_{\alpha\alpha(i,i+1)}$. Or celle-ci est totalement absente dans pour les peptides cpl289 et ncpl.

L'autre angle de torsion ψ ne peut, a priori, être déterminé pour aucun résidu des deux chaînes car il n'y a pas de méthode simple faisant appel à la RMN pour l'estimer.

Le peptide cpl289 contient deux résidus prolyles Pro⁶ et Pro¹². Dans une protéine globulaire, les statistiques ont montré que les résidus Pro ont tendance à interrompre une hélice α pour engendrer un feuillet β avec un coude β . Pour une séquence peptidique courte, nous observons aussi un pourcentage important de repliement β lorsque le peptide contient un résidu prolyle [129].

Dans le cas présent, et pour le peptide cpl289, si nous examinons les caractéristiques NOE de la séquence Phe⁵Pro⁶Ser⁷His⁸ (Fig.37), l'absence du proton amidique dans le résidu prolyle crée une cassure dans la continuité des corrélations d_{NN} (absence des corrélations $d_{NN(5,6)}$, $d_{NN(6,7)}$ et $d_{NN(6,8)}$). Cependant, la présence de la corrélation forte $d_{NN(7,8)}$ et la corrélation à longue distance $d_{\alpha N(6,8)}$ (Fig.36 et 37) d'une part et des valeurs de l'angle ϕ respectivement de -60° pour Pro⁶ et -77° pour Ser⁷ d'autre part, plaident en faveur de la présence d'un repliement de type βI autour de la séquence Phe⁵Pro⁶Ser⁷His⁸. Par ailleurs, la probable existence d'une liaison hydrogène assurée par le proton amidique de l'His⁸ (faible coefficient de température pour ce proton) vient conforter notre analyse.

Pour tenir compte de ce repliement βI (dans une séquence AX₁Y₂Z : $\phi_1 = -60^\circ$, $\psi_1 = -30^\circ$, $\phi_2 = -90^\circ$, $\psi_2 = -0^\circ$), nous avons introduit les contraintes supplémentaires suivantes : $\phi_6 = (-70^\circ ; -50^\circ)$, $\psi_6 = (-40^\circ ; -20^\circ)$, $\phi_7 = (-100^\circ ; -70^\circ)$, $\psi_7 = (-10^\circ ; +10^\circ)$ et $d_{(O5...NH8)} = 2,9 - 3,1 \text{ \AA}$.

Concernant le deuxième résidu prolyle Pro¹², comme la corrélation $d_{NN(13,14)}$ n'est pas intense et la corrélation à longue distance $d_{\alpha N(12,14)}$ est absente, il y a peu de chance d'observer la formation d'un repliement autour de la séquence Val¹¹Pro¹²Glu¹³Leu¹⁴. Les valeurs des angles ϕ de cette séquence sont cependant compatibles avec la présence d'un repliement γ autour de la Pro¹².

Le peptide non complémentaire contient, quant à lui, deux résidus glycyloxy dont un en position 4. Pour les résidus Gly, l'utilisation de la relation de type Karplus pour une valeur de constante de couplage, conduit à quatre valeurs d'angle ϕ possibles (2 positifs et 2 négatifs) au lieu de deux (négatifs) seulement pour les autres résidus L. Il est donc difficile de tenir compte de ces valeurs comme contraintes dans le calcul. En conséquence, nous n'avons pas pu objectivement définir ou, du moins, délimiter dans une fourchette donnée, l'angle ϕ de Gly⁴, introduisant ainsi un grand nombre de degrés de liberté. Le calcul de modélisation moléculaire devrait par conséquent conduire, à son terme, à plusieurs conformations différentes et gêner la sélection d'une seule structure ou d'un groupe de structures similaires. L'autre résidu Gly du fait qu'il se trouve à la fin de l'enchaînement, a peu d'influence dans l'interprétation.

Nous observons également pour ce peptide un certain nombre de corrélations (*Fig.38*) de type $i, i+3$. La multiplication de ce type de corrélations indique en général l'existence d'une hélice ; cependant, dans notre cas, le nombre de corrélations n'est pas suffisamment important pour introduire des contraintes supplémentaires. Ces corrélations concernent surtout la région Thr¹⁴Trp¹⁵Glu¹⁶ mais elles existent aussi dans la région Leu⁶Gln⁷Leu⁸. L'existence de probables liaisons hydrogène (trouvée par effet de la température) pour les hydrogènes amidiques des résidus Leu⁶ et Trp¹⁵ confortent nos hypothèses.

II. Contraintes de distance

II.1. Quantification des effets NOE

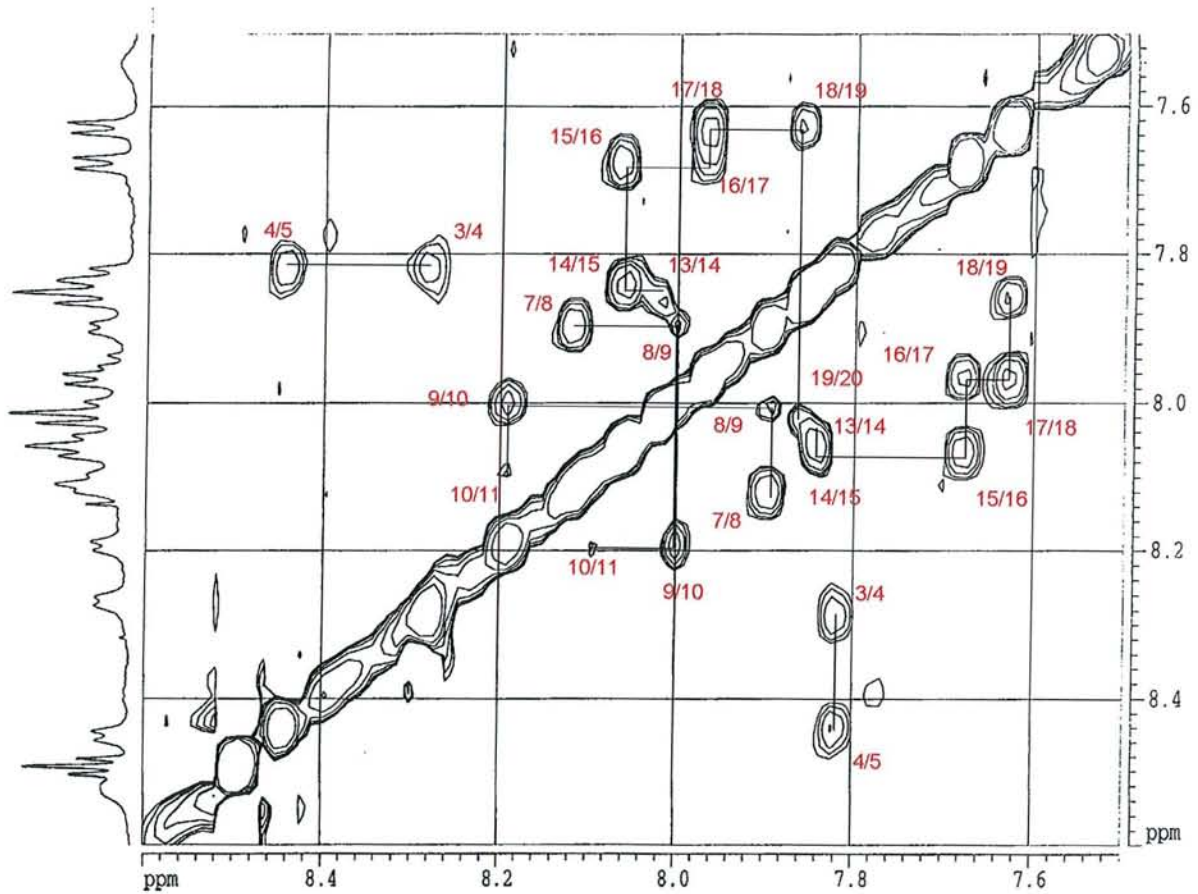


Figure 34. Partie NH/NH de la carte de corrélations NOESY pour le peptide cpl289.

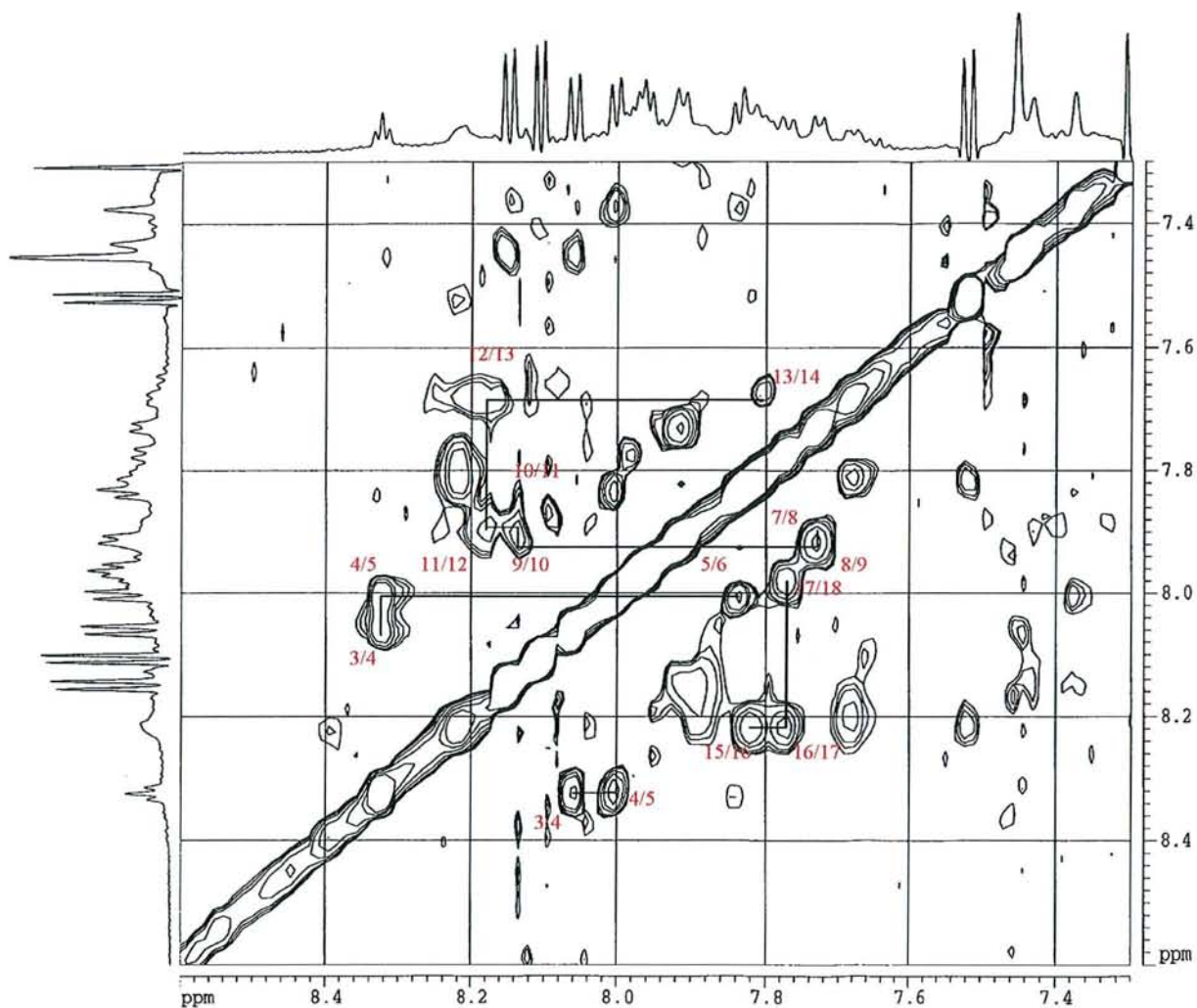


Figure 35. Agrandissement de la partie NH/NH de la carte de corrélations NOESY pour le peptide ncpl.

Les contraintes de distance sont estimées à partir des expériences NOESY et en intégrant le volume des pics de corrélations NOE entre deux protons en utilisant comme référence un pic de corrélation des deux protons d'un C_6H_2 . L'intensité est inversement proportionnelle à la puissance six de la distance r entre deux noyaux ($1/r^6$). Pour cette raison, au-delà de 5 Å l'effet NOE n'est plus pris en compte.

L'ensemble des contraintes de distance a été introduit pour le calcul de modélisation moléculaire. Nous avons réparti ces contraintes en trois groupes de

distances selon l'intensité relative des NOE : 1,8-2,8 Å pour des corrélations NOE intenses, 2,5-3,8 Å pour les intensités moyennes et 3,5-5,5 Å pour les pics de faible intensité.

Les intervalles se recoupent pour ne pas perdre de l'information, surtout dans les cas litigieux où l'intensité est, par exemple, moyennement forte...

II.2. Diagramme des effets NOE

Les constantes de couplage ${}^3J_{\text{NH}\alpha}$ sont appréciées directement sur les spectres 1D. Les valeurs mesurées autour de 7 ou 8 Hz pour le peptide complémentaire, qui ne peuvent pas être attribuées à une structure en hélice (${}^3J_{\text{NH}\alpha}$ voisins de 4 Hz), correspondent soit à une conformation étirée, soit à une conformation repliée ou à des valeurs moyennes de plusieurs conformations en équilibre.

Toutefois, la présence d'un nombre important de corrélations NOE est en faveur d'une conformation dominante et bien structurée.

Les valeurs des constantes ${}^3J_{\text{NH}\alpha}$ pour le peptide non complémentaire oscillent pour certaines autour de 7 ou 8 Hz. Nous trouvons cependant pour certains résidus des valeurs de 6 Hz qui pourraient s'approcher plus d'une structure en hélice s'ajoutant ainsi au faisceau d'indices relevés auparavant concernant l'existence, au moins partiellement, d'une structure secondaire. Cependant, beaucoup de valeurs ${}^3J_{\text{NH}\alpha}$ manquent pour pouvoir aller plus loin dans l'interprétation.

L'analyse conjointe des NOE et des constantes de couplage ${}^3J_{\text{N}\alpha}$ permet de caractériser les structures secondaires et tertiaires de la molécule (Fig. 36, 37 et 38) ainsi que les états rotationnels des liaisons $\text{C}^\alpha\text{-C}^\beta$, $\text{C}^\beta\text{-C}^\gamma$..., de leur chaîne latérale. Les différentes distances interprotoniques qui en découlent constituent une base de données à partir de laquelle nous pouvons remonter à la

conformation tridimensionnelle des peptides par l'intermédiaire de la modélisation moléculaire.

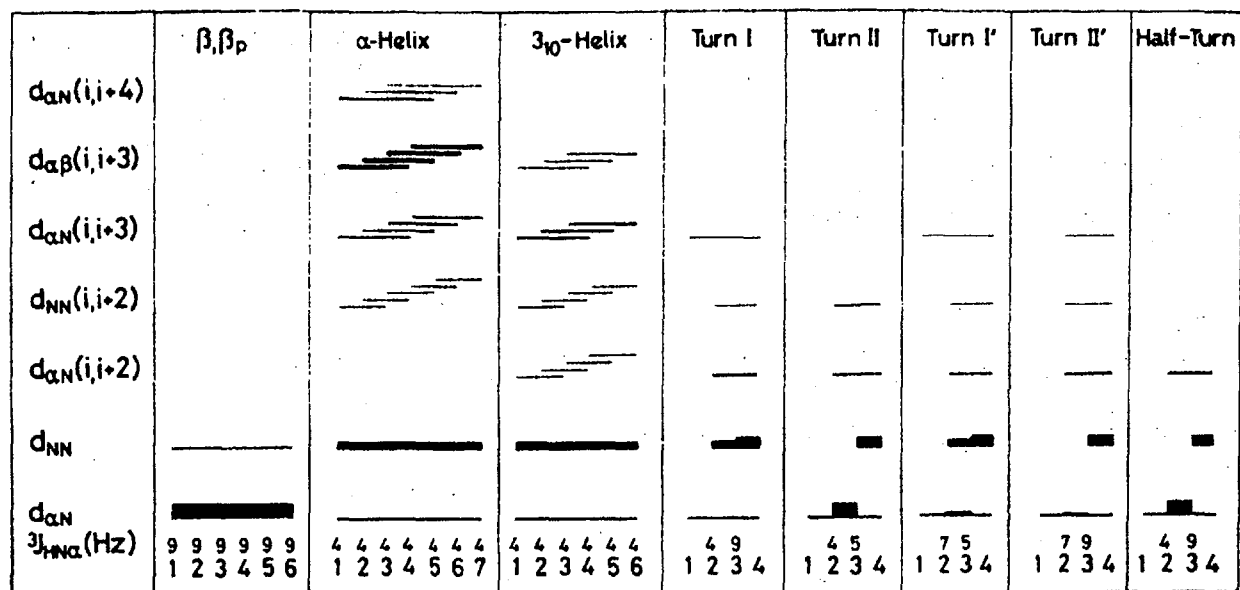


Figure 36. Diagramme des effets NOE d'intensité forte, moyenne ou faible correspondant aux distances courtes, moyennes ou longues, selon la nature des structures secondaires en présence (feuillets β parallèle et antiparallèle, hélice α , hélice 3_{10} et les différents types de repliements de type β -turn).

Les intensités relatives des NOE sont proportionnelles à l'épaisseur des traits et inversement proportionnelles à r^6 . Du fait de leur taille réduite par rapport aux protéines, les structures en hélice α ou en feuillet β sont, en général, relativement peu présentes dans les peptides. En effet, pour le cpl289, nous constatons l'absence de connectivités consécutives $d_{\alpha N(i,i+2)}$, $d_{\alpha N(i,i+3)}$, $d_{\alpha\beta(i,i+3)}$ (Fig.36 et 37). De même, aucune structure en feuillet β , caractérisée par l'existence simultanée des connectivités $d_{\alpha N}$ fortes et d_{NN} de faible intensité, n'a pu être identifiée. Toutefois, nous constatons la présence des corrélations $d_{\alpha N(i,i+2)}$, $d_{\beta N(i,i+2)}$, $d_{\gamma N(i,i+2)}$, voire $d_{\alpha\delta(i,i+2)}$. Même si ces corrélations NOE sont de très faible intensité, elles laissent présager qu'au moins une partie du peptide complémentaire est repliée.

Concernant le peptide ncpl, nous avons quelques connectivités consécutives $d_{\alpha N(i,i+3)}$, $d_{\beta N(i,i+3)}$, $d_{\gamma N(i,i+3)}$ et $d_{NN(i,i+3)}$ (Fig.36 et 38) favorables à la présence d'une hélice ou, du moins, d'une structuration partielle du peptide. Nous observons aussi des corrélations du type $d_{\alpha N(i,i+2)}$, $d_{\beta N(i,i+2)}$, $d_{\gamma N(i,i+2)}$, voire $d_{\alpha\delta(i,i+2)}$ qui, ajoutées au nombre globalement important de corrélations NOE, plaiderait en faveur d'une conformation bien structurée.

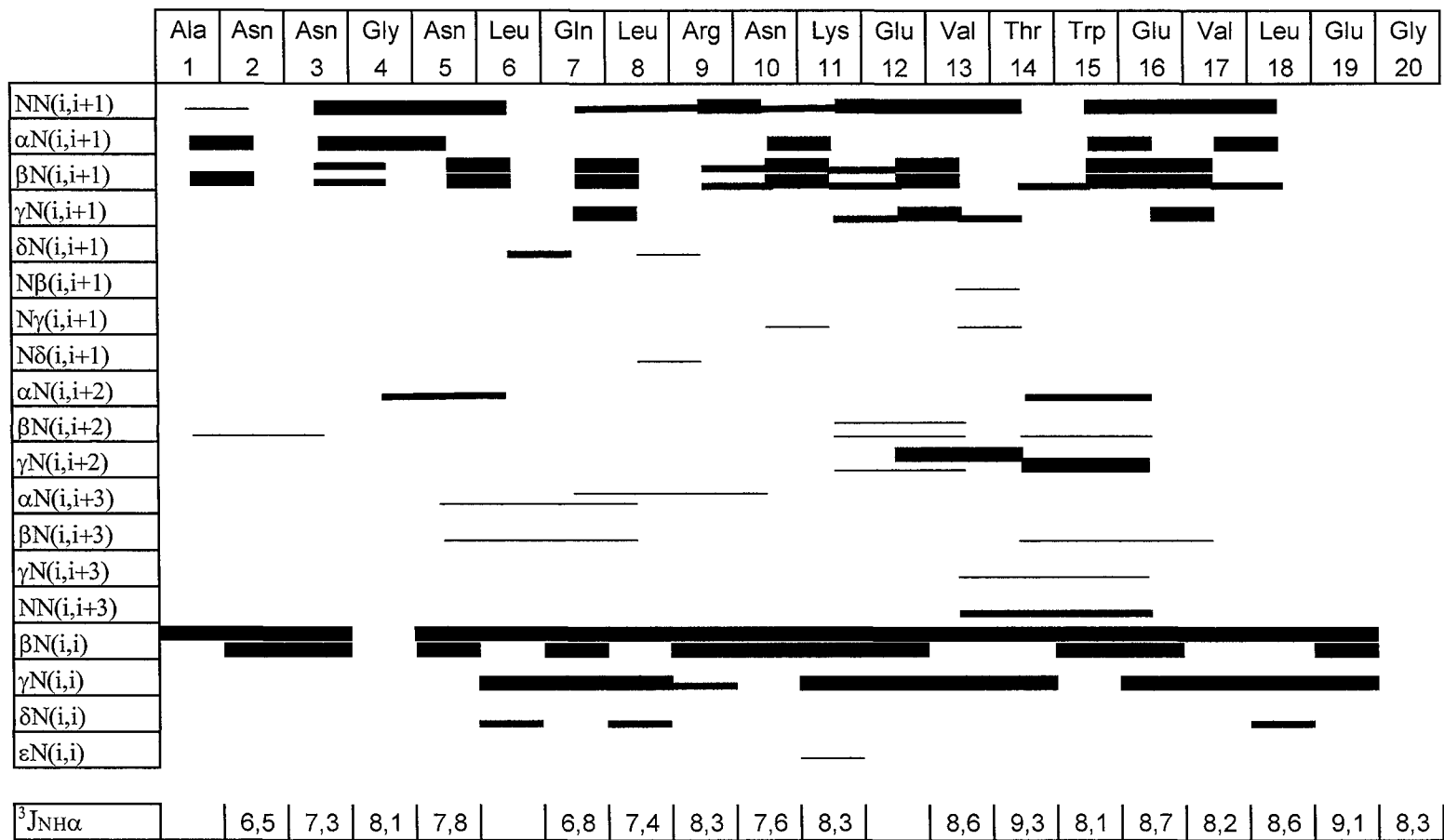


Figure 38. Diagramme des NOE relevés sur la carte NOESY du peptide non complémentaire.

	Ala 1	Asn 2	Asn 3	Gly 4	Asn 5	Leu 6	Gln 7	Leu 8	Arg 9	Asn 10	Lys 11	Glu 12	Val 13	Thr 14	Trp 15	Glu 16	Val 17	Leu 18	Glu 19	Gly 20
$\alpha\beta(i,i)$	█		█		█		█		█	█	█		█	█	█	█	█			
$\alpha\gamma(i,i)$							---		---		█					---				
$\alpha\delta(i,i)$									█		---									
$\alpha\varepsilon(i,i)$											---									
$\beta\gamma(i,i)$							█		---	---	█		█	█		█				
$\beta\delta(i,i)$									█	█	█									
$\gamma\delta(i,i)$									█		█									
$\varepsilon\beta(i,i)$											█									
$\varepsilon\gamma(i,i)$											█									
$\varepsilon\delta(i,i)$											---									
$\alpha\beta(i,i+1)$						---			---							---				
$\alpha\gamma(i,i+1)$						---										---				
$\alpha\delta(i,i+1)$						---														
$\beta\alpha(i,i+1)$									---											
$\beta\beta(i,i+1)$															---					
$\gamma\alpha(i,i+1)$									---						---					
$\gamma\beta(i,i+1)$															---					
$\alpha\delta(i,i+2)$								---												
$N^{\delta 2}\alpha(i,i)$		---	---		---					---										
$N^{\delta 2}\beta(i,i)$		---			█															
$N^{\delta 2}\alpha(i,i+1)$										---										
$N^{\delta 2}N(i,i)$	█	█	█		█					---										
$^3J_{NH\alpha}$		6,5	7,3	8,1	7,8		6,8	7,4	8,3	7,6	8,3		8,6	9,3	8,1	8,7	8,2	8,6	9,1	8,3

Figure 38 (suite). Diagramme des NOE relevés sur la carte NOESY du peptide non complémentaire.

E. Modélisation moléculaire

I. Description de la méthode

La modélisation moléculaire est une méthode relativement ancienne qui a connu un développement spectaculaire grâce aux améliorations (vitesses de calcul, puissance et coût) des stations graphiques individuelles. Son but est, entre autres, de déterminer l'ensemble des structures tridimensionnelles des molécules biologiquement actives (protéines, peptides...) sur la base des données RMN et/ou de rayons X afin de concevoir notamment de nouveaux médicaments (drug design).

Tous nos calculs, comme par exemple la distance géométrique, la minimisation énergétique et la dynamique moléculaire, ont été effectués sur une station Silicon Graphics en utilisant un ensemble de logiciels de MSI (BIOSYM). Les modules INSIGHT_II et DISCOVER_3 ont été utilisés pour les calculs de minimisation et de dynamique moléculaire.

La modélisation moléculaire permet la recherche d'une ou de plusieurs conformations stables de la molécule étudiée à partir des principes de la mécanique moléculaire. En effet, à chaque état conformationnel correspond une énergie potentielle. Parmi tous les états, la molécule adoptera celui pour lequel l'énergie associée est la plus basse.

En fait, à température ambiante, les effets dynamiques autorisent les peptides à adopter plusieurs conformations. La recherche de ces conformations de moindre énergie peut s'avérer très longue. Les renseignements géométriques (contraintes angulaires, distances interprotoniques...) déduites des expériences RMN et/ou de rayons X nous permettent de restreindre l'espace conformationnel à explorer et de réduire le temps des calculs. L'énergie de la molécule étudiée

sera ainsi composée par les termes représentant les contraintes physiques internes à la molécule et les termes des contraintes expérimentales.

Dans notre étude, nous avons utilisé le logiciel INSIGHT_II pour générer une structure initiale tridimensionnelle, avant d'introduire les contraintes géométriques pour les calculs de minimisation et de dynamique moléculaire avec le programme DISCOVER de MSI.

II. La minimisation d'énergie

La minimisation est le calcul le plus simple pour la recherche d'une conformation de basse énergie.

Il existe de nombreux algorithmes plus ou moins rapides et efficaces pour cette approche. Ainsi, nous avons utilisé :

- La méthode de la plus grande pente (steepest descent), efficace dans le cas d'une minimisation préliminaire. Par contre, à proximité du minimum du potentiel, là où la pente de la surface d'énergie est beaucoup moins grande, cette méthode a tendance à joindre le minimum le plus proche, sans pouvoir franchir les barrières de potentiel peu élevées. La convergence de cette procédure au voisinage du minimum n'est pas très bonne.
- Méthode des gradients conjugués : par cette méthode, il est possible de franchir, avec certaines limites, les barrières de potentiel. Sa convergence vers un minimum d'énergie est donc meilleure que lors de la méthode précédente.
- Méthode de Newton-Raphson : malgré son excellente convergence, cet algorithme requiert un espace mémoire important et ne peut être appliqué avec succès qu'aux molécules de petite taille. Nous l'avons utilisé en fin de calcul pour la dernière minimisation.

III. Le recuit simulé et la dynamique moléculaire

Le recuit simulé ou SA (pour Simulated Annealing) est une méthode de simulation à température variable permettant une exploration rapide de l'espace conformationnel.

La dynamique moléculaire a pour but de simuler le comportement dynamique du système. Elle permet également d'explorer l'espace conformationnel grâce à l'apport de l'énergie cinétique qui autorise le franchissement des barrières de potentiel et permet de ne pas rester bloqué dans de faux minima. Il est possible ainsi de déterminer la conformation la plus favorable correspondant à une énergie minimale.

Le schéma adopté pour la simulation est le suivant : après une minimisation initiale, notre système moléculaire est chauffé artificiellement à haute température (1000 K). Après un temps de 10 picosecondes pour atteindre son équilibre thermique, le système subit différentes dynamiques avec à chaque fois une réduction plus ou moins forte des constantes de force appliquées aux différents termes énergétiques de façon à éviter les minima locaux.

Le système est ensuite progressivement refroidi jusqu'à 300 K par pas de 100 K. Les constantes de force sont ramenées progressivement à leur valeur normale, avant d'effectuer une dynamique finale de 300 picosecondes où 41 structures sont enregistrées pour voir si le système a vraiment atteint sa conformation d'énergie minimale. Enfin, une minimisation ultime utilisant les trois algorithmes précédemment cités a été effectuée.

Il est évident que cette méthode nécessite une grande capacité de mémoire et de calcul. Le programme DISCOVER de MSI est bien adapté pour cela.

F. Discussion

I. Peptide complémentaire

1.1. Détermination des structures tertiaires

Nous avons effectué un calcul de dynamique moléculaire pour déterminer la structure tridimensionnelle adoptée par le peptide cpl289 selon la procédure décrite précédemment et en utilisant 146 contraintes de distance (31 contraintes squelette-squelette, 115 contraintes squelette-chaînes latérales) et 42 contraintes angulaires relatives aux angles rotationnels ϕ_i , ψ_i et ω_i .

Quarante et une structures ont été générées au cours des 200 dernières picosecondes du calcul de dynamique moléculaire à 300 K. Ces structures ont subi ensuite un cycle de minimisation d'énergie afin de relaxer les structures (à la fin du cycle de calculs de dynamique moléculaire, les angles de valence et les distances de liaison s'écartent souvent des valeurs standards de la liaison amide qui peut, par exemple, ne pas être idéalement plane).

Résidu	ϕ (°) Discover	ψ (°)	ω (°)
Ser ¹		123 ± 9	
Phe ²	-134 ± 11	112 ± 5	-176 ± 2
Glu ³	-101 ± 10	-55 ± 7	-179 ± 2
Tyr ⁴	-97 ± 29	-46 ± 31	-177 ± 2
Phe ⁵	-144 ± 7	121 ± 20	-174 ± 5
Pro ⁶	-55 ± 1	-24 ± 3	171 ± 2
Ser ⁷	-103 ± 1	-5 ± 6	-170 ± 2
His ⁸	-117 ± 5	38 ± 7	-170 ± 5
Phe ⁹	-159 ± 7	53 ± 22	173 ± 5
Phe ¹⁰	-73 ± 12	149 ± 3	166 ± 5
Val ¹¹	-163 ± 2	155 ± 3	-178 ± 0
Pro ¹²	-52 ± 5	-44 ± 3	171 ± 2
Glu ¹³	-105 ± 1	107 ± 6	-171 ± 2
Leu ¹⁴	-81 ± 12	-159 ± 6	174 ± 6
Glu ¹⁵	-73 ± 4	16 ± 11	-170 ± 4
Val ¹⁶	-88 ± 12	-60 ± 11	-178 ± 5
Thr ¹⁷	-112 ± 19	-53 ± 3	-179 ± 0
Ile ¹⁸	-88 ± 1	82 ± 2	173 ± 1
Ile ¹⁹	-77 ± 9	-18 ± 5	170 ± 2
Cys ²⁰	-151 ± 11		-175 ± 2

Tableau XVI. Valeurs moyennes des angles de torsion estimées pour le cpl289 à partir des 41 structures enregistrées au cours des 200 dernières picosecondes du calcul de dynamique moléculaire à 300 K.

Les 41 structures générées sont ensuite analysées à l'aide du logiciel MOLMOL qui permet à partir du calcul de l'écart des moindres carrés RMSD (Root Mean Square Deviation), de chercher des familles de structures ayant une bonne convergence entre elles, de visualiser ces différentes familles et enfin de déterminer les angles de torsion de la molécule (Tab.XVI).

Le RMSD mesure l'écart moyen entre les positions des atomes dans chaque structure. Il peut être calculé avec les positions des atomes du squelette peptidique (N, C^α, C, O) ou en prenant en compte aussi les chaînes latérales, sans tenir compte des atomes d'hydrogène.

La superposition de toutes les structures fournit un RMSD de 0,69 Å pour le squelette et de 1,34 Å pour l'ensemble des atomes lourds de la molécule.

Cette valeur montre que le peptide cpl289 est globalement bien structuré. Néanmoins, par une analyse plus poussée, nous avons constaté deux domaines où les structures sont bien superposées (*Fig.39*).

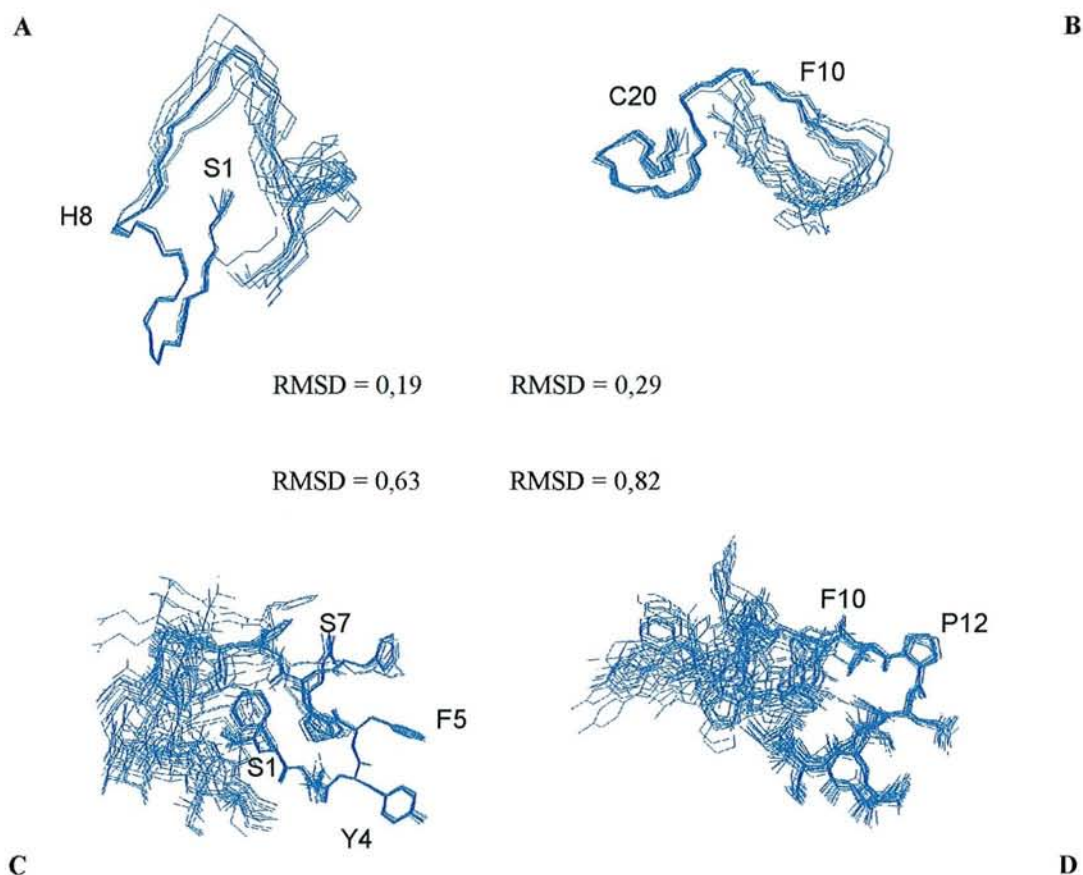


Figure 39. Superposition des 15 dernières structures minimisées du calcul de dynamique moléculaire (cpl289).

La figure 39 représente l’empreinte du squelette peptidique seul (A, B) ou celle avec les chaînes latérales (C, D). Sont mises en évidence à gauche (A et C) la superposition de la partie N-terminale du peptide sur les résidus Ser¹ à His⁸ et, à droite, la superposition de la partie C-terminale sur les résidus Phe¹⁰ à Cys²⁰.

Cette figure montre que le peptide cpl289 est bien structuré dans ses parties N-terminale (RMSD de 0,19 Å pour la superposition des résidus Ser¹ à

His⁸) et C-terminale (RMSD de 0,29 Å pour la superposition des résidus Phe¹⁰ à Cys²⁰).

La superposition des atomes lourds (*Fig.39 C et D*) montre que l'orientation des chaînes latérales est bien définie pour l'ensemble des deux fragments que nous avons représentés. Les fluctuations observées dans la partie C-terminale du peptide lorsque l'on superpose sa partie N-terminale et vice versa, ne seraient donc pas dues à une flexibilité de la molécule dans ces parties mais, au contraire, au manque de contraintes résultant de l'absence de NH au niveau des deux résidus prolyles Pro⁶ et Pro¹². Ceci engendre à chaque fois une rupture des corrélations NOE à courtes distances avec leurs deux résidus voisins (*Fig.37*) et peut-être à longues distances avec les quatre résidus qui entourent les prolyles.

Ainsi, ces pseudo-fluctuations proviennent essentiellement de la mauvaise définition de l'angle ψ_9 (incertitude assez importante $\psi_9 = 53^\circ \pm 22^\circ$) (*Tab.XVI*).

Le tableau XVI montre que les résidus Tyr⁴, Phe⁵ et Thr¹⁷ sont aussi relativement flexibles. En effet, les incertitudes sur l'estimation des angles ϕ_4 et ψ_4 sont relativement importantes ($\phi_4 = -97^\circ \pm 29^\circ$, $\psi_4 = -46^\circ \pm 31^\circ$) ainsi que pour les angles ψ_5 ($121^\circ \pm 20^\circ$) et ϕ_{17} ($-112^\circ \pm 19^\circ$).

1.2. Liaisons hydrogène intramoléculaires

Les résultats montrent que le peptide cpl289 adopte une conformation repliée constituée de longs fragments étirés. (*Fig.40*).

Les angles rotationnels estimés pour la séquence Phe⁵Pro⁶Ser⁷His⁸ autour des résidus Pro⁶ et Ser⁷ ($\phi_6 = -55^\circ \pm 1^\circ$, $\psi_6 = -24^\circ \pm 3^\circ$, $\phi_7 = -103^\circ \pm 1^\circ$ et $\psi_7 = -5^\circ \pm 6^\circ$) correspondent à un repliement de type β I, stabilisé par la liaison hydrogène Phe⁵-CO...HN-His⁸, de type $i+3 \rightarrow i$ renfermant un cycle à 10 atomes (*Fig.41*).

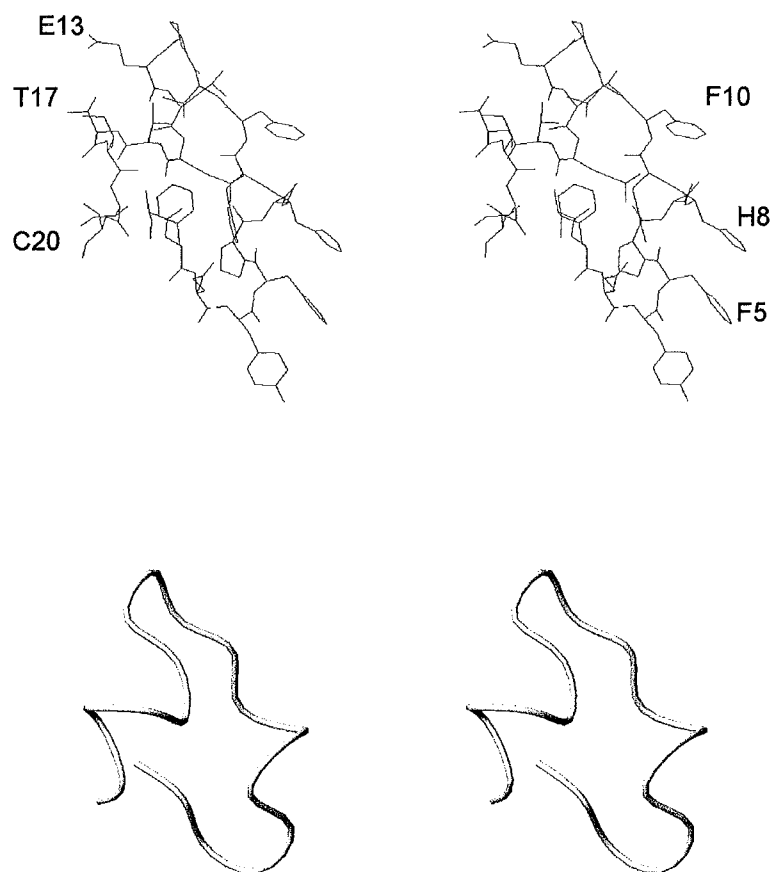


Figure 40. Vues stéréo de la dernière (41^{ème}) conformation cpl enregistrée par modélisation moléculaire. En haut avec les chaînes latérales et en bas sous forme d'un schéma en ruban.

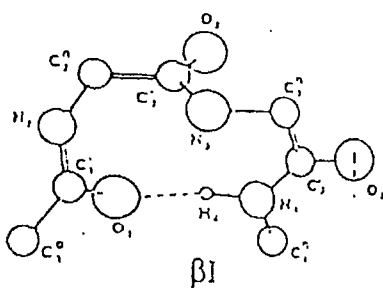


Figure 41. Représentation du repliement de type β .

Nous dénombrons en plus deux repliements γ avec formation d'une liaison hydrogène de type $i+2 \rightarrow i$ fermant un cycle à sept atomes (*Fig.42*) avec la chaîne latérale du résidu central en position équatoriale ($\phi = -75^\circ$, $\psi = 50^\circ$). Ce repliement est observé autour du résidu Ile¹⁸ avec une occurrence de 90% ($\phi_{18} = -88^\circ \pm 1^\circ$, $\psi_{18} = 82^\circ \pm 2^\circ$) et autour du résidu Glu¹⁵ avec une occurrence de 36% ($\phi_{15} = -73^\circ \pm 4^\circ$, $\psi_{15} = 16^\circ \pm 11^\circ$).

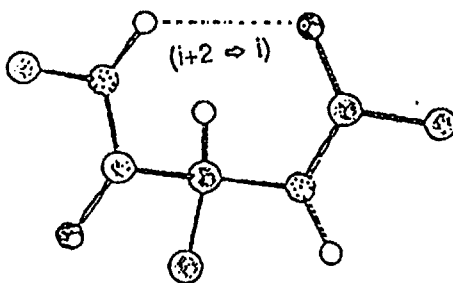


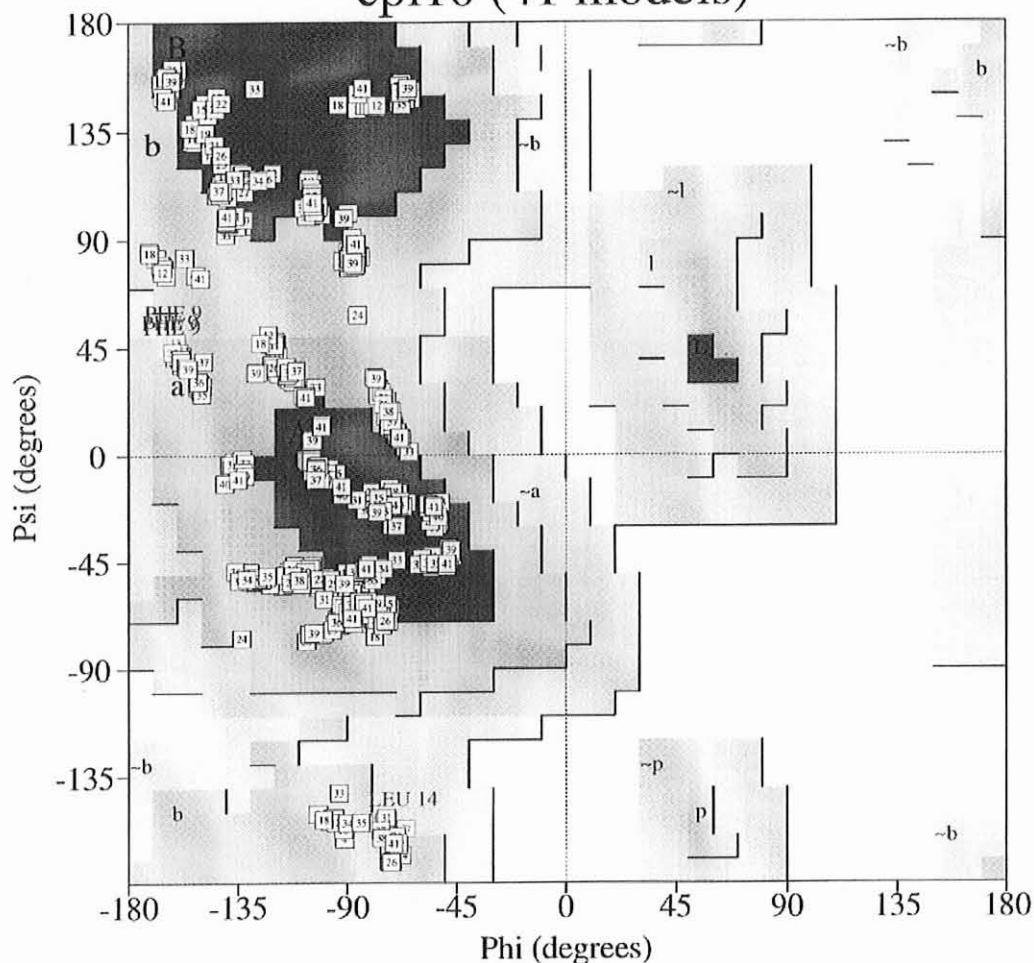
Figure 42. Représentation de la conformation C_7 forme équatoriale caractérisée par une liaison hydrogène de type $i+2 \rightarrow i$.

Nous remarquons aussi dans 50% des cas une liaison hydrogène entre l'hydrogène carboxylique (OH) de la chaîne latérale du résidu Glu¹⁵ et le carbonyle du résidu Ile¹⁹, fournissant une stabilisation supplémentaire à la structure du squelette de la molécule.

Enfin, avec le programme PROCHECK [130], nous avons établi une carte de Ramachandran à partir des valeurs des angles rotationnels ϕ_i , ψ_i des différents résidus de la molécule (à l'exception des résidus Pro et des résidus aux extrémités N et C terminales) afin de tester la validité des structures calculées par dynamique moléculaire. Ainsi le tracé de la carte de Ramachandran pour les 41 structures du peptide cpl289 (*Fig.43*) donne une bonne distribution des angles ϕ_i , ψ_i avec aucun résidu dans les régions interdites et seulement 4 résidus sur 656 (0,6%) dans les régions faiblement permises.

Sur ce tracé, nous retrouvons les angles ϕ_i , ψ_i de 16 résidus (20 résidus moins les 2 résidus terminaux et les 2 prolyles) représentés chacun 41 fois (pour toutes les structures générées) et nous pouvons constater que globalement, 50% de ces points se trouvent dans la région noire (la plus favorable) et l'autre moitié dans la région gris foncé (favorable).

Ramachandran Plot cpl10 (41 models)



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	302	46.0%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	350	53.4%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	4	0.6%
Residues in disallowed regions	0	0.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	656	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	82	
Number of glycine residues (shown as triangles)	0	
Number of proline residues	82	

Total number of residues	820	

Figure 43. Carte de Ramachandran des 41 structures g n r es par modélisation moléculaire. Les régions les plus fonc es sont les plus favorables et celles en blanc sont celles qui sont complètement interdites.

II. Peptide non complémentaire

II.1. Détermination des structures tertiaires

Pour le peptide non complémentaire, nous avons eu plus de difficultés à obtenir un modèle qui pourrait décrire l'arrangement des résidus dans l'espace. Cela est dû notamment à la présence de résidus Gly, à l'interprétation difficile des cartes RMN (superposition de certains pics de corrélation) et au manque de contraintes de distance de type squelette-squelette qui fixent la structure globale de la molécule.

Aussi, le schéma de simulation moléculaire a-t-il été légèrement modifié par rapport à celui du peptide cpl289. En effet, dans cette simulation, les temps d'équilibre des différents calculs de dynamique moléculaire ont été allongés pour atteindre globalement 190 picosecondes au lieu de 110 pour le peptide cpl289. Le reste de la procédure est resté inchangé.

En addition à ces changements, 149 contraintes de distance (25 contraintes squelette-squelette, 124 contraintes squelette-chaînes latérales) et 43 contraintes angulaires relatives aux angles rotationnels ϕ_i , ψ_i et ω_i ont été nécessaires pour arriver à proposer un arrangement tridimensionnel du peptide ncpl.

41 structures ont été enregistrées au cours des 200 dernières picosecondes de chaque calcul. Compte tenu de la difficulté d'obtenir un modèle unique ou un ensemble d'arrangements proches, nous avons procédé à plusieurs simulations sur différentes structures initiales et nous pouvons lire dans le tableau XVII les valeurs moyennes des 205 structures retenues en final :

Résidu	ϕ (°) Discover	ψ (°)	ω (°)
Ala ¹	-86 ± 6	134 ± 15	-179 ± 2
Asn ²	-86 ± 9	86 ± 45	-180 ± 2
Asn ³	-139 ± 14	64 ± 6	-178 ± 4
Gly ⁴	135 ± 39	61 ± 92	167 ± 4
Asn ⁵	-72 ± 16	-3 ± 42	-175 ± 6
Leu ⁶	-64 ± 7	-45 ± 6	178 ± 10
Gln ⁷	-78 ± 8	-43 ± 7	178 ± 2
Leu ⁸	-86 ± 4	64 ± 49	180 ± 4
Arg ⁹	-125 ± 21	-59 ± 17	174 ± 4
Asn ¹⁰	-98 ± 20	91 ± 6	-174 ± 4
Lys ¹¹	-128 ± 13	-45 ± 52	174 ± 8
Glu ¹²	-89 ± 18	-68 ± 14	178 ± 5
Val ¹³	-157 ± 8	-57 ± 7	180 ± 4
Thr ¹⁴	-96 ± 27	-87 ± 69	179 ± 2
Trp ¹⁵	-72 ± 8	11 ± 20	-177 ± 4
Glu ¹⁶	-75 ± 13	-51 ± 9	-177 ± 8
Val ¹⁷	-94 ± 20	5 ± 48	-179 ± 7
Leu ¹⁸	-109 ± 22	107 ± 80	176 ± 11
Glu ¹⁹	-96 ± 16	135 ± 64	176 ± 3
Gly ²⁰	-177 ± 25		-180 ± 5

Tableau XVII. Valeurs moyennes des angles de torsion estimées pour le peptide *ncpl* à partir des 205 structures enregistrées au cours des 200 dernières picosecondes du calcul de dynamique moléculaire à 300 K.

Les 205 structures retenues ont été ensuite analysées à l'aide du logiciel MOLMOL qui a permis de déterminer les angles de torsion de la molécule.

Nous pouvons déjà remarquer l'extrême variation au niveau de la Gly⁴ (Fig.44) et au niveau des angles ψ en général.

Nous pouvons noter aussi que pour les résidus de la partie C-terminale, la variation des angles ψ est encore plus prononcée, probablement à cause du manque de contraintes dans cette région.

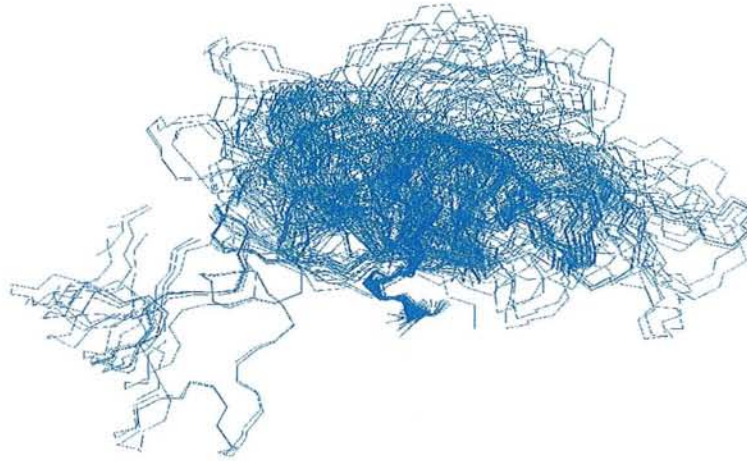


Figure 44. Superposition de la partie N-terminale jusqu'à Gly⁴ des 205 structures retenues. Nous remarquons l'extrême dispersion des résidus qui viennent après la Gly⁴.

Si nous poussons l'analyse un petit peu plus loin, nous nous apercevons, qu'en superposant le squelette sur la partie Asn⁵Asn¹⁰ (la partie venant après Gly⁴), nous avons un RMSD de 0,69 Å ce qui indique que cette région est relativement bien structurée. Cependant, en regardant ce qui vient après, nous observons l'existence de deux familles de structures (Fig.45) qui divergent au niveau de la liaison Glu¹²-Val¹³. Nous isolons ainsi deux familles : F contenant 80% des structures analysées et O contenant les 20% restants.

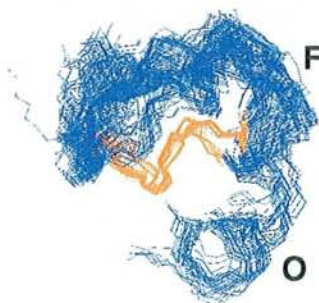


Figure 45. Superposition de la région Asn⁵Asn¹⁰ et existence de deux familles de structure.

II.1.1. Famille F

La visualisation de la famille F soit avec la superposition des régions Asn⁵Lys¹¹ soit celle des régions Arg⁹Glu¹⁶ (Fig.46) avec des RMSD respectivement de 0,64 Å et de 0,71 Å, indique que ces parties du squelette peptidique sont relativement bien structurées.

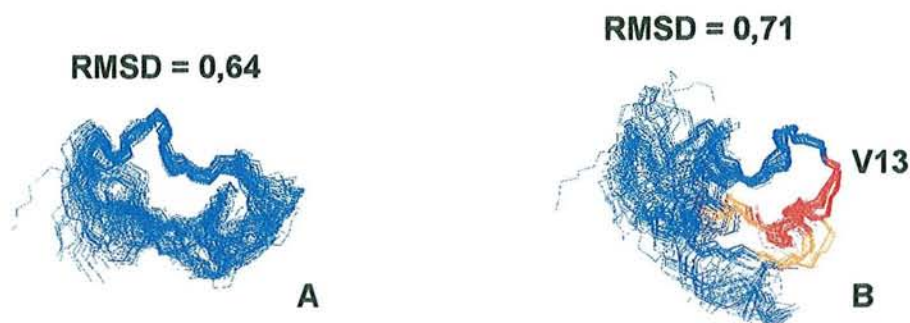


Figure 46. Superposition des résidus Asn⁵Asn¹¹ (A) et Arg⁹Glu¹⁶ (B) de la famille F.

Nous observons pour les structures de la figure 46B, un début de divergence au niveau du résidu Val¹³. La superposition de la séquence Thr¹⁴Leu¹⁸ (Fig.47) fournit un RMSD de 0,55 Å, synonyme d'un arrangement quasi stable de cette région. Cette superposition permet également d'isoler deux sous familles : F1 contenant 50% des structures et F2 contenant l'autre moitié.

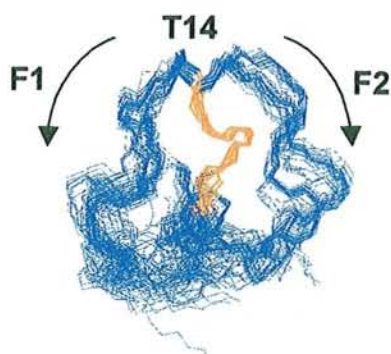


Figure 47. Mise en évidence des 2 sous-familles F1 et F2 de la famille de structure F.

En prenant la sous famille F1, nous avons cette fois-ci un arrangement tout à fait structuré pour les 82 enchaînements et un RMSD de 0,64 Å pour la partie Asn⁵Val¹⁷ (Fig.48).



Figure 48. Sous-famille F1.

L'autre sous-famille F2 présente, elle aussi, une même structuration avec un RMSD de 0,57 Å au niveau du fragment Asn⁵Val¹⁷ (Fig.49).



Figure 49. Sous-famille F2.

II.1.2. Famille O

Cette famille contient 41 structures qui sont relativement bien ordonnées. En effet, en superposant la région Asn⁵Val¹⁷ (Fig.50) nous obtenons un RMSD de 0,54 Å.

Nous remarquons aussi que selon l'angle adopté par la glycine, nous aurons soit une structure ressemblant à celle de la famille F, refermée sur elle-même en une sorte de couronne, soit une structure ressemblant à celle de la famille O plus ouverte et un peu plus étirée. Il est possible, cependant, que le peptide ncpl soit une molécule flexible qui oscille à ce niveau là.

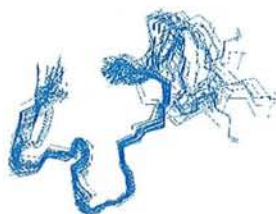


Figure 50. Superposition du segment $\text{Asn}^5\text{Val}^{17}$ des structures de la famille O.

II.2. Liaisons hydrogène intramoléculaires

Nous avons vu que le manque de contraintes ne nous permettait pas de fixer certains angles ϕ ou ψ ce qui entraîne des incertitudes relativement importantes. Néanmoins, nous observons aussi que l'ensemble des conformations retenues est bien structuré sur différentes parties de la molécule. Cette observation est confirmée par l'existence de certaines liaisons hydrogène qui viennent stabiliser l'ensemble de la molécule. Ainsi, pour la totalité des 205 structures, nous avons constaté que l'oxygène de Gly^4 est impliqué dans deux liaisons hydrogène : dans 44% des cas avec le proton amidique NH de Leu^8 et/ou dans 35% des cas avec celui de Leu^6 . Ceci indique, comme nous l'avons vu précédemment, que le fragment peptidique après le résidu Gly^4 est fortement structuré. Par ailleurs, nous retrouvons le proton amidique NH du résidu Arg^9 impliqué dans 77% des structures dans une liaison $\text{Glu}^7\text{-CO}\cdots\text{HN-Arg}^9$ tandis

que le carbonyle de ce même résidu Arg⁹ est impliqué dans 45% des structures dans une liaison Arg⁹-CO...HN-Lys¹¹.

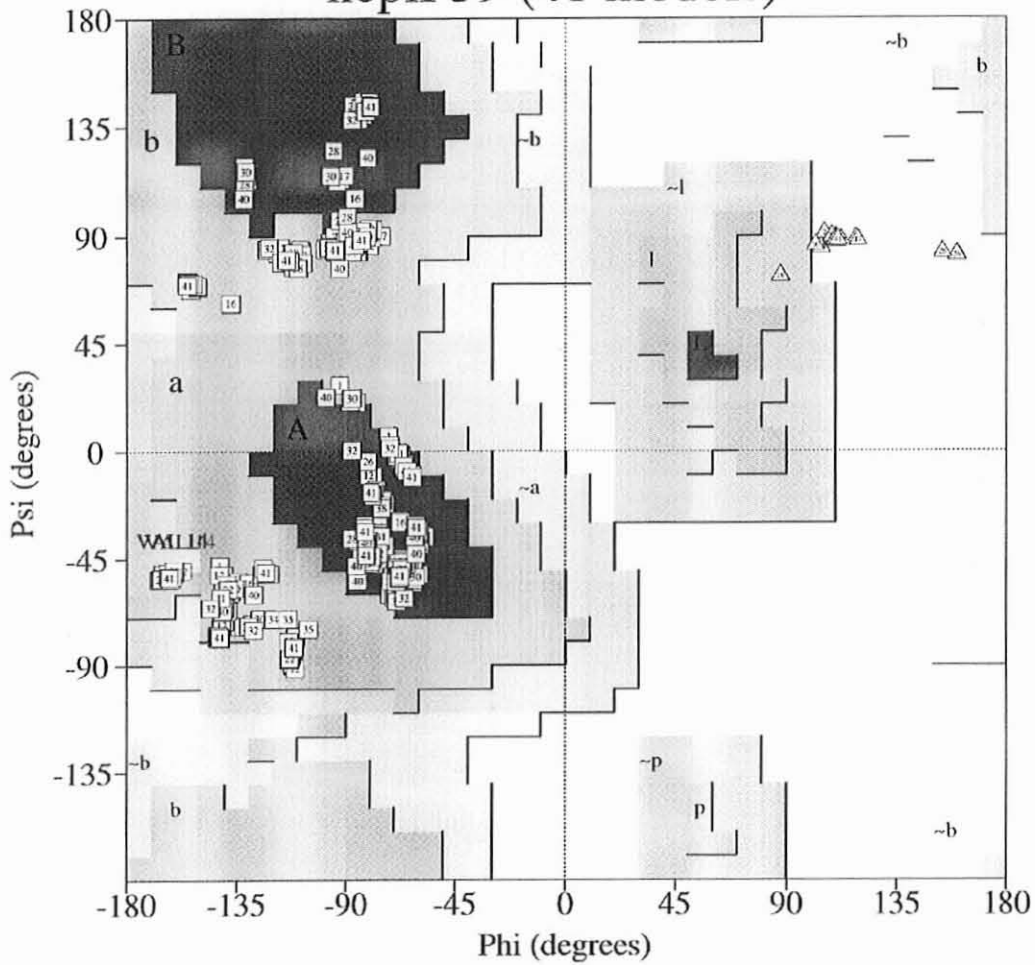
De plus, nous avons dénombré dans 40% des structures la liaison Thr¹⁴-CO...HN-Glu¹⁶.

Nous constatons donc que plusieurs portions de la molécule ncpl semblent être bien structurées. Le manque de contraintes NOE dans le cas de ce peptide, dû à la superposition des signaux de plusieurs résidus, ne permet cependant pas aux calculs de dynamique moléculaire d'aboutir à une famille majoritaire de structures stables.

Le logiciel MOLMOL indique par ailleurs l'existence d'une hélice longtemps pressentie qui se retrouverait pour la famille F dans 41% des structures, faisant intervenir le segment Thr¹⁴Trp¹⁵Glu¹⁶Val¹⁷ et pour la famille O dans 51% des structures avec les segments Leu⁶Glu⁷Leu⁸Arg⁹ et Thr¹⁴Trp¹⁵Glu¹⁶Val¹⁷, ce qui est en bon accord avec l'existence des liaisons hydrogène à ces niveaux mais qui se justifie moins bien avec les valeurs standards des angles pour les structures en hélice α ou en hélice 3_{10} . Toutes ces structures contribuent à stabiliser globalement la molécule.

Enfin, avec le programme PROCHECK [130], nous avons établi les cartes de Ramachandran (le programme PROCHECK ne permettant pas d'analyser 205 structures en une fois), correspondant à la famille O et aux sous-familles F1 et F2, à partir des valeurs des angles rotationnels ϕ_i , ψ_i des différents résidus de la molécule (à l'exception des résidus Gly et des résidus aux extrémités N et C terminales) afin de tester la validité des structures calculées par dynamique moléculaire. Nous obtenons une très bonne distribution des angles ϕ_i , ψ_i (Fig.51).

Ramachandran Plot ncplF39 (41 models)



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	330	47.3%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	363	52.1%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	4	0.6%
Residues in disallowed regions	0	0.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	697	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	41	
Number of glycine residues (shown as triangles)	82	
Number of proline residues	0	

Total number of residues	820	

Figure 51. Carte de Ramachandran pour 41 structures de la sous-famille F1 générées par modélisation moléculaire

G. Conclusion

En appliquant la notion de peptides complémentaires, nous avons examiné au cours de cette étude : la séquence peptidique La/SSB 289-308, épitope autoantigène des anticorps auto-immuns intervenant dans le syndrome de Sjögren, et son peptide complémentaire cpl289.

Nous avons montré, par cette étude, que le peptide cpl289 adopte une structure relativement rigide. En effet, les deux grands fragments respectivement 1-8 et 10-20, apparaissent parfaitement superposables à l'exception du résidu Phe⁹ dont l'angle ψ_9 reste mal défini par le fait de la présence des deux résidus Pro⁶ et Pro¹² qui créent une rupture dans les corrélations séquentielles $d_{NN(i,i+1)}$ et $d_{NN(i,i+2)}$.

Prises individuellement, les 41 structures qui découlent du calcul de dynamique moléculaire présentent un repliement β de type I au niveau du fragment Phe⁵Pro⁶Ser⁷His⁸, deux repliements γ au niveau des résidus Glu¹⁵ et Ile¹⁸ et une interaction entre le proton carboxylique (OH) de la chaîne latérale du résidu Glu¹⁵ avec le carbonyle du résidu Ile¹⁹ ce qui renforce davantage le repliement de cette partie C-terminale.

Ces structures se présentent sous la forme d'une couronne assez large avec une présentation des chaînes latérales aromatiques (Tyr⁴, Phe⁵, His⁸, Phe¹⁰) similaire à celle du site de liaison d'un anticorps. Cette ressemblance suggère que cette conformation pourrait mimer d'une façon avantageuse le site de liaison d'un anticorps auto-immun.

Pour le peptide ncpl, à cause de la superposition de certains signaux NH, l'estimation des contraintes de distance n'a pas pu être déterminée avec précision. Les calculs de dynamique moléculaire à partir de ces données ont

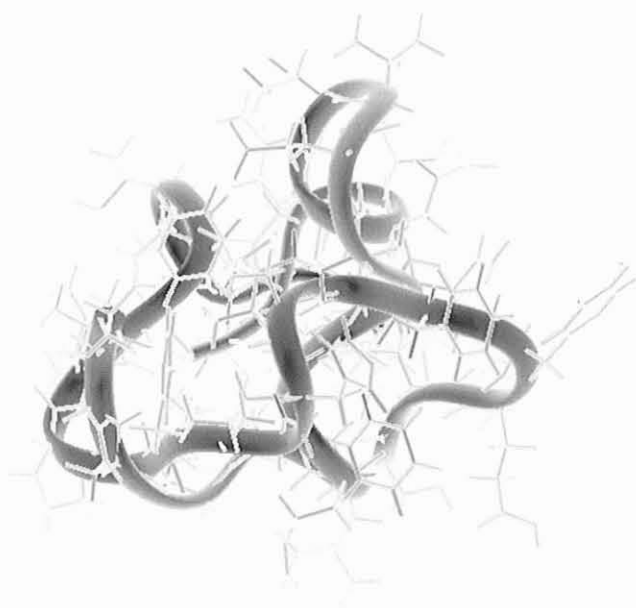
conduit à deux - voire trois - familles différentes de structures. Cependant lorsque les signaux RMN des protons NH et CH^α sont bien résolus pour certains fragments de la molécule, les calculs de modélisation ont fait ressortir plusieurs parties bien structurées, stabilisées par la présence de plusieurs liaisons hydrogène intramoléculaires.

Le but de cette étude était de vérifier la complémentarité conformationnelle des deux peptides cpl289 et ncpl. Nous avons entrepris des essais de « docking » du peptide ncpl au centre de la structure en couronne observée avec le peptide cpl289. Les résultats, quoique intéressants, ne se sont pas révélés très concluants à cause de l'incertitude sur la structure exacte adoptée par le peptide ncpl.

Récemment, les chercheurs du laboratoire d'Immunologie d'Athènes ont obtenu un anticorps anti-idiotypique contre le peptide cpl289 accroché quatre fois au support SOC et inoculé à des rats. Les essais préliminaires ont montré que cet anticorps anti-idiotypique est bien reconnu par les anticorps des sérums de patients atteints du syndrome de Sjögren (*communication personnelle*). Les résultats de cette étude sont importants et pourraient ouvrir une nouvelle voie pour le traitement du SGS et d'autres maladies auto-immunes.

Il faudrait donc rapidement essayer d'identifier les résidus responsables de cette reconnaissance mutuelle à la fois dans le peptide cpl et dans le peptide ncpl pour pouvoir étudier la complémentarité conformationnelle entre les deux peptides isolés et dans le complexe. Nous pourrions ainsi suivre les modifications conformationnelles subies par les deux peptides libres au moment de la formation du complexe peptide complémentaire/peptide non-complémentaire.

Conclusion générale



Le syndrome de Gougerot-Sjögren est une maladie méconnue, à laquelle on ne pense encore que trop rarement lors des diagnostics différentiels. Sa prévalence, sa pathogenèse et son évolution ne sont pas encore bien compris. Sous ces termes "syndrome de Gougerot-Sjögren" se cachent en réalité une multitude de symptômes pouvant toucher différents organes. Ces signes reflètent les lésions provoquées par des lymphocytes ou par des médiateurs (principalement des autoanticorps) secrétés par ces cellules, suite à un événement, encore inconnu, qui déclenche la rupture de la tolérance immunitaire vis-à-vis du soi et la réaction auto-immune. Les facteurs environnementaux, génétiques ou hormonaux sont fortement soupçonnés.

La présence ou l'absence des manifestations cliniques offre de nombreuses combinaisons rendant le diagnostic fastidieux et préjuge de l'évolution de la pathologie. En effet, bien que dans la majorité des cas ce syndrome reste bénin, limité à quelques manifestations glandulaires, il peut parfois mettre en jeu le pronostic vital du patient, avec une implication systémique (arthrite, néphrite ou pneumonie) et le développement de lymphomes malins. Les critères diagnostiques incluent à la fois des symptômes subjectifs (sensations de brûlures oculaires...) et des tests objectifs comme les mesures des flux salivaire et lacrymal, la biopsie des glandes salivaires accessoires, et une grande variété de marqueurs sérologiques.

Dans l'état actuel des choses, la thérapeutique reste principalement symptomatique. Malheureusement, les traitements locaux (comme les larmes artificielles ou des substituts salivaires) sont limités dans leurs effets. Les nouvelles approches de la stimulation des récepteurs muscariniques (pilocarpine, cévimeline) sont, par contre, très prometteuses pour l'amélioration du syndrome sec. Les traitements systémiques (principalement des corticoïdes), offrant l'avantage de s'adresser à une plus grande gamme de symptômes, voient, quant à eux, leur bénéfice limité à cause de leurs effets secondaires importants.

Les recherches actuelles ouvrent néanmoins les portes vers un traitement curatif. Ainsi, des études utilisant des inhibiteurs de TNF ou une faible dose orale de l'interferon α sont en cours, mais il est trop tôt pour en tirer des conclusions. Pour notre part, nous nous sommes attachés à étudier la structure du peptide complémentaire et non-complémentaire du peptide La/SSB épitope autoantigène des lymphocytes B, qui peut être inclus dans la destruction de la structure acineuse des glandes salivaires dans cette pathologie. Ce travail, effectué grâce à la résonance magnétique nucléaire et à la modélisation moléculaire, a aboutit à des résultats encourageants qui laissent espérer une application thérapeutique dans les années à venir.

*Références
bibliographiques*

1. TALAL N., Sjögren's syndrome : an historical perspective. *Ann. Méd. Interne*, 1998 ; 149(1) : 4-6.
2. DANIELS T.E., TALAL N., Diagnosis and differential diagnosis of Sjögren's syndrome. In TALAL N., MOUTSOPOULOS H.M., KASSAN S.S. eds. Sjögren's syndrome: Clinical and Immunological Aspects. Berlin, Springer-Verlag, 1987, 193-199.
3. MANTHORPE R., OXHOLM P., PRAUSE J.U. & SCHIØDT M., The Copenhagen criteria for Sjögren's syndrome. *Scand. J. Rheumatol.*, 1986 ; Suppl **61** :19-21.
4. SKOPOULI F.N., DROSOS A.A., PAPAIOANNOU T. & MOUTSOPOULOS H.M., Preliminary diagnostic criteria for Sjögren's syndrome. *Scand. J. Rheumatol.*, 1986 ; Suppl **61** : 22-25.
5. FOX R.I., ROBINSON C.A., CURD J.G., KOZIN F. & HOWELL F.V., Sjögren's syndrome : proposed criteria for classification. *Arthritis Rheum.*, 1986 ; **29** : 577-585.
6. HOMMA M., TOJO T., AKIZUKI M. & YAMAGATA H., Criteria for Sjögren's syndrome in Japan. *Scand. J. Rheumatol.*, 1986 ; Suppl **61** : 26-27.
7. FOX R.I., ROBINSON C.A., CURD J.G, MICHELSON P., et al., First international symposium on Sjögren's syndrome : Suggested criteria for classification. *Scand. J. Rheumatol.*, 1986 ; suppl **61** : 28-30.
8. VITALI C., BOMBARDIERI S., MOUTSOPOULOS H.M., et al., Preliminary Criteria For the Classification of Sjögren's Syndrome. Results of a Prospective Action Supported by the European Community. *Arthritis Rheum.*, 1993 ; **36** : 340-347.
9. VITALI C., BOMBARDIERI S., MOUTSOPOULOS H.M., et al., Assessment of the European Criteria for Sjögren's syndrome in a series of clinically defined cases ; results of a prospective multicentre study. *Ann. Rheum. Dis.*, 1996 ; **55** : 116-121.
10. FUNDEBERG H.H., STITES D.P., CALDWELL J.L. & WELLS J.V., Immunologie fondamentale et clinique. Italie, Piccin Nuova Libreria, 1986.
11. SANY J., Syndrome de Gougerot-Sjögren. In SANY J., CLOT J. Immunorhumatologie. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 1989, 189-199.
12. BROSTOFF J., SCADDING G.K., MALE D.K. & ROITT I.M., Immunologie Clinique. Belgique, De Boeck-Wesmael s.a., 1993.

13. BENHAMOU C.L., Le syndrome de Sjögren. *Nouv. Press. Méd.*, 1980 ; 9(45) : 3421-3422.
14. TAPINOS N.I., POLIHRONIS M., TZIOUFAS A.G. & SKOPOULI F.N., Immunopathology of Sjögren's syndrome. *Ann. Méd. Interne*, 1998 ; 149(1) : 17-24.
15. ROIT I.M., BROSTOFF J. & MALE D.K., Immunologie. Belgique, De Boeck & Larcier, 1997.
16. YOUINOU P., Syndrome de Gougerot-Sjögren. In BOUVENOT G., DEVULDER B., GUILLEVIN L., et al. Collection Abrégés de Médecine. Pathologie Médicale (tome 2). Paris, Masson, 1994, 30-35.
17. VITALI C. & BOMBARDIERI S., The diagnosis of Sjögren's syndrome : definition and validation of classification criteria for this disorder. *Ann. Méd. Interne*, 1998 ; 149(1) : 12-16.
18. VITALI C., MOUTSOPOULOS H.M., BOMBARDIERI S. and the European Community Study Group on Diagnostic Criteria for Sjögren's Syndrome., The European Community Study Group on Diagnostic Criteria for Sjögren's Syndrome. Sensitivity and specificity of tests for ocular and oral involvement in Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.*, 1994 ; 53 : 637-647.
19. THOMAS E., HAY M., HAJEER A. & SILMAN A.J., Sjögren's Syndrome : a community-based study of prevalence and impact. *Br. J. Rheumatol.*, 1998 ; 37 : 1069-1076.
20. ZHANG N.Z., SHI C.S., YAO Q.P., PAN G.X., et al., Prevalence of primary Sjögren's syndrome in China. *J. Rheumatol.*, 1995 ; 22 : 659-661.
21. MANTHORPE R., JACOBSSON L.T.H, KIRTAVA Z. & THEANDER E., Epidemiology of Sjögren's syndrome, especially its primary form., *Ann. Méd. Interne*, 1998 ; 149(1) : 7-11.
22. FOX R., Epidemiology and pathogenesis of Sjögren's syndrome., *Curr. Opin. Rheumatol.*, 1994 ; 6 : 501-508.
23. RHODUS N.L., Sjögren's syndrome., *Quintessence Int.*, 1999 ; 30(10) : 689-699.
24. HAGA H.J. & JONSSON R., The influence of age on disease manifestations and serological characteristics in primary Sjögren's syndrome. *Scand. J. Rheumatol.*, 1999 ; 28 : 227-232.
25. BRENNAN M.T. & FOX P.C., Sex differences in primary Sjögren's syndrome. *J. Rheumatol.*, 1999 ; 26 : 2373-2376.

26. DAWSON L.J., SMITH P.M., MOOTS R.J. & FIELD E.A., Sjögren's syndrome-time for a new approach. *Rheumatology* 2000 ; 39(3) : 234-237.
27. LEONHARDT H., Viscères. In KAHLE W., LEONHARDT H. & PLATZER W. Anatomie (Tome 2) 2^e éd, 7^e tirage. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 1991, 192-195.
28. POURMAND N., WAHREN-HERLENIUS M., GUNNARSSON I., SVENUNGSSON E., et al., Ro/SSA and La/SSB specific IgA autoantibodies in serum of patients with Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.*, 1999 ; 58 : 623-629.
29. AMEISEN J.C., Le suicide des cellules et le système immunitaire. In Pour la science. Dossier hors-série : les défenses de l'organisme 2000 ; oct : 54-61.
30. MANOUSSAKIS M.N., DIMITRIOU I.D., KAPSOGEORGOU E.K., et al., Expression of B7 costimulatory molecules by salivary gland epithelial cells in patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.*, 1999 ; 42 : 229-239.
31. KONTTINEN Y.T., PLATTS L.A.M., TUOMINEN S., et al., Role of nitric oxide in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.*, 1997 ; 40 : 875-883.
32. REICHLIN M., RADER M. & HARLEY J.B., Autoimmune response to the Ro/SSA particle is directed to the human antigen. *Clin. Exp. Immunol.*, 1989 ; 76 : 373-377.
33. ELENITSAS R., BAIR L.W., MEDSGER T.A. & DENG J.S., Discordance of SSA/Ro and SSB/La cellular antigens in synchronized cells. *J. Invest. Dermatol.*, 1986 ; 87 : 504-509.
34. GOT M., Contribution à l'étude des anticorps antinucléaires. Approche de leurs applications en pathologie. Th. Pharmacie. 1985. Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques. Université de Nancy I.
35. REICHLIN M., Antibodies to Ro and La. *Ann. Méd. Interne*, 1998 ; 149(1) : 34-41.
36. HELSLOOT J. & STURGESS A., T Cell Reactivity To Sjögren's Syndrome related Antigen La(SSB). *J. Rheumatol.*, 1997 ; 24 : 2340-2347.
37. ATKINSON J.C., TRAVIS W.D., PILLEMER S.R., BERMUDEZ D., et al., Major salivary gland function in primary sjögren's syndrome and its relationship to clinical features. *J. Rheumatol.*, 1990 ; 17 : 318-322.
38. HENRIKSSON G., MANTHORPE R. & Bredberg A., Antibodies to CD4 in primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology* 2000 ; 39(2) : 142-147.

39. ARAGONA P., MAGAZZU G., MACCHIA G., et al., Presence of antibodies against *Helicobacter pylori* and its heat-shock protein 60 in the serum of patients with Sjögren's syndrome. *J. Rheumatol.*, 1999 ; **26** : 1306-1311.
40. TENGNER P., HALSE A.K., HAGA H.J., JONSSON R. & WAHREN-HERLENIUS M., Detection of anti-Ro/SSA et anti-La/SSB autoantibody-producing cells in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.*, 1998 ; **41** : 2238-2248.
41. TZIOUFAS A.G., HANTOUMI I., POLIHRONIS M., et al., Autoantibodies to La/SSB in patients with primary Sjögren's syndrome (pSS) are associated with upregulation of La/SSB mRNA in minor salivary gland biopsies (MSGs). *J. Autoimmunity*, 1999 ; **13** : 429-434.
42. DEUTSCHER S.L., HARLEY J.B. & KEENE J.D., Molecular analysis of the 60-kDa human Ro ribonucleoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988 ; **85** : 9479-9483.
43. NAMEKAWA T., KURODA K., KATO T., YAMAMOTO K., et al., Identification of Ro(SSA) 52 kDa reactive T cells in labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *J. Rheumatol.*, 1995 ; **22** : 2092-2099.
44. ITOH Y., RADER M.D. & REICHLIN M., Heterogeneity of the Ro/SSA antigen and autoanti-Ro/SSA response : evidence of the four antigenically distinct forms. *Clin. Exp. Immunol.*, 1990 ; **81** : 45-51
45. WANG D., BUYON J.P., ZHU W. & CHAN E.K.L., Defining a novel 75-kDa phosphoprotein associated with SS-A/Ro and identification of distinct human autoantibodies. *J. Clin. Invest.*, 1999 ; **104** : 1265-1275.
46. WAHREN M., SOLOMIN L.; PETERSSON I. & ISENBERG D., Autoantibody Repertoire to Ro/SSA and La/SSB antigens in patients with primary and secondary Sjögren's syndrome. *J. Autoimmunity*, 1996 ; **9** : 537-544.
47. GAITHER K.K., FOX O.F., YAMAGATA H., et al., Implications of anti-Ro/Sjögren's syndrome A antigen autoantibody in normal sera for autoimmunity. *J. Clin. Invest.*, 1987 ; **79** : 841-846.
48. HARLEY J.B., ROSARIO M.O., YAMAGATA H., et al., Immunologic and structural studies of the Lupus/Sjögren's syndrome autoantigen, La/SSB, with a monoclonal antibody. *J. Clin. Invest.*, 1985 ; **76** : 801-806.
49. ROTHER R.P., THOMAS P.S., La/SSB ribonucleoprotein levels increased in transformed cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 1991 ; **83** : 369-374.
50. GUGGENBUHL P., JEAN S., JEGO P., GROSBOIS B., et al., Primary Sjögren's syndrome : Role of the HLA-DRB1*0301-*1501 Heterozygotes. *J. Rheumatol.*, 1998 ; **25** : 900-905.

51. DE WILDE P.C.M., KATER L., BODEUTSCH C., et al., Aberrant expression pattern of the SS-B/La antigen in labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.*, 1996 ; **39** : 783-791.
52. KONG L., OGAWA N., NAKABAYASHI T., et al., Fas and Fas Ligand expression in the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.*, 1997 ; **40** : 87-97.
53. BON DURAND V., JOHANET C., SOULIE E. & ABUAF N., Mise au point d'une technique de dosage immuno-enzymatique de type ELISA pour la détection des anticorps anti-SSB. Etude comparative de 2 trousse. *Rev. Méd. Interne*, 1993 ; **14(5)** : 288-293.
54. McCAULIFFE D.P., WANG L., SATOH M., et al., Recombinant 52 kDa Ro(SSA) detects autoantibodies in Sjögren's syndrome sera that go undetected by conventional serologic assays. *J. Rheumatol.*, 1997 ; **24** : 860-866.
55. YAMAGATA H, HARLEY J.B. & REICHLIN M., Molecular properties of the Ro/SSA antigen and enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of antibody. *J. Clin. Invest.*, 1984 ; **74** : 625-633.
56. BASSET C., DUEYMES M., DEVAUCHELLE V., et al., Changes in glycosylation of immunoglobulins in primary Sjögren's syndrome. *Ann. Méd. Interne*, 1998 ; **149(1)** : 42-44.
57. BASSET C., DURAND V., MIMASSI N., et al., Enhanced sialyltransferase activity in B lymphocytes from patients with primary Sjögren's syndrome. *Scand. J. Immunol.*, 2000 ; **51** : 307-311.
58. PATEL Y.I. & McHUGH N.J., Apoptosis-new clues to the pathogenesis of Sjögren's syndrome?. *Rheumatology*, 2000 ; **39(2)** : 119-121.
59. SUMIDA T., MATSUMOTO I, MURATA H, NAMEKAWA T, et al., TCR in Fas-sensitive T cells from labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *J. Immunol.*, 1997 ; **158** : 1020-1025.
60. BOLSTAD A.I. & JONSSON R., The role of apoptosis in Sjögren's syndrome. *Ann. Méd. Interne*, 1998 ; **149(1)** : 25-29.
61. POLIHRONIS M., TAPINOS N.I., THEOCHARIS S.E., et al., Modes of epithelial cell death and repair in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.*, 1997 ; **40(suppl)** : S224.
62. ANAYA J.M. & TALAL N., Sjögren's syndrome comes of age. *Semin. Arthritis Rheum.*, 1999 ; **28(6)** : 355-359.

63. HUMPHREYS-BEHER M.G., PECK A.B., DANG H. & TALAL N., The role of apoptosis in the initiation of the autoimmune response in Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.*, 1999 ; **116** : 383-387.
64. TABBARA K. & SHARARA N, Sjögren's syndrome : pathogenesis. *Eur. J. Ophthalmol.*, 1999 ; **9(1)** : 1-7.
65. PRICE E.J. & VENABLES P.J.W., The etiopathogenesis of Sjögren's syndrome. *Semin. Arthritis Rheum.*, 1995 ; **25** : 117-133.
66. SCOFIELD R.H., FARRIS A.D., HORSFALL A.C. & HARLEY J.B., Fine specificity of the autoimmune response to the Ro/SSA and La/SSB ribonucleoproteins. *Arthritis Rheum.*, 1999 ; **42** : 199-209.
67. MARIETTE X., Syndrome de Sjögren et virus. *Rev. Méd. Interne*, 1994 ; **15** : 601-606.
68. COOKE S.P., RIGBY S.P., GRIFFITHS D.J. & VENABLES P.J.W., Viral studies in rheumatic disease. *Ann. Méd. Interne*, 1998 ; **149(1)** : 30-33.
69. RAMOS-CASALS M., GARCIA-CARRASCO M., CERVERA R. & FONT J., Sjögren's syndrome and hepatitis C virus. *Clin. Rheumatol.*, 1999 ; **18(2)** : 93-100.
70. DANIELS T.E. & WHITCHER J.P., Association of patterns of labial salivary gland inflammation with keratoconjunctivitis sicca: analysis of 618 patients with suspected Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.*, 1994 ; **37** : 869-877.
71. HUMPHREYS-BEHER M.G., BRAYER J., YAMACHIKA S., et al., An alternative perspective to the immune response in autoimmune exocrinopathy : induction of functional quiescence rather than destructive autoaggression. *Scand. J. Immunol.*, 1999 ; **49** : 7-10.
72. WATERMAN S.A., GORDON T.P. & RISCHMULLER M., Inhibitory effects of muscarinic receptor autoantibodies on parasympathetic neurotransmission in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.*, 2000 ; **43** : 1647-1654.
73. KOVACS L., TOROK T., BARI F., KERI Z., et al., Impaired microvascular response to cholinergic stimuli in primary Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.*, 2000 ; **59** : 48-53.
74. KASSAN S.S., Immunogenetics of Sjögren's syndrome. *Ann. Méd. Interne*, 1998 ; **149(1)** : 45-48.
75. MOUTSOPOULOS H.M. & ZERVA L.V., Anti-Ro (SSA)/La (SSB) antibodies and Sjögren's syndrome. *Clin. Rheumatol.*, 1990 ; **9(Suppl)** : 123-131.

76. GERLI R., MUSCAT C., GIANANTI M., DANIELI M.G., et al, Quantitative assessment of salivary gland inflammatory infiltration in primary Sjögren's syndrome : its relationship to different demographic, clinical and serological features of the disorder. *Br. J. Rheumatol.*, 1997 ; **36** : 969-975.
77. FOX R.I., TORNWALL J. & MICHELSON P., Current issues in the diagnosis and treatment of Sjögren's syndrome. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 1999 ; **11** : 364-371
78. RISCHMULLER M., LESTER S., CHEN Z., et al., HLA class II phenotype controls diversification of the autoantibody response in primary Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.*, 1998 ; **111** : 365-371.
79. BANG B., ASMUSSEN K., SORENSEN O.H. & OXHOLM P., Reduced 25-hydroxyvitamin D levels in primary Sjögren's syndrome. Correlations to disease manifestations. *Scand. J. Rheumatol.*, 1999 ; **28** : 180-183.
80. SANY J., Syndrome de Gougerot-Sjögren. In PERRIN L.F., LAURENT P.E. Collection Abrégés de Médecine. Immunopathologie clinique. Paris, Masson, 1990, 179-182.
81. HAGA H.J., HULTEN B., BOLSTAD A.I., et al., Reliability and sensitivity of diagnostic tests for primary Sjögren's syndrome. *J. Rheumatol.*, 1999 ; **26** : 604-608.
82. TSUBOTA K., The importance of the Schirmer test with nasal stimulation. *Am. J. Ophthalmol.*, 1991 ; **11** : 106-108.
83. ASSIM, Immunologie Clinique. Paris, MEDSI/McGRAW-HILL, 1990.
84. SOTO-ROJAS A.E., VILLA A.R., SIFUENTES-OSORNIO J., et al., Oral manifestations in patients with Sjögren's syndrome. *J. Rheumatol.*, 1998 ; **25** : 906-910.
85. SOTO-ROJAS A.E., VILLA A.R., SIFUENTES-OSORNIO J., et al., Oral candidiasis and Sjögren's syndrome. *J. Rheumatol.*, 1998 ; **25** : 911-915.
86. SALAFFI F., ARGALIA G., CAROTTI M., GIANNINI F.B. & PALOMI C., Salivary Gland Ultrasonography in the evaluation of primary Sjögren's syndrome. Comparison with minor salivary gland biopsy. *J. Rheumatol.*, 2000 ; **27** : 1229-1236.
87. MAKULA E., POKORNY G., KISS M., et al., The place of magnetic resonance and ultrasonographic examinations of the parotid gland in the diagnosis and follow-up of primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology*, 2000 ; 39(1) : 97-104.

88. MANTHORPE R., BENONI C., JACOBSSON L., et al., Lower frequency of focal lip sialadenitis (focus score) in smoking patients. Can tobacco diminish the salivary gland involvement as judged by histological examination and anti-SSA/Ro and anti-SSB/La antibodies in Sjögren's syndrome ?. *Ann. Rheum. Dis.*, 2000 ; **59** : 54-60.
89. SKOPOULI F.N., DAFNI U., IOANNIDIS J.P.A. & MOUTSOPOULOS H.M., Clinical evolution, and morbidity and mortality of primary Sjögren's syndrome. *Semin. Arthritis Rheum.*, 2000 ; **29(5)** : 296-304.
90. CAIN H.C., NOBLE P.W. & MATTHAY R.A., Pulmonary manifestations of Sjögren's syndrome. *Clin. Chest. Med.*, 1998 ; **19(4)** : 687-699, viii.
91. DAVIDSON B.K.S., KELLY C.A. & GRIFFITHS I.D., Ten Year Follow up of pulmonary function in patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.*, 2000 ; **59** : 709-712.
92. YOUINO P., MOUTSOPOULOS H.M. & PENNEC Y.L., Clinical features of Sjögren's syndrome. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 1990 ; **2** : 687-693.
93. IOANNIDIS J.P.A. & MOUTSOPOULOS H.M., Sjögren's syndrome : Too many associations, too limited evidence. The enigmatic example of CNS involvement. *Semin. Arthritis Rheum.*, 1999 ; **29(1)** : 1-3.
94. NIEMELÄ R.K. & HAKALA M., Primary Sjögren's syndrome with severe central nervous system disease. *Semin. Arthritis Rheum.*, 1999 ; **29(1)** : 4-13.
95. BELIN C., MORONI C., CAILLAT-VIGNERON N., et al., Central nervous system involvement in Sjögren's syndrome : evidence from neuropsychological testing and HMPAO-SPECT. *Ann. Méd. Interne*, 1999 ; **150(8)** : 598-604.
96. VALTYSOTTIR S.T., GUDBJORNSSON B., LINDQVIST U., et al., Anxiety and depression in patients with primary Sjögren's syndrome. *J. Rheumatol.*, 2000 ; **27** : 165-169.
97. EL KAISSOUNI J., BENE M.C. & FAURE G.C., Investigation of activation markers demonstrates significant overexpression of the secretory component on salivary glands epithelial cells in Sjögren's syndrome. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1996 ; **79(3)** : 236-243.
98. EL KAISSOUNI J., Physiopathologie de l'activation immunitaire des cellules épithéliales glandulaires. Th. de Doctorat en Biologie et Santé de l'université Henri Poincaré - Nancy I. 1997. Université Henri Poincaré - Nancy I.

99. MOUTSOPOULOS H.M., TZIOUFAS A.G. & TALAL N., Sjögren's syndrome : a model to study autoimmunity and lymphoid malignancy. In *Molecular autoimmunity*. Academic Press, 1991, 319-340.
100. VOULGARELIS M., DAFNI U.G., ISENBERG D.A. & MOUTSOPOULOS H.M., Malignant lymphoma in primary Sjögren's syndrome : a multicenter, retrospective, clinical study by the European concerted action on Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.*, 1999 ; **42** : 1765-1772.
101. KASSAN S.S., THOMAS T.L., MOUTSOPOULOS H.M., et al., Increased Risk of Lymphoma in Sicca Syndrome. *Ann. Intern. Med.*, 1978 ; **89** : 888-892.
102. VALESINI G., PRIORI R., Bavoillot D., OSBORN J., et al., Differential Risk of Non-Hodgkin's Lymphoma in Italian Patients with Primary Sjögren's syndrome. *J. Rheumatol.*, 1997 ; **24** : 2376-2380.
103. VLACHOYIANNOPOULOS P.G., Therapy of Sjögren's syndrome. New aspects and future directions. *Ann. Méd. Interne*, 1998 ; **149(1)** : 49-53.
104. SULLIVAN D.A., WICKHAM L.A., ROCHA E.M., et al., Androgens and dry eye in Sjögren's Syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1999 ; **876** : 312-324.
105. LEVEQUE F., KHAN Z., SALISBURY P.L., et al., Sustained increases in salivary flow and safety findings following extended use of pilocarpine tablets for the treatment of dry mouth symptoms in patients with Sjögren's syndrome (SS). *Arthritis Rheum.*, 1999 ; **42(suppl)** : S139.
106. NUSAIR S. & RUBINOW A., The use of oral pilocarpine in xerostomia and Sjögren's syndrome. *Semin. Arthritis Rheum.*, 1999 ; **28(6)** : 360-367.
107. FOX R.I., PENTRONE J., CONDEMI R. et al., Randomized, placebo controlled trial of SNI-2011, a novel M3 muscarinic receptor agonist, for the treatment of Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.*, 1998 ; **41(suppl)** : S288.
108. Tsubota K., Ono M., Takamura E., et al., Efficacy of cevimeline, a muscarinic agonist in treating dry eye symptoms in patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.*, 1999 ; **42(suppl)** : S141.
109. MIYAWAKI S., NISHIYAMA S. & MATOBA K., Efficacy of low-dose prednisolone maintenance for saliva production and serological abnormalities in patients with primary Sjögren's syndrome. *Intern. Med.*, 1999 ; **38(12)** : 938-943.
110. IZUMI M., EGUCHI K., NAKAMURA H., et al., Corticosteroid irrigation of parotid gland for treatment of xerostomia in patients with Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.*, 1998 ; **57** : 464-469.

111. KRUIZE A.A., HENE R.J., KALLENBERG C.G.M., et al., Hydroxychloroquine treatment for primary Sjögren's syndrome: a two-year double-blind crossover trial. *Ann. Rheum. Dis.*, 1993 ; **52** : 360-364.
112. ASMUSSEN K., ANDERSEN V., BENDIXEN G., et al., Quantitative assessment of clinical disease status in primary Sjögren's syndrome. *Scand. J. Rheumatol.*, 1997 ; **26** : 197-205.
113. TISHLER M., YARON I., SHIRAZI I. & YARON M., Hydroxychloroquine treatment for primary Sjögren's syndrome : its effect on salivary and serum inflammatory markers. *Ann. Rheum. Dis.*, 1999 ; **58** : 253-256.
114. BELL M., ASKARI A., BOOKMAN A., et al., Sjögren's syndrome : a critical review of clinical management. *J. Rheumatol.*, 1999 ; **26** : 2051-2061.
115. STEINFELD S.D., DEMOLS P., VAN VOOREN J.P., et al., Zidovudine in primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology*, 1999 ; **38** : 814-817.
116. AZUMA M., AOTA K., TAMATANI T., et al., Suppression of tumor necrosis factor α -induced matrix metalloproteinase 9 production by the introduction of a super-repressor form of inhibitor of nuclear factor κ B α complementary DNA into immortalized human salivary gland acinar cells. Prevention of the Destruction of the Acinar structure in Sjögren's syndrome salivary glands. *Arthritis Rheum.*, 2000 ; **43** : 1756-1767.
117. BLALOCK J.E., WHITAKER J.N., BENVENISTE E.N. & BOST K.L., Use of peptides encoded by complementary RNA for generating anti-idiotypic antibodies of predefined specificity. In *Methods in Enzymology*, vol.178. Academic Press, 1989, 63-74.
118. MARRAUD M., DEMANGE P., CUNG M.T., et al., Interactions of an immunogenic decapeptide fragment of the neuromuscular acetylcholine receptor (AChR) with a monoclonal anti-AChR antibody. *Biochem. Soc. Trans.*, 1992 ; **20** : 837-839.
119. ORLEWSKI P., MARRAUD M., CUNG M.T., et al., Compared structures of the free AChR MIR decapeptide and the antibody-bound [A⁷⁶]MIR analogue. A molecular dynamics simulation from 2D-NMR data. *Biopolymers (peptide science)*, 1996 ; **40** : 419-432.
120. TZIOUFAS A.G., YIANNAKI E., SAKARELLOS-DAITSIOTIS M., et al., Fine specificity of autoantibodies to La/SSB : epitope mapping, and characterization. *Clin. Exp. Immunol.*, 1997 ; **108** : 191-198.
121. YIANNAKI E.E., TZIOUFAS A.G., BACHMANN M., et al., The value of synthetic linear epitope analogues of La/SSB for the detection of autoantibodies to La/SSB; specificity, sensitivity and comparison of methods. *Clin. Exp. Immunol.*, 1998 ; **112** : 152-158.

122. ALEXOPOULOS C., TSIKARIS V., RIZOU C., et al., The position of the LysN^εH₂-grafted antigens along the sequential oligopeptide carrier, Ac-(Aib-Lys-Aib-Gly)_n (SOC_n-II), influences the antibody recognition : application to the Sm Main Autoimmune Epitope. *Biopolymers*, 2000 ; **54** : 1-10.
123. MARKLEY J.L., BAX A., ARATA Y., et al., Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids. *J. Biomol. NMR.*, 1998 ; **12** : 1-23.
124. ORLEWSKI P., Modélisation des interactions anticorps-antigène. Application à une maladie auto-immune, la myasthénie. Th. de Doctorat de l'INPL. 1996. ENSIC. Institut National Polytechnique de Lorraine.
125. GÜNTHER H., La spectroscopie de RMN. Principes de base, concepts et application de la spectroscopie RMN du proton et du carbone 13 en chimie. Masson, 1994.
126. KARPLUS M., Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments. *J. Chem. Phys.*, 1959 ; **30** : 10-15.
127. KARPLUS M., vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1963 ; **85** : 2870-2871.
128. CUNG M.T., MARRAUD M. & NÉEL J., Experimental calibration of a Karplus relationship in order to study the conformations of peptides by Nuclear Magnetic Resonance. *Macromolécules*, 1974 ; **7** : 606-613.
129. BOUSSARD G., Etude expérimentale des modes de repliement dans des molécules peptidiques et depsipeptidiques, Th. de Doctorat ès Sciences Physiques de l'INPL. 1976. Nancy.
130. LASKOWSKI R.A., RULLMANN J.A., MACARTHUR M.W. & KAPTEIN P., AQUA and Procheck-NMR : programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR.*, 1996 ; **8(4)** : 477-486.
131. Dorosz 1998.
132. Vidal 1998.
133. Garnier Delamare., Dictionnaire des termes de médecine 25^e édition. ed. Maloine 1998.

2D-NMR and MD studies of complementary peptides to B and T-cell epitopes of the La/SSB autoantigen for immunoregulation in Sjogren's syndrome (pSS)

Aurilia MOULIA¹, Christine HEMMERLIN², Angélique PHAN-CHAN-DU², Zouhair ELHILALI², Vassilios TSIKARIS¹, Maria SAKARELLOS-DAITSIOTIS¹, Constantinos SAKARELLOS¹, Eleni DOTSIKA³, Athanasios G. TZIOUFAS⁴, Haralampos M. MOUTSOPOULOS⁴ and Manh-Thong CUNG²

1 Department of Chemistry, University of Ioannina, 45110 GREECE;
 2 LCPM, UMR 7568 CNRS-INPL, Nancy, FRANCE;
 3 Department of Parasitology Hellenic Pasteur Institut, Vas. Sofias, 127,11521 Athens, GREECE
 4 Department of Pathophysiology, National University of Athens, GREECE

It is well documented now that codons for hydrophobic amino acids are complemented by those for hydrophilic amino acids and vice versa. Following this pattern, two peptides that represent complementary strands of nucleic acids can display an interchange hydrophilic and hydrophobic amino acids. It has been reported that vaccination with complementary peptides, encoded by complementary RNA, induces the production of their anti-idiotypic and anti-clonotypic antibodies. Their combining sites are complementary and therefore reactive with Ag receptors on disease epitope-specific B and T cells. Recently, we have demonstrated that anti-La/SSB antibodies derived from pSS patients sera are directed towards four linear epitopes spanning the regions 145-164, 289-308, 301-320 and 349-368. Predictive methods have pointed out that the epitope 289-308 is also a T-cell epitope. Two peptides, encoded by complementary RNA (termed cp(289-308) La/SSB and cpl (349-368) La/SSB were used in immunization experiments with the aim to manipulate the immune network in pSS. In particular, these peptides were coupled, separately, in duplicate to the Lys-NH₂ groups of the carrier Ac-(Lys-Alb-6ty), (SOC), and then used in animal immunizations together with SOC₁-(289-308), and SOC₂-(349-368), respectively.

The conformational properties of the 20-residue peptide (SFYEPPSHFFVPELVITIC-Acm) corresponding to the complementary peptide cp(289-308) were studied by 2D-NMR experiments (TOCSY and NOESY).

ELISA experiments

Anti-La/SSB positive sera from patients with pSS were tested for anti-(289-308)La/SSB and anti-cp(289-308)La/SSB antibodies in ELISA experiments. The optical density (OD at 405 nm) ratio between non complementary and complementary anti-peptide antibodies were measured.

The reported findings point out that they are divided into two groups of anti-La/SSB positive sera :

- we one containing antibodies against both non-complementary and complementary peptides (epitope),
- we a second one with antibodies only against the non-complementary peptides,
- we whereas sera possessing antibodies against the complementary peptides do not exist.

These results are in accordance with the idiotypic-anti-idiotypic theory providing that the occurrence of idiotypic antibodies is a prerequisite for the generation of anti-idiotypic antibodies.

Figure 1 :
 OD ratio of anti-(289-308)La/SSB/anti-cp(289-308) and anti-cp(289-308)La/SSB/anti-(289-308)La/SSB positive sera in ELISA. OD anti-cp(289-308)-out off

Immune Spreading

Mice(H-2d) injected with [cp(289-308)₂, Ac₁]-SOC, exhibited a strong humoral immune response against the priming peptide, and subsequently expanded to (289-308)La/SSB suggesting an intramolecular spreading.

Spleen cells from the immunized animals were proliferated *in vivo* in the presence of the cp(289-308)La/SSB and (289-308)La/SSB peptides. It appears that immunization with [cp(289-308)₂, Ac₁]-SOC, induces strong B and T cell responses, possibly associated with the anti-idiotypic/anti-clonotypic network.

Figure 2 :
 Immune spreading in mice injected with (A) (289-308)-SOC, (mouse 1), (B), (C) and (D) [cp(289-308)₂, Ac₁]-SOC, (mice 2,3,4)

NMR Experiments and molecular modeling

All 2D-NMR experiments (TOCSY and NOESY) were recorded on a Bruker DRX 600 MHz spectrometer. The cp(289-308) peptide was studied in DMSO solution at 2 mM and 298 K. A set of 146 inter-proton distance constraints (31 backbone-backbone and 115 backbone-sidechain) was deduced from the NOESY spectrum (mixing time t_m of 300 ms) (Figure 3). The rotational angles ϕ were deduced from ³J_{HH'} vicinal coupling constants and used as angular constraints.

All calculations, i.e. energy minimization (EM) and molecular dynamics (MD), with a simulated annealing protocol were carried out on an Octane Silicon Graphics workstation using DYANA and DISCOVER software. The consistent force field (CVFF) with a default cut-off distance of 9.5 Å and a dielectric constant equal to 4 were applied.

Figure 3 :
 Comparison between cp(289-308) TOCSY and NOESY (mixing time t_m = 300 ms) spectra

Figure 4 :

Schematic ¹H/¹H NOE connectivities for the complementary peptide cp(289-308). The NOE intensities are classified as strong, medium or weak and represented by lines with decreasing thickness.

Results and discussion

40 structures were generated during the last 50 ps simulation and analyzed using the MOLMOL software. The superposition of all the structures led to a RMSD of 0,7 Å and 1,3 Å for backbone and heavy atoms respectively. Figure 6 points out that the 1-8 N-terminal and 10-20 C-terminal sequences are well superimposed, when separately considered. Fluctuations observed come from the large variation in the ψ angle value.

MD calculations led to a folded structure (Figure 5) in which a β I-turn was found for the F₅P₆S₇H₈ sequence, stabilized by the H₅ amide proton to the F₅ carbonyl hydrogen bond, whereas two γ -turns, centred around the E₁₅ and I₁₈ residues respectively, were found for the C-terminal folded part of the peptide.

The presence of the β I-turn is in good agreement with the small temperature coefficient for the H₅ amide proton resonance, the presence of strong NN(S₇-H₈) and weak α N(P₆-H₅) NOEs and the ϕ angle values of the F₅ and S₇ residues. In the folded structure, the Y₆, F₅, H₈, F₉ and F₁₀ aromatic side chains are situated on one side and the E₁₅, T₁₇ and C₂₀ side chains on the other side.

Figure 5 :
 Time averaged conformation of cp(289-308)

Figure 6 :
 Superposition of 15 structures extracted during the last 20 ps of a restrained MD simulation with fitting of the 1-8 N-terminal sequence (A: backbone atoms, C: all the heavy atoms) and of the 10-20 C-terminal sequence (B: backbone atoms, D: all the heavy atoms)

CONCLUSIONS

- Anti-idiotypic antibodies recognizing cp(289-308) La/SSB or cpl (349-364) La/SSB are always accompanied by idiotypic antibodies recognizing the non-complementary La/SSB peptides in pSS patient sera.
- Results reported obtained with ELISA experiments are in accordance with the idiotypic-anti-idiotypic theory.
- Animal immunizations with [cp(289-308)₂, Ac₁]-SOC, exhibit strong B and T cell responses possibly associated with the anti-idiotypic / anti-clonotypic network.
- Experiments are in progress to induce "immunosuppression" or "neutralization" of the anti - La/SSB response.
- The structure issued from NMR experiments and molecular modeling could mimic the binding site of an antibody.

DEMANDE D'IMPRIMATUR



**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE**

Présenté par *Zouhaïr EL HILALI*

Sujet :

**Le syndrome de Gougerot-Sjögren : utilisation
de la RMN et de la modélisation moléculaire en
vue d'une nouvelle approche thérapeutique.**

Jury :

Président : M. Alain NICOLAS, Professeur.

Juges : M. Manh Thong CUNG, Directeur de Recherche.
Mme Chantal FINANCE, Professeur.
Mme Christine HEMMERLIN, Ingénieur de
Recherche.

Vu,

Nancy, le 8 février 2001

Le président du jury

Le directeur de thèse

M. Alain NICOLAS,
Professeur

M. Manh Thong CUNG,
Directeur de Recherche

Vu et approuvé,

Nancy, le *21 février 2001*

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy I



Chantal FINANCE

Vu,

Nancy, le *23 février 2001*
n° *935*

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy I

Claude BURLET

N° d'identification :

**Le syndrome de Gougerot-Sjögren :
utilisation de la RMN et de la modélisation moléculaire
en vue d'une nouvelle approche thérapeutique.**

Thèse soutenue le 26 mars 2001

par **Zouhair EL HILALI**

RÉSUMÉ

Le syndrome de Gougerot-Sjögren est une maladie auto-immune caractérisée par une infiltration lymphoïde des glandes salivaires et lacrymales responsable d'une sécheresse buccale et oculaire, et la production de multiples autoanticorps. Des manifestations articulaires, pulmonaires ou neurologiques peuvent également être associées. L'origine de la maladie est inconnue. Le rôle de l'apoptose et/ou d'un dysfonctionnement du tissu glandulaire est fortement suspecté. La thérapeutique actuelle est principalement symptomatique.

Nous avons effectué une analyse structurale par RMN et modélisation moléculaire des peptides complémentaire et non-complémentaire du peptide La/SSB, épitope autoantigène des lymphocytes B en relation avec ce syndrome. Le but de cette étude était de vérifier la complémentarité conformationnelle de ces deux peptides. Les résultats sont encourageants et pourraient ouvrir une nouvelle voie dans le traitement du SGS et d'autres maladies auto-immunes.

MOTS CLÉS :

- Syndrome de Gougerot-Sjögren
- Sjögren
- La/SSB
- RMN
- Analyse conformationnelle
- Modélisation moléculaire

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature	
M. Manh Thong CUNG	Laboratoire de Chimie-	Expérimentale	<input checked="" type="checkbox"/>
Directeur de recherche au	Physique Macromoléculaire	Bibliographique	<input type="checkbox"/>
CNRS	(LCPM)	Thème	<input checked="" type="checkbox"/>

Thèmes

- | | |
|---------------------------|-----------------------------|
| 1. Sciences fondamentales | 2. Hygiène / Environnement |
| 3. Médicament | 4. Alimentation - Nutrition |
| 5. Biologie | 6. Pratique professionnelle |