



HAL
open science

Nouvelles immunothérapies dans le traitement du syndrome de Sjögren et autres maladies interféron-dépendantes

Martin Killian

► **To cite this version:**

Martin Killian. Nouvelles immunothérapies dans le traitement du syndrome de Sjögren et autres maladies interféron-dépendantes. Médecine humaine et pathologie. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSES051 . tel-02895179

HAL Id: tel-02895179

<https://theses.hal.science/tel-02895179>

Submitted on 9 Jul 2020

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

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



N° d'ordre NNT : 2019LYSES051

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
Université Jean Monnet Saint-Etienne

Ecole Doctorale N° 488
SIS Sciences Ingénierie Santé

Spécialité de doctorat : Biologie Cellulaire et Moléculaire
Discipline : Biologie Médecine et Santé

Soutenue publiquement le 14/11/2019, par :
Martin KILLIAN

**Nouvelles immunothérapies dans le
traitement du syndrome de Sjögren et autres
maladies interféron-dépendantes**

Devant le jury composé de :

Pr BOTELHO-NEVERS Elisabeth	PU-PH Université Jean Monnet Saint-Etienne	Présidente
Pr SERVETTAZ Amélie	PU-PH Université de Reims	Rapporteure
Pr BELOT Alexandre	PU-PH Université Claude Bernard Lyon 1	Rapporteur
Pr BATTEUX Frédéric	PU-PH Université Paris Descartes	Examineur
Pr CATHEBRAS Pascal	PU-PH Université Jean Monnet Saint-Etienne	Examineur
Pr PAUL Stéphane	PU-PH Université Jean Monnet Saint-Etienne	Directeur de thèse

Remerciements

A Mme le Pr Elisabeth Botelho-Nevers, merci d'avoir accepté de présider mon jury, merci pour nos échanges passés, et, assurément, pour nos collaborations futures

A Mme le Pr Amélie Servettaz, merci d'avoir accepté de vous investir et de juger mon travail

A M le Pr Alexandre Belot, merci pour nos échanges très enrichissants, et merci d'avoir accepté de prendre le temps de juger mon travail

A M le Pr Frédéric Batteux, merci de m'avoir mis le pied à l'étrier de la recherche en m'ouvrant la porte de votre laboratoire, et merci d'avoir accepté d'évaluer mon travail

A M le Pr Pascal Cathébras, merci d'être le chef charismatique et humain que vous êtes, sans vous notre équipe ne serait pas ce qu'elle est, et merci de me donner envie, chaque jour, d'essayer d'être digne de votre confiance

A M le Pr Stéphane Paul, merci pour ta constante gentillesse, ton inaltérable motivation et la justesse de tes conseils, merci pour cette grande rencontre humaine et professionnelle

Au GIMAP, merci de m'avoir accueilli dans ce temple des sciences et de la bonne humeur, merci d'être sérieux sans vous prendre au sérieux

A la merveilleuse équipe de Médecine Interne, merci de m'avoir épaulé pendant ce long travail de thèse, cela n'aurait pas été possible sans votre aide et, grâce à vous, se lever le matin n'est (presque) jamais une corvée

A ma famille et à ma belle-famille, merci pour vos soutiens et votre amour passés, présents et futurs

A mes filles, Pia et Garance, sans qui cette thèse aurait été finie bien plus tôt, mais sans qui elle n'aurait pas non plus eu beaucoup de sens, je suis émerveillé un peu plus chaque jour de vous voir grandir

A ma femme, Coline, sans qui je ne serais pas le quart de l'homme que je suis, merci d'être là, rien ne serait possible sans toi

Table des matières

Abréviations.....	7
Introduction.....	11
I. Généralités sur les interférons	11
I.1 Les interférons de type 1	11
Les inducteurs.....	14
Un récepteur et une voie de signalisation en commun	19
L'interféron alpha.....	21
L'interféron bêta.....	25
Les autres interférons de type 1.....	26
I.2 Les interférons de type 2	27
L'interféron gamma.....	27
Les inducteurs.....	28
Récepteur et voie de signalisation	29
I.3 Les interférons de type 3	30
Les interférons lambda.....	30
Les inducteurs.....	30
Récepteur et voie de signalisation	31
II. Les maladies interféron-dépendantes.....	35
II.1 Les interféronopathies monogéniques.....	36
II.2 Le lupus érythémateux systémique.....	38
II.3 Le syndrome de Sjögren	46
II.4 Le syndrome des anticorps anti-phospholipides.....	58
II.5 Les myosites.....	59
II.6 La sclérodermie.....	62
II.7 La polyarthrite rhumatoïde	65
II.7 Les maladies neurologiques	66
II.8 Le diabète de type 1	69

III. Outils de mesure des interférons	72
III.1 Les tests fonctionnels	72
III.2 La signature moléculaire.....	72
III.3 Le SIMOA	74
IV. Les traitements anti-interférons	76
IV.1 Les immunomodulateurs classiques	76
IV.2 Les anticorps monoclonaux.....	77
Les anticorps anti-IFN α	77
L'anticorps anti-IFNAR.....	79
Les anticorps anti-cellules dendritiques plasmacytoïdes	80
Les anticorps anti-IFN γ	81
IV.3 Le vaccin thérapeutique	83
IV.4 Les inhibiteurs de Janus Kinase	86
IV.5 Les autres traitements.....	90
Objectifs et problématiques de la thèse	92
I. Réflexion autour du positionnement du modèle MRL/lpr comme modèle murin de syndrome de Sjögren systémique.....	95
II. Evaluation d'une stratégie de vaccination thérapeutique anti-interféron alpha appliquée à des modèles murins de syndrome de Sjögren.....	98
III. Exploration du rôle des immunoglobulines E auto-réactives et impact sur la voie des interférons dans le syndrome de Sjögren chez l'Homme.....	125
IV. Utilisation d'un inhibiteur de JAK1/2 dans un cas de syndrome de Sjögren systémique chez l'Homme	158
Discussion générale	169
Bibliographie.....	178
Annexes	210

Abréviations

AECG : American European Consensus Group

AGS : syndrome d'Aicardi-Goutières

AP-1 : Activator protein 1

AMM : Autorisation de mise sur le marché

BAFF : B-cell activating factor

CANDLE : Chronic atypical neutrophilic dermatosis with lipodystrophy and elevated temperature

CARD1 : Caspase activation and recruitment domain 1

CCL : Chemokine ligand

CrkL : CRK Like Proto-Oncogene

cGAS : cGAMP synthetase

cGMP-AMP : guanosine-monophosphate-adénosine-monophosphate cyclique

Îlots CpG : Îlots non méthylés cytidine-phosphate-guanosine

CXCL : (C-X-C motif) ligand

DM : Dermatomyosite

DMARDs : Disease-modifying antirheumatic drugs

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

ELISPOT : Enzyme-linked immunospot

EMCV : virus de l'encéphalomyocardite

ERK : Extracellular signal-regulated kinase

ESSDAI : EULAR Sjögren Syndrome Disease Activity Index

GAS : Gamma-activated sequence

GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony stimulating factor

HSV : Herpes simplex virus

HCQ : Hydroxychloroquine

IFI : Interferon-inducible protein

IFIH : Interferon Induced With Helicase C Domain 1

IFIT : Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats

IFITM : Interferon Induced Transmembrane Protein

IFN : Interféron

IFNAR : Récepteur aux IFNs de type 1

IFN-K : Interféron kinoïde

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

IL-14Tg : modèle murin transgénique pour l'IL14 α humaine

IRAK4 : Interleukin-1 receptor associated kinase 4

IRF : Interferon regulatory factor

ISG : Interferon-stimulated gene

ISGF3 : Interferon-stimulated gene factor 3

ISRE : Interferon-stimulated response element

JAK : Janus Kinase

JAKi : Inhibiteur de JAK

KLH : Keyhole Limpet Hemocyanin

K.O : Knock Out

LES : Lupus érythémateux systémique

LINE : long interspersed nuclear elements

LLDAS : Low Disease Activity State

LPS : Lipopolysaccharide

MAPK : mitogen activated protein kinase

MAVS : Mitochondrial antiviral signaling protein

MDA5 : Melanoma differentiation-associated gene 5

MRL/lpr : modèle MRL/MpJ-Fas^{lpr/lpr}

MTX : Methotrexate

MuSSDAI : Murine Sjögren syndrome disease activity index

MyD88 : Myeloid differentiation primary response 88

NOD : modèle murin de diabète Nonobese diabetic

NFAT : Nuclear factor of activated T-cells

NFκB : Nuclear factor kappa b

NZB/W : modèle murin de lupus New Zealand Black and White mice

OAS : 2'-5'-Oligoadenylate Synthetase

PAMP : Pathogen-associated molecular pattern

PBS : Phosphate buffered saline

pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde

PI3K : phosphatidyl-inositol 3 kinase

PM : Polymyosite

Pyk2 : Proline-rich tyrosine kinase 2

PR : Polyarthrite rhumatoïde

PKC : Protéine kinase C

PRR : Pattern recognition receptor

RIG-1 : Retinoic acid-Inducible gene-1

RLR : RIG-1-like receptor

SAPL : Syndrome des anticorps anti-phospholipides

SAVI : STING-associated vasculopathy with onset in infancy

SEP : Sclérose en plaques

SINE : Short interspersed nuclear elements

siRNA : Petit ARN interférent

SjS : Syndrome de Sjögren

SLEDAI : Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

SLZ : Salazopyrine

SOCS : Suppressor of cytokine signalling

SRI : Systemic lupus erythematosus responder index

STAT : Signal transducer and activator of transcription

STING : Stimulator of interferon genes

TCR : T-cell receptor

TGF : Transforming growth factor

TIR : Toll-interleukin 1 receptor

TLR : Toll-like receptor

TNF α : Tumor necrosis factor α

TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

TYK2 : Tyrosine kinase 2

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VEGF : Vascular endothelial growth factor

ZEB1 : Zinc finger E-box-binding homeobox 1(ZEB1)

Introduction

I. Généralités sur les interférons

C'est en 1957 que l'interféron (IFN) a été mis en évidence par Issacs et Lindenmann (1). C'est en étudiant un phénomène jusque-là appelé « interférence virale », défini comme la restriction de la multiplication d'un virus dans une cellule ayant été antérieurement ou simultanément en contact avec un autre virus, qu'ils mirent en évidence la molécule à l'origine dudit phénomène : un facteur synthétisé et sécrété par la cellule et capable d'induire dans des cellules cibles un état de résistance à l'infection par un virus. Ce facteur fut assez logiquement appelé interféron.

Depuis cette observation princeps, il est maintenant connu qu'il n'existe pas un, mais de nombreux interférons, divisés en trois types principaux, que leurs structures biochimiques sont plus ou moins proches, que les voies par lesquelles ils transmettent le signal sont complexes, et que leurs propriétés biologiques, variables selon les situations, vont bien au-delà de la simple « interférence virale ». En effet, on sait maintenant que les IFNs ont par exemple un effet d'inhibition sur la croissance cellulaire, influent sur la différenciation cellulaire, ont des effets immunomodulateurs pléiotropes (à l'interface entre l'immunité innée et adaptative) impactent la production hormonale (2)... On sait par ailleurs, depuis quelques années maintenant, que les IFNs sont impliqués, de manière plus ou moins bien définie, dans la physiopathologie de nombreuses pathologies humaines, en particulier celle des maladies auto-immunes (3,4).

Les 3 types d'IFNs sont antigéniquement distincts (c'est-à-dire qu'un sérum monospécifique dirigé contre un type d'IFN ne neutralise pas l'activité biologique des autres), et ils diffèrent aussi par leurs propriétés biochimiques, leurs inducteurs et mécanismes d'induction, leurs cellules d'origine, ainsi que par le nombre de sous-espèces moléculaires présentes dans chaque classe.

A noter, par ailleurs, que les IFNs de type 1 et 2, ont été les premières cytokines à avoir été décrites, et ont donc servi de base à la compréhension du fonctionnement des cytokines en général, mais les IFNs de type 1 (α et β) et de type 2 ont aussi été les premières cytokines à avoir été utilisées en thérapeutique humaine (5,6).

I.1 Les interférons de type 1

Les IFNs de type 1 sont eux-mêmes divisés en différents sous-types : les IFNs α et β (les plus fréquents, dont la production et l'action se fait à l'échelle de l'organisme, dans tous les types cellulaires), mais aussi l'IFN ϵ , l'IFN κ et l'IFN ω , chez l'Homme. Il s'agit de protéines, habituellement non glycosylées, de 165 à 200 acides aminés, dont l'ensemble des gènes est situé sur le chromosome 9 chez l'Homme et sur le chromosome 4 chez la souris. La quasi-totalité des cellules est capable de produire des IFNs de type 1, avec toutefois certaines variations selon le

type d'IFN considéré. La cellule dendritique plasmacytoïde (pDC), est remarquable à ce niveau, puisqu'elle est capable de synthétiser 1000 à 10 000x plus d'IFNs de type 1 que les autres cellules (7).

Tous les IFNs de type 1 partagent de nombreuses caractéristiques communes, à commencer par leurs séquences (2,8), avec des homologies allant de 35 à 95% (entre 77 et 95% pour les sous types d'IFN α). Ils ont par ailleurs des effets biologiques communs (globalement pro-inflammatoires, antiviraux, mais aussi antiprolifératifs et pro-apoptotiques), des mécanismes inducteurs (à l'origine de leurs sécrétions) communs, ainsi qu'un récepteur commun et une voie de signalisation commune (2).

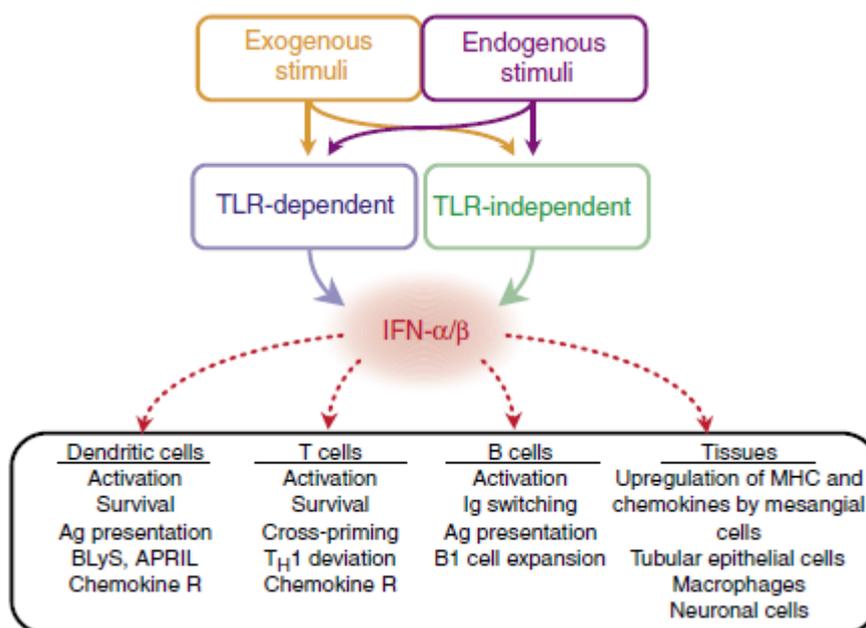


Figure 1. Schéma général de la voie des IFNs de type 1 et impact sur les cellules cibles, d'après Baccala *et al* (9).

En dehors du rôle pro-inflammatoire et antiviral majeur, attribué de longue date aux IFNs de type 1, leurs sont associées des propriétés immunosuppressives et régulatrices. Au premier rang desquelles, on retrouve le rôle antiprolifératif des IFNs de type 1, décrit depuis longtemps, et dont l'efficacité dépend de l'affinité entre l'IFN de type 1 considéré et son récepteur (10). En plus de cet effet antiprolifératif, qui peut agir sur les cellules de l'immunité innée, en fonction de la durée de la réponse IFN de type 1, un effet initialement stimulant, pro-inflammatoire, peut devenir suppresseur (notamment sur les cellules dendritiques et les macrophages) quand la réponse dure, et, a fortiori, lorsqu'elle se chronicise (11). Par exemple, la réponse IFN de type 1 a, lors de la phase précoce de la réponse antivirale, un effet stimulant sur la sécrétion d'IFN γ , pour finir par l'inhiber aux phases plus tardives de la réponse (12–14). Ainsi, les IFNs de type 1 peuvent avoir des effets sur le système immunitaires radicalement opposés en apparence, qui composent en fait les différentes étapes d'une réponse antivirale. Lors d'une infection classique, les effets pro-inflammatoires et antiviraux de la phase aiguë, vont laisser la place à des effets immunosuppresseurs lors des phases plus tardives, pour limiter les dommages collatéraux, mais lorsque la

réponse IFN de type 1 se chronicise (dans le cadre de viroses chroniques ou des maladies auto-immunes IFN-dépendantes par exemple), les mêmes effets immunosuppresseurs vont devenir délétères (11).

Table 1 : Effets immunologiques des IFNs de type 1 sur l'immunité innée, d'après Lee *et al* (11)

Type de cellule concernée	Effets pro-inflammatoires	Effets immunosuppresseurs
Cellules présentatrices d'antigènes	<ul style="list-style-type: none"> -Augmente de la synthèse et de l'expression membranaire de CD40, CD80, CD86 et des molécules de CMH II -Soutien le traitement des antigènes pour la présentation -Permet la différenciation des pDC and cellule dendritique myéloïde 	<ul style="list-style-type: none"> -Réduit la différenciation et la prolifération des cellules dendritiques conventionnelles en cas de chronicisation -Inhibe l'expression de CD11c, CD80, CD86 et des molécules de CMH II en cas de stimulation pendant le processus de différenciation -Augmente l'expression d'IL10 et de PD-L1 en cas de chronicisation
Monocytes M1	<ul style="list-style-type: none"> -Induit la synthèse de CCL2 pour le recrutement des monocytes -Favorise la différenciation en monocytes inflammatoires 	<ul style="list-style-type: none"> -Réduit l'expression du récepteur de l'IFNγ et de la nitric oxide synthétase 2 (NOS2)
Macrophages		<ul style="list-style-type: none"> -Réduit l'expression du récepteur de l'IFNγ -Augmente la synthèse d'IL10 et de PD-L1
Polynucléaires neutrophiles		<ul style="list-style-type: none"> -Supprime la production de CXCL1 et CXCL2
Lymphocytes NK	<ul style="list-style-type: none"> -Induit la synthèse de CCL3, CCL4, CCL5 pour le recrutement des lymphocytes NK -Intervient dans la cytotoxicité STAT1-dépendante -Intervient dans la production d'IFNγ 	<ul style="list-style-type: none"> -Réduit la synthèse d'IFNγ après une phase d'activation, en cas de chronicisation ou d'augmentation anormale de la quantité d'IFN de type 1
Cellules lymphoïdes innées du groupe 2		<ul style="list-style-type: none"> -Réduit leur prolifération -Réduit l'expression d'IL-5, IL-6 et IL-13

Leur existence est très largement conservée au sein du groupe des vertébrés, avec parfois des molécules particulièrement proches (par exemple, l'IFN ϵ humain et murin partagent 59% d'homologie de séquence (15), ce qui est plus que ce que partage l'IFN ϵ humain avec tous les autres type d'IFNs humain) mais aussi de nombreuses variations, aussi bien en termes de nombre de gènes et de pseudogènes, que de types d'IFNs ou de spécificités biologiques (à noter d'ailleurs qu'il n'y a pas de correspondance directe entre les molécules présentes dans les différences espèces, alors que parfois leurs noms peuvent être semblables).

Les inducteurs

La sécrétion d'IFNs de type 1 se fait essentiellement suite à la reconnaissance de signaux associés aux pathogènes, dits *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), par des récepteurs de l'immunité innée, les PRRs pour *pattern-recognition receptors*.

Dans le cas des IFNs de type 1, les PRR impliqués reconnaissent essentiellement des signaux associés aux infections virales, et sont de deux grands types, identifiés en fonction de leurs localisation : les récepteurs endosomaux, et les récepteurs cytosoliques.

A noter que le *Toll-Like Receptor* (TLR) 4, responsable de la reconnaissance du lipopolysaccharide (LPS) des bactéries gram-négative, est une exception, puisqu'il s'agit du seul TLR membranaire capable d'induire la synthèse d'IFNs de type 1, via *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF) et *Interferon Regulatory Factor 3* (IRF3) (16).

Nous allons par ailleurs détailler ici les principaux récepteurs impliqués, ainsi que leurs ligands « naturels » exogènes, mais ce ne sont pas les seuls ligands reconnus. Tous ces récepteurs peuvent reconnaître des ligands endogènes, comme les acides nucléiques contenus dans certains complexes immuns auto-anticorps/auto-antigènes, parfois à l'intérieur de complexes ribonucléoprotéiques, mais d'autres molécules peuvent aussi être reconnues, comme des produits de dégradation de la matrice extracellulaire ou des éléments issus des cellules endommagées (3,9,17–20). Le fait que des ligands endogènes puissent être reconnus est un élément majeur dans la physiopathologie des maladies auto-immunes IFN-dépendantes, et sera traité dans le chapitre correspondant.

Les récepteurs endosomaux correspondent essentiellement aux TLRs 3, 7, 8, et 9 (16), qui ont pour fonction la reconnaissance des acides nucléiques présents dans le compartiment endosomal, compartiment qui constitue la principale porte d'entrée dans la cellule pour de nombreux virus.

TLR3 est capable de reconnaître les ARNs double-brin, qui ne sont théoriquement pas produit par les cellules des vertébrés, mais essentiellement par certains virus à ARN dont la répllication passe par une étape avec de l'ARN double-brin (par exemple le virus respiratoire syncytial, le virus de l'encephalomyocardite [EMCV] ou le virus West Nile). TLR3 est aussi capable de reconnaître certains petits ARNs interférents (siRNA) et est la cible de l'analogue de synthèse d'ARN double-brin poly(I:C). Chez l'Homme l'absence de TLR3 entraîne une susceptibilité

aux encéphalites à *Herpes Simplex Virus 1* (HSV-1)(21), tandis que les souris TLR3-KO ne sont pas capables de résister à une infection par le cytomégalo virus murin (22). Pour aboutir à la production d'IFNs de type 1 (en particulier de l'IFN β), dans les phagocytes et les cellules dendritiques, TLR3 recrute l'adaptateur *Toll-Interleukin 1 Receptor (TIR)-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF), qui va lui-même recruter différents intermédiaires jusqu'à aboutir à la phosphorylation du facteur de transcription *Interferon Regulatory Factor 3* (IRF3), qui va pouvoir migrer vers le noyau (16).

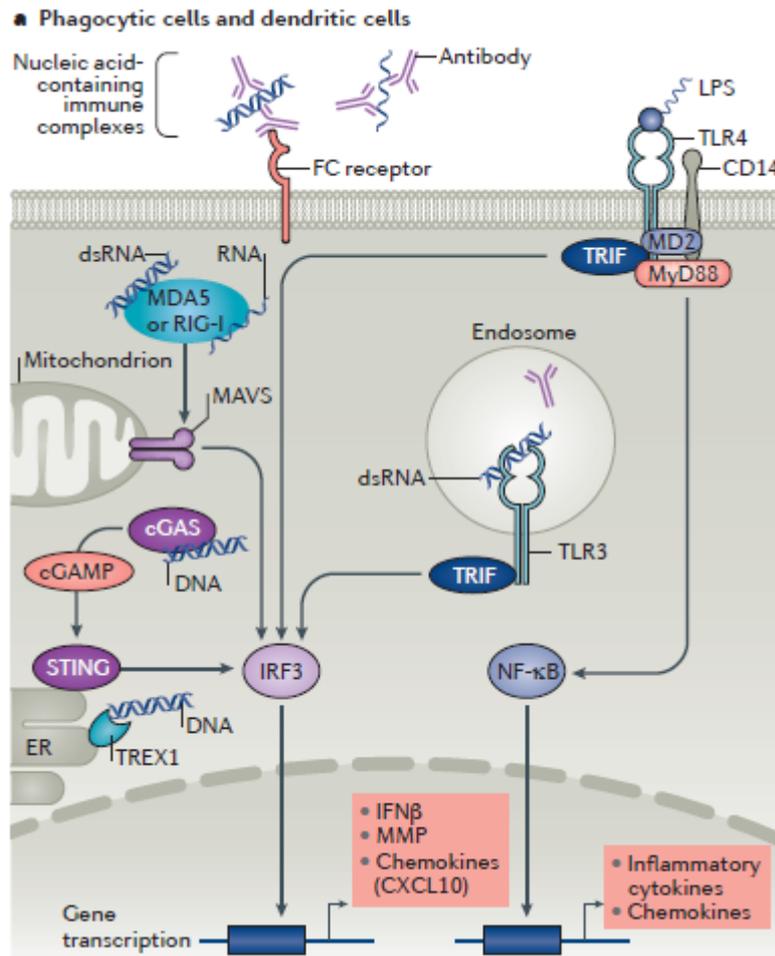


Figure 2. Principaux mécanismes aboutissant à la production d'IFNs de type 1 au sein des cellules dendritiques et phagocytaires, d'après Muskardin *et al* (3)

TLR7 et TLR8 sont très proches, et reconnaissent les ARNs simple-brin des virus à ARN comme le VIH, le virus de la grippe influenza A ou le virus de la stomatite vésiculaire (16). TLR7 est aussi capable de reconnaître certains siRNA, l'ARN de certaines bactéries (comme le *Streptococcus* B) et est la cible des dérivés de l'imidazoquinoléine (comme l'imiquimod ou le resiquimod). TLR7 est particulièrement présent dans les endosomes des pDCs, mais aussi chez les cellules dendritiques conventionnelles. TLR8 est présent dans de les endosomes de nombreux types cellulaires, mais en particulier chez les monocytes. Pour TLR7 et TLR8, dans les pDC, l'induction de la production d'IFNs de type 1 passe par un autre adaptateur, *Myeloid differentiation primary response 88* (MyD88), et au final,

la phosphorylation de l'Interferon Regulatory Factor 7 (IRF7) et/ou de l'Interferon Regulatory Factor 5 (IRF5), qui vont aussi pouvoir migrer dans le noyau pour activer la transcription des gènes des IFNs α (surtout) et β (moins), mais pas uniquement.

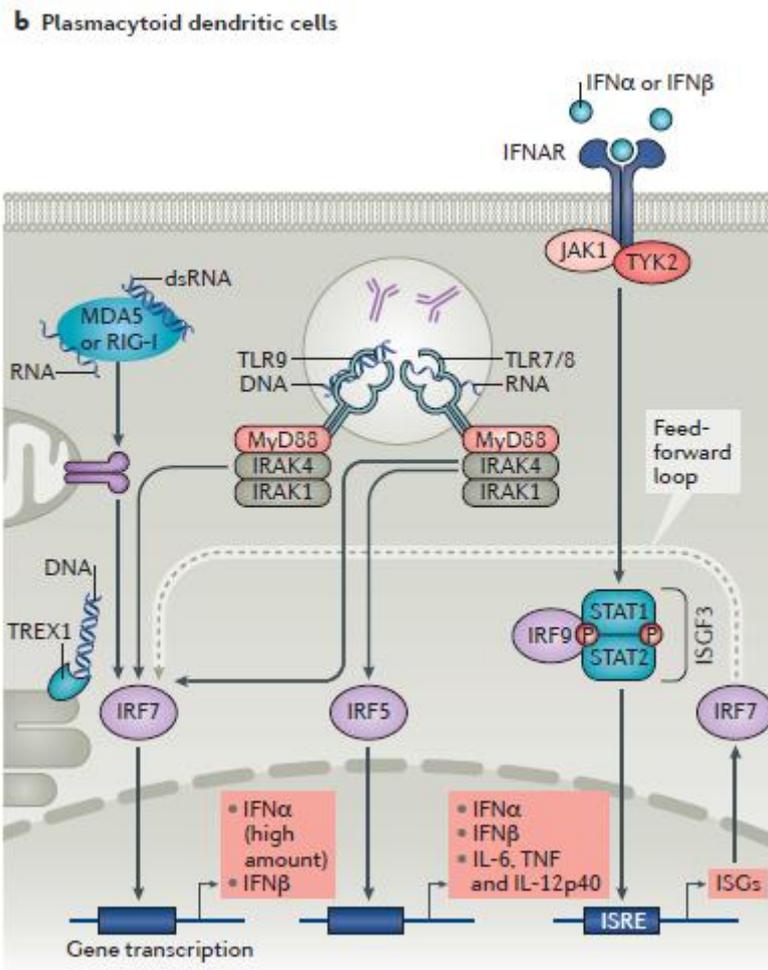
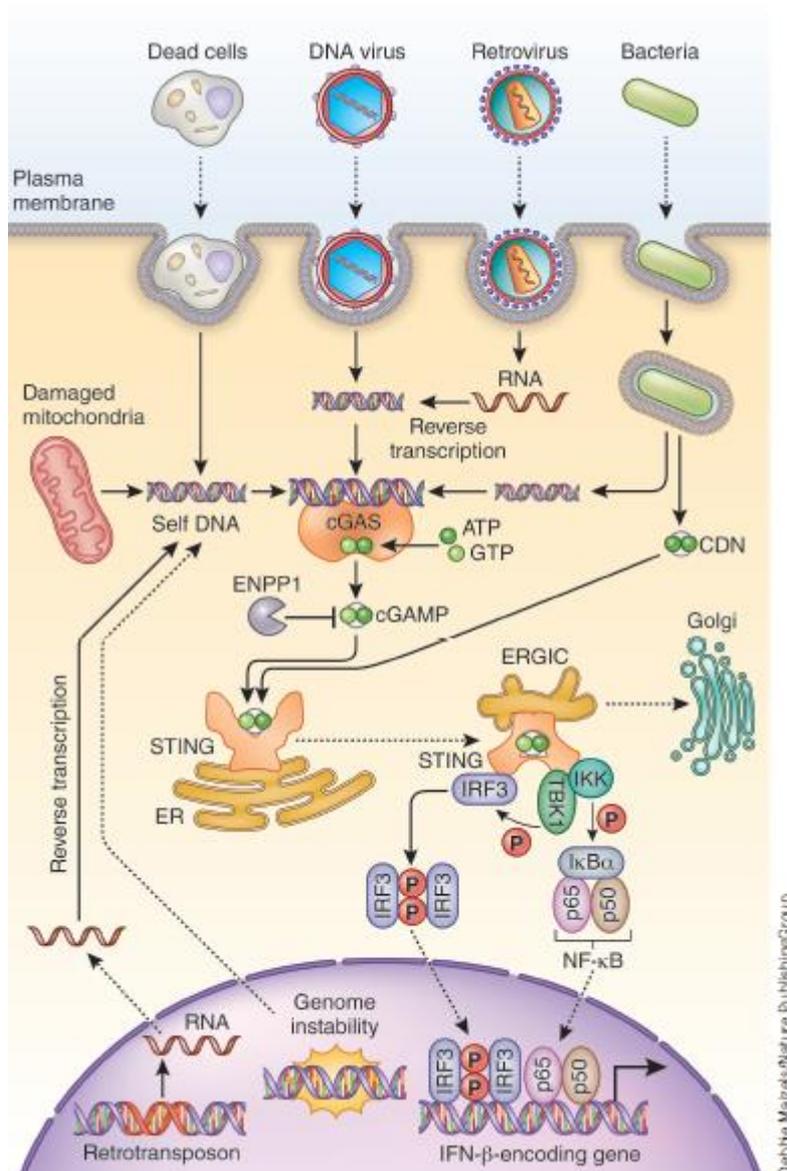


Figure 3. Principaux mécanismes aboutissant à la production d'IFNs de type 1 au sein des cellules dendritiques plasmacytoïdes, d'après Muskardin *et al* (3)

Enfin, TLR9 peut reconnaître l'ADN, en particulier les îlots non méthylés cytidine-phosphate-guanosine (CpG), motifs fréquents chez les bactéries et les virus à ADN (cytomégalovirus murin, HSV-1 et 2), mais plutôt rares chez les mammifères. TLR9 est particulièrement présent dans les endosomes des pDCs, mais aussi chez les cellules dendritiques conventionnelles, les macrophages ou les lymphocytes B par exemple. De manière anecdotique, mais symptomatique du fait que les TLRs ont probablement encore de nombreuses fonctions à découvrir, il existe des données indiquant que TLR9 est capable de reconnaître un produit résultat de la dégradation de l'hémoglobine par le parasite responsable du paludisme, *Plasmodium falciparum* (23). Pour TLR9, dans les pDC, c'est aussi MyD88 qui est recruté et IRF7 qui migrera vers le noyau, une fois phosphorylé (3)

L'autre catégorie de PRRs impliqués dans la synthèse d'IFNs de type 1, est la catégorie des récepteurs cytosoliques. Parmi ces récepteurs, ce sont surtout les *RIG-1-like Receptors* (RLRs), c'est-à-dire *retinoic acid-Inducible gene-1* (RIG-1) et *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5), qui reconnaissent les ARNs au niveau du cytosol des cellules, qui sont à l'origine de la synthèse d'IFNs de type 1 (9,16). Un autre récepteur de la famille des RLRs, appelé *laboratory of genetics and physiology 2* ou RLR-3, semble lui avoir rôle ambivalent vis-à-vis de la sécrétion d'IFNs de type 1 (24). Il a été initialement décrit comme servant au rétrocontrôle négatif de la signalisation par les RLRs, car il a une affinité pour les ARNs plus importante que RIG-1 et MDA5, mais n'a pas de domaine *caspase activation and recruitment domain 1* (CARD1), nécessaire pour induire la cascade de signalisation et la synthèse d'IFNs de type 1. Mais il existe aussi des données récentes pour penser que LGP2 pourrait être important dans la synthèse d'IFN β via un mécanisme différent, qu'il agit en synergie avec MDA5 dans la lutte contre certains virus, et qu'il pourrait reconnaître des ADN (24). Pour aboutir à la production d'IFNs de type 1, RIG-1 et MDA5 passent par la liaison à une protéine adaptatrice appelée *mitochondrial antiviral signaling protein* (MAVS) et située sur la membrane mitochondriale, entraînant, au final, comme pour les TLRs, la phosphorylation de facteurs de transcription qui pourront ainsi entrer dans le noyau. Il s'agit d'IRF3 dans les phagocytes et les cellules dendritiques conventionnelles, et d'IRF7 dans les pDC (3).

Au niveau cytosolique, il existe aussi un récepteur capable de reconnaître des ADN, dont l'existence était suspectée depuis longtemps, mais qui n'a été identifié qu'en 2013 (25). Ce récepteur cytosolique est appelé *cGAMP synthetase* (cGAS), du fait de sa capacité à synthétiser, après liaison à l'ADN cytosolique, un dinucléotide cyclique, la guanosine-monophosphate-adénosine-monophosphate cyclique (cGMP-AMP). La cGMP-AMP est ensuite capable d'activer la synthèse d'IFNs de type 1, en particulier d'IFN β , par une voie IRF3-dépendante en passant par une protéine située sur le réticulum endoplasmique, *stimulator of interferon genes protein* (STING) (25,26). D'autres récepteurs cytosoliques à ADN ont été décrits, mais cGAS est le seul dont le rôle est clairement établi et dont l'activité n'est pas redondante (26,27). Le facteur de transcription utilisé par cette voie est l'IRF3.



Debbie Maizels/Nature PublishingGroup

Figure 4. Stimuli, intermédiaires moléculaires et mécanismes d'action de la principale voie de reconnaissance des ADNs cytoplasmiques, cGAS-STING, d'après Chen *et al* (26)

Enfin, il faut noter que d'autres voies de signalisation cellulaire peuvent activer la synthèse d'IFNs de type 1. Par exemple dans les macrophages et les cellules endothéliales, le *Tumor Necrosis Factor α* (TNFα) peut entraîner, par une voie dépendante de l'*Interferon Regulatory Factor 1* (IRF1), la production d'IFNβ, qui va agir en synergie avec le TNFα pour activer les macrophages et favoriser le recrutement de monocytes par les cellules endothéliales (28). Mais ce n'est pas la seule interaction entre les IFNs de type 1 et le TNFα, puisque d'autres interactions synergiques ont déjà été décrits entre les deux voies de signalisation, impliquant par exemple l'IRF9 (29), mais aussi des modifications épigénétiques sur la chromatine, rendant certains gènes plus ou moins accessibles aux facteurs de transcriptions (30). Mais il ne s'agit là que d'un aperçu de la complexité des interactions modulant la réponse IFN.

c Endothelial cells and macrophages

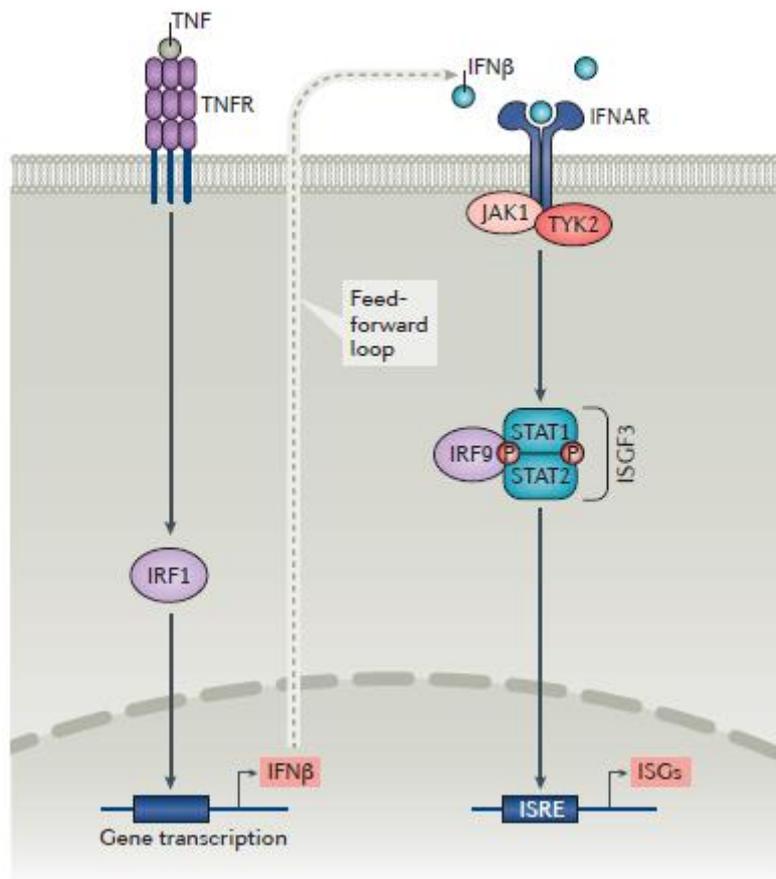


Figure 5. Exemple d'interaction entre la voie du TNF α et celle des IFNs de type 1 au sein des cellules endothéliales et des macrophages, d'après Muskardin *et al* (3)

Un récepteur et une voie de signalisation en commun

Tous les IFNs de type 1 (que nous détaillerons après) utilisent le même récepteur, appelé *IFN α Receptor* (IFNAR), pour la transmission du signal. Ce récepteur transmembranaire est un hétérodimère, composé d'une sous-unité IFNAR1 et une sous-unité IFNAR2.

La liaison des IFNs de type 1 sur l'IFNAR, entraîne une cascade, qualifiée de « voie canonique » décrite il y a plus de 30 ans maintenant, qui implique, en premier lieu, l'activation de deux tyrosines kinases, Janus Kinase 1 (JAK1) et tyrosine kinase 2 (TYK2). Ces kinases vont à leur tour activer, en les phosphorylant, des facteurs de transcription présents à l'état inactivé dans le cytosol. Ces facteurs sont de la famille *des signal transducer and activator of transcription* (STAT) 1 et 2. Une fois phosphorylés, STAT1 et STAT2, vont former un hétérodimère capable de migrer dans le noyau des cellules, qui va s'associer à l'Interferon Regulatory Factor 9 (IRF9) pour constituer le complexe *IFN-stimulated gene factor 3* (ISGF3). Le complexe ISGF3 agit ensuite comme un facteur de transcription en se liant au génome, au niveau de motifs (dont la séquence consensuelle est TTTCNNTTTC) appelés *IFN-stimulated responsive elements* (ISREs). La liaison du complexe ISGF3 aux ISREs abouti à la

transcription des *IFN-stimulated genes* (ISGs), ce qui représente plusieurs centaines de gènes, impliqués dans la réponse antivirale (par des mécanismes très divers, directs ou indirects, touchant toutes les étapes du cycle viral) pour beaucoup, mais dont l'action va aussi bien au-delà, en particulier en ce qui concerne l'activation du système immunitaire (cellules dendritiques, lymphocytes NK, lymphocytes T, lymphocytes B...), ou l'induction d'effets pro-apoptotiques et antiprolifératifs.

La voie canonique des IFNs de type 1 est particulière de par la formation de l'hétérodimère STAT1/STAT2, puis du complexe ISGF3, capable de se lier aux motifs ISREs propre aux ISGs. De nombreuses autres cytokines, comme l'IFN de type 2, l'IFN γ , entraînent la formation d'homodimères de STATs qui vont reconnaître d'autres motifs, en particulier des motifs appelés *gamma-activated sequences* (GAS) (dont la séquence consensuelle est TTCNNGAA).

Concernant les voies alternatives, elles vont dépendre du type cellulaire, et on note principalement celle qui implique la reconnaissance de motifs GAS par un homodimère phosphorylé de STAT1. Cette voie est commune avec les IFNs de type 2. Par ailleurs, d'autres homo ou hétérodimères de STATs (STAT3 à 6) peuvent être activés par les IFNs de type 1 et jouer ensuite leurs rôles de facteurs de transcription dans le noyau des cellules concernées (31). Il est important de savoir que les motifs ISRE et GAS peuvent coexister au sein des promoteurs des ISGs, ce qui implique que la transcription de ces gènes n'est pas spécifique de la voie des IFNs de type 1, mais peut aussi se faire suite à l'action d'IFN de type 2 ou d'une autre cytokine.

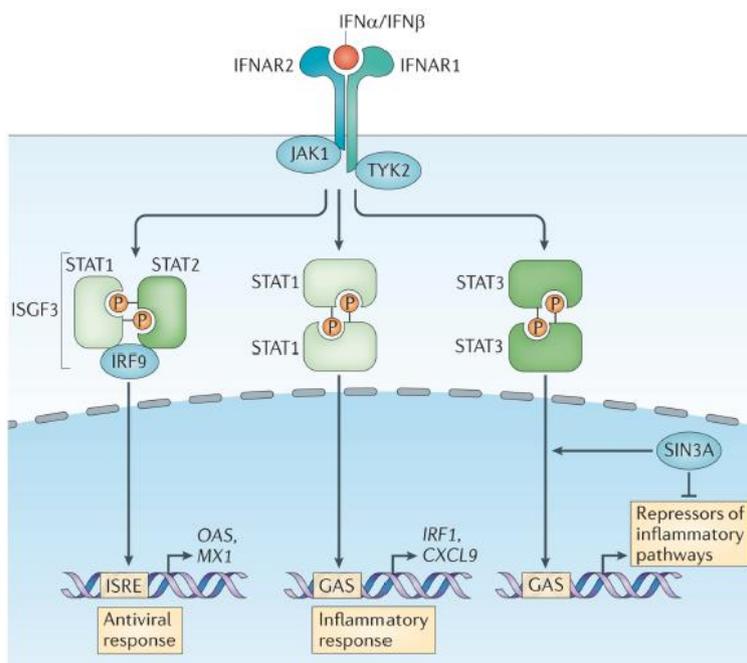


Figure 6. Principales voies de signalisation intracellulaire mises en œuvre après reconnaissance des IFNs de type 1 par leur récepteur commun, d'après Ivashkiv & Donlin (32)

D'autres voies de signalisation, indépendantes des STAT, peuvent aussi être activées par les IFNs de type 1 : la voie des *mitogen activated protein kinase* (MAPK), du *phosphatidyl-inositol 3 kinase* (PI3K), des *v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like* (CRKL) ou encore celle des différents isoformes de la protéine kinase C (PKC) (31,33).

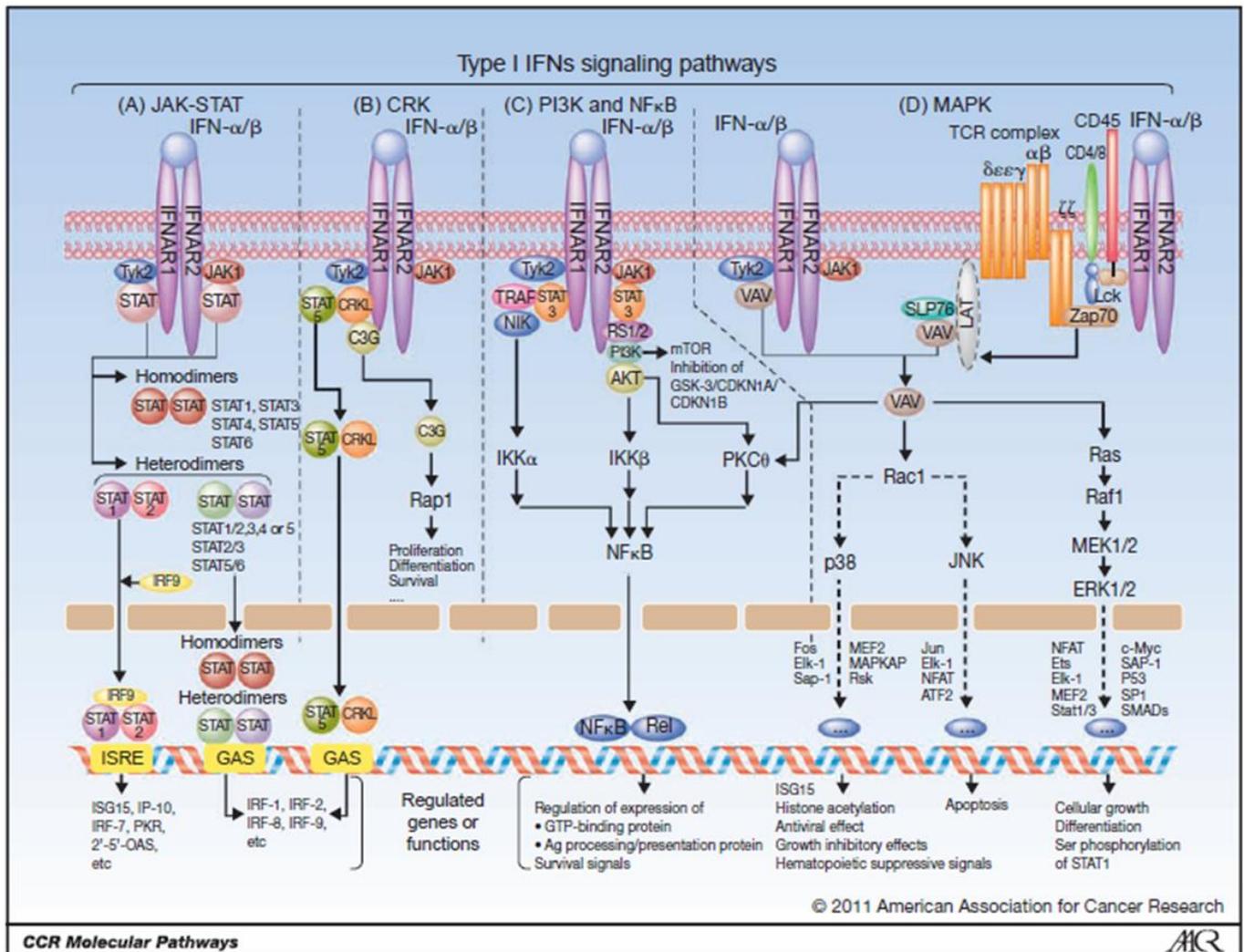


Figure 7. Exemples des nombreuses voies de signalisation intracellulaire pouvant être induites par les IFNs de type 1, en fonction du contexte et de la machinerie cellulaire à disposition, d'après Ivashkiv & Donlin (33)

L'interféron alpha

L'IFN α ou plutôt les IFNs α , puisqu'il en existe de nombreux sous-types, sont les principaux représentant de la famille des interférons de type 1 (d'ailleurs, dans la littérature, on utilise souvent, le terme IFN de type 1 alors que les études ne s'intéressent souvent qu'à l'IFN α). Chez l'Homme, il existe 12 sous-types distincts d'IFNs α (34), produits par 14 gènes différents, tous situés sur le bras court du chromosome 9, avec pour chacun au moins 2 variants alléliques déjà décrits (voir Table 1). La protéine mature d'IFN α fait 166 acides aminés (la seule exception

est l'IFN α 2, l'acide aspartique présent en position 44 chez tous les autres sous-types d'IFN α) et n'est pas glycosylée.

La structure des IFNs α (35,36) est organisée sous la forme de 5 hélices α , nommées de A à E, avec deux ponts disulfures, le 1^{er} (commun à tous les IFNs de type 1) situé entre l'hélice E et la boucle AB (cystéines 29 et 138), et l'autre, propres aux IFNs α , situé entre l'extrémité N-terminale de la protéine et l'hélice C (cystéines 1 et 98).

A noter que les différences entre les sous-types et les variants sont parfois mineures en termes de séquence, variant d'un ou deux acides aminés, mais leurs profils d'action sont uniques (2), avec plus ou moins d'activité antivirale (pouvant tout de même varier d'un facteur 1 à 50), d'impact sur la production cytokinique (là aussi, l'impact sur les lymphocytes NK semble pouvoir varier entre les sous-types d'IFNs α , mais d'un facteur 1 à 10 000), d'impact sur les cellules dendritiques (37) ou d'effet antiprolifératif. En effet, concernant l'effet antiprolifératif, il semblerait qu'il dépende en grande partie de l'affinité du sous-type d'IFN α (qui peut varier aussi, même pour un sous-type d'IFN α donné, en fonction des différents polymorphismes) pour son récepteur, l'IFNAR, nécessitant une interaction forte, alors que l'effet antiviral est moins affecté par ce paramètre (10), et une affinité « intermédiaire » pour l'IFNAR peut suffire à induire une réponse antivirale optimale. Pour expliquer les différents profils d'activation propre à chaque type d'IFN de type 1, alors que le récepteur est le même, il existe de nombreux paramètres qui entrent en ligne de compte, comme l'affinité pour le récepteur, comme nous venons le voir, mais en fait, de manière plus précise, c'est l'affinité pour chacune des chaînes (IFNAR1 et IFNAR2) qui le composent, qui compte, mais par exemple, la durée de la liaison (dépendant des constantes d'association et de dissociation) aussi est importante, ou encore le niveau d'expression de l'IFNAR et les types cellulaires en présence...(38)

La différence entre le nombre de sous-types d'IFN α et le nombre de gènes responsables de leur production s'explique par le fait que la protéine produite par les gènes IFNA1 et IFNA13 est la même, et que IFNAP22 est un pseudogène.

Table 2 : Gènes codant pour les IFNs α humains et protéines produites, d'après Pestka *et al* (2)

Gènes	Protéines et variants
IFNA1	IFN- α D, IFN- α 1
IFNA2	IFN- α A (IFN- α 2a), IFN- α 2 (IFN- α 2b), IFN- α 2c
IFNA4	IFN- α 4a (IFN- α 76), IFN- α 4b
IFNA5	IFN- α G, IFN- α 5, IFN- α 61
IFNA6	IFN- α K, IFN- α 6, IFN- α 54
IFNA7	IFN- α J, IFN- α J1, IFN- α 7
IFNA8	IFN- α B2, IFN- α B, IFN- α 8
IFNA10	IFN- α C, ψ IFN- α 10, ψ IFN- α L, IFN- α 6L
IFNA13	IFN- α 13 (identique à IFN- α 1)
IFNA14	IFN- α H, IFN- α H1, IFN- α 14
IFNA16	IFN- α WA, IFN- α 16, IFN- α O
IFNA17	IFN- α I, IFN- α 17, IFN- α 88
IFNA21	IFN- α F, IFN- α 21
IFNAP22	YIFN- α E

Les noms entre parenthèses sont d'autres dénominations de la même protéine

A noter que chez la souris, il existe 14 gènes sur le chromosome 4, codant pour autant de sous-types distincts d'IFNs α , ainsi que 3 pseudogènes, tous localisés sur le chromosome 4 (39). Evidemment, il existe différents allèles, plus ou moins éloignés, en fonction de la souche de souris considérée.

Table 3 : Gènes codant pour les IFNs α murins et protéines produites, d'après van Pesch *et al* (39)

Gènes	Protéines et variants
IFN- α 1	IFN- α 1, IFN- α 1(129/Sv)
IFN- α 2	IFN- α 2
IFN- α 4	IFN- α 4
IFN- α 5	IFN- α 5
IFN- α 6T	IFN- α 6T
IFN- α 7/10	IFN- α 7/10, IFN- α 7/10(B6)
IFN- α 8/6	IFN- α 8/6, IFN- α 8/6(B6)
IFN- α 9	IFN- α 9
IFN- α 11	IFN- α 11, IFN- α 11(B6)
IFN- α 12	IFN- α 12
IFN- α 13	IFN- α 13
IFN- α 14	IFN- α 14
IFN- α A	IFN- α A (IFN- α 3)
IFN- α B	IFN- α B

Les noms entre parenthèses sont d'autres dénominations de la même protéine

Comme nous l'avons déjà évoqué plus haut, ce sont les pDC qui permettent la production de quantités majeures d'IFN α (40,41), via la reconnaissance de PAMPs par les TLR7/8 et 9, et les récepteurs cytosoliques. Les pDC expriment l'IRF7 constitutivement, et à très haut niveau, ce qui explique en partie cette capacité. Ces cellules sont aussi présentes chez la souris (42,43), ce qui a permis, depuis 2001, des avancées considérables sur la compréhension de leur rôle, qui est bien plus large, avec aussi des fonctions de présentation d'antigène, la synthèse de nombreuses autres cytokines (comme l'IL6 ou l'IL12 par exemple), et même un rôle tolérogène dans certaines situations (7). Cela dit, selon les situations (infection virale aigue ou chronique, infection localisée ou systémique, maladie auto-immune...), la production d'IFN α dépendante des pDC (qui rappelons le, représentent moins de 0,5% des cellules mononuclées du sang) peut devenir minoritaire par rapport à celles des autres cellules impliquées, notamment aux phase plus tardives d'une infection ou lorsqu'il n'y a pas d'atteinte systémique (44).

Enfin, pour mémoire, en thérapeutique humaine, c'est l'interféron α 2 qui est majoritairement utilisé, sous une forme plus ou moins pégylée pour augmenter sa durée de vie, mais avec le développement des nouveaux antiviraux, d'immunomodulateurs et d'immunothérapies dans les cancers, les indications sont aujourd'hui devenues très limitées (45).

L'interféron bêta

Comme les IFNs α , l'IFN β est produit de manière ubiquitaire, par tous les types cellulaires, mais dans des quantités proportionnellement faibles par rapport aux autres IFNs, la seule exception étant les fibroblastes dont l'IFN β constitue la majorité de la production d'IFNs de type 1 en réponse à une infection virale (2). Il semble par ailleurs être l'IFN de type 1 qui est produit en première ligne, lors d'une infection virale, au niveau de la porte d'entrée, dès 12H après le début de l'épisode, alors que les IFNs α seraient plutôt produits dans les 48H (11).

Par ailleurs, l'IFN β constitue probablement l'essentiel de la production basale (c'est-à-dire, non induite par un pathogène ou un autre élément inducteur) d'IFNs de type 1 (46). D'après les données de la littérature, notamment les expériences menées chez des souris KO (pour l'IFN β , STAT2 ou l'IFNAR), cette sécrétion basale serait importante pour l'ontogénie, avec un rôle majeur dans plusieurs types cellulaires. Par exemple, en l'absence de production basale, l'homéostasie du système hématopoïétique est perturbée (risque augmenté de pathologie maligne, susceptibilité aux infections), mais aussi celle des lignées osseuses (à l'origine d'une baisse de la densité osseuse). Cette sécrétion basale, constitutionnelle, permettrait par ailleurs de maintenir une expression suffisante de STAT1, mais aussi de STAT2, avec un ratio adéquat par rapport aux autres STATs pour avoir une synthèse précoce d'IFNs de type 1 en cas d'infection virale, avec un rôle aussi pour d'autres voies de signalisation comme celle de l'IFN de type 2 ou de l'IL6 (47). Par rapport à la plupart des IFNs α , l'IFN β a une haute affinité pour la chaîne IFNAR1 et est capable d'induire un signal, indépendamment de l'IFNAR2 et du système JAK/STAT, à l'origine d'une signature IFN particulière, incluant notamment Mmp14, Trem14 et Prok2 (48).

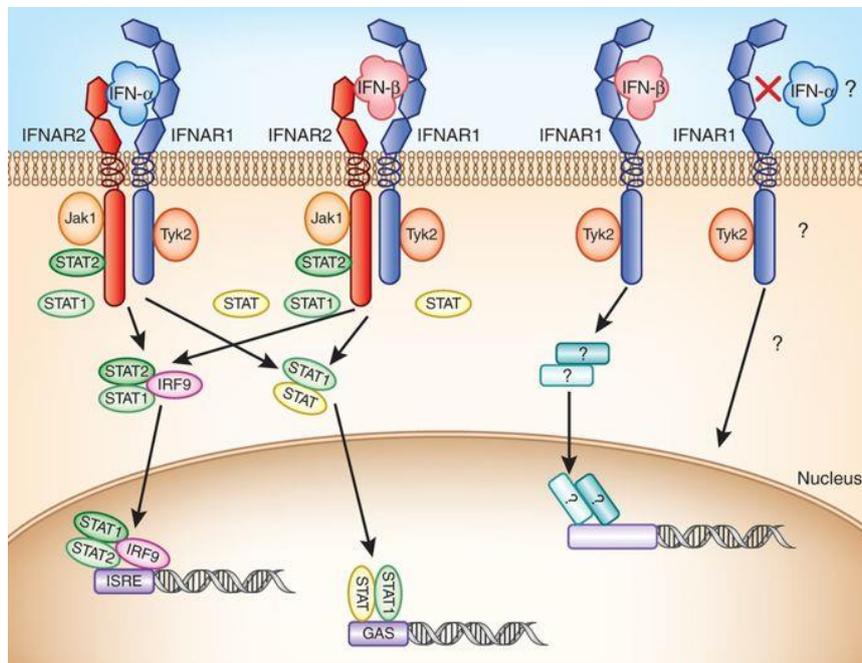


Figure 8. Voie de signalisation classique via IFNAR1 et IFNAR2, commune aux IFNs α et β , et voie de signalisation indépendante de l'IFNAR2, spécifique à l'IFN β , d'après Kaur & Plataniias (49)

Certains auteurs se sont d'ailleurs déjà intéressés aux ratios entre IFN α et IFN β pour prédire la réponse à certains traitements (50) ou à l'identification de signatures moléculaires différentes, plutôt en lien avec une activité IFN α ou IFN β selon les maladies étudiés. (51)

Enfin, il existe des données récentes particulièrement intéressantes qui rapportent que la transcription, à l'état basal, de certains ISGs, serait aussi en partie sous la dépendance de complexes de STATs non phosphorylés (52) (ne résultant donc pas de la liaison entre l'IFN α ou β et l'IFNAR), notamment des complexes STAT2/IRF9 présents au niveau du noyau (53).

L'IFN β fait 166 acides aminés, et est glycosylé. Par rapport aux IFNs α , la structure de l'IFN β (36) est aussi organisée en 5 hélices α avec un pont disulfure entre les hélices E et la boucle AB, en revanche, il n'existe pas d'autre pont disulfure car l'IFN β ne possède que trois cystéines. L'unique pont disulfure est formé par les cystéines en positions 31 et 141, en revanche la cystéine 17 est libre, ce qui peut permettre la formation d'oligomères d'IFN β (54).

Concernant la thérapeutique, l'IFN β 1 a été le premier traitement efficace dans la sclérose en plaques, mais est peu à peu abandonné maintenant que de nombreux autres traitements sont arrivés sur le marché, avec de meilleurs profils de tolérance (55).

Les autres interférons de type 1

Chez l'Homme, les autres IFNs de type 1 sont l'IFN ϵ , l'IFN κ et l'IFN ω , portant les membres de cette famille au nombre de 16 (2).

L'IFN ω a été découvert en 1985 (56), avec un gène fonctionnel chez l'Homme et 4 pseudogènes. Il est produit de manière ubiquitaire, comme les IFNs α et β , et ses effets sont proches de ces derniers (antiviral, immunomodulateur, antiprolifératif, antitumoral). A noter que la structure de l'IFN ω partage des homologies (autour de 60%) avec les IFNs α , β , κ et ϵ (15).

L'IFN ϵ et l'IFN κ sont particuliers à différents égards, d'abord parce qu'ils n'ont que 35% d'homologie entre eux et avec les autres IFNs de type 1, qu'ils présentent des variations par rapport à la structure générale en 5 hélices α des IFNs de type 1 (une séquence supplémentaire de 18 acides aminés après la 5^{ème} hélice pour l'IFN ϵ et une séquence de 13 acides aminés entre la 4^{ème} et la 5^{ème} hélice pour l'IFN κ), et parce que leurs expressions semblent limitées à la peau et aux muqueuses (15).

L'IFN κ a été décrit pour la 1^{ère} fois en 2001 (57), et est essentiellement produit par les kératinocytes de la peau et de la muqueuse génitale féminine. La production d'IFN κ , comme celle de tous les autres IFNs de type 1 en dehors de l'IFN ϵ , peut être induite par les infections virales et l'ARN double brin.

L'IFN ϵ a été identifié en 2004 (58), et est tout à fait unique au sein de la famille des IFNs, puisqu'en plus d'être restreint à une expression au sein de la muqueuse génitale féminine, sa production se fait sous la dépendance de

facteurs hormonaux (suggéré par la présence de sites de liaison pour la progestérone au sein du promoteur du gène de l'IFNε et confirmé ultérieurement) et non pas en lien avec les stimuli habituels (59).

Ces 2 IFNs sont aussi particuliers du fait de leur affinité réduite pour la chaîne IFNAR2 du récepteur commun aux IFNs de type 1 (uniquement partagée par l'IFNα1), ce qui entraîne une capacité plus faible (1000x) à induire l'expression de gènes sous la dépendance de l'*Interferon Regulatory Factor* (IRF) 9 (anciennement appelé *Interferon Stimulated Gene Factor 3* [ISGF3]) par rapport à l'IFNα2 ou l'IFNω (15). En revanche, leurs affinités pour la chaîne IFNAR1 sont identiques à celle des autres IFNs de type 1. Comme plusieurs virus (comme les poxvirus) sont capables d'échapper à l'état antiviral induit par les IFNs en produisant des protéines qui miment la chaîne IFNAR2, les auteurs s'étant intéressés aux IFNs ε et κ (mais aussi à l'IFNα1) pensent que leur persistance tient à l'avantage évolutif qu'ils ont conférés à leurs porteurs (15). L'IFNε a d'ailleurs été décrit comme pouvant limiter la réplication de certains pathogènes dont la porte d'entrée est la muqueuse génitale, comme le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) (60,61), l'*Herpes Simplex Virus 2* ou le Chlamydia (59). En revanche, d'autres pathogènes, comme les papillomavirus cancérigène (sérotypes 16, 18 et 31), ont développé d'autres mécanismes d'échappement à l'action de l'IFN κ, notamment en inhibant sa production en amont (62).

A noter que chez la souris (39), l'IFNε existe (et partage d'ailleurs 59% d'homologie avec l'IFNε humain), tout comme l'IFNκ, en revanche l'IFNω n'est présent que sous la forme d'un pseudogène (58).

I.2 Les interférons de type 2

L'interféron gamma

L'IFNγ est le seul IFN de type 2, avec un seul gène situé sur le bras long du chromosome 12 chez l'Homme et sur le chromosome 10 chez la souris. Chez l'Homme, l'IFNγ est une protéine de 144 acides aminés, sans homologie significative par rapport aux autres IFNs (2).

Contrairement aux IFNs de type 1, l'IFNγ n'est produit que par les cellules spécialisées du système immunitaire, en particulier les lymphocytes NK à la phase initiale de la réponse, puis les lymphocytes T CD4+ Th1 et CD8+ qui deviennent la principale source d'IFNγ une fois la réponse adaptative en place, mais aussi d'autres cellules comme les lymphocytes B, les lymphocytes NKT et les cellules présentatrices d'antigènes (monocytes, macrophages et cellules dendritiques) (63).

L'IFNγ a une activité antivirale moindre et en partie redondante par rapport à celle des IFNs de type 1 (64). En revanche, son rôle est important dans la lutte contre les bactéries intracellulaires, comme les mycobactéries (63,65) et il intervient aussi de manière significative dans la réponse anti-tumorale (tout comme les IFNs de type 1). En revanche, pour ne pas simplifier la compréhension du fonctionnement des IFNs, comme pour les IFNs de type 1, il existe maintenant des données prêtant à l'IFNγ des fonctions en apparence antagonistes (11,66–68) à celles qu'on lui prêtait initialement : immunorégulation et limitation de la réponse antivirale, contribution à « l'immuno-évasion » des tumeurs.... Comme pour les IFNs de type 1, ces fonctions apparemment antinomiques

ne peuvent être comprises qu'à l'échelle d'un système, en imaginant qu'*in vivo* l'IFN γ n'intervient jamais seul, mais que plusieurs voies de signalisation cellulaire sont toujours à l'œuvre et que ces effets ne surviennent pas forcément au même moment, et n'agissent en général pas toutes sur les mêmes types cellulaires impliqués dans la réponse (69,70). Ainsi, les fonctions « anti-inflammatoires » attribuées à l'IFN γ , servent vraisemblablement à limiter les conséquences délétères d'une réponse antivirale trop importante (11).

Table 4 : Effets immunologiques de IFN γ sur l'immunité innée, d'après Lee *et al* (11)

Type de cellule concernée	Effets pro-inflammatoires	Effets immunosuppresseurs
Cellules présentatrices d'antigènes	-Favorise la maturation des cellules dendritiques -Augmente l'expression des molécules CMH I et II -Augmente qualitativement et quantitativement la présentation des antigènes -Augmente l'expression d'IL-2 et de CD80	
Macrophages	-Induit la production de Monoxyde d'Azote -Prépare à la libération de radicaux libres -Augmente la phagocytose -Oriente vers une réponse M1	
Polynucléaires neutrophiles		-Augmente l'expression de PD-L1
Cellules myéloïdes suppressives		-Augmente l'expression de PD-L1 -Favorise leur différenciation
Cellules lymphoïdes innées du groupe 2		-Réduit leur prolifération -Réduit l'expression d'IL-5, IL-6 et IL-13 -Réduit l'expression d'amphiréguline

Les inducteurs

De nombreuses cytokines sont capables d'induire la production d'IFN γ , en 1^{er} lieu les IFNs de type 1, mais aussi l'IL2, l'IL12, l'IL15 ou encore l'IL18 (68,71,72). A noter que, comme pour les IFNs de type 1, il existe de nombreux mécanismes inducteurs, mais aussi des mécanismes de régulations, notamment via certaines cytokines (IL4, IL10 ou le transforming growth factor β [TGF β]), ou encore les glucocorticoïdes (endogènes ou de synthèse) (63,71).

Les lymphocytes NK et NKT produisent des ARN messagers codant pour l'IFN γ de manière constitutionnelle, ainsi, dès la reconnaissance de signaux d'activation (par exemple lorsque un pathogène diminue l'expression de CMH1 pour les NK et les NKT ou lors de la reconnaissance d'antigènes lipidiques présentés par le CD1d pour les NKT(73)), en lien avec la présence d'anomalies cellulaires (généralement du fait d'une infection virale, d'une infection bactérienne intracellulaire ou de la transformation en cellule cancéreuse) vont être capables de produire de grandes quantités d'IFN γ (74). Les lymphocytes T naïfs, eux, doivent être activés, après reconnaissance de leur antigène spécifique via leur TCR, se différencier en lymphocytes cytotoxiques CD8+, ou en lymphocytes CD4+ Th1, pour pouvoir produire de l'IFN γ à haut niveau. D'autres mécanismes ont été décrits, avec notamment un rôle de la stimulation par l'IL12 et l'IL18 pour les lymphocytes CD8+ (75).

De très nombreux facteurs de transcription ont été impliqués dans la transcription du gène de l'IFN γ (72), au premier rang desquels on peut citer T-bet, NFAT, NF κ B ou encore certains STATs (1, 3, 4 et 5).

Récepteur et voie de signalisation

Le récepteur de l'IFN γ , l'IFN γ -Receptor (IFNGR), est composé de deux sous-unités, comme l'IFNAR, IFNGR1 et IFNGR2. L'IFNGR est associé à STAT1 et STAT2, et la voie de signalisation principale de l'IFN de type 2 passe par la formation d'un homodimère phosphorylé de STAT1 (31).

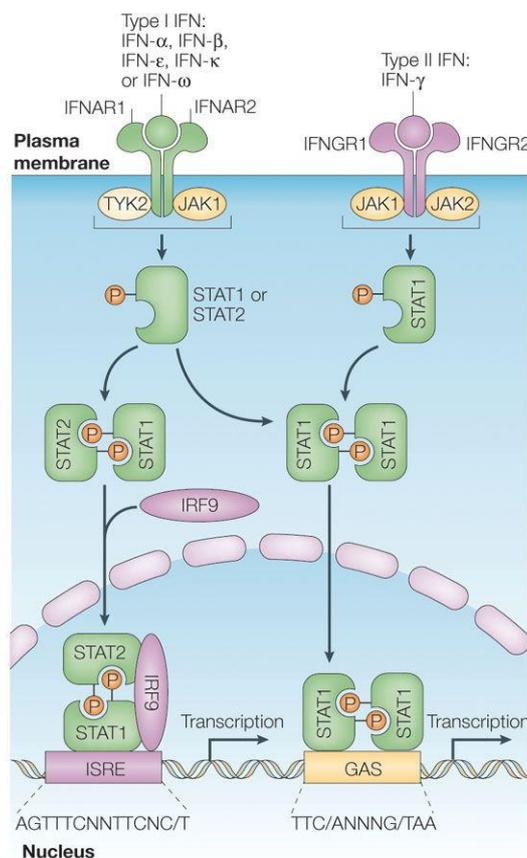


Figure 9. Comparaison des voies canoniques de signalisation de l'IFN γ et des IFNs de type 1, d'après Plataniias (31)

Comme pour les IFNs de type 1, en dehors de cette voie « canonique », il existe des voies alternatives, impliquant d'autres intermédiaires : STAT4 (lui-même à l'origine de la production d'IFN γ , et donc responsable d'une boucle d'auto-amplification), Erk1/1, Pyk2 ou encore CrkL par exemple (11) . De manière encore plus remarquable, l'IFN γ semble être aussi capable d'induire la formation du complexe ISGF3, pourtant jugé spécifique des IFNs de type 1, avec surtout des études chez la souris, mais aussi des données dans une lignée cellules épithéliales pulmonaires humaines (76). Chez l'Homme, bien que le complexe ISGF3 formé après reconnaissance de l'IFN γ par l'IFNGR, comporte une version non-phosphorylée de STAT2 (ce qui n'est pas le cas avec la voie canonique des IFNs de type 1), il est capable de se lier aux ISRE et d'induire l'expression d'ISGs.

On remarque donc que, là aussi, la voie de l'IFN de type 2 se situe au cœur des principales voies de signalisation cellulaire, avec des interactions multiples, stimulatrices ou inhibitrices, en fonction des voies, du type cellulaire (et en fait de la machinerie cellulaire disponible), mais aussi du moment.

I.3 Les interférons de type 3

Les interférons lambda

Chez l'Homme, le groupe des IFNs de type 3 est constitué de 4 membres, les IFNs λ 1, λ 2, λ 3 et λ 4 (sachant que les 3 premiers ont aussi été respectivement appelés IL29, IL28A et IL28B), résultant de la transcription de 4 gènes (IFNL1 à 4) situés sur le bras long du chromosome 19 (77), sachant que l'IFNL4 est un pseudogène chez une part plus ou moins importante de la population, en fonction de l'origine géographique (78,79) . Ce locus contient aussi 2 pseudogènes, IFNL1P1 et IFNL4P1.

Chez la souris, les gènes *ifnl3* et *ifnl2* sont situés sur le chromosome 7, à proximité de 2 pseudogènes, *ifnl1-P1* et *ifnl1-P2* : il y a donc 2 IFNs λ , IFN λ 2 et IFN λ 3, qui ne sont cependant pas strictement équivalents à leurs homonymes humains (77).

Les inducteurs

La production d'IFNs λ semble majoritairement dépendre des mêmes inducteurs que ceux qui sont à l'origine de la production des IFNs de type 1 (80–82), c'est-à-dire la reconnaissance des PAMPs (notamment liés aux virus) par les récepteurs de l'immunité innée comme les TLRs 3, 7, 8 et 9, ainsi que les récepteurs cytosoliques évoqués plus haut, en 1^{er} lieu. La production d'IFN λ 1 semble être analogue à celle d'IFN β , dépendant aussi bien d'IRF3 que d'IRF7, alors que la production d'IFNs λ 2 et λ 3 se rapproche plus de celle des IFNs α , dépendant principalement d'IRF7, avec une production retardée dans le temps (83).

Cela-dit, depuis 2003, de nombreuses données se sont accumulées pour penser que, comme pour les autres IFNs, il existe un haut niveau de complexité dans la régulation de la production des IFNs de type 3, et qu'il ne s'agit pas simplement de systèmes redondants. Par exemple, les régions promotrices des gènes codant pour les IFNs λ

contiennent des sites de liaison pour les facteurs de transcription IRF3 et IRF7 (83), mais aussi pour NFκB et AP-1 (77). La production d'IFNλ1 nécessite l'action d'NFκB pour être maximale (ce qui n'est pas le cas de l'IFNβ), et peut même se faire de manière indépendante des IRFs, uniquement via NFκB (84). Par ailleurs, des différences semblent exister en fonction des tissus, notamment au niveau de la muqueuse colique (85) et respiratoire (86), un facteur limitant spécifiquement (c'est-à-dire sans effet sur la transcription des gènes codant pour les IFNs de type 1) la transcription d'IFN λ1 a été identifié : *Zinc finger E-box-binding homeobox 1*(ZEB1). Par ailleurs, il existe aussi des différences au niveau de la voie des RLRs (RIG-1 et MDA5 principalement), que nous avons évoquée pour la production d'IFNs de type 1. Cette dernière implique un intermédiaire appelé MAVS qui a diverses localisations au sein de la cellule. Lorsque les RLRs se lient, après reconnaissance d'ARN double brin, à MAVS au niveau de la membrane mitochondrial, le processus aboutit à la production d'IFNs de type 1. En revanche, lorsque c'est les molécules MAVS des peroxysomes qui sont reconnues par les RLRs, il n'y a pas de production d'IFNs de type 1 mais bien d'IFNs de type 3 (87). Ainsi, l'endroit où l'ARN double brin sera reconnu au niveau cytosolique, mais aussi les proportions relatives en mitochondries et en peroxysomes, sont des déterminants de la teneur de la réponse, plutôt IFN de type 1 ou de type 3. Enfin, on peut noter aussi l'implication d'une molécule appelée Med23 qui agit de manière synergique avec l'IRF7 pour induire la production d'IFNλ, alors qu'il n'a aucun effet sur la production d'IFN de type 1 (88).

Récepteur et voie de signalisation

Le récepteur des IFNs de type 3 est formé d'une chaîne spécifique, l'IFNλ receptor chain 1 (IFNλR1, anciennement appelée IL28RA), ainsi que d'une chaîne commune au récepteur de l'IL10 et à d'autres cytokines, l'IL10R2 (ou IL10Rβ). Comme l'IFNAR2, l'IFNλR1 est la sous-unité dont l'affinité est élevée pour ses ligands, et une fois cette liaison établie, la sous unité de faible affinité (ici l'IL10R2) est recrutée, et le complexe permet la transmission du signal (89). Un élément important ici est que, contrairement à l'IFNAR qui est présent de manière ubiquitaire, sur toutes les cellules nucléées, le récepteurs des IFNs de type 3 est essentiellement présent à la surface des muqueuses, au niveau des épithéliums (90,91), mais aussi au niveau d'autres « barrières » comme la barrière hémato-encéphalique ou le placenta. Cela dit, certaines cellules du système immunitaire semblent aussi être sensibles aux IFNs λ, en particulier les polynucléaires neutrophiles et les cellules dendritiques (dont les pDC). Concernant les autres cellules du système immunitaire, il n'existe pas de consensus concernant les lymphocytes B, les lymphocytes T, les lymphocytes NK et les monocytes, notamment du fait de problèmes méthodologiques, car la détection du récepteurs aux IFNs de type 3 (ARNm ou la protéine elle-même) ne signifie pas forcément que lesdites cellules répondent aux IFNs de type 3 (90). Il est d'ailleurs possible que la sensibilité de ces cellules aux IFNs de type 3 dépende du contexte, de leur origine ou de leur niveau d'activation, comme c'est le cas pour les polynucléaires neutrophiles (92).

Après liaison de l'un des IFNs λ à son récepteur, la voie de signalisation principale est identique à la voie canonique des IFNs de type 1, avec l'activation de JAK1 et TYK2, puis la formation de l'hétérodimère STAT1/STAT2, qui va recruter l'IRF9 pour former le complexe ISGF3, capable de se lier aux motifs ISREs propres aux ISGs. Ainsi, bien que les IFNs de type 1 et de type 3 utilisent des récepteurs différents, ils aboutissent à la translocation nucléaire du complexe ISGF3 et donc à des signatures moléculaires proches, et, logiquement, des effets antiviraux, antiprolifératifs et immunomodulateurs proches aussi (89).

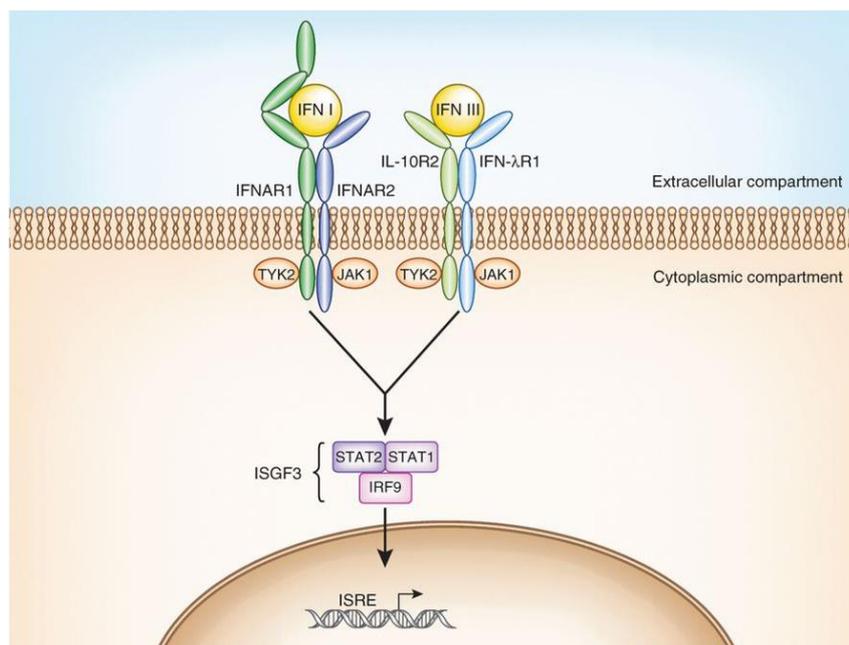


Figure 10. Mécanismes de signalisation communs aux IFNs de type 1 et de type 3, d'après Wack *et al*, (77)

L'analyse phénotypique des patients atteints de déficits immunitaires touchant les différents IFNs (93), comme par exemple les mutations de TLR3 (21) ou TYK2 (94), n'a pas permis d'identifier de rôle spécifique des IFNs de type 3 par rapport aux IFNs de type 1 (alors que, par exemple, les déficits impliquant une réponse IFN de type 2 altérée, entraînent systématiquement une sensibilité accrue aux mycobactéries), avec à chaque fois une susceptibilité aux infections virales, à l'encéphalite herpétique notamment. On peut cependant signaler que certaines mutations causant des déficits de protéines dont le rôle semble pourtant central dans la voie des IFNs, comme STAT1 (95), STAT2 (96), IFNAR1 (97), IFNAR2 (98), IRF7 (99) ou IRF9 (100), n'ont pas systématiquement entraîné de déficit immunitaire majeur, mais ont été décrits chez des patients ayant fait des tableaux infectieux particulièrement sévères suite à une administration de vaccin vivant atténué. A notre connaissance, aucun déficit immunitaire lié à l'absence isolée de signalisation par les IFNs de type 3 n'a été décrit, cela dit, il existe de nombreuses études, en particulier concernant l'hépatite C, sur la présence d'une sensibilité accrue à certains virus (avec par exemple des tableaux d'herpès labial récurrent ou de rétinite à CMV dans la cadre du VIH) en lien avec certains polymorphismes des gènes IFNL (101).

Il existe cependant des différences significatives entre les IFNs de type 1 et les IFNs de type 3. La principale, qui a été identifiée assez rapidement après la découverte des IFNs de type 3, en 2003, est leur site d'action. En effet, du fait de l'expression de leur récepteur qui est loin d'être ubiquitaire, contrairement à celle de l'IFNAR, les IFNs de type 3 ont surtout un rôle au niveau des muqueuses, comme évoqué plus haut. Chez la souris, par exemple, les IFNs de type 3 sont capables d'induire une réponse antivirale de l'épithélium intestinal alors que les IFNs de type 1 ne le peuvent pas (102). Par ailleurs, au niveau de certaines barrières de l'organisme, comme la barrière hémato-encéphalique, il a été démontré, au moins chez la souris, que les IFNs de type 3 potentialisent le rôle défensif de ces structures via l'induction de l'expression des ISGs mais aussi par un mécanisme indépendant de l'expression des ISGs qui semble renforcer les jonctions intercellulaires endothéliales (91). De la même manière, au niveau des polynucléaires neutrophiles, en plus de l'induction de l'expression des ISGs, l'effet des IFNs λ semble passer par un mécanisme non transcriptionnel, avec plutôt un effet anti-inflammatoire, limitant la production de radicaux libres et la dégranulation (103). Cet effet semble être notamment important pour le contrôle de la réponse inflammatoire au niveau intestinal. Par ailleurs, au niveau des cellules placentaires humaines (au niveau du trophoblaste), la production d'IFNs λ est constitutive, indépendante de la reconnaissance de PAMPs et semble permettre, en tout cas chez la souris, l'obtention d'un état de résistance antivirale permanent, limitant la transmission materno-fœtale des infections, notamment du virus Zika (cet effet antiviral est affecté *in vitro* par le ruxolitinib, un inhibiteur de JAK1/2 (104)). Il est important de noter qu'à l'inverse des IFNs de type 3, les IFNs de type 1 semblent plutôt avoir un effet délétère propre sur le placenta et la grossesse, ce qui a été montré dans un modèle murin d'infection materno-fœtale par le virus Zika, et semble indépendant du contrôle du virus (105). Cet effet délétère a été confirmé chez l'Homme *in vitro*, en utilisant de l'IFN β recombinant, alors que l'IFN λ 3 n'avait pas cet effet (105).

Ainsi, il existe tout de même des différences significatives entre IFNs de type 1 et IFNs de type 3, avec des rôles spécifiques pour chacun, et il est actuellement admis que les IFNs de type 3 servent de première ligne de défense, au niveau des barrières (essentiellement les muqueuses mais pas uniquement), entraînant une réponse plus lente et prolongée, plus faible et moins inflammatoire (89) que celle liée aux IFNs de type 1. Cela dit, ce concept où les IFNs de type 3 ne seraient que des « sous IFNs de type 1 » agissant en 1^{ère} ligne, et les IFNs de type 1 seraient là en relais, en cas d'atteinte systémique dépassant les barrières de l'organisme, semble surtout découler des données obtenues par l'étude de la réponse interféron (tous types confondus) face à différents pathogènes, et les données évoquées plus haut laissent déjà entrevoir qu'en fonction du contexte, de la présence d'une maladie sous-jacente (en particulier auto-immune ou inflammatoire) et du type cellulaire concerné, les choses sont probablement plus complexes que cela (89,90).

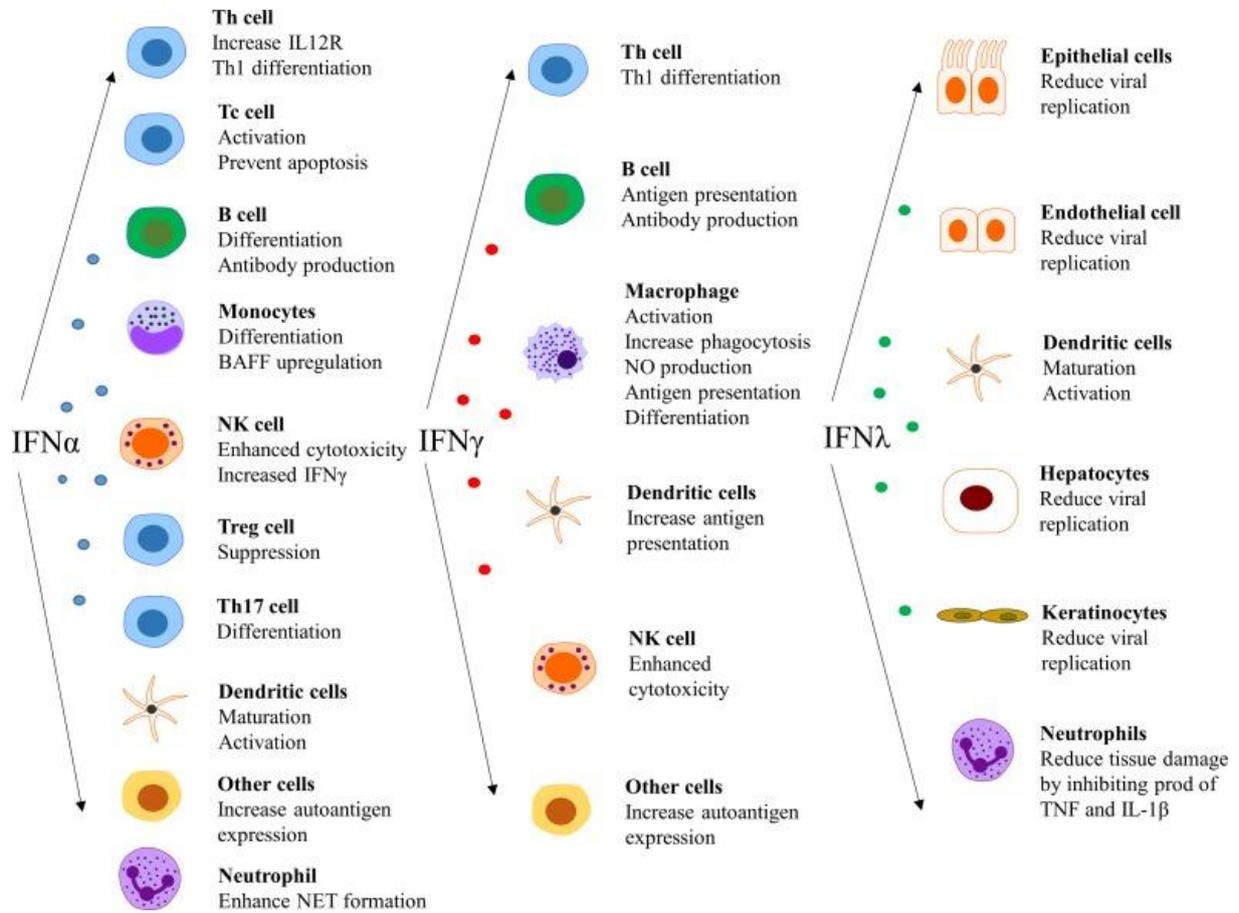


Figure 11. Principaux effets des interferons selon le type cellulaire, d'après Rönnblom & Leonard (106)

II. Les maladies interféron-dépendantes

Il est maintenant bien connu que les voies des IFNs sont anormalement activées dans diverses maladies auto-immunes systémiques (3), mais aussi dans certaines maladies auto-immunes ciblant plus spécifiquement certains organes (107,108), comme le diabète de type 1 ou certaines maladies neurologiques. Compte-tenu de la complexité de ces voies, dont nous ne venons d'avoir qu'un aperçu, il est évident qu'il existe des mécanismes propres à chaque pathologie, et même, au sein de chacune de ces pathologies, des mécanismes propres à chaque patient ou groupe de patients, en fonction de la présentation clinique. D'ailleurs, parmi les patients atteints de maladies auto-immunes systémiques, en dehors du cas particulier des interféronopathies monogéniques, le rôle physiopathologique des IFNs ne semble être présent que pour un sous-groupe de patients, dont la proportion dépend de la pathologie considérée.

Cela dit, le rôle des IFNs de type 1 dans l'induction de maladies auto-immunes (en partant de données sur le LES) a été conceptualisé de manière simplifiée, comme un processus à deux phases (9). Une première phase, dite d'initiation, indépendante des TLRs, où le matériel cellulaire (incluant des acides nucléiques), libéré après apoptose précoce des cellules cibles, va être pris en charge par des cellules présentatrices d'antigène, en particulier des cellules dendritiques. Ces cellules dendritiques vont produire des IFNs de type 1 indépendamment des TLRs, qui vont favoriser la maturation des cellules dendritiques elles-mêmes, mais aussi stimuler d'éventuels lymphocytes B et T auto-réactifs déjà existants. En parallèle, dans ce contexte pro-inflammatoire, le système immunitaire adaptatif va se mettre en branle et des lymphocytes B auto-réactifs vont produire des auto-anticorps contre les antigènes libérés par les cellules nécrotiques et lors des dernières étapes de l'apoptose. La 2^{ème} phase, dite d'amplification, se met en route avec la formation de complexes immuns auto-anticorps/auto-antigènes/acides nucléiques qui vont être reconnus par les TLRs, et entretenir la production d'IFNs de type 1, avec un effet global sur le système immunitaire.

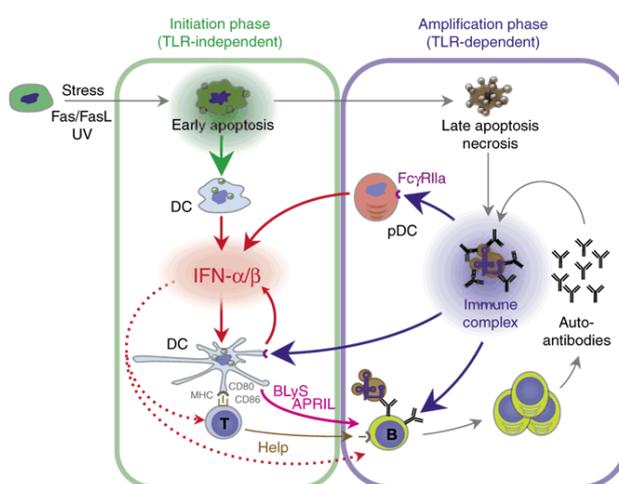


Figure 12. Concept général, en deux phases, du rôle pathologique des interférons de type 1 dans les maladies auto-immunes, d'après Baccala *et al* (9)

Evidemment, comme nous l'avons vu précédemment, même si de nombreux articles se focalisent sur les IFNs de type 1, les IFNs de type 2 sont aussi impliqués à ce niveau, notamment du fait de l'interdépendance des 2 voies. Aussi, en fonction des sites concernés, en particulier au niveau des muqueuses, les IFNs de type 3 peuvent aussi avoir un impact délétère plus ou moins important (bien que moins bien étudié, car de découverte plus récente), puisqu'ils partagent de nombreux mécanismes d'induction et d'action avec les IFNs de type 1.

II.1 Les interféronopathies monogéniques

Comme évoqué plus haut, et contrairement à toutes les autres maladies dont nous allons parler dans cette partie, il s'agit d'un groupe de maladies génétiques, au sens Mendélien du terme, caractérisé par la présence d'une mutation suffisant à elle seule à aboutir à une activation incontrôlée de la voie des IFNs de type 1, ce qui semble être le principal mécanisme physiopathologique observé dans ces maladies (4,109,110).

Le démantèlement de ces maladies particulièrement rares est en cours, et le concept d'interféronopathie est assez récent, regroupant des maladies avec des caractéristiques cliniques (atteintes neurologique et dermatologique) et biologiques (présence d'une signature IFN) communes, mais aussi des atteintes spécifique à chaque maladie.

Comme nous l'avons vu au cours de la première partie de ce travail, la voie des IFNs de type 1 est particulièrement complexe, avec de nombreuses molécules impliquées et autant d'anomalies potentielles.

Schématiquement, il y a 3 mécanismes physiopathologiques principaux pouvant aboutir à une interféronopathie de type 1 :

- 1) L'accumulation d'acides nucléiques endogènes en lien avec un défaut d'activité d'une nucléase (TREX1, SAMHD1, ADAR1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C)
- 2) L'activation constitutive ou l'augmentation de la sensibilité d'un récepteur (IFIH1 ou DDX58, codant respectivement pour les récepteurs cytosoliques MDA5 et RIG-1) ou d'une molécule adaptatrice (TMEM173 codant pour la protéine STING) impliqués dans la voie des IFNs de type 1
- 3) Un défaut dans la régulation négative de la voie des IFNs de type 1 (ISG15)

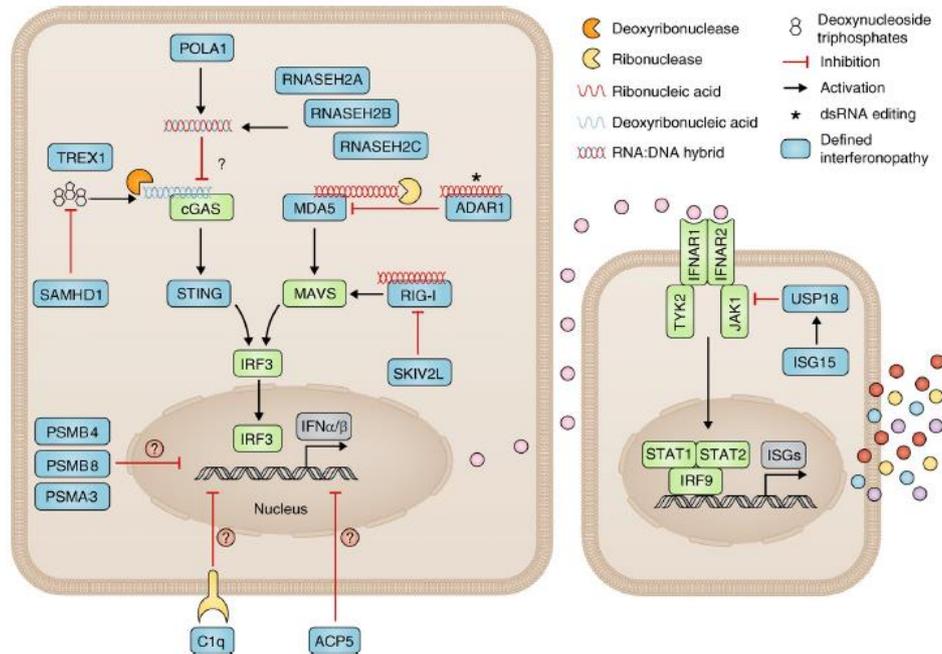


Figure 13. Représentation schématique de la voie des IFNs de type 1, insistant sur les molécules pour lesquelles des mutations à l'origine d'une interféronopathie ont déjà été identifiées (en bleu), d'après Rodero & Crow (109)

Le premier représentant de ce groupe de maladies est le syndrome d'Aicardi-Goutières (111), décrit en 1984, rapidement caractérisé comme étant lié à une surexpression d'IFN α dans le sang et le liquide cérébro-spinal des patients (112), et plus récemment identifié comme étant secondaire à une mutation perte de fonction de l'exonucléase TREX1 (113). En fait, on sait maintenant qu'il existe au moins 7 gènes (TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, IFIH1, ADAR1) pouvant être incriminé dans le syndrome, pour la plupart impliqués dans le métabolisme des acides nucléiques (4). Le tableau clinique est essentiellement neurologique, avec la survenue d'une encéphalopathie néonatale, associant à des degrés divers, et plus ou moins précocement, atrophie cérébrale, leucodystrophie, calcifications cérébrales et lymphocytose du liquide cérébrospinal, mais sans argument pour une histoire infectieuse. Parmi les autres éléments cliniques notables, l'association avec un tableau de lupus engrelure est possible, et parfois même avec un tableau de LES plus classique, plus ou moins associé à un syndrome des anticorps anti-phospholipides.

Dans les autres interféronopathies de type 1, on peut simplement citer le STING-associated vasculopathy with onset in infancy (SAVI), lié à une mutation activatrice dans le gène TMEM173 (codant pour STING) et donnant un tableau de vascularite et de fibrose pulmonaire à début précoce, le syndrome de Singleton-Merten, lié à une mutation activatrice de DDX58 (codant pour RIG-1) (114), ou encore des manifestations pathologiques causées par un déficit de rétrocontrôle négatif de la voie des IFNs de type 1 (115,116). Deux syndromes auto-inflammatoires associant fièvre à répétition, manifestations lupus-like et auto-immunité, ont été secondairement rattachés aux interféronopathies de type 1, en raison de la mise en évidence d'une signature IFN : la spondyloenchondrodysplasie (SPENCD, lié à une mutation dans le gène ACP5 codant pour la protéine lysosomale TRAP) et

le chronic atypical neutrophilic dermatosis with lipodystrophy and elevated temperature (CANDLE, lié à une ou plusieurs mutations dans les gènes codant pour les sous-unités du protéasome) (117)

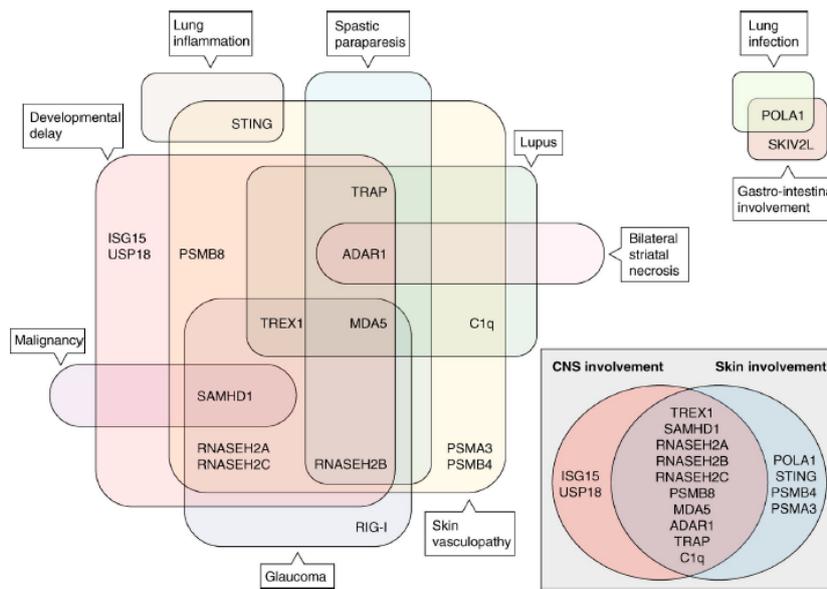


Figure 14. Chevauchement des principales caractéristiques cliniques des interféronopathies de type 1, en fonction du gène touché, d'après Rodero & Crow (109)

Bien que la présence d'une signature IFN soit un élément important dans ces maladies, il faut savoir que cette signature peut être absente dans les formes de syndrome d'Aicardi-Goutières en lien avec une mutation dans le complexe RNASEH2 (118).

Comme évoqué plus haut dans le chapitre sur les IFNs de type 3, les IFNs de type 1 semblent avoir des effets délétères, mis en évidence *in vitro*, au niveau placentaire chez l'Homme (105). Les interféronopathies constituent un modèle *in vivo* parfait pour se rendre compte de cela, puisque les femmes atteintes de l'une de ces maladies présentent de nombreuses complications en cas de grossesse, avec plus de pré-éclampsies, plus de fausses couches, et plus de naissances prématurées. Aussi, les enfants issus de ces grossesses peuvent présenter des malformations évocatrices, rappelant celles survenant suite à certaines infections (avec notamment des retards de croissances et des microcéphalies), en l'absence de pathogène (115).

II.2 Le lupus érythémateux systémique

Le LES est la première maladie auto-immune systémique où le rôle des IFNs, en particulier de l'IFN α a été mis en évidence (119–121). C'est dans cette maladie qu'il a aussi été le plus étudié, avec dès les premières publications, la description d'une corrélation entre les taux d'IFNs et l'activité clinique de la maladie ainsi que les titres d'anticorps anti-ADN double brin (120).

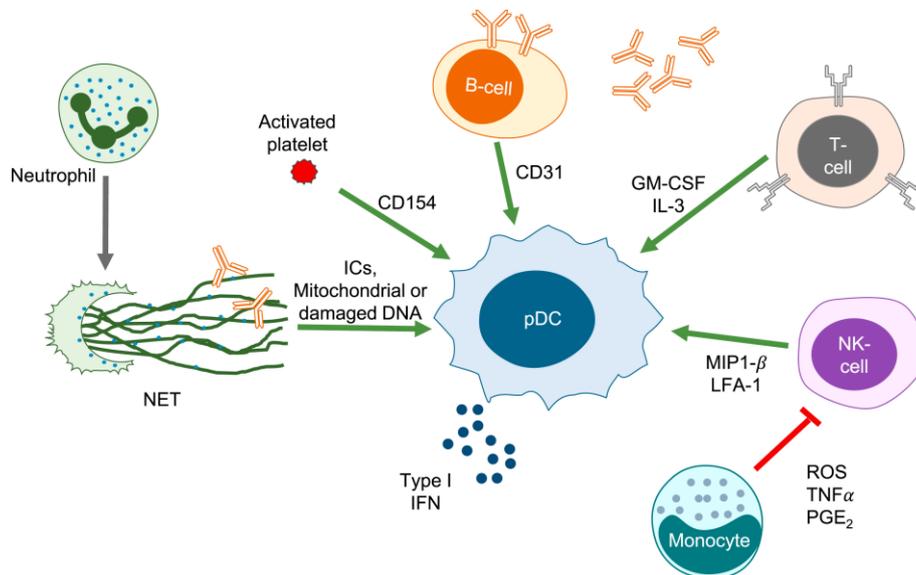


Figure 15. Principales interactions cellulaires aboutissant à la production d'interférons de type 1 par les cellules dendritiques plasmacytoïdes dans le LES, d'après Bengtsson & Rönnblom (122)

Dès les premières publications aussi, l'implication de différents sous-types d'IFNs a été évoquée, avec un rôle probable de l'IFN γ selon les patients étudiés (119,121). Il existe aussi quelques études qui se sont intéressés aux autres IFNs de type 1 dans le LES, en particulier l'IFN κ (123–125) dans les formes cutanés, mais aussi l'IFN ω (126), codant pour l'IFN ω , qui est l'un des transcrits les plus exprimés (au même titre qu'IFNA2 et IFNB1) après stimulation de pDC par des agonistes de TLR7, avec des données en faveur de leurs participations dans la physiopathologie de certaines formes de la maladie.

C'est dans le LES qu'il y a aussi eu, il y a un peu plus de 15 ans maintenant, la description de ce qui est dorénavant appelé la « signature IFN » (127,128). Cette signature a été identifiée grâce aux premiers outils d'analyse transcriptomique à haut débit, qui ont permis d'identifier qu'une part importante des gènes dont l'expression étaient significativement différentes entre patients atteints de LES et sujets sains, était identifiée comme étaient des ISGs, dont l'expression était donc IFN-dépendante. Cette signature moléculaire a trouvé sa place du fait des limites techniques (avec des difficultés pour détecter des concentrations biologiquement pertinentes d'IFN α , que nous détaillerons plus dans la partie correspondante) qu'impliquent les méthodes classiques de dosage de l'IFN α , utilisées historiquement. Depuis cette description princeps, de nombreuses études ont confirmé la présence de cette signature IFN (129–135), évaluée selon des modalités différentes en termes de techniques, de cellules et de tissus (essentiellement sur sang total ou cellules mononuclées du sang, mais aussi au niveau cutané), mais aussi de gènes étudiés. En effet, l'objectif souvent recherché d'aboutir à une utilisation clinique de cette signature, nécessite (du moins jusqu'à présent) de passer par une étape complexe où il s'agit de « transformer » des résultats de transcriptomique incluant des centaines voire des milliers de gènes, à seulement quelques gènes, avec des méthodologies variables, et idéalement, sans perte d'information. Ainsi, les publications évoquant la signature IFN dans le LES ne parlent souvent pas exactement de la même chose, allant par exemple de signatures

« simplifiées » (136) à 3 gènes (PKR [ou PRKR ou EIF2AK2], IFIT1, IFI44), à des signatures plus complexes (131) à 31 gènes (BST2, C7orf6, EPSTI1, FLJ20035, G1P2, HERC6, HSXIAPAF1, IFI35, IFI44, IFI44L, IFIH1, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFRG28, IRF7, LAP3, LGP2, LOC128607, MX1, OAS1, OAS2, OAS3, OASL, PML, RSAD2, SP110, STAT2, TAP1, UBE2L6, USP18). La majorité des études retrouvaient une corrélation entre la signature IFN et l'activité du LES (selon différents scores), mais aussi, selon les cas, avec la présence d'auto-anticorps ciblant les ribonucléoprotéines (anti-Ro/SSA, anti-RNP, anti-Sm) ou l'ADN double brin, une hypocomplémentémie, ou certaines données cliniques comme la présence d'une atteinte rénale, neurologique ou hématologique.

Compte-tenu des difficultés évoquées quant au choix (souvent aidé par des méthodes statistiques visant à identifier les expressions de transcrits les plus discriminantes et par des recoupement avec les signatures déjà publiées et les données générées suite à des expériences de stimulation par les IFNs *in vitro*) des gènes composant la signature IFN, et des risques d'erreur statistique liés aux comparaisons multiples, certaines équipes ont mis au point des algorithmes pour constituer des modules transcriptionnels (135). Il s'agit de constituer des ensembles, ou modules, de transcrits dont l'expression se fait de manière coordonnée, et ce sont ces modules qui ont été étudiés. Parmi les 11 modules identifiés initialement grâce la signature moléculaire globale dans le LES, 3 contenaient des gènes identifiés comme étant IFN-dépendants (par exemple, le module M3.1 contenaient OAS1, OAS2, OAS3, OASL, GBP1, G1P2, PKR, MX1, PML, CXCL10, STAT1, STAT2, IRF7 et ISGF3G) et ont été évalués dans une population de patients LES pédiatriques (135), puis de patients LES adultes (137), avec une bonne corrélation à l'activité clinique de la maladie.

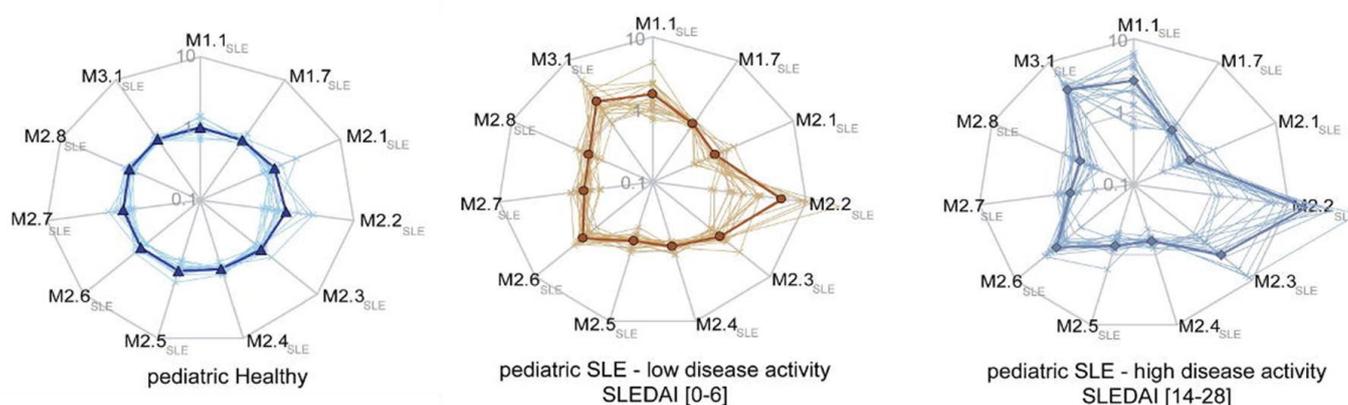


Figure 16. Comparaison, dans une population pédiatrique (sujets sains, LES peu actif, LES actif), des vecteurs transcriptionnels générés après analyse des 11 modules transcriptionnels identifiés dans le LES, d'après Chaussabel *et al* (135)

Cela dit, l'approche par module a permis de bien mieux appréhender la complexité de la signature IFN (avec l'identification d'un niveau de gradation dans l'activation des modules IFN-dépendants : lorsqu'un seul module était surexprimé, il s'agissait toujours du même, avec des seuils croissants pour les deux autres, et une variabilité

d'expression, au fil du temps, qui était croissante aussi) et notamment d'expliquer en partie des résultats qui avaient pu être discordants par le passé (notamment en ce qui concerne le suivi (129,130)) puisque parmi les 3 modules de deuxième génération (137) identifiés comme étant IFN-dépendants, tous n'étaient pas corrélés à l'activité de la maladie ou aux mêmes paramètres clinico-biologiques et seulement 2 sur 3 variaient au fil du suivi. Par ailleurs, après comparaison avec les données disponibles dans la base de données *Interferome*, les auteurs ont mis en évidence plusieurs éléments très intéressants :

- La signature moléculaire induite après traitement par IFN α ou par IFN β ne reproduisait pas complètement celle identifiée dans le LES
- Le premier module, correspondant au niveau le plus faible de signature IFN, semblait surtout dépendant de l'IFN α , alors que l'administration d'IFN β pouvait entraîner une surexpression des deux premiers modules, et ni l'action isolée de l'IFN α ou ni celle de l'IFN β n'était capable d'induire un niveau de signature IFN correspondant à la surexpression des trois modules
- Les transcrits composant les deuxième et troisième modules pouvaient être aussi bien induits par les IFNs de type 1 que par les IFNs de type 2 *in vitro*
- Pour pouvoir obtenir la signature IFN la plus élevée, impliquant une surexpression des transcrits des trois modules, il semblait falloir une action combinée de plusieurs IFNs

Les auteurs de cette étude ont par ailleurs comparé leur signature modulaire aux signatures précédemment publiées dans la littérature, et même s'ils retrouvaient une corrélation entre elles, elles n'étaient pas redondantes, et selon les cas, des patients n'étaient pas forcément classés dans la même catégorie d'activité de la maladie. Aussi, ils notaient que la plupart des gènes utilisés dans les signatures précédemment décrites faisaient partie du premier module, celui témoignant d'une activation faible de la voie des IFNs, et surtout, le moins variable (et donc, le moins adapté pour le suivi).

Enfin, une équipe a récemment publié les résultats d'une analyse systémique de toutes les bases de données publiques disponibles sur la signature moléculaire dans le LES (126). Les auteurs retrouvaient un rôle important de l'IFN β (sans écarter le rôle identifié pour l'IFN α , puisque l'IFN β est capable d'induire la production d'IFN α) dans le LES, concernant la signature sanguine, mais surtout aux niveaux cutané et articulaire, alors qu'au niveau rénal la constatation d'une expression plutôt faible des ISGs laissait penser (contrairement à certaines études précédemment citées (127,130,133,136)) que les IFNs ne semblaient pas être un cible de choix pour cette atteinte. Une autre constatation de taille, pouvant expliquer l'absence de variation de la signature IFN dans certaines études de suivi longitudinal, était la persistance d'une signature IFN positive chez des patients LES quiescents, et la persistance d'un niveau important d'expression des ISGs dans les monocytes de patients (alors qu'au sein des lymphocytes T et B, l'expression de ces gènes IFN-dépendants était variable et corrélée à l'activité de la maladie), possiblement en lien avec la présence d'une expression soutenue de STAT1 dans ce type cellulaire.

Comme dans toutes les maladies auto-immunes systémiques, il existe des facteurs génétiques dans le LES, conférant un risque plus important de développer la maladie. Parmi les polymorphismes à risque déjà décrits, un certain nombre concerne des gènes impliqués dans la voie des IFNs de type 1 (138), comme IRF5, IRF7, IRF8, STAT4, IFIH1 (codant pour MDA5) et SPP1 (codant pour l'ostéopontine, qui interagit avec MyD88, en aval des TLRs et participe à la cascade aboutissant à la production d'IFN α par les pDC (139)). Des études ont par ailleurs été menées dans certaines populations porteuses de variants à risque, notamment touchant IRF5, chez qui était constatée la présence de taux sériques d'IFN α et d'une activation de la voie des IFNs de type 1 (mesurée via la lignée cellulaire reporthrice WISH, dont nous détaillerons le principe dans la partie correspondante) plus élevées, mais uniquement chez les patients LES porteurs d'anticorps ciblant des ribonucléoprotéines ou l'ADN double brin (140). Le même genre de constatation a aussi été faite avec IRF7 (141), dont certains polymorphismes semblent être capable d'amplifier, dans les cellules dendritiques et après stimulus, l'expression de différents gènes codant pour des sous-types d'IFN α (IFNA4, 10, 13, 17 et 21) (142). Ce type d'effet favorisant sur la voie des IFNs de type 1 concerne aussi des variants de STAT4 (143), IFIH1 (144), OPN (145), tous directement situés sur la voie des IFNs de type 1. En dehors des polymorphismes de gènes codant pour des protéines directement impliquées dans la voie des IFNs de type 1, on peut aussi citer des variants à risque de PTPN22 (146,147) (une phosphatase impliquée dans la transmission du signal après reconnaissance antigénique par les lymphocytes B et T) et d'ILT3 (148) (une molécule inhibitrice exprimée dans les cellules dendritiques classiques et plasmacytoïdes, et les monocytes/macrophages, et participant au rétrocontrôle de la voie des IFNs). En revanche, des constatations opposées, c'est-à-dire une diminution de l'activation de la voie des IFNs de type 1 et de la signature IFN (IFIT1, MX1 et PKR), ont été observées chez des patients LES, avec des anticorps anti-ADN double brin, et porteurs de variants à risque concernant IRF8 (149) et MAVS (qui, rappelons-le, est une molécule importante de la voie des récepteurs cytosoliques RIG-1 et MDA5) (150). Les auteurs ont donc supposé que ces polymorphismes intervenaient plutôt dans les formes de LES négatif pour la signature IFN.

Une étude a par ailleurs été menée chez des sujets atteints de LES et leurs apparentés, en s'intéressant à la présence d'une activité IFN de type 1 dans le sang, et ils ont montré que cette voie était fréquemment activée chez les apparentés sains (151), alors que la présence d'auto-anticorps ciblant les ribonucléoprotéines ou l'ADN double brin était rare. Les auteurs concluaient donc qu'il s'agissait d'un facteur de risque complexe et héritable de LES, par ailleurs commun à tous les groupes ethniques étudiés. Une autre étude particulièrement intéressante (152) a été récemment menée chez 55 patients atteints de LES (et des sujets sains appariés selon différents paramètres) pour qui des échantillons de sérums étaient disponibles avant et après leur diagnostic. Ils ont donc pu étudier différents paramètres (auto-anticorps anti-ADN double brin, anti-chromatine, anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, anti-Sm, anti-Sm/RNP, anti-RNP, taux sériques de BAFF, CXCL9 (MIG1), CXCL10 (IP10), IFN γ , MCP3, MIP-1 α , et ils ont utilisés la lignée WISH pour mesurer la capacité du sérum à induire une activation de la voie des IFNs de type 1) avant la phase symptomatique de la maladie, et ont montré que l'activation de la voie des IFNs de type 1 augmentait à l'approche du diagnostic. En effet, plus de 4 ans avant le diagnostic, seulement 20% des patients

étudiés avaient une activité IFN de type 1 augmentée, contre 44% dans les 2 ans précédant le diagnostic, et 75% au moment du diagnostic, avec, là aussi, plus d'anticorps anti-ribonucléoprotéines ou anti-ADN double brin chez les patients positifs. Aussi, l'apparition des auto-anticorps précédait systématiquement l'apparition de l'activité IFN de type 1 chez ces patients, sauf pour les anticorps anti-ADN double brin, qui apparaissaient en général au même moment.

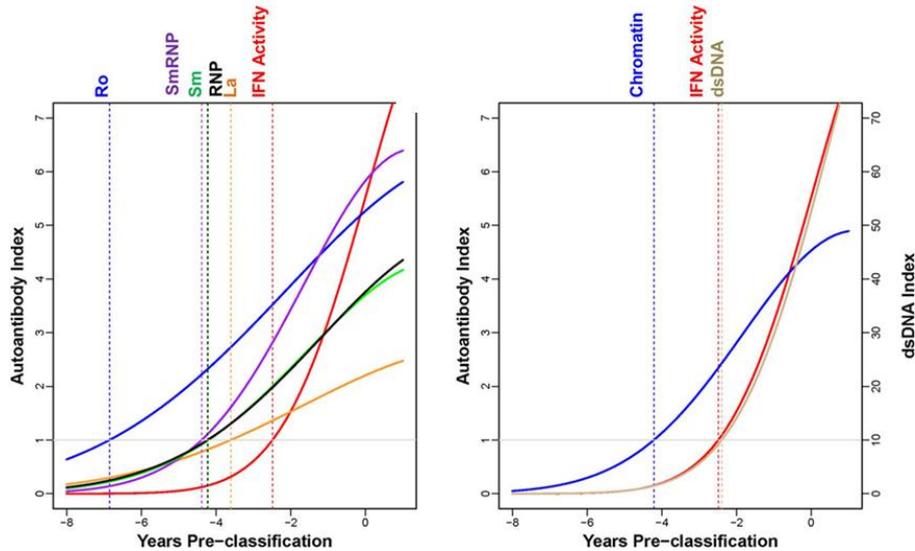


Figure 17. Représentation de la chronologie d'apparition des biomarqueurs (auto-anticorps et activation de la voie des IFNs de type 1) associés au LES, avant le diagnostic de la maladie, d'après Munroe *et al* (152)

Dans les formes pédiatriques de LES, la part génétique est bien plus importante que chez l'adulte et touche souvent, de près ou de loin, la voie des IFNs de type 1, avec 90% des patients présentant une signature IFN (153). Il existe même des formes monogéniques de LES (avec par exemple des mutations sur les gènes codant pour le C1q, ou les désoxyribonucléases 1 et γ) qui peuvent, de fait, aussi être classées dans le groupe des interféronopathies monogéniques (154,155).

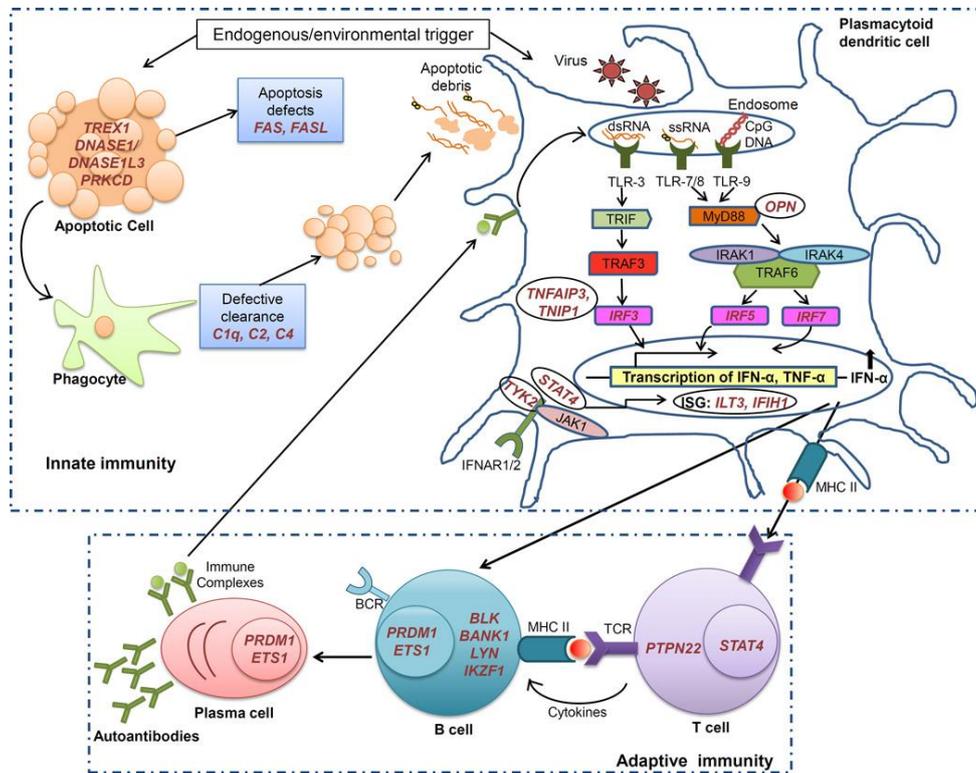


Figure 18. Représentation des différents gènes touchés par des polymorphismes à risque de développement d'un lupus érythémateux systémique, en fonction des voies de signalisation et du type cellulaire impliqués, d'après Ghodke-Puranik & Niewold (138)

Concernant les grossesses des patientes lupiques, il existe des données en faveur d'un rôle délétère pour les IFNs de type 1, en particulier l'IFN α . L'analyse de 28 patientes lupiques ayant présenté une pré-éclampsie, chacune appariée à un sujet contrôle atteint de LES (dont la grossesse s'est déroulée sans problème) et une patiente sans maladie auto-immune ayant présenté une pré-éclampsie, a permis de d'identifier des niveaux élevés d'IFN α uniquement chez les patientes lupiques, et ce en amont de la complication obstétricale (156). Des études complémentaires *in vitro*, ont montré que l'IFN α était vraisemblablement responsable, chez une partie des patientes lupiques de l'étude, de l'induction d'un effet anti-angiogénique favorisant la pré-éclampsie.

Concernant le rôle des IFNs de type 2 dans le LES, il existe de nombreuses études sur le sujet (157), avec des données en faveur d'un rôle pathogène chez l'animal, notamment dans le modèle MRL/MpJ-Fas^{lpr/lpr} (MRL/lpr), mais aussi chez l'Homme, retrouvant, selon les cas, chez les patients, une augmentation des taux d'IFN γ (au niveau transcriptionnel et protéique) dans le sang, une production plus importante d'IFN γ après stimulation cellulaire et aussi des niveaux d'expression plus importants de T-bet (intervenant en amont, mais aussi en aval de l'expression du gène de l'IFN γ , du fait d'une boucle d'auto-amplification (158)). Les niveaux d'IFN γ étaient par ailleurs corrélés aux scores d'activité de la maladie, en particulier en cas d'atteinte rénale.

Par rapport aux IFNs de type 1, un nombre plus faible d'études (159) s'est intéressé à la signature moléculaire « IFN de type 2 » en tant que telle (utilisant des gènes comme CXCL9, CXCL10 ou SOCS1), mais en réalité, il existe

un chevauchement important des gènes induits par les deux voies, ainsi que des interactions entre elles. Ainsi, l'expression d'un certain nombre de gènes étiquetés comme étant dépendants des IFNs de type 1, peut aussi dépendre de l'IFN γ . Par exemple, l'essentiel de la signature IFN de type 1 à 5 gènes (IFI44, IFI44L, IFI27, RSAD2 et IFI6) décrite par Higgs *et al* (160), et retrouvée dans le sang et les tissus cibles de patients atteints de différentes pathologies auto-immunes, comme étant corrélée à l'activité de la maladie, semble aussi pouvoir dépendre de la voie de l'IFN γ (161). Aussi, dans le LES, l'expression de BAFF par les cellules présentatrices d'antigènes semble pouvoir être induite par l'IFN γ , alors qu'il s'agit, en dehors du LES, plutôt d'un gène sous la dépendance des IFNs de type 1 (162). Dans le LES, le dosage de certaines chimiokines (jugées plutôt sous la dépendance de l'IFN γ) a aussi été étudié, avec des données intéressantes pour certaines, comme CXCL10, CCL19 (MIP3B) et CCL2, dont les taux semblaient corrélés à l'activité de la maladie avec un intérêt dans la prédiction des poussées (163,164).

Un étude chinoise récente (165) a comparé deux signatures moléculaires sanguines (sur cellules mononuclées du sang), une jugée plutôt dépendante des IFNs de type 1 (MX1, IRF7, ISG15 et ISG20), et l'autre jugée plutôt dépendante de l'IFN γ (IRF1, GBP1, CXCL9, CXCL10 et SERPING1), chez 44 patients LES et 36 donneurs sains. Chez les patients LES, l'expression du gène de l'IFN γ et des gènes IFN γ -dépendants était plus élevée, avec une traduction en termes de synthèse protéique en cytométrie en flux, et la signature était corrélée au score d'activité *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI) (sans différence significative entre les patients avec ou sans atteinte rénale, comme cela a pu être décrit ailleurs), aux titres d'anticorps anti-ADN double brin et à la signature IFN de type 1.

On peut noter que l'essai de Munroe *et al* (152) chez 55 patients suivis plusieurs années avant leur diagnostic de LES a mis en évidence une augmentation très précoce (plus de 4 ans avant le diagnostic, avant même l'apparition des auto-anticorps) de l'IFN γ et de marqueurs dits IFN γ -dépendant (CXCL10, CCL7 [MCP3]), avec une corrélation entre les taux d'IFN γ et l'activité IFN de type 1 séro-induite (mesurée grâce à la lignée cellulaire reporthrice WISH). Compte-tenu de l'ensemble de ces données, il est tout de même très vraisemblable que l'IFN γ contribue aussi à la pathogenèse du LES, sûrement avec une chronologie différente de celle des IFNs de type 1 et au moins dans un sous-groupe de patients. D'ailleurs, de manière notable, comme pour les traitements par IFNs de type 1, il existe quelques cas publiés de LES induit par un traitement par IFN γ (166,167). Nous verrons aussi, dans la partie sur les traitements anti-IFNs, que les résultats des essais évaluant les traitements anti-IFN α ne sont pas forcément à la hauteur des attentes de la communauté scientifique, que la piste des anti-IFN γ a aussi été explorée avec un succès limité, et qu'il y a vraisemblablement de la place pour les traitements ciblant plus large.

Concernant les IFNs de type 3, deux études, une chinoise (168) et une taïwanaise (169), ont retrouvé de plus hauts niveaux d'expression d'IFN- λ 1 (dans l'étude chinoise) et d'IFN- λ 2 et/ou λ 3 (dans l'étude taïwanaise) chez des patients atteints de LES par rapport à des individus sains, avec aussi, pour l'étude taïwanaise, une corrélation positive (SLEDAI, anti-ADN double brin, CRP) ou négative (fraction C3 du complément) avec les marqueurs d'activité clinico-biologique connus dans la maladie. Une étude allemande (170) s'est aussi intéressée aux IFNs λ ,

mais dans le lupus cutané (lupus subaigu et lupus discoïde), est a montré qu'ils étaient surexprimés, avec leur récepteur, dans l'épiderme lésé de patients. Il existait aussi une augmentation des taux d'IFN λ 1 dans le sérum de patients, et les kératinocytes de patients étaient capables, après stimulation par des acides nucléiques, de produire des quantités importantes d'IFN λ 1 comparativement à leurs productions d'IFNs α , β ou γ .

Par ailleurs, un sur-risque de LES a été identifié, grâce aux genome wide association studies, comme étant associé à un polymorphisme du gène codant pour la chaîne spécifique (IL28R1) du récepteur aux IFNs de type 3 (SNP rs4649203) dans la population chinoise Han. Le rôle de ce polymorphisme n'est pas clairement identifié, mais pourrait jouer sur le niveau d'expression du récepteur voire sur sa capacité à transmettre le signal.

Des études récentes (171,172) s'intéressant aux trois types d'IFNs (par des techniques de dosages directs type ELISA ou multiplex) dans des cohortes de plusieurs centaines de patients lupiques, ont mis en évidence, d'une part, que tous les types d'IFNs étaient plus élevés chez les patients LES par rapport aux contrôles, et d'autre part, que différents profils d'activité pouvaient être identifiés en fonction du type d'IFN « prédominant ». Un taux élevé d'IFN α était associé à la présence de manifestations cutanéomuqueuses actives, ainsi qu'à la présence d'anticorps anti-Ro52 et d'anti-La. Le niveau d'activité IFN de type 1, mesurée grâce à un test fonctionnel (cellule reporthice WISH), était bien corrélé aux taux d'IFN α , mais aussi aux taux d'IFN γ , mais n'était pas associée aux mêmes manifestations que l'IFN α , avec plutôt la présence d'une maladie active, plus d'arthrites, plus de néphrites et la présence d'adénopathies. Etonnement, le profil associé à un taux élevé d'IFN γ était plutôt proche du profil précédent, avec une maladie très active, plus d'arthrites, plus de néphrites actives, des anticorps anti-Ro60 et une activation de la voie classique du complément. Enfin, un taux élevé d'IFN λ 1 était associé à la présence d'anticorps anti-nucléosome, et à une maladie plutôt moins sévère (moins de fièvre, moins de photosensibilité et moins d'atteinte arthromusculaire).

Sous réserve des limites techniques qu'impliquent les dosages directs utilisés (avec des difficultés pour mesurer des concentrations cliniquement et biologiquement pertinentes d'IFN α , comme nous le verrons plus loin), bien qu'un test fonctionnel utilisant la lignée WISH a aussi été utilisé dans l'une des deux études (172), ces données rejoignent les limites que nous évoquions plus haut vis-à-vis de la spécificité de la signature IFN, des limites des tests disponibles en routine, ainsi que l'interprétation difficile des résultats en lien avec les complexité des voies de signalisation détaillées dans la première partie de ce travail. Au total, ces résultats, comme d'autres, plaident pour une évolution vers de la médecine personnalisée nécessitant une évaluation plus fine des voies de signalisation impliquées pour chaque malade, afin de choisir la prise en charge la plus appropriée.

II.3 Le syndrome de Sjögren

Dès les premières observations rapportant la présence de taux anormaux d'IFN α dans le LES, des patients atteints de syndrome de Sjögren (SjS) ont aussi été étudiés et présentait la même anomalie (119,173). Depuis maintenant

environ 15 ans, il y a eu de nombreuses publications rapportant des éléments en faveur d'un rôle prépondérant de la voie des IFNs dans la physiopathologie de la maladie (174).

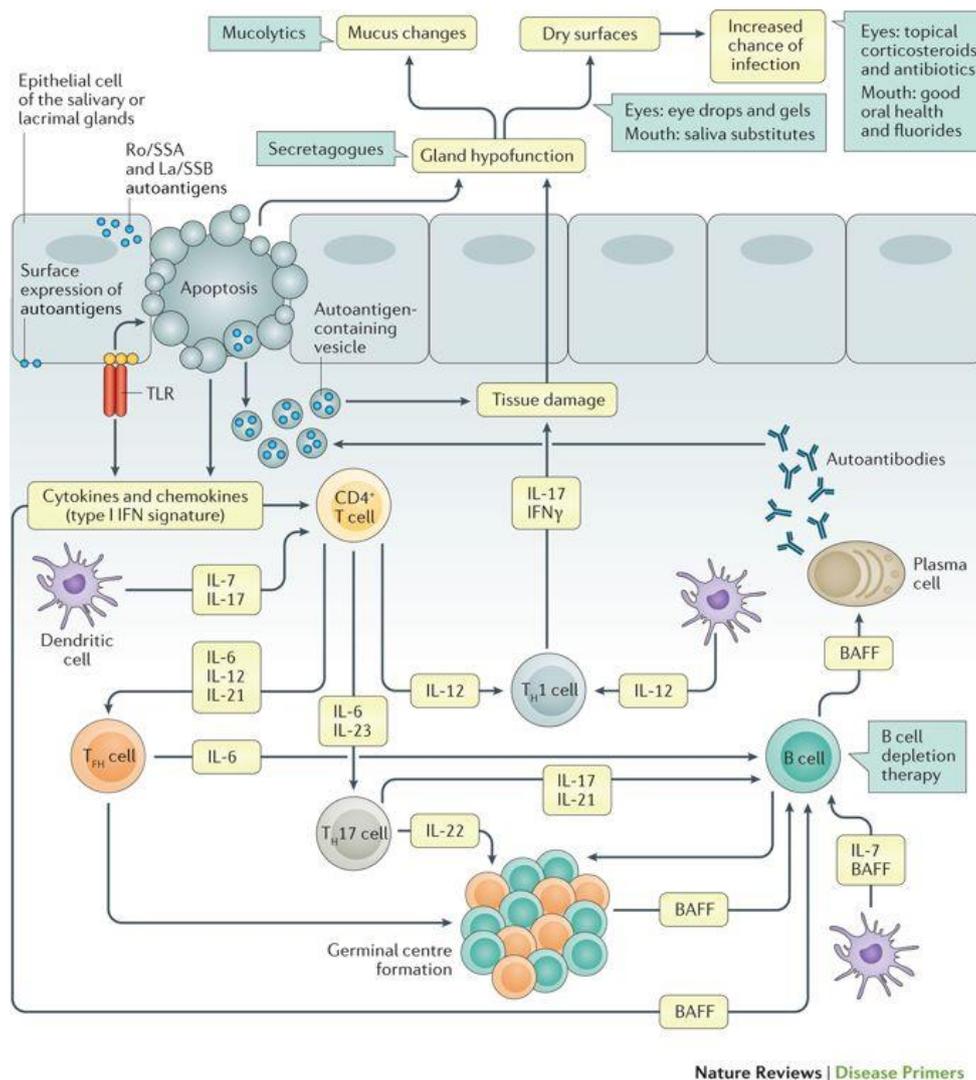


Figure 19. Aperçu de la complexité de la physiopathologie du syndrome de Sjögren et du rôle central des interférons, d'après Brito-Zeron *et al* (175)

Comme la détection de taux sériques d'IFN α n'était pas très informative (vraisemblablement du fait des limites techniques des tests utilisés, comme cela a déjà été évoqué), les premières publications importantes des années 2000, se sont particulièrement intéressées aux organes cibles du SjS, et en particulier aux glandes salivaires accessoires (176,177). Deux équipes scandinaves ont mis en évidence : la présence de cellules productrices d'IFN α (surtout au niveau des infiltrats lymphocytaires, peu au niveau glandulaire) selon différentes techniques (immunohistochimie et cytométrie en flux) et la présence d'une surexpression de nombreux ISGs (IFI27, IFI44, IFITM1, ISGF3G, IRF1, IFNAR2 mais aussi le gène codant pour une sous-unité du récepteur à l'IFN γ , IFNGR1, ainsi que CXCL10) parmi les gènes les plus différenciellement exprimés entre patients et sujet sains.

Le sérum (en particulier la fraction IgG) d'environ 80% des patients (dans cette étude) atteints de SjS pouvait par ailleurs induire la production d'IFN α par des cellules mononuclées du sang de donneurs sains (à des niveaux au

moins équivalent à ceux induits par du sérum de patients lupiques), lorsqu'il était combiné à du matériel nécrotique ou apoptotique (176). Comme dans le LES, cette induction de la production d'IFN α semblait être particulièrement liée à la présence d'auto-anticorps ciblant les ribonucléoprotéines (surtout les anticorps anti-Ro/SSA et La/SSB dans la maladie), du fait de la présence d'ARNs contenus dans les complexes immuns qui étaient en particulier reconnus par les pDC (notamment via le récepteur aux IgG, Fc γ RIIa). Là aussi, comme dans le LES, dès les premières observations, il semblait y avoir une association statistique, chez les patients dont le sérum était capable d'induire une production élevée d'IFN α , avec certaines manifestations extra-glandulaires de la maladie (atteintes cutanée, hématologique et pulmonaire).

Un article, publié plus de 10 ans après, a mis en évidence, dans le LES, mais avec les anticorps anti-Ro60/SSA (178), que les ARNs contenus dans le complexe ribonucléoprotéique en question correspondaient surtout à des séquences *Alu*, principal représentant de la famille des *short interspersed nuclear elements* (SINE, l'une des 3 familles de rétrotransposons), qui constitue tout de même 11% du génome humain. Les transcrits issus des rétrotransposons (SINE et *long interspersed nuclear elements* [LINE], en particulier), et surtout les anomalies dans les mécanismes qui les régulent, pourraient constituer l'un des premiers déterminants de la cascade aboutissant à la genèse des maladies auto-immunes systémiques, notamment le LES et le SjS (179,180).

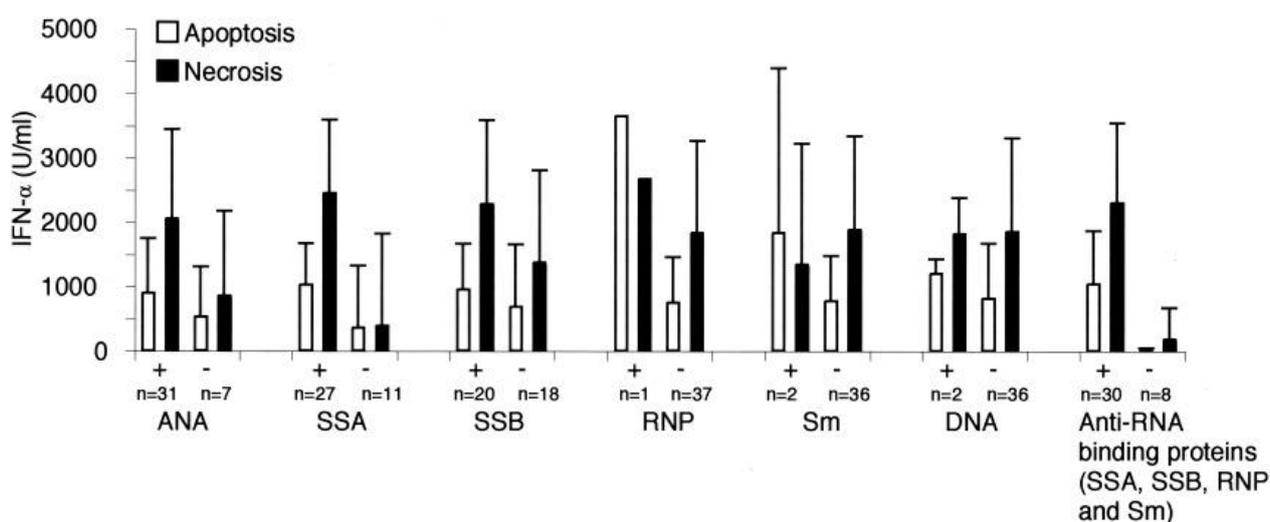


Figure 20. Profils d'induction de la production d'IFN α chez des cellules mononuclées de donneurs sains, en présence de matériel cellulaire, et selon la composition en auto-anticorps du sérum de patients atteints de syndrome de Sjögren, d'après Bave *et al* (176)

Les travaux publiés par la suite par Gottenberg *et al* (181), ont confirmé la présence d'une signature IFN, impliquant des gènes liés aux IFNs α et γ dont 23 reconnus dans la littérature comme des ISGs (182), parmi les 424 gènes exprimés différemment entre les glandes salivaires accessoires de patients SjS et celles des sujets sains. Parmi les ISGs, 21 étaient surexprimés (IFITM1, IFITM2, IFITM3, CD6, NALP2, PML, MICB, IL4R, ETV5, TAP2, SYK, B2M, MAP3K1, TLR9, DIABLO, EPHA4, COL16A1, TLR8, MATK, PRKCD et CCL20) et 2 étaient sous-exprimés (CCL18 et SOCS3). Ces résultats ont été confirmés avec une signature plus restreinte, au niveau des glandes

salivaires (TLR8, TLR9, IFITM1, BAFF et SOCS3) mais aussi au niveau des cellules conjonctivales (IFITM1 et BAFF), grâce à la réalisation d'une empreinte cornéenne. L'expression d'IFITM1 (et de BAFF) était par ailleurs induite *in vitro*, après stimulation des cellules épithéliales glandulaires (de patients et de sujets sains) par l'IFN α , mais aussi par l'IFN γ (de manière moins importante mais significative). Enfin, les auteurs ont aussi confirmé la présence de pDC dans le tissu salivaire de tous les patients SjS et d'aucun sujet sain.

Après les travaux principalement centrés sur l'étude des glandes salivaires accessoires des patients, c'est la signature IFN sanguine qui a été étudiée (183–186). Un premier essai d'une équipe hollandaise a comparé la signature transcriptomique de deux pools de monocytes de patients atteints de SjS à des sujets sains (184), ce qui a permis d'identifier 23 ISGs (IFI27, IFI44, IFI44L, IFITM1, IFITM3, RSAD2, IFIT1, IFIT2, IFIT4, USP18, SERPING1, HERC5, OAS2, OAS3, OASL, ISG15, LY6E, GBP1, GBP5, CXCL10, MX1, BIRC4BP, STAT1) parmi les 40 gènes différentiellement surexprimés entre les 2 populations. Comme précédemment, le dosage direct de l'IFN α n'était pas très performant, en revanche, l'IFN β était détectable chez la plupart des patients, et certains transcrits répondant plus à l'IFN β qu'à l'IFN α (CXCL11 et BCLAF-1) étaient surexprimés. Par ailleurs, le sérum de patient était capable d'induire (dans une lignée monocyttaire) l'expression de deux ISGs (IFI27, IFIT4) sur les 4 plus particulièrement étudiés (IFITM1, IFI44).

Enfin, les pDC sanguines (dont le nombre était plus faible que celui des sujets sains, contrairement à ce qui est observé dans les tissus cibles) exprimaient des marqueurs d'activation (CD40, CD86).

Une autre publication (185) a rapporté les résultats du même genre d'analyse transcriptomique sur sang total et sur cellules mononuclées du sang, menée sur deux cohortes indépendantes de patients atteints de SjS et de sujets sains. Les auteurs ont identifiés 38 gènes différentiellement exprimés entre patients et sujets sains, qui étaient communs aux deux cohortes. Parmi ces 38 gènes, 31 étaient des ISGs : OAS1, OASL, BST2, CEACAM1, ECGF1, FCGR1A, GBP1, IFITM1, IFITM3, IRF7, ISG20, G1P2, IFI27, IFI16, IFI30, IFI35, IFI44, IFIT1, IFIT2, MX1, MX2, PLSCR1, PSMB9, SECTM1, SERPING1, STAT1, SP110, WARS, α SF10, TNFAIP6 et UBE2L6. La corrélation de la signature IFN avec les titres des anticorps anti-Ro/SSA et La/SSB n'a pas été évaluée dans son ensemble, mais individuellement, avec un lien identifié pour certains ISGs. Enfin, on peut noter qu'une analyse a été faite sur les gènes des différents types d'IFNs, de leurs récepteurs et des IRFs, et seul IRF7 était significativement surexprimé dans les deux cohortes.

Du fait des résultats antérieurs de leur équipe (184), Brkic *et al* (183) ont étudié l'expression de 11 ISGs (IFI27, IFI44L, IFIT3, IFITM1, SERPING1, IFIT1, IFIT2, LY6E, IFI44, XAF1 et MX1) en utilisant les monocytes d'une cohorte de patients SjS, et ils ont montré qu'un score évalué grâce à une signature IFN à 5 gènes (IFI44L, IFI44, IFIT3, LY6E et MX1), déterminée après analyse en composante principale sur l'ensemble des données, était corrélée à l'EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index (ESSDAI) et à l'expression du gène BAFF (mais pas aux taux de protéine BAFF). On peut noter, au passage, que des travaux proches d'une équipe japonaise retenaient plutôt IFI27 (186) comme transcrit le plus « intéressant », car le plus surexprimé par rapport aux témoins et corrélé à certaines

données biologiques (titres d'IgG et des anticorps anti-nucléaires, taux de β 2-microglobuline et du récepteur soluble à l'IL2). Pour expliquer cette différence, en plus de la complexité de la voie des IFNs, on peut citer les différences en termes de terrain génétique, de méthode statistique et de technique pour l'analyse des transcrits (utilisation d'une puce à faible densité, avec « seulement » 778 gènes).

La signature IFN de Brkic *et al* (183) était positive chez 55% des patients, et associée à un score plus élevé d'ESSDAI (surtout en lien avec les atteintes glandulaire, cutanée et hématologique), des titres plus hauts d'IgG, d'anticorps anti-Ro60/SSA, anti-Ro52/SSA, anti-La/SSB et facteurs rhumatoïdes, et des niveaux plus bas de fraction C3, de lymphocytes et de neutrophiles. Pour 24 patients, la signature IFN a été évaluée à distance ($3,6 \pm 2,5$ ans) et ne variait pas au cours du temps. Aussi, le sérum des patients positifs pour la signature IFN était capable d'induire, *in vitro*, l'expression du gène codant pour BAFF dans une lignée monocyttaire. La même équipe a montré par la suite (187) que la mesure des taux de protéine MxA (issue de l'expression du gène MX1) était bien corrélée à la signature précédemment décrite, mais aussi à l'ESSDAI et aux titres des auto-anticorps, ce qui en faisait un bon outil pour mesurer l'activation de la voie des IFNs de type 1. Aussi, les patients sous hydroxychloroquine avaient des taux plus faibles de MxA. D'autres équipes ont cherché à identifier des paramètres « plus simples », pour refléter l'activation de la voie des IFNs, et il existe quelques données intéressantes en faveur de la mesure de l'expression de SIGLEC1 au niveau monocyttaire, mais surtout dans les formes systémiques de la maladie (187,188).

La même équipe hollandaise s'est intéressée aux mécanismes derrière la signature IFN sanguine identifiée chez les patients SJS (189), en étudiant en particulier le profil transcriptomique des pDC d'une petite cohorte de patients SJS (positifs et négatifs pour la signature IFN) et de sujets sains. Ainsi, ils ont mis en évidence qu'il y avait une surexpression des gènes en lien avec les voies de signalisation passant par TLR7 (TLR7, MYD88 et RSAD2 codant pour la Vipérine (190)) et par les récepteurs cytosoliques de la famille des RLRs (IFIH1, DDX58, DHX58, DDX60 et TBK1), contrairement à TLR9 qui était sous exprimé, en particulier chez les patients positifs pour la signature IFN (de manière notable, IFIH1 et DDX58 étaient sous exprimés chez les patients SJS dont la signature IFN était négative, mais aussi en cas de traitement par hydroxychloroquine). Ces résultats étaient comparables entre pDC et monocytes. Cela a été confirmé au niveau protéique, à l'échelle des monocytes mais aussi des glandes salivaires accessoires. Les auteurs ont aussi montré *in vitro*, que la stimulation par un agoniste de TLR7 de cellules mononucléés du sang de sujets sains, entraînait la surexpression des gènes de la voie des RLRs, et réprimait l'expression du TLR9.

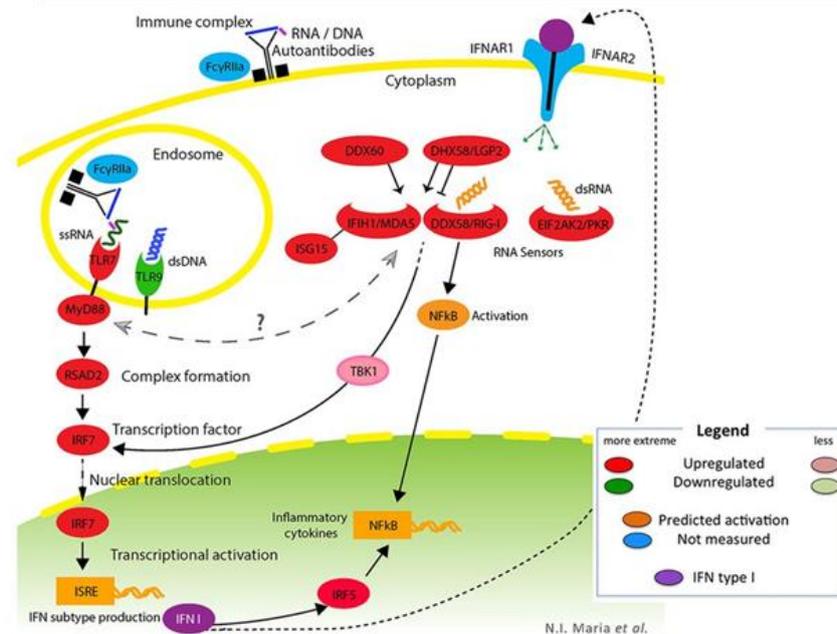


Figure 21. Représentation de l'activation de la voie de signalisation passant par TLR7 et les RLRs au niveau des monocytes de patients atteints de syndrome de Sjögren positif pour la signature IFN, d'après Maria *et al* (189)

Un autre récepteur intracellulaire aux acides nucléiques capable de reconnaître les ADNs, IFI16, a fait l'objet de plusieurs publications, dans les maladies auto-immunes, et en particulier dans le SjS (191,192). L'intérêt pour cet ISG tient dans le fait qu'il est la cible d'auto-anticorps particulièrement présents dans le SjS (entre 29 et 70%) et qu'il semble associé à certains éléments clinico-biologiques (focus score plus élevé, et présence de centres germinatifs, notamment) de la maladie (193).

Des travaux menés par une autre équipe sur le profil transcriptomique des pDC, évalué dans deux cohortes différentes, incluant à chaque fois des patients SjS, des patients avec syndrome sec non-SjS et des donneurs sains, ont été publiés récemment (194). Les profils des pDC de patients SjS et des patients avec un syndrome sec non-SjS étaient différents de ceux des donneurs sains, avec un profil proche de celui des pDC activées par des agonistes de TLR7 ou 9 pour les pDC de patients SjS.

Comme cela a été précédemment utilisé dans le LES, les auteurs ont analysé leurs résultats en utilisant un algorithme pour définir des modules transcriptionnels, c'est-à-dire des ensembles de gènes dont l'expression était coordonnée. Les auteurs ont ensuite fait des recoupements entre les modules déterminés dans la première cohorte et ceux déterminés dans la deuxième, afin d'avoir les modules les plus robustes et reproductibles. Au sein de chaque module, les *hub-genes* ont été identifiés, c'est-à-dire les gènes dont l'expression était la plus fortement corrélée avec l'expression des autres gènes contenus dans le même module. Dans le module qui était particulièrement enrichi avec des ISGs, 4 des 5 gènes précédemment utilisés par la même équipe comme signature IFN (183) dans le SjS, étaient des *hub-genes* : IFI44L, IFI44, IFIT3 et MX1.

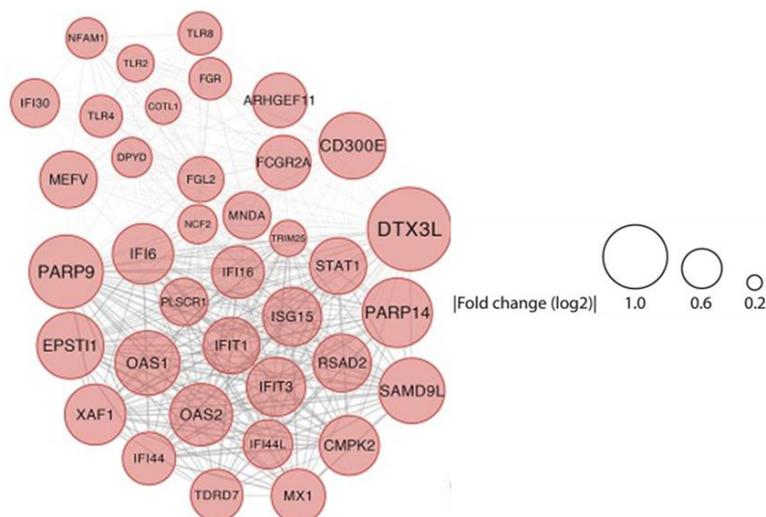


Figure 22. *Hub-genes* identifiés dans le module transcriptionnel contenant les *interferon-stimulated genes* chez les cellules dendritiques plasmacytoïdes de patients atteints de syndrome de Sjögren, d'après Hillen *et al*(194)

Aussi, l'un des modules transcriptionnels identifié chez les patients SjS contenait de nombreux gènes dont l'expression était réduite, qui codaient pour des protéines ribosomale. La réduction de la transcription et de la traduction des protéines ribosomales étant un élément connu comme étant associé à l'activation des cellules dendritiques (195), notamment après activation des TLRs (196), dont le TLR7. Ainsi, les pDC sanguines des patients atteints de SjS avaient les caractéristiques transcriptionnelles de pDC activées, et étaient capables de produire des quantités plus importantes d'IFN α et d'IFN β après stimulation par un agoniste de TLR7 (capacité réduite lorsqu'un traitement immunosuppresseur était en cours), de TNF α sans stimulation, et de CXCL10 après stimulation par un agoniste de TLR9, par rapport aux sujets sains. En revanche, les productions d'IFN λ 1 et d'IL12 n'étaient pas plus importantes.

Une analyse transcriptomique des lymphocytes B de patients SjS positifs pour les anticorps anti-Ro/SSA a été menée par une autre équipe (197). Les auteurs ont mis en évidence 1826 gènes surexprimés différemment, incluant de nombreux ISGs, comme CX3CR1, TNFSF4, TNFSF10, S100A8/A9, IFI27, IFI44L, IFI44, MX1, PARP9, OAS1 ou OAS2 (la voie des IFN était l'une des voies cellulaires les plus représentées). Les modifications épigénétiques ont aussi été étudiées, en particulier le profil de méthylation, et il se trouve que plusieurs ISGs étaient hypométhylés MX1, IFI44L, PARP9, IFIT1, IFITM1, IFITM3, RSAD2 et USP18.

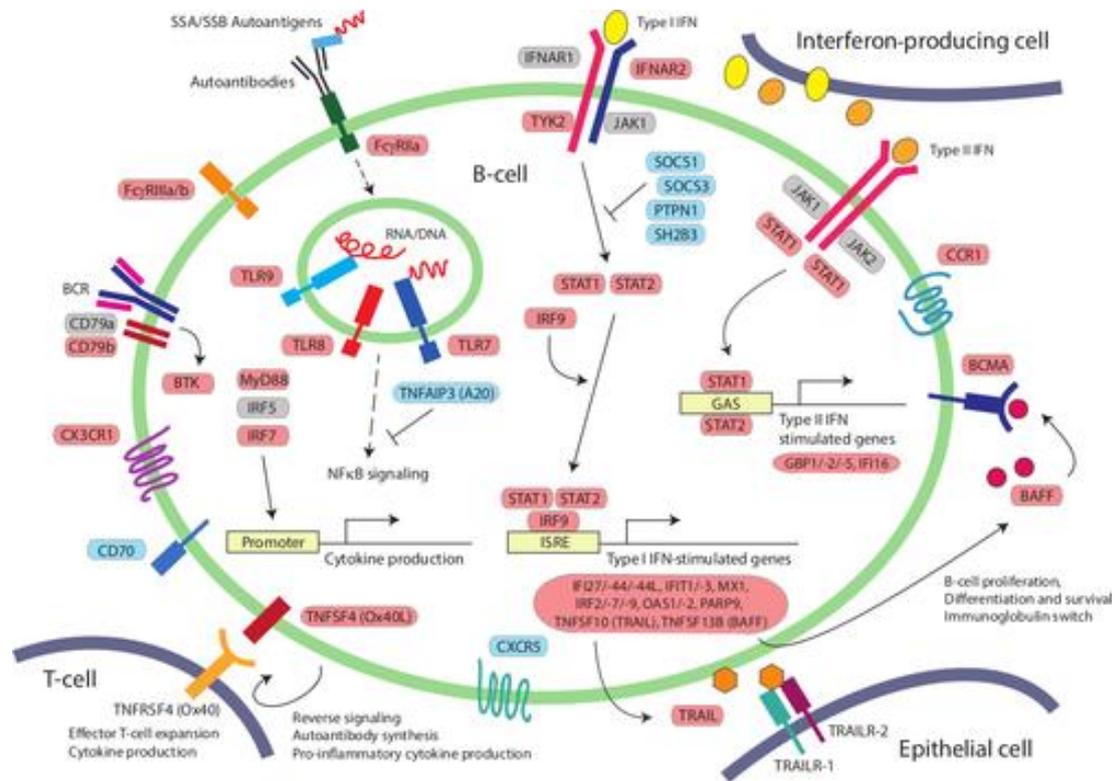


Figure 23. Représentation schématique de la signature moléculaire (gènes surexprimés en rouge , gènes sous exprimés en bleu, et gène « neutres » en gris) des lymphocytes B dans le syndrome de Sjögren séropositif pour les anticorps anti-Ro/SSA, d'après Imgenberg-Kreuz (197)

Comme nous l'avons vu en préambule (et comme nous le verrons encore dans la partie sur les traitements anti-IFN), la cascade de signalisation des trois types d'IFNs (et de nombreuses autres cytokines, pour certaines, impliquées dans la physiopathologie du SjS, comme l'IL6, l'IL7 ou l'IL12 par exemple (198)) passe par différents intermédiaires, dont certains membres de la famille des STATs (52). Ainsi, en plus du risque identifié de développer un SjS conféré par certains polymorphisme de STAT4 (que nous discuterons plus en détails après), les niveaux d'expression et d'activation (par phosphorylation) de différents STATs ont été étudiés dans le SjS, avec la mise en évidence d'une augmentation pour STAT1 (impliqué dans la signalisation par les IFNs) au niveau des glandes salivaires (infiltrats cellulaires inflammatoires et cellules canaliculaires) (199), pour STAT3 (notamment impliqué dans la signalisation par l'IL6 et l'IL10) au niveau des lymphocytes T circulants (200) et de STAT5 (notamment impliqué dans la signalisation par l'IL2 et l'IL7) au niveau de certaines cellules mononuclées du sang (surtout les lymphocytes T CD4, mais aussi CD8, les lymphocytes B et les monocytes) (201). Dans une première étude, Davies *et al* (202), ont montré que ces différences en termes de profils de phosphorylation pour STAT1 (au niveau des lymphocytes B) et STAT3 (au niveau des lymphocytes T) semblaient être particulièrement présentes après stimulation *in vitro* par l'IFN α 2b. Dans une étude plus poussée, la même équipe (203) a montré qu'il existait, à l'état basal, différents profils de phosphorylation entre patients SjS, et sujets sains, au niveau des lymphocytes T (pour STAT1, STAT5 mais aussi ERK ou NF κ B) et des lymphocytes NK (pour STAT1 et STAT5). Après

stimulation avec des agonistes des TLR7 et 9, le profil de phosphorylation des lymphocytes B (qui n'était pas différent de celui des lymphocytes B des sujets sains à l'état basal) a été le plus modifié (en particulier en l'absence de traitement immunomodulateur), avec des niveaux de phosphorylation de STAT 1 et de STAT3 plus importants que chez les sujets sains. Le niveau de corrélation de STAT3 dans les lymphocytes B était corrélé avec la signature IFN de type 1 (MX1, IFI44, OAS1), mais pas avec une signature IFN plutôt de type 2 (GBP1 et GBP2).

Pour mémoire, les anticorps monoclonaux anti-TNF α ont, un temps, été porteurs de beaucoup d'espoir pour la prise en charge des patients atteints de SjS, mais les essais cliniques menés sont revenus négatifs. Une étude menée sur des patients SjS traités par etanercept a cependant rapporté des résultats intéressants (50), puisqu'après 12 semaines de traitement, les patients présentaient, par rapport au groupe placebo, une augmentation de leur activité IFN de type 1 analysée avec la lignée reportrice WISH (ce qui a été confirmé in vitro, en mesurant l'expression d'IFNA2, IFIT1 et BAFF sur cellules mononuclées du sang incubées avec de l'etanercept).

Au niveau génétique, certains polymorphismes de gènes impliqués dans la voie des IFNs de type 1 ont aussi été décrit comme étant à risque de développer un SjS. D'ailleurs, la majorité des gènes concernés sont aussi concernés par des polymorphismes (parfois les mêmes) à risque de développer un LES : essentiellement IRF5 et STAT4 (204–207), mais aussi PTPN22 (208). Un polymorphisme à risque de développer un SjS, mais non impliqué dans le LES, a été identifié sur un autre gène connu pour être un ISG : OAS1 (209).

Les variants à risque décrits pour IRF5 et STAT4 sont les variants précédemment décrits dans le LES, et contribuent à une activation plus importante de la voie des IFNs de type 1. La présence de l'allèle d'IRF5 à risque (comportant 4 répétitions CGGGG) (205), chez des patients SjS, n'était pas associé à des manifestations cliniques ou biologiques particulières, en revanche, chez les patients porteurs, positifs pour les anticorps anti-Ro/SSA et/ou La/SSB, le niveau d'expression sanguine du transcrite d'IRF5 était plus élevé que chez les patients non porteurs, et les cellules épithéliales issues des glandes salivaires de ces patients exprimaient plus IRF5 après infection par un reovirus (virus à ARN reconnu par le TLR3). Les cellules mononuclées du sang de ces patients avaient aussi des niveaux d'expression plus élevés de MX1 et d'IFITM1, deux ISGs fréquemment utilisés, mais pas de PKR. Concernant STAT4, le polymorphisme à risque de développer la maladie n'était pas associé à un profil clinico-biologique particulier, en revanche, l'association des polymorphismes à risque identifiés pour STAT4 et IRF5, semblait conférer un risque cumulatif de développer un SjS, culminant, dans la situation la moins favorable, à un odds ratio à 6,78 (210), évalué dans une population scandinave.

Les polymorphismes touchant PTPN22 (208) et OAS1 (209), identifiés plus récemment, étaient, eux, plutôt associés à la survenue de formes de SjS sans signature IFN. Enfin, un polymorphisme concernant BAFF, un ISG bien connu, a aussi été identifié comme étant à risque de SjS séropositif (211).

Il existe par ailleurs, toujours comme dans le LES, des SjS induits par le traitement par IFN α (212–214).

Concernant les IFNs de type 2, dès les premières études sur la signature moléculaire présente au niveau des glandes salivaires accessoires (181), il a été évoqué que certains gènes différenciellement exprimés entre patients et sujets sains, étaient régulés par l'IFN γ comme IFITM1, CXCL10, STAT1 α et STAT1 β (215). Concernant l'expression IFN γ -dépendante de BAFF dans le SjS, contrairement à ce que nous avons vu dans le LES (162), elle a été étudiée par plusieurs équipes, avec des résultats variables (l'expression IFN α -dépendante de BAFF étant plus largement retrouvée) (181,216,217).

Du fait du chevauchement important entre la signature moléculaire induite par les IFNs de type 1, et celle induite par l'IFN de type 2, des efforts ont été faits dans le SjS, pour essayer de distinguer les deux signatures, afin d'identifier au mieux les mécanismes physiopathologiques à l'œuvre chez chaque patient, toujours dans une optique de médecine personnalisée. Hall *et al* (161) ont mené leurs travaux en commençant par l'étude d'une lignée humaine de cellules glandulaires sous-mandibulaires qu'ils ont stimulé par de l'IFN α ou de l'IFN γ (à des concentrations choisies pour chacune des cytokines parce qu'elles étaient capables induire le même niveau d'expression de Ro52/TRIM21, auto-antigène fréquent dans le SjS, dont l'expression est connue pour être sous la dépendance de ces deux types d'IFNs). Grâce à cette première étape, ils ont pu identifier plusieurs éléments intéressants :

- Le pic d'expression des transcrits après stimulation par l'IFN α a été atteint précocement, à 12H, contre 48H pour les transcrits post-stimulation par l'IFN γ (n=165 pour l'IFN α , contre n=285 pour l'IFN γ , sur un total de 416 transcrits surexprimés par l'une ou l'autre cytokine sur les 48H de stimulation)
- Au pic, seulement un tiers des transcrits surexprimés après stimulation par l'IFN α étaient spécifiques de cette cytokine, contre plus de la moitié après stimulation par l'IFN γ
- De manière générale, les niveaux d'expression des gènes étaient plus importants pour ceux qui étaient sous la dépendance des deux IFNs, et les gènes dont l'expression était spécifiquement stimulée par l'IFN α , étaient exprimés à un niveau assez faible (log2 fold change <3)

Grâce à une méthode statistique non supervisée (dite de *self-organizing maps*), les 416 gènes ont été clustérisés en 16 groupes, et le niveau moyen d'induction d'expression par l'IFN α et par l'IFN γ a été analysé, pour chaque gène de chaque groupe, à chaque temps de stimulation (4H, 12H, 24H, 48H). Cette première analyse a permis de confirmer que peu de transcrits étaient spécifiquement régulés par l'IFN α , puisque sur les 4 clusters de gènes (n=65) les plus surexprimés après stimulation par l'IFN α , 3 (n=45 gènes) clusters étaient aussi significativement surexprimés après stimulation par l'IFN γ . Parmi ces gènes sous « co-dépendance », de nombreux faisaient partie des signatures IFN déjà décrites dans la littérature (OAS1, OAS2, OAS3, IFI6, IFI35, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFITM1, IFI44L, IFI44, ISG15, IFI27, IFI6, STAT1, STAT2, IRF7, TAP1, SP110, LAP3, UBE2L6, PARP9), alors qu'elles étaient en générale décrites dans la littérature comme étant des « signatures IFN de type 1 ». En revanche, 2 sur les 3 clusters de gènes les plus surexprimés après stimulation par l'IFN γ (n=34) étaient soit purement spécifiques de cette cytokine (n=12), soit très préférentiellement induits par l'IFN γ (n=11). Le complément d'analyse au niveau

protéique arrivait au même genre de conclusions, IFIT3, MDA5 et Ro52 atteignait un pic à 12H, assez spécifique de la stimulation par l'IFN α , mais avec aussi un effet de la stimulation par l'IFN γ (bien que plus faible), à 24H et 48H. Les protéines GBP1 et GBP2 étaient en revanche très spécifiques de la stimulation par l'IFN γ . Ainsi, l'analyse des transcrits ou des protéines spécifiquement IFN γ -dépendants semblait être une option bien plus intéressante pour faire le distinguo entre l'activation de l'une ou l'autre voie. Les auteurs ont donc comparé les glandes salivaires accessoires de 8 patients SjS et de 8 témoins, en ce qui concerne les expressions de MDA5, IFIT3, GBP1 et GBP2 (par immunoblot et immunohistochimie). Six patients sur les 8 présentaient des profils protéiques évoquant une activation à la fois de la voie des IFNs de type 1 et de l'IFN de type 2, et concernant les 2 patients restants, l'un avait un profil plutôt « IFN de type 1 », et l'autre plutôt « IFN de type 2 ». Par la suite, la même équipe a évalué l'intérêt clinique de ces marqueurs protéiques (avec surtout une version simplifiée, évaluant la présence d'IFIT3 et de GBP1 par immunoblot) dans une cohorte de 53 patients atteints de SjS et 29 sujets sains (218). Ils ont montré que 58% des patients présentaient une activation des voies des IFNs, avec un profil clinico-biologique de maladie plus active (débit salivaire abaissé, leucopénie, hypergammaglobulinémie, titres élevés d'anticorps anti-nucléaires et en particulier d'anti-Ro/SSA et focus score élevé). En revanche, même si l'analyse des profils protéiques a bien permis d'identifier des patients plutôt « IFN de type 1 » (29%), plutôt « IFN de type 2 » (35,5%) ou « mixtes » (35,5%), aucune différence clinique n'a été mise en évidence entre ces groupes, avec simplement une association entre le groupe « IFN de type 2 » et des marqueurs paracliniques d'activité (focus score, infiltrats CD45+ et *ocular staining score* élevés, et C4 abaissé).

Nezos *et al* (217) ont étudié l'expression de 3 transcrits plutôt dépendants des IFNs de type 1 (MX1, IFIT1, IFI44), de 2 transcrits plutôt dépendants de l'IFN γ (GBP1, CXCL9), mais aussi des transcrits codant pour l'IFN α , l'IFN γ , BAFF, TRAIL, Ro52 et p53, et ce sur sang total et glandes salivaires de patients (avec un groupe atteint de SjS sans lymphome, un groupe atteint de SjS avec lymphome, et un groupe de sujets sains). Les signatures IFN de type 1 et de type 2 étaient plus élevés dans le sang et les glandes salivaires accessoires des patients, avec un profil mixte au niveau sanguin, et plutôt IFN de type 2 au niveau tissulaire. Par ailleurs, l'expression de CXCL9 était la seule qui était différente entre les patients avec lymphome et ceux qui n'en avaient pas développé, avec une surexpression dans la groupe lymphome. Par ailleurs, le profil d'expression des gènes codant pour les IFNs, au niveau des glandes salivaires accessoires (et pas dans le sang), était particulièrement intéressant chez les patients qui ont développé un lymphome, avec une sous expression du gène de l'IFN α (corrélée à la sous expression de gènes codant pour des molécules pro-apoptotiques IFN α -dépendantes) et une surexpression de celui de l'IFN γ (associée à la présence de purpura et d'un C4 bas). Cela faisait du ratio IFN γ /IFN α un bon marqueur de survenue de maladie lymphoïde maligne (le meilleur seuil, déterminé par courbe ROC, donnait à ce dosage une sensibilité de 88,9% et une spécificité de 87,5%).

Comme cela a été fait dans le LES (219), Bodewes *et al* (220), ont réalisé une analyse par modules transcriptionnels de la signature moléculaire sanguine de patients SjS, mais en se limitant à l'expression de 5 gènes représentatifs de chaque module (après analyse en composante principale) déjà identifié : IFI44, IFI44L,

IFIT1, IFIT3 et MX1 pour le premier (plutôt dépendant de l'IFN α et peu variable), ZBP1, EIFAK2, IFIH1, PARP9 et GBP4 pour le deuxième (plutôt dépendant de l'IFN β et/ou de l'IFN γ , peu induit par l'IFN α , et plutôt variable) et PSMB9, NCOA7, TAP1, ISG20 et SP140 pour le troisième (nécessitant l'action simultanée des IFNs de type 1 et de type 2, et très variable). A trois exceptions près, les résultats étaient concordants avec ceux obtenus dans le LES concernant la présence de « seuils d'activation » des différents modules. Les auteurs ont estimé que les patients chez qui, seuls les gènes du premier module étaient surexprimés, avaient plutôt une activation de la voie des IFNs de type 1, tandis que les patients chez qui les gènes des 2 premiers, voire des 3 modules, étaient surexprimés, avaient à la fois une activation de la voie des IFNs de type 1 et de l'IFN de type 2. Comme évoqué plus haut sur d'autres données (218), cette différence de signature n'était pas associée à des différences cliniques jugées sur l'ESSDAI ou l'ESSDAI clinique, en revanche la présence d'une signature mixte impliquait plus d'anomalies biologiques (domaine biologique de l'ESSDAI), alors que son absence semblait être associée à plus de douleurs. La variation des 3 modules transcriptionnels au fil du temps a été évaluée dans une petite proportion des patients (n=15), avec une deuxième mesure (à $1,8 \pm 0,8$ ans de la première, en moyenne), et seul le module le plus variable était statistiquement différent entre les deux points.

Enfin, l'étude suédoise publiée récemment sur l'analyse du profil transcriptomique des lymphocytes B de patients SJS (197), a mis en évidence, la surexpression de gènes plutôt spécifiques de la voie de l'IFN γ , comme GBP1 et GBP5, mais aussi IFI16, par rapport aux témoins.

Toujours dans le sens d'un rôle pour l'IFN de type 2 dans le SJS : une analyse des données cliniques et paracliniques de l'essai BELISS (221), a mis en évidence que la présence d'un faible nombre de lymphocytes NK dans le sang et au niveau des glandes salivaires accessoires, était le seul facteur prédictif (y compris les taux de BAFF) de bonne réponse au belimumab (anticorps monoclonal anti-BAFF). Les auteurs évoquaient donc la présence d'au moins deux sous-groupes de patients, un premier où l'axe IFN de type 1-BAFF-Lymphocytes B était prédominant, et l'autre où il s'agissait plutôt de l'axe IFN γ -Lymphocytes NK qui était à l'œuvre. Une signature plutôt IFN de type 2, avec 2 gènes (CXCL9, GBP1), a d'ailleurs été évaluée dans cet étude, et n'était logiquement pas modifiée par le traitement (222). Pour mémoire la signature IFN de type 1 (MX1, IFI44, IFIT1) n'a pas non plus été modifiée dans cette étude, mais les patients chez qui elle était élevée initialement sont ceux chez qui les effets humoraux (réduction des IgG, IgA, IgM et facteurs rhumatoïdes) étaient les plus marqués.

Au niveau génétique, une équipe japonaise (223) a identifié un polymorphisme à risque de développer un SJS dans le gène MCP-1, dont l'expression semble être sous la dépendance de l'IFN γ . (197)

Concernant les IFNs de type 3, les données sont évidemment plus rares, mais quelques études ont été menées. L'expression des gènes codant pour les IFNs de type 3, et pour leur récepteur, a été examinée dans différentes conditions (224). Tous les IFNs λ étaient exprimés par les cellules acineuses et canaliculaires des glandes salivaires

des patients, mais aussi, des témoins, avec une expression plus élevée d'IFN λ 2 chez les patients. En sus, les IFNs λ 2 et λ 3 étaient aussi exprimés au niveau des cellules composant les infiltrats mononucléés des glandes des patients. Au niveau des glandes salivaires accessoires, toutes les cellules, sauf les fibroblastes, exprimaient la chaîne spécifique IFN λ R1 du récepteur aux IFNs λ , avec une expression particulièrement forte au niveau des pDC. Au niveau du sérum, les taux d'IFN λ 1 étaient augmentés chez les patients par rapport aux témoins. Ces résultats ont été confirmés par une autre équipe (225), qui a en plus montré que les IFNs λ étaient capable d'induire l'expression des gènes CXCL10, BAFF et TLR3 dans des lignées cellulaires épithéliales de glandes salivaires. Les auteurs ont aussi montré que l'IFN λ avait un effet synergique avec l'IFN α (sur l'induction d'expression de CXCL10, de BAFF, et la phosphorylation de STAT1) mais aussi avec l'IFN γ (sur la phosphorylation de STAT1).

II.4 Le syndrome des anticorps anti-phospholipides

Dans le syndrome des anticorps anti-phospholipides (SAPL), les données concernant l'implication des IFNs ne sont pas aussi nombreuses qu'on pourrait l'imaginer, compte-tenu de l'association préférentielle qui existe entre cette maladie à hauts risques thrombotique et obstétrical, et le LES. Cela dit, on peut tout de même citer les résultats de quelques études de bonne taille particulièrement récentes (226–229), qui se sont intéressées à la signature IFN dans différentes populations d'intérêt (patients avec SAPL primitif, SAPL/LES, LES et évident des sujets sains). Tout d'abord, toutes ces études ont montré qu'une partie des patients atteints de SAPL primitif, avec une proportion variant entre 38 et 49%, présentait une signature IFN sanguine évaluée dans différents types cellulaires (cellules mononucléées du sang, monocytes, lignées cellulaires induites par du sérum de patients) et avec différentes combinaisons d'ISGs (MX1, IFIT1, IFI44 ou PKR, IFIT1, IFI44 ou LY6E, IFITM1, SERPING1, IFI44L ou DNAJA1, IFI27, IFI6, IFIT5, MX1, TYK2). Ce qu'on peut retenir de ces études, c'est que la positivité d'une signature IFN était associée positivement au sexe féminin, à la survenue d'une pré-éclampsie, à la survenue plus précoce du premier évènement thrombotique, à la présence d'anticorps anti- β 2GP1, et à la présence de proportions plus élevées de monocytes pro-inflammatoires (connus pour être associés à une augmentation du risque cardiovasculaire dans la PR et le LES) et négativement à un âge plus avancé et à la présence d'un traitement par hydroxychloroquine mais aussi par statine (mais nous verrons que cela n'est pas si étonnant dans la partie sur les traitements anti-IFN). La production de facteur tissulaire (un élément jugé central dans le risque thrombotique) a été étudiée par une équipe (228,230), retrouvant une tendance à l'augmentation chez les patients SAPL avec une signature IFN positive, mais sans différence significative. Aussi, élément très intéressant, dans une étude (227), un groupe de patients atteints de thrombophilie « non-immunologique » (déficits en protéine C, S et hyperhomocystéinémie) a été inclus, et avait une signature moléculaire sanguine comparable à celle des individus sains étudiés. Enfin, on peut noter que dans les cas de SAPL/LES ou LES seul (228–230) la proportion de patients dont la signature IFN était positive, et le niveau de signature IFN, étaient plus importants.

Indépendamment des études précédentes, il a aussi été montré (231), *in vitro*, que des anticorps impliqués dans le SAPL étaient capable d'induire la transcription des gènes codant pour le TLR7 dans les pDC, et le TLR8 dans les

monocytes, mais aussi d'induire la translocation des protéines correspondantes du réticulum endoplasmique aux endosomes, rendant ces cellules particulièrement sensibles à l'action des ligands de ces TLRs, et donc à la production d'IFNs.

II.5 Les myosites

Au sein du groupes des myopathies inflammatoires idiopathiques ou myosites, il existe des études, dans la dermatomyosite (DM), mais aussi dans la polymyosite (PM) (par rapport aux myosites à inclusions, qui ont souvent été étudiées concomitamment), en particulier dans les formes juvéniles de ces maladies, qui retrouvent une hyperactivation de la voie des IFNs de type 1 dans environ 50% des cas, avec la positivité de la signature IFN (232–235) dans le sang et/ou les tissus cibles (essentiellement pour la DM, dans les muscles et la peau), des dépôts tissulaires (plutôt périfasciculaires au niveau musculaire) de protéines IFN-dépendantes (normalement absentes du tissu sain) comme MxA ou ISG15 (233,234,236,237), mais aussi une augmentation de l'activité fonctionnelle des IFNs de type 1, *via* des tests cellulaires (232,238). Une étude (232) a particulièrement attribué cette signature IFN à une augmentation sanguine de l'IFN β (avec des données expérimentales plus récentes allant dans ce sens, en lien avec l'induction IFN β -dépendante de stress oxydatif (239)), par rapport aux IFNs α et ω , chez les patients atteints de DM, avec les limites techniques (que nous détaillerons dans la partie correspondante) qu'impliquent un dosage ELISA, même de haute sensibilité, pour mesurer des concentrations cliniquement pertinentes d'IFNs. Ces résultats sont concordants avec une analyse de l'expression cutanée des différents types d'IFNs de type 1 (7 IFNs α , l'IFN β , l'IFN κ et l'IFN ω) et de l'IFN de type 2, chez des patients atteints de DM, où l'IFN β était le seul IFN de type 1 à être corrélé avec la signature IFN (235).

Par ailleurs, dans la DM, au niveau musculaire (240), le gène codant pour le récepteur cytosolique aux acides nucléiques, RIG-1, semblait être surexprimé, avec une corrélation en termes de production de la protéine correspondante, ce qui n'était pas retrouvé dans la PM, les myosites à inclusion ou chez les sujets sains. Aussi, l'utilisation *in vitro* de ligands de RIG-1 entraînait la production d'IFN β par les cellules de patients, à l'origine d'une boucle d'auto-amplification. Il est par ailleurs intéressant de remarquer que MDA5, un autre récepteur primordial dans la reconnaissance cytosolique des acides nucléiques, aboutissant à la production d'IFNs de type 1, est la cible d'auto-anticorps spécifiques d'une forme de DM dite « amyopathique », où l'atteinte musculaire est plutôt au second plan, voire absente, au profit d'une atteinte pulmonaire interstitielle sévère parfois associée à des manifestations cutanéomuqueuses importantes (241–243).

Il est par ailleurs très intéressant de savoir que l'activation de la voie des IFNs de type 1 a plusieurs fois été rapportée comme étant corrélée à l'activité clinique des myosites (244,245), avec, ici, un intérêt dans le suivi (236,238,246).

Concernant la signature IFN, l'analyse transcriptomique *via* des puces à ADN a été largement utilisée, retenant, selon les cas et les conditions expérimentales, un nombre plus ou moins important d'ISGs (jusqu'à 136 gènes (246)) dont l'expression était augmentée chez les patients atteints de myosites, mais quelques signatures sanguines plus restreintes, corrélées à l'activité de la maladie (et donc, avec un intérêt clinique) ont été retenues

par certaines équipes : notamment avec des signatures à 3 (IFIT1, G1P2 et IRF7) et 13 gènes (IFI6, IFI27, IFI44L, IFI44, OAS1, OAS3, RSAD2, IFIT1, IFIT3, ISG15, HERC5, MX1 et ESPT1) (245,246). On peut noter que, comme pour la sclérodémie systémique que nous évoquerons juste après, la présence, chez ces patients, d'auto-anticorps ciblant des ribonucléoprotéines, comme les anticorps anti-Ro/SSA, La/SSB ou anti-Sm, était particulièrement associée à la signature IFN (247).

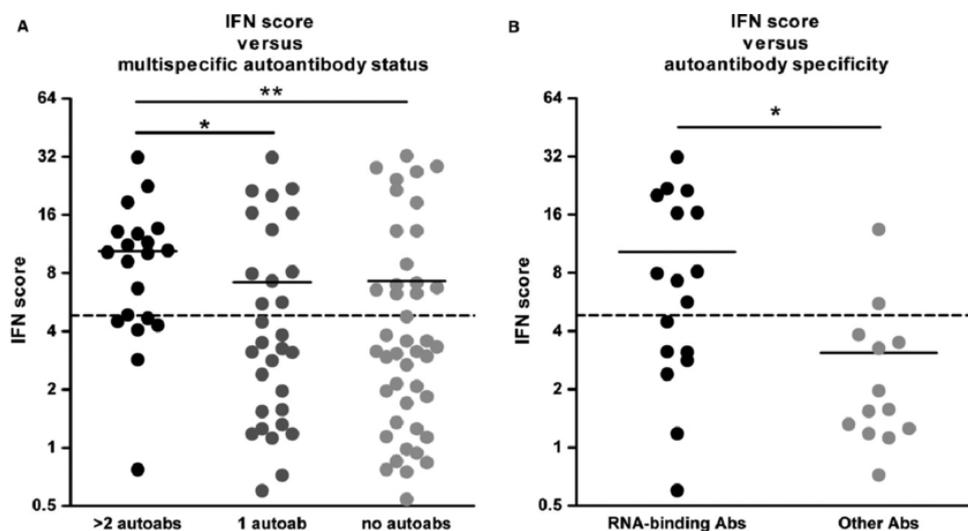


Figure 24. Niveau de signature IFN en fonction du nombre et du type d'auto-anticorps, dans les myosites, d'après Ekholm *et al* (248)

Concernant les auto-anticorps plus classiquement associés aux myosites, la fraction immunoglobuline G de patients positifs pour les anticorps anti-Jo1 semble être capable d'induire la production d'IFN α par des cellules mononuclées de donneurs sains, *in vitro*, en présence d'ARNs (249).

Des pDC ont été retrouvées au sein des muscles de patients, mais aussi au niveau des lésions cutanées dans la dermatomyosite (250–252), avec une différence notable par rapport au LES, puisque ces cellules étaient essentiellement localisées dans l'épiderme dans le DM, et plutôt dans le derme dans le LES (251).

Concernant la génétique, les études menées dans les myosites auto-immunes sont moins nombreuses que dans le LES, mais ont tout de même permis d'identifier des polymorphismes de gènes à risque, notamment de STAT4 et d'OPN (253), qui sont directement impliqués dans la voie des IFNs (254). Parmi les polymorphismes à risque impliquant des gènes ne faisant pas directement partie de la voie des IFNs, certains ont en revanche été retrouvés comme étant associés à la présence d'une activation de la voie des IFNs, touchant notamment le gène codant pour le TNF α (253). D'autres polymorphismes à risque ont été décrits, en particulier pour des gènes codants pour des molécules HLA, mais aussi au niveau de PTPN22 (comme dans le LES), qui semblait avoir un impact sur la voie des IFNs de type 1 (255), mais avec des données contradictoires dans les myosites auto-immunes (253).

En ce qui concerne les myosites, des case reports ont aussi été rapportés suite à un traitement par IFN pour une autre indication (256).

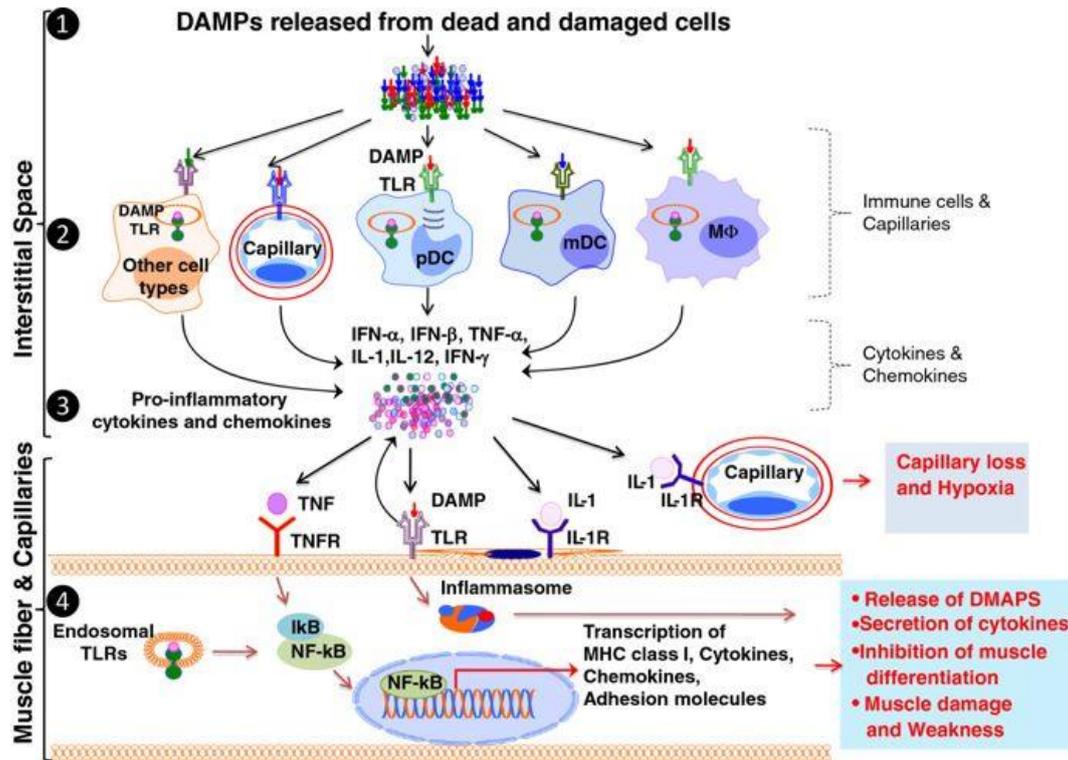


Figure 25. Schéma général de l'immunopathologie des myosites, à l'échelle générale et musculaire, d'après Rayavarapu *et al* (257)

Concernant l'IFN de type 2, CXCL10, une chimiokine reconnue comme étant plutôt sous la dépendance de l'IFN γ , a été étudiée dans la DM, et il a été montré que les niveaux de CXCL10 étaient corrélés à la signature IFN et à la sévérité de la maladie (244). Aussi, dans l'étude de Wong *et al* (235) où l'expression du gène de l'IFN β était la seule, parmi les IFNs de type 1 étudiés, à être corrélée à la signature IFN, il faut garder en tête que l'expression du gène de l'IFN γ était aussi fortement corrélée à cette signature.

L'étude de Hall *et al* (161) qui s'est intéressée à l'identification de marqueurs moléculaires, puis protéiques, dans le but de distinguer l'activation des voies des IFNs de type 1 par rapport à celle de l'IFN de type 2 dans les glandes salivaires accessoires de patients SjS, les auteurs ont aussi analysé du tissu musculaire de patients atteints de DM. Les muscles des patients contrôles n'exprimaient pas les protéines étudiées, en revanche, chez les patients myositiques, la protéine IFIT3 était particulièrement présente, avec en revanche, peu de GBP1 ou 2, et les auteurs évoquaient donc plutôt un profil IFN de type 1.

A notre connaissance, le rôle potentiel des IFNs de type 3 n'a pas été évalué dans les myosites à ce jour.

II.6 La sclérodermie

Dans la sclérodermie systémique (SSc), de nombreuses études ont rapporté la présence d'une signature IFN dans le sang (160,258–262) et les principaux organes cibles, c'est-à-dire la peau (263–265) et les poumons (266), chez environ 50% des patients. Selon les études, la signature IFN était corrélée aux scores de mesure d'activité de l'atteinte cutanée et/ou à la fibrose pulmonaire. Au niveau biologique, comme cela a déjà été constaté dans d'autres maladies IFN-dépendantes, la présence d'auto-anticorps anti-Ro60/SSA et anti-U1RNP (267), connus pour cibler des ribonucléoprotéines, mais surtout d'anticorps anti-topoisomérase (ou anti-ScI70, des auto-anticorps spécifiques de la forme diffuse de la maladie), semble être un élément lié la présence d'une signature IFN élevée, probablement en lien avec la formation de complexes immuns servant d'inducteurs (261,268,269).

On peut particulièrement citer une étude récente (262) qui s'est intéressée à la mesure d'une signature IFN basée sur 11 gènes (IFI27, IFI44L, IFIT3, IFITM1, SERPING1, IFIT1, IFIT2, LY6E, IFI44, XAF3 et MXA, qui ont été identifiés précédemment, par la même équipe, dans une étude sur les monocytes de SJS (183)) sur sang total et sur 5 gènes (IFI44L, IFIT3, IFITM1, IFIT1 et MXA, qui étaient responsable de 96% de la variance de la signature précédente) après tri des monocytes, et ce dans différents types cliniques de SSc : des formes classiques (cutanées limitées et cutanées diffuses), mais aussi des formes précoces (syndrome de Raynaud associé à la présence d'anticorps spécifiques et/ou d'anomalies capillaroscopiques) (270) et des formes *sine scleroderma*. L'étude comprenait aussi des patients atteints isolément de syndrome de Raynaud. Tous les patients avaient des signatures IFN positives, avec des proportions variables selon le groupe, allant d'environ 1/3 chez les patients uniquement atteints de syndrome de Raynaud, jusqu'à 100% chez les patients SSc *sine scleroderma*. Les patients avec une forme diffuse avaient plus souvent une signature IFN positive que ceux avec une forme limitée (70% contre 42,9%), et les résultats suggéraient que l'activation de la voie des IFNs de type 1 était un phénomène précoce dans la maladie, puisque 78,9% des formes précoces étaient positives. Ainsi, les formes sans fibrose étaient celles où la proportion de patients positifs pour la signature IFN était la plus élevée, avec aussi des niveaux de signature IFN les plus élevés.

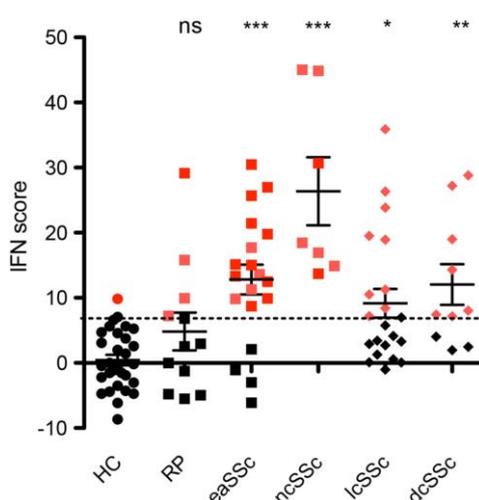


Figure 26. Signature IFN dans une cohorte de patients atteints de syndrome de Raynaud (RP), SSc précoce (eaSSc), SSc *sine scleroderma* (ncSSc), SSc cutanées limitée (lcSSc) ou diffuse (dcSSc), d'après Brkic et al (262)

Par ailleurs, la signature IFN était associée à des taux plus élevés de B cell activating factor (BAFF), cytokine précédemment corrélée à l'extension de la fibrose (271), et de pro-peptide N-terminal du pro-collagène de type III, qui est un marqueur indirect de la production de collagène.

Des pDC ont été identifiées dans le sang et la peau des patients, et semblent capables de produire en grande quantité de l'IFN α , mais aussi du CXCL4, l'un des principaux facteurs anti-angiogéniques (contribuant vraisemblablement à la vasculopathie de la SSc), dont la quantité était corrélée aux niveaux de fibrose cutanée, pulmonaire et à la survenue d'hypertension artérielle pulmonaire (272). C'est l'expression aberrante de TLR8 au sein des pDC présents dans la peau et le sang des patients SSc (et pas dans le LES par exemple), qui semble entraîner une activation chronique de ces cellules, à l'origine de la surproduction d'IFN α et de CXCL4 (273). Très récemment, il a même été montré que CXCL4 était capable d'organiser les acides nucléiques en complexes liquides cristallins, amplifiant l'activation du TLR9 et donc la production d'IFNs de type 1 par les pDC (274). Concernant les autres données notables dans la maladie, il a été montré que l'IFN α était capable d'induire une production accrue de TLR3 par les fibroblastes dermiques de patients SSc, permettant la mise en place d'une boucle d'auto-amplification du signal inflammatoire, notamment via l'IL6, dont l'action est aussi profibrosante (275). Un autre facteur important de la voie des IFNs de type 1, l'IRF7, a été très récemment identifié comme étant capable d'interagir, dans les fibroblastes de patients, avec la voie du *Transforming Growth Factor β* (TGF β) via SMAD3 (276). Par ailleurs, la présence de taux élevés de CCL2, un ISG (277), a été identifiée comme étant un facteur de risque de progression de l'atteinte pulmonaire interstitielle et de survie diminuée (278).

Une étude s'est intéressée à l'IFN κ , l'IFN de type 1 produit par les kératinocytes, dont la production semblait plutôt réduite dans la SSc (279).

Au niveau génétique, là aussi il existe certains polymorphismes de gènes impliqués dans la cascade des IFNs de type 1, qui confèrent un sur-risque de SSc, comme IRF5 (280), IRF7 (263), IRF8 (281), TREX1 (282), IRAK1 (263), et STAT4 (280). Un certain nombre des gènes impliqués se retrouvent dans plusieurs maladies IFN-dépendantes évoquées ici, ce qui plaide bien pour l'existence de mécanismes physiopathologiques communs, mais aussi de l'implication de différents autres facteurs, ce qui permet d'expliquer que des polymorphismes proches, voire identiques, peuvent favoriser la survenue de maladies aux phénotypes cliniques très différents comme le LES ou la SSc.

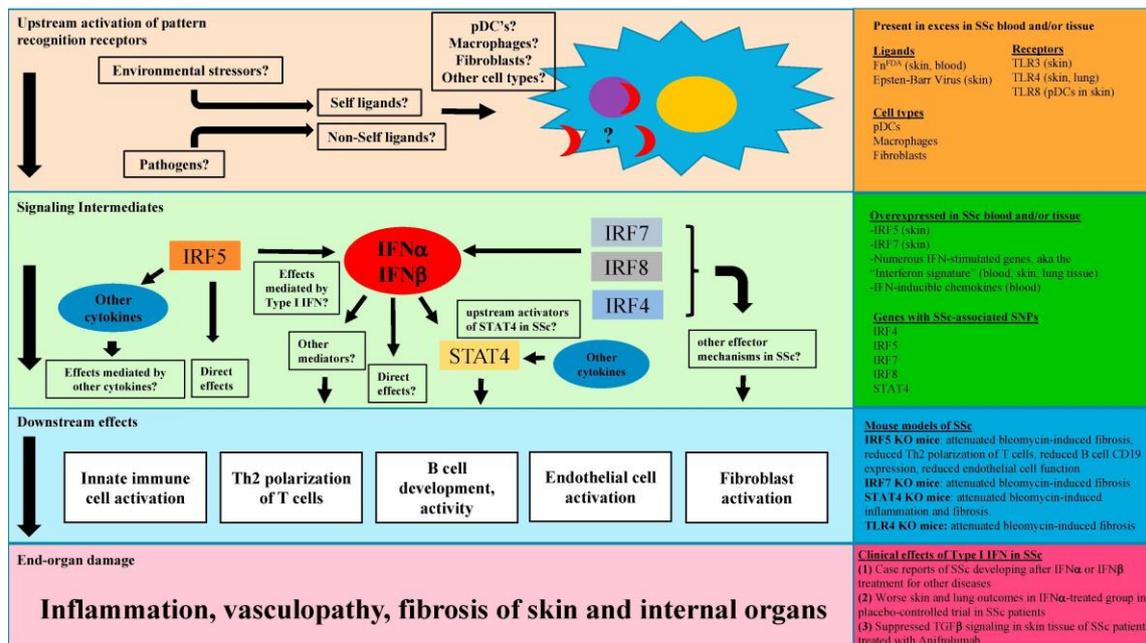


Figure 27. Schéma récapitulatif des principales données disponibles impliquant la voie des interférons dans la physiopathologie de la sclérodémie systémique, d'après Skaug & Assassi (283)

Comme, pour la majorité des pathologies étiquetées comme étant IFN-dépendantes, il existe des cas reports de SSc jugés secondaires à un traitement par IFN α mais aussi par IFN β (284,285). De manière plus originale, surtout maintenant que des cas induits ont été rapportés et que les IFNs sont plutôt identifiés comme étant délétères dans la maladie, on peut tout de même rappeler qu'il y a eu, il y a plus de 20 ans, des essais thérapeutiques où l'IFN α (286), mais aussi l'IFN γ (287), ont été utilisés comme traitement de la SSc. Les résultats initiaux étaient encourageants (dans les essais de petite taille), et finalement, dans les essais de plus grande envergure, c'est plutôt l'absence d'efficacité qui a été mise en évidence, voire un effet délétère, en particulier pour l'IFN α (notamment sur les atteintes cutanée et pulmonaire).

Concernant l'IFN de type 2, comme dans la DM, CXCL10 a été étudiée dans la SSc, et il a été montré que les niveaux de CXCL10 étaient corrélés, d'une part, aux niveaux de signature IFN (mesurée avec 43 et 3 gènes [STAT1, IFI6, IFIT3], sachant que les auteurs étaient conscients d'avoir utilisé des gènes sous la dépendance des IFNs de type 1 et 2) et d'autre part, aux scores de sévérité concernant les atteintes cutanée, pulmonaire et musculaire (288). L'IFN γ semble par ailleurs capable d'induire la production, par les fibroblastes de patients SSc et pas ceux des témoins, de CCL2, mais aussi d'IL6 lorsque l'IFN γ est associé au TNF α , avec une action synergique (289). On peut enfin noter qu'il existe des données fondamentales concernant un vraisemblable effet profibrosant et favorisant la vasculopathie pour l'IFN γ , mais sans plus d'élément spécifiquement obtenu dans la SSc (290,291).

Enfin, une étude menée dans l'hypertension artérielle pulmonaire, sur le rôle des IFNs, a montré que les 3 types d'IFNs étaient présents à des niveaux plus élevés que chez les contrôles, avec un rôle délétère plus marqué pour les IFNs de type 1 et 2 (292). Aussi, concernant spécifiquement les IFNs de type 3, une équipe brésilienne a

montré que les taux d'IFN λ 1 étaient plus élevés chez les patients SSc de leur cohorte par rapport à des sujets sains, et que ces taux étaient corrélés avec les taux d'IFN γ (293).

II.7 La polyarthrite rhumatoïde

Contrairement à ce que laissent penser les données disponibles sur le rôle clairement pathogènes des IFNs dans le LES ou le SjS, les données sur le rôle pathogène des IFNs de type 1 dans la PR sont plus complexes à interpréter, d'autant plus que l'IFN β a été mis en évidence dans la membrane synoviale de patients, mais avec un rôle jugé plutôt protecteur (294,295), jouant sur la voie de l'IL1 et du TNF α (296,297). Cela dit, après des résultats thérapeutiques intéressants chez la souris, un essai de phase II mené avec l'IFN β dans la PR n'a pas montré d'efficacité du traitement (298).

En pratique, il existe bien des données, en particulier des données de biologie moléculaire dans le sang et le tissu synovial de patients, pour penser que les IFNs de type 1 peuvent avoir un rôle délétère dans la maladie. En effet, certaines études transcriptomiques menées dans la PR ont permis d'identifier un sous-groupe de patients chez qui les ISGs étaient surexprimés (environ 50% dans cette étude), avec par ailleurs un taux plus élevé d'anticorps anti-peptides citrullinés (299). De manière intéressante, dans cette étude, les auteurs ont en particulier étudiés l'expression de 2 sets de gènes, un 1^{er} set de 13 gènes (DDX17, OAS1, OAS2, IFIT1, MX1, MX2, TRIM22, PDXK, G1P3, POLR2B, CD164, SMAD4 et IRF2) identifié (d'après les données de la littérature) comme étant sous la dépendance des IFNs α et β (mais pas de l'IFN γ , mais si nous avons déjà vu que cette spécificité était très relative), et un 2^{ème} set de 5 gènes (IL15RA, BAK1, VAT1, SF3A1 et ICAM1) identifié cette fois comme étant sous la dépendance de l'IFN γ . En comparant l'expression de ces 2 sets entre patients et sujets sains, les auteurs concluaient à un rôle prédominant des IFNs de type 1, et pas de l'IFN γ , chez les patients atteints de PR avec signature IFN. Cela dit, en analysant le profil d'expression complet des transcrits de patients dont la signature IFN était la plus élevée, les auteurs ont tout de même montré que chez ces patients, un set de 34 gènes (parmi ceux identifiés comme étant IFN γ -dépendants dans une étude précédente (182), menée sur une lignée cellulaire de fibrosarcome humain, stimulée par différents IFNs) dépendant de la voie de l'IFN γ , était bien surexprimé par rapport aux sujets sains, laissant penser que l'IFN de type 2 joue sûrement un rôle dans la PR aussi. La présence d'une signature IFN sanguine (dont les polynucléaires semblent être les principaux contributeurs dans les formes précoces de PR (300)) chez des sujets positifs pour les anticorps anti-peptides citrullinés et/ou facteurs rhumatoïdes, mais non atteints de PR, a aussi été identifiée comme étant un facteur de risque d'évolution vers une authentique PR, dans une première étude ayant utilisé une signature assez large (301), puis une seconde avec les 7 ISGs (FI44L, IFI6, IFIT1, MXA, OAS3, RSAD2 et EPSTI) jugés les plus discriminants (302) chez ces patients. Les auteurs évoquaient la possibilité de se servir de la signature IFN comme biomarqueur dans ces situations indéterminées. Aussi, pour faire le lien avec les biothérapies classiquement utilisées dans la PR, l'IFN α est capable d'augmenter la production d'IL6 et de TNF α , et de potentialiser la production d'IL1 β médiée par le TLR4.

En revanche, la positivité d'une signature IFN basé sur les travaux précédents (299), et tenant compte de l'expression de 19 ISGs (EPSTI1, HERC5, IFI35, IFI44, IFI44L, IFI6, IFIT1, IFITM1, IL1RN, ISG15, LGALS3BP, LY6E, MX1, MX2, OAS1, OAS2, RSAD2, SAMD9L et SERPING1) dans le sang n'était pas associée à une forme clinique ou biologique particulière de la maladie, dans une étude plus récente sur 182 patients (300). La seule chose qui ressortait de cette étude était que les patients traités par hydroxychloroquine, prednisone ou sulfasalazine avec des signatures IFNs moins élevées (et il s'agit effectivement des traitements immunomodulateurs classiques pour lesquelles nous disposons de quelques données sur leur activité anti-IFN, mais cela sera détaillé dans la partie correspondante). A noter qu'il existe un autre élément intéressant vis-à-vis de la voie des IFNs de type 1, dans la PR : son utilisation comme facteur prédictif de réponse aux traitements. En effet, dans une étude (303), la présence d'une signature IFN avant traitement était statistiquement associée à une non-réponse au rituximab (anticorps monoclonal anti-CD20), et dans deux autres études, c'est le ratio d'activité IFN β /IFN α (mesuré grâce à des lignées cellulaires repotrices et l'utilisation d'anticorps anti-IFN α ou anti-IFN β) qui était associé à la réponse aux anticorps anti-TNF α , mais avec des résultats variables, positifs (50) ou négatifs (304).

On peut noter aussi que la présence de pDC a été décrite dans le liquide, mais aussi dans la membrane synoviale de patients (305).

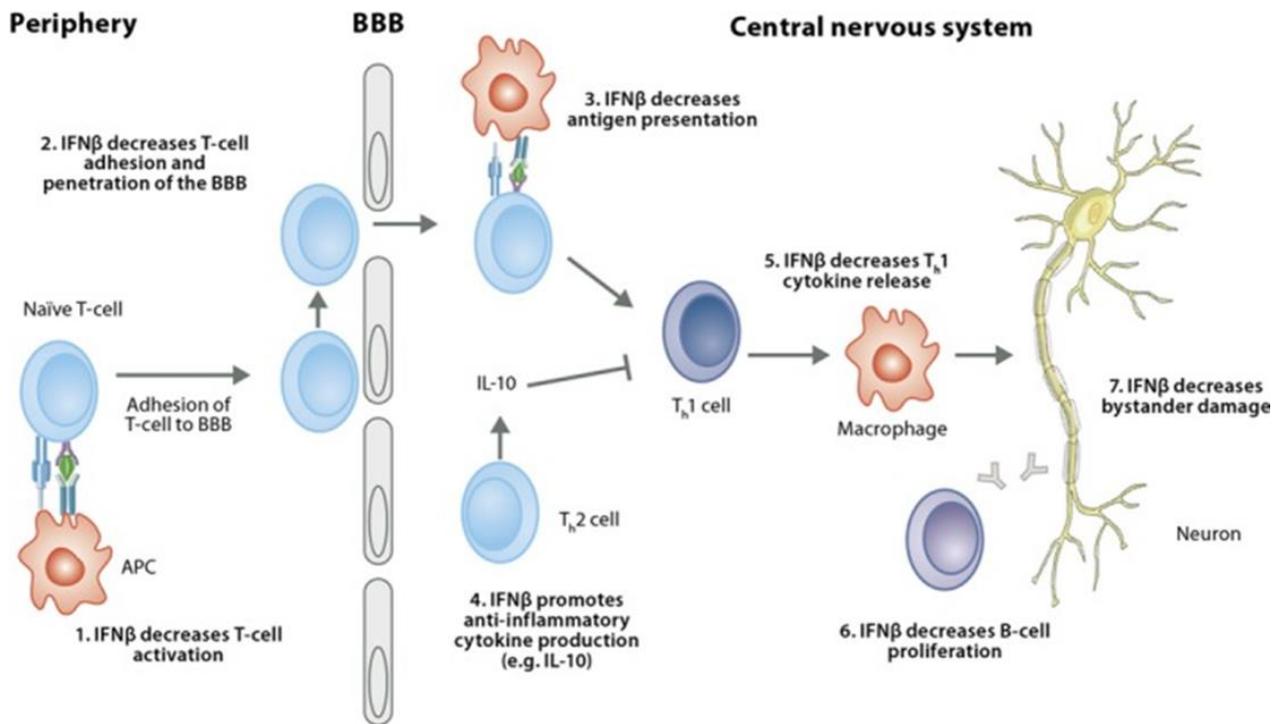
Au niveau génétique, certains polymorphismes de gènes impliqués dans la cascade des IFNs de type 1, et déjà signalés dans des maladies sus-cités, comme IRF5 (306), IRAK1 (307), STAT4 (308) ou PTPN22 (309), semblent être à risque de développer une PR.

Enfin, il existe aussi des case reports de PR jugée secondaire à un traitement antiviral par IFN (310).

La même équipe chinoise qui s'est intéressée aux IFNs de type 3 dans le LES, s'est intéressée à ces cytokines dans la PR (311). Ils ont montré, chez 40 patients atteints de PR, que les niveaux d'expression du gène IFNL1, dans les cellules mononuclées du sang, et les niveaux d'IFN λ 1 dans le sérum, étaient plus importants que ceux de patients atteints de spondylarthrite ankylosante ou de sujets sains. Il ne semblait, en revanche, pas y avoir de lien avec l'activité de la maladie, si ce n'est une corrélation un peu étonnante avec la présence d'une atteinte inflammatoire du genou.

II.7 Les maladies neurologiques

Dans la sclérose en plaques (SEP), par rapport aux autres maladies évoquées ici, le fait que l'IFN β a été le principal traitement immunomodulateur disponible dans la maladie pendant longtemps, plaide clairement plus pour un rôle protecteur des IFNs de type 1 dans ce contexte, sachant toutefois que les études cliniques ayant validé son utilisation n'ont pas permis d'identifier clairement son mécanisme d'action (312) au-delà du stade de l'hypothèse (313).



Ag=antigen; APC=antigen-presenting cell; BBB=blood-brain barrier; IFN=interferon; IL=interleukin; MMP=matrix metalloproteinase; MS=multiple sclerosis; TH=T helper cell

Figure 28. Mécanismes d'action proposés (en périphérie, au niveau de la barrière hémato-encéphalique et au sein du système nerveux central) pour l'interféron β dans la sclérose en plaques, d'après Madsen (313).

Malgré cela, la présence IFNα, et surtout d'une signature IFN (évaluée largement, avec des gènes classiquement utilisés comme IFI44L, IFITM1, IFITM2, IFITM3, OAS1, OAS2, MX1, MX2, ADAR1, IRF2 ou IRF7, puis avec un set de 9 gènes, IFNA1, IFNAR1, IFNAR2, IFNB1, ISGF3G, JAK1, STAT1, STAT2, et TYK2) ont été identifiés dans le sang de patients atteints de SEP récurrente rémittente (environ 50%), indemnes de traitement par IFNβ, dès les années 2000 (314). On peut noter que les auteurs se sont aussi intéressés à un set de 6 gènes qu'ils jugeaient spécifiques des IFNs de type 2 (IFNG, IFNGR1, IFNGR2, JAK1, JAK2 et STAT1), sans retrouver de différence significative entre patients et témoins.

Aussi, au niveau tissulaire, les IFNs α et β, ainsi que la protéine MxA, ont été retrouvés au niveau des zones cérébrales lésés des patients, avec des expressions différentes selon le type cellulaire considéré (107). Des pDC ont aussi été identifiées au niveau de ces lésions.

Le concept le plus communément admis à l'heure actuel est que l'IFNα serait plutôt délétère, favorisant l'auto-immunité systémique, tandis que l'IFNβ aurait plutôt un effet protecteur localement. Les travaux menés par une équipe espagnole, chez des patients atteints de SEP, répondeurs ou non au traitement par IFNβ, ont été particulièrement intéressants en la matière (315). En effet, ils ont étudié longitudinalement les profils transcriptomiques (sur cellules mononuclées du sang) des cohortes de répondeurs et de non répondeurs, et ont mis en évidence que la présence d'une signature IFN (incluant IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFI44 et OASL), avant traitement, était le profil moléculaire le plus associé à la non réponse à l'IFNβ. En plus de la signature moléculaire, les auteurs

ont montré que les quantités de STAT1 phosphorylé et d'IFNAR1 au niveau monocytaire, ainsi que l'activité IFN de type 1 (mesure grâce à une lignée cellulaire reportrice utilisant la luciférase), étaient aussi plus importantes, avant traitement, chez les non répondeurs (315). A 3 mois de traitement, les non répondeurs n'avaient pas modifié leur signature moléculaire sanguine, alors que la plupart des répondeurs avait développé une signature interféron. L'interprétation qui en a été faite est que la voie des IFNs de type 1 était déjà activée chez un sous-groupe de patients SEP, ce qui pouvait être mis en évidence par la mesure de la signature IFN avant traitement, et contribuait vraisemblablement à l'activité de la maladie. Assez logiquement, ces patients n'étaient pas enclins à répondre à un traitement par IFN β , et pourrait, en revanche, bénéficier d'un traitement anti-IFN de type 1. Concernant les patients répondeurs à l'IFN β , il se peut que l'activité de leur SEP soit plutôt dépendante du TNF α , voire de l'IFN γ , puisqu'il a été montré que ce traitement était capable de réduire les niveaux de ces cytokines pro-inflammatoires, via un mécanisme inhibant la voie de signalisation du TLR4 (316,317). Comme cela a été évoqué plus haut, il existe d'autres mécanismes par lesquels l'IFN β semble agir bénéfiquement dans une maladie inflammatoire comme la SEP, dont certains impliquent les pDC et le TLR7 (318).

Dans la myasthénie auto-immune, une maladie auto-immune rare, touchant la jonction neuromusculaire, avec pour effet néfaste une fatigabilité musculaire plus ou moins sévère et étendue (allant de formes localisées au niveau des muscles oculomoteurs aux formes généralisées), il y a aussi quelques données pour penser à une implication des IFNs de type 1. En effet, plusieurs études ont été menées chez l'Homme et l'animal, notamment par une équipe française qui s'est particulièrement intéressée au thymus de différents types de patients, car la myasthénie auto-immune est souvent associée à des anomalies thymiques (hyperplasies et thymomes), et qu'il s'agit évidemment d'un organe lymphoïde majeur. Cette équipe a notamment retrouvé une signature IFN (319,320) (sans plus de précision disponible dans les publications, mais avec des ISGs plutôt sous la dépendance des IFNs de type 1 que de l'IFN de type 2, d'après les auteurs), en particulier en lien avec la production d'IFN β (mais pas uniquement) dans le thymus de certains groupes de patients (en particulier en cas d'hyperplasie). Ces IFNs de type 1, en particulier l'IFN β , contribueraient vraisemblablement à la mise en place d'une réponse auto-immune dirigée contre la chaîne α du récepteur de l'acétylcholine, principale cible des auto-anticorps pathogènes dans la maladie (321). Enfin, là aussi, plusieurs cas de myasthénie auto-immune ont été rapportés, survenant suite à un traitement antiviral incluant de l'IFN α (322) mais aussi suite à un traitement par IFN β dans le cadre d'une SEP (323).

Concernant l'IFN de type 2, il existe quelques données animales pour l'impliquer dans la myasthénie auto-immune, en particulier chez le rat et la souris (aggravation du phénotype ou absence de maladie dans des modèles induits, en administrant de l'IFN γ ou après K.O. du gène codant pour l'IFN γ), ainsi que quelques études chez l'Homme, montrant aussi que l'expression de la chaîne α du récepteur de l'acétylcholine semblait amplifiée *in vitro* au sein des cellules épithéliales thymiques de patients, après administration d'IFN γ (324). On peut aussi noter l'existence d'une publication chinoise récente, chez l'Homme, ayant mis en évidence une mutation du gène

codant pour le récepteur de l'IFN γ R (dont l'implication fonctionnelle n'est pas connue) dans une forme familiale de myasthénie auto-immune, ainsi que chez quelques cas sporadiques (325).

Enfin, en ce qui concerne les IFNs de type 3, il y a très peu de données, mais l'équipe française qui a publié de nombreux travaux sur la myasthénie auto-immune et les IFNs a montré que les IFNs λ 1 et λ 2 étaient produits en plus grande quantité dans le thymus de patients atteints de myasthénie auto-immune, par rapport à des contrôles, et qu'ils contribuaient, à leur niveau, à la production de chaîne α du récepteur de l'acétylcholine et à la réponse auto-immune (321).

II.8 Le diabète de type 1

Les maladies auto-immunes spécifiques d'organe, comme le diabète de type 1, n'ont pas vocation à être traitées dans ce travail, mais compte-tenu de la fréquence de cette pathologie, et du rôle pathogène globalement admis de l'IFN α dans sa physiopathologie, il nous a paru intéressant de l'évoquer brièvement.

La majorité des données disponibles jusqu'à présent (induction de diabète de type 1 dans un modèle transgénique dont les cellules pancréatiques produisent de l'IFN α , présence d'une signature IFN, présence de pDC dans les ganglions de drainage du pancréas ou encore, amélioration du phénotype de ces souris par un traitement anti-IFNAR) sont issues de modèles murins (107), en particulier du modèle *non obese diabetic* (NOD), qui, fait notable, est aussi considéré comme étant un modèle classique de SjS (avec différents modèles dérivés plus ou moins dépourvus de diabète).

Chez l'Homme (326), il existe tout de même des données, avec la détection d'IFN α et d'une signature IFN au niveau des îlots pancréatiques de patients récemment diagnostiqués avec un diabète de type 1, la détection d'une signature IFN sanguine avant la survenue du diabète chez des jeunes patients génétiquement prédisposés, et aussi l'identification d'un terrain génétique à risque incluant certains polymorphismes de gènes (IFIH1 et TYK2 notamment) de la voie des IFNs de type 1. On peut aussi noter qu'il existe des case reports de diabète de type 1 secondaire à un traitement antiviral par IFN (327).

Enfin, fait plus original, mais particulièrement intéressant, il a été démontré que parmi une cohorte de patients atteints de syndrome APECED (une maladie génétique liée à une mutation dans le gène *autoimmune regulator* [AIRE], à l'origine d'un tableau de polyendocrinopathie auto-immune, mais aussi d'une susceptibilité aux infections fongiques à *Candida*), certains avaient des auto-anticorps endogènes anti-IFN α qui avaient un effet bénéfique, en protégeant les porteurs du risque de survenue de diabète de type 1 (328).

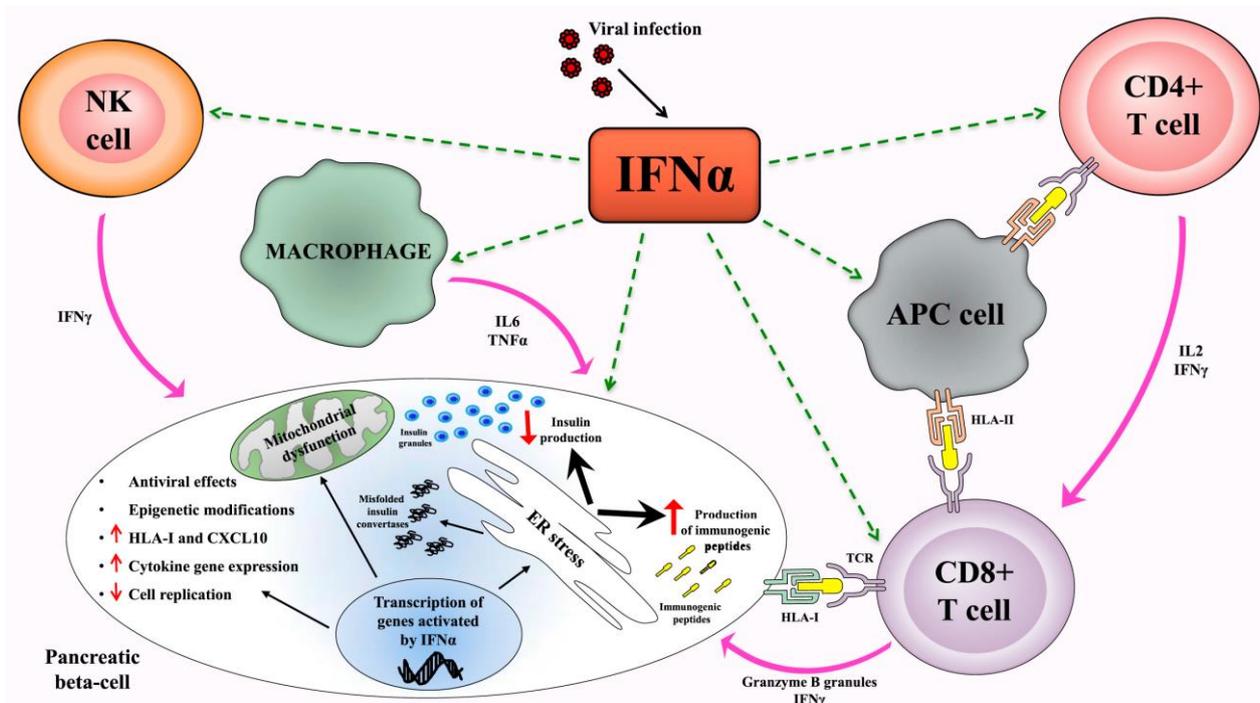


Figure 29. Effets de l'IFN α impliqués dans la pathogenèse du diabète de type 1, d'après Lombardi *et al* (329)

Comme dans la majorité des autres maladies IFN-dépendantes, il existe aussi quelques données sur l'implication des autres types d'IFNs dans le diabète de type 1.

En ce qui concerne l'IFN de type 2, il existe des données (330), en particulier chez l'animal, par exemple sur l'induction d'un diabète de type 1 néonatal par transfert adoptif de lymphocytes T CD4 Th1 de souris NOD déjà malades, ou encore l'induction d'une résistance au diabète dans un modèle murin induit, par *knock out* du gène codant pour l'IFN γ R.

Concernant les IFNs de type 3, les données sont peu nombreuses, et se sont focalisées sur l'infection par le coxsackie virus B3, qui est le principal entérovirus mentionné dans les facteurs d'environnement pouvant favoriser la survenue d'un diabète de type 1 (331). Suite à une infection par ce virus, il a été démontré que les cellules des îlots pancréatiques produisaient des IFNs de type 3 (IFNs λ 1 et λ 2), que ces cellules étaient elles-mêmes porteuses du récepteurs aux IFNs de type 3 (le récepteur complet, avec les deux chaînes, étant surtout présent au niveau des cellules α) et sensibles à la stimulation par ces IFNs, en induisant l'expression d'ISGs (mais moins fortement que l'IFN α) (332). Par ailleurs, la présence du polymorphisme A946T du gène IFIH1 (codant pour MDA5), à risque de diabète de type 1 (mais aussi de LES et de SEP), semble limiter la production de facteur de transcription IRF1 par les cellules pancréatiques, suite à une infection par le coxsackie virus B3, ce qui limiterait la production d'IFNs de type 3 (et pas des IFNs de type 1) (333). Ainsi, les cellules pancréatiques primaires de patients qui n'étaient pas porteurs de cet allèle à risque, produisaient plus d'IFNs de type 3 après infection et avaient une signature IFN plus forte que celles des patients à risque, laissant libre cours aux spéculations quant à l'éventuel rôle protecteur des IFNs de type 3 (ou du ratio entre IFNs de type 1 et IFNs de type 3), soit directement, soit, dans ce cas précis, parce-que le contrôle de l'infection par le coxsackie virus B3 était meilleur. Un élément

majeur que nous avons déjà évoqué plus haut, et qui est bien illustré dans cette étude, est la grande importance d'utiliser, autant que possible, les conditions expérimentales les plus proches de ce qui se passe *in vivo* (ici, des cellules pancréatiques primitives et pas une lignée cellulaire, une infection virale authentique et pas des agonistes de synthèse comme les poly(I:C)). En effet, des études préalables menées sur l'impact fonctionnel du polymorphisme A946T du gène IFIH1 avaient conclu, soit à l'absence d'impact, soit à la production d'une protéine MDA5 constitutionnellement activée...

III. Outils de mesure des interférons

Le dosage des IFNs de type 1 s'est très longtemps heurté aux limites techniques des méthodes habituellement utilisées. En effet, les IFNs de type 1 peuvent déjà être actifs à des concentrations plus faibles que les limites de détection d'une technique ELISA classique (de l'ordre de 10^{-13} M). Les ELISA classiques n'étant pas assez sensibles, et parfois trop peu spécifiques (334) pour être pertinent en pratique clinique ou en recherche, plusieurs stratégies ont été développées pour pallier ce problème.

III.1 Les tests fonctionnels

Comme la mesure directe des IFNs de type 1 n'était pas pertinente avec les tests disponibles, des tests fonctionnels, utilisant principalement des lignées cellulaires reportrices, ont été développés dès les années 90. Le principe général de ces tests est d'utiliser des lignées cellulaires exprimant l'IFNAR et au moins une partie de la voie de signalisation qui l'accompagne, pour mesurer la capacité de l'échantillon testé à activer la voie des IFNs de type 1. La sensibilité de ces tests permet de détecter de faibles quantités d'IFNs, en revanche, les contraintes techniques liées à l'utilisation de lignées cellulaires ont limité jusqu'à présent leur large utilisation en routine clinique. Les deux tests les plus étudiés à ce jour utilisent 2 lignées cellulaires différentes :

- une lignée transfectée par un plasmide contenant le gène de la luciférase (335) sous la dépendance d'un promoteur avec un domaine ISRE (ainsi l'activité IFN de type 1 est évaluée en mesurant l'expression de la luciférase)
- la lignée WISH, incapable de produire les IFNs de type 1 et sans TLRs pour n'évaluer que l'activité IFN de type 1 du sérum testé (336–338), et ce en mesurant l'expression de 3 ISGs (MX1, IFIT1 et PKR [EIF2AK2]), standardisée par rapport à l'expression des mêmes gènes après incubation avec du sérum de donneur sain

III.2 La signature moléculaire

Dans la même optique que pour les tests fonctionnels, au début des années 2000, l'idée de s'intéresser à l'expression des ISGs a germé, et le concept de ce qui est maintenant couramment appelé « signature IFN » est né (127,128,339). Dans les 1^{ères} publications s'intéressant à des patients atteints de LES, il s'agissait de mesurer l'expression globale des gènes des cellules mononucléées du sang chez ces patients, par rapport à des témoins. En procédant ainsi, les auteurs ont pu identifier, selon le type de puce à ARNs utilisé (entre 4566 et 12 626 ARNs étudiés) et surtout selon les critères et les méthodes statistiques utilisés, entre 15 et 210 gènes (127,128) identifiés comme étant surexprimés chez les patients par rapport aux témoins. Parmi ces gènes surexprimés, les auteurs ont pu identifier une part importante de gènes dépendants de la voie des IFNs, mais pas exclusivement, et uniquement dans certains groupes ou *clusters* de patients. Cette surexpression de certains ISGs a été rapidement appelée « signature IFN », et semblait être corrélée à l'activité de la maladie (score SLEDAI, survenue de formes sévères neurologique, rénale ou hématologique).

L'intérêt d'une telle signature (pour le diagnostic, le suivi et le traitement des malades) a été identifié dès le départ, de nombreuses études ont largement confirmé l'existence de cette signature IFN dans le LES depuis, mais aussi dans les autres maladies auto-immunes que nous avons vues précédemment.

C'est de loin la signature IFN qui est la plus utilisée dans les études cliniques (comme nous venons de le voir) et les essais thérapeutiques (comme nous le verrons après) ces dernières années, en revanche, il est important de savoir que le terme « signature IFN » ne correspond en général pas souvent à la même chose, d'une étude à l'autre, et il faut connaître certains détails techniques et faire attention à certains paramètres pour pouvoir l'interpréter :

- l'expression des gènes est évidemment hautement dépendante du type cellulaire (161,189,197) dans lequel elle est mesurée, il faudrait idéalement la mesurer dans les organes cibles, mais comme cela n'est pas forcément faisable, c'est souvent le sang qui est choisi, et là aussi, il y a évidemment des variations si l'analyse est faite sur sang total, sur cellules mononuclées du sang ou sur des types cellulaires plus précis, après tri
- le terme « signature IFN » sous-entend en général « signature IFN de type 1 » dans les études, mais comme nous l'avons déjà évoqué, de nombreux ISGs ne sont pas spécifiques de la voie des IFNs de type 1 et leur expression peut aussi être modulé par d'autres voies de signalisation, en particulier celle de l'IFN de type 2 (161,218,219,340), mais aussi celle des IFNs de type 3, avec un chevauchement probablement encore plus important (89)
- comme nous l'avons vu précédemment aussi, la voie des IFNs de type 1 est complexe, avec de très nombreux acteurs impliqués à tous les niveaux, de nombreux mécanismes de rétrocontrôle positif ou négatif (liés à la voie des IFNs de type 1 directement, ou à d'autres voies comme celles du TNF α , de l'IFN de type 2, ou du receptor activator of NF κ B [RANK]/RANK ligand par exemple (3)), un contexte variable (infection, inflammation chronique, maladie auto-immune sous-jacente...) et une machinerie cellulaire variable aussi selon le type de cellule considéré (70) et l'origine des patients (69), ce qui implique vraisemblablement qu'il n'existe pas une, mais de nombreuses signatures IFN (cet élément est d'ailleurs assez évident quand on voit que dans quasiment chaque article les gènes qui composent la signature IFN sont différents)
- enfin, les expérimentations *in vitro* sont faciles à conduire et très utiles à la compréhension générale du fonctionnement des IFNs ainsi que de leurs mécanismes de régulation, en revanche, l'utilisation de « substituts » (lignées cellulaires, agonistes de synthèse des TLRs...) ne permettra jamais de conclure formellement dans une situation et une pathologie données, d'ailleurs il a bien été montré que la signature induite après stimulation cellulaire *in vitro* par des IFNs ne reproduisait pas la complexité de la signature chez les patients (219)

Il faut aussi noter que des méthodes innovantes d'analyse de la signature IFN ont été développées, grâce à l'utilisation d'algorithmes permettant que la signature IFN reflète mieux la complexité de la voie des IFNs (219,341).

III.3 Le SIMOA

Très récemment (342,343), une nouvelle forme d'ELISA dit digital, basé sur une technologie appelée single molecule array ou SIMoA, a été mise au point et devrait révolutionner, à l'avenir, la mesure des IFNs de type 1. En effet, cet ELISA nouvelle génération utilise des disques contenant des milliers de puits de la taille d'un femtolitre (10^{-15} litre) qui vont permettre, grâce à l'outil numérique, de compter individuellement chaque immunocomplexe formé de la cytokine cible et de l'anticorps spécifique choisi au préalable, fixé sur une bille paramagnétique pourvue d'un système rapporteur. Ainsi, de manière générale, cela permet de gagner considérablement en sensibilité par rapport à un ELISA classique, d'un facteur >1000 (détection de concentrations de l'ordre de 10^{-16} M).

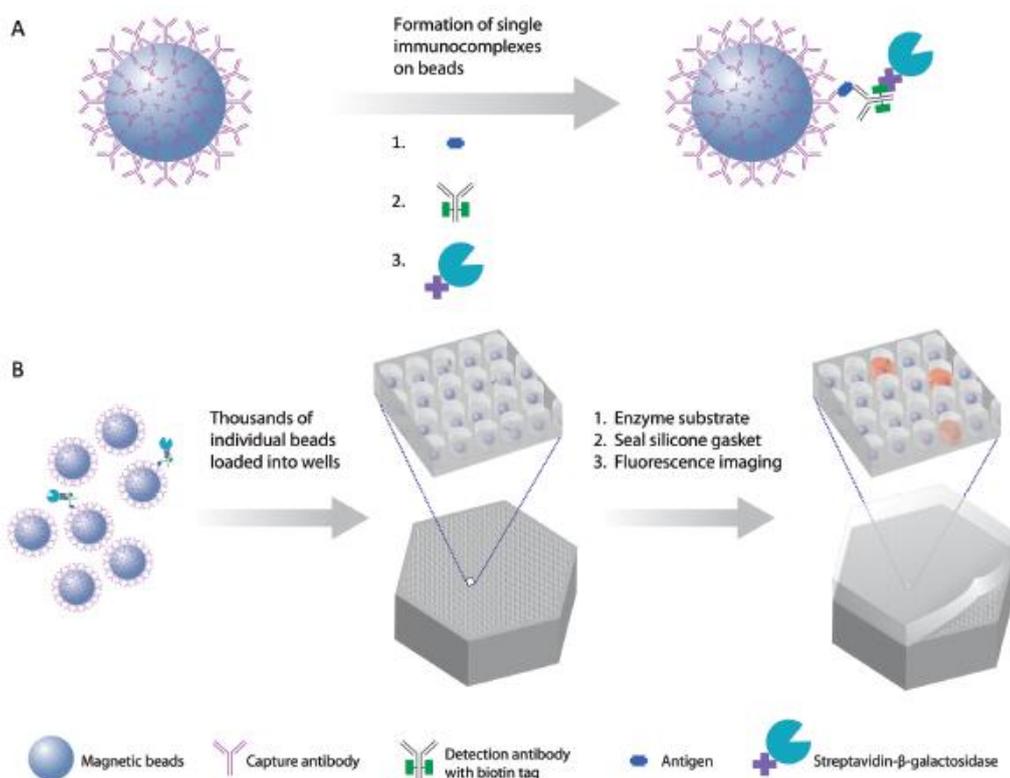


Figure 30. Principes de la technologie SIMoA, d'après Rissin *et al* (343)

Pour le dosage de l'IFN α en particulier, l'association de cette nouvelle technologie à des anticorps anti-IFN α de très haute affinité (328), a permis de mettre au point un test dont la sensibilité est 5000 fois supérieure (capable de détecter des concentrations de l'ordre du femtogramme par millilitre, soit 10^{-16} M) à celle des ELISA du commerce (344). Par ailleurs, avec cette technique, les concentrations d'IFN α détectées chez des patients atteints

de LES, de DM et d'interféronopathies monogéniques, étaient corrélées aux tests fonctionnels et à la signature IFN de type 1 (344).

La problématique, à l'heure actuelle, est que le coût du SIMoA ne permet pas une application à la pratique clinique, mais cela devrait évoluer.

IV. Les traitements anti-interférons

IV.1 Les immunomodulateurs classiques

Concernant les traitements immunomodulateurs classiques, celui qui est le mieux reconnu comme étant à même d'agir sur la voie des IFNs de type 1 (mais aussi de type 3, vu son mode d'action), est l'hydroxychloroquine, historiquement recommandée chez tous les patients lupiques (345), et évalué dans d'autres indications, en particulier en cas d'atteinte cutané-articulaire, mais aussi dans le syndrome des anti-phospholipides ou encore le lupus néonatal. En effet, l'hydroxychloroquine semble principalement agir en augmentant le pH intracytoplasmique (346,347), ce qui a pour conséquence d'empêcher l'acidification et la maturation des endosomes. Ainsi, les récepteurs endosomaux comme les TLR7 et 9 vont voir leurs capacités à reconnaître leurs ligands diminuées, et par la même occasion, la production d'IFN α qui en découle. Cela a été mis en évidence *in vitro* avec des pDC stimulés par des agonistes de TLRs (348,349), mais aussi *in vivo* dans une cohorte de patients lupiques (350). Dans la PR, l'hydroxychloroquine a été utilisée historiquement, puis en association avec d'autres traitements (méthotrexate et sulfasalazine) mais est peu à peu délaissée dans cette indication, même si une revue récente semble indiquer un rôle bénéfique, chez ces patients, sur la diminution du risque cardiovasculaire (351).

Dans les autres traitements classiquement utilisés dans les maladies auto-immunes systémiques et pouvant impacter la voie des IFNs de type 1, il y a aussi les glucocorticoïdes. En effet, des études *in vitro* ont montré que l'inhibition de la voie des IFN de type 1 passait par une inhibition de l'expression des gènes dépendant de l'IRF3 (352–354), mais aussi par une inhibition de STAT1 (355). Chez des volontaires sains, il a été montré que les glucocorticoïdes étaient capables de réduire le nombre de pDC, ainsi que leur capacité à produire de l'IFN α (356), avec des effets moins importants dans le LES, du fait de l'activation des TLRs 7 et 9 (357). Des études plus anciennes montrent que les glucocorticoïdes, en particulier la dexaméthasone, avaient aussi un effet sur la production d'IFN γ (358), notamment en agissant sur les molécules de co-stimulation CD28/CD80 (359)

Dans la PR, l'utilisation de méthotrexate associé à une faible corticothérapie, semble jouer sur le nombre de lymphocytes produisant de l'IFN γ (360). En revanche, une étude longitudinale récente (361) comparant l'effet de deux schémas thérapeutiques classiques dans la PR, COBRA (prédnisolone à partir de 60mg/jour, associé à du méthotrexate [MTX] à partir de 7,5mg/semaine et de la SLZ) et COBRA-LIGHT (prédnisolone à partir de 30mg/jour associé à du MTX à partir de 10mg/semaine), a montré une réduction de la signature IFN (sur les gènes comportant des sites de liaison pour les IRFs et pour STAT1) proche dans les deux groupes, dès 4 semaines (probablement du fait des glucocorticoïdes), maintenue uniquement dans le groupe COBRA après 12 semaines, alors que la dose de glucocorticoïdes était la même dans les deux groupes à ce moment-là. En revanche, la dose de MTX étaient plus importante dans le groupe COBRA-LIGHT (25mg/semaine contre 7,5mg/semaine), mais le

groupe COBRA avait reçu 1,5x plus de glucocorticoïdes, et recevait toujours de la SLZ à 2g/jour. Il est donc probable que le MTX n'ait pas d'effet sur les IFNs de type 1, alors que les glucocorticoïdes et la SLZ si. Ces résultats sont concordants avec les données évoquées plus haut sur les glucocorticoïdes, et avec des résultats précédemment obtenus par la même équipe pour la SLZ (300).

Les inhibiteurs de la calcineurine comme le tacrolimus ou la ciclosporine, qui peuvent être utilisés dans le LES, en particulier en Asie, semblent avoir des effets controversés sur la voie des IFNs de type 1, avec des résultats en faveur d'une stimulation (362) ou d'une inhibition (363), mais sans donnée spécifiquement dans le LES. En revanche, leur rôle sur la production d'IFN γ est lui, clairement établi, du fait de leur effet anti-lymphocyte T (364).

Enfin, à notre connaissance, il n'existe pas de donnée claire sur l'effet vis-à-vis des IFNs de type 1 des autres immunomodulateurs classiquement utilisés dans les maladies qui nous intéressent. En revanche, on peut noter l'existence d'une étude transcriptomique sur une cohorte de patients atteints de maladie Crohn (365), qui retrouvait une signature IFN de type 1 sanguine chez environ la moitié des patients, et surtout, aucun effet de la prise, ou non, d'un traitement par azathioprine.

IV.2 Les anticorps monoclonaux

Il existe, à l'heure actuelle, quatre anticorps monoclonaux en développement clinique, ciblant la voie des IFNs de type 1, trois d'entre eux ciblant l'IFN α , et le dernier ciblant l'IFNAR (qui est d'ailleurs le plus prometteur et pour qui le développement clinique est le plus avancé). Aucun n'a cependant reçu d'AMM pour le moment. Il existe par ailleurs un anticorps monoclonal ciblant l'IFN γ .

Les anticorps anti-IFN α

Le sifalimumab est le 1^{er} anticorps monoclonal humain d'isotype IgG1, ciblant l'IFN α . Les résultats de l'essai de phase I/II publié en 2011 (366) dans le LES a mis en évidence un effet biologique positif dose-dépendant sur la réponse IFN (baisse de la signature IFN mesurée dans le sang sur l'expression de 21 gènes [IFI27, IFI6, RSAD2, IFI44, IFI44L, USP18, LY6E, OAS1, SIGLEC1, ISG15, IFIT1, OAS3, HERC5, MX1, LAMP3, EPST11, IFIT3, OAS2, RTP4, PLSCR1, DNAPTP6] selon Yao *et al* (367) et de l'expression de protéines IFN-dépendantes [USP18 et ESI-1] dans la peau), avec un bon profil de tolérance.

Le sifalimumab a aussi été évalué dans les myosites auto-immunes (368), avec un essai de phase précoce aussi concluant que celui mené dans le LES, puisqu'il y avait une diminution de la signature IFN (évaluée sur 13 gènes [IFI27, RSAD2, IFI44L, IFI44, OAS1, IFIT1, ISG15, OAS3, HERC5, MX1, ESPT11, IFIT3, and IFI6] dans le sang et dans le muscle).

De manière un peu plus étonnante, le sifalimumab a aussi été évalué dans le psoriasis chronique (369) où il n'a montré ni efficacité biologique ni efficacité clinique.

Finalement, un essai de phase 2b a été mené uniquement dans le LES (370), avec 3 dosages différents, et l'activité clinique (sur les scores classiques d'activité de la maladie) du LES était améliorée dans tous les groupes traités, par rapport au placebo, mais de manière modérée, avec par exemple, pour le critère de jugement principal, un taux de répondeur selon le *Systemic Lupus Erythematosus Responder Index 4* (SRI-4) à 52 semaines, statistiquement plus élevé dans les groupes traités, entre 56,5 et 58,8%, contre 45,4% dans le groupe placebo. Cet effet était surtout important chez les patients dont la signature IFN (sur 4 gènes [IFI27, IFI44, IFI44L, RSAD2] dont l'expression a été mesurée dans le sang) était haute (soit 81% des patients) à l'inclusion.

A noter que dans aucun des essais utilisant le sifalimumab, il n'y a eu d'efficacité sur les marqueurs biologiques classiques d'activité (activation de la voie classique du complément et titres d'anti-ADN double brin). En termes d'effets indésirables, la fréquence des épisodes de zona étaient augmentée autour de 10% contre un peu moins de 1% dans le groupe placebo. Finalement, le laboratoire a décidé de ne pas poursuivre le développement de cet anticorps anti-IFN α , au profit de l'anifrolumab, anticorps anti-IFNAR dont nous parlerons après.

Le rontalizumab est aussi un anticorps monoclonal d'isotype IgG1, mais humanisé, ciblant l'IFN α (et théoriquement censé neutraliser les 12 sous-types d'IFN α (371), mais ce dont on peut douter aux vues des résultats décevants, cliniques et surtout biologiques, de l'essai de phase II dont nous parlerons à la fin de ce paragraphe), dont les résultats d'un essai de phase I/II publié en 2012 (372) étaient encourageant, avec là aussi une réduction de la signature IFN mesurée sur l'expression de 7 gènes (IFI27, IFI44, IFIT1, MX1, OAS1, OAS2, et OAS3) dans le sang et un bon profil de tolérance. Les taux sériques de protéines induites par les IFNs de type 1 (I-TAC, MCP-1, BLC et BAFF) et de type 2 (CXCL10) ont aussi été mesurés et étaient différents en fonction du type de sujet (LES avec signature IFN élevée, LES avec signature IFN basse et sujets sains) mais n'ont pas été modifiés par le traitement. Un essai de phase II (371) a été mené par la suite, avec des résultats publiés en 2016 qui n'ont malheureusement pas été concluants sur les principaux objectifs cliniques (scores BILAG et SRI-4), avec, étonnamment, une efficacité plus importante dans le groupe avec une signature IFN basse à l'inclusion, évaluée dans le sang, sur deux panels de 3 (HERC5, EPSTI et CMPK2) et 7 gènes (IFI27, IFI44, IFIT1, MX1, OAS1, OAS2 et OAS3). Il n'y a d'ailleurs pas eu d'efficacité non plus sur la réduction de la signature IFN dans le groupe traitement, ni de différence concernant les marqueurs biologiques classiques d'activité du LES. Ainsi, le développement clinique du rontalizumab a également été stoppé.

Concernant l'AGS009, il s'agit d'un anticorps humanisé d'isotype IgG4 ciblant l'IFN α , qui a été évalué dans le LES durant un essai de phase I/II, dont les résultats n'ont fait l'objet que d'une présentation à l'EULAR en 2012, avec une bonne efficacité biologique sur la signature IFN (évaluée dans le sang sur 27 gènes dont le détail n'est pas disponible dans l'abstract) et un bon profil de tolérance (sans que nous ne disposions du détail). A l'heure actuelle, aucun essai de phase IIb n'a été programmé.

Ainsi, l'option de cibler directement l'IFN α a plutôt été mise de côté aux vues des résultats des essais cliniques, cette stratégie apparaissant finalement peut-être trop ciblée, sans effet sur les IFNs de type 2 et de type 3 (373), mais sans impact non plus sur les autres IFNs de type 1 (essentiellement les IFNs β , ω et κ), et surtout, avec un potentiel neutralisant en général partiel selon les sous-types d'IFN α (374–376).

L'anticorps anti-IFNAR

L'anifrolumab est un anticorps monoclonal humain, d'isotype IgG1, dirigé contre la sous-unité IFNAR1 de l'IFNAR, qui permet donc de neutraliser l'activité de tous les IFNs de type 1 (377) (et pas uniquement de certains sous-types d'IFN α). Comme évoqué plus haut, du fait de ses résultats plus qu'encourageants, c'est cette biothérapie dont le développement a été favorisé par rapport à celui du sifalimumab.

De manière originale par rapport aux autres anticorps monoclonaux ciblant la voie des IFNs de type 1, on peut noter que l'essai de phase I/II pour l'anifrolumab a été mené dans la SSc (378), et pas dans le LES, mais montrait un bon profil de tolérance (ce qui était évidemment un point central compte tenu de l'effet large sur tous les types d'IFNs de type 1) et des effets biologiques positifs sur la réduction de la signature IFN (basée sur l'expression de 5 gènes, RSAD2, IFI44, IFI44L, IFI27, IFI6) dans le sang et la peau des patients.

La majorité des essais a ensuite été menée dans le LES (à l'exception d'un essai de phase I/II en cours de recrutement dans la PR), avec des administrations IV et SC, et différentes populations évaluées. Les résultats du 1^{er} essai de phase IIb mené dans le LES non rénal et non neurologique, avec un traitement par voie IV sur un rythme mensuel, avec deux doses différentes (300mg et 1000 mg), ont été publiés en 2017 (379). Le critère de jugement principal, le SRI-4 à 24 semaines (mais le traitement a été poursuivi toutes les 4 semaines pendant 48 semaines, avec une dernière évaluation à 52 semaines) est revenu positif à 300mg et 1000mg (avec respectivement 34,3% et 28,8% de patients répondeurs contre 17,6% dans le groupe placebo) avec des différences statistiquement significatives. L'effet clinique était clairement plus important chez les patients dont la signature IFN (évaluée dans le sang, sur 4 gènes [IFI27, IFI44, IFI44L, RSAD2]) était élevée. En termes d'efficacité biologique du traitement, la réduction des titres d'anti-ADN double brin étaient statistiquement significative uniquement dans le groupe anifrolumab à 300mg, et il n'y avait pas de différence significative sur la normalisation du bilan du complément. Il y avait aussi un effet sur la réduction de la signature IFN dans le sang (évaluée sur l'expression de 21 gènes, a priori selon Yao *et al* (367), mais sans précision dans l'article), cette fois dans les deux groupes anifrolumab, et pas dans le groupe placebo. A 52 semaines, l'effet sur le SRI-4 était maintenu, avec 62,6% de répondeurs pour le groupe anifrolumab 300mg, 53,8% pour le groupe anifrolumab 1000mg et 40% pour le groupe placebo. Par ailleurs, une analyse *post hoc* de cet essai de phase II (380) a montré que les patients sous anifrolumab avaient une probabilité plus importante d'être répondeurs, et ce plus rapidement, selon le Lupus *Low Disease Activity State* (LLDAS) que les patients sous placebo. Le fait d'être répondeur LLDAS étant associé à un faible risque d'évènements indésirables liés à la maladie ou au traitement, et implique que 5 paramètres soient remplis, témoignant tous de l'absence d'atteinte sévère et d'une stabilité de la maladie moyennant un traitement stable, à faible dose (pour les corticoïdes) et bien toléré (381). Il est important de noter que dans cet

essai, il n'y avait pas de supériorité clinico-biologique pour le groupe traité avec la plus haute posologie, avec en revanche un risque de zona peut-être plus élevé (2% dans le groupe placebo, 5,1% dans le groupe à 300mg et 9,5% dans le groupe à 1000mg) et aussi plus de cas de grippe, sans différence notable entre les deux groupes traités (2% dans groupe placebo, 6,1% dans le groupe à 300mg et 7,6% dans le groupe à 1000mg).

Les autres essais de phase II menés dans le LES avec l'anifrolumab, comprennent un essai ouvert par voie i.v. chez des patients japonais dont les résultats (concordant en termes de tolérance dans cette population) ont été publiés (382), ainsi que des essais dont les résultats n'ont pas encore été publiés (ou sont toujours en cours) : un essai ouvert par voie i.v. sur la tolérance à long terme du traitement, un essai contrôlé randomisé par voie i.v. dans la néphrite lupique et un essai contrôlé randomisé par voie s.c. s'intéressant uniquement aux patients avec une signature IFN élevée dans le sang et une atteinte cutanée active.

Enfin, concernant la phase III, elle comporte 2 études pivots distinctes, l'essai TULIP 1 et l'essai TULIP 2, pour un total d'un peu plus de 800 patients LES (sans atteinte rénale ou neurologique grave) inclus et traités par voie i.v. Les deux principales différences étant que l'essai TULIP 1 comporte 2 bras de traitement, l'un à 150mg et l'autre à 300mg, et surtout que son critère de jugement principal est le score SRI-4 à 52 semaines, alors que l'essai TULIP 2 utilise comme critère de jugement principal le British Isles Lupus Assessment Group Based Composite Lupus Assessment (BICLA), aussi à 52 semaines. Cela témoigne surtout de l'absence de consensus quant au choix du critère principal de jugement dans les essais cliniques sur le LES (383), avec un SRI-4 nécessitant réponse complète sur certaines atteintes et un BICLA se « contentant » d'une amélioration partielle mais sur la totalité des atteintes. Cela dit, la difficulté du choix du critère de jugement principal est loin d'être anecdotique (dans le LES mais aussi toutes les autres maladies auto-immunes systèmes), puisqu'en l'occurrence, même si les résultats de ces 2 essais de phase III n'ont pas encore été publiés, les résultats préliminaires communiqués par Astra Zeneca en date du 31 août 2018 pour TULIP 1 et le 29 août 2019 pour TULIP 2, sont radicalement différents, puisque le 1^{er} est négatif alors que le 2nd est positif sur le critère de jugement principal. Il faudra attendre les publications définitives ainsi que les résultats complémentaires de l'essai TULIP SLE LTE, phase d'extension de TULIP 1 et 2, qui vise à évaluer la tolérance à long terme de l'anifrolumab.

Il y a par ailleurs un essai clinique de phase I/IIa en cours dans la PR, mais uniquement chez des patients avec une signature IFN élevée dans le sang.

Les anticorps anti-cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les pDC étant identifiées comme les principales cellules productrices d'IFN α , bien que présentes en faible quantité, c'est assez logiquement que des traitements anti-pDC ont été mis au point, et sont en cours de développement clinique.

On citera essentiellement le BIIB059, un anticorps monoclonal humanisé d'isotype IgG1 ciblant le *blood dendritic cell antigen 2* (BDCA2), spécifique des pDC, dont les résultats de la phase I/IIa (384) (réduction de la signature IFN, basée sur la mesure de l'expression de 9 gènes [IF44, IF44L, IFIT1, IFIT3, MX1, OAS1, OAS2, OAS3, SIGLEC1] dans le

sang et réduction de l'expression de protéines IFN-dépendantes [MxA et IFITM3] dans la peau) ont permis la mise en route d'un essai de phase IIb, axé en priorité sur le lupus cutané. Au niveau cellulaire, le traitement semblait entraîner une internalisation prolongée de BDCA2, avec une baisse transitoire du nombre de pDC. Il n'y par ailleurs pas eu de problème en ce qui concerne le profil de sécurité du médicament, mais évidemment les effectifs étaient faibles pour cet essai de phase précoce.

Le talacotuzumab (JNJ-56022473), un anticorps humanisé d'isotype IgG1 ciblant le CD123 (aussi appelé *interleukin-3 receptor alpha chain*), une molécule présente sur les pDC mais aussi à la surface d'autres cellules sanguines, en particulier des cellules progénitrices (385) (alors qu'il est quasiment absent aux stades de maturation plus avancés), a passé le stade préclinique dans le LES, mais l'essai de phase I semble avoir été abandonné pour l'instant (avec toutefois un développement qui se poursuit en hématologie, l'expression membranaire du CD123 étant à nouveau présente dans certaines hémopathies).

Les anticorps anti-IFN γ

Comme évoqué plus haut, il existe aussi, dans bon nombre de maladies IFN-dépendantes, des données directes ou indirectes plaidant en faveur du rôle de l'IFN γ dans leurs physiopathologies, ne serait-ce que, par exemple, du fait de l'existence d'un *crosstalk* entre les IFNs de type 1 et de type 2 (386–388), ou encore parce que certains ISGs ne sont pas spécifiquement sous la dépendance des IFNs de type 1 (137,161).

Ainsi, l'AMG 811, un anticorps monoclonal humain d'isotype IgG1 ciblant l'IFN γ , a été développé dans le LES. Les résultats d'un 1^{er} essai de phase I/IIa évaluant une administration, avec 5 posologies d'AMG811 administré par voie s.c. et 1 posologie par voie i.v., ont été publiés en 2015 (389). Le traitement a permis une réduction dose dépendante des taux sériques de CXCL10. Par ailleurs, les auteurs ont réalisé une analyse transcriptomique sur sang total assez complexe, en utilisant évidemment le sang des patients LES, mais aussi de donneurs sains stimulés ou non avec de l'IFN γ , afin de déterminer une signature et un score IFN γ basés sur l'expression de 432 gènes. Parmi cette liste, ils ont identifié les 18 gènes dont l'expression était la plus modifiée après stimulation par l'IFN γ , avec surtout des gènes surexprimés (IDO1, ANKRD22, CXCL9, RSAD2, FAM26F, P2RY14, GBP5, SERPING1, FCGR1B, GBP1, CXCL10, ETV7, PD-L1, IDO2), dont l'expression a été significativement réduite par l'AMG811 pour la majorité d'entre eux (12 sur 14 gènes, l'expression d'IDO1 et RSAD2 n'ayant pas été significativement réduite), mais aussi des gènes sous-exprimés (LYVE1, SERPINB2, MMP19, HS3ST1). Les auteurs ont aussi utilisés des sets de gènes basés sur des études précédentes, un 1^{er} set de 46 gènes (sur un set publié (128) de 49 gènes identifiés en faisant des recoupements entre le profil d'expression des gènes de cellules mononuclées du sang de donneurs sains, stimulées par les IFNs α et β , et celui de cellules mononuclées de sang de patients LES) et un 2^{ème} set de 13 gènes (sur un set publié (127) de 14 gènes, déterminé de la même manière, mais avec une stimulation uniquement par IFN α). Ces données sont particulièrement intéressantes parce que, d'une part, les 2 premiers sets de gènes ou signatures, plutôt liés aux IFNs de type 1, n'avaient que 10 gènes en commun, et que d'autre part, le

1^{er} set de 46 gènes plutôt liés aux IFNs de type 1, et le set de gènes liés à l'IFN γ , déterminé par les auteurs, comportait 20 gènes en commun (389), dont des gènes très fréquemment utilisés dans les signatures IFNs de type 1 publiées. Aussi, les 3 signatures étaient statistiquement corrélées, ce qui témoigne bien de la présence d'interactions entre les deux voies.

Le profil de tolérance de l'AMG 811 ne semblait pas inquiétant, avec un seul effet indésirable grave (pyélonéphrite) dans un groupe traité par voie s.c., mais il n'y a eu qu'une administration et 18 patients traités. Evidemment, aucun effet clinique n'a pu être mis en évidence, et pas non plus d'effet sur les marqueurs biologiques classiques d'activité de la maladie.

Un autre essai de phase I/II a été mené dans le lupus cutané chronique, chez 16 patients atteints de lupus discoïde réfractaire aux antipaludéens de synthèse, avec ou sans forme systémique associée (390). Cette fois, il s'agissait d'un essai en *cross-over*, avec aussi une seule injection par voie s.c., mais avec une seule posologie. L'AMG 811 a aussi été capable de réduire les taux sériques de CXCL10, ainsi que la signature IFN γ dans le sang (avec une signature IFN γ basée sur les 10 gènes les plus exprimés [IDO1, ANKRD22, CXCL9, RSAD2, FAM26F, P2RY14, GBP5, SERPING1, FCGR1B, GBP1] dans la signature décrite dans la première étude sur l'AMG 811). Au niveau cutané, la même signature IFN γ a été réduite au niveau des lésions par rapport à ce qui avait été observé avant traitement, en revanche, la signature post-traitement restait toujours plus élevée que la signature réalisée sur les biopsies faites en zone saine. A noter que les auteurs ont aussi étudié une autre signature IFN γ sur les biopsies de peau, basée sur une étude précédente comparant les profils d'expression des gènes de kératinocytes humains (issus de donneurs sains) stimulés par l'IL17A, l'IL22 ou l'IFN γ (391). Cette 2^{ème} signature (avec environ 800 gènes significativement surexprimés après stimulation par l'IFN γ dans l'étude initiale (391), dont CXCL9, CXCL10, CXCL11, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5 et ICAM1, sans plus de précision) était bien augmentée dans la peau (saine et atteinte, avec un score plus important dans la peau atteinte) des patients atteints de lupus cutané, par rapport à celle des donneurs sains, en revanche, l'AMG 811 n'a pas eu d'effet significatif sur cette signature.

Finalement, l'AMG 811 a été évalué dans la néphrite lupique (classe III ou IV, possiblement associée à une classe V), chez 28 patients (n=7 dans le groupe placebo et dans chaque groupe traité, avec 3 posologies différentes) présentant une atteinte rénale *de novo* ou en récurrence, après au moins 12 semaines de traitement par mycophénolate mofétil ou azathioprine (392). Il existait 3 posologies différentes en ce qui concerne les groupes traités, à chaque fois avec une administration par voie s.c., et un groupe placebo. A 12 semaines de suivi, il n'y avait pas de différence significative sur la réponse clinico-biologique (mais aucun des 3 essais avec l'AMG 811 n'a assez de puissance pour démontrer cela), notamment sur la protéinurie, avec un impact partiel et transitoire sur les biomarqueurs utilisés pour refléter l'activité IFN γ , c'est-à-dire les taux sériques d'IP-10 et la signature IFN γ (dont nous n'avons pas le détail). Il y avait apparemment un nombre plus élevé d'épisodes infectieux (sans savoir s'il s'agissait d'infections mycobactériennes ou autres) dans les groupes AMG 811, mais sans différence significative avec le groupe placebo.

Pour l'heure, les effets biologiques limités (bien qu'évalués sur un faible nombre de patients) de l'AMG 811 semblent avoir freiné l'engouement autour des traitements anti-IFN γ dans le LES.

Un autre anticorps monoclonal anti-IFN γ a été développé dans les maladies inflammatoires, mais essentiellement dans des maladies que nous n'avons pas traitées dans ce travail. Le fontolizumab, est un anticorps monoclonal humanisé anti-IFN γ , qui a surtout été évalué dans la maladie de Crohn (393), jusqu'en phase II, avec une bonne tolérance, une amélioration des taux de CRP, mais sans impact clinique suffisamment significatif. Le fontolizumab a aussi été évalué dans la PR, mais l'essai de phase II a été interrompu, du fait de résultats décevants en phase I. Enfin, les résultats d'essais de phases précoces ont été publiés dans le psoriasis (394), montrant aussi une bonne tolérance, mais des résultats cliniques très limités (bien que difficilement évaluables dans des essais de tolérance) et un effet variable et non soutenu sur l'expression cutanée des gènes IFN γ -dépendants (K16, IL23/p19, CXCL9, IL12/23/p40, et iNOS).

Le dernier anticorps monoclonal anti-IFN γ qu'il faut mentionner, l'emapalumab, est particulièrement intéressant puisqu'il a obtenu une autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis, et est en cours d'évaluation par les agences européennes. Il a été développé dans une indication pédiatrique rare, les lymphohistocytoses hémophagocytaires primitives (ou familiales), réfractaires aux traitements usuels (395,396). Dans notre cas, ce traitement est aussi intéressant dans la mesure où il existe des formes de lymphohistocytose hémophagocytaire secondaire (plutôt appelée syndrome d'activation lymphohistocytaire) qui peuvent compliquer les maladies auto-immunes systémiques (397), comme le LES (398) ou les myosites (399).

IV.3 Le vaccin thérapeutique

Parmi les thérapeutiques ciblant spécifiquement les IFNs de type 1 (IFN α ou IFNAR), une seule n'est pas un anticorps monoclonal, mais un vaccin thérapeutique anti-cytokine : l'IFN-kinoïde (IFN-K).

Les kinoïdes développés par NEOVACS S.A. se présentent sous la forme d'un hétéro-complexe obtenu par liaison chimique de la cytokine cible à une protéine porteuse, la *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH) (400,401). Cette protéine porteuse a un rôle double, celui de fournir les déterminants antigéniques (épitopes T) nécessaires à l'activation des lymphocytes T auxiliaires mais aussi de présenter aux cellules B productrices d'anticorps une densité élevée d'antigènes cytokiniques dans leur conformation native. L'immunisation/vaccination avec le kinoïde associé à un adjuvant (c'est l'ISA51, un adjuvant *water-in-oil*, qui a été utilisé dans toutes les études [sauf celle que l'étude préclinique que nous présentons dans cette thèse], y compris en clinique humaine dans le LES) induit des titres élevés d'anticorps neutralisants de haute affinité, dirigés contre tous les épitopes de la cytokine native correspondante.

Le kinoïde étant dirigé contre une cytokine du soi, la réaction immunitaire présente, de manière générale (mais évidemment, il peut y avoir des spécificités en fonction du vaccin et de la pathologie considérés) des propriétés inhérentes à son caractère autologue :

- la réponse anticorps anti-cytokine est transitoire (l'activité neutralisante disparaît environ 3 mois après la dernière injection du fait de l'absence de mémoire T anti-cytokine), en l'absence d'injection de rappel
- les anticorps polyclonaux circulants induits par le vaccin ont une forte avidité pour la cytokine ciblée et ils neutralisent les molécules ectopiques présentes dans les liquides biologiques, mais n'ont pas d'effet sur leur fonctionnement physiologique du fait de la plus forte affinité des récepteurs exprimés à la surface des cellules cibles (402)
- il n'y a théoriquement pas de réponse cellulaire T dirigée contre la cytokine ainsi ciblée, du fait de la sélection négative centrale et de la présence de cellules T régulatrices périphériques

En théorie, du fait de l'absence de réponse T anti-cytokine ou d'interférence avec le fonctionnement physiologique de ces cytokines, les kinoïdes doivent avoir un bon profil de tolérance, et en pratique toutes les études menées avec les kinoïdes ont démontré une très bonne tolérance de ces traitements (376,401,403), avec essentiellement des réactions bénignes et transitoires aux points d'injection, mais aucun sur-risque infectieux majeur (et même des données plaidant pour des effets immunosuppresseurs moins importants que les biothérapies équivalentes (404)) ou déclenchement de maladie auto-immune. Il faut par ailleurs savoir que d'autres kinoïdes que l'IFN-K ont été développés par NEOVACS, mais aussi par d'autres équipes, chez l'animal et/ou chez l'Homme, avec parmi les cibles : le TNF α (404–406), le VEGF (402), le TGF β (405) ou encore le PDGFB (407).

Pour mémoire, les premiers travaux menés avec une stratégie de vaccination thérapeutique anti-IFN α , l'ont été dans le VIH, dans les années 90, en raison de la constatation d'une hyperactivation de la voie des IFNs dans la maladie, avec des conséquences jugées délétères (408). Le taux de réponse vaccinal était assez faible dans cet essai, concernant environ 33% des patients vaccinés, mais les patients inclus étaient immunodéprimés avec des chiffres de lymphocytes T CD4 entre 100 et 643/mm³. L'analyse de l'efficacité du traitement a par ailleurs été biaisée, car, du fait de la publication de nouvelles recommandations thérapeutiques en cours d'inclusion, 2/3 des patients ont vu leur traitement modifié pour ajouter des inhibiteurs de protéase. Malgré ce dernier élément, les auteurs notaient que les patients qui avaient répondu au vaccin avaient présenté moins de complications liées au VIH. On peut aussi noter que, même dans cette population fragile, la tolérance du traitement était bonne sur les 18 mois de suivi. Enfin, le développement des traitements antiviraux dans le VIH et les autres viroses chroniques a très largement pris le pas sur ce genre de stratégie, mais il faut savoir qu'il existe toujours des études, y compris des études récentes, s'intéressant à l'hyperactivation de la voie des IFNs dans ces indications (409–412), mais aussi en cancérologie. Mais, là encore, le rôle des IFNs est complexe, puisqu'une hyperactivation de la voie des

IFNs au sein des cellules tumorales semble pouvoir participer à la résistance aux immunothérapies (413), alors que la combinaison de l'IFN α à une immunothérapie anti-cancéreuse, semble, au contraire, pouvoir en potentialiser les effets (414).

La preuve de concept pour l'IFN-K (utilisant de l'IFN α murin pour le couplage), dans le LES, a été faite dans un modèle murin New Zealand Black/White (NZB/W) ayant reçu une injection d'adénovirus exprimant l'IFN α murin, lui-même à l'origine d'une glomérulonéphrite avec atteinte rénale sévère. L'immunisation de ces souris avec le kinoïde IFN α murin prévenait la survenue de l'atteinte rénale (jugée sur la protéinurie et les lésions histologiques) et améliorait significativement la survie (415).

L'essai clinique contrôlé de phase I/IIa mené avec l'IFN-K (et l'ISA51 comme adjuvant), chez 28 patientes LES, confirmait les bonnes immunogénicité et tolérance du traitement, et apportait des éléments en faveur d'une efficacité au moins biologique, avec notamment une réduction de la signature IFN sur l'expression de 21 gènes dans le sang (selon Yao *et al* (367)), qui était corrélée aux titres d'anticorps anti-IFN α générés et une amélioration des taux de C3 sérique chez les patientes traitées (21). Les résultats de l'essai international de phase IIb, mené avec l'IFN-K et l'ISA51, chez 166 patients LES dont la signature IFN était positive à l'inclusion, sont en attente de publication, mais les données préliminaires communiquées par NEOVACS rapportent une efficacité très significative sur la diminution de la signature IFN, ainsi que sur le score LLDAS à 36 semaines, et la réduction de la dose de corticothérapie à moins de 5mg/j, avec un bon profil de tolérance (12,9% d'effets indésirables graves dans le groupe placebo contre 6,6% dans le groupe IFN-K). En revanche, la différence sur le SRI-4 s'approchait de la significativité statistique, sans pour autant l'atteindre (54,4% dans le groupe LES contre 29,8% dans le groupe placebo, avec un $p=0,07$) et le British Isles Lupus Assessment Group-Based Composite Lupus Assessment (BICLA) n'était pas différent entre les groupes. Ces résultats devraient permettre la mise en place d'un essai de phase III dans le LES.

Concernant les autres maladies auto-immunes IFN-dépendantes, l'IFN-K a aussi été utilisé dans un modèle murin (non obese diabetic) de diabète de type 1, là aussi, avec des résultats préliminaires récents qui semblent prometteurs. Un autre essai phase IIa est en cours dans la dermatomyosite. De notre côté, nous avons mené une étude dans un modèle murin de SjS avec atteinte systémique, dont les résultats seront détaillées plus loin.

Ainsi, on retrouve dans cette stratégie thérapeutique innovante, des caractéristiques qui la rendent particulièrement adaptée à la prise en charge d'une maladie telle que le SjS, où la grande majorité des patients présente une altération significative de leur qualité de vie sans forcément d'engagement du pronostic vital : apparente innocuité (et donc rapport bénéfice/risque favorable), faible niveau de contrainte (et donc observance élevée) avec un faible nombre d'injections faisables en ambulatoire, absence d'immunisation vis-à-vis du

traitement (et donc prise en charge au long cours facilitée), polyclonalité de la réponse anticorps (et donc neutralisation des 12 isotypes circulants de l'IFN α (374)) et faible coût.

IV.4 Les inhibiteurs de Janus Kinase

De nombreux récepteurs cytokiniques, dont les récepteurs aux IFNs, ne possèdent pas de machinerie enzymatique propre, et se reposent donc sur l'utilisation de kinases, recrutées dans le cytosol, afin de transmettre leur signal. Parmi ces kinases cytosoliques, les Janus Kinase (JAK), nommées ainsi d'après le dieu romain bicéphale Janus (d'une part du fait de leur structure moléculaire, et d'autre part parce que les JAK se situent au commencement des cascades de signalisation intracellulaire), sont indispensables à la signalisation par de nombreuses cytokines (416). Ainsi, cette famille qui comporte 4 membres (JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2) a été identifiée dans les années 90, et a été rapidement identifiée comme une cible de choix dans le traitement de nombreuses maladies, essentiellement hématologiques, auto-immunes et inflammatoires.

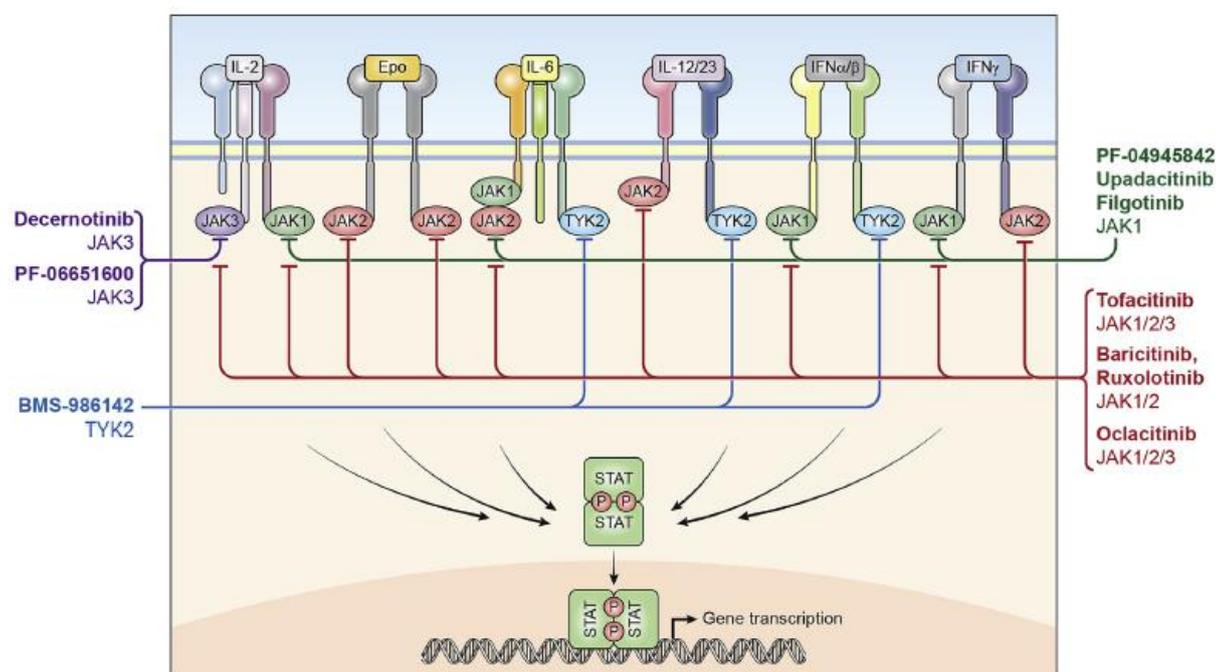


Figure 31. Principaux inhibiteurs de JAK et leurs impacts sur différents récepteurs cytokiniques, d'après Gadina *et al* (417)

Quasiment tous les inhibiteurs de JAK (JAKi) sont des inhibiteurs compétitifs du site de liaison à l'ATP des JAK, nécessaires pour le fonctionnement de leur activité enzymatique, et ont une sélectivité plus ou moins importante pour un ou plusieurs membres de la famille des JAK. Il faut d'ailleurs garder en tête que les 3 JAKi ayant une AMM pour le moment, la ruxolotinib, le tofacitinib et le baricitinib, sont considérés comme étant des JAKi de 1^{ère} génération, qui ont tous une activité pan-inhibitrice, qui va dépendre de la molécule, du tissu et de la dose utilisée (à forte dose, la sélectivité va être moins importante, comme nous le verrons après pour le tofacitinib) (418).

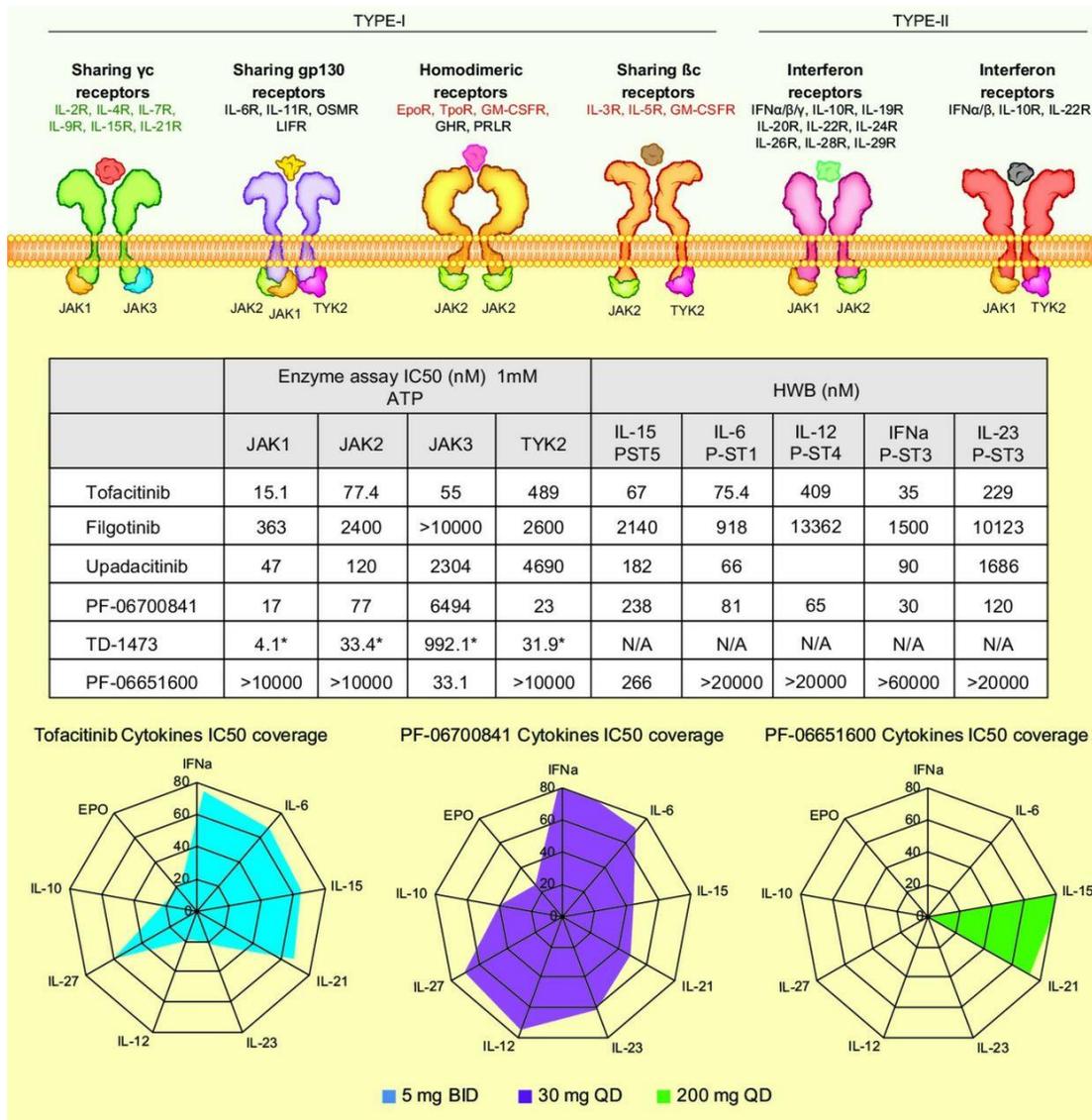


Figure 32. Exemples des profils de sélectivité de différents JAKi, avec les concentrations inhibitrices 50 (IC50) pour les différents JAKs, ainsi que sur le profil de sécrétion cytokinique sur sang total humain (HWB), d'après Danese *et al* (418)

Le 1^{er} JAKi à avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM), est le ruxolitinib (419), en 2012, dans la prise en charge des syndromes myéloprolifératifs (souvent associés à une mutation activatrice de JAK2), avec en particulier un effet sur les signes généraux et sur la réduction de la splénomégalie. Le ruxolitinib a surtout une activité anti-JAK1 et JAK2, mais aussi une activité anti-TYK2 modérée (alors que l'effet anti-JAK3 est négligeable) et a donc un effet sur de nombreuses cytokines, dont l'ensemble des 3 types d'IFNs (mais aussi l'IL6, l'IL12, l'IL23, l'Erythropoïétine, le *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* [GM-CSF] ou encore l'hormone de croissance). Concernant les pathologies qui nous intéressent plus ici, des case reports retrouvant un effet bénéfique de ce traitement ont été rapportés dans la dermatomyosite (420) et dans le lupus engelure (421), et bien qu'il n'existe pas de nouvelle AMM dans d'autres indications, nous disposons maintenant de résultats, et il y a des essais cliniques toujours en cours dans plusieurs autres pathologies (PR (422), psoriasis (423), pelade

(424,425), vitiligo (426)), par voie orale et avec une forme topique par voie cutanée. De notre côté, nous avons utilisé le ruxolitinib chez un patient atteint de SjS systémique avec signe généraux, néphropathie glomérulaire et myélofibrose sans mutation JAK2, que nous détaillerons dans la suite de ce travail de thèse.

Ensuite, le tofacitinib (développé comme un anti-JAK3, mais aussi capable d'agir efficacement sur JAK1, et avec une faible affinité sur JAK2, surtout lorsqu'il est utilisé à forte dose (427)). Ainsi, là aussi cette molécule est capable d'agir sur les 3 types d'IFNs, et a montré son efficacité dans le traitement de la PR, avec une première AMM obtenue dans cette indication (après échec ou intolérance au méthotrexate [MTX]) en 2017 (428), puis une extension d'AMM au rhumatisme psoriasique (après échec ou intolérance au MTX) et à la rectocolite hémorragique (en 2^{ème} et 3^{ème} ligne après échec des traitements conventionnels et/ou des traitements anti-TNF α) en 2018 (429,430). D'autres essais thérapeutiques ont été menés, ou sont en train d'être menés, et des cas reports ont été rapportés dans des maladies auto-immunes et inflammatoires, comme dans le LES (431), la SSC (432), la dermatomyosite (433) et certaines interféronopathies monogéniques (CANDLE, SAVI, AGS) (434) pour les maladies identifiées comme étant IFN-dépendantes, mais il existe aussi des données dans les arthrites juvéniles (435), le psoriasis (436,437), la pelade (425,438), la dermatite atopique (439), la maladie de Crohn (440) et la spondylarthrite ankylosante (441). A noter que pour ce JAKi aussi, il existe une forme administrée par voie orale et une forme topique cutanée, mais aussi, fait singulier, une forme topique en collyre (CP-690,550). En effet, le tofacitinib en collyre a été utilisé à différentes doses dans un essai randomisé et contrôlé (contre ciclosporine en collyre et placebo) de phase I/II chez des patients atteints de syndrome sec oculaire (442,443). Il n'y avait en revanche qu'une faible proportion de patient atteints de SjS (442) (38 patients, soit 11,6% des effectifs), ne permettant pas d'étude en sous-groupe valable dans cette population qui pourtant constituerait une cible de choix pour ce genre de traitement. Cette étude a montré un bon profil de tolérance (notamment par rapport à la ciclosporine en collyre), une diminution d'un certain nombre de cytokines pro-inflammatoires (mais les IFNs n'ont pas été évalués) (443) et des effets cliniques encourageants (442). Enfin, on peut noter que le tofacitinib par voie générale a été utilisé récemment dans des cas d'uvéïte et de sclérite particulièrement réfractaires (444).

Le dernier JAKi ayant eu une AMM à ce jour, en 2017 dans la PR (aussi après échec ou intolérance au MTX), est le baricitinib. Il s'agit d'un anti-JAK1/JAK2, très similaire au ruxolitinib, mais avec comme principale différence une élimination rénale du médicament (alors que le ruxolitinib et le tofacitinib sont métabolisés par le foie, en particulier le cytochrome p450), ainsi qu'une affinité plus faible pour TYK2 (445). Il est important de noter que le baricitinib a montré sa supériorité face à l'adalimumab, l'anti-TNF α le plus utilisé dans la PR, dans un essai contrôlé randomisé (446). Le baricitinib a aussi été utilisé dans le 1^{er} essai contrôlé randomisé de phase 2 dans le LES (447) (mais comme nous l'avons vu plus haut, d'autres sont en cours (448)), avec des résultats encourageants publiés en 2018 pour le groupe de patients ayant reçu la dose la plus forte, à 4mg, et un essai de phase 3 en cours. Là aussi, il existe des essais cliniques dans d'autres indications, certaines communes aux autres JAKi,

comme les interféronopathies monogéniques (449) (avec un protocole compassionnel initialement, et maintenant un essai en ouvert s'intéressant particulièrement à l'AGS), l'arthrite juvénile, la dermatite atopique (450), la pelade (451), le psoriasis (452), mais aussi des indications plus originale comme l'artérite à cellules géantes réfractaire, la pseudopolyarthrite rhizomélique, l'hypersensibilité retardée ou l'atteinte rénale diabétique. Enfin, on peut noter la publication récente de 2 case reports, l'un dans la dermatomyosite juvénile réfractaire (453), et l'autre (454) parle d'un cas où le baricitinib a été utilisé chez une patiente atteinte d'une maladie auto-immune complexe associant PR, SSc et diabète de type 1, avec une efficacité sur l'ensemble des maladies (d'après les auteurs, même le diabète a été amélioré, avec des besoin en insuline moindre et une baisse de l'hémoglobine glyquée).

Il existe plusieurs autres JAKi en développement plus ou moins bien avancé, en particulier des molécules dites de 2^{ème} génération, ciblant plus sélectivement (bien que, pour quasiment toutes les molécules cette sélectivité est relative, selon différents paramètres, dont la posologie utilisée) JAK1 (filgotinib, upadacitinib, solcitinib ou GSK2586184, itacitinib, PF-06700841), JAK2 (lestaurtinib) JAK3 (decernotinib, peficitinib) ou TYK2 (BMS-986165, PF-06700841). D'autres stratégies intéressantes sont aussi développées, avec notamment un JAKi pan-inhibiteur ciblant spécifiquement la muqueuse digestive (car sa biodisponibilité est très faible), TD-1473 (455), mais aussi des molécules ciblant plusieurs JAK, comme PF-06700841 (456) qui est plutôt sélectif de JAK1 et TYK2 (particulièrement intéressant pour l'inhibition de la signalisation par les IFNs), et PF-06651600 (457), qui, contrairement aux autres JAKi, est un inhibiteur irréversible de JAK3 (avec qui il forme une liaison covalente), qui est aussi capable d'inhiber des kinases de la famille Tec (comme la Bruton's Tyrosine Kinase [BTK], une kinase majeure pour le bon fonctionnement des lymphocytes B) .

La majorité des essais cliniques en cours se font dans les indications déjà évoquées pour les JAKi sur le marché, mais il y a tout de même quelques éléments notables, l'évaluation du filgotinib dans la glomérulonéphrite lupique extra-membraneuse et dans le SjS « actif » selon le score ESSDAI (avec des données *in vitro* intéressantes sur les cellules des glandes salivaires (458)) ou l'évaluation de l'itacitinib dans le syndrome de libération cytokinique en lien avec certains traitements utilisés en hématologie (mais d'autres thérapies très utilisées dans le domaine de l'auto-immunité, comme le rituximab, sont aussi capables d'induire ce phénomène). Aussi, le développement d'inhibiteurs sélectifs de TYK2 semble être une piste particulièrement intéressante pour les pathologies qui nous intéressent, puisque le blocage sélectif de cette kinase devrait être essentiellement efficace sur la production d'IFNs de type 1 et de type 3, mais aussi d'IL12/23. Ainsi, assez « naturellement », le développement clinique du BMS-986165 (459) s'intéresse particulièrement au LES (460) (rénal et non rénal) et au psoriasis (461), mais toutes les autres interféronopathies de type 1 seraient des cibles potentielles, en particulier celles où il existe aussi un rationnel pour cibler la voie IL12/23, comme le SjS (462–464) .

En termes de mécanistique en lien avec les voies des IFNs, il a été montré que les 2 JAKi ayant obtenu une AMM dans la PR, le tofacitinib et le baricitinib, étaient capables, *in vitro*, dans des *fibroblast-like synovocytes* de PR traités par TNF α et, *in vivo*, dans un modèle de souris transgénique pour le TNF α , d'induire une réduction de la signature IFN (465), et que cette cascade induite par le TNF α était dépendante d'IRF1.

Enfin, jusqu'à présent le profil de tolérance des JAKi semble particulièrement favorable (466), sans alerte majeure, et ce malgré leur action sur de nombreuses cytokines. Plusieurs méta-analyses d'essais contrôlés randomisés, ont été récemment publiées, ne retrouvait pas d'augmentation du risque cardio-vasculaire (467) (malgré des modifications du bilan lipidique) et un risque faible d'infection sévère, avec simplement une augmentation modérée du risque de zona (468), qu'on retrouve aussi chez les anticorps anti-IFN α ou anti-IFNAR cités plus haut. Il faut noter en revanche que les plus hauts dosages de tofacitinib et de baricitinib étaient associés à un sur-risque de maladie veineuse thromboembolique. Aussi, en particulier pour les molécules inhibant JAK2 et JAK3 (avec les limites sur la sélectivité que nous avons évoquées plus haut pour les molécules de 1^{ère} génération, ce qui explique la survenue de cytopénies avec le tofacitinib à haute dose), il faut noter la survenue de cytopénies. On peut noter aussi que l'efficacité de la vaccination anti-pneumococcique (par Prevenar 13) et anti-tétanique a été évaluée chez une centaine de patients traités au long cours par baricitinib (469), avec une réponse humorale (68% des cas pour le premier vaccin et 43% pour le second) similaire à ce qui a été observé précédemment dans la PR sous biothérapie.

IV.5 Les autres traitements

Parmi les autres traitements jouant sur les voies de signalisation des interférons, on peut citer deux études intéressantes, bien que préliminaires et réalisées sur de très petits effectifs, à propos d'un inhibiteur du TNF receptor-associated factor NF κ B activator (TANK)-binding kinase 1 (TBK1) et de l'I κ B kinase ϵ (IKK ϵ) appelé BX795 (470,471). TBK1 et IKK ϵ sont des kinases importantes dans la voie de signalisation des récepteurs cytosoliques (comme les RLRs ou cGAS par exemple) aux acides nucléiques, puisqu'elles permettent la phosphorylation d'IRF3 et IRF7, qui vont alors être capables de se transloquer dans le noyau et d'induire la production d'IFNs de type 1 (mais aussi de type 3). TBK1 et IKK ϵ sont aussi impliquées dans la boucle d'auto-amplification des IFNs de type 1, puisque ce sont des ISGs, et IKK ϵ est même impliquée dans la voie de signalisation en aval de l'IFNAR (472,473). BX795 a démontré sa capacité à réduire l'activation de la voie des IFNs de type 1 (via une signature IFN sur 5 gènes [IFI44, IFI44L, IFIT1, IFIT3 et MX1] dans les cellules mononuclées du sang et l'utilisation d'une lignée cellulaire reportrice HEK-Blue IFN α/β) et réduire la phosphorylation de TBK1 (évaluée par cytométrie en flux) dans les pDC d'un petit groupe de patients SJS, LES et SSc dont la signature IFN était connue pour être positive (470). Le même genre d'étude a aussi été réalisé chez 4 patients atteints d'interféronopathie de type SAVI, avec aussi de très bons résultats biologiques (471).

Il existe aussi un essai en cours dans la PR sur l'utilisation d'un antagoniste de l'*Interleukin-1 Receptor Associated Kinase 4* (IRAK4) (474), une kinase importante dans la transduction du signal de nombreux récepteurs

membranaires, dont les TLRs qui utilisent MyD88 (mais aussi le récepteur à l'IL1 par exemple). Ainsi, l'utilisation de cet antagoniste (PF-06650833) semble avoir un effet sur la production d'IFNs de type 1 (mais aussi d'IL1, d'IL6 et de TNF α), notamment en inhibant la cascade de phosphorylation qui aboutit à l'activation d'IRF5 (475,476) .

Comme nous l'avons vu plus haut, les inhibiteurs de JAK sont en train de se faire une place de choix (qui risque encore de grandir) dans la prise en charge des maladies auto-immunes et inflammatoires, mais d'autres options sont explorées, notamment les inhibiteurs de STATs selon différentes modalités (417). Il s'agit d'une option qui a été particulièrement explorée et qui est toujours en cours d'exploration dans le traitement des pathologies néoplasiques, une activation constitutive de certains STAT (notamment STAT3) étant fréquemment présente chez les cellules cancéreuses, il n'existe en revanche pas d'essai clinique de ce type, à notre connaissance, dans le traitement des maladies auto-immunes et inflammatoires. Cela dit, certaines molécules utilisées dans d'autres indications, comme la pravastatine (477) ou la fludarabine (478), ont été identifiées comme étant capable d'inhiber STAT1, et donc d'agir sur la voie des IFNs.

Aussi, une autre approche ciblant la cascade de signalisation menant à la production d'IFNs pourrait être l'inhibition des IRFs, et il y a d'ailleurs des efforts de recherche dans ce sens, mais à l'heure actuelle, il n'existe aucun inhibiteur direct (mais quelques molécules existent dans la nature, notamment des protéines issues de l'arsenal de certains pathogènes) de ces facteurs de transcription (479).

Enfin, complètement en amont, il existe aussi des travaux sur des anticorps monoclonaux anti-TLR4 (480) et anti-TLR3, jouant donc sur la reconnaissance de signaux à l'origine de la production d'IFNs. Ces molécules sont en cours d'essais cliniques de phase précoce, dans la PR pour l'anti-TLR4 (NI-0101), dans la rectocolite hémorragique pour l'anti-TLR3 (PRV-300). Il y a aussi des données publiées sur un essai de phase IIa utilisant un oligonucléotide antagoniste des TLR 7, 8 et 9 (IMO-8400) dans le psoriasis, avec de bons résultats (481). De manière plus confidentielle, il existe quelques publications sur l'utilisation d'extraits de *Mycobacterium W.* (initialement congelé à sec, sans pouvoir pathogène) comme antagoniste du TLR9 dans une série de 8 patients atteints de névrite optique corticorésistante, avec de bons résultats à court (482) et à long (5 ans) terme (483).

Objectifs et problématiques de la thèse

Mon travail de thèse s'est particulièrement intéressé au SjS (175), la 2^{ème} maladie auto-immune systémique la plus fréquente, qui est présente dans toutes les ethnies à travers le monde et touche particulièrement les femmes entre 40 et 60 ans.

La physiopathologie du SjS est complexe et encore, pour partie, méconnue, mais comme nous venons de la voir, les voies des IFNs, de type 1, mais aussi de type 2 (et probablement de type 3, même si les données sont moins nombreuses) semblent avoir une place centrale dans la maladie. La présence d'une signature IFN a été décrite dans le sang et les tissus cibles (en particulier les glandes salivaires), qui sont aussi le siège d'un infiltrat inflammatoire, incluant des pDC, principales sources d'IFNs de type 1, il a aussi de nombreux polymorphismes (notamment d'IRF5 et de STAT4) concernant des gènes de la voie des IFNs qui sont associés à la maladie, et des case reports de SjS induits par les IFNs utilisés comme traitement dans d'autres indications.

En termes de symptomatologie, le SjS a un fort tropisme muqueux, avec une atteinte préférentielle au niveau glandulaire salivaire et lacrymal, où l'infiltration par des cellules du système immunitaire est à l'origine d'une sécheresse buccale et oculaire, présente chez la majorité des patients. Par ailleurs, entre 30 et 50% des patients peuvent présenter des formes systémiques, pouvant toucher les articulations, le système nerveux, les poumons, les reins ou encore la peau. Alors que la maladie est souvent jugée bénigne, les études ont montré une augmentation de la mortalité par rapport à la population générale, avec des taux de survie de 90% à 10 ans et 81% à 20 ans (484), notamment en lien avec la complication la plus sérieuse de la maladie, le lymphome B (qui touche environ 5% des patients) (485).

A ce jour, des mesures symptomatiques (larmes artificielles, sialagogues) sont utilisées pour les atteintes glandulaires, et des immunomodulateurs peuvent être prescrits au cas par cas, en fonction des atteintes, mais aucun essai clinique bien conduit n'a validé de traitement de fond dans la maladie. Parmi les essais menés, on peut noter que l'HCQ est le seul traitement avec un effet anti-IFN qui a été évalué dans un essai contrôlé randomisé s'intéressant au SjS, l'essai JOQUER (486). Cet essai est revenu négatif en ce qui concerne le critère principal d'évaluation, en revanche, une analyse *ad hoc* (487) a montré que la signature IFN (positive chez environ 50% des patients à l'inclusion), basée sur un score incluant l'expression de 5 gènes (IFI44, IFI44L, IFIT1, IFIT3, et MX1) était réduite à 6 mois dans le groupe traité par rapport au groupe placebo. Il faut cependant tenir compte de plusieurs éléments concernant l'échec sur l'objectif principal : le critère d'évaluation principal a été évalué à 6 mois, probablement trop précocement par rapport au délai d'action du médicament, et surtout les auteurs ont choisi l'amélioration de 30% d'au moins deux parmi trois échelles numériques analogiques concernant la sécheresse, la douleur et la fatigue. Il faut aussi savoir que le score ESSDAI n'était pas encore disponible dans sa forme actuelle, mais que de toute façon le nombre de patients avec atteinte systémique était faible, ne permettant vraisemblablement pas de conclure sur ce point. Pour mémoire, même si le critère de jugement

principal a été évalué à 6 mois, l'étude comportait une phase de suivi prolongé, avec, de fait, des effectifs moindres, où tous les patients ont reçu de l'HCQ de 6 à 12 mois, en plus de la phase initiale. Chez les patients qui ont finalement reçu un an d'HCQ, il y avait une tendance favorable, avec presque 2 fois plus de répondeurs par rapport au groupe contrôle, mais sans différence statistiquement significative. On peut donc tout de même penser qu'un suivi de plus longue durée aurait pu modifier les résultats de cet essai, et il est par ailleurs probable que certaines sous-populations de patients SjS pourraient bénéficier de l'effet de l'HCQ, notamment en cas de manifestations rhumatismales (488).

En dehors de l'HCQ, aucun des traitements anti-IFN que nous avons évoqué précédemment n'a été évalué dans le SjS, malgré les nombreuses données publiées qui incriminent ces voies.

Ainsi, les objectifs poursuivis étaient de :

- 1) D'évaluer l'intérêt d'une approche thérapeutique par IFN-K dans des modèles précliniques de SjS. La majorité des modèles animaux étiquetés « SjS primitif » sont peu adaptés à l'évaluation de nouveaux traitements immunomodulateurs, car ils sont limités à l'atteinte glandulaire, ainsi, en clinique, ils correspondraient à des patients chez qui le rapport bénéfice/risque pour un tel traitement ne serait pas forcément favorable. J'ai été amené à discuter, à travers une lettre aux éditeurs (Article 1 : Killian *et al*, The MRL/lpr Mouse Model: An Important Animal Model for Systemic Sjögren Syndrome and Polyautoimmunity, *J Rheumatol* 2019), faisant suite à un éditorial de Mavragani & Moutsopoulos (489), de la pertinence des modèles murins disponibles, en particulier de la classification entre SjS dit primitif ou secondaire, et de l'intérêt d'utiliser des modèles avec atteinte systémique, comme le modèle MRL/lpr. Une première partie de mon travail a été de mettre en place les différents tests fonctionnels et immunologiques pour évaluer l'efficacité de l'IFN-K dans le SjS murin. C'est en 1^{er} lieu dans le modèle MRL/lpr, et à l'aide de deux formulations d'IFN-K, que j'ai montré que cette stratégie thérapeutique était capable d'améliorer les atteintes glandulaire et neurologique périphérique, ainsi que de bloquer la signature IFN (Article 2 : Killian *et al*, Blocking interferon α by vaccination is highly efficient in a systemic Sjögren's syndrome preclinical trial, *NPJ Vaccines*, en révision). Nous avons ensuite décidé d'évaluer cette stratégie de vaccination thérapeutique dans le modèle IL14Tg, un modèle de SjS plus proche de la cinétique de la pathologie humaine, avec une installation lente des atteintes, sur plus d'un an. Ce modèle est aussi particulièrement intéressant du point de vue de la lymphomagenèse, puisque presque 100% des souris de plus de 18 mois vont présenter un lymphome B. J'ai donc mis en place un élevage de ces souris à Saint-Etienne, et débuté un essai préclinique utilisant l'IFN-K par voie systémique et par voie muqueuse (sublinguale) pour évaluer l'efficacité du traitement sur les atteintes présentes dans ce modèle (Article 3 : Killian *et al*, en préparation).

- 2) Approfondir les connaissances sur la physiopathologie du syndrome de Sjögren, en particulier autour des mécanismes à l'œuvre dans l'induction et le maintien de l'activation des voies des IFNs, pour, à terme, optimiser la prise en charge des patients et, idéalement, s'attaquer aux mécanismes plutôt qu'à leurs conséquences. Dans cette optique, je me suis en particulier intéressé aux autoanticorps anti-Ro60/SSA d'isotype IgE dans le SjS humain, sachant que Ro60/SSA est un auto-antigène emblématique de la maladie, et que, d'une part, un nouveau mécanisme impliquant les IgG anti-Ro60/SSA, les rétro-éléments endogènes *Alu* et la production d'IFNs de type 1 a été décrit récemment (178), et que, d'autre part, un mécanisme physiopathologie propre (impliquant aussi la production d'IFN de type 1) a été mis en évidence dans le LES pour les IgE auto-réactives anti-ADN double brin (490). Grâce à un financement par le Programme Hospitalier de Recherche Clinique Interrégional de la région Auvergne-Rhône-Alpes, j'ai pu mettre en place une étude clinique (101 patients SjS inclus à ce jour, et 18 patients avec syndrome sec non-SjS) dont j'expose le rationnel ici et dont l'objectif principal est d'évaluer l'association des IgE anti-Ro60/SSA avec l'activité du SjS, jugée sur l'ESSDAI. En fonction des résultats, ce marqueur pourrait être utile au diagnostic (chez des patients où les auto-anticorps classiques seraient négatifs), mais aussi, chez certains patients, à la prise en charge thérapeutique, comme il existe un anticorps monoclonal anti-IgE, l'omalizumab (491)

- 3) Evaluer la place des nouveaux traitements immunomodulateurs développés dans les autres maladies auto-immunes, en particulier les JAKi qui, pour deux d'entre eux ont déjà des AMM dans la PR, avec de nombreux autres essais en cours dans les maladies auto-immunes et auto-inflammatoires. Dans le SjS, il existe de rares données *in vitro* et chez l'animal avec le filgotinib (458), mais rien en clinique humaine. Je rapporte ici le premier cas de patient atteint de SjS avec une forme systémique particulièrement sévère incluant une atteinte hématologique centrale à type de myélofibrose, chez qui un traitement par ruxolitinib a permis de contrôler la maladie (Article 4 : Killian *et al*, *Blood*, en préparation)

I. Réflexion autour du positionnement du modèle MRL/lpr comme modèle murin de syndrome de Sjögren systémique

Le choix du modèle animal le plus adapté à une étude préclinique dans le domaine des maladies auto-immunes systémiques est une problématique centrale du fait d'une physiopathologie très complexe, associant des anomalies immunologiques, des facteurs d'environnement et une prédisposition génétique. Ainsi, il existe de très nombreux modèles animaux pour chacune de ces maladies, car aucun n'est capable isolément d'en reproduire toute la complexité. Dans le SjS, cette problématique comporte un niveau supplémentaire de complexité, les modèles murins étaient classés en SjS primaire ou secondaire (30,492–494).

Chez l'Homme, la mise au point du concept de SjS primitif ou secondaire il y a 40 ans (495), a été faite en partant de la constatation que le profil des patients atteints uniquement de SjS et des patients atteints de SjS associé à une PR, n'était pas le même, avec plus de parotidites, de syndromes de Raynaud, de purpura, d'adénopathies, de myosites, d'atteintes rénales et d'anticorps anti-Ro/SSA et La/SSB (496) dans le 1^{er} cas. Le même genre de constatation a ensuite été fait avec la cirrhose biliaire primitive (497). En revanche, le concept a été largement étendu à toutes les autres maladies auto-immunes systémiques, mais il n'existe pas de donnée pour dire qu'un SjS dit secondaire aura un phénotype clinico-biologique moins sévère qu'un SjS dit primitif, au contraire, les données, notamment dans le LES (498) et la SSc (499,500) plaident plutôt pour des profils comparables. Compte-tenu de ces éléments, plusieurs équipes, y compris celle à l'origine du concept chez l'Homme (489), remettent en question cette classification, et surtout l'utilisation qui en a été faite depuis 40 ans.

Dans le processus menant à la publication de nos résultats sur l'évaluation de l'IFN- κ dans le modèle MRL/lpr, nous avons été directement confrontés à ce problème, et nous avons essuyé des refus au principal motif que le modèle MRL/lpr était identifié comme un modèle de SjS dit secondaire, du fait de la présence de certaines atteintes plus fréquentes dans le LES (néphropathie glomérulaire, signes neurologiques centraux) que dans le SjS (sans en être absentes cela dit). La problématique ici étant que, la grande majorité des modèles de SjS dit primitif (501) ne présente qu'une atteinte glandulaire, et s'il s'agissait de patients, ils ne seraient probablement pas inclus dans un essai évaluant un nouveau traitement immunosuppresseur, du fait d'un rapport bénéfice/risque défavorable. A contrario, le modèle MRL/lpr comporte de très nombreuses caractéristiques cliniques (prédominance féminine, syndrome sec salivaire et buccal, neuropathie périphérique, pneumopathie interstitielle, arthrites, adénopathies) et biologiques (anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, cryoglobulinémie, implication des IFNs (431,502–505)) de SjS avec atteinte systémique, ou nous avons fait valoir notre point de vue, via une lettre publiée dans *Journal of Rheumatology*, estimant qu'il s'agissait d'un modèle de choix pour l'évaluation de nouveaux traitements immuno-actifs dans la maladie.

The Journal of Rheumatology

The MRL/lpr Mouse Model: An Important Animal Model for Systemic Sjögren Syndrome and Polyautoimmunity

Martin Killian, Frederic Batteux and Stephane Paul

DOI: 10.3899/jrheum.190820

<http://www.jrheum.org/content/early/2019/09/11/jrheum.190820>

1. Sign up for TOCs and other alerts
<http://www.jrheum.org/alerts>
2. Information on Subscriptions
<http://jrheum.com/faq>
3. Information on permissions/orders of reprints
http://jrheum.com/reprints_permissions

The Journal of Rheumatology is a monthly international serial edited by Earl D. Silverman featuring research articles on clinical subjects from scientists working in rheumatology and related fields.

The MRL/lpr Mouse Model: An Important Animal Model for Systemic Sjögren Syndrome and Polyautoimmunity

To the Editor:

We read with great interest the editorial by Mavragani and Moutsopoulos¹, questioning the historical classification of Sjögren syndrome (SS) as primary or secondary.

Few authors² have published papers in line with these criticisms, but this editorial was of particular interest to us, because Dr. Moutsopoulos and his team were the ones who coined the concept of secondary SS more than 35 years ago. The authors remind us that it was specifically coined for patients with SS in a rheumatoid arthritis (RA) background, because of the clinical, serological, and genetic differences they observed between SS and SS/RA patients¹. The same kind of observations were made only in patients with primary biliary cirrhosis presenting with sicca syndrome¹; however, the concept of secondary SS has been improperly expanded to include the other systemic autoimmune diseases, especially systemic lupus erythematosus (SLE). We think that this expansion occurred because SS, especially secondary SS, is still widely seen as a benign disease, confined to the exocrine glands, whereas it is now evident that both primary and secondary SS include patients with systemic disease, life-threatening phenotypes³, and an increased risk for lymphoma development¹. Because this primary/secondary SS dichotomy misrepresents the potential manifestations and risks of the syndrome, as soon as the criteria for SS are fulfilled, we agree with the authors to say that the term *secondary* should be replaced by a more descriptive term (i.e., *SS associated with*) or *polyautoimmunity*, as preferred by other authors².

Consequently, the same dichotomy has been used to classify the animal models of SS⁴. Choosing the right animal model for a preclinical trial in systemic autoimmune diseases (SS, SLE, systemic sclerosis...) is always challenging, because of the complex and incompletely understood pathophysiology of these diseases, but in SS it is even more complicated because of this classification. Indeed, many investigators and experts consider that all the new treatments, including immunosuppressants, biologics, and targeted therapies, should be evaluated in the primary SS mouse models [e.g., nonobese diabetic (NOD) mice and their derivatives, which are first, type 1 diabetes models] while these models are almost always limited to the glandular disease. In clinical practice, such patients would not be eligible for immunological therapies owing to the unfavorable risk-benefit balance.

We conducted a preclinical trial using an innovative anti-interferon (IFN)- α therapeutic vaccine in a well-recognized congenital model of SS, the MRL/MpJ-Fas^{lpr}/lpr (MRL/lpr) mouse model^{4,5}. Despite good results (reduction of the global disease activity, type 1 IFN signature, and glandular infiltrates), we experienced difficulties in the publication process (the manuscript is still under review) because this model is usually referred to as a secondary mouse model of SS. That is because MRL/lpr mice present with glomerulonephritis, which is classic in SLE but rare (although not absent) in SS⁶. Of note, the MRL/lpr mouse model has also been historically identified as a pivotal model for neurological SLE⁷, because of the neuropsychiatric/central nervous system (CNS) manifestations (which are not absent either in SS) seen in these mice. MRL/lpr mice also present with peripheral neuropathy, a particularly rare complication of SLE, but one of the most frequent in SS⁶. Apart from these features, the clinical, biological, and histological phenotype of MRL/lpr mice encompasses the key features of SS: female sex predilection, decreased salivary flow rate (a feature erroneously noted as absent in all the review papers⁴ about animal models of SS, but which was noticed by us and other teams⁸ in MRL/lpr mice) and tear production, lymphocytic infiltrates in the salivary and lacrimal glands, and anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibodies production. Apart from the renal and CNS/peripheral nervous system manifestations, these mice also develop other manifestations resembling those of human patients with systemic SS, such as arthritis, pneumonitis, cryoglobulinemia, and signs of lymphoproliferation (lymphadenopathies, splenomegaly)⁷. Even the NOD/ShiLtJ-derived model NOD.B10Sn-H2b/J (NOD.B10), which was described by Kiripolsky, *et al*⁹ as an excellent tool for trials designed to

evaluate extraglandular manifestations in SS, has fewer systemic features than MRL/lpr mice.

Finally, the etiopathogenesis of autoimmunity in these MRL/lpr mice encompasses pathogenic mechanisms leading to SS in humans, such as the upregulation of type 1 (Killian, *et al*, aforementioned unpublished work) and type 2 IFN⁷ pathways, as well as the proliferation of double-negative (CD4⁻CD8⁻) T cells¹⁰, due to the lymphoproliferation (lpr) mutation-related defect in Fas-mediated apoptosis of autoreactive T cells.

No perfect model for SS exists, since no single mouse model has replicated each and every aspect of human SS to date. However, we think that the MRL/lpr mouse model should be considered as a model of choice for preclinical trials evaluating new immunological treatments in SS.

MARTIN KILLIAN , MD, EA 3064, Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, Université de Lyon, and Internal Medicine Department, Saint-Etienne University Hospital, Saint-Etienne; **FRÉDÉRIC BATTEUX** , MD, PharmD, PhD, Team Stress oxydant, prolifération cellulaire et inflammation, INSERM U1016 Institut Cochin, Paris; **STÉPHANE PAUL**, PhD, EA 3064, Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, Université de Lyon, Saint-Etienne, France. Address correspondence to M. Killian, Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, Faculté de Médecine Jacques Lisfranc, Pôle Santé Innovations, 10 rue de la Marandière, 42270 Saint-Priest-en-Jarez, France. E-mail: martin.killian@chu-st-etienne.fr

REFERENCES

1. Mavragani CP, Moutsopoulos HM. Primary versus secondary Sjögren syndrome: is it time to reconsider these terms? *J Rheumatol* 2019;46:665–6.
2. Amador-Patarroyo MJ, Arbelaez JG, Mantilla RD, Rodríguez-Rodríguez A, Cárdenas-Roldán J, Pineda-Tamayo R, et al. Sjögren's syndrome at the crossroad of polyautoimmunity. *J Autoimmun* 2012;39:199–205.
3. Flores-Chávez A, Kostov B, Solans R, Fraile G, Maure B, Feijoo-Massó C, et al. Severe, life-threatening phenotype of primary Sjögren's syndrome: clinical characterisation and outcomes in 1580 patients (GEAS-SS Registry). *Clin Exp Rheumatol* 2018;36 Suppl 112:121–9.
4. Donate A, Voigt A, Nguyen CQ. The value of animal models to study immunopathology of primary human Sjögren's syndrome symptoms. *Expert Rev Clin Immunol* 2014;10:469–81.
5. Hayashi Y, Haneji N, Hamano H. Cytokine gene expression and autoantibody production in Sjögren's syndrome of MRL/lpr mice. *Autoimmunity* 1996;23:269–77.
6. Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Solans R, Camps M-T, Casanovas A, Sopena B, et al. Systemic involvement in primary Sjögren's syndrome evaluated by the EULAR-SS disease activity index: analysis of 921 Spanish patients (GEAS-SS Registry). *Rheumatology* 2014;53:321–31.
7. Jeltsch-David H, Muller S. Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus and cognitive dysfunction: The MRL-lpr mouse strain as a model. *Autoimmun Rev* 2014;13:963–73.
8. Sato M, Kuroda S, Mansjur KQ, Khaliuana G, Nagata K, Horiuchi S, et al. Low-intensity pulsed ultrasound rescues insufficient salivary secretion in autoimmune sialadenitis. *Arthritis Res Ther* 2015;17:278.
9. Kiripolsky J, Shen L, Liang Y, Li A, Suresh L, Lian Y, et al. Systemic manifestations of primary Sjögren's syndrome in the NOD.B10Sn-H2b/J mouse model. *Clin Immunol* 2017;183:225–32.
10. Alunno A, Carubbi F, Bistoni O, Caterbi S, Bartoloni E, Bigerna B, et al. CD4(-)CD8(-) T-cells in primary Sjögren's syndrome: association with the extent of glandular involvement. *J Autoimmun* 2014;51:38–43.

J Rheumatol First Release September 15 2019; 2019;46:xxxx; doi:10.3899/jrheum.190820

II. Evaluation d'une stratégie de vaccination thérapeutique anti-interféron alpha appliquée à des modèles murins de syndrome de Sjögren

Comme nous venons de l'évoquer, nous avons choisi le modèle MRL/lpr comme premier modèle pour mener un essai préclinique dont l'objectif était de démontrer l'intérêt (immunogénicité, efficacité, tolérance) de la stratégie de vaccination thérapeutique utilisant l'IFN-K, pour cibler l'IFN α . Ce modèle murin est reconnu dans toutes les *reviews* sur les modèles animaux de SjS (493,494,501), et est particulièrement intéressant du fait de la forme systémique de maladie auto-immune qu'il présente, mais est en général identifié sous l'appellation inadaptée de SjS secondaire, puisqu'il est associé à une atteinte rénale glomérulaire et à une atteinte neuropsychiatrique plus fréquente dans le LES. Là aussi, comme nous l'avons vu précédemment, ce type d'atteinte existe dans le SjS, mais est plus rare, et quoiqu'il en soit, si l'on choisit tout de même d'attribuer ces atteintes à une maladie lupique associée, cela n'empêche en rien de conclure sur l'efficacité d'un traitement en ce qui concerne les manifestations *SjS-like*.

Concernant le rôle des IFNs, et en particulier des IFN α (puisque'il s'agit de la cible de l'IFN-K), les données disponibles sur le modèle MRL/lpr ne semblent, a priori, pas évidentes à interpréter, mais en pratique, les choses ne sont pas si complexes que ça. En effet, le principal point de discordance (repris dans plusieurs *reviews*) est qu'il existe une étude de 2004, avec des souris MRL/lpr KO pour l'IFNAR, pour l'IFNGR, ou pour les deux récepteurs (506), qui a montré une aggravation du phénotype clinico-biologique (lymphoprolifération et production d'auto-anticorps augmentées, et aggravation de l'atteinte rénale) des souris MRL/lpr IFNAR $^{-/-}$, alors que les souris IFNGR $^{-/-}$ présentaient un phénotype moins sévère. Les auteurs ont donc conclu que le modèle était IFN γ -dépendant, mais que les IFNs de type 1 avaient plutôt un effet protecteur. Or, on sait que les IFNs de type 1 ont une action pléiotrope, comprenant, au niveau immunologique, un rôle immunorégulateur, mais en ce qui concerne les effets extra-immunologiques, ils ont aussi un rôle anti-prolifératif et anti-angiogénique. On peut donc imaginer que l'absence totale de signalisation par les IFNs de type 1, dès le développement embryonnaire, puisse avoir des conséquences bien au-delà du système immunitaire, qui pourraient expliquer, au final, des effets délétères. Concernant les données plus récentes, elles plaident plutôt pour un rôle des IFNs de type 1 dans la physiopathologie du modèle :

- les souris MRL/lpr KO pour l'IRF5 semblent présenter un phénotype clinico-biologique moins sévère (moins d'anticorps, moins de lymphoprolifération, moins d'atteinte rénale et une meilleure survie) (507)
- certains mécanismes induisant la production d'IFNs de type 1, ou impliquant une sensibilité plus grande aux IFNs de type 1, identifiés dans le LES humain, ont été retrouvés dans le modèle MRL/lpr (502–504),
- certains traitements anti-IFN (anticorps monoclonaux, JAKi) ont permis d'améliorer le tableau présenté par les souris MRL/lpr, avec, selon les cas, un effet sur la signature IFN (431,508)

On peut donc légitimement penser que le modèle MRL/lpr est, au moins en partie, IFN-dépendant, avec à la fois des données pour les IFNs de type 1, mais aussi pour l'IFN γ , ce qui semble être un argument de plus pour penser

qu'il s'agit d'un modèle pertinent dans l'évaluation du SjS, ce qui a été avalisé par Mavragani & Moutsopoulos, des experts reconnus de la maladie, en réponse à la lettre que nous avons publié (509). En revanche, comme les paramètres *SjS-like*, aussi bien concernant l'atteinte glandulaire, que l'atteinte neuropathique périphérique, n'ont pas été étudiés dans les essais précliniques avec les traitements anti-IFN, nos travaux apportent des éléments inédits en la matière.

Je rappelle par ailleurs qu'un seul traitement anti-IFN a été évalué dans le SjS humain à travers un essai contrôlé randomisé, l'HCQ, avec des résultats mitigés (486,487), mais plusieurs éléments, notamment en ce qui concerne le design de l'étude (choix du critère de jugement principal, évaluation précoce de ce dernier, choix de la population incluse avec très peu de formes systémiques), empêchent de conclure définitivement à ce sujet. Chez la souris, le filgotinib, un anti-JAK1, a été utilisé récemment et a montré des résultats encourageants (458).

Il était donc important d'évaluer les effets d'un traitement plus spécifiquement anti-IFN de type 1, comme l'IFN-K, dans un modèle de SjS. Par ailleurs, le caractère innovant de l'IFN-K (en tant que vaccin thérapeutique et de par son action anti-IFN α), et ses nombreux avantages théoriques par rapport aux anticorps monoclonaux (bon profil de tolérance, faible niveau de contrainte du fait d'un faible nombre d'injections faisables en ambulatoire, absence d'immunisation vis-à-vis du traitement, polyclonalité de la réponse anticorps et faible coût de production), nous a donné envie de collaborer avec NEOVACS, afin d'évaluer ce traitement plutôt qu'un autre. Nous en avons profité pour comparer deux stratégies différentes d'adjuvantation, un adjuvant *water-in-oil*, l'ISA51 (adjuvant utilisé en clinique pour l'IFN-K, nécessitant un temps de préparation avant injection, pour le formuler avec le vaccin (510)) et un adjuvant *oil-in-water*, le SWE01 (un adjuvant proche du MF59 (511) utilisé en clinique humaine, qui, comme l'ISA51, est une émulsion, mais ne nécessite pas de préparation).

J'ai donc commencé mon travail de thèse au sein du laboratoire du Pr Batteux, à l'Institut Cochin, afin de me familiariser avec le modèle MRL/lpr et d'apprendre à manier les outils pour évaluer les atteintes neurologiques centrale et périphérique qui étaient déjà utilisés en routine au laboratoire. J'ai pu mettre en place, grâce à l'aide des membres de cette équipe particulièrement rompue à l'étude des modèles murins, les tests nécessaires à l'évaluation des atteintes propres du SjS, et pensé, à terme, à développer un score d'évaluation de la maladie systémique présenté par les souris MRL/lpr, calqué sur l'ESSDAI. Concernant la partie vaccinale et l'évaluation de la réponse anti-IFN α induite par l'IFN-K, c'est au sein de l'équipe préclinique de NEOVACS que j'ai pu apprendre à manier les outils indispensables au monitoring (dosage des anticorps anti-IFN α et anti-KLH, test cellulaire de neutralisation de l'IFN α), et j'ai, là aussi, contribué à l'adaptation de tests qui n'étaient pas utilisés en routine (notamment les ELISpot), pour l'évaluation de la réponse à l'IFN-K, J'ai aussi pu assister au procédé de couplage entre l'IFN α et la KLH, pour l'élaboration du vaccin.

Grâce aux compétences acquises, j'ai pu mener à bien, avec le soutien nécessaire, ledit essai préclinique, qui a permis de montrer que, quel que soit l'adjuvant utilisé, l'IFN-K améliorait les atteintes salivaires, lacrymales et neurologiques périphériques présentées par les souris MRL/lpr étudiées (ce qui allait par ailleurs dans le sens du caractère IFN α -dépendant du modèle). Ces données fonctionnelles ont été confirmées, au niveau histologique, dans les deux groupes pour l'atteinte salivaire, et uniquement dans le groupe SWE01 pour l'atteinte lacrymale. Les titres des anticorps anti-IFN α induits étaient élevés avec les deux adjuvants, mais les anticorps anti-IFN α induits avec l'IFN-K + SWE01 avaient des capacités de neutralisation environ 10 fois supérieures à ceux induits quand l'adjuvant était l'ISA51, avec des données concordantes en ELISpot B et en termes d'impact sur la signature IFN α (évaluée par RTqPCR dans les ganglions de drainage des glandes salivaires et lacrymales). Nous ne nous attendions pas à une différence sur la réponse humorale induite par l'IFN-K, entre les groupes ISA51 et SWE01, puisque les données obtenues précédemment par NEOVACS sur des souris *wild type* n'avaient pas mis en évidence une telle différence, et la raison principale pour le choix d'évaluer le SWE01 était une plus grande praticité, du fait de l'absence de nécessité d'un temps de préparation avant injection. Cela dit, des différences d'immunogénicité ont déjà été décrites pour le MF59 (512), et il ne paraît pas aberrant de penser que la réponse à un vaccin adjuvanté puisse être différente dans un modèle de maladie auto-immune, par rapport à des souris *wild type* saines.

Blocking interferon α by vaccination is highly efficient in a systemic Sjögren's syndrome preclinical trial

Martin Killian^{1,2}, Fabien Colaone³, Philippe Haumont³, Carole Nicco⁴, Olivier Cerles⁴, Sandrine Chouzenoux⁴, Pascal Cathébras^{1,2}, Nicolas Rochereau¹, Mireille Thomas⁵, Géraldine Grouard-Vogel^{3,6}, Frédéric Batteux^{4,6} and Stéphane Paul^{*1,6}

¹EA 3064, Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, Université de Lyon, Saint-Etienne, France

²Internal Medicine Department, Saint-Etienne University Hospital, Saint-Etienne, France

³NEOVACS S.A., Paris, France

⁴Team « Stress oxydant, prolifération cellulaire et inflammation », INSERM U1016 Institut Cochin, Paris, France

⁵INSERM U1059-Sainbiose, Université de Lyon, F 42270 Saint Priest en Jarez, France.

⁶These authors jointly supervised this work.

Correspondence should be addressed to Stéphane Paul

Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes

Faculté de Médecine Jacques Lisfranc, Pôle Santé Innovations

10 rue de la Marandière, 42270 Saint-Priest-en-Jarez, France

Tel: +33 (0)4 77 82 05 12

stephane.paul@chu-st-etienne.fr

ABSTRACT

Sjögren's syndrome (SjS) is a frequent systemic autoimmune disease responsible for major decrease in patients' quality of life, potentially leading to life-threatening conditions while facing an unmet therapeutic need. Hence, we assessed the immunogenicity, efficacy and tolerance of IFN-Kinoid (IFN-K), an innovative anti-interferon (IFN) α vaccination strategy, in a well-known mouse model of systemic SjS, MRL/MpJ-Faslpr/lpr (MRL/lpr) mice. IFN-K induced a disease-modifying anti-IFN α antibody response in all treated mice with high IFN α neutralization capacities, type 1 IFN signature's reduction and disease features' (ocular and oral sicca syndrome, peripheral neuropathy, focus score) improvement, as reflected by the decrease in murine SjS global activity score (MuSSDAI) modelled on EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index (ESSDAI). No adverse effects were observed. This proof-of-concept study paves the way for further clinical developments.

KEYWORDS: Sjögren's syndrome, therapeutic vaccine, interferon alpha, sicca syndrome

INTRODUCTION

Sjögren's syndrome (SjS) is a frequent and predominantly female (10:1) systemic autoimmune disease, affecting 0.01-0.3% of the adult population worldwide ¹. Lymphocytic infiltration of the salivary and lacrimal glands responsible for dry eyes and mouth and anti-Ro/Sicca Syndrome A (SSA) and anti-La/Sicca Syndrome B (SSB) autoantibodies are typical in SjS ². Apart from these classical features, the clinical spectrum is broad with systemic (i.e. extra-glandular) manifestations in one third of cases ^{3,4}. SjS's burden in terms of quality of life is well-known but the disease is also responsible for increased mortality with recent estimates of the adjusted standardized mortality ratio of 4.66 (95% CI 3.85 to 5.60) ⁵. Despite these worrisome elements, therapeutic resources are scarce, artificial tears and secretagogues only offer temporary relief, and no immunomodulatory treatment was superior to placebo in randomized controlled trials to date ⁶, partly because of the difficulty in the choice of the right outcome ⁷. However, a growing body of evidence indicates a major role for type 1 interferons (IFNs) in Sjögren's pathogenesis ⁸, susceptibility ⁹, and disease activity/complications ^{10,11}, hence becoming a potential therapeutic target. Among these findings, the identification of a type 1 IFN signature – the overexpression of type 1 IFN-inducible genes – in the blood and salivary glands of more than 50% of SjS patients ^{9,10}, its correlation with disease activity and B cell activating factor (BAFF) – which is type 1 IFN-inducible – overexpression ^{10,12} and the promising results of recent studies evaluating anti-B cells therapies such as the anti-BAFF mAb, belimumab ¹³, alone or combined with rituximab ^{14,15}, as well as a preclinical trial with filgotinib ¹⁶, a JAK1 inhibitor (with effects on IFN pathways, including BAFF production), are noteworthy. We previously showed that an active immunotherapy strategy, IFN-Kinoid (IFN-K), made up of conjugated IFN α and Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), was successful in preventing systemic lupus erythematosus (SLE)-manifestations and improving survival in New Zealand Black and White (NZB/W) mice ¹⁷, by inducing neutralizing anti-IFN α antibodies (Abs). Phase I/IIa ^{18,19} and IIb trials, in human SLE showed encouraging results, allowing the pursuit of IFN K's clinical development.

Given the pivotal role of type 1 IFN in SjS and the urgent need for treatments ²⁰, we investigated in a preclinical study using the MRL/MpJ-Fas^{lpr/lpr} (MRL/lpr) model, a well-recognized mouse model of systemic SjS ²¹, the potential benefits of the murine surrogate of the human IFN-K vaccine.

RESULTS

Immunogenicity and neutralization

Immunization with IFN-K adjuvanted with SWE01 or ISA51 (Figures 1b, 1c) efficiently elicited high titers of anti-IFN α Abs in all treated mice by day+38 post immunization (respectively $1/27172 \pm 1/2856$ and $1/16768 \pm 1/3861$, $p=0.0973$) with persistent titers at day+66 ($1/25631 \pm 1/2674$ and $1/14137 \pm 1/3726$, $p=0.0728$) day+94 ($1/25386 \pm 1/3718$ and $1/8068 \pm 1/2197$, $p=0.0047$) and day+122 ($1/16313 \pm 1/2304$ and $1/9654 \pm 1/2963$, $p=0.1014$). KLH/ISA51-treated mice belatedly developed low titers of anti-IFN α Abs starting at day+94 ($1/1682 \pm 1/492$) and still present at day+122 ($1/1643 \pm 1/308$), without detectible neutralizing properties.

Neutralizing anti-IFN α Abs were only detected in IFN K-treated mice, with higher neutralizing capacities in the IFN-K/SWE01 group than in the IFN-K/ISA51 group (Figure 1d), at all time points: day+38 ($1/287 \pm 1/61$ versus $1/56 \pm 1/36$, $p=0.0095$), day+66 ($1/2226 \pm 1/799$ versus $1/147 \pm 1/77$, $p=0.0045$), day+94 ($1/2168 \pm 1/663$ versus $1/151 \pm 1/59$, $p=0.0079$) and day+122 ($1/2363 \pm 1/548$ versus $1/95 \pm 1/44$, $p=0.0032$).

The quantification of anti-IFN α -IgG-secreting splenocytes (see Supplementary Figure S1 for the detailed analysis) was superior in IFN-K/SWE01-treated mice (Figure 1e) than in their controls ($183 \text{ spots} \pm 11$ versus $31 \text{ spots} \pm 4$, $p=0.0079$), regardless of the restimulation conditions. The difference was not significant between IFN-K/ISA51-treated mice (Figure 1f) and their controls ($32 \text{ spots} \pm 3$ versus $26 \text{ spots} \pm 1$, $p=0.1508$).

Only mice that received KLH (i.e. KLH and IFN-K groups) developed anti-KLH Abs (see Supplementary Figure S2)

Type 1 IFN signature

Type 1 IFN-inducible genes expression (Figure 2 and see Supplementary Figure S3 for a more detailed analysis) was reduced in IFN-K-treated mice's mandibular lymph nodes when compared to their controls, with a superior effect with SWE01.

Global disease activity

The Murine Sjögren's Syndrome Disease Activity Index (MuSSDAI), a systemic disease activity score we modelled on the EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index (ESSDAI) (Supplementary Table S1), was statistically improved in IFN-K/SWE01 (24.8 ± 2.3 versus 37.8 ± 3.5 , $p=0.0059$) and IFN-K/ISA51-treated (22.1 ± 2.6 versus 36.2 ± 2.2 , $p=0.0012$) mice when compared to their respective controls (Figures 3a, 3b).

Glandular features

IFN-K improved saliva and tear productions in MRL/lpr mice, when compared to control groups. In SWE01-adjuvanted groups, the SFR (Figure 3g) were $3.4 \pm 0.8 \text{ ml/g}$ versus $2.0 \pm 0.7 \text{ ml/g}$ ($p=0.0026$) and $4.0 \pm 1.2 \text{ ml/g}$ versus $2.3 \pm 0.5 \text{ ml/g}$ ($p=0.0044$), while the phenol red thread tests (Figure 3h) were $3.3 \pm 0.5 \text{ mm}$ versus 1.3 ± 0.2

mm ($p=0.0017$) and 2.6 ± 0.2 mm versus 0.8 ± 0.1 mm ($p=0.0002$), at 8 and 16 weeks post-immunization, respectively. In ISA51-adjuvanted groups, the SFR (Figure 3k) were 4.0 ± 0.4 ml/g versus 2.1 ± 0.2 ml/g ($p=0.0012$) and 3.1 ± 0.3 ml/g versus 1.3 ± 0.2 ml/g ($p=0.0004$), and the phenol red thread tests (Figure 3l) were 2.9 ± 0.8 mm versus 1.3 ± 0.2 mm ($p=0.0027$) and 2.3 ± 0.2 mm versus 0.9 ± 0.1 mm ($p=0.0001$) at the same time points.

At the histological level, the focus scores were improved in SMG (0.22 focus/mm² \pm 0.07 versus 0.85 focus/mm² \pm 0.12 , $p=0.0010$) and LG (0.44 focus/mm² \pm 0.17 versus 2.90 focus/mm² \pm 0.23 , $p=0.0006$) of IFN-K/SWE01-treated mice (Figures 3c, 3d), when compared to SWE01-adjuvanted controls. The same beneficial effect was observed in IFN-K/ISA51-treated mice's SMG (0.28 focus/mm² \pm 0.10 versus 0.75 focus/mm² \pm 0.07 , $p=0.0068$), but in their LG (2.08 focus/mm² \pm 0.35 versus 3.15 focus/mm² \pm 0.38 , $p=0.0602$) the downward trends did not reach statistical significance (Figures 3e, 3f).

Extra-glandular features

Mechanically-induced nociception was not altered in IFN-K-treated mice when compared to mice from the control groups whose hypoesthesia significantly worsened with aging. In SWE01-adjuvanted groups (Figure 3i), the threshold of withdrawal of the touched paw was lower in IFN-K-treated mice than in their controls, at 8 weeks (0.03 ± 0.01 g versus 0.15 ± 0.03 g, $p=0.0007$) and 16 weeks (0.19 ± 0.06 g versus 0.89 ± 0.12 g, $p=0.0005$) post-immunization. In ISA51-adjuvanted groups (Figure 3m), the threshold of withdrawal of the touched paw was also lower in IFN-K-treated mice than in their controls, at 8 weeks (0.04 ± 0.01 g versus 0.22 ± 0.04 g, $p=0.0004$) and 16 weeks (0.11 ± 0.05 g versus 0.55 ± 0.06 g, $p=0.0006$) post-immunization.

As for thermally-induced nociception (Figures 3j, 3n), earlier effects were observed in IFN-K/SWE01-treated mice (with a higher mean number of brisk lifts of either hind paw), starting at 8 weeks (8.71 ± 0.68 paw lifts versus 3.74 ± 0.52 paw lifts, $p=0.0005$) post-immunization and maintained at 16 weeks (9.14 ± 1.14 paw lifts versus 4.43 ± 0.48 paw lifts, $p=0.0016$)., when beneficial effects were also significant in IFN-K/ISA51-treated mice (6.00 ± 0.98 paw lifts versus 2.32 ± 0.30 paw lifts, $p=0.0021$). No difference was observed between IFN-K/ISA51-treated mice and their controls at 8 weeks post-immunization (5.43 ± 0.95 paw lifts versus 4.32 ± 0.47 paw lifts, $p=0.41$).

Neuropsychiatric tests and lung infiltrated were not affected by IFN-K (Figure 4).

Proteinuria-free survival (Supplementary Figure S4) was not statistically different between groups.

DISCUSSION

IFN-K induced high levels of anti-IFN α Abs, regardless of its adjuvantation protocol, with higher trends in IFN-K/SWE01-treated mice. However, the difference was only significant at one time point. In both IFN-K-vaccinated groups, both glandular and PNS manifestations of the disease were significantly improved. These improvements were concordant at the histological level, as shown by the reduced inflammatory cell infiltrates in the glands of IFN-K-treated mice. In IFN-K/ISA51-treated mice, a similar beneficial effect was observed, but did not reach statistical significance in lacrimal glands, which is although not incompatible with a normalized tear production²².

Regarding the anti-IFN α neutralizing capacity, there was a clear superiority in IFN-K/SWE01-treated mice, with concordant results in the large downregulation of type 1 IFN signature and the quantification of anti-IFN α -IgG-secreting splenocytes. As a MF59-like adjuvant, SWE01's superiority may be due to its known positive effect on T follicular helper cells' (TFH) response and thus the magnitude of the germinal center B cell response²³. MF59 has previously been shown to be able to induce a greater adjuvant efficacy (with different vaccine antigens: influenza, tetanus toxoid, hepatitis B, Group B and C Meningococcal bacteria) than any other adjuvant²⁴, including ISA51²⁵.

The fact that KLH/ISA51-treated mice belatedly developed low titers of non-neutralizing-anti-IFN α Abs starting at day+94, and that all control mice had low counts of anti-IFN α -IgG-secreting splenocytes, indicate that, IFN-K induces an anti-IFN α Abs production by increasing or promoting the maturation of pre-existing autoreactive B cells as previously described in SLE patients^{18,26}.

As for the other extra-glandular manifestations, the neuropsychiatric manifestations of the disease were not affected by IFN-K, but the behavioral tests evaluating these features are known to be complex with many confounding factors²⁷. Furthermore, proteinuria-free survival was also not different between groups. However, our trial was not specifically designed to evaluate this aspect of the disease (because glomerulonephritis in the MRL/lpr model is more a lupus-like feature than a SjS-like one) and the occurrence of these events was lower than expected²⁸. Finally, about the fact that pulmonary disease was unaffected by IFN-K, we think that a non-IFN-dependent pathologic process might be mediating lung damage, as previously described²⁹.

The main limitation that one could see in this study is the use of the MRL/lpr mouse model, because it is usually referred to as a secondary mouse model of SjS. That is because it presents with glomerulonephritis (which was absent in our mice) and CNS manifestations, which are rare but not absent in SjS 4. However, many authors³⁰⁻³² now criticize the primary/secondary SjS dichotomy which misrepresents the potential manifestations and risks of the syndrome. As Professor Moutsopoulos (among others), who coined the concept of secondary SjS more than 35 years ago, we think that the term "secondary", in human and murine SjS, should be replaced by a more descriptive term (i.e. "SjS associated with") or by the term "polyautoimmunity"^{31,32}. Moreover, the MRL/lpr mouse model is included in all review papers about murine models of SjS, including the ones focusing on primary SjS and it has all key features of SjS: female sex predilection, decreased salivary flow rate³³ and tear production,

lymphocytic infiltrates in the salivary and lacrimal glands, and anti-Ro/SSA and anti-La/SSB. In addition to the rare aforementioned CNS and renal manifestations these mice also develop classical systemic SjS manifestations: peripheral neuropathy (rare in SLE), arthritis, pneumonitis, cryoglobulinemia and signs of lymphoproliferation (lymphadenopathies, splenomegaly)³⁴. As we noted in a recent correspondence (Killian et al, J Rheumatol, in press), no perfect model for SS exists, but we think that the MRL/lpr mouse model should be considered as a model of choice for preclinical trials evaluating new immunological treatments in SS, because of its unique systemic manifestations. Another limitation could be the use of mandibular lymph nodes to evaluate type 1 IFN signature. However, we decided to use all SMG tissue to perform the more rigorous and accurate evaluation of the focus score, and draining lymph nodes were previously described as important elements in SjS^{35,36}.

Anti-Ro52 and anti-Ro60 AutoAbs were positive at sacrifice in all mice (data not shown), but the titers did not differ between groups, which is consistent with the absence of fluctuation in anti-Ro titers with disease activity in human SjS³⁷.

As reported in previous preclinical studies¹⁷ no signs of autoreactive anti-IFN α T cell response were detected using IFN- γ ELISpotBASIC (data not shown).

We herein describe for the first time, a proof-of-concept for the efficacy of IFN-K in a mouse model of systemic SjS. Its beneficial effects on sicca syndrome and peripheral neuropathy pave the way for its clinical development in SjS, which is still facing an unmet therapeutic need. Due to its substantial advantages when compared to monoclonal Abs (absence of anti-drug Abs formation, neutralization of all IFN α subtypes³⁸, better predictable patient compliance because of a low number of administrations¹⁹, lower production and health care costs...) and its good safety profile^{18,19}, IFN-K is the good candidate for Sjögren's syndrome's treatment, but of course, further studies are required to confirm this proof-of-concept.

METHODS

Mouse model

The MRL/lpr mouse model is a well-recognized congenital model of SjS³⁹⁻⁴¹, whose autoimmunity was found to be particularly caused by an acquired mutation in the lymphoproliferation (lpr) gene, leading to a defect in Fas-mediated apoptosis of auto-reactive T cells, prompting the proliferation of double negative (CD4- CD8-) T cells (which were previously found to be involved in the pathogenic mechanisms leading to SjS^{42,43}).

Preparation of the immunogen

IFN-K was prepared by complexing murine IFN α 3 (PBL Assay Science, Piscataway, NJ) with KLH, by aldehyde treatment, as previously reported^{17,44}.

Study Approval

All experiments received approval of the INSERM and Université Paris Descartes CEEA34 Ethics committee on Animal Experimentation.

Experimental protocol

The first cohort of 26 female MRL/MpJ-Faslpr/lpr (MRL/lpr, bred in our colony) mice, injected with ISA51 (Seppic, Paris, France), a water-in-oil adjuvant, was randomly divided into 4 parallel groups: NT (n=6), PBS/ISA51 (n=6), KLH/ISA51 (n=7) and IFN-K/ISA51 (n=7). The second cohort of 26 female MRL/lpr mice, whose adjuvant was SWE01 (University of Lausanne, Switzerland), an MF59-like oil-in-water emulsion, was also randomly divided into 4 parallel groups: NT (n=6), PBS/SWE01 (n=6), KLH/SWE01 (n=7) and IFN-K/SWE01 (n=7). NT, PBS and KLH-receiving mice were considered as Controls of IFN-K-treated mice.

Except for NT mice, 8-weeks-old-mice received 5 i.m. injections (0.1 mL) of PBS, KLH (10 μ g) or IFN-K (10 μ g), emulsified in the appropriate adjuvant at a ratio of 1:1, at day 0 (i.e. 54th day of life), 7, 28, 56 and 84. Blood samples were collected in all mice, at day -11 (pre-immune), 38, 66, 94 and 122 (final bleed). At final bleed, surviving mice were euthanized and their organs were harvested.

Anti-IFN α /KLH titer assay

Serum anti-IFN α and anti-KLH antibody titers were determined by ELISA, as previously described¹⁷. Titers were expressed as serum dilutions.

IFN α neutralizing capacity bioassay

The collected sera capacity to neutralize antiviral activity of IFN α was assessed by using the L929 cells with Encephalomyocarditis virus (EMCV) cytopathic effect inhibition assay, as previously described¹⁷. All sera were

tested in duplicate and the 50% neutralization capacity (NC50) value (i.e. serum dilution resulting in 50% neutralization of virus-mediated cell mortality) was assessed.

Anti-IFN α B-cell response assay

Mouse IgG ELISpotBASIC (Mabtech, France) was used for the quantification of anti-IFN α -IgG-producing cells among splenocytes (300 000 cells/well), under different stimulation conditions (no stimulation, Concanavalin A, KLH, IFN α or IFN-K, at a final concentration of 10 μ g/ml), tested in duplicates. The assays were performed according to the manufacturer's protocol and an automated reader (BIOSYS, Germany) was used.

SjS-related auto-antibodies ELISA

Mice sera collected at -11 and 122 days were used for ELISA detection of auto-antibodies and tested in duplicate. Briefly, precoated ELISA plates with Ro-52 or Ro-60 were incubated with 100-fold diluted sera. Specific IgG were detected with HRP-conjugated anti-mouse IgG and binding quantified using 3,3',5,5'-tetramethylbiphenyl-4,4'-diamine (TMB) substrate by absorbance measurement at 490 nm. Positivity threshold was determined as the mean titer + 2 standard deviations in C57Bl/6 mice (n=5).

Salivary flow rate measurement

Mice were anesthetized (i.p. injection of a 60mg/ml ketamine and 8mg/ml xylazine solution), and their stimulated (s.c. pilocarpine hydrochloride at 0.5 μ g/g of body weight; Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, USA) 10-minute-Salivary Flow Rates (SFR) were measured.

Phenol red thread test

Following saliva collection, phenol red threads (Danyang Nuorishi Optical Co., Jiangsu, China) were used to measure tear production in mice, for 20 sec, as previously described⁴⁵.

Von Frey test

Tactile sensitivity was evaluated using the von Frey test⁴⁶. The principle of this test is standardized. Once the mouse is calm and motionless, a hind paw is touched with the tip of a flexible fiber of given length and diameter (Bioseb, Vitrolles, France). The force of application increases as long as the investigator is pushing the probe and until the fibre bends. This principle makes it possible for the investigator to apply a reproducible force to the skin surface. The scale of force used ranged from 0.008 to 1 g. The force required to induce a withdrawal paw movement was recorded.

Cold plate assay

Cold hypoalgesia was evaluated during 5 min using a cold plate set at $2 \pm 0.2^\circ\text{C}$ (Bioseb, Vitrolles, France) as previously described⁴⁷. The total number of brisk lifts of either hind paw was counted, and two observers were tasked with counting to ensure accuracy. Normal locomotion was distinct, involving coordinated movements of all four limbs that were excluded. A maximal cut-off time of 5 min was used to prevent tissue damage.

Open field test

To evaluate anxiety-like behavior³⁴, mice were placed in a field of 40 x 20 cm including a new object in the center, for 10 min. The amount of time the mouse spent in the arena center (15 x 7.5 cm around the new object, i.e. the “exposed field”) and in the arena periphery (the rest of the field, i.e. the “protected field”) were measured using an automated video-tracking device (Smart, Panlab Harvard Apparatus, Barcelona, Spain). Data recorded during the last 5 min were analyzed.

Forced-swim test

To evaluate depressive-like behavior³⁴, mice were placed in Plexiglas cylinders (20 cm high, 15 cm in diameter) filled with 35°C water to a depth of 15cm. During 6 min, immobility was scored using an automated video-tracking device and the last 4-minute-data were analyzed.

Sucrose consumption test

To measure anhedonia³⁴, the mice responsiveness to a 4% sucrose solution was evaluated. Water, then 4% sucrose solution intakes were measured over two 48h-periods, and average sucrose solution/water intake ratios were analyzed.

Lymph nodes measurement

To evaluate their level of lymphoproliferation, mice’s main lymph nodes (cervical, axillary, brachial and inguinal areas) were measured before sacrifice. A semi-quantitative gradation was performed (0, not palpable; 1, $\leq 5\text{mm}$; 2, $> 5\text{mm}$).

Dipstick test for proteinuria

Mice were observed for proteinuria at weeks 0, 3, 6, 9, 12 and 16 from first immunization, by using urine dipstick tests (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, USA) which allowed a semi-quantitative gradation, according to the manufacturer’s instructions (0, negative to traces ; 1 : 0.3 g/l ; 2 : 1 g/l ; 3 : ≥ 3 g/l).

Murine Sjögren’s Syndrome Disease Activity Index (MuSSDAI)

Modelled on the EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index⁴⁸ (ESSDAI), MuSSDAI was designed as a global activity score using all the applicable features in MRL/lpr mice. The weight of each organ-specific domain in MuSSDAI was chosen to be as close as possible to the human index.

Lymphadenopathy (weight = 4) and renal (weight = 5) domains' scores respectively ranged from 0 to 2 and 0 to 3, using the aforementioned semi-quantitative gradation.

For the other selected domains (glandular, peripheral nervous system [PNS] and central nervous system [CNS]), the results of their respective tests were converted into a semi-quantitative gradation system ranging from 0 (no activity) to 3 (high activity). The limits of each activity class were determined, using the tests' results in all 52 pre-morbid MRL/lpr mice, as follows: no activity (=0) when the result was included in the 95% confidence interval (CI95) of the mean ; low activity (=1) when the result was between the upper (length of the fibers [Von Frey] and % of immobility [forced-swim test]) or the lower (SFR, phenol red thread test, cold plate assay, % in the center zone [open field test] and sucrose solution/water intake ratio) limit of the CI95 and the same limit $\pm 15\%$ of the mean ; moderate activity (=2) when the result was between the upper/lower limit of the CI95 $\pm 15\%$ of the mean and the same limit $\pm 30\%$ of the mean ; high activity (=3) when the result was beyond the upper/lower limit of the CI95 $\pm 30\%$ of the mean.

Glandular domain's weight (=3) was equally divided between salivary and lacrimal functions assessments. Similarly, PNS (=5) and CNS (=6) domains' weights were respectively and equally divided between mechanical and thermal nociception evaluations, and between depressive-like behavior, anxiety-like behavior and anhedonia evaluations.

MuSSDAI was calculated for each mouse as the sum of every organ-specific domain's score multiplied by its own weight, and ranged from 0 to 65.

Histology

Submandibular glands (SMG), lacrimal glands (LG), lungs and kidneys harvested at the time of sacrifice were fixed and embedded in paraffin wax. Kidneys (4 μ m sections) were stained with periodic acid/Schiff light green. SMG, LG and lungs (6 μ m sections) were stained with hematoxylin/eosin. For each sample, 2 to 6 sections of both (left and right) organs were blindly examined.

For SMG and LG, the focus score⁴⁹, based on enumeration of the number of foci (i.e. infiltrates of at least 50 mononuclear cells/mm²), was determined. For lungs, perivascular (medium to large vessels surrounded by inflammatory cells/total number of medium to large sized vessels) and peribronchiolar (medium to large bronchioles surrounded by inflammatory cells/total number of medium to large bronchioles) infiltrates were scored²⁹.

Interferon-inducible genes expression profiling

RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen, Maryland, USA) was used for RNA extraction of mandibular lymph nodes, according to the manufacturer's instructions. Quality was assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

The Mouse Type 1 Interferon Response RT² Profiler PCR Array, RT² First Strand Kit and RT² Real-Time SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Maryland, USA) were used according to the manufacturer's instructions and using the data analysis web portal at <http://www.qiagen.com/geneglobe>. Quantitative real-time PCR array was performed (using 0.5 µg of extracted RNA/mouse) on the ABI 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, USA). Samples were assigned to Controls (NT, PBS and KLH mice) and test (IFN-K-treated mice) groups. CT values were normalized based on IFNA4 expression (automatically selected from the full panel because of its stable expression). Fold change/regulation was calculated using $\Delta\Delta CT$ method 50, with a cut off of 2.

Statistics

Means (\pm standard error of the mean) of MuSSDAI, SFR, phenol red thread, Von Frey, cold plate, sucrose consumption, forced-swim and open field tests, as well as histological scoring were analyzed between control (NT, PBS and KLH groups) and treated (IFN-K) mice by the Mann-Whitney U test. These parameters and cells' response assays results were also analyzed by the Kruskal-Wallis test, mainly to assess the lack of differences between the 3 control groups, followed by Dunn tests to compare individually the treated groups with their respective control groups. Survival and proteinuria data were analyzed using Kaplan–Meier graphs and log-rank tests. For IFN-inducible genes expression, the p values were calculated based on a Student's t-test of the replicate $2(-\Delta CT)$ values for each gene in the Control and IFN-K-treated groups.

The data analyses were performed using GraphPad PRISM 4.0 (Intuitive Software for Science, USA).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Ms. Béatrice Drouet for her help in writing and reviewing the manuscript, and Pr. Driss Zoukhri for his technical advice. Seppic supplied ISA51 adjuvant and the University of Lausanne supplied the SWE01 adjuvant. This work was supported by the Association Française du Gougerot Sjögren (AFGS) and NEOVACS S.A. FC PH and GGV are scientists of NEOVACS S.A., and took part in the design (GGV) and the conduct (FC and PH) of the experiments. The funding sources had no role in the reporting of the study or the decision to publish the manuscript.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

MK GGV FB and SP designed the study, MK FC PH CN OC SC NR and MT conducted experiments, MK acquired data, MK FC OC SC MT GGV FB and SP analyzed data, GGV FB and SP provided reagents, MK wrote the manuscript and FC OC PC GGV FB and SP reviewed the manuscript.

REFERENCES

1. Qin, B. et al. Epidemiology of primary Sjögren's syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Rheum. Dis.* 74, 1983–1989 (2015).
2. Kyriakidis, N. C., Kapsogeorgou, E. K. & Tzioufas, A. G. A comprehensive review of autoantibodies in primary Sjögren's syndrome: clinical phenotypes and regulatory mechanisms. *J. Autoimmun.* 51, 67–74 (2014).
3. Ramos-Casals, M., Brito-Zerón, P., Sisó-Almirall, A. & Bosch, X. Primary Sjogren syndrome. *BMJ* 344, e3821 (2012).
4. Ramos-Casals, M. et al. Systemic involvement in primary Sjögren's syndrome evaluated by the EULAR-SS disease activity index: analysis of 921 Spanish patients (GEAS-SS Registry). *Rheumatology* 53, 321–331 (2014).
5. Brito-Zerón, P. et al. Systemic activity and mortality in primary Sjögren syndrome: predicting survival using the EULAR-SS Disease Activity Index (ESSDAI) in 1045 patients. *Ann. Rheum. Dis.* annrheumdis-2014-206418 (2014). doi:10.1136/annrheumdis-2014-206418
6. Saraux, A., Pers, J.-O. & Devauchelle-Pensec, V. Treatment of primary Sjögren syndrome. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 456–471 (2016).
7. Seror, R. et al. Outcome measures for primary Sjögren's syndrome: a comprehensive review. *J. Autoimmun.* 51, 51–56 (2014).
8. Maria, N. I. et al. Contrasting expression pattern of RNA-sensing receptors TLR7, RIG-I and MDA5 in interferon-positive and interferon-negative patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 76, 721–730 (2017).
9. Yao, Y., Liu, Z., Jallal, B., Shen, N. & Rönnblom, L. Type I interferons in Sjögren's syndrome. *Autoimmun. Rev.* 12, 558–566 (2013).
10. Brkic, Z. et al. Prevalence of interferon type I signature in CD14 monocytes of patients with Sjogren's syndrome and association with disease activity and BAFF gene expression. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 728–735 (2013).
11. Nezos, A. et al. Type I and II interferon signatures in Sjogren's syndrome pathogenesis: Contributions in distinct clinical phenotypes and Sjogren's related lymphomagenesis. *J. Autoimmun.* 63, 47–58 (2015).
12. Nezos, A. et al. B-cell activating factor genetic variants in lymphomagenesis associated with primary Sjogren's syndrome. *J. Autoimmun.* 51, 89–98 (2014).
13. Mariette, X. et al. Efficacy and safety of belimumab in primary Sjögren's syndrome: results of the BELISS open-label phase II study. *Ann. Rheum. Dis.* 74, 526–531 (2015).
14. Cornec, D. et al. Blood and salivary-gland BAFF-driven B-cell hyperactivity is associated to rituximab inefficacy in primary Sjögren's syndrome. *J. Autoimmun.* 67, 102–110 (2016).
15. Abdulhad, W. H., Kroese, F. G. M., Vissink, A. & Bootsma, H. Immune regulation and B-cell depletion therapy in patients with primary Sjögren's syndrome. *J. Autoimmun.* 39, 103–111 (2012).

16. Lee, J. et al. JAK-1 Inhibition Suppresses Interferon-Induced BAFF Production in Human Salivary Gland: Potential Therapeutic Strategy for Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ 70, 2057–2066 (2018).
17. Zagury, D. et al. IFN α kinoid vaccine-induced neutralizing antibodies prevent clinical manifestations in a lupus flare murine model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 5294–5299 (2009).
18. Lauwerys, B. R. et al. Down-regulation of interferon signature in systemic lupus erythematosus patients by active immunization with interferon α -kinoid. *Arthritis Rheum.* 65, 447–456 (2013).
19. Ducreux, J. et al. Interferon α kinoid induces neutralizing anti-interferon α antibodies that decrease the expression of interferon-induced and B cell activation associated transcripts: analysis of extended follow-up data from the interferon α kinoid phase I/II study. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 55, 1901–1905 (2016).
20. Cornec, D., Jamin, C. & Pers, J.-O. Sjögren's syndrome: where do we stand, and where shall we go? *J. Autoimmun.* 51, 109–114 (2014).
21. Lavoie, T. N., Lee, B. H. & Nguyen, C. Q. Current Concepts: Mouse Models of Sjögren's Syndrome. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, (2011).
22. Kosenda, K., Ichii, O., Otsuka, S., Hashimoto, Y. & Kon, Y. BXSJ/MpJ-Yaa mice develop autoimmune dacryoadenitis with the appearance of inflammatory cell marker messenger RNAs in the lacrimal fluid. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 41, 788–797 (2013).
23. Mastelic Gavillet, B. et al. MF59 Mediates Its B Cell Adjuvanticity by Promoting T Follicular Helper Cells and Thus Germinal Center Responses in Adult and Early Life. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 194, 4836–4845 (2015).
24. Ko, E.-J. & Kang, S.-M. Immunology and efficacy of MF59-adjuvanted vaccines. *Hum. Vaccines Immunother.* 14, 3041–3045 (2018).
25. Zhang, N. et al. Identification of an ideal adjuvant for receptor-binding domain-based subunit vaccines against Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Cell. Mol. Immunol.* (2015). doi:10.1038/cmi.2015.03
26. Gupta, S. et al. Distinct Functions of Autoantibodies Against Interferon in Systemic Lupus Erythematosus: A Comprehensive Analysis of Anticytokine Autoantibodies in Common Rheumatic Diseases. *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ 68, 1677–1687 (2016).
27. Hånell, A. & Marklund, N. Structured evaluation of rodent behavioral tests used in drug discovery research. *Front. Behav. Neurosci.* 8, (2014).
28. Andrews, B. S. et al. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J. Exp. Med.* 148, 1198–1215 (1978).
29. Kim, N., Ussin, L., Cheng, X., Murali, R. & Sullivan, K. E. TNF α inhibition in MRL/lpr mice ameliorates pulmonary but not renal disease. *J. Autoimmun.* 19, 215–222 (2002).
30. Mavragani, C. P. & Moutsopoulos, H. M. Primary versus Secondary Sjögren Syndrome: Is It Time To Reconsider These Terms? *J. Rheumatol.* 46, 665–666 (2019).
31. Amador-Patarroyo, M. J. et al. Sjögren's syndrome at the crossroad of polyautoimmunity. *J. Autoimmun.* 39, 199–205 (2012).

32. Rojas-Villarraga, A., Amaya-Amaya, J., Rodriguez-Rodriguez, A., Mantilla, R. D. & Anaya, J.-M. Introducing polyautoimmunity: secondary autoimmune diseases no longer exist. *Autoimmune Dis.* 2012, 254319 (2012).
33. Sato, M. et al. Low-intensity pulsed ultrasound rescues insufficient salivary secretion in autoimmune sialadenitis. *Arthritis Res. Ther.* 17, 278 (2015).
34. Jeltsch-David, H. & Muller, S. Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus and cognitive dysfunction: The MRL-lpr mouse strain as a model. *Autoimmun. Rev.* 13, 963–973 (2014).
35. Saito, M. et al. Unique Phenotypes and Functions of Follicular Helper T Cells and Regulatory T Cells in Sjögren's Syndrome. *Curr. Rheumatol. Rev.* 14, 239–245 (2018).
36. Puñet-Ortiz, J. et al. Ly9 (CD229) Antibody Targeting Depletes Marginal Zone and Germinal Center B Cells in Lymphoid Tissues and Reduces Salivary Gland Inflammation in a Mouse Model of Sjögren's Syndrome. *Front. Immunol.* 9, (2018).
37. Praprotnik, S., Bozic, B., Kveder, T. & Rozman, B. Fluctuation of anti-Ro/SS-A antibody levels in patients with systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome: a prospective study. *Clin. Exp. Rheumatol.* 17, 63–68 (1999).
38. Mathian, A. et al. Active immunisation of human interferon α transgenic mice with a human interferon α Kinoid induces antibodies that neutralise interferon α in sera from patients with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 1138–1143 (2011).
39. Park, Y.-S., Gauna, A. E. & Cha, S. Mouse models of primary Sjögren's syndrome. *Curr. Pharm. Des.* 21, 2350–2364 (2015).
40. Delaleu, N., Nguyen, C. Q., Peck, A. B. & Jonsson, R. Sjögren's syndrome: studying the disease in mice. *Arthritis Res. Ther.* 13, 217 (2011).
41. Hayashi, Y., Haneji, N. & Hamano, H. Cytokine gene expression and autoantibody production in Sjögren's syndrome of MRL/lpr mice. *Autoimmunity* 23, 269–277 (1996).
42. Alunno, A. et al. CD4(-)CD8(-) T-cells in primary Sjögren's syndrome: association with the extent of glandular involvement. *J. Autoimmun.* 51, 38–43 (2014).
43. Brandt, D. & Hedrich, C. M. TCR $\alpha\beta$ +CD3+CD4-CD8- (double negative) T cells in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 17, 422–430 (2018).
44. Le Buanec, H. et al. TNF α kinoid vaccination-induced neutralizing antibodies to TNF α protect mice from autologous TNF α -driven chronic and acute inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 19442–19447 (2006).
45. Doyle, M. E. et al. Autoimmune dacryoadenitis of NOD/LtJ mice and its subsequent effects on tear protein composition. *Am. J. Pathol.* 171, 1224–1236 (2007).
46. Bradman, M. J. G., Ferrini, F., Salio, C. & Merighi, A. Practical mechanical threshold estimation in rodents using von Frey hairs/Semmes–Weinstein monofilaments: Towards a rational method. *J. Neurosci. Methods* 255, 92–103 (2015).

47. Ta, L. E., Low, P. A. & Windebank, A. J. Mice with cisplatin and oxaliplatin-induced painful neuropathy develop distinct early responses to thermal stimuli. *Mol. Pain* 5, 9 (2009).
48. Seror, R. et al. EULAR Sjogren's syndrome disease activity index: development of a consensus systemic disease activity index for primary Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 1103–1109 (2010).
49. Jonsson, R., Tarkowski, A., Bäckman, K., Holmdahl, R. & Klareskog, L. Sialadenitis in the MRL-l mouse: morphological and immunohistochemical characterization of resident and infiltrating cells. *Immunology* 60, 611–616 (1987).
50. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408 (2001).

FIGURES

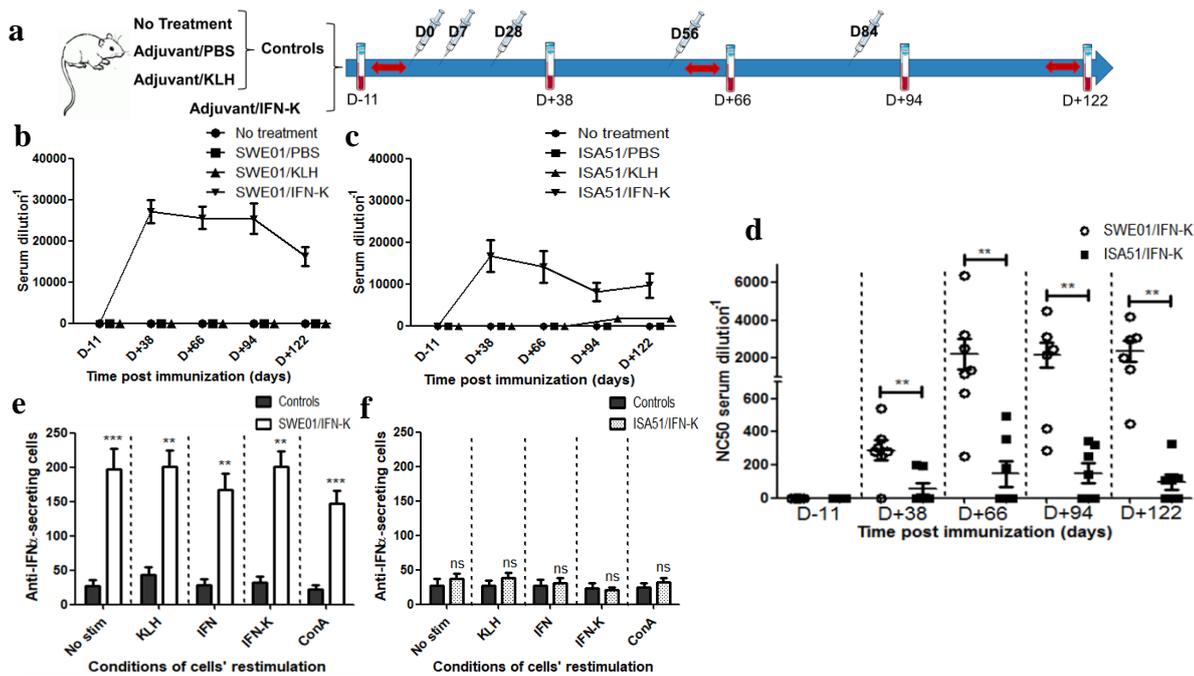


Fig. 1. Immunological effects of IFN-K. (a) Within each cohort (n=26; SWE01 or ISA51), 8-week-old female MRL/lpr mice were not treated (n=6) or injected (syringes) with PBS (n=6) or KLH (n=7), referred to as Controls, or treated with IFN-K (n=7) depending on their group. Blood samples (blood tubes) were collected and Sjögren's syndrome-like disease (red arrows) was monitored, once prior and serially after injections for a 122-day-follow-up. (b, c) Serum anti-IFN α Abs (ELISA) and their (d) anti-IFN α neutralizing capacity were monitored at different time points pre (D-11) and post-immunization (D+38, D+66, D+94, D+122) in all groups: no treatment (n=6+6), SWE01/PBS (n=6), ISA51/PBS (n=6), SWE01/KLH (n=7), ISA51/KLH (n=7), SWE01/IFN-K (n=7) and ISA51/IFN-K (n=7). Neutralizing activity was expressed as the serum dilution resulting in 50% neutralization of virus-mediated cell mortality (NC50). (e, f) Mononuclear splenocytes were isolated in all living mice (n=14 in SWE01-adjuvanted control mice, n=6 in SWE01/IFN-K mice, n=18 in ISA51-adjuvanted control mice and n=7 in ISA51/IFN-K mice) at sacrifice (D+122), and used for the quantification of anti-IFN α -IgG-producing cells. Proliferation of the harvested cells was stimulated under different conditions (no stimulation, ConA, KLH, IFN α or IFN-K, at a final concentration of 10 μ g/ml), without noticeable impact. Error bars indicate mean \pm S.E.M. ns p > 0.05, *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001.

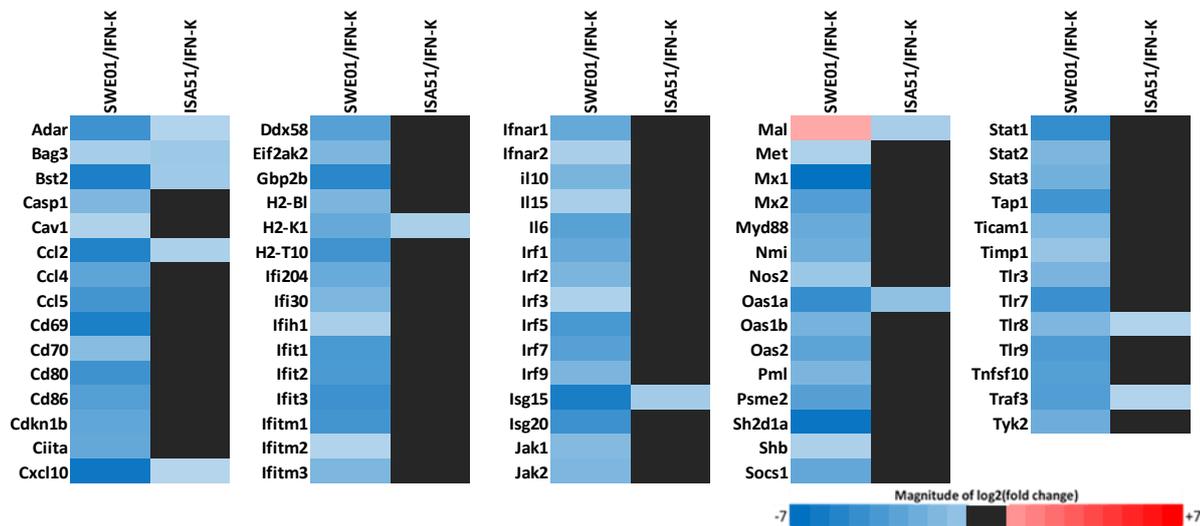


Fig. 2. Type 1 IFNs signature. Mandibular lymph nodes were isolated in all living mice (n=14 in SWE01-adjuvanted control mice, n=6 in SWE01/IFN-K mice, n=18 in ISA51-adjuvanted control mice and n=7 in ISA51/IFN-K mice) at sacrifice (D+122) to determine the expression profile of type 1 IFNs pathways genes (type 1 IFN signature). Fold changes were determined using the $\Delta\Delta CT$ method, with a cut off of 2, and compared between IFN-K-treated mice (SWE01/IFN-K and ISA51/IFN-K) and their controls (not treated, PBS and KLH groups).

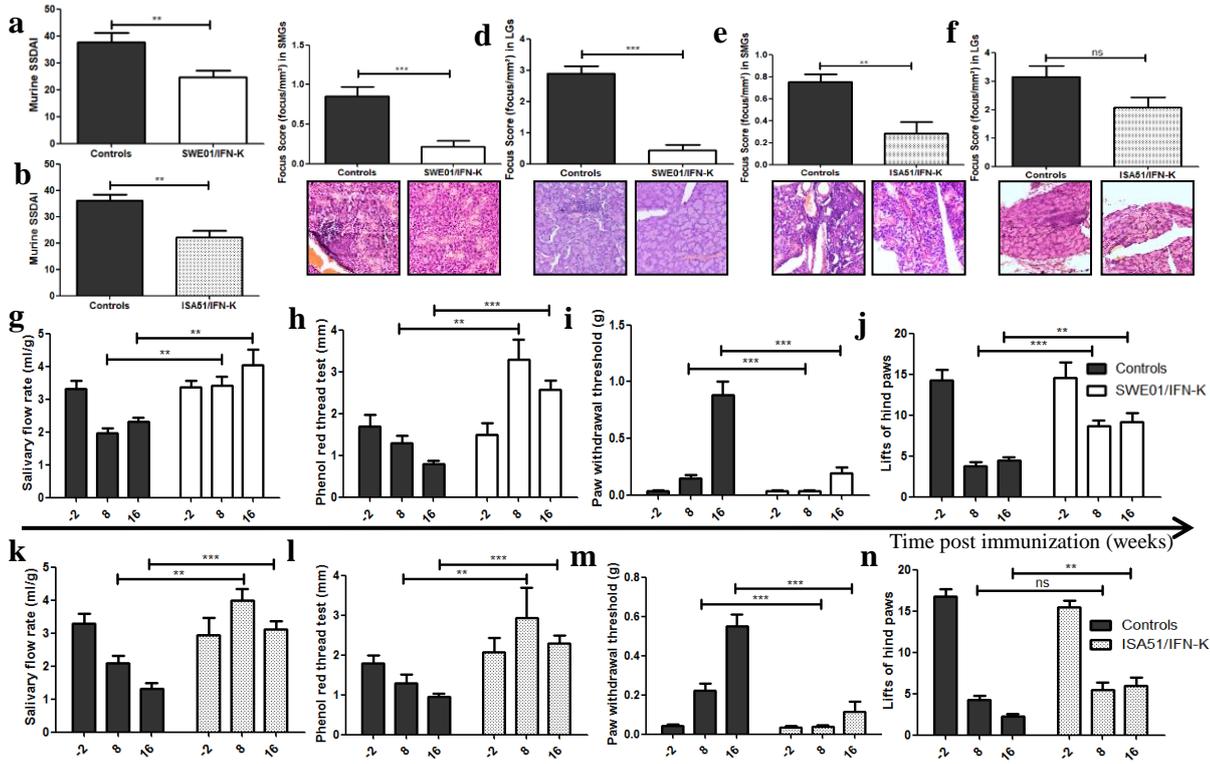


Fig. 3. Improving Sjögren's syndrome in MRL/lpr mice. Sjögren's syndrome-like features were monitored and compared between IFN-K-treated mice and their controls (not treated, PBS and KLH groups). (a, b) Modeled on the EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index (ESSDAI), we designed a Murine Sjögren's Syndrome Disease Activity Index (MuSSDAI), using all the applicable features in MRL/lpr mice. MuSSDAI was assessed at the end of follow-up, as was determined (c, d, e, f) the focus score, i.e. the degree of lymphoid infiltration (one focus = an aggregate of ≥ 50 mononuclear cells), in (c, e) submandibular and (d, f) lacrimal glands. Representative images of hematoxylin and eosin stained sections are shown (original magnification $\times 40$). (g, k) Salivary flow rates, (h, l) tear production, (i, m) mechanical and (j, n) thermal sensitivities were assessed 2 weeks before immunization, 8 weeks and 16 weeks post-immunization. Error bars indicate mean \pm S.E.M. Ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. SMG: submandibular glands; LG: lacrimal glands.

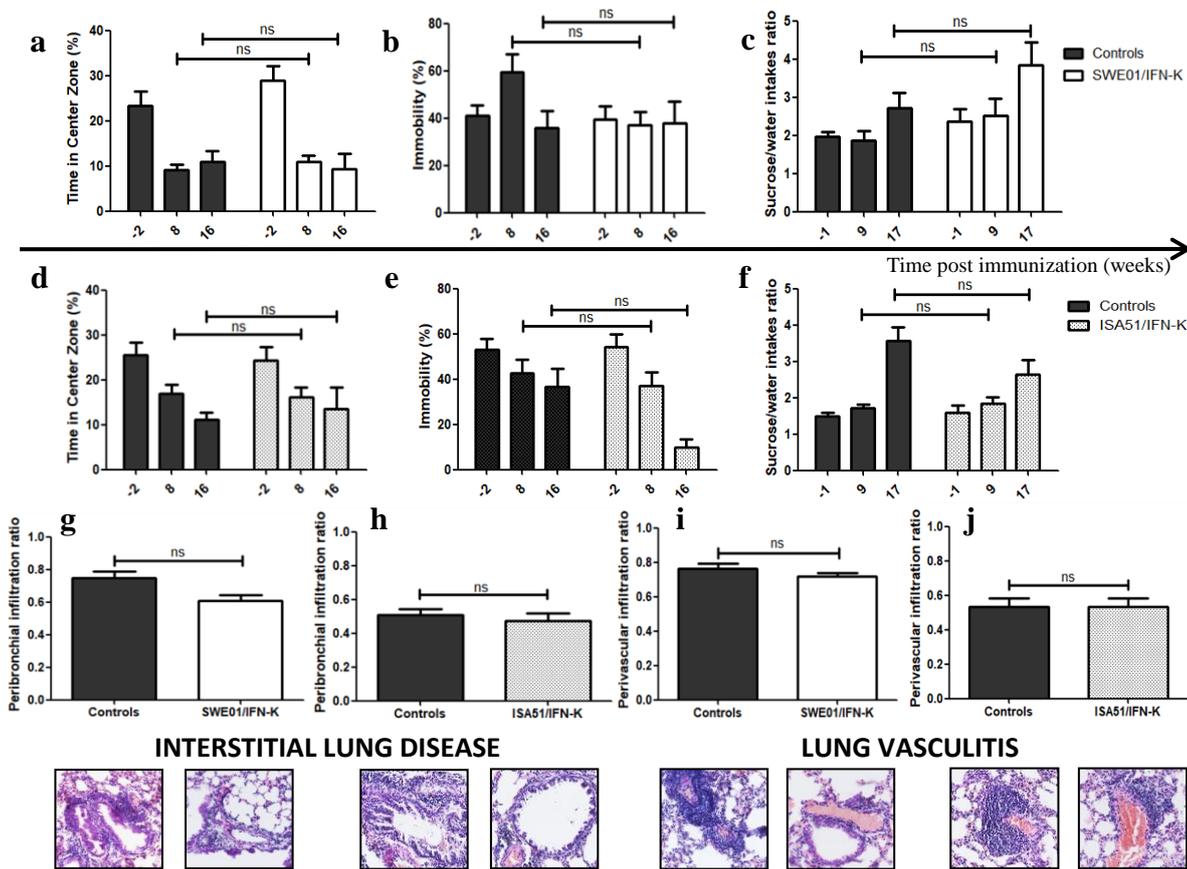
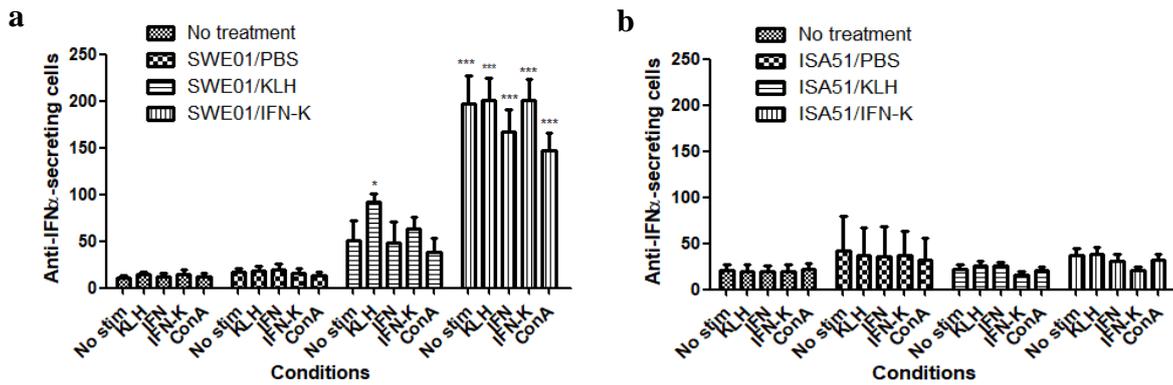
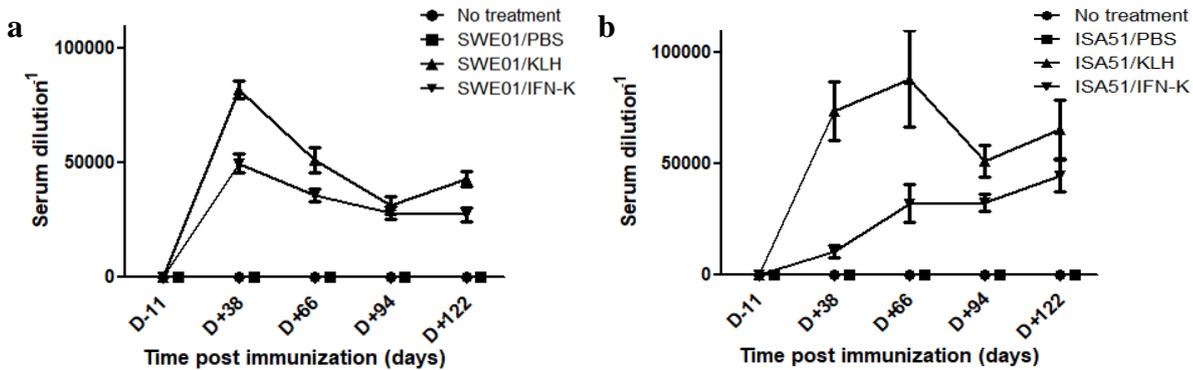


Fig. 4. Unaffected features of systemic Sjögren's syndrome in MRL/lpr mice. (a, d) Anxiety-like (leading to a reduction of the time spent in the center zone in the open field) and (b, e) depression-like (leading to a higher degree of immobility in the forced swim test) behaviors were assessed 2 weeks before immunization, 8 weeks and 16 weeks post-immunization with (a,b) SWE01 or (d, e) ISA51 as adjuvant. (c, f) Anhedonia, leading to a reduction in sucrose/water intakes ratios, was assessed before immunization (-1 week), 9 weeks and 17 weeks post-immunization. Lungs were harvested for all living mice, at the time of sacrifice (D+122), to evaluate the extent of their pulmonary disease. (g, h) The peribronchiolar infiltration ratio (i.e. the number of medium to large bronchioles surrounded by inflammatory cells over the total number of medium to large bronchioles on each slide) and the (i, j) perivascular infiltration ratio (i.e. the number of medium to large vessels surrounded by inflammatory cells over the total number of medium to large sized vessels on each slide) were calculated to quantify the degree of interstitial lung disease and lung vasculitis, respectively. Representative images of hematoxylin and eosin stained sections are shown (original magnification x40). No IFN-K-related effect was observed when comparing the treated mice and their controls (NT, PBS and KLH mice). Error bars indicate mean \pm S.E.M. Ns $p > 0.05$.

SUPPLEMENTARY TABLES AND FIGURES



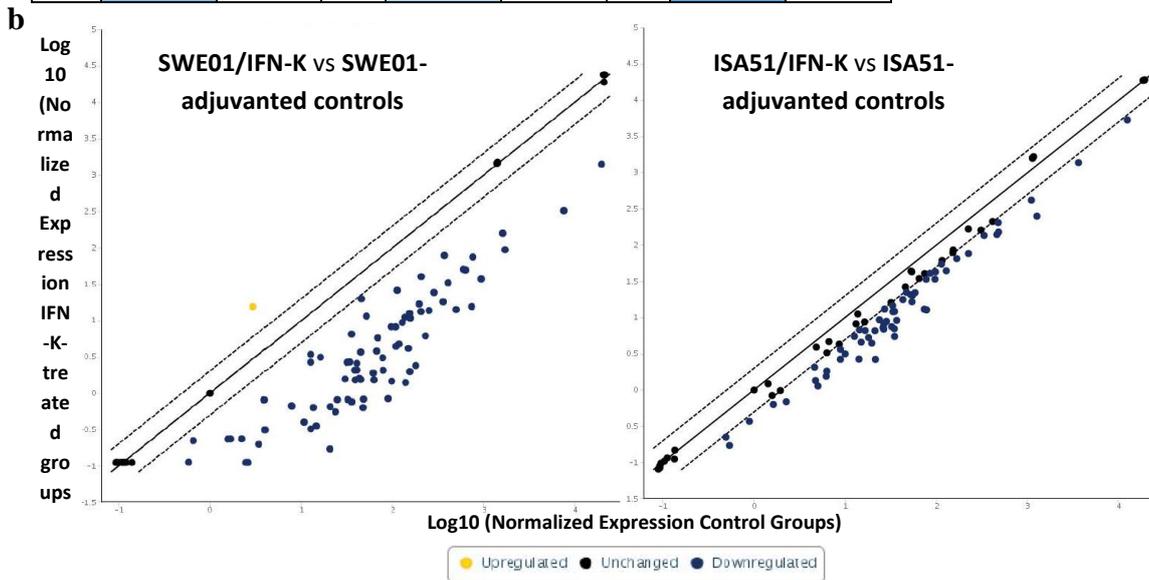
Supplementary Figure S1. Detailed evaluation of anti-IFN̳ secreting splenocytes. Mononuclear splenocytes were isolated in all living mice (n=14 in SWE01-adjuvanted control mice, n=6 in SWE01/IFN-K mice, n=18 in ISA51-adjuvanted control mice and n=7 in ISA51/IFN-K mice) at sacrifice (D+122), and used for the quantification of anti-IFN̳-IgG-producing cells. Proliferation of the harvested cells was stimulated under different conditions (no stimulation, ConA, KLH, IFN̳ or IFN-K, at a final concentration of 10 µg/ml), without noticeable impact. Error bars indicate mean ± S.E.M. Ns p > 0.05, *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001.



Supplementary Figure S2. Anti-KLH antibody response in MRL/lpr mice. Serum anti-KLH Abs (ELISA) were monitored at different time points pre (D-11) and post-immunization (D+38, D+66, D+94, D+122) in all groups: no treatment (n=6+6), SWE01/PBS (n=6), ISA51/PBS (n=6), SWE01/KLH (n=7), ISA51/KLH (n=7), SWE01/IFN-K (n=7) and ISA51/IFN-K (n=7).

a

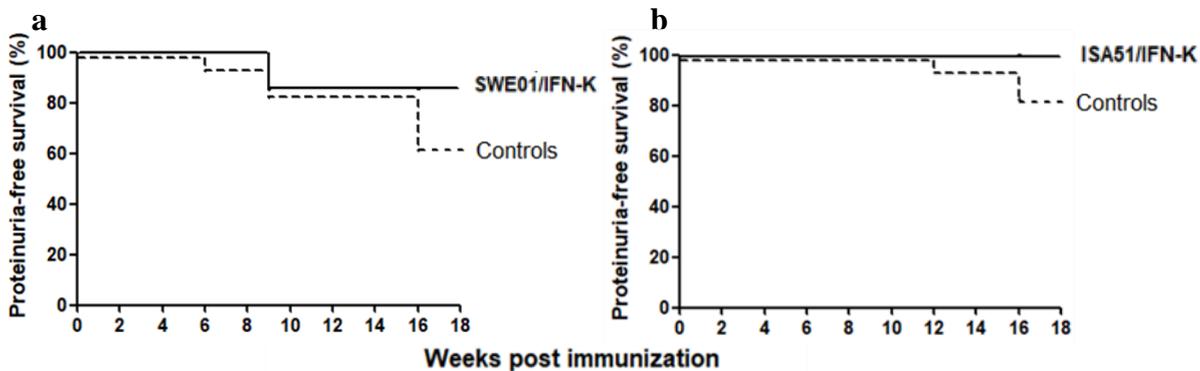
Genes	Log2(Fold change)		Genes	Log2(Fold change)		Genes	Log2(Fold change)		Genes	Log2(Fold change)	
	SWE01/IFN-K	ISA51/IFN-K		SWE01/IFN-K	ISA51/IFN-K		SWE01/IFN-K	ISA51/IFN-K		SWE01/IFN-K	ISA51/IFN-K
Adar	-5,29	-2,14	H2-K1	-4,19	-2,34	Irf5	-5,01	-1,94	Sh2d1a	-6,71	-1,08
Bag3	-2,44	-2,67	H2-T10	-5,24	-1,05	Irf7	-4,62	-0,33	Shb	-2,27	-1,16
Bst2	-6,22	-2,62	Ifi204	-4,13	-1,19	Irf9	-3,61	-0,88	Socs1	-4,29	-0,91
Casp1	-3,54	-1,2	Ifi30	-3,55	-0,84	Isg15	-6,27	-2,51	Stat1	-5,57	-1,3
Cav1	-2,17	-1,71	Ifih1	-2,38	-1,65	Isg20	-5,35	-1,52	Stat2	-3,57	-1,28
Ccl2	-6,06	-2,3	Ifit1	-4,98	-1,74	Jak1	-3,35	-0,97	Stat3	-3,85	-1,52
Ccl4	-4,4	-1,79	Ifit2	-4,92	-1,29	Jak2	-3,55	-1,41	Tap1	-5,22	-1,55
Ccl5	-5,14	-0,95	Ifit3	-5,35	-2	Mal	2,39	-2,41	Ticam1	-3,52	-0,51
Cd69	-6,21	-1,77	Ifitm1	-5,16	-0,91	Met	-2,24	-1,71	Timp1	-2,84	-0,99
Cd70	-3,24	-0,91	Ifitm2	-2,11	-1,07	Mx1	-6,9	-1,66	Tlr3	-3,65	-1,72
Cd80	-5,28	-0,96	Ifitm3	-3,56	-1,67	Mx2	-4,73	-1,81	Tlr7	-5,4	-1
Cd86	-4,66	-0,98	Ifnar1	-4,2	-1,69	Myd88	-4,12	-1,71	Tlr8	-3,55	-2,14
Cdkn1b	-4,31	-1,36	Ifnar2	-2,36	-0,95	Nmi	-3,94	-1,06	Tlr9	-4,85	-0,3
Ciita	-4,25	-1,08	il10	-3,67	-1,37	Nos2	-2,74	-0,23	Tnfsf10	-4,67	-1,32
Cxcl10	-6,62	-2,01	Il15	-2,37	-0,69	Oas1a	-5,54	-3,02	Traf3	-4,75	-2,11
Ddx58	-4,62	-1,43	Il6	-4,56	-1,14	Oas1b	-3,76	-0,28	Tyk2	-3,97	-1,84
Eif2ak2	-3,57	-1,34	Irf1	-4,19	-0,92	Oas2	-4,47	-1,27			
Gbp2b	-5,84	-1,68	Irf2	-3,61	-1,2	Pml	-3,6	-1,47			
H2-BI	-3,62	-1,56	Irf3	-2,24	-0,43	Psme2	-4,66	-1,73			



Supplementary Figure S3. Supplementary data about type 1 IFNs signature. Mandibular lymph nodes were isolated in all living mice (n=14 in SWE01-adjuvanted control mice, n=6 in SWE01/IFN-K mice, n=18 in ISA51-adjuvanted control mice and n=7 in ISA51/IFN-K mice) at sacrifice (D+122) to determine the type 1 IFN signature. (a) Fold changes were determined using the $\Delta\Delta CT$ method, with a cut off of 2, and compared between IFN-K-treated mice (SWE01/IFN-K and ISA51/IFN-K) and their controls (not treated, PBS and KLH groups). (b) The scatter plots compare the normalized expression of every gene on the array between the two selected groups by plotting them against one another to quickly visualize large gene expression changes. The central line indicates unchanged gene expression. The dotted lines indicate the selected fold regulation threshold. Data points beyond the dotted lines in the upper left and lower right sections meet the selected fold regulation threshold.

Domains	Weight in	
	ESSDAI	MuSSDAI
Constitutional	3	NA
Lymphadenopathy	4	4
Glandular	2	3
Articular	2	NA
Cutaneous	3	NA
Pulmonary	5	NA
Renal	5	5
Muscular	6	NA
PNS	5	5
CNS	5	6
Hematological	2	NA
Biological	1	NA

Supplementary Table S1. A murine global SS activity score. Modeled on the EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index (ESSDAI), we designed a Murine Sjögren's Syndrome Disease Activity Index (MuSSDAI), using all the applicable features in MRL/lpr mice. The weight of each organ-specific domain in MuSSDAI was chosen to be as close as possible to the human index.



Supplementary Figure S4. Proteinuria-free survival in MRL/lpr mice after IFN-K immunization. All MRL/lpr mice were monitored for proteinuria (0, 3, 6, 9, 12 and 16 weeks post-immunization) and death was recorded daily. Due to the high impact of severe nephropathy on survival, Kaplan-Meier graphs for (a) SWE01 and (b) ISA51-adjuvanted groups include survival data and severe proteinuria (>3g/l) occurrence under the term "Proteinuria-free survival". Trends favoring IFN-K emerged, but no statistically significant difference was observed when compared to their controls (NT, PBS and KLH mice).

III. Exploration du rôle des immunoglobulines E auto-réactives et impact sur la voie des interférons dans le syndrome de Sjögren chez l'Homme

Comme nous l'avons évoqué plus haut, le syndrome de Sjögren est une maladie auto-immune systémique fréquente (entre 0,01 et 0,3% de la population), dont la physiopathologie est complexe, la présentation clinique hétérogène (allant de l'altération modérée de la qualité de vie jusqu'à l'engagement du pronostic vital, avec en particulier un risque élevé de lymphome qui touche environ 5% des patients) et l'évolution chronique, mais imprévisible.

A l'heure actuelle, il n'existe aucun examen spécifique, réalisable en routine, qui permettrait un monitoring global de l'activité de la maladie, fluctuant au fil des poussées, et de ce fait, constituerait une aide précieuse à la décision thérapeutique au quotidien. Dans le LES, un tel marqueur existe : les IgG anti-ADN double brin. Comme nous l'avons évoqué plus haut, ces anticorps forment des complexes immuns contenant de l'ADN, capables d'activer, notamment via TLR9, certaines voies cellulaires, et en particulier celle des IFNs de type 1 qui est centrale dans le LES. Des résultats récents (490) indiquent aussi la présence importante d'anticorps anti-ADN double brin d'un autre isotype, immunoglobuline E (IgE), dans le LES. Les IgE auto-réactives ont été décrites pour la première fois il y a plus de 35 ans dans la PR et le LES (513), mais leurs cibles antigéniques et leurs implications dans la physiopathologie des maladies auto-immunes ne sont que de description récente. Les IgE anti-ADN double brin du LES ont été particulièrement étudiées. Récemment, dans l'étude de Henault *et al* (490), les titres des IgE anti-ADN double brin étaient corrélés au SLEDAI, et ce, indépendamment de ceux des IgG anti-ADN double brin. Les IgE anti-ADN double brin étaient par ailleurs capables d'induire, par l'intermédiaire du récepteur FcεRI (le récepteur spécifique de haute affinité des IgE, qui est notamment présent sur les pDC) et du TLR9, la sécrétion d'IFNα. Ainsi leur rôle délétère semble être au moins aussi important que celui de leurs homologues IgG, avec lesquelles elles ont aussi une action synergique, et ce malgré leurs taux en moyenne 20 fois inférieurs.

Dans le SjS, les IgG anti-Ro60/SSA sont associées à des formes plus sévères de la maladie (514,515) et forment des complexes immuns incluant des ARNs (notamment des transcrits *Alu*, principal représentant de la famille des short interspersed nuclear element), aussi capables d'entraîner la production d'IFNs de type 1 (178). En revanche, le suivi des taux d'IgG anti-Ro60/SSA n'a pas d'intérêt en routine car ce paramètre ne fluctue pas avec le niveau d'activité de la maladie. Ainsi, à l'instar de ce qui a été décrit pour les IgE anti-ADN double brin dans le LES, et du fait des caractéristiques physico-chimiques particulières des IgE, nous avons imaginé que les IgE anti-Ro60/SSA avaient le potentiel pour devenir un marqueur intéressant pour le monitoring biologique du SjS. C'est pour cela que nous avons mis au point un essai clinique pour évaluer ce paramètre. Depuis le début des inclusions en mars 2018, plus de 120 patients de la région Auvergne-Rhône-Alpes ont intégré l'étude, dont 18 qui avaient été adressés pour bilan de syndrome sec et chez qui le diagnostic de SjS n'a finalement pas été retenu. Le rythme des inclusions devrait permettre de tenir l'objectif de 145 patients SjS.

I GET DRY

Autoreactive anti-Ro/SSA IgE To Determine primary Sjögren syndrome's disease activity

Evaluation de l'intérêt des IgE auto-réactives anti-Ro/SSA comme biomarqueur d'activité dans le syndrome de Sjögren primitif

(Etude transversale avec suivi prospectif, multicentrique)

Version n°2 du 04/07/2016

Investigateur-Coordonnateur :

Pr Pascal CATHEBRAS, Service de Médecine Interne, Hôpital Nord – CHU Saint-Etienne 42055 Cedex 2 – Tel : 04 77 82 83 42 – Mail : pascal.cathebras@chu-st-etienne.fr

Expérimentateur principal :

Pr Stéphane PAUL, Laboratoire d'Immunologie clinique – CHU Saint-Etienne 42055 Cedex 2 – Tel : 04 77 82 89 75 – Mail : stephane.paul@chu-st-etienne.fr

Responsable scientifique :

Martin KILLIAN, Service de Médecine Interne, Hôpital Nord – CHU Saint-Etienne 42055 Cedex 2 – Tel : 06 67 62 91 10 – Mail : martin.killian7@yahoo.fr

Co-investigateurs :

Dr Isabelle GUICHARD, Dr Jean-Baptiste GAULTIER, Service de Médecine Interne, Hôpital Nord – CHU Saint-Etienne

Dr Jean-Christophe LEGA, Dr Quitterie REYNAUD, Service de Médecine Interne, Centre Hospitalier Lyon Sud – CHU Lyon

Pr Pascal SEVE, Dr Yvan JAMILLOUX, Dr Mathieu GERFAUD-VALENTIN, Dr Claire BERNARD, Service de Médecine Interne, Hôpital de la Croix Rousse – CHU Lyon

Pr Marc RUIVARD, Dr Virginie RIEU, Dr Guillaume LE GUENNO, Dr Vincent GROBOST Service de Médecine Interne, CHU Estaing – CHU Clermont-Ferrand

Dr Marc FABRE, Dr Marielle ROUX, Service de Médecine Interne, CH Pierre Oudot – CH Bourgoin-Jailleu

Pr Laurence BOUILLET, Dr Françoise SARROT-REYNAULD, Dr Alban DEROUX, Service de Médecine Interne, Hôpital Michallon – CHU Grenoble Alpes

Chef de projet URCIP : Florence RANCON - Hôpital Nord – CHU Saint-Etienne 42055 Cedex 2

Promoteur :

CHU de Saint-Étienne
42055 SAINT-ETIENNE Cedex 2.

Représentant du promoteur :

Mme Aurélie CHANNET

Direction des Affaires Médicales et de la Recherche
Pavillon 31 – Hôpital de Bellevue
CHU de Saint-Étienne
42055 SAINT-ETIENNE Cedex 2.

CPP Sud Est I

Direction des Affaires Médicales et de la Recherche
Pavillon 31 – Hôpital de Bellevue
CHU de Saint-Étienne
42055 SAINT-ETIENNE Cedex 2

PAGE DE SIGNATURE DU PROTOCOLE

Titre de l'étude : I GET DRY - Evaluation de l'intérêt des IgE auto-réactives anti-Ro/SSA comme biomarqueur d'activité dans le syndrome de Sjögren primitif

Version du protocole et date : Version n°2 du 04/07/2016

N° interne :

Représentant du promoteur :

Mme Aurélie CHANNET

Direction des Affaires Médicales et de la
Recherche

Bât 31 - Hôpital Bellevue

CHU de Saint-Étienne

42055 SAINT-ETIENNE Cedex 2

Date :/...../201...

Signature

P/ Le Directeur Général et par délégation,
Le Directeur des Affaires Médicales
Et de la Recherche,

Investigateur principal/coordonnateur

Pr Pascal CATHEBRAS

Service de Médecine Interne

Hôpital Nord

CHU de Saint-Étienne

42055 SAINT-ETIENNE Cedex 2

Date :/...../201...

Signature

Résumé de l'étude (à envoyer séparément à l'ANSM)

Le syndrome de Sjögren primitif (pSS) est la 2ème connectivite la plus fréquente, après la polyarthrite rhumatoïde, avec environ 50 à 200 000 patients concernés en France. Les manifestations caractéristiques de la maladie sont les sécheresses buccale et oculaire, en rapport avec l'infiltration des glandes correspondantes par des cellules du système immunitaire. En dehors de ce syndrome sec et de ses complications, l'asthénie et les arthromyalgies sont particulièrement fréquentes, et environ un tiers des patients présente des atteintes systémiques (cutanée, neurologique, respiratoire, rénale...) possiblement graves. Par ailleurs, le pSS est la maladie auto-immune systémique où le risque de survenue de lymphome est le plus élevé, touchant déjà 3 à 4% des patients à 5 ans d'évolution. La physiopathologie du pSS est multifactorielle, son évolution chronique, entrecoupée de poussées, et ses formes cliniques variables (allant de l'altération modérée de la qualité de vie à l'engagement du pronostic vital), rendant la prise en charge des patients complexe. A l'instar de la majorité des autres maladies auto-immunes systémiques, la multiplicité et la complexité des outils évaluant l'activité globale du pSS, rendent cette évaluation difficile à réaliser en pratique routinière. Or, comme cela a été initialement démontré pour la polyarthrite rhumatoïde, avec une stratégie de type « treat-to-target » qui tend à s'étendre aux autres maladies rhumatologiques, la disponibilité et l'utilisation d'éléments cliniques et/ou paracliniques simples, fiables et reproductibles pour mesurer l'activité de la maladie et adapter les traitements en conséquence, sont les conditions sine qua non du suivi optimal des patients.

Aucun examen paraclinique spécifique de routine, ne permet un monitoring global de l'activité du pSS et de ce fait, constituerait une aide précieuse à la décision thérapeutique au quotidien. Or, dans le lupus érythémateux systémique (SLE), proche du pSS, un marqueur, impliqué dans la physiopathologie de la maladie (notamment via la voie de l'interféron alpha [IFN α]) existe chez 30 à 70% des patients : les immunoglobulines G (IgG) anti-ADN double brin (dsDNA). Des publications récentes rapportent aussi l'existence d'immunoglobuline E (IgE) anti-dsDNA chez 30 à 50% des patients SLE, qui, en plus d'être un facteur de risque indépendant d'activité de la maladie, semblent pouvoir revêtir un intérêt majeur comme biomarqueur, ces IgE étant reconnues par un récepteur d'affinité plus de 100 fois supérieure à celle du récepteur aux IgG et étant présentes chez 60 à 80% des patients dont le SLE est actif.

Dans le pSS, la présence d'IgG anti-Ro/Sicca Syndrome A (SSA), et dans une moindre mesure d'IgG anti-La/Sicca Syndrome B (SSB), est associée à des manifestations plus sévères, plus de lymphomes et ces auto-anticorps sont capables de former des complexes immuns incluant des acides nucléiques (ARN), mais leurs titres ne sont pas corrélés à l'activité de la maladie et ils ne sont donc pas utilisés dans le suivi des patients. En revanche, compte-tenu de la description récente d'un mécanisme physiopathologique propre aux IgG anti-Ro/SSA, analogue à celui des anti-dsDNA dans le SLE et impliquant la voie de l'IFN α , ainsi que des propriétés spécifiques des IgE (demi-vie très courte de 2 à 2,5 jours, constante de dissociation très faible entre 10^{-9} et 10^{-10}) à l'origine d'une cinétique plus compatible avec un suivi clinique, nous pensons que les IgE anti-Ro/SSA pourraient devenir un biomarqueur clé du suivi des patients pSS et contribuer à l'évolution vers une stratégie de type « treat-to-target » dans cette maladie.

L'étude I GET DRY sera la 1^{ère} à évaluer la fréquence de positivité des IgE anti-Ro/SSA (évaluée à 33,8% dans la seule étude rétrospective existante, ayant fait l'objet d'un poster au congrès de l'American College of Rheumatology en 2012) en fonction des manifestations cliniques et biologiques (dont le niveau d'expression des transcrits ARNm des gènes régulés par l'IFN α , appelé « signature IFN α ») du pSS. L'objectif principal étant de déterminer si la fréquence de positivité des IgE anti-Ro/SSA dépend du caractère actif ou inactif/faiblement actif de la maladie, jugé sur l'EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index, respectivement ≥ 5 ou < 5 .

Pour ce faire nous prévoyons de réaliser une étude transversale incluant 145 patients déjà suivis pour pSS ou pour qui le diagnostic vient d'être fait, chez qui un test ELISA IgE anti-Ro/SSA sera pratiqué, en plus du recueil des éléments clinico-biologiques habituellement indiqués dans le suivi des patients, ainsi que des scores d'activité du pSS et la signature IFN α . Nous nous attendons à retrouver une fréquence significativement plus importante de patients positifs pour les IgE anti-Ro/SSA dans le groupe pSS actif,

ce qui ouvrirait la porte à la conduite d'un essai longitudinal avec différents temps de prélèvements pour évaluer l'évolution des IgE anti-Ro/SSA au fil du temps ainsi que leur intérêt comme marqueur prédictif de survenue de poussée de la maladie et de lymphome.

Résumé de l'étude en anglais pour clinicaltrial

Title	I GET DRY: Autoreactive anti-Ro/SSA IgE To Determine primary Sjögren's syndrome's disease activity	
Collaborators (organisme financeur)	French Ministry of Health	
Brief summary (10-12 lignes)	<p>Primary Sjögren's syndrome (pSS) can affect various organs, sometimes leads to life-threatening conditions and is always responsible for a decreased quality of life. Its evolution is chronic, with flares and relapses, and the need for reliable biomarkers to be carried out routinely is major in patients' follow-up. Because of the existence of autoreactive immunoglobulins E (IgE) in autoimmune diseases, the recently described role for anti-Ro/SSA antibodies in inducing interferon alpha (IFNα) signaling and the specific pharmacologic properties of IgE, we think anti-Ro/SSA IgE should be an interesting biomarker to determine pSS's activity. The aim of our study is to evaluate whether the proportion of anti-Ro/SSA IgE positive patients is higher in patients with active disease (<i>i.e.</i> ESSDAI\geq 5). All consecutive patients with pSS (new or already known diagnosis) will be included, Anti-Ro/SSA IgE titers will be determined, the disease's features will be collected (including ESSDAI/ESSPRI).</p>	
Conditions (primary disease or condition being studied)	Primary Sjögren's syndrome	
Primary purpose	<input type="checkbox"/> Treatment <input type="checkbox"/> Diagnostic <input type="checkbox"/> Screening <input type="checkbox"/> Basic science	<input type="checkbox"/> Prevention <input type="checkbox"/> Supportive care <input type="checkbox"/> Health services Research <input checked="" type="checkbox"/> Other
Intervention model	<input checked="" type="checkbox"/> Single group <input type="checkbox"/> Crossover	<input type="checkbox"/> Parallel <input type="checkbox"/> Factorial
Study classification	<input type="checkbox"/> Safety <input checked="" type="checkbox"/> Efficacy <input type="checkbox"/> Bio-availability <input type="checkbox"/> Pharmacokinetics/dynamics	<input type="checkbox"/> Safety/Efficacy <input type="checkbox"/> Bio-equivalence <input type="checkbox"/> Pharmacokinetics <input type="checkbox"/> Pharmacodynamics
Number of arm(s) (Write "1" if a single arm)	1	
Name of arm(s) (max 62 characters)	Arm 1: Arm 2:	
Intervention (at least one intervention)	<input type="checkbox"/> Drug (including placebo) <input type="checkbox"/> Device (including sham) <input type="checkbox"/> Biological / vaccine <input type="checkbox"/> Procédure / surgery	<input type="checkbox"/> Radiation <input type="checkbox"/> Behavioral <input type="checkbox"/> Genetic <input type="checkbox"/> Dietary supplement <input checked="" type="checkbox"/> Other
Intervention name	Blood withdrawal	
Intervention description (max 1 000 characters)	Blood samples will be collected at inclusion to determine anti-Ro/SSA IgE titers (ELISA)	
Other Intervention (if applicable)	<input type="checkbox"/> Drug (including placebo) <input type="checkbox"/> Device (including sham) <input type="checkbox"/> Biological / vaccine <input type="checkbox"/> Procédure / surgery	<input type="checkbox"/> Radiation <input type="checkbox"/> Behavioral <input type="checkbox"/> Genetic <input type="checkbox"/> Dietary supplement <input type="checkbox"/> Other
Other intervention name		
Other intervention description (max 1 000 characters)		
Technique/experimental conditions evaluated	An indirect quantitative ELISA assay will be performed to determine anti-Ro/SSA IgE titers in the serum of included patients	
Primary outcome	To evaluate whether the proportion of anti-Ro/SSA IgE positive patients is higher in patients with active pSS (<i>i.e.</i> ESSDAI\geq 5).	

Time point(s) at which primary outcome measure is assessed	At inclusion
Secondary outcome measure*	<ul style="list-style-type: none"> - To determine whether anti-Ro/SSA IgE titers correlate with pSS's activity - To determine whether the positivity of anti-Ro/SSA IgE is associated with a high level of IFNα-inducible genes's expression ("IFNα signature") - To determine whether the positivity of anti-Ro/SSA IgE is a risk factor for the onset of lymphoma in pSS
Time point(s) at which Secondary outcome measure is assessed*	<ul style="list-style-type: none"> - At inclusion - At inclusion - At inclusion, and yearly during 5 years of extended follow-up (M+60)
Inclusion criteria*	<ul style="list-style-type: none"> - Age > 18 years - Primary Sjögren's syndrome according to the American-European Consensus Criteria) - Informed and having signed the study consent form
Exclusion criteria*	<ul style="list-style-type: none"> - Secondary Sjögren's syndrome - Other systemic autoimmune disease (e.g. rheumatoid arthritis, ANCA-associated vasculitis, mixed connective tissue disease...) - Incapacity or refusal to sign the informed consent form - Incapacity or refusal to perform the follow-up examinations required by the study - Has received abatacept, sifalimumab, rontalizumab, anifrolumab, belimumab, TNF antagonists or interferon during the 6 months prior to the inclusion - Has any current signs or symptoms of active infection
Keywords (3 à 5)	Primary Sjögren's syndrome, Immunoglobulin E, Anti-Ro/SSA, Autoimmune disease, Biomarker

* Ne noter que les 2 à 3 principaux critères d'évaluations secondaires et les 5 à 10 principaux critères d'inclusions/non inclusion

TABLE DES MATIERES

I - JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE ET DESCRIPTION GENERALE DE LA RECHERCHE	134
1.1 Le syndrome de Sjögren primitif	134
1.2 Les immunoglobulines E : une classe d'anticorps à part	136
1.3 Pourquoi les IgE anti-Ro/SSA pourraient être un bon marqueur dans le syndrome de Sjögren	137
1.4 Résultats attendus pour les IgE anti-Ro/SSA et perspectives	139
II - OBJECTIFS	139
2.1 Objectif principal	139
2.2 Objectif(s) secondaire(s)	139
III - CONCEPTION DE LA RECHERCHE	139
3.1 Critères d'évaluation	139
3.2 Méthodologie de la recherche	141
3.3 Mesures prises pour réduire et éviter les biais	141
3.4 Le déroulement	141
3.5 Description des règles d'arrêt définitif ou temporaire	143
3.6 Maintien de l'insu et Procédures de levée de l'insu	143
IV - SELECTION ET EXCLUSION DES PERSONNES DE LA RECHERCHE	143
4.1. Critères d'inclusion	143
4.2. Critères de non-inclusion des personnes qui se prêtent à la recherche	143
4.3. Procédure d'arrêt prématuré de la recherche	144
V- TECHNIQUE ETUDIEE DANS LE CADRE DE LA RECHERCHE	144
VI- EVALUATION DE L'EFFICACITE	145
6.1. Description des paramètres d'évaluation de l'efficacité	145
6.2. Méthodes et calendrier prévus pour mesurer, recueillir et analyser les paramètres d'évaluation de l'efficacité	145
VII- EVALUATION DE LA SECURITE	145
7.1. Description des paramètres d'évaluation de la sécurité ;	145
7.2. Méthodes et calendrier prévus pour mesurer, recueillir et analyser les paramètres d'évaluation de sécurité ; ..	145
7.3. Procédures mises en place en vue de l'enregistrement et de la notification des événements indésirables	146
7.4. Modalités et durée du suivi des personnes suite à la survenue d'événements indésirables	147
VIII - ANALYSE STATISTIQUE	147
8.1 Nombre de sujets nécessaire	147
8.2 Description des méthodes statistiques	147
8.3 Degré de signification statistique	148
8.4 Méthodes de prise en compte des données manquantes, inutilisées ou non valides	148
8.5 Gestion des modifications apportées au plan d'analyse de la stratégie initiale	148
8.6 Choix des personnes à inclure dans les analyses	149
Tous les patients inclus dans l'étude pour qui les critères jugements seront disponibles, seront analysés	149
IX - DROIT D'ACCES AUX DONNEES ET DOCUMENTS SOURCES	149
9.1. Droit d'accès aux données	149
9.2. Description des variables recueillies	149
9.3. Identification des données sources	149
X - CONTRÔLE ET ASSURANCE QUALITE	150
XI - FAISABILITE ET CALENDRIER DE L'ETUDE	150
XII - ORGANISATION DE L'ETUDE	151
XIII - CONSIDERATIONS ETHIQUES	151
13.1 Déclaration indiquant que la recherche sera conduite conformément au protocole, aux bonnes pratiques et aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur	152
13.2. Protection des personnes	152
13.3 Assurance	152
13.4 Rapport Bénéfice/Risque	152
XIV - TRAITEMENT DES DONNEES ET CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES RELATIVES A LA RECHERCHE	152

<u>14.1.</u>	<u>Circuit des données</u>	153
<u>14.2.</u>	<u>Modalités de traitement, vérification et validation des données (data management)</u>	153
<u>14.3.</u>	<u>Archivage des documents de l'essai</u>	153
<u>XV - PROPRIETES DES DONNEES – REGLES DE PUBLICATION</u>		154
<u>XVI - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>		154
<u>Annexe 1 : Schéma de l'étude</u>	Erreur ! Signet non défini.	

I - JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE ET DESCRIPTION GENERALE DE LA RECHERCHE

1.1 Le syndrome de Sjögren primitif

1.1.1 Les généralités

Le syndrome de Sjögren primitif (pSS) est la connectivite la plus fréquente après la polyarthrite rhumatoïde (PR), et concerne entre 0,01% et 0,3% (Qin et al., 2015) de la population adulte selon les critères de classification du consensus Américano-Européen, soit 50 000 à 200 000 malades en France. Cette maladie auto-immune systémique est caractérisée par la présence d'un syndrome sec oculaire et buccal, en lien avec une infiltration des glandes correspondantes par des cellules de l'immunité, ainsi que par la production d'anticorps auto-réactifs dont les principales cibles sont les ribonucléoprotéines du soi Ro/Sicca Syndrome A (SSA) et La/Sicca Syndrome B (SSB).

A partir de ces manifestations classiques, des critères de classifications ont été mis au point, non sans mal en l'absence de signe réellement spécifique du pSS, puisque malgré des efforts dans ce sens depuis les années 80, ce n'est qu'en 1993 (Vitali et al., 1993) que les premiers critères européens furent validés, avant d'être révisés en 2002 pour aboutir aux critères du consensus américano-européens (AECG) (Vitali et al., 2002), qui restent les plus utilisés à ce jour, et ce malgré la parution de nouveaux critères en 2012 (Shiboski et al., 2012). Pour affirmer le pSS selon les critères AECG, les patients doivent remplir 4 des 6 critères suivants, dont au moins l'un des deux derniers : au moins un élément subjectif de syndrome sec oculaire, au moins un élément subjectif de syndrome sec buccal, un test objectif positif en faveur du syndrome sec oculaire, un test objectif positif en faveur du syndrome sec buccal, une biopsie des glandes salivaires accessoires positive (classification de Chisolm et Masson ≥ 3 et/ou Focus score ≥ 1) et la présence d'auto-anticorps anti-Ro/SSA et/ou anti-La/SSB (Vitali et al., 2002).

Les critères de classification servent d'aide au diagnostic mais ne doivent pas se substituer à l'avis du clinicien expert, considéré comme le « Gold Standard » en la matière, ces critères ayant été mis au point pour avoir des cohortes homogènes dans les essais cliniques, et ne tenant, par exemple, pas compte des manifestations extra-glandulaires du pSS. En effet, en dehors des atteintes classiques sus-citées, de nombreuses autres manifestations sont possibles dans le pSS, telles que l'asthénie, les arthromyalgies, le syndrome de Raynaud, les atteintes neurologiques périphériques et centrales, les atteintes respiratoires, dermatologiques ou encore rénales pour les plus fréquentes (Ramos-Casals et al., 2012). Par ailleurs, le pSS est la maladie auto-immune systémique où le risque de survenue de lymphome est le plus élevé, touchant 3-4% des patients à 5 ans du diagnostic et presque 10% d'entre eux à 15 ans (Nocturne and Mariette, 2015). Ainsi, l'altération de la qualité de vie est la règle, même pour les formes les plus bénignes, limitées au syndrome sec, mais pour les patients présentant des manifestations systémiques (plus d'un tiers des cas), le tableau peut aller jusqu'à l'engagement du pronostic vital. En effet, une étude récente (Brito-Zerón et al., 2014) de grande envergure portant sur une cohorte de 1045 patients atteints de pSS, retrouvait un taux de mortalité (ajusté en fonction de l'âge et du sexe) 4,66 [3,85-5,60] fois supérieur à celui de la population général espagnole, avec des taux de survie à 5, 10, 20 et 30 ans du diagnostic, de 96,0%, 90,5%, 80,9% et 60,4% respectivement. Cette étude ainsi que les autres s'intéressant à la mortalité dans le pSS (Brito-Zerón et al., 2014; Horvath et al., 2014; Palm et al., 2013), renaient l'existence d'une maladie active et de manifestations systémiques (y compris biologiques) au diagnostic, comme étant des facteurs pronostiques significativement associés

à cette surmortalité dont les principales causes étaient les événements cardiovasculaires, les infections, le pSS lui-même et les complications hématologiques malignes (lymphomes B malins non hodgkiniens).

1.1.2 La prise en charge

Le traitement du pSS en 2016 se compose d'un volet symptomatique à base de substituts salivaires et lacrymaux ou de sialagogues dont l'efficacité est souvent insuffisante, et d'un volet immunologique avec l'utilisation de thérapeutiques par voie générale à base d'antipaludéens de synthèse, de glucocorticoïdes et d'immunosuppresseurs, selon l'organe touché et la sévérité de l'atteinte (Ramos-Casals et al., 2010). En revanche, aucun essai contrôlé et randomisé ne valide l'utilisation des traitements immunologiques à l'heure actuelle. Même le rituximab, anticorps monoclonal anti-CD20 porteur d'espoir du fait du rôle central attribué aux lymphocytes B dans le pSS, n'a pas démontré son efficacité sur les critères de jugements principaux utilisés dans les essais contrôlés et randomisés, dont les deux plus ambitieux en termes d'effectifs : TEARS (n=120) en France et TRACTISS (n=133) au Royaume-Uni (Nocturne et al., 2015).

1.1.3 Le besoin d'objectifs et d'éléments de suivi

L'absence de résultats satisfaisants des essais cliniques bien conduits dans le pSS est probablement, au moins en partie, liée au choix difficile des critères de jugement les plus appropriés, ce qui a notamment été illustré par l'analyse post-hoc de l'essai TEARS (Cornec et al., 2015; Devauchelle-Pensec et al., 2015). Ce problème est tout aussi présent dans la « vraie vie » : il n'existe, à l'heure actuelle, aucun consensus concernant le rythme de suivi, du fait des difficultés à identifier les patients à risque de manifestations systémiques ou de lymphome (Nocturne and Mariette, 2015) ni même d'objectifs précis à cibler chez les patients pour qui la mise en route d'un traitement a été décidée. Cela dit, des efforts sont faits dans ce sens, notamment grâce aux travaux d'une Task Force européenne (Seror et al., 2010, 2011) sur l'établissement d'un score composite d'activité, l'EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index ou ESSDAI et d'un auto-questionnaire sur le ressenti des symptômes par le patient, l'EULAR Sjögren's Syndrome Patient Reported Index ou ESSPRI. Ces scores ont permis, via leurs applications à deux larges cohortes de la « vraie vie », de définir différents niveaux d'activité de la maladie grâce à l'ESSDAI (<5 = inactif ou faiblement actif ; entre 5 et 13 = modérément actif ; >13 = hautement actif) ainsi qu'un niveau d'acceptabilité des symptômes ressentis par le patient, grâce à l'ESSPRI (<5 = intensité acceptable ; ≥5 = intensité non-acceptable). Ainsi, les patients dont la maladie est active (ESSDAI≥5) et/ou dont le niveau de symptomatologie n'est pas acceptable (ESSPRI≥5) sont ceux qui devraient être inclus dans les essais cliniques (Seror et al., 2016).

Il a été clairement démontré, dans une autre connectivite, la PR, avec les études TICORA (Grigor et al., 2004) et CAMERA (Verstappen et al., 2007), qu'en utilisant les traitements existants (en l'occurrence les disease-modifying antirheumatic drugs [DMARDs]) de manière rigoureuse via une stratégie intensive de type « treat-to-target », impliquant des ajustements thérapeutiques itératifs jusqu'à atteindre un objectif préalablement fixé, améliorerait grandement les taux de rémission et de séquelles par rapport à une stratégie thérapeutique conventionnelle. L'approche « treat-to-target » est d'ailleurs devenue la référence pour la prise en charge de la PR, s'étend assez volontiers aux autres rhumatismes inflammatoires de type spondyloarthrites et commence à gagner du terrain dans une pathologie au moins aussi

versatile et complexe que le pSS, le lupus érythémateux systémique (SLE) (Franklyn et al., 2014).

Du fait de l'évolution imprévisible du pSS, de la grande variabilité des formes cliniques, du besoin de critères de jugement pour les essais thérapeutiques et d'objectifs de suivi pour la pratique quotidienne, il est primordial d'avoir à disposition des outils fiables, reproductibles, peu coûteux, réalisables en routine et sensibles aux traitements, afin de permettre un monitoring global de l'activité de la maladie, en parallèle du recueil des données cliniques. Plusieurs candidats ont été pressentis ces dernières années, tels que la mesure du niveau d'expression des ARN messagers (par PCR quantitative en temps réel) issus des gènes régulés par l'interféron α (IFN α), appelée « signature interféron ». L'IFN α , principal représentant des IFN de type 1, est une cytokine clé du système immunitaire, dont les actions, globalement pro-inflammatoires, vont bien au-delà de la lutte antivirale, et sont impliquées dans la physiopathologie et l'activité de plusieurs maladies auto-immunes, dont le pSS et le SLE (Hall and Rosen, 2010; Yao et al., 2013), au point d'en faire une cible thérapeutique de choix (Kirou and Gkrouzman, 2013). Pour l'IFN α , l'utilisation de techniques de PCR quantitative s'intéressant aux gènes qu'il régule est bien plus fiable et sensible que des techniques plus conventionnelles (Yao et al., 2010), mais la complexité et le coût de cet examen rendent son utilisation en pratique courante très difficile.

En revanche, nous pensons que le dosage des immunoglobulines E (IgE) auto-réactives anti-Ro/SSA pourrait devenir ce biomarqueur clé du suivi des patients pSS et notamment contribuer à l'évolution vers une stratégie de type « Treat To Target » dans cette maladie.

1.2 Les immunoglobulines E : une classe d'anticorps à part

1.2.1 Des caractéristiques faites pour le monitoring

1.2.1 Des caractéristiques faites pour le monitoring

Parmi les 5 isotypes d'anticorps humains, les IgE sont celles dont la découverte est la plus récente (Ishizaka et al., 1966) et donc probablement les moins bien étudiées. En revanche, certaines de leurs propriétés connues sont remarquables au sein de la famille des immunoglobulines (Wu and Zarrin, 2014), puisqu'il s'agit des moins abondantes dans le sérum (50 à 200 ng/ml contre environ 10 mg/ml pour les immunoglobulines G [IgG]), de celles dont la demi-vie sérique est la plus faible (environ 2 à 2,5 jours contre 21 pour les IgG) et que leur réponse, tout du moins chez la souris (Yang et al., 2012), est classiquement transitoire, du fait d'une faible propension des lymphocytes B IgE-positifs à se différencier en plasmocytes de longue durée de vie. Les deux récepteurs cellulaires aux IgE sont tout aussi remarquables (Sutton and Davies, 2015), de par son affinité plus de 100 fois supérieure à celle des récepteurs aux IgG pour le récepteur Fc ϵ RI, présent sur les polynucléaires, les mastocytes, les cellules dendritiques, les macrophages, et certaines cellules épithéliales, et de par sa structure homo-trimérique à l'origine d'une avidité majeure compensant largement sa plus faible affinité, pour le récepteur Fc ϵ R2, essentiellement présent sur les lymphocytes B et sur certains épithéliums. Ainsi, par rapport aux autres immunoglobulines, la majeure partie des IgE est présente sous forme liée à ses récepteurs, à la surface des cellules effectrices, simplifiant grandement la formation et la signalisation via les complexes immuns IgE-antigène (c'est cette propriété qui explique la rapidité et la gravité des réactions d'hypersensibilité immédiate en cas d'allergie) (Sutton and Davies, 2015; Yang et al., 2012). Toutes ces caractéristiques reflètent, d'une part, l'existence de nombreux mécanismes de

régulation de la réponse IgE, et d'autre part le caractère tout à fait particulier des fonctions liées à cet isotype d'anticorps, que l'on pensait jusqu'à présent limitées aux manifestations allergiques et à la lutte anti-parasitaire, et laissent entrevoir de potentielles applications, en particulier pour le suivi des patients.

1.2.2 Un rôle propre dans la physiopathologie des maladies auto-immunes

Malgré la description, il y a plus de 35 ans dans le SLE (Permin and Wiik, 1978), d'anticorps auto-réactifs d'isotype IgE (en l'absence de troubles allergiques), avec déjà des pistes en faveur de leur association avec une maladie active, les avancées sur la compréhension du rôle de ces IgE dans l'auto-immunité sont récentes. Ces dernières années, ont été décrites des IgE dirigées contre les principales cibles antigéniques connues dans les maladies auto-immunes, en particulier contre les protéines Ro/SSA, La/SSB et contre l'ADN double brin (dsDNA) (Charles et al., 2010; Dema et al., 2014a; Sekigawa et al., 2008). Parmi ces auto-anticorps, les IgE anti-dsDNA du SLE ont été les plus étudiées. A l'instar de leurs homologues IgG déjà utilisés dans le suivi des patients lupiques, leur positivité est un facteur de risque de lupus actif (Odds Ratio 4,64 [2,49-8,64]) et est associée à l'activité de la maladie, en particulier en cas d'atteinte rénale où leur fréquence de positivité peut atteindre plus de 80% (Charles et al., 2010; Dema et al., 2014a; Henault et al., 2016). Par ailleurs, en termes de physiopathologie du SLE, un nouveau mécanisme impliquant l'activation des polynucléaires basophiles (cellules porteuses du FcεRI) par les complexes immuns dsDNA/IgE anti-dsDNA a été identifié (Charles et al., 2010; Dema et al., 2014b) et, encore plus récemment, un rôle propre leur a été attribué dans l'hyperactivation de la voie de l'IFNα, cytokine clé de la physiopathologie du SLE, mais aussi du pSS. En effet, les complexes immuns dsDNA/IgE anti-dsDNA sont reconnues et internalisés par l'intermédiaire des FcεRI présents sur les cellules dendritiques plasmacytoïdes, entraînant la reconnaissance de l'ADN double brin par les récepteurs TLR9 endosomaux et la synthèse de grande quantité d'IFNα (Henault et al., 2016). Ainsi le rôle délétère des IgE anti-dsDNA (dont les titres se situent dans le même ordre de grandeur que ceux des IgE spécifiques d'allergènes) semble être au moins aussi important que celui de leurs homologues IgG dans le SLE, avec lesquels elles ont, en plus de leur rôle propre, une action synergique, et ce malgré des titres en moyenne 20 fois inférieurs (Henault et al., 2016).

1.3 Pourquoi les IgE anti-Ro/SSA pourraient être un bon marqueur dans le syndrome de Sjögren

Les IgG anti-Ro/Sicca Syndrome A (SSA) qui incluent deux entités, les anti-Ro60/TROVE2 et les anti-Ro52/TRIM21, sont emblématiques du pSS, bien qu'elles puissent aussi être retrouvées dans d'autres maladies auto-immunes comme le SLE. La positivité des IgG anti-Ro/SSA au diagnostic du pSS, plus ou moins accompagnées d'IgG anti-La/SSB, est classiquement associée à l'existence d'une maladie plus sévère avec manifestations systémiques, à des signes biologiques d'activation lymphocytaire B et à un sur-risque de lymphome (Kyriakidis et al., 2014; Quartuccio et al., 2015). En revanche, contrairement à celle des IgG anti-dsDNA dans le SLE, l'évolution des titres d'IgG anti-Ro/SSA ne suit pas l'évolution du pSS et ils restent stables indépendamment des poussées ou des phases de rémission (avec ou sans traitement), rendant cet examen inutile dans le suivi de l'activité de la maladie.

Mais le rôle connu de Ro52 (en l'absence d'auto-anticorps anti-Ro52) dans la régulation négative de la voie de l'IFNα (Kyriakidis et al., 2014) et la description récente du rôle de

Ro60 (en l'absence d'auto-anticorps anti-Ro60) dans la prévention de l'induction de réponse inflammatoire (notamment via l'IFN α) par les rétro-éléments endogènes porteurs de séquences ARN Alu (Hung et al., 2015), associés aux propriétés particulières des IgE que nous venons de décrire et qui semblent particulièrement adaptées au suivi des patients, laissent présager un rôle majeur pour les IgE anti-Ro/SSA dans le suivi du pSS. En effet, à l'instar du mécanisme physiopathologique décrit pour les auto-anticorps anti-dsDNA dans le SLE, les complexes immuns ribonucléoprotéiques Ro60-ARNs-IgG anti-Ro60 sont captés par les cellules du système immunitaire, et induisent, via la reconnaissance de l'ARN Alu par les TLR7 (équivalent au TLR9, mais pour les ARNs) endosomaux, une réponse inflammatoire (notamment via l'IFN α). On peut ainsi facilement imaginer que le même mécanisme existe pour les IgE anti-Ro60.

A l'heure actuelle, les résultats d'une seule étude rétrospective ont été présentés au congrès de l'American College of Rheumatology (<http://acrabstracts.org/abstract/ige-autoantibodies-against-ssa-and-ssb-in-patients-with-sjogrens-syndrome-and-healthy-controls/>) en 2012, et rapportaient une positivité des IgE anti-Ro/SSA chez 33,8% de leurs patients pSS, sans donnée sur l'activité de la maladie ou la survenue de lymphome. Ces chiffres sont concordants avec nos données personnelles (n=15 pSS), qui nous ont par ailleurs permis de confirmer la présence d'IgE auto-réactives ciblant les sous-unités Ro60/TROVE2 et R52/TRIM21, et aucune étude prospective, n'est menée par cette équipe (semblant se concentrer sur le SLE) ou une autre sur le pSS.

Compte-tenu du caractère très récent des publications sur le sujet et de l'absence de corrélation aux données cliniques dans le pSS, aucun test dédié aux IgE auto-réactives en général et aux IgE anti-Ro/SSA en particulier, n'est commercialisé à l'heure actuelle, ainsi il n'existe aucun partenaire industriel avec qui collaborer pour le moment, ce qui explique la part importante allouée à l'achat de réactifs dans le budget de notre projet. Le test utilisé est un test ELISA innovant de par sa cible, mais classique de par sa technique. Brièvement, les sérums préalablement déplétés en IgG, via une technique standardisée, sont dilués en cascade du 1/12^{ème} au 1/768^{ème} dans des plaques pré-coatées avec des antigènes Ro60 ou Ro52, puis les plaques sont lavées pour ne laisser en place que les anticorps fixant l'antigène d'intérêt, et parmi ces anticorps, seules les IgE seront révélées grâce à un anticorps, dit de détection, spécifique du fragment constant des IgE et couplé à une enzyme, la peroxydase de raifort. Cette enzyme permet une quantification colorimétrique des IgE anti-Ro/SSA en transformant un substrat incolore (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine [TMB]) en produit coloré, dont la densité optique à une certaine longueur d'onde (450 nm) est proportionnelle à la quantité d'anticorps. A l'instar de ce qui a été fait précédemment dans le SLE (Dema et al., 2014a), le seuil de positivité de la technique a été déterminé comme étant la moyenne des absorbances (en densité optique) retrouvées chez des donneurs sains (n=50) + 2 déviations standards et le titre des IgE correspond à la dernière dilution dont l'absorbance (en densité optique) est supérieure à ce seuil de positivité.

L'étude I GET DRY sera la 1^{ère} à évaluer la fréquence de positivité des IgE anti-Ro/SSA, en fonction des manifestations cliniques (dont le risque de survenue de lymphome lors d'une phase de suivi prolongé) et biologiques (dont le niveau d'expression des transcrits ARNm des gènes régulés par l'IFN α , appelé « signature IFN α ») des patients atteints de pSS (diagnostic de novo ou patients déjà suivis pour cette maladie). L'objectif principal étant de déterminer si la fréquence de positivité des IgE anti-Ro/SSA dépend du caractère actif ou inactif/faiblement actif de la maladie, jugé sur l'EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index (ESSDAI), respectivement ≥ 5 ou < 5 .

1.4 Résultats attendus pour les IgE anti-Ro/SSA et perspectives

Nous pensons que notre large étude transversale (n=145), dont la composition sera proche de la « vraie vie », avec à la fois des nouveaux patients pSS et des patients déjà suivis dans le cadre de cette maladie, retrouvera une fréquence plus importante de positivité des IgE anti-Ro/SSA chez les malades dont l'ESSDAI est ≥ 5 , et vraisemblablement une association avec un niveau élevé de signature IFN α , aux vues des données récentes sur le sujet (Hung et al., 2015; Henault et al., 2016). Aussi, la phase de suivi prospectif prolongée à 5 ans (qui pourra éventuellement être poursuivie dans le cadre d'une étude ancillaire), permettra d'avoir des informations utiles concernant la positivité des IgE anti-Ro/SSA et la survenue de lymphome et ce, à moindre coût. Après cette 1ère étape clé, il s'agirait de mener, via un financement par le PHRC-N, un essai longitudinal avec différents temps de prélèvements (tous les 6 mois) sur une longue période (24 mois) pour évaluer l'évolution des IgE anti-Ro/SSA au fil du temps ainsi que leur intérêt comme marqueur prédictif de survenue de poussée de la maladie et de lymphome. L'utilisation de ce test permettrait idéalement d'organiser une surveillance plus étroite et/ou la conduite d'examen complémentaires et/ou l'introduction de traitements en fonction du risque de poussée ou de lymphomagenèse, débouchant sur un diagnostic et une prise en charge plus précoces de ces complications et permettant une réduction de la morbi-mortalité et des dépenses de santé. A l'inverse, la normalisation de ce marqueur pourrait aider à la désescalade thérapeutique.

II - OBJECTIFS

2.1 Objectif principal.

Déterminer si la fréquence de positivité des IgE anti-Ro/SSA dépend de l'activité de la maladie, jugée sur l'EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index (ESSDAI).

2.2 Objectif(s) secondaire(s).

- 1) Déterminer si les titres des IgE anti-Ro/SSA sont corrélés à l'activité du pSS.
- 2) Déterminer si la fréquence de positivité des IgE anti-Ro/SSA dépend du niveau de symptomatologie ressentie par le patient, jugé sur l'EULAR Sjögren's Syndrome Patient Reported Index (ESSPRI).
- 3) Déterminer si la positivité des IgE anti-Ro/SSA est un facteur de risque de survenue de lymphome lié au pSS.
- 4) Déterminer si la positivité des IgE anti-Ro/SSA est associée à la présence d'une signature interféron plus élevée.
- 5) Décrire et comparer les principales caractéristiques clinico-biologiques et anatomopathologiques des populations pSS IgE anti-Ro/SSA positifs et IgE anti-Ro/SSA négatifs.
- 6) Décrire et comparer les principales caractéristiques clinico-biologiques et anatomopathologiques des populations pSS IgE anti-La/SSB positifs et IgE anti-La/SSB négatifs.

III - CONCEPTION DE LA RECHERCHE

3.1 Critères d'évaluation

Critère d'évaluation principal :

Positivité/négativité des IgE anti-Ro/SSA.

Le dosage des IgE sera effectué selon un technique ELISA modifiée (confère chapitre V).

Les seuils de positivité ont été déterminés comme étant la moyenne des absorbances (en densité optique) obtenus avec les sérums des 50 donneurs sains plus 2 déviations standards.

L'activité de la maladie sera définie par le score ESSDAI :

Une maladie active sera définie si ESSDAI ≥ 5 .

Une maladie inactive ou faiblement active sera définie si ESSDAI < 5 .

Critères d'évaluation secondaire :

1) Titres des IgE anti-Ro/SSA et ESSDAI.

Les sérums seront dilués en cascade et le titre des IgE auto-réactives a été défini comme étant la dernière dilution dont l'absorbance (en densité optique) est supérieure au seuil de positivité.

2) Positivité/négativité des IgE anti-Ro/SSA.

Le niveau de symptomatologie ressentie par le patient sera mesuré par le score ESSPRI :

- Si ESSPRI ≥ 5 : symptomatologie dont l'intensité, ressentie par le patient, n'est pas acceptable

- Si ESSPRI < 5 : symptomatologie dont l'intensité, ressentie par le patient, est acceptable

3) Positivité/négativité des IgE anti-Ro/SSA.

Survenue d'un lymphome (dont le phénotype est classiquement associé au pSS) suivi tous les ans pendant 5 ans.

4) Positivité/négativité des IgE anti-Ro/SSA.

Le niveau de signature interféron alpha sera mesurée par PCR quantitative en temps réel en calculant la moyenne des niveaux d'expression (delta cycle threshold ou ΔCt) des ARNm issus des gènes régulés par l'interféron alpha.

5) Positivité/négativité des IgE anti-Ro/SSA

Caractéristiques cliniques recueillies :

- type d'organe atteint,

- existence d'un antécédent de lymphome,

- existence de troubles allergiques,

- scores ESSDAI, ESSPRI, et échelles visuelles analogiques [EVA] maladie patient et médecin,

- débit salivaire et test de Schirmer.

Caractéristiques biologiques recueillies :

- titres des IgG anti-Ro/SSA et anti-La/SSB,

- titre du Facteur Rhumatoïde,

- dosages de la $\beta 2$ -microglobuline, des LDH et des gammaglobulines,

- nombre de lymphocytes totaux et de lymphocytes T CD4,

- bilan du complément,

- présence d'une cryoglobulinémie et/ou d'une gammopathie monoclonale.

Caractéristiques anatomopathologiques :

- focus score [nombre d'infiltrats de plus de 50 lymphocytes/4mm²] et présence de centres germinatifs à la biopsie des glandes salivaires accessoires [BGSA]).

6) Positivité/négativité des IgE anti-La/SSB et caractéristiques cliniques, biologiques et anatomopathologiques décrits ci-dessus.

3.2 Méthodologie de la recherche

- Il s'agit d'une étude transversale, avec phase de suivi prospectif, comparant la fréquence de positivité d'un nouveau biomarqueur de monitoring global de l'activité du pSS (les IgE anti-Ro/SSA), chez les patients dont la maladie est jugée active ou non selon le score d'activité composite ESSDAI.
- Le schéma de l'étude est présenté en Annexe 1

3.3 Mesures prises pour réduire et éviter les biais

Depuis sa mise au point en 2009 par un large consensus d'experts internationaux, grâce à l'analyse d'une cohorte de 702 vignettes cliniques, l'ESSDAI est devenu le score de référence pour la majorité des essais cliniques menés dans le pSS. Il a par ailleurs été validé récemment via l'analyse de deux larges cohortes (395 patients chacune) en condition « vraie vie », et les classes d'activités de la maladie ont été clairement définies (Seror et al., 2016). Les niveaux de sévérité de chacun des 12 domaines évalués et leurs scores (cf Annexe 3), sont précisément définis et accompagnés d'une liste détaillée des manifestations qui leurs correspondent. Ainsi, l'ESSDAI est simple et standardisé, et sa mesure ne laisse pas de place à la subjectivité, ce qui permet d'éviter tout biais de classification. En outre, l'ESSDAI est bien connu de tous les praticiens impliqués dans l'étude.

Les inclusions seront consécutives afin de limiter le risque de biais de sélection, et un registre de non-inclusion sera tenu.

Pour éviter les biais d'évaluation, les analyses biologiques (notamment la mesure des IgE auto-réactives) seront réalisées en aveugle de l'état clinique des patients. L'ensemble des tests ne relevant pas de la pratique courante (mesure des IgE auto-réactives et signature IFN α en particulier) seront centralisés au laboratoire d'Immunologie du CHU de Saint-Etienne, où nous avons l'expérience de ces techniques. La déplétion des sérums en IgG sera faite par une technique semi-automatisée (système ÄKTATM start) de chromatographie sur colonne (HiTrapTM Protein G HP). Les réactifs (hors anticorps de détection anti-fragment constant des IgE dont la dilution optimale a été déterminée par des analyses préliminaires) utilisés pour les ELISA IgE anti-Ro/SSA et La/SSB sont ceux validés pour les kits commerciaux ELISA IgG anti-Ro/SSA et La/SSB par Signosis Inc. Enfin, l'analyse de la signature IFN α par PCR quantitative en temps réel fera appel à des dispositifs et des réactifs dédiés à la biologie moléculaire (PAXgeneTM Blood RNA Tubes, RT² ProfilerTM PCR Array System) et commercialisés par des entreprises dont les compétences sont reconnues dans ce domaine (BD Diagnostics, Qiagen). Tous les tests seront réalisés en duplicats afin de limiter la variabilité liée au degré d'incertitude inhérent à toute mesure.

Pour limiter les perdus de vue lors de la phase de suivi prolongé s'intéressant à la survenue d'un lymphome lié au pSS, les patients qui ne seront pas vus en consultation au moins une fois par an, seront appelés par téléphone.

3.4 Le déroulement

Le plan expérimental de l'étude est présenté en Annexe 1.

3.4.1 Déroulement pour un patient :

La sélection :

- Pour les patients déjà suivis dans le cadre d'un pSS, la sélection se fera dans la file active du centre, en ciblant ceux pour qui un bilan de suivi est indiqué, après confirmation du diagnostic de pSS (critères du consensus Américano-Européen) et de l'éligibilité (après vérification des critères d'inclusion/non-inclusion sur dossier). Dans ce cas, la présentation de l'étude et la remise de la notice d'information et de consentement se feront

en consultation ou en hospitalisation (selon les modalités choisies par le médecin en charge du patient), le jour dudit bilan qui coïncide avec le jour d'inclusion.

- Pour les patients non suivis dans le cadre d'un pSS, la sélection se fera chez les patients éligibles (après vérification des critères d'inclusion/non-inclusion), adressés pour syndrome sec ± autre symptôme évocateur de pSS, pour qui il n'existe pas de diagnostic différentiel évident (laissé à l'appréciation du médecin en charge du patient) et donc, une indication de bilan à visée diagnostique. Dans ce cas, la présentation de l'étude et la remise de la notice d'information et de consentement se feront dès ce premier contact.

L'inclusion (M0) :

- Pour les patients déjà suivis dans le cadre d'un pSS, l'inclusion sera faite le jour du bilan de suivi organisé par le médecin en charge du patient (en consultation ou en hospitalisation de jour), après recueil, par l'investigateur, du formulaire de consentement signé. Dans ce cas, le délai de réflexion sera au minimum d'une heure.
- Pour les patients non suivis dans le cadre d'un pSS, l'inclusion sera faite le jour du bilan diagnostique organisé par le médecin en charge du patient (en consultation ou en hospitalisation de jour) pour affirmer (ou infirmer) le diagnostic de pSS, après recueil, par l'investigateur, du formulaire de consentement signé. Dans ce cas, le délai de réflexion sera au minimum de 12H.
- Dans les deux cas, cette visite (M0) impliquera un bilan relevant de la prise en charge habituelle :
 - Recueil des antécédents, examen clinique complet.
 - Mesure du débit salivaire non stimulé, test de Schirmer et BGSA pour les patients qui ne sont pas encore suivis dans le cadre d'un pSS (dans les centres éligibles, un fragment de glande salivaire accessoire sera récupéré, en cas d'échantillon de taille suffisante, en vue d'études ancillaires) et recueil des données anatomopathologiques en lien avec la BGSA précédemment réalisée chez les autres patients (focus score et présence de centres germinatifs).
 - Bilan biologique habituellement indiqué, incluant au moins : numération formule sanguine, plaquettes, ionogramme sanguin, urée, créatinine, bilan hépatique, CRP, électrophorèse des protéines sériques, LDH, β 2-microglobuline, C3, C4, CH50, anticorps anti-nucléaires, anti-ENA, recherche de cryoglobuline et numération des lymphocytes T CD4.
- Dans les deux cas, cette visite (M0), impliquera aussi un bilan propre à l'étude (pour lequel un financement propre est prévu à hauteur d'1H de temps PH et 1H30 de temps TEC par visite) :
 - Remplissage des scores ESSDAI, ESSPRI, mesure des EVA maladie patient et médecin.
 - Mesure du débit salivaire non stimulé et test de Schirmer chez les patients déjà suivis dans le cadre d'un pSS.
 - Bilan biologique propre à l'étude (IgE anti-Ro/SSA, IgE anti-La/SSB, IgE totales, identification d'IgE anti-allergène dans le sérum et mesure des niveaux d'expression des ARNm issus des gènes régulés par l'IFN α , « signature IFN α »).
- Les rares patients non suivis dans le cadre d'un pSS, chez qui le diagnostic de pSS ne sera finalement pas retenu après l'obtention des résultats du bilan diagnostique réalisé à M0, constitueront un sous-groupe témoin avec « syndrome sec non-pSS », sans suivi ultérieur dans le cadre de l'étude. Leurs prélèvements seront conservés et utilisés dans le cadre

d'études ancillaires, notamment pour confirmer les données déjà obtenues chez les donneurs sains ainsi que le potentiel intérêt diagnostique du dosage des IgE anti-Ro/SSA.

La phase de suivi prolongé :

- Dans les deux cas où le diagnostic de pSS sera retenu (patients déjà suivis pour un pSS ou pour qui le diagnostic a été posé lors de l'inclusion), les patients entreront dans une phase de suivi prolongé avec simple recueil d'information annuel concernant l'éventuelle survenue d'un lymphome en rapport avec le pSS (via le dossier médical et/ou par téléphone) pour 5 ans (M60).

La fin d'étude :

- La fin de l'étude correspond à la fin de la phase de suivi prolongé, soit M60.
- Le patient pourra participer simultanément à une autre étude, tant que les critères d'inclusion/non-inclusion sont compatibles.
- Aucune période d'exclusion quant à la participation à une autre étude à la fin de celle-ci, n'est nécessaire.

Durée de participation à l'étude pour un patient : 5 ans

3.5 Description des règles d'arrêt définitif ou temporaire

Si les inclusions n'ont pas commencé dans l'année qui suit l'obtention de l'autorisation du CPP et de l'ANSM, l'étude sera arrêtée. Si le taux d'inclusion paraît insuffisant et non justifié, le promoteur pourra décider de l'arrêt de l'étude.

3.6 Maintien de l'insu et Procédures de levée de l'insu

Non applicable.

IV - SELECTION ET EXCLUSION DES PERSONNES DE LA RECHERCHE

4.1. Critères d'inclusion

- Patient affilié ou ayant droit d'un régime de sécurité
- Age \geq 18 ans.
- Patient informé et ayant signé le formulaire d'information et le consentement de participation à l'étude.
- Patient déjà suivi pour un syndrome de Sjögren primitif selon les critères du consensus Américano-Européen

ou

Patient consultant pour syndrome sec \pm autre symptôme évocateur de syndrome de Sjögren primitif et pour qui il n'existe pas de diagnostic différentiel évident (à l'appréciation du clinicien en charge du patient).

4.2. Critères de non-inclusion des personnes qui se prêtent à la recherche.

- Incapacité ou refus de comprendre et/ou signer le consentement éclairé de participation à l'étude.
- Incapacité et/ou refus d'effectuer les examens requis au titre de l'étude.
- Syndrome de Sjögren secondaire.
- Présence d'une autre maladie auto-immune systémique (e.g. polyarthrite rhumatoïde, connectivite mixte de Sharp, vascularite à ANCA...).

- Traitement par interféron (alpha, bêta ou gamma), anti-IFN α (e.g. sifalimumab, rontalizumab, anifrolumab), anti-Tumor Necrosis Factor alpha (e.g. infliximab, adalimumab, etanercept) ou belimumab dans les 6 mois avant l'inclusion.
- Tout signe clinique ou toute preuve d'infection virale, bactérienne ou fongique en cours.
- Infection virale chronique non guérie (e.g. VIH, VHB, VHC).
- Présence d'une autre étiologie que le pSS pouvant expliquer avec certitude l'ensemble des symptômes présentés (à l'appréciation du clinicien en charge du patient).

4.3. Procédure d'arrêt prématuré de la recherche

4.3.1. Abandons d'étude

Les patients peuvent abandonner l'étude s'ils le décident, à tout moment et qu'elle qu'en soit la raison. La sortie d'essai peut aussi être motivée par l'investigateur.

Tous les cas de sortie d'étude doivent être documentés et l'investigateur doit en préciser la raison.

4.3.2. Arrêt prématuré de l'essai

L'essai pourra être interrompu pour des raisons administratives ou sur le conseil du promoteur, et/ou des autorités de tutelles.

Si l'essai est arrêté prématurément ou suspendu, le promoteur devra informer l'investigateur coordonnateur, les investigateurs des centres, les Autorités Réglementaires, et le CPP de la raison de l'arrêt ou de la suspension.

Modalités de remplacement de ces personnes, le cas échéant

Les patients ayant abandonné ou ayant arrêté prématurément l'étude ne seront pas remplacés.

Modalités de suivi de ces personnes

Les patients ayant abandonné continueront à bénéficier d'un suivi médical approprié.

Procédure en cas de perdu de vue

Toute interruption prolongée dans le suivi clinique et/ou biologique d'un patient est à considérer comme « perdu de vue ». Pour ces sujets, le cahier d'observation doit être rempli jusqu'à la dernière visite effectuée. Dans ce cas, l'investigateur devra réaliser une enquête afin d'en déterminer la cause et le notifier dans le document source et le CRF.

V- TECHNIQUE ETUDIEE DANS LE CADRE DE LA RECHERCHE

ELISA IgE anti-Ro/SSA et anti-La/SSB

- Extraction des sérums des patients, à partir du sang total.
- Déplétion des sérums en IgG (via des colonnes HiTrap™ Protein G HP et le système de chromatographie ÄKTA™ start [GE Healthcare Life Sciences] pour un maximum de standardisation, selon les protocoles fournis par le constructeur).
- Récupération des sérums déplétés en IgG (dilués au 1/6^{ème}).
- Utilisation de plaques 96 puits calibrées, pré-coatées avec les antigènes Ro60/TROVE2 ou Ro52/TRIM21 ou La/SSB et déjà pré-saturées (Signosis Inc.), en partie selon le protocole fourni par le constructeur.
- Dépôts des sérums déplétés en IgG, dans les plaques 96 puits à raison de 8 sérums (en duplicats) par plaque.

- Dilutions en cascade au 1/2 (six fois par échantillon) des sérums (dilution du 1/12^{ème} au 1/768^{ème}).
- Incubation des sérums dans les plaques 96 puits pendant 1H à température ambiante en agitant doucement.
- Lavage des plaques par une solution de PBS + 0.05% Tween-20 (x3).
- Ajout d'un anticorps monoclonal anti-fragment constant des IgE (dilué au 1/2000^{ème}) couplé à la peroxydase de raifort (Aviva Systems Biology), dans les plaques 96 puits et incubation pendant 1H à température ambiante en agitant doucement.
- Lavage des plaques par une solution de PBS + 0.05% Tween-20 (x3).
- Ajout de TMB dans les plaques 96 puits, et incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- Blocage de la réaction par ajout de H₂SO₄, puis mesure de l'absorbance (en densité optique) à 450nm.

A l'heure actuelle, il n'existe pas sur le marché, d'anticorps ant-Ro/SSA ou La/SSB d'isotype IgE, ni d'industriel souhaitant se lancer dans leurs productions (en l'absence de preuve de leur intérêt en clinique pour le moment), ainsi la concentration des IgE auto-réactives de nos patients ne peut pas être déterminée de manière absolue (en ng/ml) via une gamme standard et une courbe d'étalonnage. En revanche, à l'instar de ce qui a été fait précédemment par une équipe française s'intéressant spécifiquement au SLE et aux IgE auto-réactives (Dema et al., 2014a), nous avons déterminé les seuils de positivité de nos tests comme la moyenne des absorbances (en densité optique) obtenus avec les sérums de 50 donneurs sains, plus 2 déviations standards. Afin de compenser l'absence de gamme standard, nous avons décidé de diluer les sérums en cascade et d'exprimer le titre des IgE auto-réactives comme étant la dernière dilution dont l'absorbance (en densité optique) est supérieure au seuil de positivité.

VI- EVALUATION DE L'EFFICACITE

6.1. Description des paramètres d'évaluation de l'efficacité.

Non applicable.

6.2. Méthodes et calendrier prévus pour mesurer, recueillir et analyser les paramètres d'évaluation de l'efficacité.

Non applicable.

VII- EVALUATION DE LA SECURITE

7.1. Description des paramètres d'évaluation de la sécurité ;

Il n'a pas été prévu d'évaluer de paramètre de sécurité pour le prélèvement sanguin en raison du caractère peu invasif du geste, et du simple risque d'hématome au point de ponction (qui est déjà présent en dehors de toute étude, puisque ces patients ont des prises de sang régulières dans le suivi classique de leurs maladies, et que nous profiterons de l'une d'entre elles pour réaliser le prélèvement supplémentaire).

7.2. Méthodes et calendrier prévus pour mesurer, recueillir et analyser les paramètres d'évaluation de sécurité ;

S'il en survient, nombre d'événement indésirables graves.

7.3. Procédures mises en place en vue de l'enregistrement et de la notification des événements indésirables

7.3.1 Définition

Un effet/événement indésirable est une manifestation nocive survenant chez une personne qui se prête à la recherche biomédicale que cette manifestation soit liée ou non à la recherche ou au produit sur lequel porte la recherche.

Un effet/événement indésirable grave est un effet/événement indésirable qui :

- entraîne la mort,
- met en danger la vie de la personne qui se prête à la recherche,
- nécessite une hospitalisation ou la prolongation de l'hospitalisation,
- provoque une incapacité ou un handicap important ou durable,
- se traduit par une anomalie ou une malformation congénitale.

Cette étude ne comportant que des tests/prélèvements sans danger, aucun EIG n'est attendu dans cette étude. Tout événement entrant dans la définition d'un EIG mais lié aux pathologies initiales des patients ou découverts lors de l'examen d'inclusion ne sera pas considéré comme un EIG.

S'il survient un EIG, il sera automatiquement considéré comme inattendu et déclaré selon les modalités décrites au § 7.3.2.

7.3.2 Déclaration de l'investigateur au promoteur.

L'investigateur devra déclarer au promoteur :

- tout EIG inattendu dès qu'il en a connaissance et,
 - tout EIG attendu dans un délai de 8 jours après qu'il en ait eu connaissance.
- que cet EIG soit ou non lié au produit/technique expérimental/étude.

Dans les 2 cas, l'investigateur complétera puis faxera au promoteur au 04 77 12 78 20 le bordereau spécifique de déclaration d'EIG figurant dans les cahiers d'observation ainsi que tout élément du dossier médical expliquant les circonstances de survenue de l'événement et son évolution. Le comité de validation des EIG du promoteur constitué d'un médecin de l'Unité de Recherche Clinique et d'un médecin du Centre Régionale de Pharmacovigilance, jugera du caractère attendu ou inattendu et de l'imputabilité de cet EIG par rapport à l'étude. Tous les EIGI pour lesquels le comité de validation des EIG n'aura pu totalement écarter un lien avec le produit/technique expérimental/étude seront déclarés à l'ANSM et au CPP par le promoteur.

La fréquence des EIG attendus sera suivie par le comité EIG du promoteur. En cas d'augmentation de la fréquence d'un EIG attendu, celui sera requalifié en inattendu et fera l'objet d'une déclaration de fait nouveau auprès du CPP et de l'ANSM.

7.3.3 Déclaration du promoteur au CPP et aux autorités de santé.

Tous les EIG pour lesquels le comité de validation n'aura pu totalement écarter un quelconque lien avec l'étude seront déclarés à l'ANSM et au CPP, par le promoteur, dans un délai de 7 jours.

En cas de déclaration initiale incomplète d'un EIGI, le promoteur adressera, dès réception d'informations complémentaires, un rapport de suivi référencé et numéroté de cet EIGI.

S'il survient des EIG dans cette étude, le promoteur transmettra au CPP et à l'ANSM :

- tous les 6 mois, un listing (accompagné d'une synthèse) de ces EIGI
- chaque année, dans les 60 jours suivant la date anniversaire de l'inclusion du 1^{er} patient dans l'étude, un rapport annuel de sécurité

Si aucun EIG n'est déclaré dans cette étude, seul un courrier annuel sera adressé à l'ANSM et au CPP pour leur indiquer l'absence de survenue d'EIG.

La survenue et la déclaration des EIG attendus et inattendus seront systématiquement vérifiées lors des visites de monitoring.

En cas de survenue d'un fait nouveau (par exemple nouvelle donnée de sécurité) durant cette étude, le promoteur adressera immédiatement, dès qu'il en a connaissance, une déclaration de ce fait nouveau et des éventuelles mesures prises, au CPP et à l'ANSM. Si le promoteur a connaissance d'informations complémentaires pertinentes concernant ce fait nouveau, il adressera un rapport de suivi, à l'ANSM et au CPP.

7.4. Modalités et durée du suivi des personnes suite à la survenue d'événements indésirables.

Toute personne présentant un effet/événement indésirable recevra la prise en charge adaptée à son état et sera suivie jusqu'à la résolution de l'événement ou jusqu'à la fin de la recherche. Si cela s'avère nécessaire, le produit/technique expérimentée/l'étude sera arrêtée.

VIII - ANALYSE STATISTIQUE

8.1 Nombre de sujets nécessaire

Par analogie avec les données sur les IgE anti-dsDNA dans le SLE (en l'absence de donnée précise sur la fréquence des IgE anti-Ro/SSA selon l'activité du pSS), nous pensons observer environ 2 fois plus de patients IgE anti-SSA positifs dans le groupe ESSDAI \geq 5 (63,1%) par rapport au groupe ESSDAI $<$ 5 (36,9%) (Dema et al., 2014a). Pour mettre en évidence cette différence avec un risque alpha de 5% et une puissance de 85%, il nous faudra inclure 71 patients avec ESSDAI \geq 5. Comme l'analyse de 2 larges cohortes de la « vraie vie » (hors essais cliniques) de 395 patients pSS chacune, retrouvait entre 36,6 et 61,3% des patients avec un ESSDAI \geq 5, soit 49% des patients en moyenne, il nous faudra inclure 145 patients au total. Ce calcul a été effectué via le logiciel Medcalc®.

Comme il s'agit une étude transversale, l'analyse du critère principal pourra être faite dès la visite d'inclusion, il n'y aura donc pas de patient « perdu de vue ». Il en sera de même pour la quasi-totalité des critères secondaires. Concernant la survenue de lymphome, compte-tenu du caractère très peu contraignant de la phase de suivi prolongé de l'étude, nous pensons obtenir ces données pour l'immense majorité des patients.

8.2 Description des méthodes statistiques

Analyse descriptive :

La population incluse sera décrite globalement et en fonction du score ESSDAI ($<$ 5 versus \geq 5) grâce aux statistiques suivantes :

- variables quantitatives : nombre de données disponibles, moyenne, écart-type, médiane, 1^{er} et 3^{ème} quartiles, minimum et maximum ;
- variables qualitatives : fréquences absolues et relatives (exprimées en %)

Analyse du critère d'évaluation principal :

La fréquence de positivité des IgE anti-Ro/SSA sera comparée entre le groupe de patients ayant une maladie active (ESSDAI \geq 5) et ceux dont la maladie est inactive/faiblement active (ESSDAI $<$ 5). Pour cela, un test exact de Fisher sera mis en œuvre. L'Odds Ratio et son intervalle de confiance à 95% pourront également être calculés. Si un déséquilibre sur un ou des facteurs de confusion apparaît, une analyse de sensibilité sera réalisée en ajustant sur ce ou ces facteurs. Pour cela, un modèle logistique multivarié sera envisagé.

Analyses des critères d'évaluation secondaires :

Afin de déterminer s'il existe une corrélation linéaire entre les titres des IgE anti-Ro/SSA et le score d'ESSDAI (1^{er} objectif secondaire), le coefficient de corrélation de Pearson sera calculé, dans le cas où les variables testées suivent une Loi Normale. Dans le cas inverse, un coefficient de Spearman sera préféré. La Normalité sera au préalable vérifiée à l'aide d'un test de Shapiro-Wilk. Une représentation graphique de type nuage de points sera également employée.

Des méthodes identiques à celle décrites ci-dessus pour l'analyse du critère d'évaluation principal, en remplaçant l'ESSDAI par l'ESSPRI, seront utilisées afin de répondre au 2^{ème} objectif secondaire.

Afin de quantifier le risque qu'implique la positivité des IgE anti-Ro/SSA sur la survenue d'un lymphome à 5 ans (3^{ème} objectif secondaire), une régression logistique univariée sera réalisée. L'Odds Ratio et son intervalle de confiance à 95% seront ainsi calculés. Par ailleurs, les résultats seront ajustés en fonction de la durée d'évolution du pSS, facteur bien connu de survenue de lymphome.

Concernant le 4^{ème} objectif secondaire, la moyenne des niveaux d'expression (delta cycle threshold ou Δ Ct) des ARNm issus des gènes régulés par l'interféron alpha sera comparée entre les patients ayant une maladie active (ESSDAI \geq 5) et ceux dont la maladie est inactive/faiblement active (ESSDAI $<$ 5) au moment du dosage. Pour cela, un test t de Student sera mis en œuvre, si la Normalité de la distribution de la variable testée est vérifiée. Dans le cas inverse, un test des rangs sera utilisé.

Concernant les deux derniers objectifs secondaires, les caractéristiques cliniques, biologiques et anatomopathologiques (détaillées dans le paragraphe correspondant au critère de jugement secondaire) seront décrites en fonction de la positivité des IgE anti-Ro/SSA (objectif 5) ou IgE anti-La/SSB (objectif 6). Pour cela, des statistiques identiques à celles détaillées dans le paragraphe analyse descriptive seront utilisées. Afin de comparer ces caractéristiques, des tests exacts de Fisher seront utilisés, si la variable testée est qualitative. Dans le cas d'une variable quantitative, des tests T de Student ou des tests de rangs seront employés, en fonction de la Normalité de la distribution de la variable testée.

8.3 Degré de signification statistique

Les résultats seront considérés comme significatifs au seuil de 5%.

8.4 Méthodes de prise en compte des données manquantes, inutilisées ou non valides

Aucune imputation des valeurs manquantes ne sera réalisée.

8.5 Gestion des modifications apportées au plan d'analyse de la stratégie initiale

Le plan d'analyse statistique sera rédigé à l'aveugle des données. Si des modifications doivent être apportées dans les méthodes décrites dans le paragraphe « analyse statistique » du présent

protocole, elles seront validées par le statisticien de référence dans le plan d'analyse statistique.

8.6 Choix des personnes à inclure dans les analyses.

Tous les patients inclus dans l'étude pour qui les critères jugements seront disponibles, seront analysés.

IX - DROIT D'ACCES AUX DONNEES ET DOCUMENTS SOURCES

9.1. Droit d'accès aux données

Les personnes participant à cette recherche seront informées de leur droit d'accès et de rectification aux données les concernant, ainsi que des modalités d'application de ce droit via la notice d'information et le formulaire de consentement de participation à l'étude. Le promoteur (par l'intermédiaire du TEC ou des investigateurs) s'engage à répondre à toute demande d'accès aux données dans un délai de 2 mois maximum. Par ailleurs, seule le personnel habilité par le promoteur (investigateurs, ARC, TEC) et les représentants des autorités de santé pourront avoir accès à ces informations.

9.2. Description des variables recueillies

Les données de l'étude seront recueillies directement dans les cahiers d'observation, au fur et à mesure des visites de l'étude. Ces données seront validées par l'investigateur qui signera (manuellement ou électroniquement) les cahiers d'observation.

Les informations recueillies dans le cadre de cette étude sont les suivantes (lister l'ensemble des données que vous souhaitez recueillir) :

- *Antécédents médicaux pertinents*
- *Historique de la maladie (date du diagnostic de pSS, symptômes et complications associés)*
- *Traitements déjà utilisés si applicable*
- *Examen clinique*
- *Examens biologiques*
- *Scores ESSDAI, ESSPRI*
- *EVA maladie patient et médecin*
- *Débit salivaire non-stimulé*
- *Test de Schirmer*
- *Examens anatomopathologiques*

Les données manquantes devront être justifiées (par exemple dans un tableau des violations de protocole). Toute correction apportée dans le CRF devra être traçable (barrée, datée et paraphée par le correcteur sur un CRF « papier », via l'audit trial » sur un e-CRF).

9.3. Identification des données sources

Les documents sources seront constitués par l'ensemble des informations et résultats d'examens figurant dans le dossier médical des personnes participants à cette recherche. Les informations suivantes devront figurer dans le dossier médical :

- titre de l'étude,
- date d'information et d'inclusion du patient dans l'étude (signature du consentement),
- les différentes visites du patient dans le cadre du protocole,
- la survenue des complications (Evénements Indésirables Graves).

L'investigateur s'engage à donner un accès direct à l'ensemble de ces documents aux personnes mandatées par le promoteur.

X - CONTRÔLE ET ASSURANCE QUALITE

Projet avec ARC spécifique

Le contrôle de qualité sera réalisé par l'Attaché de Recherche Clinique recruté spécifiquement dans le cadre de cette étude. Cet ARC réalisera 1 visite de mise en place, le nombre de visites de monitoring nécessaire au contrôle de 100% des cahiers d'observation et une visite de fermeture dans chaque centre. Toutes les données de tous les cahiers d'observation et la présence des consentements signés seront vérifiées. Ces visites seront réalisées selon les procédures opératoires standards du promoteur. Celui-ci ayant classé cette étude en niveau de monitoring minimal, chaque visite donnera lieu à la rédaction de comptes rendus de visites qui seront transmis pour information, aux chefs de projets de l'URCIP du CHU de Saint-Étienne.

XI - FAISABILITE ET CALENDRIER DE L'ETUDE

Le pSS est une connectivite fréquente compte-tenu de sa prévalence (0,01 à 0,3% de la population générale), mais son diagnostic et son suivi, relèvent du spécialiste, interniste ou rhumatologue en général. La quasi-totalité des patients étant vu à l'hôpital et nos critères d'inclusion/non-inclusion était peu contraignant, le taux d'inclusion sera optimal.

Les services impliqués sont des centres reconnus pour la prise en charge du pSS, avec qui nous avons l'habitude de travailler. Aussi, nous avons l'expérience des tests ELISA IgE anti-Ro/SSA et La/SSB qui seront utilisés, et ils ne présentent aucune difficulté technique.

- Durée de l'étude : 60 mois
- Date prévisible de début des inclusions : Novembre 2017
- Date de fin des inclusions : Novembre 2019
- Date de fin du suivi : Novembre 2024
- Analyse et validation des résultats : Mai 2025
- Rapport final : Novembre 2025

<u>NOM</u>	<u>Prénom</u>	<u>Ville</u>	<u>Pays</u>	<u>Recrutement attendu /</u> <u>mois</u>	<u>Total</u>
CATHEBRAS	Pascal	Saint-Etienne	FRANCE	1.25	30
KILLIAN	Martin				
GAULTIER	Jean-Baptiste				
GUICHARD	Isabelle				
LEGA	Jean-Christophe	Pierre-Bénite	FRANCE	1	24
REYNAUD	Quitterie	Lyon	FRANCE	1.25	30
SEVE	Pascal				
GERFAUD-VALENTIN	Mathieu				
JAMILLOUX	Yvon				
BERNARD	Claire				

RUIVARD	Marc	Clermont-Ferrand	FRANCE	1.2	26
RIEU	Virginie				
LE GUENNO	Guillaume				
GROBOST	Vincent				
FABRE	Marc	Bourgoin-Jailleu	FRANCE	0.5	12
ROUX	Marielle				
BOUILLET	Laurence	La Tronche	FRANCE	1	24
SARROT-REYNAULD	Françoise				
DEROUX	Alban				

XII - ORGANISATION DE L'ETUDE

- Centre coordonnateur : Service de Médecine Interne – CHU de Saint-Etienne.
- Investigateur coordonnateur : Pr Pascal Cathébras.
- Centres et investigateurs associés :
 Dr Isabelle GUICHARD, Dr Jean-Baptiste GAULTIER, Service de Médecine Interne, Hôpital Nord – CHU Saint-Etienne.
 Dr Jean-Christophe LEGA, Dr Quitterie REYNAUD, Service de Médecine Interne, Centre Hospitalier Lyon Sud – CHU Lyon.
 Pr Pascal SEVE, Dr Yvan JAMILLOUX, Dr Mathieu GERFAUD-VALENTIN, Dr Claire BERNARD, Service de Médecine Interne, Hôpital de la Croix Rousse – CHU Lyon.
 Pr Marc RUIVARD, Dr Virginie RIEU, Dr Guillaume LE GUENNO, Dr Vincent GROBOST, Service de Médecine Interne, CHU Estaing – CHU Clermont-Ferrand.
 Dr Marc FABRE, Dr Marielle ROUX, Service de Médecine Interne, CH Pierre Oudot – CH Bourgoin-Jailleu.
 Pr Laurence BOUILLET, Dr Françoise SARROT-REYNAULD, Dr Alban DEROUX, Hôpital Michallon – CHU Grenoble Alpes
- Le(s) responsable(s) de la mesure du (des) critère(s) d'évaluation :
 M. Martin Killian, Service de Médecine Interne.
 Pr. Stéphane Paul, Laboratoire d'Immunologie Clinique.
- La personne chargée du contrôle de qualité de la recherche :
 ARC de l'étude
- La personne chargée de la saisie des données :
 TEC de chaque centre
- Le responsable de l'analyse statistique :
 Biostatisticienne de l'Unité de Recherche Clinique, Innovation et Pharmacologie du CHU de Saint-Etienne

XIII - CONSIDERATIONS ETHIQUES

13.1 Déclaration indiquant que la recherche sera conduite conformément au protocole, aux bonnes pratiques et aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur

Le protocole est en conformité avec les principes d'éthique établis par la 18^{ème} Assemblée Médicale Mondiale (Helsinki 1964) et par les amendements établis lors des 29^{ème} (Tokyo 1975), 35^{ème} (Venise 1983), 41^{ème} (Hong Kong 1989), 48^{ème} (Somerset West 1996) la 52^{ème} (Edinburg 2000) et révisée lors de la 54^{ème} Assemblée Médicale Mondiale (Washington 2002). Il sera conduit conformément aux recommandations ICH de Bonnes Pratiques Cliniques.

13.2. Protection des personnes

Il s'agit d'une étude entrant dans le cadre de la loi du 9 août 2004, du fait des prélèvements sanguins supplémentaires.

Le protocole sera soumis à l'avis du Comité de Protection des Personnes (CPP) Sud-Est I et à l'autorisation de l'ANSM avant de débiter les inclusions. Chaque patient se verra remettre une notice d'information lui expliquant l'étude et devra signer un formulaire de consentement éclairé (annexe 4) avant de pouvoir participer à la recherche.

Tous les patients inclus, y compris ceux chez qui le diagnostic de pSS ne sera finalement pas retenu, il est prévu de conserver les prélèvements pour une étude ancillaire. Ces prélèvements seront conservés dans la collection de prélèvements sanguins du laboratoire d'immunologie du CHU de Saint-Etienne déclarée sous le n° DC-2010-1108.

Un consentement spécifique de conservation sera demandé au sujet. Si le patient refuse que ses prélèvements soient conservés, son refus ne remettra pas en cause sa participation à cette étude.

Par ailleurs, le patient pourra demander, à tout moment, la destruction de ses échantillons en contactant le responsable de cette collection, Monsieur le Professeur Stéphane PAUL du laboratoire d'Immunologie du CHU de Saint-Etienne.

13.3 Assurance

Le promoteur de l'étude, le CHU de Saint-Étienne, contractera une police d'assurance en responsabilité civile (SHAM n°144.942).

13.4 Rapport Bénéfice/Risque

Les patients participant à l'étude n'en retireront aucun bénéfice direct, en revanche, l'objectif étant d'optimiser la prise en charge et le suivi du pSS, les résultats de l'étude pourront contribuer à une amélioration ultérieure de la manière dont ils seront traités.

Par ailleurs, le seul risque encouru est celui lié au prélèvement sanguin, c'est-à-dire d'hématome au point de ponction (qui est déjà présent en dehors de toute étude, puisque ces patients ont des prises de sang régulières dans le suivi classique de leurs maladies, et que nous profiterons de l'une d'entre elles pour réaliser le prélèvement supplémentaire).

XIV - TRAITEMENT DES DONNEES ET CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES RELATIVES A LA RECHERCHE

14.1. Circuit des données

Lors de leur recueil, les informations concernant les patients participant à cette étude seront anonymisées (identification par le monogramme et le n° d'inclusion) selon les recommandations établit par la CNIL dans la déclaration de conformité enregistrée sous le n°1167710 pour le CHU de Saint-Étienne.

La saisie des données sera réalisée, sous la responsabilité de l'investigateur, par un membre de son équipe (TEC) sur :

- un e-CRF hébergé (et sauvegardé de façon journalière) par un prestataire et protégé par un mot de passe changeant tous les 3 mois.

Une extraction des données sous forme ASCII, TXT, Access ou SAS sera demandée pour l'analyse, afin de pouvoir faire l'importation dans le logiciel d'analyse statistique adéquate.

Le fichier de données et les formats et labels correspondant seront relus et sauvegardés au format SAS, selon les procédures opératoire standard de l'URCIP et CIC du CHU de Saint-Etienne. Les données seront sauvegardées sur le réseau interne du CHU dans un répertoire dédié à l'étude, répertoire accessible uniquement au statisticien. Le réseau interne du CHU est sécurisé par un pare-feu qui protège le réseau du CHU de toute intrusion extérieure. Un serveur proxy contrôle également la navigation sur internet et un logiciel anti-virus examine tous les fichiers et les pages copiées depuis des serveurs extérieurs, vers le CHU. Chaque personne souhaitant se connecter au réseau du CHU doit d'abord s'identifier à l'aide d'un identifiant et d'un mot de passe fournis par les services informatiques du CHU.

14.2. Modalités de traitement, vérification et validation des données (data management)

Comme la saisie sera faite par ACCESS (ou e-CRF), des contrôles de bornes seront programmés en fonction du manuel de data-mangement et imposeront donc la correction des données dès la saisie.

En fonction du cahier des charges, une validation des données sera éventuellement réalisée pour l'analyse statistique, et des demandes de correction seront émises à l'investigateur ou au TEC de l'étude, qui s'engage à compéter et corriger les données en conséquence.

Le gel de base sera décidé d'un commun accord entre le statisticien de l'étude, l'investigateur principal et le chef de projet.

14.3. Archivage des documents de l'essai

A la fin de la recherche, l'ensemble des documents (différentes versions du protocole, cahiers d'observation, classeur investigateur, consentements, correspondances,...) figurant sur support papier seront archivés puis conservés, dans chaque centre, et chez le promoteur, durant 15 ans.

Une fois le rapport final de la recherche réalisé ou publié et, au maximum dans un délai de 5 ans après la fin de la recherche, les données figurant sur support informatique seront archivées sur CD/disque dur/clé USB et conservés pendant 15 ans dans une armoire fermée à clé du service concerné.

XV - PROPRIETES DES DONNEES – REGLES DE PUBLICATION

- Les données seront la propriété du promoteur. Leur accès et leur utilisation seront sous la responsabilité de l'investigateur principal.
- L'étude devra donner lieu à une publication dans les meilleurs délais après la fin de l'étude.
- Noter la personne responsable de la publication : M. Martin Killian.
- Pour les études entrant dans le cadre de loi du 9 août 2004, citer le CHU de Saint-Etienne en tant que promoteur de l'étude et le ou les organismes financeurs (Ministère de la Santé et des Solidarités pour les projets PHRC, CHU de Saint-Etienne pour les projets « appel d'offres local », industriel...).

XVI - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Brito-Zerón, P., Kostov, B., Solans, R., Fraile, G., Suárez-Cuervo, C., Casanovas, A., Rascón, F.J., Qanneta, R., Pérez-Alvarez, R., Ripoll, M., et al. (2014). Systemic activity and mortality in primary Sjögren syndrome: predicting survival using the EULAR-SS Disease Activity Index (ESSDAI) in 1045 patients. *Ann. Rheum. Dis.* annrheumdis-2014-206418.

Charles, N., Hardwick, D., Daugas, E., Illei, G.G., and Rivera, J. (2010). Basophils and the T helper 2 environment can promote the development of lupus nephritis. *Nat. Med.* 16, 701–707.

Cornec, D., Devauchelle-Pensec, V., Mariette, X., Jousse-Joulin, S., Berthelot, J.-M., Perdriger, A., Puéchal, X., Le Guern, V., Sibilia, J., Gottenberg, J.-E., et al. (2015). Development of the Sjögren's Syndrome Responder Index, a data-driven composite endpoint for assessing treatment efficacy. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 54, 1699–1708.

Dema, B., Pellefigues, C., Hasni, S., Gault, N., Jiang, C., Ricks, T.K., Bonelli, M.M., Scheffel, J., Sacré, K., Jablonski, M., et al. (2014a). Autoreactive IgE is prevalent in systemic lupus erythematosus and is associated with increased disease activity and nephritis. *PloS One* 9, e90424.

Dema, B., Charles, N., Pellefigues, C., Ricks, T.K., Suzuki, R., Jiang, C., Scheffel, J., Hasni, S., Hoffman, V., Jablonski, M., et al. (2014b). Immunoglobulin E plays an immunoregulatory role in lupus. *J. Exp. Med.* 211, 2159–2168.

Devauchelle-Pensec, V., Gottenberg, J.-E., Jousse-Joulin, S., Berthelot, J.-M., Perdriger, A., Hachulla, E., Hatron, P.Y., Puechal, X., Le Guern, V., Sibilia, J., et al. (2015). Which and How Many Patients Should Be Included in Randomised Controlled Trials to Demonstrate the Efficacy of Biologics in Primary Sjögren's Syndrome? *PloS One* 10, e0133907.

Franklyn, K., Hoi, A., Nikpour, M., and Morand, E.F. (2014). The need to define treatment goals for systemic lupus erythematosus. *Nat. Rev. Rheumatol.* 10, 567–571.

Grigor, C., Capell, H., Stirling, A., McMahon, A.D., Lock, P., Vallance, R., Kincaid, W., and Porter, D. (2004). Effect of a treatment strategy of tight control for rheumatoid arthritis (the TICORA study): a single-blind randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 364, 263–269.

- Hall, J.C., and Rosen, A. (2010). Type I interferons: crucial participants in disease amplification in autoimmunity. *Nat. Rev. Rheumatol.* 6, 40–49.
- Henault, J., Riggs, J.M., Karnell, J.L., Liarski, V.M., Li, J., Shirinian, L., Xu, L., Casey, K.A., Smith, M.A., Khattry, D.B., et al. (2016). Self-reactive IgE exacerbates interferon responses associated with autoimmunity. *Nat. Immunol.* 17, 196–203.
- Horvath, I.F., Szanto, A., Papp, G., Zeher, M., Horvath, I.F., Szanto, A., Papp, G., and Zeher, M. (2014). Clinical Course, Prognosis, and Cause of Death in Primary Sjögren's Syndrome, Clinical Course, Prognosis, and Cause of Death in Primary Sjögren's Syndrome. *J. Immunol. Res. J. Immunol. Res.* 2014, 2014, e647507.
- Hung, T., Pratt, G.A., Sundararaman, B., Townsend, M.J., Chaivorapol, C., Bhangale, T., Graham, R.R., Ortmann, W., Criswell, L.A., Yeo, G.W., et al. (2015). The Ro60 autoantigen binds endogenous retroelements and regulates inflammatory gene expression. *Science* 350, 455–459.
- Ishizaka, K., Ishizaka, T., and Hornbrook, M.M. (1966). Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 97, 75–85.
- Kirou, K.A., and Gkrouzman, E. (2013). Anti-interferon alpha treatment in SLE. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 148, 303–312.
- Kyriakidis, N.C., Kapsogeorgou, E.K., and Tzioufas, A.G. (2014). A comprehensive review of autoantibodies in primary Sjögren's syndrome: clinical phenotypes and regulatory mechanisms. *J. Autoimmun.* 51, 67–74.
- Nocturne, G., and Mariette, X. (2015). Sjögren Syndrome-associated lymphomas: an update on pathogenesis and management. *Br. J. Haematol.* 168, 317–327.
- Nocturne, G., Cornec, D., Seror, R., and Mariette, X. (2015). New biological therapies in Sjögren's syndrome. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 29, 783–793.
- Palm, O., Garen, T., Berge Enger, T., Jensen, J.L., Lund, M.-B., Aaløkken, T.M., and Gran, J.T. (2013). Clinical pulmonary involvement in primary Sjogren's syndrome: prevalence, quality of life and mortality--a retrospective study based on registry data. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 52, 173–179.
- Permin, H., and Wiik, A. (1978). The prevalence of IgE antinuclear antibodies in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. [C]* 86C, 245–249.
- Qin, B., Wang, J., Yang, Z., Yang, M., Ma, N., Huang, F., and Zhong, R. (2015). Epidemiology of primary Sjögren's syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Rheum. Dis.* 74, 1983–1989.
- Quartuccio, L., Baldini, C., Bartoloni, E., Priori, R., Carubbi, F., Corazza, L., Alunno, A., Colafrancesco, S., Luciano, N., Giacomelli, R., et al. (2015). Anti-SSA/SSB-negative

Sjögren's syndrome shows a lower prevalence of lymphoproliferative manifestations, and a lower risk of lymphoma evolution. *Autoimmun. Rev.* 14, 1019–1022.

Ramos-Casals, M., Tzioufas, A.G., Stone, J.H., Sisó, A., and Bosch, X. (2010). Treatment of primary Sjögren syndrome: a systematic review. *JAMA* 304, 452–460.

Ramos-Casals, M., Brito-Zerón, P., Sisó-Almirall, A., and Bosch, X. (2012). Primary Sjogren syndrome. *BMJ* 344, e3821.

Sekigawa, I., Kaneda, K., Kaneko, H., Takasaki, Y., Takamori, K., and Ogawa, H. (2008). Detection of serum IgE class anti-SSA antibodies in mothers with foetal loss. *Rheumatol. Int.* 28, 623–626.

Seror, R., Ravaud, P., Bowman, S.J., Baron, G., Tzioufas, A., Theander, E., Gottenberg, J.-E., Bootsma, H., Mariette, X., Vitali, C., et al. (2010). EULAR Sjogren's syndrome disease activity index: development of a consensus systemic disease activity index for primary Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 1103–1109.

Seror, R., Ravaud, P., Mariette, X., Bootsma, H., Theander, E., Hansen, A., Ramos-Casals, M., Dörner, T., Bombardieri, S., Hachulla, E., et al. (2011). EULAR Sjogren's Syndrome Patient Reported Index (ESSPRI): development of a consensus patient index for primary Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 968–972.

Seror, R., Bootsma, H., Saraux, A., Bowman, S.J., Theander, E., Brun, J.G., Baron, G., Le Guern, V., Devauchelle-Pensec, V., Ramos-Casals, M., et al. (2016). Defining disease activity states and clinically meaningful improvement in primary Sjögren's syndrome with EULAR primary Sjögren's syndrome disease activity (ESSDAI) and patient-reported indexes (ESSPRI). *Ann. Rheum. Dis.* 75, 382–389.

Shiboski, S.C., Shiboski, C.H., Criswell, L.A., Baer, A.N., Challacombe, S., Lanfranchi, H., Schiødt, M., Umehara, H., Vivino, F., Zhao, Y., et al. (2012). American College of Rheumatology classification criteria for Sjögren's syndrome: a data-driven, expert consensus approach in the Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance cohort. *Arthritis Care Res.* 64, 475–487.

Sutton, B.J., and Davies, A.M. (2015). Structure and dynamics of IgE-receptor interactions: FcεRI and CD23/FcεRII. *Immunol. Rev.* 268, 222–235.

Verstappen, S.M.M., Jacobs, J.W.G., van der Veen, M.J., Heurkens, A.H.M., Schenk, Y., ter Borg, E.J., Blaauw, A. a. M., Bijlsma, J.W.J., and Utrecht Rheumatoid Arthritis Cohort study group (2007). Intensive treatment with methotrexate in early rheumatoid arthritis: aiming for remission. Computer Assisted Management in Early Rheumatoid Arthritis (CAMERA, an open-label strategy trial). *Ann. Rheum. Dis.* 66, 1443–1449.

Vitali, C., Bombardieri, S., Moutsopoulos, H.M., Balestrieri, G., Bencivelli, W., Bernstein, R.M., Bjerrum, K.B., Braga, S., Coll, J., and de Vita, S. (1993). Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European Community. *Arthritis Rheum.* 36, 340–347.

Vitali, C., Bombardieri, S., Jonsson, R., Moutsopoulos, H., Alexander, E., Carsons, S., Daniels, T., Fox, P., Fox, R., Kassin, S., et al. (2002). Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann. Rheum. Dis.* 61, 554–558.

Wu, L.C., and Zarrin, A.A. (2014). The production and regulation of IgE by the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 247–259.

Yang, Z., Sullivan, B.M., and Allen, C.D.C. (2012). Fluorescent In Vivo Detection Reveals that IgE+ B Cells Are Restrained by an Intrinsic Cell Fate Predisposition. *Immunity* 36, 857–872.

Yao, Y., Higgs, B.W., Richman, L., White, B., and Jallal, B. (2010). Use of type I interferon-inducible mRNAs as pharmacodynamic markers and potential diagnostic markers in trials with sifalimumab, an anti-IFN α antibody, in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 12, S6.

Yao, Y., Liu, Z., Jallal, B., Shen, N., and Rönnblom, L. (2013). Type I interferons in Sjögren's syndrome. *Autoimmun. Rev.* 12, 558–566.

IV. Utilisation d'un inhibiteur de JAK1/2 dans un cas de syndrome de Sjögren systémique chez l'Homme

Comme nous l'avons vu précédemment, parmi les traitements qui ont un effet sur les IFNs, les inhibiteurs de JAK sont ceux qui connaissent le développement le plus actif ces dernières années, avec déjà quelques AMM dans le traitement des maladies auto-immunes et inflammatoires, et de nombreux essais cliniques en cours (516).

Parmi les 3 JAKi qui ont une AMM à ce jour, le ruxolitinib a une place à part, du fait de son positionnement en hématologie, dans la prise en charge des syndromes myéloprolifératifs (419,517). En revanche, il s'agit d'un JAKi de 1^{ère} génération, avec un effet large de « pan-inhibiteur », et une spécificité plus importante pour JAK1 et JAK2, comme le baricitinib, qui, lui, a été positionné dans la prise en charge des maladies dysimmunes avec une AMM dans la PR (446), et un développement avancé dans le LES (447). Le ruxolitinib aurait même une affinité plus importante que le baricitinib pour TYK2, qui intervient notamment dans les voies de signalisation des IFNs de type 1 et de type 3. Ainsi, il existe plusieurs publications sur des utilisations hors AMM pour le ruxolitinib, notamment dans le lupus engelure (421), la PR (422), le psoriasis (423), la pelade (424,425) et le vitiligo (426). Aussi, une publication parue dans le *New England Journal of Medicine* en 2014 (420) a particulièrement attiré notre attention, puisque elle rapportait le cas d'une patiente atteinte de dermatomyosite réfractaire aux traitements habituels, ayant développé une authentique myélofibrose avec mutation de JAK2 V617F et pour qui du ruxolitinib a été débuté. Du fait d'une thrombopénie initiale, le traitement a été introduit à petite dose et progressivement augmenté, avec une bonne efficacité sur les signes généraux liés à la myélofibrose, sur les cytopénies, mais aussi sur la maladie musculaire inflammatoire associée, si bien que tous les autres immunomodulateurs (prednisone, mycophénolate mofétil et immunoglobulines intraveineuses) ont pu être arrêtés.

Nous rapportons ici un cas clinique assez proche, d'un patient atteint de syndrome de Sjögren séropositif (anticorps anti-Ro/SSA), avec une forme systémique sévère, associant des signes généraux, des adénopathies multiples, des sérites et une atteinte rénale glomérulaire avec insuffisance rénale associée. Il a aussi été diagnostiqué chez lui une myélofibrose, mais sans mutation (ni JAK2 ni une mutation plus rare recherchée sur un panel de gènes par NGS) en faveur du caractère clonal de la maladie hématologique. Le ruxolitinib a été introduit dans cette indication, et a, là aussi, permis de mettre la maladie dysimmune en rémission.

Il s'agit là, à notre connaissance, de la 1^{ère} observation clinique rapportant l'utilisation d'un JAKi dans le cadre du SjS, mais comme nous l'avons vu précédemment, la physiopathologie de la maladie, ainsi que les données *in vitro* et animales publiées récemment (458), laissent penser que les JAKi

pourraient constituer une option thérapeutique de choix dans cette maladie. Il faut d'ailleurs garder en tête, qu'en dehors de l'essai contrôlé randomisé ayant évalué l'HCQ (486,487), aucun autre traitement anti-IFN n'a été évalué dans le SjS chez l'Homme. Ainsi, ce *case report* représente une étape intéressante en faveur de l'intérêt des JAKi dans le SjS d'une part, mais aussi dans la prise en charge des myélofibroses auto-immunes d'autre part, et nous avons pour objectif de le publier dans une revue de langue anglaise en ciblant l'un ou l'autre aspect (*Arthritis & Rheumatology* ou *Blood*, idéalement).

Présentation du cas

Nous rapportons ici le cas d'un patient de 55 ans, pris en charge en Médecine Interne du fait d'un syndrome de Sjögren avec atteinte multisystémique associant une altération de l'état général, un syndrome sec oculaire et buccal, une atteinte pulmonaire parenchymateuse et des épanchements inflammatoires des séreuses, une myélofibrose avec une thrombopénie au premier plan, une insuffisance rénale sur néphropathie glomérulaire, une atteinte hépatique auto-immune, des adénopathies hypermétaboliques et un syndrome inflammatoire biologique.

Monsieur D. n'avait pas d'antécédent notable, en dehors d'une hypertension artérielle et d'une appendicectomie ancienne.

L'histoire médicale a débuté en mai 2018, avec des troubles digestifs peu spécifiques, ayant nécessité une hospitalisation de courte durée du fait d'une suspicion initiale d'occlusion intestinale, dont l'évolution a été favorable sous traitement médical seul.

Dans les suites, s'est installée l'altération de l'état général, d'aggravation progressive, avec asthénie et perte de poids associée à nouveau à des symptômes digestifs avec une gêne et une impression de gonflement abdominal.

Le patient a été vu en hépato-gastro-entérologie au CHU de Saint-Etienne en août 2018 pour bilan d'une hépatite (ASAT et ALAT à plus de 10 fois la normale initialement, puis cholestase importante), finalement étiquetée auto-immune devant la présence d'anticorps antinucléaires à 320, des IgG augmentées à 25 g/l, sans anticorps des hépatites auto-immunes initialement (mais avec des anticorps anti-Ro52 positifs), et avec une ponction biopsie hépatique qui retrouvait des lésions d'hépatite chronique d'activité marqué, avec un infiltrat à prédominance de plasmocytes et de polynucléaires éosinophiles, avec de nombreux septas fibreux équivalents à un score METAVIR F2-3. En l'absence de diagnostic étiologique formel, et du fait d'une amélioration des chiffres des enzymes hépatiques, le patient a été mis sous simple surveillance.

Devant la persistance de l'altération de l'état général, un PET scanner a été réalisé en Septembre 2018 et a permis la découverte d'une condensation pulmonaire du lobe inférieur droit, hypermétabolique (SUXmax à 5,1), au contact d'un épanchement pleural droit non hypermétabolique mais qui s'avèrera être exsudatif (protides >40g/l), avec 70% de macrophages et 20% de lymphocytes, ainsi que des adénopathies hypermétaboliques (SUVmax entre 3 et 5,7) surtout sus, mais aussi sous diaphragmatiques. Il y avait par ailleurs une hépatomégalie et une splénomégalie homogène à 15 cm, non hypermétabolique.

Au niveau biologique, un syndrome inflammatoire (jugé sur la CRP autour de 80 mg/l) est apparu, ainsi qu'une thrombopénie à 109 G/L, en revanche, les explorations réalisées afin d'éliminer une étiologie infectieuses (hémocultures, ETT, fibroscopie bronchique) sont toutes revenues normales.

Compte-tenu de l'aggravation des signes généraux, un complément de bilan a été organisé en Médecine Interne en Octobre 2018. Biologiquement, les transaminases s'étaient normalisées, mais il persistait une cholestase avec une bilirubine conjuguée un peu augmentée (sans obstacle ou autre anomalie en imagerie dédiée, y compris en IRM), et surtout, les cytopénies s'aggravaient (apparition d'une anémie à 11,5 g/dl arégénérative non carencielle, sans hypothyroïdie et aggravation de la thrombopénie à 70 G/l), le syndrome inflammatoire biologique persistait (CRP autour de 70 mg/l) et cliniquement, le patient présentait en plus une ascite de faible abondance avec une gêne abdominale permanente.

Concernant le diagnostic étiologique, les critères du consensus Americano-Européen (AECG) de 2002 étaient remplis pour poser le diagnostic de syndrome de Sjögren, devant :

- Un syndrome sec oculaire et buccal subjectif (mais avec un test de Schirmer et un débit salivaire normaux)
- Des anticorps anti-nucléaires à 320, d'aspect moucheté, avec des anti-ENA correspondant à des anticorps anti-Ro/SSA à 36 (N<10)
- Une biopsie des glandes salivaires accessoires montrant un stade III de Chisholm et Mason

Le reste du bilan biologique retrouvait des Facteurs Rhumatoïdes IgM à 15 UI/ml (N<3,5), sans anticorps anti-CCP, ni cryoglobulinémie et sans anomalie du complément. Le phénotypage lymphocytaire par cytométrie en flux retrouvait une tendance à la lymphopénie T CD4+ à 515/mm³ (N entre 606 et 1701), et la β 2-microglobuline était très augmentée à 8 mg/l (N<2,3). L'électrophorèse de protéines sériques était compatible avec le syndrome inflammatoire, et retrouvait une hypergammaglobulinémie polyclonale à 21,1 g/l (N entre 8 et 13,5 g/l) et le ratio Kappa/Lambda était normal. Il n'y avait, par ailleurs, pas de population clonale lymphoïde dans le sang, et pas d'argument pour une autre étiologie (notamment tuberculeuse avec un Quantiféron négatif).

Du fait des cytopénies, une exploration médullaire a été réalisée, avec une moelle cytologiquement pauvre, sans population anormale en cytométrie en flux.

Il a donc été décidé de faire pratiquer, en date du 5 octobre 2018, une thoracoscopie pour drainage et biopsies pleurales, biopsies ganglionnaires et biopsie ostéo-médullaire. A partir du 8 octobre 2019, le patient a été mis sous glucocorticoïdes par voie orale, à 1 mg/kg/jour, dans l'hypothèse d'une

poussée de maladie dysimmunitaire possiblement associée à un lymphome et dans l'attente des résultats anatomopathologiques. Cependant, les glucocorticoïdes n'ont pas eu d'effet significatif, ni cliniquement, ni biologiquement, avec la persistance du syndrome inflammatoire (CRP entre 40 et 50 mg/l), et même une aggravation, avec le temps, des plaintes cliniques (de l'asthénie en premier lieu), et surtout une aggravation progressive de l'atteinte hématologique, puisque l'anémie s'est aggravée jusqu'à 9,2 g/dl (sans cause surajoutée en dehors du syndrome inflammatoire) et les plaquettes sont descendues progressivement jusqu'à un nadir à 28 G/l le 22 octobre 2019.

Finalement, l'analyse anatomopathologique des tissus prélevés lors de la thoracoscopie n'a pas permis de faire avancer le diagnostic, retrouvant un faible infiltrat lymphoplasmocytaire pleural, sans atypie, avec une inflammation aspécifique, et au niveau ganglionnaire, essentiellement du tissu congestif avec des cellules lymphoïdes sans atypie.

En revanche, l'analyse de la biopsie ostéo-médullaire a permis de poser un diagnostic de syndrome myéloprolifératif à type de myélofibrose avec coloration à la réticuline correspondant à un stade 2 de l'OMS.

Le dossier de Monsieur D. a ainsi été présenté en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) d'hématologie, et il a été proposé, compte-tenu des plaintes avec des signes généraux au premier plan, de débiter un traitement par ruxolitinib, à la dose de 5 mg matin et soir (du fait des cytopénies) à partir du 23 octobre 2019, et de poursuivre la corticothérapie mais avec une posologie dégressive sur 3 mois. L'introduction de l'inhibiteur de JAK1/2 a permis une amélioration de l'état général, en particulier de l'asthénie, dès le lendemain de l'introduction, ce qui a permis de faire sortir le patient d'hospitalisation.

Concernant la suite de la prise en charge, dès le départ, l'origine auto-immune de la myélofibrose a été discutée, mais du fait du tableau sévère et du jeune âge du patient, une allogreffe a été envisagée par l'équipe d'hématologie, mais, finalement, l'absence de mutation JAK2 V617F ou d'une autre mutation évaluée par NGS (ASXL1, CALR, CSF3R, DNMT3A, EZH2, FLT3, GATA2, IDH1, IDH2, JAK2, KIT, KRAS, MPL, NPM1, NRAS, PTPN11, RUNX1, SETBP1, SF3B1, SRSF2, TET2, TP53, U2AF1, WT1), et le risque de complication majeur, les ont convaincu de sursoir à la greffe. Nous avons donc mis en place une surveillance régulière, en poursuivant le ruxolitinib à la même dose et en baissant progressivement les glucocorticoïdes.

Pendant les mois qui ont suivi, l'état clinique de Monsieur D. s'est stabilisé, mais dans un état non satisfaisant, avec la persistance d'un syndrome inflammatoire à bas bruit (20-40 mg/l de CRP), des cytopénies (plaquettes entre 25 et 35 G/L, hémoglobine autour de 9,5 g/dl), et surtout la survenue de multiples épisodes hémorragiques digestifs, en lien avec un ulcère gastrique.

Le bilan de réévaluation réalisé en Médecine Interne en février 2019 retrouvait par ailleurs un PET scanner plutôt superposable, en particulier en ce qui concerne les adénopathies, l'atteinte parenchymateuse pulmonaire, les épanchements pleuraux et l'épanchement péritonéal. L'analyse du liquide de ponction pleurale retrouvait toujours un exsudat. Concernant la recherche de maladie clonale lymphoïde, la β 2-microglobuline était toujours très élevée à 8,2 mg/l, et il n'y avait toujours pas de population clonale lymphoïde dans le sang, avec toutefois un répertoire appauvri. On peut aussi noter que le bilan auto-immun a permis de confirmer le caractère dysimmunitaire de l'atteinte hépatique, avec la positivité des anticorps anti-muscle lisse de spécificité anti-actine. En revanche, l'élément nouveau était que Monsieur D. commençait à présenter une aggravation de sa fonction rénale, avec une créatinine à 120 μ mol/l (alors qu'elle était normale, à 79 μ mol/l en août 2018), puis à 140 μ mol/l et l'apparition d'une protéinurie d'abord de rang tubulaire à 0,5 g/24H (avec une kaliurèse un peu augmentée, sans hypokaliémie, et sans autre anomalie ionique pour évoquer une acidose tubulaire) puis de rang glomérulaire, jusqu'à 2,6 g/24H, avec la présence de cylindres hématiques en cytologie. Malheureusement, du fait de la thrombopénie, la ponction biopsie rénale n'a pas pu être raisonnablement envisagée.

En revanche, le dossier a été rediscuté en réunion de concertation pluridisciplinaire, localement, mais aussi au niveau national (*via* la filière de santé des maladies auto-immunes et auto-inflammatoires rares), et il a été convenu qu'il fallait intensifier le traitement immunomodulateur de Monsieur D. Ainsi, la corticothérapie a été reprise à 1 mg/kg/jour (avec une décroissance sur 6 mois), et comme le ruxolitinib avait permis d'améliorer partiellement la symptomatologie initialement, nous avons pris l'option d'augmenter la posologie à 10 mg matin et soir, puis 15 mg matin et soir, plutôt que de modifier le traitement pour un immunosuppresseur plus classique (ce qui avait aussi été envisagé en RCP, sans trancher entre les deux approches), en surveillant très étroitement les cytopénies.

Ainsi, le ruxolitinib a été augmenté à 10 mg x2/j dès le 25 février 2019, ce qui a été suivi d'effets bénéfiques significatifs et rapides, puisque dans les 2 semaines, le syndrome inflammatoire persistant s'est normalisé, les plaquettes sont remontées à 54 G/l et l'hémoglobine a atteint 10,5 g/dl. La créatinine est redescendue à 100 μ mol/l en 1 mois, mais la protéinurie a mis plus de temps à

se normaliser. Fait encore plus notable, l'état général de Monsieur D n'a cessé de s'améliorer, avec disparition des épanchements des séreuses et de la gêne abdominale, et une reprise de poids.

Le ruxolitinib a finalement été augmenté à 15 mg matin et soir à partir du 3 mai 2019, sans aucun problème de tolérance. Environ 2 mois après (et 4 mois après l'augmentation à 10 mg x2/j), fin juin 2019, l'état général de Monsieur D était revenu à son état antérieur, si bien qu'il a pu reprendre son travail à mi-temps, et au niveau biologique, les plaquettes étaient à 80 G/l, l'hémoglobine à 11 g/dl, la CRP était toujours indosable et la β 2-microglobuline s'était aussi normalisée, tout comme les gammaglobulines (à 9,5 g/l).

A ce jour, le bénéfice du traitement semble se maintenir dans le temps, sans toutefois d'amélioration supplémentaire de la thrombopénie mais avec une normalisation de l'hémoglobine. Il n'y a par ailleurs pas eu de nouvelle manifestation clinique ou biologique, rénale, hépatique ou pulmonaire, et il est prévu que le patient soit réévalué de manière globale, y compris avec une nouvelle biopsie ostéo-médullaire, au mois d'octobre 2019. En fonction des résultats du bilan, il s'agira d'envisager une désescalade thérapeutique, sachant que maintenant que la maladie dysimmunitaire semble contrôlée, il se peut que le ruxolitinib soit lui-même à l'origine de la persistance de la thrombopénie, puisqu'il s'agit d'un effet indésirable classique de ce traitement (en inhibant l'action de certains facteurs de croissance, comme la thrombopoïétine).

Discussion

Il s'agit ici du premier cas décrit de syndrome de Sjögren traité par un JAKi, et du 3^{ème} cas de myélofibrose, en contexte dysimmun, traitée par ce genre de molécule (420,421). L'atteinte glandulaire de Monsieur D. n'a jamais été au premier plan, sans nécessité de traitement substitutif ou de sialagogue et avec des tests objectifs normaux (débit salivaire à 0,4 ml/min et test de Schirmer à 13 mm à droite et 15 mm à gauche), il est donc difficile de juger de l'effet du traitement sur cet aspect mais les données sur l'utilisation d'un anti-JAK1 chez l'animal laissent penser que cela pourrait être intéressant (518). En revanche, le ruxolitinib, lorsqu'il a été pris à bonne dose (à partir de 10mg x2/j), a permis de contrôler la maladie dysimmunitaire qui se présentait pourtant sous une forme systémique sévère. L'élément le plus notable de ce point de vue-là est probablement le bon contrôle de la maladie rénale avec atteinte glomérulaire, sans cryoglobulinémie. Il s'agit d'une atteinte systémique potentiellement sévère, dont la prise en charge n'est pas bien codifiée, mais qui relève en général d'un traitement par glucocorticoïdes associé à des immunosuppresseurs (et potentiellement du rituximab). Chez ce patient, on peut imaginer que les glucocorticoïdes ont contribué à l'amélioration clinico-biologique, mais il faut garder en tête qu'ils ont été utilisés seuls pendant les 2 premières semaines de la prise en charge, sans effet, alors que dans le même délai, lorsque le ruxolitinib a été augmenté à 10 mg x2/j, les effets positifs ont été très significatifs (disparition du syndrome inflammatoire, amélioration des cytopénies, amélioration de la créatininémie).

La myélofibrose auto-immune est une manifestation hématologique rare qui peut compliquer un certain nombre de maladies auto-immunes (519), et dont les critères diagnostiques ne sont pas clairement établis (520). Les deux éléments principaux du diagnostic étant 1) l'absence d'argument pour une origine clonale (et, en l'occurrence, l'absence de mutation somatique identifiée comme étant associée aux myélofibroses, comme c'était le cas ici) et 2) l'existence d'un contexte auto-immun. Il s'agit d'une forme de myélofibrose jugée de meilleur pronostic que lorsqu'il s'agit d'une maladie hématologique clonale, avec une possible réponse à la corticothérapie lorsqu'un traitement est indiqué, mais certaines formes peuvent nécessiter des immunosuppresseurs (comme pour notre patient), avec des modalités et un résultat variable (521,522). D'après l'analyse de la littérature, la majorité des cas de myélofibroses auto-immunes était associée au LES, à la PR ou aux cytopénies auto-immunes isolées (521,522). Il existe, tout de même, 2 cas publiés de SjS compliqués de myélofibrose (523,524), et les données préliminaires (non encore publiées) issues du registre national sur les myélofibroses auto-immunes coordonné par l'équipe du Pr Martin (centre de référence sur les maladies auto-immunes rares de Strasbourg) en comportent d'autres. Par ailleurs,

de manière concordante avec la littérature, il semble ressortir de ce registre que les myélofibroses auto-immunes seraient préférentiellement associées à des maladies IFN dépendantes. Chez notre patient, nous avons eu l'occasion d'évaluer la signature IFN, sur 6 gènes (IFIT1, ISG15, RSAD2, IFI27, SIGLEC1 et IFI44L), mais le patient était déjà sous ruxolitinib 5 mg x2/j lors du premier prélèvement. Nous avons ensuite répété les prélèvements après chaque augmentation de dose, mais la signature IFN est revenue négative à chaque fois. Il est donc assez difficile de conclure sur ce dernier point, il se peut que la faible dose de ruxolitinib ait suffi à négativer la signature moléculaire, alors même que le bénéfice clinique était modeste, mais comme la réponse au traitement est surtout apparu à partir de 10mg x2/j, on aimerait croire que, si l'hyperactivation de la voie des IFNs avait été un moteur important de la maladie de Monsieur D, la signature IFN aurait été encore positive à la plus faible dose de JAKi. Il faut donc imaginer que le traitement par anti-JAK1/2 a dû être efficace en agissant sur une autre voie de signalisation, comme la voie de l'IFN de type 2, celle de l'IL6 (525), ou encore celle de l'IL12 (463), qui ont toutes été impliquées dans la physiopathologie du SjS et sont inhibées par le ruxolitinib. Nous avons prévu de réaliser des dosages cytokiniques pour essayer d'étayer cette hypothèse.

Compte-tenu des voies de signalisation suspectes d'être impliquées dans le SjS, on peut par ailleurs remarquer que l'utilisation d'un JAKi ciblant JAK2, comme le ruxolitinib (choisi du fait de la présence d'une myélofibrose, ce qui correspond à l'AMM du médicament), ne serait pas forcément indispensable a priori, si ce n'est pour l'inhibition de l'IL12/23, et une molécule ciblant JAK1 pourrait être suffisante, comme cela a été fait chez la souris (526), et aurait peut-être moins de risque d'effet indésirable, notamment de cytopénie.

Concernant le reste du tableau clinique présenté par ce patient, il faut aussi savoir que les pleurésies sont particulièrement rares dans le SjS, avec tout de même quelques cas rapportés (527). Pour ce qui de l'ascite, il s'agit d'une manifestation encore plus rare (528), avec, à notre connaissance, un cas rapporté dans la littérature dans le cadre d'une entéropathie exsudative associée (529). Pendant un temps, la question s'est d'ailleurs posée d'attribuer l'ascite à de l'hypertension portale, du fait de l'atteinte hépatique avancée d'après la biopsie, mais les examens d'imagerie (notamment le doppler) n'apportaient pas beaucoup d'argument pour cela, le taux de protides dans le liquide d'ascite était plutôt élevé à 25,8 g/l, et surtout la disparition de l'épanchement après intensification du traitement immunomodulateur, laissent plutôt penser que l'origine de l'ascite était dysimmunitaire.

Ainsi, une autre interprétation diagnostique du tableau clinique de Monsieur D. serait d'en faire un syndrome TAFRO, pour Thrombocytopenia, Anasarca, Fever, Reticulin fibrosis and Organomegaly

(530). Il s'agit d'un syndrome rare, de description récente (531,532), essentiellement rapporté au Japon et initialement constaté en association, ou comme étant une forme sévère de maladie de Castleman multicentrique, négative pour l'Human Herpesvirus (533). Notre patient remplissait les critères diagnostiques proposés en 2015 pour le syndrome TAFRO (534), puisqu'il avait les 3 critères majeurs (épanchement pleuraux et ascite, thrombopénie ≤ 100 G/l, inflammation systémique avec CRP élevée) et 3 sur les 4 critères mineurs (myélofibrose avec fibrose réticulinique, hépatosplénomégalie et adénopathies de tailles modérées, insuffisance rénale d'aggravation progressive), à ceci près que les auteurs de ces critères précisait la nécessité d'exclure une maladie auto-immune sous-jacente, et que l'hypergammaglobulinémie y est théoriquement très rare. Un élément important (mais qui n'a été retenu que comme critère secondaire par les auteurs des critères diagnostiques) pour penser à ce diagnostic en pratique courante, reste l'examen anatomopathologique des adénopathies, qui évoque en général une maladie de Castleman. Dans notre cas, cet élément était absent, malgré la réalisation de biopsies ganglionnaires chirurgicales, sous réserve que les tissus semblaient être très congestifs, et donc difficilement analysables.

Il se trouve que le premier cas caucasien de syndrome TAFRO a été rapporté en 2014 et était associé à un SjS (535). Depuis, un cas japonais de SjS à début pédiatrique associé à un syndrome TAFRO a été décrit (536), et dans une série de 7 cas de maladie de Castleman multicentrique idiopathique (négatifs pour l'HHV8), 2 patients avaient un SjS associé (537). Les 2 patients identifiés comme ayant un syndrome TAFRO, comme Monsieur D., avaient une hypergammaglobulinémie, des auto-anticorps évocateurs ainsi qu'une biopsie des glandes salivaires compatible. Il est intéressant de noter que le cas japonais a été rapporté par l'équipe qui a le plus publié sur le sujet, et qui a proposé les critères diagnostiques de 2015, ainsi, le fait qu'il y avait un SjS associé ne leur a pas fait éliminer le diagnostic, mais leur a fait classer le tableau clinique comme syndrome *TAFRO-like* (536). Chez ces deux patients, les glucocorticoïdes ont été efficaces, sans nécessité d'avoir recours à un immunosuppresseur, ce qui n'a pas été suffisant dans notre cas. La prise en charge thérapeutique est d'ailleurs souvent complexe dans le syndrome de TAFRO, avec parfois des formes particulièrement sévères, un taux de réponse aux corticoïdes de l'ordre de 60%, des rechutes et une survie de 85% à deux ans (530). De nombreux traitements immunomodulateurs ont été utilisés, par analogie avec la maladie de Castleman, en particulier les anticorps monoclonaux anti-IL6 et anti-CD20, mais aussi des inhibiteurs de la calcineurine, des anti-IL1, voire même des protocoles de chimiothérapie. Les JAKi n'ont pas été utilisés à ce jour dans cette indication, mais comme l'action de nombreuses cytokines qui semblent être impliquées dans le syndrome TAFRO (530), peut être inhibée par ces molécules, cela semble être une option de choix. Dans le cas du ruxolitinib, l'inhibition de JAK1 permet d'agir sur

l'IL2, l'IL6, l'IFN γ (et donc CXCL10, qui semble être augmenté dans la maladie, en particulier à l'occasion des poussées (538)) et l'inhibition de JAK2 permet d'agir sur l'IL6, l'IL23 et l'IFN γ . Concernant le VEGF, ce facteur de croissance n'utilise pas le système JAK/STAT pour transmettre son signal, en revanche, certaines cytokine qui stimulent sa production via STAT3 (539), en dépendent.

Quel que soit le cadre nosologique dans lequel nous nous situons, il existe des données pour soutenir l'utilisation des JAKi dans le SJS avec atteinte systémique, y compris dans certaines formes particulièrement rares et sévères de la maladie, comme l'illustre le cas de notre patient.

Discussion générale

Durant mon travail de thèse, nous nous sommes donc particulièrement intéressés aux IFNs, et à leurs implications dans le cadre des maladies auto-immunes, en particulier dans le SjS.

Bien que cette famille de molécules ait été identifiée en 1957, que beaucoup considèrent qu'il s'agit des premières cytokines décrites, et que leur très probable rôle dans les maladies auto-immunes systémiques est évoqué depuis 1981, il est assez fascinant de voir qu'aucun traitement ciblé contre l'un des IFNs n'a d'AMM à ce jour. Cela est probablement lié à la grande complexité du système des IFNs dont j'ai essayé de donner un aperçu en préambule de cette thèse, avec un très grand nombre d'inducteurs/intermédiaires de signalisation/gènes cibles/mécanismes de régulation, rendant chaque situation unique, nécessitant d'extrapoler les données *in vitro* avec la plus grande prudence, et expliquant parfois l'obtention de résultats, en apparence, contradictoires (50,304). On peut par ailleurs imaginer assez facilement que les effets pléiotropes des IFNs, à la fois anti-infectieux mais aussi anti-tumoraux, aient pu freiner le développement des traitements anti-IFN.

Quant au SjS, finalement, sa place au sein des connectivites ressemble un peu à celle des IFNs parmi les cytokines. La maladie est connue en tant que telle depuis 1933 (avec une première description probable par Mikulicz en 1888, et une série de quelques cas décrit dès 1925 par le français Gougerot). Il s'agit de la 2^{ème} maladie auto-immune systémique la plus fréquente (540), elle peut être présente en association avec de nombreuses autres maladies auto-immunes, et pourtant, il n'existe à ce jour aucun traitement étiologique validé. Cela dit, il y a eu et il y a encore de nombreux essais cliniques, même si le SjS « souffre » de sa réputation de maladie bénigne, la majorité, si ce n'est la totalité des essais cliniques menés, concernent d'ailleurs des molécules développées initialement dans d'autres pathologies, et il n'y a, par exemple, aucun essai clinique évaluant l'un des anti-IFN α dans cette indication. Aussi, comme pour les IFNs, la complexité de la physiopathologie du SjS (175) et la grande hétérogénéité des patients, sont probablement des freins importants à la conduite d'essais thérapeutiques. Il y a d'ailleurs eu, et il y a encore, beaucoup de discussions autour du type de patients à inclure dans les essais cliniques, ainsi que des critères d'évaluation les plus adaptés (541).

En premier lieu, nous avons évalué une stratégie de vaccination thérapeutique anti-IFN α , l'IFN-K, dans un modèle murin reconnu de SjS, le modèle MRL/lpr. Le vaccin a permis d'induire la production d'anticorps neutralisants, avec un avantage clair, en termes de neutralisation et de réduction de la signature IFN, pour l'un des deux adjuvants utilisés, le SWE01, qui est proche du MF59. En revanche, concernant l'effet sur la maladie, le traitement, quel que soit l'adjuvant utilisé, a permis d'améliorer

significativement le débit salivaire et la production lacrymal, avec un effet concordant au niveau histologique (plus marqué avec le SWE01), et a aussi eu un effet bénéfique franc sur la neuropathie périphérique *via* deux tests bien validés dans la littérature. En revanche, les autres atteintes évaluées, à savoir l'atteinte pulmonaire histologique et l'atteinte neurologique centrale, n'ont pas été améliorées par l'IFN-K.

Notre essai préclinique avec le modèle MRL/lpr pose d'abord de nombreuses questions, notamment celle de la reproductibilité des effets du traitement en utilisant, en 1^{er} lieu, d'autres modèles animaux de SjS. Evidemment, aucun résultat chez l'animal ne permet de garantir une extrapolation chez l'Homme, mais il est certain que des résultats encourageants, dans plusieurs études et avec plusieurs modèles, sont de meilleur augure. Nous avons donc décidé, assez rapidement, d'évaluer l'IFN-K dans un modèle qui nous paraissait particulièrement intéressant dans la maladie, le modèle transgénique pour l'IL14 α humaine (IL14Tg), qui permettait d'essayer de confirmer nos résultats et d'avoir une idée de l'impact éventuel de l'inhibition de la voie de l'IFN α sur la principale complication de la maladie, le lymphome. En effet, comme nous l'avons évoqué dans la lettre publiée dans *Journal of Rheumatology* et présentée dans cette thèse, le choix du modèle est toujours une question centrale pour évaluer un nouveau traitement, mais en même temps, c'est aussi une question particulièrement complexe à trancher lorsqu'aucun modèle ne reproduit parfaitement l'ensemble des aspects de la maladie considérée. Comme nous avons pu le voir en introduction (et encore, nous n'avons exposé que l'aspect IFN-dépendant des maladies auto-immunes), dans le cas du SjS, et des maladies auto-immunes systémiques en général, la physiopathologie est tellement complexe et vraisemblablement variable d'un groupe de patients à l'autre, que les modèles murins disponibles sont forcément insuffisants. En l'espèce, la problématique liée au caractère soi-disant primitif ou secondaire du SjS vient encore compliquer la chose, et cela a été une problématique systématiquement relevée lors du processus de publication de nos résultats alors même que, du propre aveu de son inventeur, le concept a été très abusivement utilisé par rapport à sa description initiale (489,509). Le modèle MRL/lpr est aussi reconnu comme étant un modèle de LES (542), alors que les atteintes glomérulaire et neurologique centrales sont effectivement plus fréquentes dans le LES, mais ne sont pas absentes du SjS, et ce modèle présente par ailleurs de nombreuses caractéristiques clinico-biologiques de la forme systémique de la maladie. Nous avons par ailleurs montré que l'atteinte glandulaire, mais aussi l'atteinte neurologique périphérique, étaient, au moins en partie, dépendantes de l'IFN α , alors que les données disponibles jusqu'à présent sur « l'IFN-dépendance » de ce modèle sont présentes (502–505,507,508), mais parfois contradictoires (506), et concernent aussi bien l'IFN α que l'IFN γ (543,544). Une des explications pourrait être que, comme

pour le SjS, les deux types d'IFNs soient impliqués, d'ailleurs, une étude récente avec un JAKi (le tofacitinib) a obtenu de bons résultats avec le modèle MRL/lpr (431), mais les auteurs n'ont évalué que les atteintes rénale et cutanée.

Dans notre étude, nous n'avons pas constaté d'effet bénéfique ni sur l'atteinte pulmonaire (mais qui n'a été évaluée qu'histologiquement), ni sur l'atteinte neurologique centrale, et il se peut, là aussi, que l'inhibition limitée à l'IFN α , n'ait pas permis une amélioration significative de ces manifestations. Malheureusement, les études utilisant des souris KO pour l'IFNAR (506), l'IRF5 (507) ou l'IFNGR (506) n'ont pas étudié cet aspect-là de la maladie, idem pour les essais précliniques avec l'anticorps monoclonal anti-IFNAR (508) ou avec le tofacitinib (431). Il se peut aussi que le rôle de certaines voies cellulaires soit variable selon les tissus, puisqu'il existe une étude préclinique rapportant une amélioration de l'atteinte pulmonaire du modèle MRL/lpr suite à un traitement par anti-TNF α , qui n'avait pas d'effet sur les autres manifestations, en particulier sur l'atteinte rénale (545). Alors que le rôle délétère de l'IFN α a été mis en évidence récemment concernant l'atteinte neurologique centrale dans le modèle murin NZB/NZW (546), un essai préclinique a évalué l'efficacité d'un anticorps monoclonal anti-IFNAR sur ce type d'atteinte dans le modèle MRL/lpr, avec les mêmes résultats que les nôtres (547). Il faut aussi garder en tête que les tests comportementaux utilisés pour évaluer l'atteinte neuropsychiatrique chez la souris sont complexes et sujets à de nombreux facteurs confondants (542), mais les auteurs de l'essai préclinique sur l'anticorps anti-IFNAR ont aussi montré l'absence d'amélioration histologique (lésions cérébrales, infiltrats cellulaires inflammatoires et atteinte de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique), alors même que l'expression d'IFIT1 était réduite au niveau cérébral après traitement (547).

Concernant l'atteinte rénale, nous n'avons pas constaté de différence significative quant à la protéinurie entre les groupes (ce qui est aussi concordant avec les résultats de l'essai évaluant l'anticorps anti-IFNAR dans le modèle MRL/lpr (547)), mais l'atteinte rénale était modérée dans notre étude, d'ailleurs, en ce qui concerne l'analyse histologique, les reins qui ont pu être examinés, au laboratoire et par l'anatomopathologiste référente en histologie rénale du CHU de Saint-Etienne, ne présentaient pas d'atteinte significative. Malheureusement, pour des raisons techniques, les reins des souris décédés durant le protocole, qui étaient probablement plus atteints, n'ont pas pu être examinés. Par ailleurs, comme l'étude a été mise au point avec comme objectif l'analyse des symptômes en lien avec le SjS, et pas par rapport à l'atteinte rénale, il se peut que la mise à mort des souris ait été trop précoce pour évaluer cela. Les données collectées par le Jackson Laboratory vont dans ce sens puisqu'elles font état d'une atteinte rénale significative entre 4 et 7 mois, alors que notre étude s'est arrêtée à 6 mois. Enfin, il faut savoir que le modèle MRL/lpr est connu pour avoir déjà présenté une atténuation de son phénotype, si bien qu'en juillet 2007, l'élevage du Jackson

Laboratory a dû être renouvelé à partir d'embryons congelés. Il se peut que nos souris aient présenté le même genre de problème concernant l'atteinte rénale (pour le Jackson Laboratory, c'était la lymphoprolifération qui était moins importante), comme elles étaient issues d'un élevage hébergé dans notre animalerie, mais aucune autre atteinte ne semblait être différente de ce qui était attendu.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, afin de confirmer nos résultats dans un autre modèle de SjS, nous avons décidé de poursuivre les essais précliniques avec l'IFN-K dans le modèle IL14Tg. Ce modèle a été mis au point par l'équipe du Pr Julian Ambrus à Buffalo, sur un fond génétique de C57Bl/6, en utilisant un vecteur permettant l'expression de l'IL14 humaine au niveau des lymphocytes B murins. Ainsi, le phénotype développé par ces souris est celui d'un tableau de SjS proche de la pathologie humaine, avec des anomalies immunologiques apparaissant dès 3 mois de vie (hypergammaglobulinémie polyclonale, auto-anticorps anti-Ro/SSA et La/SSB, ainsi que des auto-anticorps plus rares), une diminution du débit salivaire dès 6 mois, puis une infiltration lymphoïde des glandes sous-mandibulaires dès 9 mois, des glandes parotides et lacrymales dès 10 mois, et, à partir de 12 mois, ces souris développent une atteinte systémique, avec des manifestations pulmonaire (pneumopathie interstitielle avec infiltrat lymphocytaire) et rénale (avec surtout une protéinurie, sans insuffisance rénale, correspondant à une atteinte mésangiale), et, à terme, hématologique maligne (avec presque 100% de lymphome B diffus à grandes cellules à 18 mois) (548,549). Il y a par ailleurs des données en faveur de l'IFN-dépendance de ce modèle murin, avec des taux élevés d'IFN α (et pas d'IFN β ou d'IFN γ) dans le sang (548), et une amélioration du tableau clinique chez des souris IL14Tg KO pour l'IFNAR (550).

Nous avons pu nous procurer, à travers une collaboration avec l'équipe du Pr Ambrus, deux couples de souris IL14Tg et mettre en place cet élevage dans notre animalerie. Après avoir confirmé la présence du transgène au fil des générations, et étudié le phénotype naturel de ces souris, nous avons pu débiter des expérimentations préliminaires.

Nous avons malheureusement été confrontés à des problèmes pour la réalisation du couplage pour la fabrication de l'IFN-K. En effet, pour diverses raisons, les priorités à court terme de NEOVACS n'étaient pas de poursuivre l'évaluation de l'IFN-K dans le SjS, et la production de l'IFN-K n'a pas pu être faite au sein de leur laboratoire. Or, n'ayant pas le support technique ni les procédés exacts nécessaires à la mise au point du vaccin dans notre laboratoire, nous avons dû opter pour un kit de couplage disponible dans le commerce (kit de conjugaison KLH Imject [Fisher Scientific]), utilisant les groupements amines pour la liaison à la KLH. Après essais de 2 ratios IFN α :KLH différents (1:1 puis 2:1) pour le couplage et une évaluation de l'immunogénicité du vaccin dans un groupe de 5 souris IL14Tg, après 3 injections (J0, J7, J28) d'IFN-K formulé dans du SWE01, nous avons débuté les

expérimentations avec les souris IL14Tg prévues pour le protocole, soit un total de 47 souris, réparties en 6 groupes individus (PBS i.m. et sublingual [s.l.], KLH i.m. et s.l., et IFN-K i.m. et s.l.) de 7 ou 8 individus. Les souris ont été vaccinées à partir de 7 mois de vie (administrations à J0, J7, J28, J56, J84, J168) et suivies pendant 1 an, avec des prélèvements sanguins itératifs, et des évaluations de la fonction glandulaire (salivaire et lacrymale) avant traitement, à 6 mois et à 12 mois de suivi. A la fin du protocole, toutes les souris ont été mise à mort pour analyse histologique des organes cibles (glandes salivaires et lacrymales, poumons, reins, rate, adénopathies ± masse suspecte de lymphome).

Malheureusement, l'immunogénicité du vaccin était bien plus faible que ce qui avait été observé précédemment (par NEOVACS et dans notre étude sur le modèle MRL/lpr), probablement du fait de problèmes de couplage que nous sommes en train d'évaluer, mais qui découleraient possiblement du fait que les 5 cystéines (porteuses des groupements amines) de l'IFN α 3 murin sont impliquées dans deux liaisons pour 4 d'entre elles, ou enfouies pour la dernière.

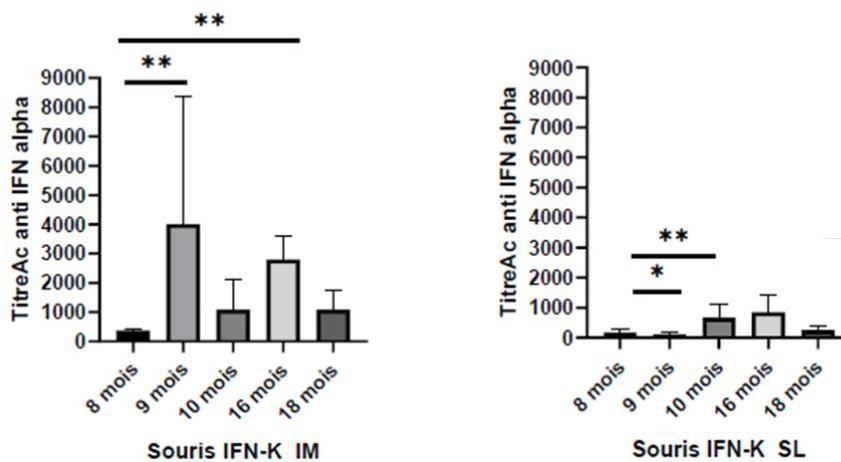


Figure 33. Titre des anticorps (dernière dilution positive avec un seuil déterminé comme la moyenne des densités optiques observées chez des souris pré-morbides + 2 déviations standards) anti-IFN α induits par IFN-K par voie IM ou SL, en fonction de l'âge des souris.

De manière assez logique, les résultats des évaluations salivaire et lacrymale n'ont pas montré de différence significative entre les groupes.

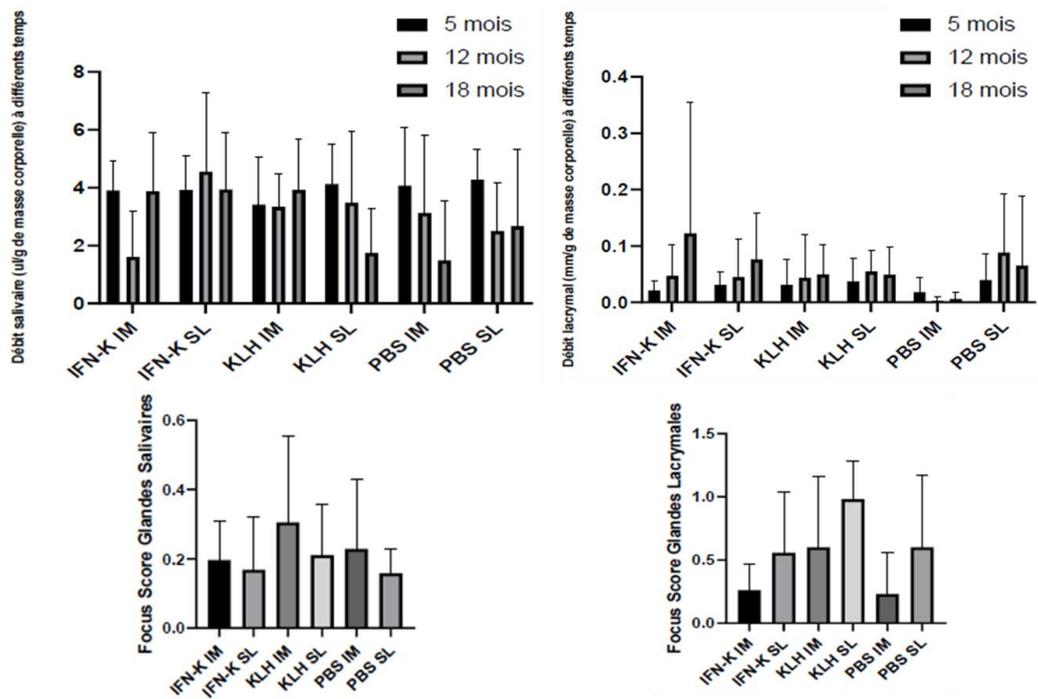


Figure 34. Analyse fonctionnelle (débits salivaire et lacrymal) longitudinale et histologique (focus score) à 18 mois, de l'atteinte glandulaire selon les différents groupes de l'étude, traités (IFN-K IM et SL) ou contrôles (KLH IM et SL, PBS IM et SL)

En ce qui concerne la survie, une tendance a été observée pour les groupes traités, qu'il faudra interpréter en fonction des résultats des analyses histologiques à la recherche de lymphomes.

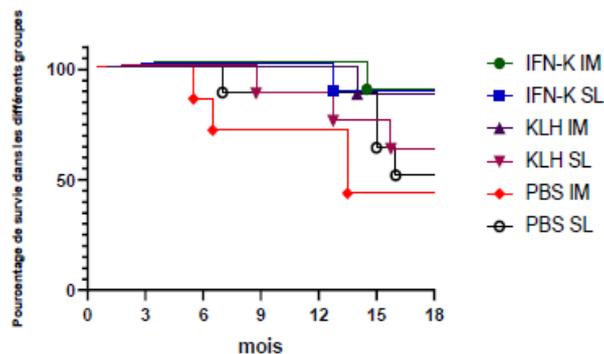


Figure 35. Analyse de la survie selon les différents groupes de l'étude, traités (IFN-K IM et SL) ou contrôles (KLH IM et SL, PBS IM et SL)

Les analyse complémentaires (couplage, atteintes rénale et pulmonaire, lymphome) et surtout, de nouveaux essais sont en cours d'élaboration avec NEOVACS, mais comme le développement de l'IFN-K dans le SjS n'est pas une priorité pour eux, nous envisageons aussi d'autres stratégies thérapeutiques, comme l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-IFN α , d'un inhibiteur de JAK

voire même d'une stratégie diététique innovante dite de « régime mimant le jeûne » qui a pu être utilisée dans la SEP et a montré des propriétés immunomodulatrices intéressantes (551).

Enfin, l'une des questions que posent les résultats obtenus avec notre essai préclinique dans le modèle MRL/lpr, est de savoir par quel mécanisme fonctionne l'effet bénéfique observé dans le groupe traité par l'ISA51/IFN-K. En effet, les titres d'anticorps anti-IFN α étaient élevés dans ce groupe, en revanche, la capacité de neutralisation était bien moins importante que dans le groupe SWE01/IFN-K, avec un effet concordant sur la signature IFN, mais tout de même des effets bénéfiques sur les manifestations de la maladie. Comme l'IFN α est capable d'avoir des effets biologiques à des concentrations faibles, nous pensons que le pouvoir neutralisant des anticorps anti-IFN α induits par l'ISA51/IFN-K, même modéré, a pu être suffisant pour induire les effets bénéfiques observés, qui étaient logiquement moins marqués que ceux observés avec le SWE01/IFN-K. Enfin, il est toujours possible qu'une partie des effets du vaccin passe par d'autres mécanismes que la neutralisation, comme cela a pu être montré dans d'autres situations avec des anticorps capables induisant un haut niveau de cytotoxicité dépendante des anticorps (552).

Au-delà de ces problématiques, on peut tout même considérer que les résultats de cette étude préclinique plaident pour l'intérêt d'évaluer, chez l'Homme, un traitement anti-IFN α dans le SjS, et plus vraisemblablement un traitement avec une action assez large, sur au moins tous les sous-types d'IFN α , comme l'IFN-K. Cela-dit, il est possible qu'une neutralisation de l'ensemble des IFNs de type 1, en particulier de l'IFN β , soit plus efficace, et il reste possible qu'il faille, au moins dans certaines situations (en cas d'atteinte systémique sévère par exemple), aller au-delà, compte-tenu du rôle important que semble avoir l'IFN γ dans le SjS, sans parler des autres voies de signalisation impliquées (175,463,525). Evidemment, le fait de cibler de nombreuses cytokines importantes dans la machinerie cellulaire et les défenses immunitaires, pose la question de la tolérance de ce genre de traitement, mais pour l'instant, les données disponibles concernant l'IFN-K ainsi que les anticorps monoclonaux anti-IFN sont plutôt rassurantes, y compris pour l'anifrolumab qui inhibe l'action de tous les IFNs de type 1, avec essentiellement un sur-risque d'herpès et de zona (382). Comme nous l'avons vu précédemment, les données concernant les anticorps monoclonaux anti-IFN γ ne sont pas particulièrement préoccupantes, mais représentent un nombre bien plus limité de patients, et surtout, les résultats des essais cliniques, et l'utilisation en routine des 3 JAKi ayant déjà une AMM n'ont pas soulevé de problème de sécurité majeur.

Le fait que ces traitements, dont l'action est tout de même très large, soient bien tolérés, ouvre la porte à l'utilisation de JAKi dans le SjS, comme nous l'avons montré au travers du cas clinique de

Monsieur D. Dans ce cas précis, et dans les formes systémiques de SjS, la sévérité de l'atteinte fait de toute façon discuter l'utilisation d'un immunomodulateur, donc possiblement un JAKi, mais on peut même imaginer utiliser ce genre de médicament dans certaines formes glandulaires sévères, en particulier avec la mise au point de formes topiques, en collyre (comme cela a été fait pour le tofacitinib, mais avec un essai clinique dans le syndrome sec oculaire, avec finalement très peu de patients atteints de SjS étudiés), et pourquoi pas en utilisant les crèmes en cours de développement, mais avec des applications intrabuccales, pour cibler le syndrome sec oral.

Dans la même dynamique, il faut savoir que la technologie kinoïde permet théoriquement de mettre au point un vaccin multivalent, ciblant plusieurs cytokines à la fois, comme NEOVACS semble l'avoir fait récemment dans le domaine de l'allergie, en ciblant l'IL4 et l'IL13 (les résultats précliniques ont été présentés à des congrès en mai et juin 2019, mais n'ont pas encore été publiés). Ainsi, on peut par exemple imaginer la mise au point d'un kinoïde anti-IFN α et anti-IFN γ , pour cibler ces deux voies majeures dans le SjS. On pourrait même imaginer des stratégies encore plus innovantes, en ciblant, en plus des cytokines d'intérêt pour l'aspect thérapeutique, un ou plusieurs antigènes viraux, par exemple de VZV (compte-tenu du sur-risque lié à l'inhibition de l'IFN α), pour limiter de manière intrinsèque le risque d'effet indésirable du traitement.

Evidemment, quel que soit la stratégie thérapeutique choisie à l'avenir, il faudra, même si les données actuellement disponibles sont rassurantes, assurer un suivi rigoureux au long cours, notamment vis-à-vis du risque théorique de survenue de cancer lié à l'inhibition des IFNs. Ce suivi est indispensable pour évaluer la sécurité de ces médicaments, mais il y a aussi un intérêt très vraisemblable à leur suivi, basé sur des dosages pharmacologiques, pour optimiser leur efficacité, comme notre équipe l'a montré dans plusieurs publications avec les anticorps monoclonaux anti-TNF α (553–555), et je suis moi-même directeur scientifique d'un essai clinique en cours, sur le monitoring du rituximab (identifiant sur ClinicalTrials.gov : NCT02474888). Enfin, toutes les publications, en particulier les plus récentes, sur le raffinement de la signature IFN, ou plutôt des signatures IFNs (de type 1, de type 2, et pourquoi pas de type 3), laissent penser qu'il pourrait s'agir, à l'avenir, d'un outil particulièrement utile, en pré-thérapeutique, pour mieux caractériser la maladie de chaque patient, dans le sang, mais aussi les tissus cibles (dans les glandes salivaires accessoires et pourquoi pas, avec une empreinte cornéenne, dans le SjS), et cibler la ou les voies de signalisation les plus activées. D'autres types de biomarqueurs plus « simples » sont, ou seront, probablement très intéressants à ce titre, comme certaines publications ont essayé de le démontrer avec MxA ou SIGLEC1, et comme nous cherchons à le faire avec notre essai « I GET DRY » (NCT03003572) et les immunoglobulines E anti-Ro60.

Pour conclure, en décidant de m'intéresser à l'IFN α dans une maladie systémique comme le syndrome de Sjögren, qui donne souvent l'impression d'être un peu le parent pauvre des maladies auto-immunes systémiques, laissant souvent médecins et malades sans solution thérapeutique satisfaisante, j'ai pu contribuer, à mon niveau, au développement d'une piste de traitement de traitement potentiel qui a montré des résultats encourageants chez l'animal. Mais ce travail de thèse m'a surtout permis de me rendre pleinement compte de la grande complexité de cette maladie et de l'hétérogénéité des patients, qui sont deux éléments qui peuvent vraisemblablement expliquer l'essentiel des échecs de tous les essais cliniques menés jusqu'à présent. Ainsi, à l'avenir, il s'agira d'essayer de mieux caractériser les patients, et les modèles pour les étudier, dans une logique de médecine personnalisée, pour pouvoir proposer des thérapeutiques ciblées, ou multimodales, mais adaptées à chaque situation.

Bibliographie

1. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1957 Sep 12;147(927):258–67.
2. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev.* 2004 Dec 1;202(1):8–32.
3. Muskardin TLW, Niewold TB. Type I interferon in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2018 Apr;14(4):214–28.
4. Crow YJ, Manel N. Aicardi-Goutières syndrome and the type I interferonopathies. *Nat Rev Immunol.* 2015 Jul;15(7):429–40.
5. Pestka S. The human interferons--from protein purification and sequence to cloning and expression in bacteria: before, between, and beyond. *Arch Biochem Biophys.* 1983 Feb 15;221(1):1–37.
6. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:227–64.
7. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2015 Aug;15(8):471–85.
8. Walter MR. Structural Analysis of IL-10 and Type I Interferon Family Members and their Complexes with Receptor. In: *Advances in Protein Chemistry [Internet]. Academic Press; 2004 [cited 2019 Aug 6]. p. 171–223. (Cell Surface Receptors; vol. 68). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065323304680065>*
9. Baccala R, Hoebe K, Kono DH, Beutler B, Theofilopoulos AN. TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat Med.* 2007 May;13(5):543–51.
10. Thomas C, Moraga I, Levin D, Krutzik PO, Podoplelova Y, Trejo A, et al. Structural linkage between ligand discrimination and receptor activation by type I interferons. *Cell.* 2011 Aug 19;146(4):621–32.
11. Lee AJ, Ashkar AA. The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. *Front Immunol [Internet].* 2018 Sep 11 [cited 2019 Aug 8];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6141705/>
12. Teijaro JR, Ng C, Lee AM, Sullivan BM, Sheehan KCF, Welch M, et al. Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science.* 2013 Apr 12;340(6129):207–11.
13. Pontiroli F, Dussurget O, Zanoni I, Urbano M, Beretta O, Granucci F, et al. The timing of IFN β production affects early innate responses to *Listeria monocytogenes* and determines the overall outcome of lethal infection. *PLoS One.* 2012;7(8):e43455.
14. Miyagi T, Gil MP, Wang X, Louten J, Chu W-M, Biron CA. High basal STAT4 balanced by STAT1 induction to control type 1 interferon effects in natural killer cells. *J Exp Med.* 2007 Oct 1;204(10):2383–96.
15. Harris BD, Schreiter J, Chevrier M, Jordan JL, Walter MR. Human interferon- ϵ and interferon- κ exhibit low potency and low affinity for cell-surface IFNAR and the poxvirus antagonist B18R. *J Biol Chem.* 2018 Dec 10;293(41):16057–68.
16. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010 May;11(5):373–84.
17. Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol.* 2006 Nov;6(11):823–35.
18. Theofilopoulos AN. TLRs and IFNs: critical pieces of the autoimmunity puzzle. *J Clin Invest.* 2012 Oct;122(10):3464–6.
19. Kono DH, Baccala R, Theofilopoulos AN. TLRs and interferons: a central paradigm in autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2013 Dec;25(6):720–7.

20. Crow MK, Ronnblom L. Type I interferons in host defence and inflammatory diseases. *Lupus Sci Med* [Internet]. 2019 [cited 2019 Aug 6];6(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6541752/>
21. Zhang S-Y, Jouanguy E, Ugolini S, Smahi A, Elain G, Romero P, et al. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science*. 2007 Sep 14;317(5844):1522–7.
22. Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, et al. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 9;101(10):3516–21.
23. Coban C, Igari Y, Yagi M, Reimer T, Koyama S, Aoshi T, et al. Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9. *Cell Host Microbe*. 2010 Jan 21;7(1):50–61.
24. Bruns AM, Horvath CM. LGP2 Synergy with MDA5 in RLR-Mediated RNA Recognition and Antiviral Signaling. *Cytokine*. 2015 Aug;74(2):198–206.
25. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science*. 2013 Feb 15;339(6121):786–91.
26. Chen Q, Sun L, Chen ZJ. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat Immunol*. 2016 20;17(10):1142–9.
27. Paludan SR, Bowie AG. Immune sensing of DNA. *Immunity*. 2013 May 23;38(5):870–80.
28. Yarilina A, Park-Min K-H, Antoniv T, Hu X, Ivashkiv LB. TNF activates an IRF1-dependent autocrine loop leading to sustained expression of chemokines and STAT1-dependent type I interferon-response genes. *Nat Immunol*. 2008 Apr;9(4):378–87.
29. Fink K, Martin L, Mukawera E, Chartier S, De Deken X, Brochiero E, et al. IFN β /TNF α synergism induces a non-canonical STAT2/IRF9-dependent pathway triggering a novel DUOX2 NADPH oxidase-mediated airway antiviral response. *Cell Res*. 2013 May;23(5):673–90.
30. Park SH, Kang K, Giannopoulou E, Qiao Y, Kang K, Kim G, et al. Type I interferons and the cytokine TNF cooperatively reprogram the macrophage epigenome to promote inflammatory activation. *Nat Immunol*. 2017 Oct;18(10):1104–16.
31. Platanias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol*. 2005 May;5(5):375–86.
32. Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol*. 2014 Jan;14(1):36–49.
33. Hervas-Stubbs S, Perez-Gracia JL, Rouzaut A, Sanmamed MF, Le Bon A, Melero I. Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2011 May 1;17(9):2619–27.
34. Pestka S. The human interferon alpha species and receptors. *Biopolymers*. 2000;55(4):254–87.
35. Radhakrishnan R, Walter LJ, Hruza A, Reichert P, Trotta PP, Nagabhushan TL, et al. Zinc mediated dimer of human interferon-alpha 2b revealed by X-ray crystallography. *Struct Lond Engl* 1993. 1996 Dec 15;4(12):1453–63.
36. Karpusas M, Nolte M, Benton CB, Meier W, Lipscomb WN, Goelz S. The crystal structure of human interferon beta at 2.2-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Oct 28;94(22):11813–8.
37. Garcin G, Bordat Y, Chuchana P, Monneron D, Law HKW, Piehler J, et al. Differential activity of type I interferon subtypes for dendritic cell differentiation. *PLoS One*. 2013;8(3):e58465.
38. Schreiber G. The molecular basis for differential type I interferon signaling. *J Biol Chem*. 2017 05;292(18):7285–94.
39. van Pesch V, Lanaya H, Renaud J-C, Michiels T. Characterization of the Murine Alpha Interferon Gene Family. *J Virol*. 2004 Aug;78(15):8219–28.
40. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med*. 1999 Aug;5(8):919–23.

41. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*. 1999 Jun 11;284(5421):1835–7.
42. Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, Durand I, Yessaad N, Dezutter-Dambuyant C, et al. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol*. 2001 Dec;2(12):1144–50.
43. Nakano H, Yanagita M, Gunn MD. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med*. 2001 Oct 15;194(8):1171–8.
44. Wang Y, Swiecki M, McCartney SA, Colonna M. dsRNA sensors and plasmacytoid dendritic cells in host defense and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2011 Sep;243(1):74–90.
45. Antonelli G, Scagnolari C, Moschella F, Proietti E. Twenty-five years of type I interferon-based treatment: a critical analysis of its therapeutic use. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015 Apr;26(2):121–31.
46. Gough DJ, Messina NL, Clarke CJP, Johnstone RW, Levy DE. Constitutive type I interferon modulates homeostatic balance through tonic signaling. *Immunity*. 2012 Feb 24;36(2):166–74.
47. Cheon H, Borden EC, Stark GR. Interferons and their stimulated genes in the tumor microenvironment. *Semin Oncol*. 2014 Apr;41(2):156–73.
48. de Weerd NA, Vivian JP, Nguyen TK, Mangan NE, Gould JA, Braniff S-J, et al. Structural basis of a unique interferon- β signaling axis mediated via the receptor IFNAR1. *Nat Immunol*. 2013 Sep;14(9):901–7.
49. Kaur S, Platanias LC. IFN- β -specific signaling via a unique IFNAR1 interaction. *Nat Immunol*. 2013 Sep;14(9):884–5.
50. Mavragani CP, La DT, Stohl W, Crow MK. Association between the response to TNF-antagonists and plasma type I interferon activity and interferon-beta/alpha ratios in rheumatoid arthritis patients: a post-hoc analysis of a predominantly Hispanic Cohort. *Arthritis Rheum*. 2010 Feb;62(2):392.
51. de Jong TD, Vosslamber S, Mantel E, de Ridder S, Wesseling JG, van der Pouw Kraan TCTM, et al. Physiological evidence for diversification of IFN α - and IFN β -mediated response programs in different autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther*. 2016 Feb 17;18:49.
52. Majoros A, Platanitis E, Kernbauer-Hözl E, Rosebrock F, Müller M, Decker T. Canonical and Non-Canonical Aspects of JAK-STAT Signaling: Lessons from Interferons for Cytokine Responses. *Front Immunol*. 2017;8:29.
53. Platanitis E, Demiroz D, Schneller A, Fischer K, Capelle C, Hartl M, et al. A molecular switch from STAT2-IRF9 to ISGF3 underlies interferon-induced gene transcription. *Nat Commun [Internet]*. 2019 Jul 2 [cited 2019 Aug 9];10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6606597/>
54. Mark DF, Lu SD, Creasey AA, Yamamoto R, Lin LS. Site-specific mutagenesis of the human fibroblast interferon gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Sep;81(18):5662–6.
55. Rommer PS, Milo R, Han MH, Satyanarayan S, Sellner J, Hauer L, et al. Immunological Aspects of Approved MS Therapeutics. *Front Immunol*. 2019;10:1564.
56. Li S-F, Zhao F-R, Shao J-J, Xie Y-L, Chang H-Y, Zhang Y-G. Interferon-omega: Current status in clinical applications. *Int Immunopharmacol*. 2017 Nov;52:253–60.
57. LaFleur DW, Nardelli B, Tsareva T, Mather D, Feng P, Semenuk M, et al. Interferon-kappa, a novel type I interferon expressed in human keratinocytes. *J Biol Chem*. 2001 Oct 26;276(43):39765–71.
58. Hardy MP, Owczarek CM, Jermiin LS, Ejdebäck M, Hertzog PJ. Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes. *Genomics*. 2004 Aug;84(2):331–45.

59. Fung KY, Mangan NE, Cumming H, Horvat JC, Mayall JR, Stifter SA, et al. Interferon- ϵ protects the female reproductive tract from viral and bacterial infection. *Science*. 2013 Mar 1;339(6123):1088–92.
60. Garcia-Minambres A, Eid SG, Mangan NE, Pade C, Lim SS, Matthews AY, et al. Interferon epsilon promotes HIV restriction at multiple steps of viral replication. *Immunol Cell Biol*. 2017;95(5):478–83.
61. Abdulhaqq SA, Zorrilla C, Kang G, Yin X, Tamayo V, Seaton KE, et al. HIV-1-negative female sex workers sustain high cervical IFN ϵ , low immune activation, and low expression of HIV-1-required host genes. *Mucosal Immunol*. 2016;9(4):1027–38.
62. Reiser J, Hurst J, Voges M, Krauss P, Münch P, Iftner T, et al. High-risk human papillomaviruses repress constitutive kappa interferon transcription via E6 to prevent pathogen recognition receptor and antiviral-gene expression. *J Virol*. 2011 Nov;85(21):11372–80.
63. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004 Feb;75(2):163–89.
64. Presti RM, Pollock JL, Dal Canto AJ, O'Guin AK, Virgin HW. Interferon gamma regulates acute and latent murine cytomegalovirus infection and chronic disease of the great vessels. *J Exp Med*. 1998 Aug 3;188(3):577–88.
65. Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Lammas D, Dorman SE, Fondanèche MC, Dupuis S, et al. A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nat Genet*. 1999 Apr;21(4):370–8.
66. Mojic M, Takeda K, Hayakawa Y. The Dark Side of IFN- γ : Its Role in Promoting Cancer Immuno-evasion. *Int J Mol Sci*. 2017 Dec 28;19(1).
67. Takeda K, Nakayama M, Hayakawa Y, Kojima Y, Ikeda H, Imai N, et al. IFN- γ is required for cytotoxic T cell-dependent cancer genome immunoediting. *Nat Commun*. 2017 24;8:14607.
68. Wood KJ, Sawitzki B. Interferon gamma: a crucial role in the function of induced regulatory T cells in vivo. *Trends Immunol*. 2006 Apr;27(4):183–7.
69. Sharma S, Jin Z, Rosenzweig E, Rao S, Ko K, Niewold TB. Widely divergent transcriptional patterns between SLE patients of different ancestral backgrounds in sorted immune cell populations. *J Autoimmun*. 2015 Jun;60:51–8.
70. Becker AM, Dao KH, Han BK, Kornu R, Lakhanpal S, Mobley AB, et al. SLE peripheral blood B cell, T cell and myeloid cell transcriptomes display unique profiles and each subset contributes to the interferon signature. *PLoS One*. 2013;8(6):e67003.
71. Young HA. Unraveling the pros and cons of interferon-gamma gene regulation. *Immunity*. 2006 May;24(5):506–7.
72. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*. 2007;96:41–101.
73. Brutkiewicz RR. CD1d ligands: the good, the bad, and the ugly. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006 Jul 15;177(2):769–75.
74. Stetson DB, Mohrs M, Reinhardt RL, Baron JL, Wang Z-E, Gapin L, et al. Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *J Exp Med*. 2003 Oct 6;198(7):1069–76.
75. Glimcher LH, Townsend MJ, Sullivan BM, Lord GM. Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells. *Nat Rev Immunol*. 2004 Nov;4(11):900–11.
76. Morrow AN, Schmeisser H, Tsuno T, Zoon KC. A Novel Role for IFN-Stimulated Gene Factor 3II in IFN- γ Signaling and Induction of Antiviral Activity in Human Cells. *J Immunol*. 2011 Feb 1;186(3):1685–93.
77. Wack A, Terczyńska-Dyla E, Hartmann R. Guarding the frontiers: the biology of type III interferons. *Nat Immunol*. 2015 Aug;16(8):802–9.

78. Prokunina-Olsson L, Muchmore B, Tang W, Pfeiffer RM, Park H, Dickensheets H, et al. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat Genet.* 2013 Feb;45(2):164–71.
79. Key FM, Peter B, Dennis MY, Huerta-Sánchez E, Tang W, Prokunina-Olsson L, et al. Selection on a variant associated with improved viral clearance drives local, adaptive pseudogenization of interferon lambda 4 (IFNL4). *PLoS Genet.* 2014 Oct;10(10):e1004681.
80. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol.* 2003 Jan;4(1):63–8.
81. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, et al. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol.* 2003 Jan;4(1):69–77.
82. Onoguchi K, Yoneyama M, Takemura A, Akira S, Taniguchi T, Namiki H, et al. Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. *J Biol Chem.* 2007 Mar 9;282(10):7576–81.
83. Osterlund PI, Pietilä TE, Veckman V, Kotenko SV, Julkunen I. IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN-lambda) genes. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2007 Sep 15;179(6):3434–42.
84. Thomson SJP, Goh FG, Banks H, Krausgruber T, Kotenko SV, Foxwell BMJ, et al. The role of transposable elements in the regulation of IFN-lambda1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jul 14;106(28):11564–9.
85. Swider A, Siegel R, Eskdale J, Gallagher G. Regulation of interferon lambda-1 (IFNL1/IFN-λ1/IL-29) expression in human colon epithelial cells. *Cytokine.* 2014 Jan;65(1):17–23.
86. Siegel R, Eskdale J, Gallagher G. Regulation of IFN-λ1 promoter activity (IFN-λ1/IL-29) in human airway epithelial cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2011 Dec 1;187(11):5636–44.
87. Odendall C, Dixit E, Stavru F, Bierne H, Franz KM, Fiegen A, et al. Diverse intracellular pathogens activate Type III Interferon expression from peroxisomes. *Nat Immunol.* 2014 Aug;15(8):717–26.
88. Poss ZC, Ebmeier CC, Taatjes DJ. The Mediator complex and transcription regulation. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2013 Dec;48(6):575–608.
89. Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity.* 2019 Apr 16;50(4):907–23.
90. Kotenko SV, Durbin JE. Contribution of type III interferons to antiviral immunity: location, location, location. *J Biol Chem.* 2017 05;292(18):7295–303.
91. Wells AI, Coyne CB. Type III Interferons in Antiviral Defenses at Barrier Surfaces. *Trends Immunol.* 2018;39(10):848–58.
92. Blazek K, Eames HL, Weiss M, Byrne AJ, Perocheau D, Pease JE, et al. IFN-λ resolves inflammation via suppression of neutrophil infiltration and IL-1β production. *J Exp Med.* 2015 Jun 1;212(6):845–53.
93. Zhang S-Y, Boisson-Dupuis S, Chapgier A, Yang K, Bustamante J, Puel A, et al. Inborn errors of interferon (IFN)-mediated immunity in humans: insights into the respective roles of IFN-alpha/beta, IFN-gamma, and IFN-lambda in host defense. *Immunol Rev.* 2008 Dec;226:29–40.
94. Minegishi Y, Saito M, Morio T, Watanabe K, Agematsu K, Tsuchiya S, et al. Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity. *Immunity.* 2006 Nov;25(5):745–55.
95. Burns C, Cheung A, Stark Z, Choo S, Downie L, White S, et al. A novel presentation of homozygous loss-of-function STAT-1 mutation in an infant with hyperinflammation-A case report and review of the literature. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2016 Aug;4(4):777–9.
96. Moens L, Van Eyck L, Jochmans D, Mitera T, Frans G, Bossuyt X, et al. A novel kindred with inherited STAT2 deficiency and severe viral illness. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(6):1995-1997.e9.

97. Hernandez N, Bucciol G, Moens L, Pen JL, Shahrooei M, Goudouris E, et al. Inherited IFNAR1 deficiency in otherwise healthy patients with adverse reaction to measles and yellow fever live vaccines. *J Exp Med*. 2019 Sep 2;216(9):2057–70.
98. Duncan CJA, Mohamad SMB, Young DF, Skelton AJ, Leahy TR, Munday DC, et al. Human IFNAR2 deficiency: Lessons for antiviral immunity. *Sci Transl Med*. 2015 Sep 30;7(307):307ra154.
99. Ciancanelli MJ, Huang SXL, Luthra P, Garner H, Itan Y, Volpi S, et al. Infectious disease. Life-threatening influenza and impaired interferon amplification in human IRF7 deficiency. *Science*. 2015 Apr 24;348(6233):448–53.
100. Hernandez N, Melki I, Jing H, Habib T, Huang SSY, Danielson J, et al. Life-threatening influenza pneumonitis in a child with inherited IRF9 deficiency. *J Exp Med*. 2018 01;215(10):2567–85.
101. Griffiths SJ, Dunnigan CM, Russell CD, Haas JG. The Role of Interferon- λ Locus Polymorphisms in Hepatitis C and Other Infectious Diseases. *J Innate Immun*. 2015;7(3):231–42.
102. Pott J, Mahlaköiv T, Mordstein M, Duerr CU, Michiels T, Stockinger S, et al. IFN-lambda determines the intestinal epithelial antiviral host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 10;108(19):7944–9.
103. Broggi A, Tan Y, Granucci F, Zanoni I. IFN- λ suppresses intestinal inflammation by non-translational regulation of neutrophil function. *Nat Immunol*. 2017 Oct;18(10):1084–93.
104. Corry J, Arora N, Good CA, Sadovsky Y, Coyne CB. Organotypic models of type III interferon-mediated protection from Zika virus infections at the maternal-fetal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 29;114(35):9433–8.
105. Yockey LJ, Jurado KA, Arora N, Millet A, Rakib T, Milano KM, et al. Type I interferons instigate fetal demise after Zika virus infection. *Sci Immunol*. 2018 05;3(19).
106. Rönnblom L, Leonard D. Interferon pathway in SLE: one key to unlocking the mystery of the disease. *Lupus Sci Med*. 2019;6(1):e000270.
107. Crow MK. Type I interferon in organ-targeted autoimmune and inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(Suppl 1):S5.
108. Hofer MJ, Campbell IL. Type I interferon in neurological disease-the devil from within. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013 Jun;24(3):257–67.
109. Rodero MP, Crow YJ. Type I interferon-mediated monogenic autoinflammation: The type I interferonopathies, a conceptual overview. *J Exp Med*. 2016 Nov 14;213(12):2527–38.
110. Picard C, Belot A. Les interféronopathies de type I. Mise au point et revue de la littérature. *Rev Médecine Interne*. 2018 Apr 1;39(4):271–8.
111. Aicardi J, Goutières F. A progressive familial encephalopathy in infancy with calcifications of the basal ganglia and chronic cerebrospinal fluid lymphocytosis. *Ann Neurol*. 1984 Jan;15(1):49–54.
112. Lebon P, Badoual J, Ponsot G, Goutières F, Hémeury-Cukier F, Aicardi J. Intrathecal synthesis of interferon-alpha in infants with progressive familial encephalopathy. *J Neurol Sci*. 1988 Apr;84(2–3):201–8.
113. Crow YJ, Hayward BE, Parmar R, Robins P, Leitch A, Ali M, et al. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause Aicardi-Goutières syndrome at the AGS1 locus. *Nat Genet*. 2006 Aug;38(8):917–20.
114. Jang M-A, Kim EK, Now H, Nguyen NTH, Kim W-J, Yoo J-Y, et al. Mutations in DDX58, which encodes RIG-I, cause atypical Singleton-Merten syndrome. *Am J Hum Genet*. 2015 Feb 5;96(2):266–74.
115. Meuwissen MEC, Schot R, Buta S, Oudesluijs G, Tinschert S, Speer SD, et al. Human USP18 deficiency underlies type 1 interferonopathy leading to severe pseudo-TORCH syndrome. *J Exp Med*. 2016 27;213(7):1163–74.
116. Zhang X, Bogunovic D, Payelle-Brogard B, Francois-Newton V, Speer SD, Yuan C, et al. Human intracellular ISG15 prevents interferon- α/β over-amplification and auto-inflammation. *Nature*. 2015 Jan 1;517(7532):89–93.

117. Brehm A, Liu Y, Sheikh A, Marrero B, Omoyinmi E, Zhou Q, et al. Additive loss-of-function proteasome subunit mutations in CANDLE/PRAAS patients promote type I IFN production. *J Clin Invest*. 2015 Nov 2;125(11):4196–211.
118. Crow YJ, Leitch A, Hayward BE, Garner A, Parmar R, Griffith E, et al. Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutières syndrome and mimic congenital viral brain infection. *Nat Genet*. 2006 Aug;38(8):910–6.
119. Hooks JJ, Moutsopoulos HM, Notkins AL. Circulating interferon in human autoimmune diseases. *Tex Rep Biol Med*. 1981 1982;41:164–8.
120. Ytterberg SR, Schnitzer TJ. Serum interferon levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1982 Apr;25(4):401–6.
121. Preble OT, Black RJ, Friedman RM, Klippel JH, Vilcek J. Systemic lupus erythematosus: presence in human serum of an unusual acid-labile leukocyte interferon. *Science*. 1982 Apr 23;216(4544):429–31.
122. Bengtsson AA, Rönnblom L. Role of interferons in SLE. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2017 Jun 1;31(3):415–28.
123. Stannard JN, Reed TJ, Myers E, Lowe L, Sarkar MK, Xing X, et al. Lupus Skin Is Primed for IL-6 Inflammatory Responses through a Keratinocyte-Mediated Autocrine Type I Interferon Loop. *J Invest Dermatol*. 2017;137(1):115–22.
124. Sarkar MK, Hile GA, Tsoi LC, Xing X, Liu J, Liang Y, et al. Photosensitivity and type I IFN responses in cutaneous lupus are driven by epidermal-derived interferon kappa. *Ann Rheum Dis*. 2018 Nov;77(11):1653–64.
125. Harley ITW, Niewold TB, Stormont RM, Kaufman KM, Glenn SB, Franek BS, et al. The role of genetic variation near interferon-kappa in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010.
126. Catalina MD, Bachali P, Geraci NS, Grammer AC, Lipsky PE. Gene expression analysis delineates the potential roles of multiple interferons in systemic lupus erythematosus. *Commun Biol* [Internet]. 2019 Apr 23 [cited 2019 Sep 27];2. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6478921/>
127. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Mar 4;100(5):2610–5.
128. Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med*. 2003 Mar 17;197(6):711–23.
129. Petri M, Singh S, Tesfayone H, Dedrick R, Fry K, Lal P, et al. Longitudinal expression of type I interferon responsive genes in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2009 Oct;18(11):980–9.
130. Landolt-Marticorena C, Bonventi G, Lubovich A, Ferguson C, Unnithan T, Su J, et al. Lack of association between the interferon-alpha signature and longitudinal changes in disease activity in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2009 Sep;68(9):1440–6.
131. Nikpour M, Dempsey AA, Urowitz MB, Gladman DD, Barnes DA. Association of a gene expression profile from whole blood with disease activity in systemic lupus erythaematosus. *Ann Rheum Dis*. 2008 Aug;67(8):1069–75.
132. Higgs BW, Liu Z, White B, Zhu W, White WI, Morehouse C, et al. Patients with systemic lupus erythematosus, myositis, rheumatoid arthritis and scleroderma share activation of a common type I interferon pathway. *Ann Rheum Dis*. 2011 Nov;70(11):2029–36.
133. Feng X, Wu H, Grossman JM, Hanvivadhanakul P, FitzGerald JD, Park GS, et al. Association of increased interferon-inducible gene expression with disease activity and lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2006 Sep;54(9):2951–62.

134. Kirou KA, Lee C, George S, Louca K, Papagiannis IG, Peterson MGE, et al. Coordinate overexpression of interferon-alpha-induced genes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2004 Dec;50(12):3958–67.
135. Chaussabel D, Quinn C, Shen J, Patel P, Glaser C, Baldwin N, et al. A modular analysis framework for blood genomics studies: application to systemic lupus erythematosus. *Immunity.* 2008 Jul 18;29(1):150–64.
136. Kirou KA, Lee C, George S, Louca K, Peterson MGE, Crow MK. Activation of the interferon-alpha pathway identifies a subgroup of systemic lupus erythematosus patients with distinct serologic features and active disease. *Arthritis Rheum.* 2005 May;52(5):1491–503.
137. Chiche L, Jourde-Chiche N, Whalen E, Presnell S, Gersuk V, Dang K, et al. Modular transcriptional repertoire analyses of adults with systemic lupus erythematosus reveal distinct type I and type II interferon signatures. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* 2014 Jun;66(6):1583–95.
138. Ghodke-Puranik Y, Niewold TB. Immunogenetics of Systemic Lupus Erythematosus: A Comprehensive Review. *J Autoimmun.* 2015 Nov;64:125.
139. Shinohara ML, Lu L, Bu J, Werneck MBF, Kobayashi KS, Glimcher LH, et al. Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol.* 2006 May;7(5):498–506.
140. Niewold TB, Kelly JA, Flesch MH, Espinoza LR, Harley JB, Crow MK. Association of the IRF5 Risk Haplotype With High Serum Interferon- α Activity in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Arthritis Rheum.* 2008 Aug;58(8):2481–7.
141. Salloum R, Franek BS, Kariuki SN, Rhee L, Mikolaitis RA, Jolly M, et al. Genetic variation at the IRF7/PHRF1 locus is associated with autoantibody profile and serum interferon-alpha activity in lupus patients. *Arthritis Rheum.* 2010 Feb;62(2):553–61.
142. Lee MN, Ye C, Villani A-C, Raj T, Li W, Eisenhaure TM, et al. Common genetic variants modulate pathogen-sensing responses in human dendritic cells. *Science.* 2014 Mar 7;343(6175):1246980.
143. Kariuki SN, Kirou KA, MacDermott EJ, Barillas-Arias L, Crow MK, Niewold TB. Cutting edge: autoimmune disease risk variant of STAT4 confers increased sensitivity to IFN-alpha in lupus patients in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2009 Jan 1;182(1):34–8.
144. Robinson T, Kariuki SN, Franek BS, Kumabe M, Kumar AA, Badaracco M, et al. Autoimmune disease risk variant of IFIH1 is associated with increased sensitivity to IFN- α and serologic autoimmunity in lupus patients. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2011 Aug 1;187(3):1298–303.
145. Kariuki SN, Moore JG, Kirou KA, Crow MK, Utset TO, Niewold TB. Age- and gender-specific modulation of serum osteopontin and interferon-alpha by osteopontin genotype in systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* 2009 Jul;10(5):487–94.
146. Wang Y, Shaked I, Stanford SM, Zhou W, Curtsinger JM, Mikulski Z, et al. The autoimmunity-associated gene PTPN22 potentiates toll-like receptor-driven, type 1 interferon-dependent immunity. *Immunity.* 2013 Jul 25;39(1):111–22.
147. Kariuki SN, Crow MK, Niewold TB. The PTPN22 C1858T polymorphism is associated with skewing of cytokine profiles toward high interferon-alpha activity and low tumor necrosis factor alpha levels in patients with lupus. *Arthritis Rheum.* 2008 Sep;58(9):2818–23.
148. Jensen MA, Patterson KC, Kumar AA, Kumabe M, Franek BS, Niewold TB. Functional genetic polymorphisms in ILT3 are associated with decreased surface expression on dendritic cells and increased serum cytokines in lupus patients. *Ann Rheum Dis.* 2013 Apr;72(4):596–601.
149. Chrabot BS, Kariuki SN, Zervou MI, Feng X, Arrington J, Jolly M, et al. Genetic variation near IRF8 is associated with serologic and cytokine profiles in systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis. *Genes Immun.* 2013 Dec;14(8):471–8.
150. Pothlichet J, Niewold TB, Vitour D, Solhonne B, Crow MK, Si-Tahar M. A loss-of-function variant of the antiviral molecule MAVS is associated with a subset of systemic lupus patients. *EMBO Mol Med.* 2011 Mar;3(3):142–52.

151. Niewold TB, Hua J, Lehman TJA, Harley JB, Crow MK. High serum IFN-alpha activity is a heritable risk factor for systemic lupus erythematosus. *Genes Immun*. 2007 Sep;8(6):492–502.
152. Munroe ME, Lu R, Zhao YD, Fife DA, Robertson JM, Guthridge JM, et al. Altered type II interferon precedes autoantibody accrual and elevated type I interferon activity prior to systemic lupus erythematosus classification. *Ann Rheum Dis*. 2016 Nov;75(11):2014–21.
153. Banchereau R, Hong S, Cantarel B, Baldwin N, Baisch J, Edens M, et al. Personalized Immunomonitoring Uncovers Molecular Networks that Stratify Lupus Patients. *Cell*. 2016 Apr 21;165(3):551–65.
154. Ellyard JI, Jerjen R, Martin JL, Lee AYS, Field MA, Jiang SH, et al. Identification of a pathogenic variant in TREX1 in early-onset cerebral systemic lupus erythematosus by Whole-exome sequencing. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2014 Dec;66(12):3382–6.
155. Troedson C, Wong M, Dalby-Payne J, Wilson M, Dexter M, Rice GI, et al. Systemic lupus erythematosus due to C1q deficiency with progressive encephalopathy, intracranial calcification and acquired moyamoya cerebral vasculopathy. *Lupus*. 2013 May;22(6):639–43.
156. Andrade D, Kim M, Blanco LP, Karumanchi SA, Koo GC, Redecha P, et al. Interferon- α and angiogenic dysregulation in pregnant lupus patients who develop preeclampsia. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2015 Apr;67(4):977–87.
157. Pollard KM, Cauvi DM, Toomey CB, Morris KV, Kono DH. Interferon- γ and systemic autoimmunity. *Discov Med*. 2013 Sep;16(87):123–31.
158. Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti J, Hissong BD, et al. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Dec 18;98(26):15137–42.
159. Karonitsch T, Feierl E, Steiner CW, Dalwigk K, Korb A, Binder N, et al. Activation of the interferon-gamma signaling pathway in systemic lupus erythematosus peripheral blood mononuclear cells. *Arthritis Rheum*. 2009 May;60(5):1463–71.
160. Higgs BW, Liu Z, White B, Zhu W, White WI, Morehouse C, et al. Patients with systemic lupus erythematosus, myositis, rheumatoid arthritis and scleroderma share activation of a common type I interferon pathway. *Ann Rheum Dis*. 2011 Nov;70(11):2029–36.
161. Hall JC, Casciola-Rosen L, Berger AE, Kapsogeorgou EK, Cheadle C, Tzioufas AG, et al. Precise probes of type II interferon activity define the origin of interferon signatures in target tissues in rheumatic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Oct 23;109(43):17609.
162. Harigai M, Kawamoto M, Hara M, Kubota T, Kamatani N, Miyasaka N. Excessive production of IFN-gamma in patients with systemic lupus erythematosus and its contribution to induction of B lymphocyte stimulator/B cell-activating factor/TNF ligand superfamily-13B. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008 Aug 1;181(3):2211–9.
163. Antonelli A, Ferrari SM, Giuggioli D, Ferrannini E, Ferri C, Fallahi P. Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2014 Mar;13(3):272–80.
164. Bauer JW, Petri M, Batliwalla FM, Koeuth T, Wilson J, Slattery C, et al. Interferon-Regulated Chemokines as Biomarkers of Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity: A Validation Study. *Arthritis Rheum*. 2009 Oct;60(10):3098–107.
165. Liu M, Liu J, Hao S, Wu P, Zhang X, Xiao Y, et al. Higher activation of the interferon-gamma signaling pathway in systemic lupus erythematosus patients with a high type I IFN score: relation to disease activity. *Clin Rheumatol*. 2018 Oct;37(10):2675–84.
166. Graninger WB, Hassfeld W, Pesau BB, Machold KP, Zielinski CC, Smolen JS. Induction of systemic lupus erythematosus by interferon-gamma in a patient with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1991 Oct;18(10):1621–2.
167. Machold KP, Smolen JS. Interferon-gamma induced exacerbation of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 1990 Jun;17(6):831–2.

168. Wu Q, Yang Q, Lourenco E, Sun H, Zhang Y. Interferon-lambda1 induces peripheral blood mononuclear cell-derived chemokines secretion in patients with systemic lupus erythematosus: its correlation with disease activity. *Arthritis Res Ther*. 2011 Jun 16;13(3):R88.
169. Lin S-C, Kuo C-C, Tsao J-T, Lin L-J. Profiling the expression of interleukin (IL)-28 and IL-28 receptor α in systemic lupus erythematosus patients. *Eur J Clin Invest*. 2012 Jan;42(1):61–9.
170. Zahn S, Rehkämper C, Kümmerer BM, Ferring-Schmidt S, Bieber T, Tüting T, et al. Evidence for a Pathophysiological Role of Keratinocyte-Derived Type III Interferon (IFN λ) in Cutaneous Lupus Erythematosus. *J Invest Dermatol*. 2011 Jan 1;131(1):133–40.
171. Oke V, Brauner S, Larsson A, Gustafsson J, Zickert A, Gunnarsson I, et al. IFN- λ 1 with Th17 axis cytokines and IFN- α define different subsets in systemic lupus erythematosus (SLE). *Arthritis Res Ther*. 2017 15;19(1):139.
172. Oke V, Gunnarsson I, Dorschner J, Eketjäll S, Zickert A, Niewold TB, et al. High levels of circulating interferons type I, type II and type III associate with distinct clinical features of active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2019 Apr 29;21(1):107.
173. Hooks JJ, Jordan GW, Cupps T, Moutsopoulos HM, Fauci AS, Notkins AL. Multiple interferons in the circulation of patients with systemic lupus erythematosus and vasculitis. *Arthritis Rheum*. 1982 Apr;25(4):396–400.
174. Yao Y, Liu Z, Jallal B, Shen N, Rönnblom L. Type I interferons in Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev*. 2013 Mar;12(5):558–66.
175. Brito-Zerón P, Baldini C, Bootsma H, Bowman SJ, Jonsson R, Mariette X, et al. Sjögren syndrome. *Nat Rev Dis Primer*. 2016 07;2:16047.
176. Båve U, Nordmark G, Lövgren T, Rönnelid J, Cajander S, Eloranta M-L, et al. Activation of the type I interferon system in primary Sjögren's syndrome: a possible etiopathogenic mechanism. *Arthritis Rheum*. 2005 Apr;52(4):1185–95.
177. Hjelmervik TOR, Petersen K, Jonassen I, Jonsson R, Bolstad AI. Gene expression profiling of minor salivary glands clearly distinguishes primary Sjögren's syndrome patients from healthy control subjects. *Arthritis Rheum*. 2005 May;52(5):1534–44.
178. Hung T, Pratt GA, Sundararaman B, Townsend MJ, Chaivorapol C, Bhangale T, et al. The Ro60 autoantigen binds endogenous retroelements and regulates inflammatory gene expression. *Science*. 2015 Oct 23;350(6259):455–9.
179. Crow MK. Long interspersed nuclear elements (LINE-1): potential triggers of systemic autoimmune disease. *Autoimmunity*. 2010 Feb;43(1):7–16.
180. Mavragani CP, Nezos A, Sagalovskiy I, Seshan S, Kirou KA, Crow MK. Defective regulation of L1 endogenous retroelements in primary Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus: Role of methylating enzymes. *J Autoimmun*. 2018 Mar;88:75–82.
181. Gottenberg J-E, Cagnard N, Lucchesi C, Letourneur F, Mistou S, Lazure T, et al. Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 21;103(8):2770–5.
182. Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 22;95(26):15623–8.
183. Brkic Z, Maria NI, van Helden-Meeuwssen CG, van de Merwe JP, van Daele PL, Dalm VA, et al. Prevalence of interferon type I signature in CD14 monocytes of patients with Sjogren's syndrome and association with disease activity and BAFF gene expression. *Ann Rheum Dis*. 2013 May;72(5):728–35.
184. Wildenberg ME, van Helden-Meeuwssen CG, van de Merwe JP, Drexhage HA, Versnel MA. Systemic increase in type I interferon activity in Sjögren's syndrome: a putative role for plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2008 Jul;38(7):2024–33.
185. Emamian ES, Leon JM, Lessard CJ, Grandits M, Baechler EC, Gaffney PM, et al. Peripheral blood gene expression profiling in Sjögren's syndrome. *Genes Immun*. 2009 Jun;10(4):285–96.

186. Kimoto O, Sawada J, Shimoyama K, Suzuki D, Nakamura S, Hayashi H, et al. Activation of the interferon pathway in peripheral blood of patients with Sjogren's syndrome. *J Rheumatol*. 2011 Feb;38(2):310–6.
187. Maria NI, Brkic Z, Waris M, van Helden-Meeuwsen CG, Heezen K, van de Merwe JP, et al. MxA as a clinically applicable biomarker for identifying systemic interferon type I in primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2014 Jun;73(6):1052–9.
188. Rose T, Szelinski F, Lisney A, Reiter K, Fleischer SJ, Burmester GR, et al. SIGLEC1 is a biomarker of disease activity and indicates extraglandular manifestation in primary Sjögren's syndrome. *RMD Open*. 2016 Dec 1;2(2):e000292.
189. Maria NI, Steenwijk EC, IJpma AS, Helden-Meeuwsen CG van, Vogelsang P, Beumer W, et al. Contrasting expression pattern of RNA-sensing receptors TLR7, RIG-I and MDA5 in interferon-positive and interferon-negative patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2017 Apr 1;76(4):721–30.
190. Saitoh T, Satoh T, Yamamoto N, Uematsu S, Takeuchi O, Kawai T, et al. Antiviral protein Viperin promotes Toll-like receptor 7- and Toll-like receptor 9-mediated type I interferon production in plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*. 2011 Mar 25;34(3):352–63.
191. Mondini M, Vidali M, De Andrea M, Azzimonti B, Airò P, D'Ambrosio R, et al. A novel autoantigen to differentiate limited cutaneous systemic sclerosis from diffuse cutaneous systemic sclerosis: the interferon-inducible gene IFI16. *Arthritis Rheum*. 2006 Dec;54(12):3939–44.
192. Uchida K, Akita Y, Matsuo K, Fujiwara S, Nakagawa A, Kazaoka Y, et al. Identification of specific autoantigens in Sjögren's syndrome by SEREX. *Immunology*. 2005 Sep;116(1):53–63.
193. Baer AN, Petri M, Sohn J, Rosen A, Casciola-Rosen L. Association of Antibodies to Interferon-Inducible Protein-16 With Markers of More Severe Disease in Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis Care Res*. 2016 Feb;68(2):254–60.
194. Hillen MR, Pandit A, Blokland SLM, Hartgring SAY, Bekker CPJ, van der Heijden EHM, et al. Plasmacytoid DCs From Patients With Sjögren's Syndrome Are Transcriptionally Primed for Enhanced Pro-inflammatory Cytokine Production. *Front Immunol [Internet]*. 2019 Sep 4 [cited 2019 Sep 28];10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6736989/>
195. Ceppi M, Clavarino G, Gatti E, Schmidt EK, de Gassart A, Blankenship D, et al. Ribosomal protein mRNAs are translationally-regulated during human dendritic cells activation by LPS. *Immunome Res*. 2009 Nov 27;5:5.
196. Mathan TSM, Textor J, Sköld AE, Reinieren-Beeren I, van Oorschot T, Brüning M, et al. Harnessing RNA sequencing for global, unbiased evaluation of two new adjuvants for dendritic-cell immunotherapy. *Oncotarget*. 2017 Mar 21;8(12):19879–93.
197. Imgenberg-Kreuz J, Sandling JK, Björk A, Nordlund J, Kvarnström M, Eloranta M-L, et al. Transcription profiling of peripheral B cells in antibody-positive primary Sjögren's syndrome reveals upregulated expression of CX3CR1 and a type I and type II interferon signature. *Scand J Immunol*. 2018 May;87(5):e12662.
198. Nocturne G, Mariette X. Advances in understanding the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol*. 2013 Sep;9(9):544–56.
199. Wakamatsu E, Matsumoto I, Yasukochi T, Naito Y, Goto D, Mamura M, et al. Overexpression of phosphorylated STAT-1alpha in the labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2006 Nov;54(11):3476–84.
200. Ramos HL, Valencia-Pacheco G, Alcocer-Varela J. Constitutive STAT3 activation in peripheral CD3+ cells from patients with primary Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol*. 2008 Jan 1;37(1):35–9.
201. Pertovaara M, Silvennoinen O, Isomäki P. STAT-5 is activated constitutively in T cells, B cells and monocytes from patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol*. 2015 Jul;181(1):29–38.

202. Davies R, Hammenfors D, Bergum B, Vogelsang P, Gavasso S, Brun JG, et al. Aberrant cell signalling in PBMCs upon IFN- α stimulation in primary Sjögren's syndrome patients associates with type I interferon signature. *Eur J Immunol*. 2018 Jul;48(7):1217–27.
203. Davies R, Sarkar I, Hammenfors D, Bergum B, Vogelsang P, Solberg SM, et al. Single Cell Based Phosphorylation Profiling Identifies Alterations in Toll-Like Receptor 7 and 9 Signaling in Patients With Primary Sjögren's Syndrome. *Front Immunol* [Internet]. 2019 Feb 21 [cited 2019 Sep 29];10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6393381/>
204. Miceli-Richard C, Comets E, Loiseau P, Puechal X, Hachulla E, Mariette X. Association of an IRF5 gene functional polymorphism with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2007 Dec;56(12):3989–94.
205. Miceli-Richard C, Gestermann N, Ittah M, Comets E, Loiseau P, Puechal X, et al. The CGGGG insertion/deletion polymorphism of the IRF5 promoter is a strong risk factor for primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2009 Jul;60(7):1991–7.
206. Nordmark G, Kristjansdottir G, Theander E, Eriksson P, Brun JG, Wang C, et al. Additive effects of the major risk alleles of IRF5 and STAT4 in primary Sjögren's syndrome. *Genes Immun*. 2009 Jan;10(1):68–76.
207. Korman BD, Alba MI, Le JM, Alevizos I, Smith JA, Nikolov NP, et al. Variant form of STAT4 is associated with primary Sjögren's syndrome. *Genes Immun*. 2008 Apr;9(3):267–70.
208. Vlachogiannis NI, Nezos A, Tzioufas AG, Koutsilieris M, Moutsopoulos HM, Mavragani CP. Increased frequency of the PTPN22W* variant in primary Sjogren's Syndrome: Association with low type I IFN scores. *Clin Immunol Orlando Fla*. 2016 Dec;173:157–60.
209. Li H, Reksten TR, Ice JA, Kelly JA, Adrianto I, Rasmussen A, et al. Identification of a Sjögren's syndrome susceptibility locus at OAS1 that influences isoform switching, protein expression, and responsiveness to type I interferons. *PLoS Genet*. 2017 Jun;13(6):e1006820.
210. Nordmark G, Kristjansdottir G, Theander E, Eriksson P, Brun JG, Wang C, et al. Additive effects of the major risk alleles of IRF5 and STAT4 in primary Sjögren's syndrome. *Genes Immun*. 2009 Jan;10(1):68–76.
211. Nossent JC, Lester S, Zahra D, Mackay CR, Rischmueller M. Polymorphism in the 5' regulatory region of the B-lymphocyte activating factor gene is associated with the Ro/La autoantibody response and serum BAFF levels in primary Sjogren's syndrome. *Rheumatol Oxf Engl*. 2008 Sep;47(9):1311–6.
212. Oishi A, Miyamoto K, Kashii S, Yoshimura N. Abducens palsy and Sjogren's syndrome induced by pegylated interferon therapy. *Br J Ophthalmol*. 2007 Jun;91(6):843–4.
213. Onishi S, Nagashima T, Kimura H, Matsuyama Y, Yoshio T, Minota S. Systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome induced in a case by interferon-alpha used for the treatment of hepatitis C. *Lupus*. 2010 May;19(6):753–5.
214. Ojha J, Bhattacharyya I, Islam N, Cohen DM, Stewart CM, Katz J. Xerostomia and lichenoid reaction in a hepatitis C patient treated with interferon-alpha: a case report. *Quintessence Int Berl Ger 1985*. 2008 Apr;39(4):343–8.
215. Wakamatsu E, Nakamura Y, Matsumoto I, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, et al. DNA microarray analysis of labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2007 Jun;66(6):844–5.
216. Lavie F, Miceli-Richard C, Ittah M, Sellam J, Gottenberg J-E, Mariette X. B-cell activating factor of the tumour necrosis factor family expression in blood monocytes and T cells from patients with primary Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol*. 2008 Feb;67(2):185–92.
217. Nezos A, Gravani F, Tassidou A, Kapsogeorgou EK, Voulgarelis M, Koutsilieris M, et al. Type I and II interferon signatures in Sjogren's syndrome pathogenesis: Contributions in distinct clinical phenotypes and Sjogren's related lymphomagenesis. *J Autoimmun*. 2015 Sep;63:47–58.

218. Hall JC, Baer AN, Shah AA, Criswell LA, Shiboski CH, Rosen A, et al. Molecular Subsetting of Interferon Pathways in Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2015 Sep;67(9):2437–46.
219. Chiche L, Jourde-Chiche N, Whalen E, Presnell S, Gersuk V, Dang K, et al. Modular transcriptional repertoire analyses of adults with systemic lupus erythematosus reveal distinct type I and type II interferon signatures. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2014 Jun;66(6):1583–95.
220. Bodewes ILA, Al-Ali S, van Helden-Meeuwsen CG, Maria NI, Tarn J, Lendrem DW, et al. Systemic interferon type I and type II signatures in primary Sjögren's syndrome reveal differences in biological disease activity. *Rheumatol Oxf Engl*. 2018 01;57(5):921–30.
221. Seror R, Nocturne G, Lazure T, Hendel-Chavez H, Desmoulin F, Belkhir R, et al. Low numbers of blood and salivary natural killer cells are associated with a better response to belimumab in primary Sjögren's syndrome: results of the BELISS study. *Arthritis Res Ther*. 2015 Sep 4;17(1):241.
222. Quartuccio L, Mavragani CP, Nezos A, Gandolfo S, Tzioufas AG, De Vita S. Type I interferon signature may influence the effect of belimumab on immunoglobulin levels, including rheumatoid factor in Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 2017 Aug;35(4):719–20.
223. Iwamoto N, Kawakami A, Arima K, Nakamura H, Kawashiri S, Tamai M, et al. Regulation of disease susceptibility and mononuclear cell infiltration into the labial salivary glands of Sjögren's syndrome by monocyte chemotactic protein-1. *Rheumatol Oxf Engl*. 2010 Aug;49(8):1472–8.
224. Apostolou E, Kapsogeorgou EK, Konsta OD, Giotakis I, Saridaki MI, Andreakos E, et al. Expression of type III interferons (IFN λ s) and their receptor in Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol*. 2016 Dec;186(3):304–12.
225. Ha Y-J, Choi YS, Kang EH, Chung J-H, Cha S, Song YW, et al. Increased expression of interferon- λ in minor salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome and its synergic effect with interferon- α on salivary gland epithelial cells. *Clin Exp Rheumatol*. 2018 Jun;36 Suppl 112(3):31–40.
226. Grenn RC, Yalavarthi S, Gandhi AA, Kazzaz NM, Núñez-Álvarez C, Hernández-Ramírez D, et al. Endothelial progenitor dysfunction associates with a type I interferon signature in primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2017 Feb 1;76(2):450–7.
227. Ugolini-Lopes MR, Torrezan GT, Gândara APR, Olivieri EHR, Nascimento IS, Okazaki E, et al. Enhanced type I interferon gene signature in primary antiphospholipid syndrome: Association with earlier disease onset and preeclampsia. *Autoimmun Rev*. 2019 Apr;18(4):393–8.
228. van den Hoogen LL, Fritsch-Stork RDE, Versnel MA, Derksen RHW, van Roon JAG, Radstake TRD. Monocyte type I interferon signature in antiphospholipid syndrome is related to proinflammatory monocyte subsets, hydroxychloroquine and statin use. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(12):e81.
229. Palli E, Kravvariti E, Tektonidou MG. Type I Interferon Signature in Primary Antiphospholipid Syndrome: Clinical and Laboratory Associations. *Front Immunol [Internet]*. 2019 Mar 15 [cited 2019 Sep 20];10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6428719/>
230. van den Hoogen LL, van Roon JAG, Mertens JS, Wienke J, Lopes AP, de Jager W, et al. Galectin-9 is an easy to measure biomarker for the interferon signature in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2018;77(12):1810–4.
231. Prinz N, Clemens N, Strand D, Pütz I, Lorenz M, Daiber A, et al. Antiphospholipid antibodies induce translocation of TLR7 and TLR8 to the endosome in human monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2011 Aug 25;118(8):2322–32.
232. Liao AP, Salajegheh M, Nazareno R, Kagan JC, Jubin RG, Greenberg SA. Interferon β is associated with type 1 interferon-inducible gene expression in dermatomyositis. *Ann Rheum Dis*. 2011 May 1;70(5):831–6.

233. Greenberg SA, Pinkus JL, Pinkus GS, Burlison T, Sanoudou D, Tawil R, et al. Interferon-alpha/beta-mediated innate immune mechanisms in dermatomyositis. *Ann Neurol*. 2005 May;57(5):664–78.
234. Salajegheh M, Kong SW, Pinkus JL, Walsh RJ, Liao A, Nazareno R, et al. Interferon-Stimulated Gene 15 (ISG15) Conjugates Proteins in Dermatomyositis Muscle with Perifascicular Atrophy. *Ann Neurol*. 2010 Jan;67(1):53–63.
235. Wong D, Kea B, Pesich R, Higgs BW, Zhu W, Brown P, et al. Interferon and biologic signatures in dermatomyositis skin: specificity and heterogeneity across diseases. *PLoS One*. 2012;7(1):e29161.
236. Walsh RJ, Kong SW, Yao Y, Jallal B, Kiener PA, Pinkus JL, et al. Type I Interferon-Inducible Gene Expression in Blood Is Present and Reflects Disease Activity in Dermatomyositis and Polymyositis. *Arthritis Rheum*. 2007 Nov;56(11):3784–92.
237. Wenzel J, Schmidt R, Proelss J, Zahn S, Bieber T, Tüting T. Type I interferon-associated skin recruitment of CXCR3+ lymphocytes in dermatomyositis. *Clin Exp Dermatol*. 2006 Jul;31(4):576–82.
238. Niewold TB, Kariuki SN, Morgan GA, Shrestha S, Pachman LM. Elevated serum interferon-alpha activity in juvenile dermatomyositis: associations with disease activity at diagnosis and after thirty-six months of therapy. *Arthritis Rheum*. 2009 Jun;60(6):1815–24.
239. Meyer A, Laverny G, Allenbach Y, Grelet E, Ueberschlag V, Echaniz-Laguna A, et al. IFN- β -induced reactive oxygen species and mitochondrial damage contribute to muscle impairment and inflammation maintenance in dermatomyositis. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2017 Oct;134(4):655–66.
240. Suárez-Calvet X, Gallardo E, Nogales-Gadea G, Querol L, Navas M, Díaz-Manera J, et al. Altered RIG-I/DDX58-mediated innate immunity in dermatomyositis. *J Pathol*. 2014 Jul;233(3):258–68.
241. Nakashima R, Imura Y, Kobayashi S, Yukawa N, Yoshifuji H, Nojima T, et al. The RIG-I-like receptor IFIH1/MDA5 is a dermatomyositis-specific autoantigen identified by the anti-CADM-140 antibody. *Rheumatol Oxf Engl*. 2010 Mar;49(3):433–40.
242. Sato S, Hoshino K, Satoh T, Fujita T, Kawakami Y, Fujita T, et al. RNA helicase encoded by melanoma differentiation-associated gene 5 is a major autoantigen in patients with clinically amyopathic dermatomyositis: Association with rapidly progressive interstitial lung disease. *Arthritis Rheum*. 2009 Jul;60(7):2193–200.
243. Fiorentino D, Chung L, Zwerner J, Rosen A, Casciola-Rosen L. The mucocutaneous and systemic phenotype of dermatomyositis patients with antibodies to MDA5 (CADM-140): a retrospective study. *J Am Acad Dermatol*. 2011 Jul;65(1):25–34.
244. Baechler EC, Bauer JW, Slattery CA, Ortmann WA, Espe KJ, Novitzke J, et al. An Interferon Signature in the Peripheral Blood of Dermatomyositis Patients is Associated with Disease Activity. *Mol Med*. 2007;13(1–2):59–68.
245. Bilgic H, Ytterberg SR, Amin S, McNallan KT, Wilson JC, Koeuth T, et al. Interleukin-6 and type I interferon-regulated genes and chemokines mark disease activity in dermatomyositis. *Arthritis Rheum*. 2009 Nov;60(11):3436–46.
246. Greenberg SA, Higgs BW, Morehouse C, Walsh RJ, Kong SW, Brohawn P, et al. Relationship between disease activity and type 1 interferon- and other cytokine-inducible gene expression in blood in dermatomyositis and polymyositis. *Genes Immun*. 2012 Apr;13(3):207–13.
247. Balboni I, Niewold TB, Morgan G, Limb C, Eloranta M-L, Rönnblom L, et al. Detection of anti-Ro, La, Smith and RNP autoantibodies by autoantigen microarray analysis and interferon-alpha induction in juvenile dermatomyositis. *Arthritis Rheum*. 2013 Sep;65(9):2424–9.
248. Ekholm L, Vosslander S, Tjärnlund A, de Jong TD, Betteridge Z, McHugh N, et al. Autoantibody Specificities and Type I Interferon Pathway Activation in Idiopathic Inflammatory Myopathies. *Scand J Immunol*. 2016 Aug;84(2):100–9.

249. Eloranta M-L, Barbasso Helmers S, Ulfgren A-K, Rönnblom L, Alm GV, Lundberg IE. A possible mechanism for endogenous activation of the type I interferon system in myositis patients with anti-Jo-1 or anti-Ro 52/anti-Ro 60 autoantibodies. *Arthritis Rheum.* 2007 Sep;56(9):3112–24.
250. Shrestha S, Wershil B, Sarwark JF, Niewold TB, Philipp T, Pachman LM. Lesional and nonlesional skin from patients with untreated juvenile dermatomyositis displays increased numbers of mast cells and mature plasmacytoid dendritic cells. *Arthritis Rheum.* 2010 Sep;62(9):2813–22.
251. McNiff JM, Kaplan DH. Plasmacytoid dendritic cells are present in cutaneous dermatomyositis lesions in a pattern distinct from lupus erythematosus. *J Cutan Pathol.* 2008 May;35(5):452–6.
252. López de Padilla CM, Vallejo AN, McNallan KT, Vehe R, Smith SA, Dietz AB, et al. Plasmacytoid dendritic cells in inflamed muscle of patients with juvenile dermatomyositis. *Arthritis Rheum.* 2007 May;56(5):1658–68.
253. Niewold TB, Kariuki SN, Morgan GA, Shrestha S, Pachman LM. Gene-gene-sex interaction in cytokine gene polymorphisms revealed by serum interferon alpha phenotype in juvenile dermatomyositis. *J Pediatr.* 2010 Oct;157(4):653–7.
254. Rothwell S, Cooper RG, Lundberg IE, Miller FW, Gregersen PK, Bowes J, et al. Dense genotyping of immune-related loci in idiopathic inflammatory myopathies confirms HLA alleles as the strongest genetic risk factor and suggests different genetic background for major clinical subgroups. *Ann Rheum Dis.* 2016 Aug;75(8):1558–66.
255. Zheng J, Petersen F, Yu X. The role of PTPN22 in autoimmunity: learning from mice. *Autoimmun Rev.* 2014 Mar;13(3):266–71.
256. Somani A-K, Swick AR, Cooper KD, McCormick TS. Severe dermatomyositis triggered by interferon beta-1a therapy and associated with enhanced type I interferon signaling. *Arch Dermatol.* 2008 Oct;144(10):1341–9.
257. Rayavarapu S, Coley W, Kinder TB, Nagaraju K. Idiopathic inflammatory myopathies: pathogenic mechanisms of muscle weakness. *Skelet Muscle.* 2013 Jun 7;3(1):13.
258. Tan FK, Zhou X, Mayes MD, Gourh P, Guo X, Marcum C, et al. Signatures of differentially regulated interferon gene expression and vasculotrophism in the peripheral blood cells of systemic sclerosis patients. *Rheumatol Oxf Engl.* 2006 Jun;45(6):694–702.
259. York MR, Nagai T, Mangini AJ, Lemaire R, van Seventer JM, Lafyatis R. A macrophage marker, Siglec-1, is increased on circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and induced by type I interferons and toll-like receptor agonists. *Arthritis Rheum.* 2007 Mar;56(3):1010–20.
260. Duan H, Fleming J, Pritchard DK, Amon LM, Xue J, Arnett HA, et al. Combined analysis of monocyte and lymphocyte messenger RNA expression with serum protein profiles in patients with scleroderma. *Arthritis Rheum.* 2008 May;58(5):1465–74.
261. Assassi S, Mayes MD, Arnett FC, Gourh P, Agarwal SK, McNearney TA, et al. Systemic Sclerosis and Lupus. *Arthritis Rheum.* 2010 Feb;62(2):589–98.
262. Brkic Z, van Bon L, Cossu M, van Helden-Meeuwssen CG, Vonk MC, Knaapen H, et al. The interferon type I signature is present in systemic sclerosis before overt fibrosis and might contribute to its pathogenesis through high BAFF gene expression and high collagen synthesis. *Ann Rheum Dis.* 2016 Aug;75(8):1567–73.
263. Mahoney JM, Taroni J, Martyanov V, Wood TA, Greene CS, Pioli PA, et al. Systems level analysis of systemic sclerosis shows a network of immune and profibrotic pathways connected with genetic polymorphisms. *PLoS Comput Biol.* 2015 Jan;11(1):e1004005.
264. Farina G, Lafyatis D, Lemaire R, Lafyatis R. A four-gene biomarker predicts skin disease in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2010 Feb;62(2):580–8.
265. Assassi S, Swindell WR, Wu M, Tan FD, Khanna D, Furst DE, et al. Dissecting the heterogeneity of skin gene expression patterns in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* 2015 Nov;67(11):3016–26.
266. Christmann RB, Sampaio-Barros P, Stifano G, Borges CL, de Carvalho CR, Kairalla R, et al. Association of Interferon- and transforming growth factor β -regulated genes and macrophage

- activation with systemic sclerosis-related progressive lung fibrosis. *Arthritis Rheumatol* Hoboken NJ. 2014 Mar;66(3):714–25.
267. Wuttge DM, Lood C, Tufvesson E, Scheja A, Truedsson L, Bengtsson AA, et al. Increased serum type I interferon activity in early systemic sclerosis patients is associated with antibodies against Sjögren's syndrome antigens and nuclear ribonucleoprotein antigens. *Scand J Rheumatol*. 2013 May 1;42(3):235–40.
268. Kim D, Peck A, Santer D, Patole P, Schwartz SM, Molitor JA, et al. Induction of interferon-alpha by scleroderma sera containing autoantibodies to topoisomerase I: association of higher interferon-alpha activity with lung fibrosis. *Arthritis Rheum*. 2008 Jul;58(7):2163–73.
269. Raschi E, Chighizola CB, Cesana L, Privitera D, Ingegnoli F, Mastaglio C, et al. Immune complexes containing scleroderma-specific autoantibodies induce a profibrotic and proinflammatory phenotype in skin fibroblasts. *Arthritis Res Ther*. 2018 29;20(1):187.
270. Valentini G, Maccoccia A, Cuomo G, Iudici M, Vettori S. The concept of early systemic sclerosis following 2013 ACR/EULAR criteria for the classification of systemic sclerosis. *Curr Rheumatol Rev*. 2014;10(1):38–44.
271. Matsushita T, Hasegawa M, Yanaba K, Kodera M, Takehara K, Sato S. Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis Rheum*. 2006 Jan;54(1):192–201.
272. van Bon L, Affandi AJ, Broen J, Christmann RB, Marijnissen RJ, Stawski L, et al. Proteome-wide Analysis and CXCL4 as a Biomarker in Systemic Sclerosis. *N Engl J Med*. 2014 Jan 30;370(5):433–43.
273. Ah Kioon MD, Tripodo C, Fernandez D, Kirou KA, Spiera RF, Crow MK, et al. Plasmacytoid dendritic cells promote systemic sclerosis with a key role for TLR8. *Sci Transl Med*. 2018 10;10(423).
274. Lande R, Lee EY, Palazzo R, Marinari B, Pietraforte I, Santos GS, et al. CXCL4 assembles DNA into liquid crystalline complexes to amplify TLR9-mediated interferon- α production in systemic sclerosis. *Nat Commun*. 2019 01;10(1):1731.
275. Agarwal SK, Wu M, Livingston CK, Parks DH, Mayes MD, Arnett FC, et al. Toll-like receptor 3 upregulation by type I interferon in healthy and scleroderma dermal fibroblasts. *Arthritis Res Ther*. 2011 Jan 11;13(1):R3.
276. Wu M, Skaug B, Bi X, Mills T, Salazar G, Zhou X, et al. Interferon regulatory factor 7 (IRF7) represents a link between inflammation and fibrosis in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2019 Aug 22;
277. Lehmann MH, Torres-Domínguez LE, Price PJR, Brandmüller C, Kirschning CJ, Sutter G. CCL2 expression is mediated by type I IFN receptor and recruits NK and T cells to the lung during MVA infection. *J Leukoc Biol*. 2016;99(6):1057–64.
278. Wu M, Baron M, Pedroza C, Salazar GA, Ying J, Charles J, et al. CCL-2 in the Circulation Predicts Long-term Progression of Interstitial Lung Disease in Early Systemic Sclerosis Patients: Data from Two Independent Cohorts. *Arthritis Rheumatol* Hoboken NJ. 2017 Sep;69(9):1871–8.
279. McCoy SS, Reed TJ, Berthier CC, Tsou P-S, Liu J, Gudjonsson JE, et al. Scleroderma keratinocytes promote fibroblast activation independent of transforming growth factor beta. *Rheumatol Oxf Engl*. 2017 Nov;56(11):1970–81.
280. Dieudé P, Guedj M, Wipff J, Ruiz B, Hachulla E, Diot E, et al. STAT4 is a genetic risk factor for systemic sclerosis having additive effects with IRF5 on disease susceptibility and related pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum*. 2009 Aug;60(8):2472–9.
281. Gorlova O, Martin J-E, Rueda B, Koeleman BPC, Ying J, Teruel M, et al. Identification of novel genetic markers associated with clinical phenotypes of systemic sclerosis through a genome-wide association strategy. *PLoS Genet*. 2011 Jul;7(7):e1002178.

282. Barizzone N, Monti S, Mellone S, Godi M, Marchini M, Scorza R, et al. Rare Variants in the TREX1 Gene and Susceptibility to Autoimmune Diseases. *BioMed Res Int* [Internet]. 2013 [cited 2019 Sep 22];2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3810194/>
283. Skaug B, Assassi S. Type I interferon dysregulation in Systemic Sclerosis. *Cytokine*. 2019 Jan 23;
284. Silva JL, Faria DS, Teixeira F, Afonso MC, Peixoto D. Systemic sclerosis induced by interferon-alfa treatment of melanoma. *Acta Reumatol Port*. 2017 Sep;42(3):263–4.
285. Powell A, Myles ML, Yacyshyn E. The development of systemic sclerosis in a female patient with multiple sclerosis following beta interferon treatment. *Clin Rheumatol*. 2008 Nov;27(11):1467–8.
286. Black CM, Silman AJ, Herrick AI, Denton CP, Wilson H, Newman J, et al. Interferon-alpha does not improve outcome at one year in patients with diffuse cutaneous scleroderma: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*. 1999 Feb;42(2):299–305.
287. Grassegger A, Schuler G, Hossenberger G, Walder-Hantich B, Jabkowski J, MacHeiner W, et al. Interferon-gamma in the treatment of systemic sclerosis: a randomized controlled multicentre trial. *Br J Dermatol*. 1998 Oct;139(4):639–48.
288. Liu X, Mayes MD, Tan FK, Wu M, Reveille JD, Harper BE, et al. Correlation of interferon-inducible chemokine plasma levels with disease severity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2013 Jan;65(1):226–35.
289. Antonelli A, Fallahi P, Ferrari SM, Giuggioli D, Colaci M, Di Domenicantonio A, et al. Systemic sclerosis fibroblasts show specific alterations of interferon- γ and tumor necrosis factor- α -induced modulation of interleukin 6 and chemokine ligand 2. *J Rheumatol*. 2012 May;39(5):979–85.
290. Chrobak I, Lenna S, Stawski L, Trojanowska M. Interferon- γ promotes vascular remodeling in human microvascular endothelial cells by upregulating endothelin (ET)-1 and transforming growth factor (TGF) β 2. *J Cell Physiol*. 2013 Aug;228(8):1774–83.
291. Tellides G, Tereb DA, Kirkiles-Smith NC, Kim RW, Wilson JH, Schechner JS, et al. Interferon-gamma elicits arteriosclerosis in the absence of leukocytes. *Nature*. 2000 Jan 13;403(6766):207–11.
292. George PM, Oliver E, Dorfmueller P, Dubois OD, Reed DM, Kirkby NS, et al. Evidence for the involvement of type I interferon in pulmonary arterial hypertension. *Circ Res*. 2014 Feb 14;114(4):677–88.
293. Dantas AT, Gonçalves SMC, Pereira MC, de Almeida AR, Marques CDL, Rego MJB de M, et al. Interferons and systemic sclerosis: correlation between interferon gamma and interferon-lambda 1 (IL-29). *Autoimmunity*. 2015;48(7):429–33.
294. van Holten J, Smeets TJM, Blankert P, Tak PP. Expression of interferon beta in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis: comparison with patients with osteoarthritis and reactive arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005 Dec;64(12):1780–2.
295. Smeets TJ, Dayer JM, Kraan MC, Versendaal J, Chicheportiche R, Breedveld FC, et al. The effects of interferon-beta treatment of synovial inflammation and expression of metalloproteinases in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2000 Feb;43(2):270–4.
296. Coclet-Ninin J, Dayer JM, Burger D. Interferon-beta not only inhibits interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha but stimulates interleukin-1 receptor antagonist production in human peripheral blood mononuclear cells. *Eur Cytokine Netw*. 1997 Dec;8(4):345–9.
297. Roelofs MF, Wenink MH, Brentano F, Abdollahi-Roodsaz S, Oppers-Walgreen B, Barrera P, et al. Type I interferons might form the link between Toll-like receptor (TLR) 3/7 and TLR4-mediated synovial inflammation in rheumatoid arthritis (RA). *Ann Rheum Dis*. 2009 Sep;68(9):1486–93.
298. van Holten J, Pavelka K, Vencovsky J, Stahl H, Rozman B, Genovese M, et al. A multicentre, randomised, double blind, placebo controlled phase II study of subcutaneous interferon beta-1a in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005 Jan;64(1):64–9.

299. van der Pouw Kraan TCTM, Wijbrandts CA, van Baarsen LGM, Voskuyl AE, Rustenburg F, Baggen JM, et al. Rheumatoid arthritis subtypes identified by genomic profiling of peripheral blood cells: assignment of a type I interferon signature in a subpopulation of patients. *Ann Rheum Dis*. 2007 Aug;66(8):1008–14.
300. de Jong TD, Blits M, de Ridder S, Vosslander S, Wolbink G, Nurmohamed MT, et al. Type I interferon response gene expression in established rheumatoid arthritis is not associated with clinical parameters. *Arthritis Res Ther*. 2016 12;18(1):290.
301. van Baarsen LGM, Bos WH, Rustenburg F, van der Pouw Kraan TCTM, Wolbink GJJ, Dijkmans BAC, et al. Gene expression profiling in autoantibody-positive patients with arthralgia predicts development of arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010 Mar;62(3):694–704.
302. Lübbers J, Brink M, Stadt LA van de, Vosslander S, Wesseling JG, Schaardenburg D van, et al. The type I IFN signature as a biomarker of preclinical rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2013 May 1;72(5):776–80.
303. Raterman HG, Vosslander S, de Ridder S, Nurmohamed MT, Lems WF, Boers M, et al. The interferon type I signature towards prediction of non-response to rituximab in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther*. 2012 Apr 27;14(2):R95.
304. Wampler Muskardin T, Vashisht P, Dorschner JM, Jensen MA, Chrabot BS, Kern M, et al. Increased pretreatment serum IFN- β/α ratio predicts non-response to tumour necrosis factor α inhibition in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(10):1757–62.
305. Cavanagh LL, Boyce A, Smith L, Padmanabha J, Filgueira L, Pietschmann P, et al. Rheumatoid arthritis synovium contains plasmacytoid dendritic cells. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(2):R230-240.
306. Dieguez-Gonzalez R, Calaza M, Perez-Pampin E, de la Serna AR, Fernandez-Gutierrez B, Castañeda S, et al. Association of interferon regulatory factor 5 haplotypes, similar to that found in systemic lupus erythematosus, in a large subgroup of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008 May;58(5):1264–74.
307. Han T-U, Cho S-K, Kim T, Joo YB, Bae S-C, Kang C. Association of an activity-enhancing variant of IRAK1 and an MECP2-IRAK1 haplotype with increased susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2013 Mar;65(3):590–8.
308. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2007 Sep 6;357(10):977–86.
309. Carlton VEH, Hu X, Chokkalingam AP, Schrodi SJ, Brandon R, Alexander HC, et al. PTPN22 genetic variation: evidence for multiple variants associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*. 2005 Oct;77(4):567–81.
310. Ionescu C, Micu L, Constantinescu I, Hortopan M, Ursaciuc C, Voiculescu M. Prolonged treatment with interferon alpha and peginterferon induces rheumatoid arthritis syndrome and erythema nodosum. *J Gastrointest Liver Dis JGLD*. 2008 Jun;17(2):211–2.
311. Wu Q, Yang Q, Sun H, Li M, Zhang Y, La Cava A. Serum IFN- λ 1 is abnormally elevated in rheumatoid arthritis patients. *Autoimmunity*. 2013 Feb;46(1):40–3.
312. Burks J. Interferon-beta1b for multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother*. 2005 Mar;5(2):153–64.
313. Madsen C. The innovative development in interferon beta treatments of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain Behav [Internet]*. 2017 May 8 [cited 2019 Sep 20];7(6). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5474703/>
314. van Baarsen LGM, van der Pouw Kraan TCTM, Kragt JJ, Baggen JMC, Rustenburg F, Hooper T, et al. A subtype of multiple sclerosis defined by an activated immune defense program. *Genes Immun*. 2006 Sep;7(6):522–31.
315. Comabella M, Lünemann JD, Río J, Sánchez A, López C, Julià E, et al. A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Brain J Neurol*. 2009 Dec;132(Pt 12):3353–65.

316. Mirandola SR, Hallal DEM, Farias AS, Oliveira EC, Brandão CO, Ruocco HH, et al. Interferon-beta modifies the peripheral blood cell cytokine secretion in patients with multiple sclerosis. *Int Immunopharmacol*. 2009 Jul;9(7–8):824–30.
317. Axtell RC, de Jong BA, Boniface K, van der Voort LF, Bhat R, De Sarno P, et al. T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med*. 2010 Apr;16(4):406–12.
318. Severa M, Rizzo F, Giacomini E, Annibali V, Gafa V, Romano S, et al. IFN- β Therapy Regulates TLR7-Mediated Response in Plasmacytoid Dendritic Cells of Multiple Sclerosis Patients Influencing an Anti-Inflammatory Status. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res*. 2015 Sep;35(9):668–81.
319. Poëa-Guyon S, Christadoss P, Panse RL, Guyon T, Baets MD, Wakkach A, et al. Effects of Cytokines on Acetylcholine Receptor Expression: Implications for Myasthenia Gravis. *J Immunol*. 2005 May 15;174(10):5941–9.
320. Panse RL, Cizeron-Clairac G, Cuvelier M, Truffault F, Bismuth J, Nancy P, et al. Regulatory and Pathogenic Mechanisms in Human Autoimmune Myasthenia Gravis. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1132(1):135–42.
321. Cufi P, Dragin N, Ruhlmann N, Weiss JM, Fadel E, Serraf A, et al. Central role of interferon-beta in thymic events leading to myasthenia gravis. *J Autoimmun*. 2014 Aug;52:44–52.
322. Baik SJ, Kim TH, Kim HI, Rhie JY. Myasthenia Crisis Induced by Pegylated-Interferon in Patient With Chronic Hepatitis C: A Case Report. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2016 May [cited 2019 Sep 20];95(21). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4902372/>
323. Dionisiotis J, Zoukos Y, Thomaidis T. Development of myasthenia gravis in two patients with multiple sclerosis following interferon beta treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004 Jul;75(7):1079.
324. Zheng Y, Wheatley LM, Liu T, Levinson AI. Acetylcholine Receptor Alpha Subunit mRNA Expression in Human Thymus: Augmented Expression in Myasthenia Gravis and Upregulation by Interferon- γ . *Clin Immunol*. 1999 May 1;91(2):170–7.
325. Qi G, Liu P, Gu S, Yang H, Dong H, Xue Y. Whole-exome sequencing reveals a rare interferon gamma receptor 1 mutation associated with myasthenia gravis. *Neurol Sci*. 2018 Apr 1;39(4):717–24.
326. Qaisar N, Jurczyk A, Wang JP. Potential role of type I interferon in the pathogenic process leading to type 1 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2018 Apr;25(2):94–100.
327. Oka R, Hiroi N, Shigemitsu R, Sue M, Oshima Y, Yoshida-Hiroi M. Type 1 Diabetes Mellitus Associated with Pegylated Interferon- α Plus Ribavirin Treatment for Chronic Hepatitis C: Case Report and Literature Review. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes*. 2011 Aug 23;4:39–45.
328. Meyer S, Woodward M, Hertel C, Vlaicu P, Haque Y, Kärner J, et al. AIRE-Deficient Patients Harbor Unique High-Affinity Disease-Ameliorating Autoantibodies. *Cell*. 2016 Jul 28;166(3):582–95.
329. Lombardi A, Tsomos E, Hammerstad SS, Tomer Y. Interferon alpha: The key trigger of type 1 diabetes. *J Autoimmun*. 2018 Nov 1;94:7–15.
330. Marwaha AK, Tan S, Dutz JP. Targeting the IL-17/IFN- γ axis as a potential new clinical therapy for type 1 diabetes. *Clin Immunol Orlando Fla*. 2014 Sep;154(1):84–9.
331. Principi N, Berlioli MG, Bianchini S, Esposito S. Type 1 diabetes and viral infections: What is the relationship? *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2017;96:26–31.
332. Lind K, Richardson SJ, Leete P, Morgan NG, Korsgren O, Flodström-Tullberg M. Induction of an antiviral state and attenuated coxsackievirus replication in type III interferon-treated primary human pancreatic islets. *J Virol*. 2013 Jul;87(13):7646–54.
333. Domsgen E, Lind K, Kong L, Hühn MH, Rasool O, van Kuppeveld F, et al. An IFIH1 gene polymorphism associated with risk for autoimmunity regulates canonical antiviral defence pathways in Coxsackievirus infected human pancreatic islets. *Sci Rep*. 2016 21;6:39378.

334. Jabs WJ, Hennig C, Zawatzky R, Kirchner H. Failure to detect antiviral activity in serum and plasma of healthy individuals displaying high activity in ELISA for IFN-alpha and IFN-beta. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res.* 1999 May;19(5):463–9.
335. Canosi U, Mascia M, Gazza L, Serlupi-Crescenzi O, Donini S, Antonetti F, et al. A highly precise reporter gene bioassay for type I interferon. *J Immunol Methods.* 1996 Nov 29;199(1):69–76.
336. Hua J, Kirou K, Lee C, Crow MK. Functional assay of type I interferon in systemic lupus erythematosus plasma and association with anti-RNA binding protein autoantibodies. *Arthritis Rheum.* 2006 Jun;54(6):1906–16.
337. Khabar KSA, Al-Haj L, Al-Zoghaibi F, Marie M, Dhalla M, Polyak SJ, et al. Expressed gene clusters associated with cellular sensitivity and resistance towards anti-viral and anti-proliferative actions of interferon. *J Mol Biol.* 2004 Sep 17;342(3):833–46.
338. Bürgi M de LM, Prieto C, Etcheverrigaray M, Kratje R, Oggero M, Bollati-Fogolín M. WISH cell line: from the antiviral system to a novel reporter gene assay to test the potency of human IFN- α and IFN- β . *J Immunol Methods.* 2012 Jul 31;381(1–2):70–4.
339. Crow MK, Wohlgemuth J. Microarray analysis of gene expression in lupus. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(6):279–87.
340. Mahoney JM, Taroni J, Martyanov V, Wood TA, Greene CS, Pioli PA, et al. Systems level analysis of systemic sclerosis shows a network of immune and profibrotic pathways connected with genetic polymorphisms. *PLoS Comput Biol.* 2015 Jan;11(1):e1004005.
341. El-Sherbiny YM, Psarras A, Yusof MYM, Hensor EMA, Tooze R, Doody G, et al. A novel two-score system for interferon status segregates autoimmune diseases and correlates with clinical features. *Sci Rep.* 2018 Apr 11;8(1):1–11.
342. Wilson DH, Rissin DM, Kan CW, Fournier DR, Piech T, Campbell TG, et al. The Simoa HD-1 Analyzer: A Novel Fully Automated Digital Immunoassay Analyzer with Single-Molecule Sensitivity and Multiplexing. *J Lab Autom.* 2016 Aug;21(4):533–47.
343. Rissin DM, Kan CW, Campbell TG, Howes SC, Fournier DR, Song L, et al. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nat Biotechnol.* 2010 Jun;28(6):595–9.
344. Rodero MP, Decalf J, Bondet V, Hunt D, Rice GI, Werneke S, et al. Detection of interferon alpha protein reveals differential levels and cellular sources in disease. *J Exp Med.* 2017 01;214(5):1547–55.
345. Canadian Hydroxychloroquine Study Group. A randomized study of the effect of withdrawing hydroxychloroquine sulfate in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 1991 17;324(3):150–4.
346. Häcker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, et al. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* 1998 Nov 2;17(21):6230–40.
347. Macfarlane DE, Manzel L. Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1998 Feb 1;160(3):1122–31.
348. Means TK, Latz E, Hayashi F, Murali MR, Golenbock DT, Luster AD. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest.* 2005 Feb;115(2):407–17.
349. Kwok S-K, Lee J-Y, Park S-H, Cho M-L, Min S-Y, Park S-H, et al. Dysfunctional interferon-alpha production by peripheral plasmacytoid dendritic cells upon Toll-like receptor-9 stimulation in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(2):R29.
350. Sacre K, Criswell LA, McCune JM. Hydroxychloroquine is associated with impaired interferon-alpha and tumor necrosis factor-alpha production by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(3):R155.

351. Rempenault C, Combe B, Barnetche T, Gaujoux-Viala C, Lukas C, Morel J, et al. Metabolic and cardiovascular benefits of hydroxychloroquine in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis*. 2018 Jan;77(1):98–103.
352. Reily MM, Pantoja C, Hu X, Chinenov Y, Rogatsky I. The GRIP1:IRF3 interaction as a target for glucocorticoid receptor-mediated immunosuppression. *EMBO J*. 2006 Jan 11;25(1):108–17.
353. Flammer JR, Dobrovolna J, Kennedy MA, Chinenov Y, Glass CK, Ivashkiv LB, et al. The Type I Interferon Signaling Pathway Is a Target for Glucocorticoid Inhibition. *Mol Cell Biol*. 2010 Oct;30(19):4564–74.
354. Chinenov Y, Gupte R, Dobrovolna J, Flammer JR, Liu B, Michelassi FE, et al. Role of transcriptional coregulator GRIP1 in the anti-inflammatory actions of glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jul 17;109(29):11776–81.
355. Bhattacharyya S, Zhao Y, Kay TWH, Muglia LJ. Glucocorticoids target suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) and type 1 interferons to regulate Toll-like receptor-induced STAT1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jun 7;108(23):9554–9.
356. Shodell M, Shah K, Siegal FP. Circulating human plasmacytoid dendritic cells are highly sensitive to corticosteroid administration. *Lupus*. 2003;12(3):222–30.
357. Guiducci C, Gong M, Xu Z, Gill M, Chaussabel D, Meeker T, et al. TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus. *Nature*. 2010 Jun 17;465(7300):937–41.
358. Verhoef CM, van Roon JA, Vianen ME, Lafeber FP, Bijlsma JW. The immune suppressive effect of dexamethasone in rheumatoid arthritis is accompanied by upregulation of interleukin 10 and by differential changes in interferon gamma and interleukin 4 production. *Ann Rheum Dis*. 1999 Jan;58(1):49–54.
359. Agarwal SK, Marshall GD. Role of CD28/B7 costimulation in the dexamethasone-induced suppression of IFN-gamma. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res*. 2000 Nov;20(11):927–34.
360. Schuerwegh AJ, van Offel JF, Bridts CH, Stevens WJ, De Clerck LS. Influence of longterm therapy with methotrexate and low dose corticosteroids on type 1 and type 2 cytokine production in CD4+ and CD8+ T lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2001 Aug;28(8):1793–9.
361. de Jong TD, Snoek T, Mantel E, van der Laken CJ, van Vollenhoven RF, Lems WF. Dynamics of the Type I Interferon Response During Immunosuppressive Therapy in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol [Internet]*. 2019 Apr 24 [cited 2019 Aug 30];10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6491736/>
362. Kang YJ, Kusler B, Otsuka M, Hughes M, Suzuki N, Suzuki S, et al. Calcineurin Negatively Regulates TLR-Mediated Activation Pathways. *J Immunol*. 2007 Oct 1;179(7):4598–607.
363. Hirano K, Ichikawa T, Nakao K, Matsumoto A, Miyaaki H, Shibata H, et al. Differential effects of calcineurin inhibitors, tacrolimus and cyclosporin a, on interferon-induced antiviral protein in human hepatocyte cells. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc*. 2008 Mar;14(3):292–8.
364. Tsuda K, Yamanaka K, Kitagawa H, Akeda T, Naka M, Niwa K, et al. Calcineurin Inhibitors Suppress Cytokine Production from Memory T Cells and Differentiation of Naïve T Cells into Cytokine-Producing Mature T Cells. *PloS One*. 2012 Feb 16;7:e31465.
365. Bouma G, Baggen JM, van Bodegraven AA, Mulder CJJ, Kraal G, Zwiers A, et al. Thiopurine treatment in patients with Crohn’s disease leads to a selective reduction of an effector cytotoxic gene expression signature revealed by whole-genome expression profiling. *Mol Immunol*. 2013 Jul 1;54(3):472–81.
366. Merrill JT, Wallace DJ, Petri M, Kirou KA, Yao Y, White WI, et al. Safety profile and clinical activity of sifalimumab, a fully human anti-interferon α monoclonal antibody, in systemic lupus erythematosus: a phase I, multicentre, double-blind randomised study. *Ann Rheum Dis*. 2011 Jan 11;70(11):1905–13.

367. Yao Y, Higgs BW, Morehouse C, de los Reyes M, Trigona W, Brohawn P, et al. Development of Potential Pharmacodynamic and Diagnostic Markers for Anti-IFN- α Monoclonal Antibody Trials in Systemic Lupus Erythematosus. *Hum Genomics Proteomics HGP* [Internet]. 2009 Nov 17 [cited 2019 Sep 3];2009. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2950308/>
368. Higgs BW, Zhu W, Morehouse C, White WI, Brohawn P, Guo X, et al. A phase 1b clinical trial evaluating sifalimumab, an anti-IFN- α monoclonal antibody, shows target neutralisation of a type I IFN signature in blood of dermatomyositis and polymyositis patients. *Ann Rheum Dis*. 2014 Jan;73(1):256–62.
369. Bissonnette R, Papp K, Maari C, Yao Y, Robbie G, White WI, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase I study of MEDI-545, an anti-interferon- α monoclonal antibody, in subjects with chronic psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. 2010 Mar;62(3):427–36.
370. Khamashta M, Merrill JT, Werth VP, Furie R, Kalunian K, Illei GG, et al. Sifalimumab, an anti-interferon- α monoclonal antibody, in moderate to severe systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Ann Rheum Dis*. 2016 Nov;75(11):1909–16.
371. Kalunian KC, Merrill JT, Maciuga R, McBride JM, Townsend MJ, Wei X, et al. A Phase II study of the efficacy and safety of rontalizumab (rhuMAB interferon- α) in patients with systemic lupus erythematosus (ROSE). *Ann Rheum Dis*. 2016 Jan;75(1):196–202.
372. McBride JM, Jiang J, Abbas AR, Morimoto A, Li J, Maciuga R, et al. Safety and pharmacodynamics of rontalizumab in patients with systemic lupus erythematosus: results of a phase I, placebo-controlled, double-blind, dose-escalation study. *Arthritis Rheum*. 2012 Nov;64(11):3666–76.
373. Amezcua-Guerra LM, Ferrusquía-Toriz D, Castillo-Martínez D, Márquez-Velasco R, Chávez-Rueda AK, Bojalil R. Limited effectiveness for the therapeutic blockade of interferon α in systemic lupus erythematosus: a possible role for type III interferons. *Rheumatology*. 2015 Feb 1;54(2):203–5.
374. Mathian A, Amoura Z, Adam E, Colaone F, Hoekman MFM, Dhellin O, et al. Active immunisation of human interferon α transgenic mice with a human interferon α Kinoid induces antibodies that neutralise interferon α in sera from patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2011 Jun;70(6):1138–43.
375. Kontsek P, Borecký L, Novák M, Kontseková E, Máciková I. Enhancement of neutralizing efficacy by combining three monoclonal antibodies to human interferon- α . *Immunology*. 1991 May;73(1):8–11.
376. Ducreux J, Houssiau FA, Vandepapelière P, Jorgensen C, Lazaro E, Spertini F, et al. Interferon α kinoid induces neutralizing anti-interferon α antibodies that decrease the expression of interferon-induced and B cell activation associated transcripts: analysis of extended follow-up data from the interferon α kinoid phase I/II study. *Rheumatol Oxf Engl*. 2016 Oct;55(10):1901–5.
377. Peng L, Oganessian V, Wu H, Dall'Acqua WF, Damschroder MM. Molecular basis for antagonistic activity of anifrolumab, an anti-interferon- α receptor 1 antibody. *mAbs*. 2015 Jan 21;7(2):428–39.
378. Goldberg A, Geppert T, Schiopu E, Frech T, Hsu V, Simms RW, et al. Dose-escalation of human anti-interferon- α receptor monoclonal antibody MEDI-546 in subjects with systemic sclerosis: a phase 1, multicenter, open label study. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(1):R57.
379. Furie R, Khamashta M, Merrill JT, Werth VP, Kalunian K, Brohawn P, et al. Anifrolumab, an Anti-Interferon- α Receptor Monoclonal Antibody, in Moderate-to-Severe Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol Hoboken Nj*. 2017 Feb;69(2):376–86.

380. Morand EF, Trasieva T, Berglind A, Illei GG, Tummala R. Lupus Low Disease Activity State (LLDAS) attainment discriminates responders in a systemic lupus erythematosus trial: post-hoc analysis of the Phase IIb MUSE trial of anifrolumab. *Ann Rheum Dis*. 2018;77(5):706–13.
381. Franklyn K, Lau CS, Navarra SV, Louthrenoo W, Lateef A, Hamijoyo L, et al. Definition and initial validation of a Lupus Low Disease Activity State (LLDAS). *Ann Rheum Dis*. 2016 Sep;75(9):1615–21.
382. Tanaka Y, Takeuchi T, Okada M, Ishii T, Nakajima H, Kawai S, et al. Safety and tolerability of anifrolumab, a monoclonal antibody targeting type I interferon receptor, in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: A multicenter, phase 2, open-label study. *Mod Rheumatol*. 2019 Feb 22;1–8.
383. Thanou A, Chakravarty E, James JA, Merrill JT. Which outcome measures in SLE clinical trials best reflect medical judgment? *Lupus Sci Med*. 2014 Apr 1;1(1):e000005.
384. Furie R, Werth VP, Merola JF, Stevenson L, Reynolds TL, Naik H, et al. Monoclonal antibody targeting BDCA2 ameliorates skin lesions in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 129(3):1359–71.
385. Testa U, Pelosi E, Frankel A. CD 123 is a membrane biomarker and a therapeutic target in hematologic malignancies. *Biomark Res*. 2014 Feb 10;2(1):4.
386. Brinkmann V, Geiger T, Alkan S, Heusser CH. Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. *J Exp Med*. 1993 Nov 1;178(5):1655–63.
387. Nguyen KB, Cousens LP, Doughty LA, Pien GC, Durbin JE, Biron CA. Interferon alpha/beta-mediated inhibition and promotion of interferon gamma: STAT1 resolves a paradox. *Nat Immunol*. 2000 Jul;1(1):70–6.
388. Rayamajhi M, Humann J, Penheiter K, Andreasen K, Lenz LL. Induction of IFN- $\alpha\beta$ enables *Listeria monocytogenes* to suppress macrophage activation by IFN- γ . *J Exp Med*. 2010 Feb 15;207(2):327–37.
389. Welcher AA, Boedigheimer M, Kivitz AJ, Amoura Z, Buyon J, Rudinskaya A, et al. Blockade of interferon- γ normalizes interferon-regulated gene expression and serum CXCL10 levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2015 Oct;67(10):2713–22.
390. Werth VP, Fiorentino D, Sullivan BA, Boedigheimer MJ, Chiu K, Wang C, et al. Brief Report: Pharmacodynamics, Safety, and Clinical Efficacy of AMG 811, a Human Anti-Interferon- γ Antibody, in Patients With Discoid Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol Hoboken Nj*. 2017 May;69(5):1028.
391. Nograles KE, Zaba LC, Guttman E, Fuentes-Duculan J, Suarez-Farinas M, Cardinale I, et al. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br J Dermatol*. 2008 Nov;159(5):1092–102.
392. Martin DA, Amoura Z, Romero-Diaz J, Chong YB, Sanchez-Guerrero J, Chan T, et al. THU0389 A Multiple Dose Study of AMG 811 (Anti-IFN-Gamma) in Subjects with Systemic Lupus Erythematosus and Active Nephritis. *Ann Rheum Dis*. 2015 Jun 1;74(Suppl 2):337–337.
393. Reinisch W, de Villiers W, Bene L, Simon L, Rácz I, Katz S, et al. Fontolizumab in moderate to severe Crohn's disease: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled, multiple-dose study. *Inflamm Bowel Dis*. 2010 Feb;16(2):233–42.
394. Harden JL, Johnson-Huang LM, Chamian MF, Lee E, Pearce T, Leonardi CL, et al. Humanized anti-IFN- γ (HuZAF) in the treatment of psoriasis. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Feb 1;135(2):553–556.e3.
395. Al-Salama ZT. Emapalumab: First Global Approval. *Drugs*. 2019 Jan;79(1):99–103.
396. Vallurupalli M, Berliner N. Emapalumab for the treatment of relapsed/refractory hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 2019 Sep 19;

397. La Rosée P, Horne A, Hines M, von Bahr Greenwood T, Machowicz R, Berliner N, et al. Recommendations for the management of hemophagocytic lymphohistiocytosis in adults. *Blood*. 2019 Jun 6;133(23):2465–77.
398. Gavand P-E, Serio I, Arnaud L, Costedoat-Chalumeau N, Carvelli J, Dossier A, et al. Clinical spectrum and therapeutic management of systemic lupus erythematosus-associated macrophage activation syndrome: A study of 103 episodes in 89 adult patients. *Autoimmun Rev*. 2017 Jul;16(7):743–9.
399. Lianga J, Xu D, Sun C, Chen W, Cao H, Lina J. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis : A Skeleton in the Cupboard of Adult Idiopathic Inflammatory Myopathies. *J Rheumatol*. 2019 Oct 1;
400. Bizzini B, Achour A. ‘Kinoids’: the basis for anticytokine immunization and their use in HIV infection. *Cell Mol Biol Noisy--Gd Fr*. 1995 May;41(3):351–6.
401. Bensussan A, Bizzini B, Pouletty P, Gallo RC, Zagury D. [Kinoids: a novel generation of specific immune therapy against cytokines]. *Médecine Sci MS*. 2008 Mar;24(3):306–13.
402. Rad FH, Le Buanec H, Paturance S, Larcier P, Genne P, Ryffel B, et al. VEGF kinoid vaccine, a therapeutic approach against tumor angiogenesis and metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 20;104(8):2837–42.
403. Lauwerys BR, Hachulla E, Spertini F, Lazaro E, Jorgensen C, Mariette X, et al. Down-regulation of interferon signature in systemic lupus erythematosus patients by active immunization with interferon α -kinoid. *Arthritis Rheum*. 2013 Feb;65(2):447–56.
404. Belmellat N, Semerano L, Segueni N, Damotte D, Decker P, Ryffel B, et al. Tumor Necrosis Factor-Alpha Targeting Can Protect against Arthritis with Low Sensitization to Infection. *Front Immunol*. 2017;8:1533.
405. Le Buanec H, Delavallée L, Bessis N, Paturance S, Bizzini B, Gallo R, et al. TNF α kinoid vaccination-induced neutralizing antibodies to TNF α protect mice from autologous TNF α -driven chronic and acute inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Dec 19;103(51):19442–7.
406. Durez P, Vandepapeliere P, Miranda P, Toncheva A, Berman A, Kehler T, et al. Therapeutic vaccination with TNF-Kinoid in TNF antagonist-resistant rheumatoid arthritis: a phase II randomized, controlled clinical trial. *PLoS One*. 2014;9(12):e113465.
407. Hao Z-M, Fan X-B, Li S, Lv Y-F, Su H-Q, Jiang H-P, et al. Vaccination with platelet-derived growth factor B kinoids inhibits CCl₄-induced hepatic fibrosis in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012 Sep;342(3):835–42.
408. Gringeri A, Musicco M, Hermans P, Bentwich Z, Cusini M, Bergamasco A, et al. Active anti-interferon-alpha immunization: a European-Israeli, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial in 242 HIV-1--infected patients (the EURIS study). *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology Off Publ Int Retrovirology Assoc*. 1999 Apr 1;20(4):358–70.
409. Cheng L, Ma J, Li J, Li D, Li G, Li F, et al. Blocking type I interferon signaling enhances T cell recovery and reduces HIV-1 reservoirs. *J Clin Invest*. 2017 03;127(1):269–79.
410. Nganou-Makamdop K, Billingsley JM, Yaffe Z, O’Connor G, Tharp GK, Ransier A, et al. Type I IFN signaling blockade by a PASylated antagonist during chronic SIV infection suppresses specific inflammatory pathways but does not alter T cell activation or virus replication. *PLoS Pathog*. 2018;14(8):e1007246.
411. Ng CT, Sullivan BM, Teijaro JR, Lee AM, Welch M, Rice S, et al. Blockade of interferon Beta, but not interferon alpha, signaling controls persistent viral infection. *Cell Host Microbe*. 2015 May 13;17(5):653–61.
412. Amara R, Bosinger S, Su L. Blocking type I interferon signaling to reverse T cell exhaustion and control HIV-1 reservoirs. [cited 2019 Oct 6]; Available from: <http://grantome.com/grant/NIH/R01-AI136990-01A1>

413. Jacquelot N, Yamazaki T, Roberti MP, Duong CPM, Andrews MC, Verlingue L, et al. Sustained Type I interferon signaling as a mechanism of resistance to PD-1 blockade. *Cell Res.* 2019 Oct;29(10):846–61.
414. Guo J, Xiao Y, Iyer R, Lu X, Lake M, Lador U, et al. Empowering therapeutic antibodies with IFN- α for cancer immunotherapy. *PloS One.* 2019;14(8):e0219829.
415. Zagury D, Le Buanec H, Mathian A, Larcier P, Burnett R, Amoura Z, et al. IFN α kinoid vaccine-induced neutralizing antibodies prevent clinical manifestations in a lupus flare murine model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Mar 31;106(13):5294–9.
416. O’Shea JJ, Murray PJ. Cytokine Signaling Modules in Inflammatory Responses. *Immunity.* 2008 Apr 11;28(4):477–87.
417. Gadina M, Gazaniga N, Vian L, Furumoto Y. Small molecules to the rescue: Inhibition of cytokine signaling in immune-mediated diseases. *J Autoimmun.* 2017 Dec 1;85:20–31.
418. Danese S, Argollo M, Berre CL, Peyrin-Biroulet L. JAK selectivity for inflammatory bowel disease treatment: does it clinically matter? *Gut.* 2019 Oct 1;68(10):1893–9.
419. Ostojic A, Vrhovac R, Verstovsek S. Ruxolitinib: a new JAK1/2 inhibitor that offers promising options for treatment of myelofibrosis. *Future Oncol Lond Engl.* 2011 Sep;7(9):1035–43.
420. Hornung T, Janzen V, Heidgen F-J, Wolf D, Bieber T, Wenzel J. Remission of Recalcitrant Dermatomyositis Treated with Ruxolitinib. *N Engl J Med.* 2014 Dec 25;371(26):2537–8.
421. Wenzel J, van Holt N, Maier J, Vonnahme M, Bieber T, Wolf D. JAK1/2 Inhibitor Ruxolitinib Controls a Case of Chilblain Lupus Erythematosus. *J Invest Dermatol.* 2016 Jun 1;136(6):1281–3.
422. Malemud CJ, Blumenthal DE. Protein kinase small molecule inhibitors for rheumatoid arthritis: Medicinal chemistry/clinical perspectives. *World J Orthop.* 2014 Sep 18;5(4):496–503.
423. Punwani N, Burn T, Scherle P, Flores R, Shi J, Collier P, et al. Downmodulation of key inflammatory cell markers with a topical Janus kinase 1/2 inhibitor. *Br J Dermatol.* 2015 Oct;173(4):989–97.
424. Almutairi N, Nour TM, Hussain NH. Janus Kinase Inhibitors for the Treatment of Severe Alopecia Areata: An Open-Label Comparative Study. *Dermatol Basel Switz.* 2019;235(2):130–6.
425. Bokhari L, Sinclair R. Treatment of alopecia universalis with topical Janus kinase inhibitors - a double blind, placebo, and active controlled pilot study. *Int J Dermatol.* 2018 Dec;57(12):1464–70.
426. Joshipura D, Alomran A, Zancanaro P, Rosmarin D. Treatment of vitiligo with the topical Janus kinase inhibitor ruxolitinib: A 32-week open-label extension study with optional narrow-band ultraviolet B. *J Am Acad Dermatol.* 2018 Jun;78(6):1205-1207.e1.
427. Choy EH. Clinical significance of Janus Kinase inhibitor selectivity. *Rheumatology.* 2019 Jun 1;58(6):953–62.
428. Dhillon S. Tofacitinib: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs.* 2017 Dec;77(18):1987–2001.
429. Sandborn WJ, Su C, Sands BE, D’Haens GR, Vermeire S, Schreiber S, et al. Tofacitinib as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *N Engl J Med.* 2017 04;376(18):1723–36.
430. Paik J, Deeks ED. Tofacitinib: A Review in Psoriatic Arthritis. *Drugs.* 2019 Apr;79(6):655–63.
431. Furumoto Y, Smith CK, Blanco L, Zhao W, Brooks SR, Thacker SG, et al. Tofacitinib Ameliorates Murine Lupus and Its Associated Vascular Dysfunction. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* 2017;69(1):148–60.
432. Komai T, Shoda H, Hanata N, Fujio K. Tofacitinib rapidly ameliorated polyarthropathy in a patient with systemic sclerosis. *Scand J Rheumatol.* 2018;47(6):505–6.
433. Chen Z, Wang X, Ye S. Tofacitinib in Amyopathic Dermatomyositis-Associated Interstitial Lung Disease. *N Engl J Med.* 2019 18;381(3):291–3.
434. Yu Z-X, Song H-M. Toward a better understanding of type I interferonopathies: a brief summary, update and beyond. *World J Pediatr WJP.* 2019 Aug 3;

435. Ruperto N, Brunner HI, Zuber Z, Tzaribachev N, Kingsbury DJ, Foeldvari I, et al. Pharmacokinetic and safety profile of tofacitinib in children with polyarticular course juvenile idiopathic arthritis: results of a phase 1, open-label, multicenter study. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2017 Dec 28;15(1):86.
436. Abe M, Nishigori C, Torii H, Ihn H, Ito K, Nagaoka M, et al. Tofacitinib for the treatment of moderate to severe chronic plaque psoriasis in Japanese patients: Subgroup analyses from a randomized, placebo-controlled phase 3 trial. *J Dermatol*. 2017 Nov;44(11):1228–37.
437. Merola JF, Elewski B, Tatulych S, Lan S, Tallman A, Kaur M. Efficacy of tofacitinib for the treatment of nail psoriasis: Two 52-week, randomized, controlled phase 3 studies in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. 2017 Jul;77(1):79-87.e1.
438. Jabbari A, Sansaricq F, Cerise J, Chen JC, Bitterman A, Ulerio G, et al. An Open-Label Pilot Study to Evaluate the Efficacy of Tofacitinib in Moderate to Severe Patch-Type Alopecia Areata, Totalis, and Universalis. *J Invest Dermatol*. 2018;138(7):1539–45.
439. Bissonnette R, Papp KA, Poulin Y, Gooderham M, Raman M, Mallbris L, et al. Topical tofacitinib for atopic dermatitis: a phase IIa randomized trial. *Br J Dermatol*. 2016 Nov;175(5):902–11.
440. Panés J, Sandborn WJ, Schreiber S, Sands BE, Vermeire S, D’Haens G, et al. Tofacitinib for induction and maintenance therapy of Crohn’s disease: results of two phase IIb randomised placebo-controlled trials. *Gut*. 2017;66(6):1049–59.
441. van der Heijde D, Deodhar A, Wei JC, Drescher E, Fleishaker D, Hendrikx T, et al. Tofacitinib in patients with ankylosing spondylitis: a phase II, 16-week, randomised, placebo-controlled, dose-ranging study. *Ann Rheum Dis*. 2017 Aug;76(8):1340–7.
442. Liew SHM, Nichols KK, Klamerus KJ, Li JZ, Zhang M, Foulks GN. Tofacitinib (CP-690,550), a Janus kinase inhibitor for dry eye disease: results from a phase 1/2 trial. *Ophthalmology*. 2012 Jul;119(7):1328–35.
443. Huang J-F, Yafawi R, Zhang M, McDowell M, Rittenhouse KD, Sace F, et al. Immunomodulatory effect of the topical ophthalmic Janus kinase inhibitor tofacitinib (CP-690,550) in patients with dry eye disease. *Ophthalmology*. 2012 Jul;119(7):e43-50.
444. Paley MA, Karacal H, Rao PK, Margolis TP, Miner JJ. Tofacitinib for refractory uveitis and scleritis. *Am J Ophthalmol Case Rep*. 2018 Dec 4;13:53–5.
445. Clark JD, Flanagan ME, Telliez J-B. Discovery and Development of Janus Kinase (JAK) Inhibitors for Inflammatory Diseases. *J Med Chem*. 2014 Jun 26;57(12):5023–38.
446. Taylor PC, Keystone EC, van der Heijde D, Weinblatt ME, Del Carmen Morales L, Reyes Gonzaga J, et al. Baricitinib versus Placebo or Adalimumab in Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med*. 2017 16;376(7):652–62.
447. Wallace DJ, Furie RA, Tanaka Y, Kalunian KC, Mosca M, Petri MA, et al. Baricitinib for systemic lupus erythematosus: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Lond Engl*. 2018 21;392(10143):222–31.
448. Mok CC. The Jakinibs in systemic lupus erythematosus: progress and prospects. *Expert Opin Investig Drugs*. 2019 Jan;28(1):85–92.
449. Sanchez GAM, Reinhardt A, Ramsey S, Wittkowski H, Hashkes PJ, Berkun Y, et al. JAK1/2 inhibition with baricitinib in the treatment of autoinflammatory interferonopathies. *J Clin Invest*. 2018 Jul 2;128(7):3041–52.
450. Guttman-Yassky E, Silverberg JI, Nemoto O, Forman SB, Wilke A, Prescilla R, et al. Baricitinib in adult patients with moderate-to-severe atopic dermatitis: A phase 2 parallel, double-blinded, randomized placebo-controlled multiple-dose study. *J Am Acad Dermatol*. 2019 Apr;80(4):913-921.e9.
451. Jabbari A, Dai Z, Xing L, Cerise JE, Ramot Y, Berkun Y, et al. Reversal of Alopecia Areata Following Treatment With the JAK1/2 Inhibitor Baricitinib. *EBioMedicine*. 2015 Apr;2(4):351–5.

452. Papp KA, Menter MA, Raman M, Disch D, Schlichting DE, Gaich C, et al. A randomized phase 2b trial of baricitinib, an oral Janus kinase (JAK) 1/JAK2 inhibitor, in patients with moderate-to-severe psoriasis. *Br J Dermatol*. 2016 Jun;174(6):1266–76.
453. Papadopoulou C, Hong Y, Omoyinmi E, Brogan PA, Eleftheriou D. Janus kinase 1/2 inhibition with baricitinib in the treatment of juvenile dermatomyositis. *Brain*. 2019 Mar;142(3):e8.
454. Fujita Y, Nawata M, Nagayasu A, Someya K, Saito K, Tanaka Y. Fifty-Two-Week Results of Clinical and Imaging Assessments of a Patient with Rheumatoid Arthritis Complicated by Systemic Sclerosis with Interstitial Pneumonia and Type 1 Diabetes despite Multiple Disease-Modifying Antirheumatic Drug Therapy That Was Successfully Treated with Baricitinib: A Novel Case Report. *Case Rep Rheumatol*. 2019;2019:5293981.
455. Sandborn WJ, Bhandari R, Leighton J, Ganeshappa R, Nguyen D, Ferslew B, et al. P041 THE GUT-SELECTIVE, ORALLY ADMINISTERED, PAN-JAK INHIBITOR TD-1473 DEMONSTRATES FAVORABLE SAFETY, TOLERABILITY, PHARMACOKINETIC, AND SIGNAL FOR CLINICAL ACTIVITY IN SUBJECTS WITH MODERATELY-TO-SEVERELY ACTIVE ULCERATIVE COLITIS. *Gastroenterology*. 2019 Feb 1;156(3):S29–30.
456. Banfield C, Scaramozza M, Zhang W, Kieras E, Page KM, Fensome A, et al. The Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of a TYK2/JAK1 Inhibitor (PF-06700841) in Healthy Subjects and Patients With Plaque Psoriasis. *J Clin Pharmacol*. 2018;58(4):434–47.
457. Xu H, Jesson MI, Seneviratne UI, Lin TH, Sharif MN, Xue L, et al. PF-06651600, a Dual JAK3/TEC Family Kinase Inhibitor. *ACS Chem Biol*. 2019 Jun 21;14(6):1235–42.
458. Lee J, Lee J, Kwok S-K, Baek S, Jang SG, Hong S-M, et al. JAK-1 Inhibition Suppresses Interferon-Induced BAFF Production in Human Salivary Gland: Potential Therapeutic Strategy for Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2018 Dec;70(12):2057–66.
459. Wroblewski ST, Moslin R, Lin S, Zhang Y, Spergel S, Kempson J, et al. Highly Selective Inhibition of Tyrosine Kinase 2 (TYK2) for the Treatment of Autoimmune Diseases: Discovery of the Allosteric Inhibitor BMS-986165. *J Med Chem*. 2019 Jul 18;
460. Singhal S, Shah V, Crater C, Hobar C, Nguyen H, Throup J, et al. 5 Oral selective tyrosine kinase 2 (TYK2) inhibition with BMS-986165 in patients with systemic lupus erythematosus: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled study (PAISLEY). *Lupus Sci Med*. 2019 Apr 1;6(Suppl 1):A5–6.
461. Papp K, Gordon K, Thaçi D, Morita A, Gooderham M, Foley P, et al. Phase 2 Trial of Selective Tyrosine Kinase 2 Inhibition in Psoriasis. *N Engl J Med*. 2018 04;379(14):1313–21.
462. Vosters JL, Landek-Salgado MA, Yin H, Swaim WD, Kimura H, Tak PP, et al. Interleukin-12 induces salivary gland dysfunction in transgenic mice, providing a new model of Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2009 Dec;60(12):3633–41.
463. Fogel O, Rivièrè E, Seror R, Nocturne G, Boudaoud S, Ly B, et al. Role of the IL-12/IL-35 balance in patients with Sjögren syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;142(1):258-268.e5.
464. Chimenti MS, Talamonti M, Novelli L, Teoli M, Galluzzo M, Triggianese P, et al. Long-term ustekinumab therapy of psoriasis in patients with coexisting rheumatoid arthritis and Sjögren syndrome. Report of two cases and review of literature. *J Dermatol Case Rep*. 2015 Sep 30;9(3):71–5.
465. Bonelli M, Dalwigk K, Platzer A, Olmos Calvo I, Hayer S, Niederreiter B, et al. IRF1 is critical for the TNF-driven interferon response in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes : JAKinibs suppress the interferon response in RA-FLSs. *Exp Mol Med*. 2019 Jul 8;51(7):75.
466. Harigai M. Growing evidence of the safety of JAK inhibitors in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Oxf Engl*. 2019 Feb 1;58(Supplement_1):i34–42.
467. Xie W, Huang Y, Xiao S, Sun X, Fan Y, Zhang Z. Impact of Janus kinase inhibitors on risk of cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Ann Rheum Dis*. 2019 Aug;78(8):1048–54.

468. Bechman K, Subesinghe S, Norton S, Atzeni F, Galli M, Cope AP, et al. A systematic review and meta-analysis of infection risk with small molecule JAK inhibitors in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Oxf Engl*. 2019 Apr 14;
469. Winthrop KL, Bingham CO, Komocsar WJ, Bradley J, Issa M, Klar R, et al. Evaluation of pneumococcal and tetanus vaccine responses in patients with rheumatoid arthritis receiving baricitinib: results from a long-term extension trial substudy. *Arthritis Res Ther [Internet]*. 2019 [cited 2019 Aug 31];21. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6471863/>
470. Bodewes ILA, Huijser E, van Helden-Meeuwssen CG, Tas L, Huizinga R, Dalm VASH, et al. TBK1: A key regulator and potential treatment target for interferon positive Sjögren's syndrome, systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis. *J Autoimmun*. 2018 Jul 1;91:97–102.
471. Frémond M-L, Ugenti C, Van Eyck L, Melki I, Bondet V, Kitabayashi N, et al. Brief Report: Blockade of TANK-Binding Kinase 1/IKKε Inhibits Mutant Stimulator of Interferon Genes (STING)-Mediated Inflammatory Responses in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2017;69(7):1495–501.
472. Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, et al. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol*. 2003 May;4(5):491–6.
473. Tenover BR, Ng S-L, Chua MA, McWhirter SM, García-Sastre A, Maniatis T. Multiple functions of the IKK-related kinase IKKepsilon in interferon-mediated antiviral immunity. *Science*. 2007 Mar 2;315(5816):1274–8.
474. Lee KL, Ambler CM, Anderson DR, Boscoe BP, Bree AG, Brodfuehrer JI, et al. Discovery of Clinical Candidate 1-[[[2S,3S,4S]-3-Ethyl-4-fluoro-5-oxopyrrolidin-2-yl]methoxy]-7-methoxyisoquinoline-6-carboxamide (PF-06650833), a Potent, Selective Inhibitor of Interleukin-1 Receptor Associated Kinase 4 (IRAK4), by Fragment-Based Drug Design. *J Med Chem*. 2017 13;60(13):5521–42.
475. Cushing L, Winkler A, Jelinsky SA, Lee K, Korver W, Hawtin R, et al. IRAK4 kinase activity controls Toll-like receptor-induced inflammation through the transcription factor IRF5 in primary human monocytes. *J Biol Chem*. 2017 10;292(45):18689–98.
476. Celhar T, Lu HK, Benso L, Rakhilina L, Lee HY, Tripathi S, et al. TLR7 Protein Expression in Mild and Severe Lupus-Prone Models Is Regulated in a Leukocyte, Genetic, and IRAK4 Dependent Manner. *Front Immunol*. 2019;10:1546.
477. Zhou X-X, Gao P-J, Sun B-G. Pravastatin attenuates interferon-gamma action via modulation of STAT1 to prevent aortic atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009 Apr;36(4):373–9.
478. Frank DA, Mahajan S, Ritz J. Fludarabine-induced immunosuppression is associated with inhibition of STAT1 signaling. *Nat Med*. 1999 Apr;5(4):444–7.
479. Antonczyk A, Krist B, Sajek M, Michalska A, Piaszyk-Borychowska A, Plens-Galaska M, et al. Direct Inhibition of IRF-Dependent Transcriptional Regulatory Mechanisms Associated With Disease. *Front Immunol [Internet]*. 2019 May 24 [cited 2019 Aug 29];10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6543449/>
480. Monnet E, Lapeyre G, Poelgeest E van, Jacqmin P, Graaf K de, Reijers J, et al. Evidence of NI-0101 pharmacological activity, an anti-TLR4 antibody, in a randomized phase I dose escalation study in healthy volunteers receiving LPS. *Clin Pharmacol Ther*. 2017 Feb;101(2):200–8.
481. Balak DMW, van Doorn MBA, Arbeit RD, Rijneveld R, Klaassen E, Sullivan T, et al. IMO-8400, a toll-like receptor 7, 8, and 9 antagonist, demonstrates clinical activity in a phase 2a, randomized, placebo-controlled trial in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis. *Clin Immunol Orlando Fla*. 2017;174:63–72.

482. Sudhalkar A, Khamar M, Khamar B. Outcomes of toll-like receptors' antagonism in steroid-resistant optic neuritis; a pilot study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*. 2012 Jun;250(6):871–7.
483. Sudhalkar A, Khamar M, Khamar B. Mycobacterium W administration for steroid resistant optic neuritis with long-term follow-up. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*. 2014 Dec;252(12):1999–2003.
484. Brito-Zerón P, Kostov B, Solans R, Fraile G, Suárez-Cuervo C, Casanovas A, et al. Systemic activity and mortality in primary Sjögren syndrome: predicting survival using the EULAR-SS Disease Activity Index (ESSDAI) in 1045 patients. *Ann Rheum Dis*. 2014 Nov 28;annrheumdis-2014-206418.
485. Nocturne G, Mariette X. Sjögren Syndrome-associated lymphomas: an update on pathogenesis and management. *Br J Haematol*. 2015 Feb;168(3):317–27.
486. Gottenberg J-E, Ravaud P, Puéchal X, Le Guern V, Sibilia J, Goeb V, et al. Effects of hydroxychloroquine on symptomatic improvement in primary Sjögren syndrome: the JOQUER randomized clinical trial. *JAMA*. 2014 Jul 16;312(3):249–58.
487. Bodewes I LA, Gottenberg J-E, van Helden-Meeuwesen CG, Mariette X, Versnel MA. Hydroxychloroquine treatment downregulates systemic interferon activation in primary Sjögren's syndrome in the JOQUER randomized trial. *Rheumatol Oxf Engl*. 2019 Jun 25;
488. Mirouse A, Seror R, Vicaut E, Mariette X, Dougados M, Fauchais A-L, et al. Arthritis in primary Sjögren's syndrome: Characteristics, outcome and treatment from French multicenter retrospective study. *Autoimmun Rev*. 2019 Jan;18(1):9–14.
489. Mavragani CP, Moutsopoulos HM. Primary versus Secondary Sjögren Syndrome: Is It Time To Reconsider These Terms? *J Rheumatol*. 2019 Jul;46(7):665–6.
490. Henault J, Riggs JM, Karnell JL, Liarski VM, Li J, Shirinian L, et al. Self-reactive IgE exacerbates interferon responses associated with autoimmunity. *Nat Immunol*. 2016 Feb;17(2):196–203.
491. Hasni S, Gupta S, Davis M, Poncio E, Temesgen-Oyelakin Y, Joyal E, et al. Safety and Tolerability of Omalizumab: A Randomized Clinical Trial of Humanized Anti-IgE Monoclonal Antibody in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2019 Jul;71(7):1135–40.
492. Donate A, Voigt A, Nguyen CQ. The value of animal models to study immunopathology of primary human Sjögren's syndrome symptoms. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014 Apr;10(4):469–81.
493. Lavoie TN, Lee BH, Nguyen CQ. Current Concepts: Mouse Models of Sjögren's Syndrome. *J Biomed Biotechnol [Internet]*. 2011 [cited 2015 Jun 7];2011. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3018660/>
494. Delaleu N, Nguyen CQ, Peck AB, Jonsson R. Sjögren's syndrome: studying the disease in mice. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(3):217.
495. Moutsopoulos HM, Chused TM, Mann DL, Klippel JH, Fauci AS, Frank MM, et al. Sjögren's syndrome (Sicca syndrome): current issues. *Ann Intern Med*. 1980 Feb;92(2 Pt 1):212–26.
496. Moutsopoulos HM, Webber BL, Vlagopoulos TP, Chused TM, Decker JL. Differences in the clinical manifestations of sicca syndrome in the presence and absence of rheumatoid arthritis. *Am J Med*. 1979 May;66(5):733–6.
497. Tsianos EV, Hoofnagle JH, Fox PC, Alspaugh M, Jones EA, Schafer DF, et al. Sjögren's syndrome in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology Baltim Md*. 1990 May;11(5):730–4.
498. Manoussakis MN, Georgopoulou C, Zintzaras E, Spyropoulou M, Stavropoulou A, Skopouli FN, et al. Sjögren's syndrome associated with systemic lupus erythematosus: clinical and laboratory profiles and comparison with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2004 Mar;50(3):882–91.
499. Salliot C, Mouthon L, Ardizzone M, Sibilia J, Guillevin L, Gottenberg J-E, et al. Sjögren's syndrome is associated with and not secondary to systemic sclerosis. *Rheumatol Oxf Engl*. 2007 Feb;46(2):321–6.

500. Drosos AA, Andonopoulos AP, Costopoulos JS, Stavropoulos ED, Papadimitriou CS, Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome in progressive systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 1988 Jun;15(6):965–8.
501. Park Y-S, Gauna AE, Cha S. Mouse models of primary Sjögren's syndrome. *Curr Pharm Des*. 2015;21(18):2350–64.
502. Jain S, Stock A, Macian F, Putterman C. A Distinct T Follicular Helper Cell Subset Infiltrates the Brain in Murine Neuropsychiatric Lupus. *Front Immunol*. 2018;9:487.
503. Faridi MH, Khan SQ, Zhao W, Lee HW, Altintas MM, Zhang K, et al. CD11b activation suppresses TLR-dependent inflammation and autoimmunity in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 127(4):1271–83.
504. Sang A, Danhorn T, Peterson JN, Rankin AL, O'Connor BP, Leach SM, et al. Innate and adaptive signals enhance differentiation and expansion of dual-antibody autoreactive B cells in lupus. *Nat Commun*. 2018 28;9(1):3973.
505. Xue L, Liu L, Huang J, Wen J, Yang R, Bo L, et al. Tumor Necrosis Factor-Like Weak Inducer of Apoptosis Activates Type I Interferon Signals in Lupus Nephritis. *BioMed Res Int [Internet]*. 2017 [cited 2019 Oct 9];2017. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5733219/>
506. Hron JD, Peng SL. Type I IFN protects against murine lupus. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Aug 1;173(3):2134–42.
507. Yasuda K, Watkins AA, Kochar GS, Wilson GE, Laskow B, Richez C, et al. Interferon regulatory factor-5 deficiency ameliorates disease severity in the MRL/lpr mouse model of lupus in the absence of a mutation in DOCK2. *PLoS One*. 2014;9(7):e103478.
508. Baccala R, Gonzalez-Quintal R, Schreiber RD, Lawson BR, Kono DH, Theofilopoulos AN. Anti-IFN- α/β receptor antibody treatment ameliorates disease in lupus-predisposed mice. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012 Dec 15;189(12):5976–84.
509. Mavragani CP, Moutsopoulos HM. Drs. Mavragani and Moutsopoulos reply. *J Rheumatol*. 2019 Sep 15;jrheum.190837.
510. van Doorn E, Liu H, Huckriede A, Hak E. Safety and tolerability evaluation of the use of Montanide ISATM51 as vaccine adjuvant: A systematic review. *Hum Vaccines Immunother*. 2016;12(1):159–69.
511. O'Hagan DT, Ott GS, Nest GV, Rappuoli R, Giudice GD. The history of MF59(®) adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. *Expert Rev Vaccines*. 2013 Jan;12(1):13–30.
512. Zhang N, Channappanavar R, Ma C, Wang L, Tang J, Garron T, et al. Identification of an ideal adjuvant for receptor-binding domain-based subunit vaccines against Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Cell Mol Immunol*. 2016 Mar;13(2):180–90.
513. Permin H, Wiik A. The prevalence of IgE antinuclear antibodies in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Acta Pathol Microbiol Scand [C]*. 1978 Oct;86C(5):245–9.
514. Quartuccio L, Baldini C, Bartoloni E, Priori R, Carubbi F, Corazza L, et al. Anti-SSA/SSB-negative Sjögren's syndrome shows a lower prevalence of lymphoproliferative manifestations, and a lower risk of lymphoma evolution. *Autoimmun Rev*. 2015 Nov;14(11):1019–22.
515. Kyriakidis NC, Kapsogeorgou EK, Tzioufas AG. A comprehensive review of autoantibodies in primary Sjögren's syndrome: clinical phenotypes and regulatory mechanisms. *J Autoimmun*. 2014 Jun;51:67–74.
516. Jamilloux Y, El Jammal T, Vuitton L, Gerfaud-Valentin M, Kerever S, Sève P. JAK inhibitors for the treatment of autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev*. 2019 Sep 11;102390.
517. Bose P, Verstovsek S. JAK2 inhibitors for myeloproliferative neoplasms: what is next? *Blood*. 2017 13;130(2):115–25.
518. Lee J, Lee J, Kwok S-K, Baek S, Jang SG, Hong S-M, et al. JAK-1 Inhibition Suppresses Interferon-Induced BAFF Production in Human Salivary Gland: Potential Therapeutic Strategy for Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2018;70(12):2057–66.

519. Abaza Y, Yin CC, Bueso-Ramos CE, Wang SA, Verstovsek S. Primary autoimmune myelofibrosis: a case report and review of the literature. *Int J Hematol*. 2017 Apr;105(4):536–9.
520. Pullarkat V, Bass RD, Gong JZ, Feinstein DI, Brynes RK. Primary autoimmune myelofibrosis: definition of a distinct clinicopathologic syndrome. *Am J Hematol*. 2003 Jan;72(1):8–12.
521. Chalayer E, Ffrench M, Cathébras P. Bone marrow fibrosis as a feature of systemic lupus erythematosus: a case report and literature review. *SpringerPlus*. 2014;3:349.
522. Vergara-Lluri ME, Piatek CI, Pullarkat V, Siddiqi IN, O’Connell C, Feinstein DI, et al. Autoimmune myelofibrosis: an update on morphologic features in 29 cases and review of the literature. *Hum Pathol*. 2014 Nov;45(11):2183–91.
523. Marie I, Levesque H, Cailleux N, Lepretre S, Duval C, Tilly H, et al. An uncommon association: Sjögren’s syndrome and autoimmune myelofibrosis. *Rheumatol Oxf Engl*. 1999 Apr;38(4):370–1.
524. Takahashi T. Autoimmune myelofibrosis accompanied by Sjögren’s syndrome in a 47, XXX/46, XX mosaic woman. *Intern Med Tokyo Jpn*. 2014;53(7):783–7.
525. Mavragani CP. Mechanisms and New Strategies for Primary Sjögren’s Syndrome. *Annu Rev Med*. 2017 Jan 14;68(1):331–43.
526. Lee J, Lee J, Kwok S-K, Baek S, Jang SG, Hong S-M, et al. JAK-1 Inhibition Suppresses Interferon-Induced BAFF Production in Human Salivary Gland: Potential Therapeutic Strategy for Primary Sjögren’s Syndrome. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2018;70(12):2057–66.
527. Bouros D, Pneumatikos I, Tzouveleki A. Pleural involvement in systemic autoimmune disorders. *Respir Int Rev Thorac Dis*. 2008;75(4):361–71.
528. Kröner PT, Tolaymat OA, Bowman AW, Abril A, Lacy BE. Gastrointestinal Manifestations of Rheumatological Diseases. *Am J Gastroenterol*. 2019 Sep;114(9):1441–54.
529. Liao C-Y, Chien S-T, Wang C-C, Chen I-H, Chiu H-W, Liu M-Y, et al. Sjögren’s syndrome associated with protein losing gastroenteropathy manifested by intestinal lymphangiectasia successfully treated with prednisolone and hydroxychloroquine. *Lupus*. 2015 Dec;24(14):1552–6.
530. Paydas S. Tafro syndrome: Critical review for clinicians and pathologists. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018 Aug 1;128:88–95.
531. Takai K, Nikkuni K, Momoi A, Nagai K, Igarashi N, Saeki T. Thrombocytopenia with reticulinn fibrosis accompanied by fever, anasarca and hepatosplenomegaly : a clinical report of five cases. *J Clin Exp Hematop JCEH*. 2013;53(1):63–8.
532. Takai K, Nikkuni K, Shibuya H, Hashidate H. [Thrombocytopenia with mild bone marrow fibrosis accompanied by fever, pleural effusion, ascites and hepatosplenomegaly]. *Rinsho Ketsueki*. 2010 May;51(5):320–5.
533. Iwaki N, Fajgenbaum DC, Nabel CS, Gion Y, Kondo E, Kawano M, et al. Clinicopathologic analysis of TAFRO syndrome demonstrates a distinct subtype of HHV-8-negative multicentric Castleman disease. *Am J Hematol*. 2016 Feb;91(2):220–6.
534. Masaki Y, Kawabata H, Takai K, Kojima M, Tsukamoto N, Ishigaki Y, et al. Proposed diagnostic criteria, disease severity classification and treatment strategy for TAFRO syndrome, 2015 version. *Int J Hematol*. 2016 Jun 1;103(6):686–92.
535. Abdo LA. First European Case of TAFRO Syndrome Associated with Sjogren Disease. *Am J Intern Med*. 2014;2(6):102.
536. Fujimoto S, Kawabata H, Kurose N, Kawanami-Iwao H, Sakai T, Kawanami T, et al. Sjögren’s syndrome manifesting as clinicopathological features of TAFRO syndrome. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2017 Dec 15 [cited 2019 Oct 2];96(50). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5815761/>
537. Kojima M, Nakamura N, Tsukamoto N, Yokohama A, Itoh H, Kobayashi S, et al. Multicentric Castleman’s disease representing effusion at initial clinical presentation: clinicopathological study of seven cases. *Lupus*. 2011 Jan;20(1):44–50.

538. Iwaki N, Gion Y, Kondo E, Kawano M, Masunari T, Moro H, et al. Elevated serum interferon γ -induced protein 10 kDa is associated with TAFRO syndrome. *Sci Rep.* 2017 13;7:42316.
539. You T, Bi Y, Li J, Zhang M, Chen X, Zhang K, et al. IL-17 induces reactive astrocytes and up-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) through JAK/STAT signaling. *Sci Rep.* 2017 10;7:41779.
540. Qin B, Wang J, Yang Z, Yang M, Ma N, Huang F, et al. Epidemiology of primary Sjögren's syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis.* 2015 Nov;74(11):1983–9.
541. Devauchelle-Pensec V, Gottenberg J-E, Jousse-Joulin S, Berthelot J-M, Perdriger A, Hachulla E, et al. Which and How Many Patients Should Be Included in Randomised Controlled Trials to Demonstrate the Efficacy of Biologics in Primary Sjögren's Syndrome? *PLoS One.* 2015;10(9):e0133907.
542. Jeltsch-David H, Muller S. Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus and cognitive dysfunction: The MRL-lpr mouse strain as a model. *Autoimmun Rev.* 2014 Sep;13(9):963–73.
543. Hasegawa H, Inoue A, Kohno M, Muraoka M, Miyazaki T, Terada M, et al. Antagonist of interferon-inducible protein 10/CXCL10 ameliorates the progression of autoimmune sialadenitis in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum.* 2006 Apr 1;54(4):1174–83.
544. Nicoletti F, Di Marco R, Zaccone P, Xiang M, Magro G, Grasso S, et al. Dichotomic effects of IFN-gamma on the development of systemic lupus erythematosus-like syndrome in MRL-lpr / lpr mice. *Eur J Immunol.* 2000 Feb;30(2):438–47.
545. Kim N, Ussin L, Cheng X, Murali R, Sullivan KE. TNF α inhibition in MRL/lpr mice ameliorates pulmonary but not renal disease. *J Autoimmun.* 2002 Dec;19(4):215–22.
546. Zeng J, Meng X, Zhou P, Yin Z, Xie Q, Zou H, et al. Interferon- α exacerbates neuropsychiatric phenotypes in lupus-prone mice. *Arthritis Res Ther [Internet].* 2019 [cited 2019 Oct 4];21. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6724270/>
547. Huang MW, Stock AD, Mike EV, Herlitz L, Kolbeck R, Putterman C. Anti-IFNAR treatment does not reverse neuropsychiatric disease in MRL/lpr lupus mice. *Lupus.* 2019 Aug 31;0961203319872265.
548. Shen L, Zhang C, Wang T, Brooks S, Ford RJ, Lin-Lee YC, et al. Development of autoimmunity in IL-14 α -transgenic mice. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2006 Oct 15;177(8):5676–86.
549. Shen L, Suresh L, Li H, Zhang C, Kumar V, Pankewycz O, et al. IL-14 α , the nexus for primary Sjögren's disease in mice and humans. *Clin Immunol Orlando Fla.* 2009 Mar;130(3):304–12.
550. Shen L, Suresh L, Malyavantham K, Kowal P, Xuan J, Lindemann MJ, et al. Different Stages of Primary Sjögren's Syndrome Involving Lymphotoxin and Type 1 IFN. *J Immunol.* 2013 Jul 15;191(2):608–13.
551. Choi IY, Piccio L, Childress P, Bollman B, Ghosh A, Brandhorst S, et al. Diet mimicking fasting promotes regeneration and reduces autoimmunity and multiple sclerosis symptoms. *Cell Rep.* 2016 Jun 7;15(10):2136–46.
552. Mayr LM, Su B, Moog C. Non-Neutralizing Antibodies Directed against HIV and Their Functions. *Front Immunol [Internet].* 2017 Nov 20 [cited 2019 Oct 5];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5701973/>
553. Roblin X, Boschetti G, Duru G, Williet N, Deltedesco E, Phelip JM, et al. Distinct Thresholds of Infliximab Trough Level Are Associated with Different Therapeutic Outcomes in Patients with Inflammatory Bowel Disease: A Prospective Observational Study. *Inflamm Bowel Dis.* 2017;23(11):2048–53.
554. Martelli L, Olivera P, Roblin X, Attar A, Peyrin-Biroulet L. Cost-effectiveness of drug monitoring of anti-TNF therapy in inflammatory bowel disease and rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Gastroenterol.* 2017 Jan 1;52(1):19–25.
555. Williet N, Paul S, Peyrin-Biroulet L, Roblin X. Pharmacokinetics of Infliximab and Reduction of Treatment for Inflammatory Bowel Diseases. *Dig Dis Sci.* 2016 Apr;61(4):990–5.

Impact of genetic predisposition of de novo uveitis with etanercept in ankylosing spondylitis

We read with interest the paper by Sieper *et al*¹ reporting acute anterior uveitis (AAU) during etanercept or sulfasalazine therapies for axial spondyloarthritis (AxSpA). AAU is a well-known symptom in AxSpA without therapy and is itself a good indication for tumour necrosis factor (TNF) blockers.² However during the last years, new onsets of AAU were reported with TNF blockers,³ as a paradoxical effect of this therapy, similarly to paradoxical psoriasis. New onset of AAU occurred mainly in AxSpA (19 cases) compared with other rheumatic conditions (12 cases) according to data from the French nationwide network.⁴

The real mechanism of this type of AAU is not yet elucidated. We would like to suggest a potential genetic predisposition for this type of event by reporting cases in two related patients, both followed for AxSpA in the Department of Rheumatology at University Hospital of Saint-Etienne. They both developed AAU with etanercept therapy, whereas rheumatic symptoms were under control, similarly to many cases reported.⁴ AAU resolved rapidly with local therapy without etanercept discontinuation in both patients. However, AAU relapsed and the decision was taken to switch etanercept to another TNF blocker: infliximab for the first case (who had been treated by adalimumab before) and adalimumab for the second case, with no AAU relapse to date. AAU was more frequently reported with etanercept, the soluble receptor p55, than with monoclonal antibody TNF blockers. This discrepancy between TNF blockers may be due to the specific structure of etanercept, which is a fusion protein combining two extracellular ligand-binding portions of the human soluble TNF receptor p75 with the end Fc fragment of human immunoglobulin G1.⁵

Since de novo uveitis is a rare event with approximately 1 case for 100 patient-years exposed to TNF blockers,¹⁻⁴ occurrence in two cousins from the same family, both treated for AxSpA by etanercept, suggested a genetic predisposition to this paradoxical side effect with TNF blockers. Since the microsatellite, D9S157, on chromosome 9p was identified by genome-wide scan to be associated with AAU in AxSpA,⁶ we analysed this region using several microsatellites in these two patients. Both patients shared an identical allele at three contiguous polymorphic markers, located at 9p21.3–p22.2: D9S157, D9S1684 and D9S162, but are different for D9S156 and D9S171. This locus covers approximately a 6 Mb interval and contains some 37 genes. This identity might be an additional indication for a genetic predisposition to uveitis at this locus, and along these lines, it is noteworthy that the cluster of interferon type 1 genes is present in this region between markers D9S162 and D9S171.

Conversely, in our family, there is a probability of 1/16 that this haplotype identity occurred by chance. Further experiments are required to determine the specific gene from this area related to AAU.

According to our experience and the findings of this genetic analysis, we would suggest avoiding etanercept among TNF blockers when patients present a familial history of uveitis.

Martin Killian,¹ Renaud Touraine,² Adamah Amouzougan,¹ Thierry Thomas,^{1,3} Hubert Marotte^{1,3}

¹Rheumatology Department, University Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France

²Laboratory of Genetics Saint-Etienne, University Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France

³INSERM U1059/LBTO, Université de Lyon – Université Jean Monnet, Saint-Etienne, France

Correspondence to Professor Hubert Marotte, Department of Rheumatology, Hôpital Nord, University Hospital of Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne, Cedex 02, France; hubert.marotte@chu-st-etienne.fr

Contributors MK, AA, TT and HM participated in the follow-up of patients. RT performed genetic analysis. All authors have reviewed the paper in questions, help draft the letter and gave consent for the final version.

Competing interests None.

Patient consent Obtained.

Provenance and peer review Not commissioned; internally peer reviewed.



CrossMark

To cite Killian M, Touraine R, Amouzougan A, *et al*. *Ann Rheum Dis* 2015;**74**:e22.

Received 12 October 2014

Revised 29 October 2014

Accepted 7 November 2014

Published Online First 2 December 2014

Ann Rheum Dis 2015;**74**:e22. doi:10.1136/annrheumdis-2014-206776

REFERENCES

- 1 Sieper J, Koenig A, Baumgartner S, *et al*. Analysis of uveitis rates across all etanercept ankylosing spondylitis clinical trials. *Ann Rheum Dis* 2010;**69**:226–9.
- 2 Guignard S, Gossec L, Salliot C, *et al*. Efficacy of tumour necrosis factor blockers in reducing uveitis flares in patients with spondyloarthropathy: a retrospective study. *Ann Rheum Dis* 2006;**65**:1631–4.
- 3 Fouache D, Goëb V, Massy-Guillemant N, *et al*. Paradoxical adverse events of anti-tumour necrosis factor therapy for spondyloarthropathies: a retrospective study. *Rheumatology (Oxford)* 2009;**48**:761–4.
- 4 Wendling D, Paccou J, Berthelot J-M, *et al*. New onset of uveitis during anti-tumour necrosis factor treatment for rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 2011;**41**:503–10.
- 5 Marotte H, Cimaz R. Etanercept—TNF receptor and IgG1 Fc fusion protein: is it different from other TNF blockers? *Expert Opin Biol Ther* 2014;**14**:569–72.
- 6 Martin TM, Zhang G, Luo J, *et al*. A locus on chromosome 9p predisposes to a specific disease manifestation, acute anterior uveitis, in ankylosing spondylitis, a genetically complex, multisystem, inflammatory disease. *Arthritis Rheum* 2005;**52**:269–74.

Vaccine hesitancy among general practitioners: evaluation and comparison of their immunisation practice for themselves, their patients and their children

M. Killian^{1,2,3} · M. Detoc^{2,3} · P. Berthelot^{1,2,3} · R. Charles⁴ · A. Gagneux-Brunon^{1,2,3} · F. Lucht^{1,2,3} · C. Pulcini^{5,6} · S. Barbois¹ · E. Botelho-Nevers^{1,2,3}

Received: 11 May 2016 / Accepted: 14 July 2016 / Published online: 3 August 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract To gain knowledge about vaccine hesitancy among general practitioners (GPs), we conducted a survey to compare their vaccination attitudes for themselves, their children and their patients. A questionnaire survey was sent to GPs working in private practice in the Rhône-Alpes region, France, between October 2013 and January 2014. GPs' immunisation practices for diphtheria–tetanus–poliomyelitis (DTP), measles–mumps–rubella (MMR), pneumococcal, pertussis, hepatitis B (hepB), human papillomavirus (HPV), seasonal and H1N1 influenza and meningococcal C (menC) vaccines were considered. Divergence was defined by the presence of at least one different immunisation practice between their patients and their children. A total of 693 GPs answered the questionnaire. When considering all investigated vaccines, 45.7 % of divergence was found. Individually, divergence was highest for the newest and more controversial, i.e. HPV

(11.8 %), hepB (13.1 %), menC (23.7 %) and pneumococcal (19.8 %) vaccines. Only 73.9 % of GPs declared that they recommended HPV vaccine for their daughters. After multivariate analysis, older age was associated with higher risk of divergence. According to the French 2012 recommendations, GPs were insufficiently immunised, with 88 % for DTP and 72 % for pertussis. GPs declared to recommend vaccination against DTP, pertussis and MMR for their patients and their children in more than 95 % of cases. The declared rates of recommendation were lower than 90 % for other vaccines. These results bring new insight about vaccine hesitancy. GPs have divergent immunisation attitudes toward their relatives and their patients, especially when considering the newest and most controversial vaccines, with HPV vaccine being the main focus of controversies.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10096-016-2735-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ E. Botelho-Nevers
e.botelhonevers@gmail.com

- ¹ Infectious Diseases Department, University Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France
- ² GIMAP EA 3064 (Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes), University of Lyon, Saint-Etienne, France
- ³ Centre of Clinical Investigation Vaccinology (CIC) 1408 INSERM, University Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France
- ⁴ General Practice Department, University of Lyon, Saint-Etienne, France
- ⁵ University of Lorraine, Paris Descartes University, EA 4360 APEMAC, Nancy, France
- ⁶ Infectious and Tropical Diseases Department, University Hospital of Nancy, Nancy, France

Introduction

Vaccination is one of the greatest and cost-effective successes of modern medicine, saving countless lives and preventing many disabilities, even now [1]. Despite the existence of an overwhelming flow of evidences pleading for vaccines' efficacy, it seems to have disappeared from the collective memory. This apparent memory loss, associated to the emergence of several vaccine controversies empowered by mass media [2], have created an atmosphere of mistrust toward immunisation matters in the general population during the last 15 years [3].

A new concept called 'vaccine hesitancy' has emerged during these past years and has become a growing focus of concern because of its great potential of harm. To address this important issue, a specific Working Group on Vaccine Hesitancy was established in 2012 within the Strategic Advisory Group of Experts (SAGE) on immunisation, which is the main advisory group to the World Health Organization (WHO) in the field of

vaccines. The experts developed a definition for this notion: “Vaccine hesitancy refers to a delay in acceptance or refusal of vaccination despite availability of vaccination services. Vaccine hesitancy is complex and context specific, varying across time, place, and vaccines. It is influenced by factors such as complacency, convenience and confidence” [4]. As stated in this definition, vaccine hesitancy is a worldwide problem, affecting low- and high-income countries alike [5]. It is important to understand that vaccine hesitancy encompasses vaccine refusal, whose participation in lowering vaccine coverage is difficult to measure, but also vaccine acceptance with doubts about its safety and/or benefits. This second part is harder to detect, can eventually lead to vaccine refusal depending on the context and vaccine hesitancy’s evaluation requires complex survey tools anyway [6]. Because of the difficulties in evaluating vaccine hesitancy itself, its real impact is even harder to measure, but many recent outbreaks of vaccine-preventable diseases have been linked to undervaccinated or non-vaccinated communities [7]. In France, doubts and questions were raised about the reliability of information provided by authorities and the safety of specific vaccines, such as hepatitis B (hepB) [8] or human papillomavirus (HPV) [9], as well as aluminium-based adjuvants [10].

General practitioners (GPs), by their recommendations and administration of vaccines to their patients, play a major role in vaccination. They notably influence their patients’ vaccination behaviour [11, 12]. On the other hand, as individual persons or parents, physicians are free to choose their own vaccination practice, for themselves and for their children, in accordance with their own beliefs. Although physicians are generally favourable to vaccination, previous studies have reported growing prevalence rates of doubts about vaccine harmlessness and utility [13, 14]. Hesitant physicians were shown to be less convincing relays to recommend vaccines to their patients [13, 15, 16].

To gain insight on the complex issue that is vaccine hesitancy among GPs, the aim of our study was to compare vaccine policies of GPs for themselves, their children and their patients.

Materials and methods

An invitation to complete a Web-based survey (hosted on GoogleDrive®) about vaccination was sent by e-mail to GPs working in private practice in the Rhône-Alpes region, France. In October 2013, the questionnaire was sent by the medical councils of 6 out of 8 counties (Loire, Ardèche, Drôme, Isère, Savoie and Haute-Savoie) in the region, to their affiliated GPs. A second e-mail was sent in January 2014, by the regional union of healthcare professionals (URPS Rhône-Alpes) to their 2839 GP adherents (representing almost 50 % of the GPs in the region) in Rhône-Alpes. Data were collected between October 2013 and February 2014.

A total of 41 questions were asked to GPs, the main topic being their immunisation practice for their patients as healthcare provider (HCP), for themselves and for their children. The Checklist for Reporting Results of Internet E-Surveys (CHERRIES) statement [17] was followed, when applicable. All questions were previously validated and tested by general medicine and infectious diseases specialists involved in the study. Vaccines against diphtheria–tetanus–poliomyelitis (DTP), measles–mumps–rubella (MMR), *Streptococcus pneumoniae*, pertussis, hepB, HPV and meningococcal C meningitis (menC) were considered according to recommendations for each category (GPs, patients, children). For each vaccine, GPs were asked if they recommended it to their patients and if they had followed the official recommendations for their children. For HPV, if none of their children were concerned or if they were childless, their hypothetical immunisation practice was questioned (i.e. “have you vaccinated or would you vaccinate your daughter against HPV?”).

Seasonal and pandemic H1N1 influenza vaccines’ coverage was only explored for GPs. Recommendations provided by French authorities in 2012 [18] were chosen as reference because the 2013 version had just been published at the time of the survey. Divergence between their immunisation practice as HCP and parents was defined by the presence of at least one different immunisation practice between their patients and their children. The presence of two or more different immunisation practices was also examined. All responses were anonymous and declarative.

The questionnaire was validated by the local ethics committee of the University Hospital of Saint-Etienne and by the French national commission for data protection (Commission Nationale Informatique et Libertés).

Differences between proportions were analysed by the chi-squared test or Fisher’s exact test, and the Kruskal–Wallis test was used to compare quantitative data. Chi-squared test for trend was used to test whether there was a linear trend between divergence and GPs’ characteristics. A *p*-value below 0.05 was considered to be statistically significant. To adjust for confounding factors, we conducted a multivariate analysis to test associations between the divergence of GPs’ declared immunisation practice for their patients and their children and the explicative variables with a *p*-value below the 0.2 significance level in the univariate analysis. The software used for the collection of the recorded data was Microsoft Excel. SPSS software, version 20.0 (Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis.

Results

A total of 693 GPs accepted to fulfil the entire questionnaire, corresponding to a response rate of 12.5 %.

The main characteristics of responding GPs are summarised in Table 1. Among these, 73 % were older than 40 years of age and the sex ratio (women/men) was 0.81. Two-thirds of the physicians practised exclusively general medicine, 8.9 % practised homeopathy and 1.6 % practised acupuncture. GPs mainly monitored vaccination status by using the health booklet (Camet de Santé) for their paediatric patients (99.3 %) and their children (91.9 %). For adult patients, the medical file (86.6 %) and the vaccination card (83.0 %) were more frequently cited than the health booklet (53.1 %). For themselves, 64 (9.2 %) GPs declared not to use any means to monitor their vaccination status, whereas only 8 (1.1 %) declared using no record for their adult patients' vaccination status.

GPs' vaccination coverage for DTP, pertussis, seasonal and pandemic H1N1 influenza was evaluated among the 693 responders. According to the French 2012 recommendations [18], GPs declared for themselves to be correctly immunised for DTP in 88 % of cases ($n=610$), for pertussis in 72 % of cases ($n=499$) and for seasonal Influenza in 79.1 % of cases ($n=548$). Five hundred and fourteen (74.2 %) declared that they have been vaccinated in 2009 against the pandemic flu. Their vaccination coverage was not evaluated for hepB in the questionnaire. However, 75.9 % of the panel declared that they would accept a booster dose if their anti-HBs antibody titre was found to be undetectable.

Table 1 Demographic and professional characteristics of the panel population

	$n = 693$	
Gender		
Male	377	54.4 %
Age, years		
<40	182	26.3 %
40–60	386	55.7 %
>60	125	18.0 %
Workload (number of procedures in 2012)		
<3000	145	20.9 %
3000–4000	196	28.3 %
4000–5000	173	25.0 %
>5000	179	25.9 %
Place of practice		
Urban	279	40.3 %
Mixed	238	34.3 %
Rural	176	25.4 %
Type of practice		
General medicine exclusively	458	66.1 %
Homeopathy	62	8.9 %
Acupuncture	11	1.6 %
Sports medicine	82	11.8 %
Others	80	11.5 %

Table 2 summarises, for each vaccine, the recommendations claimed by GPs for their patients and their own children. GPs' recommendations for DTP, pertussis, MMR and menC were not different between both groups. For the other vaccines, GPs declared that they recommended more pneumococcal and HPV vaccine to their patients when compared to their children, whereas it was the other way round for hepB (see Table 2). About a quarter of the GPs who declared that they had immunised or would immunise their daughters for HPV did it using an alternative schedule.

Since differences in immunisation practices were observed between GPs' patients and children, we explored these divergences. When considering all investigated vaccines, a 45.7 % divergence was found between GPs' declared immunisation practice for their patients and their children in the whole panel. After univariate and multivariate analysis shown in Table 3, GPs' age was the only factor associated with a higher risk of divergence between immunisation practice for their patients and their children. When compared to <40-year-old GPs, the risk of divergence kept growing between 40–49, 50–59 and ≥ 60 -year-old GPs, with odds ratios of 1.70, 3.07 and 3.51, respectively ($p < 0.001$). This divergence was predominantly found for the newest and more controversial vaccines. The divergence rate was particularly measured among GPs practising homeopathy ($n = 62$) or acupuncture ($n = 11$), and was found to be higher than in the rest of the panel, with, respectively, 71.0 % ($p = 0.001$) and 81.8 % ($p = 0.03$) of divergence. When considered individually in the whole panel, we found a 0.9 % divergence for DTP, 2.7 % for pertussis, 2.6 % for MMR, 11.8 % for HPV, 13.1 % for hepB, 19.8 % for pneumococcal and 23.7 % for menC vaccines. Regarding the highest vaccine-specific divergence rates, the 'direction' of this divergence depended on the considered vaccine. 'Divergent' GPs tended to recommend more pneumococcal and HPV vaccines to their patients, whereas it was the other way round for hepB. There was no clear trend in one direction or the other for menC vaccine. Finally, when considering two or more different immunisation practices between what GPs declared for their patients and what they declared for their children, the divergences rate was 19.9 %.

Discussion

Attitudes of GPs about vaccination as HCP have been largely studied [12, 15, 19]. By contrast, data about GPs' vaccination practice for themselves and their own children are scarce. To our best knowledge, only one Swiss declarative survey [20] investigated physicians' immunisation attitudes for their children. The present study was the first to make a comparison of GPs' immunisation attitudes for themselves, their own children and their patients.

Table 2 Comparison of GPs' immunisation practices for their patients and their own children ($n = 693$)

Vaccines recommended by GPs to:	Their patients	Their children	<i>p</i> -Value
DTP	99.1 %	99.7 % ^a	0.33
Pertussis for child patients	98.6 %	97.0 % ^b	0.07
MMR	97.7 %	99.1 % ^c	0.2
Pneumococcal (13-valent vaccine)	90.2 %	84.3 % ^d	0.001
Hepatitis B	86.9 %	100.0 % ^e	<0.001
Papillomavirus	83.4 %	73.9 % ^f	<0.001
Meningococcal C meningitis	79.65 %	81.7 % ^g	0.11

^a 1.6 % were immunised with alternative schedules^b 3.1 % were immunised with alternative schedules^c 3.6 % were immunised with alternative schedules^d 11.9 % were immunised with alternative schedules^e 14.9 % were immunised with alternative schedules^f 22.9 % were immunised with alternative schedules^g 20.7 % were immunised with alternative schedules

Vaccination coverage claimed by GPs for their children was superior to the reported coverage in the general population for DTP, pertussis, MMR and hepB vaccines [21, 22]. An explanation for this might be a higher degree of dedication among GPs to prevent these diseases from reaching their loved ones. A more likely reason would be the difficulties in convincing some of their patients to get immunised [23]. In the Swiss study, similar findings were reported for DTP, pertussis and MMR [20], whose use seems well established and accepted. Interestingly, for hepB vaccine, the entire panel claimed that their children were immunised, among whom more than 85 % used the schedule recommended by the French authorities [18] (three administrations during the first year of life). The reported rates were higher than Swiss paediatricians' (68.1 %) and non-paediatricians' (64.6 %) children coverage, possibly due to different recommendations at that time in Switzerland (limited to children from 11 to 15 years of age) [20]. The declared hepB vaccination coverage in GPs' children found in our study was also much better than what was previously described in the general population [24]. A French survey conducted in 2008 among 2175 GPs reported that 10 % of the panel had not immunised their children against hepB at that time [25]. As previous surveys [24, 25] were declarative like ours, we hypothesise that our findings might reflect an improvement of hepB vaccine's perception

among French physicians within the time frame since the suspension of the school-based hepatitis B vaccination programme in 1998 [26]. This improvement would be in accordance with recent reports [24], but may also reflect the presence of a selection bias induced by the fact that GPs were aware of the survey's subject before participating. By contrast, GPs' own declared vaccination coverage was insufficient and even lower than those of the general population for DTP and pertussis, as previously reported [27, 28]. The fact that they are usually taking care of their vaccinations on their own, and that nearly 10 % of the panel did not use any record to monitor these vaccinations, can at least partially explain this. For seasonal influenza and pandemic influenza in 2009, vaccination coverages seemed higher than in precedent reports [28–30]. GPs' hepB vaccine coverage has not been evaluated since, in France, it is strongly recommended for GPs and mandatory for medical students and physicians that work in healthcare facilities, and we assumed that nearly 100 % were vaccinated. However, as nearly one-quarter of the panel declared that they would not accept a booster dose if their anti-HBs antibody titre was found to be undetectable, it suggests that they could be hesitant about HepB vaccine for themselves.

Newer vaccines such as pneumococcal, HPV and menC, respectively added to the French official recommendations in 2006, 2007 and 2010, were less likely to be recommended by

Table 3 Univariate and multivariate analysis of risk factors for divergence

Risk factors for divergence	Univariate analysis	Multivariate analysis	OR [SE]
Age (<40; 40–50; 50–60; >60)	$p < 0.001$	$p < 0.001$	1.578 [0.075]
Male sex	$p = 0.19$	NS	
Practice (rural, urban, mixed)	$p = 0.249$	NS	
Workload (<3000 procedures; 3000–4000; 4000–5000; >5000)	$p = 0.141$	NS	

NS not statistically significant; SE standard error

GPs to their paediatric patients and even less likely to be administered to their own children. Despite being slightly better than GPs' level of recommendation for HPV vaccine in the last national survey in 2009 [31], our results revealed that the recommendation level for HPV vaccine was low for GPs' daughters (<75 %) and their patients (<85 %). This attitude is probably linked to the barriers and controversies that have emerged about HPV vaccine during the past several years and revealed that GPs have a barely higher acceptance level toward this vaccine than the general population [9]. Barriers to HPV vaccine in the general population were religious beliefs [32], parents' concerns about the fantasised effect on their children's sexual behaviour [33] or a low perceived risk of HPV infection. In France, claims of unproven links between HPV vaccination and autoimmune disorders have resulted in demands, made by a few patients and GPs, to establish a parliamentary mission and a moratorium on HPV vaccines. They have not succeeded, unlike in Japan, where health authorities have suspended their HPV vaccination recommendation in 2013 [34]. Despite their unproved nature, these elements probably induce vaccine hesitancy among GPs and could partially explain our results. MenC and pneumococcal vaccines were also less frequently recommended to their patients and their children, even when only <40-year-old GPs' (whose children were potentially at the age of receiving these vaccines according to current immunisation guidelines) responses were analysed (data not shown). In fact, in France, vaccine coverage concerning these vaccines has been reported to be lower than what is recommended by the health authorities, to expect effectiveness of the vaccination policy [35, 36]. GPs' recommendations is one of the most important factors in parents' decision to vaccinate their children [33], whereas vaccine hesitancy lessens their ability to be good pro-vaccination preachers [16]. One of the possible consequences of this hesitancy is the existence of alternative immunisation strategy users for all investigated vaccines in the survey (see Table 2), particularly for the newest and most controversial ones. This attitude might result from wrong beliefs about immune overload among GPs [20, 37] or could be linked to the use of other countries' recommendations known by GPs (e.g. two and not three injections for HPV vaccine). A divergent immunisation practice for their patients and their children was reported by a high percentage of the GPs, representing almost half of the panel. We think that this "do as I say, not as I do" attitude can be considered as vaccine hesitancy, at least at a personal level, with the highest degree of divergence for the newest and the most controversial vaccines. Hopefully, the fact that 'divergent' GPs declared a higher rate of recommendation for the majority of the considered vaccines among their patients when compared to their children might indicate a lower impact of this hesitancy at the professional level. Alternative medicine practitioners, known to be less favourable to vaccination [38], reported

more divergent immunisation practice, but their low percentage (particularly for acupuncture practitioners) in the panel doesn't allow any conclusions to be drawn.

Because of its complexity and context-specific nature, no univocal solution could overcome the worldwide issue that is vaccine hesitancy, but HCP are key players in the process. To address GPs' vaccine hesitancy, the importance of including appropriate training about immunisation matters in general, and vaccine hesitancy in particular, in the curricula of healthcare students has already been pointed out by the SAGE [5]. The results of this study suggest, as reported elsewhere [16], that training should also be organised by independent medical associations for current practitioners to update their knowledge, especially for the newest vaccines.

Limits must be noted about the present work. First of all, its declarative character must have led to inaccuracies in the responses. However, the questionnaire data appear to overestimate vaccination rates by less than 10 % [39] and are good proxies for recorded vaccine coverage in HCP [40]. Moreover, the panel was representative of the GPs population in the Rhone-Alpes region when compared to official data [41, 42]. As reported previously [38], the responding physicians were probably more concerned about vaccination matters, whether it was positively or negatively, but it could not have been verified in the absence of data about the refusing GPs. Some GPs may have grown-up children or no children at all, and may have incorrectly understood the questions, especially because immunisation schedules have evolved over the years, and some of the new vaccines may not have been officially recommended when older GPs' children were receiving infant vaccines and we cannot exclude that it may have biased their responses. However, we received a very limited number (less than five) of queries about the lack of specific instruction for childless GPs. Moreover, although absolute divergence rates increased with GPs' age, menC and pneumococcal vaccines' relative contribution (nearly a half) to them was approximately the same among all age groups (data not shown). With hepB vaccine being part of child and adolescent immunisation guidelines since 1994 in France, it was most probably present in vaccination schedules when older GPs' children were of appropriate age to receive it. For HPV vaccine, the question was clearer, and we believe that the answers were correct.

In conclusion, the results from this survey support the fact that French GPs are, in general, favourable to vaccination, but also argue for the existence of vaccine hesitancy among them, as reported recently by Verger et al. [16]. It is notably the case when they act as parents. GPs seem to have divergent attitudes regarding immunisation policies for their relatives and their patients. Today, HPV vaccine appears to be the main focus of controversies in France. Older age seems to play a part in divergence, potentially because these GPs might be less confident about the newest vaccines (the main source of

divergence), but reasons for divergent attitudes are unclear and further studies are needed in order to better understand this phenomenon. With vaccine hesitancy being a context-specific issue, further research will be necessary to confirm these findings at a national level, to determine their prevalence in other countries and to understand the determinants of divergent vaccination behaviours among physicians in order to assess this specific issue, as recommended by the SAGE Working Group on Vaccine Hesitancy [5].

Acknowledgements The authors thank the six medical councils (Loire, Ardèche, Drôme, Isère, Savoie and Haute-Savoie, France) involved in the study and URPS Rhône-Alpes for their help in the Web-based survey sending.

Compliance with ethical standards

Funding No specific funding source was used for this study.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval For this type of study, formal consent is not required.

References

- Duclos P, Okwo-Bele J-M, Gacic-Dobo M, Cherian T (2009) Global immunization: status, progress, challenges and future. *BMC Int Health Hum Rights* 9(Suppl 1):S2. doi:10.1186/1472-698X-9-S1-S2
- Kata A (2010) A postmodern Pandora's box: anti-vaccination misinformation on the internet. *Vaccine* 28:1709–1716. doi:10.1016/j.vaccine.2009.12.022
- Larson HJ, Cooper LZ, Eskola J, Katz SL, Ratzan S (2011) Addressing the vaccine confidence gap. *Lancet* 378:526–535. doi:10.1016/S0140-6736(11)60678-8
- MacDonald NE; SAGE Working Group on Vaccine Hesitancy (2015) Vaccine hesitancy: definition, scope and determinants. *Vaccine* 33:4161–4164. doi:10.1016/j.vaccine.2015.04.036
- Eskola J, Duclos P, Schuster M, MacDonald NE; SAGE Working Group on Vaccine Hesitancy (2015) How to deal with vaccine hesitancy? *Vaccine* 33:4215–4217. doi:10.1016/j.vaccine.2015.04.043
- Larson HJ, Jarrett C, Schulz WS, Chaudhuri M, Zhou Y, Dube E et al (2015) Measuring vaccine hesitancy: the development of a survey tool. *Vaccine* 33:4165–4175. doi:10.1016/j.vaccine.2015.04.037
- Falagas ME, Zarkadoulia E (2008) Factors associated with suboptimal compliance to vaccinations in children in developed countries: a systematic review. *Curr Med Res Opin* 24:1719–1741. doi:10.1185/03007990802085692
- Mikaelloff Y, Canidade G, Suissa S, Tardieu M (2009) Hepatitis B vaccine and the risk of CNS inflammatory demyelination in childhood. *Neurology* 72:873–880. doi:10.1212/01.wnl.0000335762.42177.07
- Denis F, Cohen R, Stahl J-P, Martinot A, Dury V, Le Danvic M et al (2014) Papillomavirus vaccination in France according to 2008 to 2012 Vaccinoscopia® data. *Méd Mal Infect* 44:18–24. doi:10.1016/j.medmal.2013.11.001
- Gherardi RK, Coquet M, Cherin P, Belec L, Moretto P, Dreyfus PA et al (2001) Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. *Brain* 124:1821–1831
- Freed GL, Clark SJ, Cowan AE, Coleman MS (2011) Primary care physician perspectives on providing adult vaccines. *Vaccine* 29:1850–1854. doi:10.1016/j.vaccine.2010.12.097
- Schwarzinger M, Verger P, Guerville M-A, Aubry C, Rolland S, Obadia Y et al (2010) Positive attitudes of French general practitioners towards A/H1N1 influenza-pandemic vaccination: a missed opportunity to increase vaccination uptakes in the general public? *Vaccine* 28:2743–2748. doi:10.1016/j.vaccine.2010.01.027
- Dubé E, Labege C, Guay M, Bramadat P, Roy R, Bettinger J (2013) Vaccine hesitancy: an overview. *Hum Vaccin Immunother* 9:1763–1773. doi:10.4161/hv.24657
- Bruno DM, Wilson TE, Gany F, Aragonés A (2014) Identifying human papillomavirus vaccination practices among primary care providers of minority, low-income and immigrant patient populations. *Vaccine* 32:4149–4154. doi:10.1016/j.vaccine.2014.05.058
- Bean SJ, Catania JA (2013) Vaccine perceptions among Oregon health care providers. *Qual Health Res* 23:1251–1266. doi:10.1177/1049732313501891
- Verger P, Fressard L, Collange F, Gautier A, Jestin C, Launay O et al (2015) Vaccine hesitancy among general practitioners and its determinants during controversies: a national cross-sectional survey in France. *EBioMedicine* 2:891–897. doi:10.1016/j.ebiom.2015.06.018
- Eysenbach G (2004) Improving the quality of Web surveys: the Checklist for Reporting Results of Internet E-Surveys (CHERRIES). *J Med Internet Res* 6:e34. doi:10.2196/jmir.6.3.e34
- Floret D (2012) Le Calendrier des vaccinations et les recommandations vaccinales 2012 selon l'avis du Haut Conseil de la santé publique. Available online at: http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/beh_14_15_1_.pdf. Accessed Dec 2015
- Flicoteaux R, Pulcini C, Carrieni P, Schwarzinger M, Lepout C, Verger P (2014) Correlates of general practitioners' recommendations to patients regarding vaccination for the 2009–2010 pandemic influenza (A/H1N1) in France: implications for future vaccination campaigns. *Vaccine* 32:2281–2287. doi:10.1016/j.vaccine.2014.02.074
- Posfay-Barbe KM, Heining U, Aebi C, Desgrandchamps D, Vaudaux B, Siegrist C-A (2005) How do physicians immunize their own children? Differences among pediatricians and nonpediatricians. *Pediatrics* 116:e623–e633. doi:10.1542/peds.2005-0885
- Fonteneau L, Urcun J-M, Guthmann J-P, Collet M, Neulat N, Bristol-Gauzy P et al (2013) Vaccination coverage in 6-year-old preschool children, France, 2005–2006. *Arch Pédiatr* 20:241–247. doi:10.1016/j.arcped.2012.12.019
- Antona D, Lévy-Bruhl D, Baudon C, Freymuth F, Lamy M, Maine C et al (2013) Measles elimination efforts and 2008–2011 outbreak, France. *Emerg Infect Dis* 19:357–364. doi:10.3201/eid1903.121360
- Luthy KE, Beckstrand RL, Peterson NE (2009) Parental hesitation as a factor in delayed childhood immunization. *J Pediatr Health Care* 23:388–393. doi:10.1016/j.pedhc.2008.09.006
- Denis F, Cohen R, Martinot A, Stahl J-P, Lery T, Le Danvic M et al (2013) Evolution of hepatitis B vaccine coverage rates in France between 2008 and 2011. *Méd Mal Infect* 43:272–278. doi:10.1016/j.medmal.2013.06.016
- François M, Alla F, Rabaud C, Raphaël F (2011) Hepatitis B virus vaccination by French family physicians. *Méd Mal Infect* 41:518–525. doi:10.1016/j.medmal.2011.07.002
- Larson HJ, Heymann DL (2010) Public health response to influenza A(H1N1) as an opportunity to build public trust. *JAMA* 303:271–272. doi:10.1001/jama.2009.2023
- Semaille P, Gourbin C, Legrand D, Meyer A, Roland M, Paulus D et al (2006) Evaluation of the vaccine coverage of the general practitioners in the French Community. *Rev Méd Brux* 27:S292–S302

Durant mon travail de thèse, je me suis particulièrement intéressé au lien entre les maladies auto-immunes et le système des interférons (IFN). Ces cytokines sont bien connues pour leur rôle dans la lutte antivirale, mais leurs effets dépassent largement ce cadre, avec une implication maintenant bien documentée dans la physiopathologie de nombreuses maladies dysimmunes comme le lupus érythémateux systémique (LES), le syndrome de Sjögren (SjS), les myosites ou encore la sclérodémie systémique, en particulier concernant les IFNs de type 1. C'est donc assez logiquement que nous nous sommes arrêtés, en premier lieu, sur l'IFN α , principal représentant des IFNs de type 1.

Après la conduite d'une réflexion autour du choix et de l'utilisation actuelle des modèles animaux de SjS, en particulier à propos de la pertinence de la dichotomie entre SjS dit primaire ou secondaire, la première partie de mon travail a consisté en l'évaluation d'une stratégie innovante de vaccination thérapeutique anti-IFN α , appelée IFN-Kinoïde (IFN-K), dans un modèle murin de SjS systémique, le modèle MRL/MpJ-Fas^{lpr/lpr} (MRL/lpr). Nous avons obtenu des résultats particulièrement intéressants, en terme d'immunogénicité et de tolérance, et une amélioration (fonctionnelle et morphologique) des atteintes glandulaires, neurologique périphérique et de la signature IFN, ce qui est de bon augure pour l'avenir, sachant que l'équivalent humain de ce traitement est en cours de développement clinique dans le LES chez l'Homme. Ces résultats nous ont permis de mener un autre essai préclinique avec l'IFN-K (dont je présente ici des résultats préliminaires) dans un modèle de SjS développant des lymphomes B : le modèle transgénique pour l'interleukine 14 α humaine.

Le travail autour de cette première approche thérapeutique nous a menés à d'autres pistes de recherche que nous présentons également dans une deuxième partie. Je me suis intéressé aux mécanismes à l'origine de l'activation de la voie des IFNs dans le SjS, ce qui nous a conduit à mettre en place un essai clinique interrégional, pour évaluer l'intérêt d'un nouveau biomarqueur pour le SjS, les anticorps anti-Ro60/SSA d'isotype immunoglobuline E. Pour finir, je rapporte ici le 1^{er} cas humain de patient atteint de SjS et traité avec succès par inhibiteur de JAK, le ruxolitinib, en raison d'une forme systémique particulièrement rare et sévère incluant une myélofibrose auto-immune (atteinte hématologique centrale). L'ensemble des données produites dans ce travail de thèse permet d'éclaircir quelques aspects du rôle des IFNs dans le SjS, en particulier de l'IFN α , et permet d'ouvrir la voie à de nouvelles pistes thérapeutiques.

My PhD thesis focused on the link between autoimmune diseases and the interferons' (IFN) system. These cytokines are well known for their antiviral effects, but their role goes far beyond this, with a growing body of evidence concerning their implication in many autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus (SLE), Sjögren's syndrome (SjS), myositis and systemic sclerosis (SSc), especially concerning type 1 IFNs. Hence, we mainly focused on IFN α , which is the main representative of type 1 IFNs.

After an in-depth thinking on the choice and current use of mouse models in SjS, especially about the concept of primary and secondary SjS, the first part of my work was dedicated to the conduct of a preclinical trial evaluating IFN-Kinoid (IFN-K) in a systemic SjS mouse model, MRL/MpJ-Fas^{lpr/lpr} (MRL/lpr) mice. We obtained good results, in terms of immunogenicity and tolerance, and improved the glandular manifestations, peripheral neuropathy and IFN signature in these mice, which paves the way towards IFN-K's future clinical development in SjS, as it is already the case for SLE. These results allowed us to conduct another preclinical trial with IFN-K in a SjS model developing B lymphomas: the human interleukin 14 α transgenic mouse model.

In the second part of my PhD thesis, I studied some of the mechanisms leading to the activation of the IFN pathways in SjS, especially the effects of anti-Ro60/SSA immunoglobulin E autoantibodies, and we conducted a regional clinical trial to evaluate this new biomarker in the disease. Finally, I have reported here the first human case of a patient with systemic SjS (including autoimmune myelofibrosis), successfully treated with the JAK inhibitor, ruxolitinib.

The set of data produced in this PhD thesis clarifies some aspects about the role of IFNs (especially IFN α) in SjS, and paves the way towards new therapeutic leads.