



**HAL**  
open science

# Rôle des cellules épithéliales salivaires au cours du Syndrome de Sjögren primitif

Élodie Rivière

► **To cite this version:**

Élodie Rivière. Rôle des cellules épithéliales salivaires au cours du Syndrome de Sjögren primitif. Immunologie. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASS124 . tel-03162842

**HAL Id: tel-03162842**

**<https://theses.hal.science/tel-03162842>**

Submitted on 8 Mar 2021

**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.

# Rôle des cellules épithéliales salivaires au cours du syndrome de Sjögren primitif

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 569, Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)

Spécialité de doctorat : Immunologie

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, Inserm, CEA, Immunologie des maladies virales,  
auto-immunes, hématologiques et bactériennes, 92265, Fontenay-aux-Roses, France.

Référent : Faculté de pharmacie

Thèse présentée et soutenue au Kremlin-Bicêtre, le 24 Juin 2020, par

**Elodie RIVIERE**

### Composition du Jury

**M. Jacques-Eric GOTTENBERG**

PU-PH, Université de Strasbourg

Président

**Mme Marion ESPELI**

Chargée de Recherche, HDR, Université de Paris

Rapporteur & Examinatrice

**M. Divi CORNEC**

PU-PH, Université de Bretagne Occidentale

Rapporteur & Examineur

**Mme Claire DAIEN**

PHU, Université de Montpellier

Examinatrice

**M. Xavier MARIETTE**

PU-PH, Université Paris-Saclay

Directeur de thèse

**Mme Gaëtane NOCTURNE**

MCU-PH, Université Paris-Saclay

Co-directrice de thèse



## Remerciements

M'y voilà, c'est (enfin !) le moment d'écrire les remerciements ! C'est pour moi l'occasion de dire combien le soutien, les compétences et la bienveillance de l'ensemble des personnes qui m'ont entourée au cours de ces années de thèse ont été importants pour moi.

Je tiens à remercier le Docteur Marion Espeli d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être rapporteur. J'avais eu la chance d'assister à une présentation de vos travaux et de vous rencontrer à une journée organisée par la Fondation Arthritis. Je suis très honorée de voir mon travail jugé par vous aujourd'hui.

Je remercie le Professeur Divi Cornec d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Tu as pu suivre l'avancée de ces travaux au cours du comité de mi-thèse tenu à Washington (en plein décalage horaire !), puis lors des présentations à la SFR. Je suis heureuse que tu puisses juger ce travail maintenant terminé.

Je remercie sincèrement le Docteur Claire Daien d'avoir accepté de juger ce travail. Je suis ravie que vous fassiez partie de mon jury aujourd'hui.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Professeur Jacques-Eric Gottenberg d'avoir accepté de participer à ce jury et d'évaluer ce travail. Nous avons pu échanger brièvement sur ce sujet passionnant des cellules épithéliales à la SFR. C'est un honneur de vous compter dans mon jury aujourd'hui.

Je tiens à remercier sincèrement le Professeur Xavier Mariette qui m'a permis de réaliser ce travail. Merci d'avoir partagé votre grand intérêt pour la recherche et de m'avoir proposé ce sujet de thèse. Je vous suis reconnaissante de m'avoir accordé votre confiance pour avancer dans ce projet. Merci pour la qualité de votre encadrement. Merci de m'avoir accompagnée tout au long de ces trois années au laboratoire qui auront été pour moi très enrichissantes. Je suis heureuse de poursuivre l'aventure maintenant dans votre équipe à l'hôpital.

Je remercie vivement le Docteur Gaëtane Nocturne qui a co-dirigé ce travail. Merci Gaëtane, je suis arrivée en M2 pendant la fin de ta thèse, je crois que ton goût pour la recherche a été contagieux. Merci pour ta disponibilité, tes encouragements, tes compétences, ta bienveillance, dont j'ai eu la chance de profiter tout au long de ces années, et encore maintenant à l'hôpital. C'est un plaisir de travailler avec toi.

Je remercie l'AP-HP de m'avoir accordé l'année médaille. Je remercie la Fondation Arthritis de m'avoir accordé une bourse de thèse CIFRE.

Je remercie vivement toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer pour la réalisation de ce travail : Valentina Libri, Nicolas Tchitchek, Bernd Jagla, Michael Mingueneau, Odile Heidmann, Kevin De Azevedo, Franck Letourneur, Benjamin Saint Pierre, Vanessa Gauttier, Nicolas Poirier.

Cette thèse aura été l'occasion de retrouver et de rencontrer des collègues exceptionnels. Mille mercis à Juliette, ingénieure hors pair, merci d'avoir partagé tes compétences, tes exigences en termes de contrôles, ton aide a été indispensable pour la réalisation de ce travail. Les heures passées dans le L2 ont été l'occasion de discussions passionnantes et maintenant, on peut le dire, on aura quand même bien « glandé » ! Un grand merci à Bineta, j'ai eu le plaisir de te retrouver, merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et le congrès à Louvain où on a bien failli rester bloquées ! Merci à Audrey, la reine des macrophages, nous sommes arrivées au labo la même année, ça a été un plaisir

de travailler avec toi et de partir en congrès à Madrid et à Lyon. Je tiens à remercier Saida, pour son travail précieux sur les glandes salivaires. Merci à Samuel, ancien co-interne et futur co-chef ! Merci à Alexandre, Anastasia, Julien, Pauline, Marie, nos « petits » M2, je suis ravie d'avoir partagé une année au labo avec vous.

Je remercie le Docteur Roger Le Grand de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Un grand merci à toute l'équipe de l'unité INSERM U1184. Merci à Christine, Camille, Anaëlle, Marie, Chloé, Anna-Maria, Adela, Manon, Marie-Ghislaine, Carole, Philippe, Candie, Delphine, Houria, Hélène, Aliénor, Ashley, Ariane, Lola, Christelliah. J'ai eu la chance d'être accueillie dans un environnement privilégié pour la réalisation de ce travail de thèse. Merci pour cette ambiance agréable de travail, les raclettes de Noël, les gâteaux, les verres à Denfert... !

Je remercie mes « nouveaux » collègues à l'hôpital : Xavier, Raphaële, Stephan, Rakiba, Gaëtane, Julien et Alexandre. Je suis heureuse de travailler avec vous, merci pour votre disponibilité et votre gentillesse, vous formez une équipe géniale ! Merci aux secrétaires, aux infirmières, aux aide-soignantes, à l'équipe de recherche clinique, merci pour votre accueil dans le service. Ce début de clinicat aura été marqué par des événements exceptionnels : la grève à l'hôpital, la grève des transports puis le covid, dont on se souviendra. Merci Alexandre, mon co-chef, après avoir fait quelques PCR ensemble, je suis ravie de travailler avec toi maintenant, tu sais rendre notre bureau accueillant et l'ambiance festive ! J'en profite pour remercier chaleureusement mes premiers internes : Omar, Julia, Sabrina, Kevin, Maxime, Hélène, Anne-Sophie et Marion. Une super équipe qui aura contribué à rendre ce début de clinicat mémorable !

Mille mercis à mes amis, vous êtes tellement importants ! Merci à mes amis d'internat, Lucile, Solange, Aurore, Camille C., Camille S., Carole, Déborah, Olivier, Nicolas, Camélia. Merci à mes copines de la fac, Tessa, Marie, Delphine et Laurene. Merci aux amis d'Erwan qui sont maintenant mes amis, et à mes amis de toujours, Giulia, Dimitrii, Pauline, Kim, Thomas, Céline, Fabien, Sherley, Boris, Amélie, Noémie, Pierre, Pauline, Julie, Marthe, Ingrid, Madonie, Gary, merci pour votre présence et pour tous les bons moments passés ensemble !

Je remercie avec émotion ma famille. Merci à mes parents, pour votre soutien indispensable et votre présence tout au long de ces longues années d'études. Merci à ma petite sœur, Pauline, et à Markus, pour vos encouragements bienveillants. Merci à ma grand-mère, pour ton enthousiasme et ton écoute attentive. Merci à Marie-Paule, Romain et Anh-Linh et à toute la famille d'Erwan pour votre gentillesse et votre accueil. Et enfin, bien sûr, je remercie du fond du cœur mon chéri, Erwan, merci pour tout, merci d'être là tous les jours.

## Table des matières

A.	INTRODUCTION .....	1
A.I.	Maladies auto-immunes .....	1
A.I.2.	Les maladies auto-immunes.....	7
A.I.3.	Les « épithélites auto-immunes » .....	8
A.II.	Le Syndrome de Sjögren .....	12
A.II.1.	Définition et épidémiologie .....	12
A.II.2.	Caractéristiques clinique, biologique et histologique .....	13
A.III.	Physiopathologie du syndrome de Sjögren primitif.....	16
A.III.1	Déclenchement de la maladie.....	17
A.III.2.	Mécanismes physiopathologiques et principaux acteurs .....	26
A. IV.	Traitements évalués et pistes thérapeutiques envisagées au cours du SSp .....	38
A.IV.1.	cs DMARDs (conventional synthetic Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug) .....	38
A.IV.2.	b DMARDs (biological Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug).....	38
B.	OBJECTIFS .....	43
1)	Etude du rôle des cellules épithéliales salivaires dans la physiopathologie du SSp <i>via</i> leur interaction avec les lymphocytes B .....	43
2)	Etude du rôle des cellules épithéliales salivaires dans la physiopathologie du SSp <i>via</i> leur interaction avec les lymphocytes T .....	43
3)	Résultats préliminaires : caractérisation transcriptomique de CES cultivées et stimulées .....	43
C.	RESULTATS.....	44
C.I.	Article 1 : “Salivary gland epithelial cells from patients with Sjögren’s syndrome induce B-lymphocyte survival and activation” .....	44
C.I.1.	Contexte de l’étude.....	44
C.I.2.	Principaux messages .....	99
C.II.	Article 2: “The Interleukin7/Interferon axis drives T cell and salivary gland epithelial cell interactions in Sjögren’s syndrome” . .....	101
C.II.1.	Contexte de l’étude.....	101
C.II.2.	Principaux messages .....	145
C.III.	Résultats préliminaires: “RNA-seq analysis of primary cultured salivary gland epithelial cells and response to poly(I:C), IFN $\alpha$ and IFN $\gamma$ stimuli” . .....	146
C.III.1.	Contexte de l’étude .....	146
C.III.2.	Principaux messages .....	166
D.	DISCUSSION.....	167
D.I.	Rôle actif des CES dans la physiopathologie du SSp .....	167
D.I.1.	Stimuli extrinsèques.....	167

D.I.2. Anomalies intrinsèques.....	168
D.I.3. CES et niches plasmocytaires.....	175
D.II. Comparaison des mécanismes physiopathologiques du SSp avec d'autres épithélites auto-immunes.....	176
D.II.1. Maladie cœliaque et rôle de l'IL15 .....	176
D.II.2. Cirrhose biliaire primitive, complexes immuns et centres germinatifs .....	178
D.II.3. Maladies inflammatoires chroniques intestinales, IL7 et ILC.....	181
D.III. Avantages et limites des modèles de culture primaire et de co-culture.....	183
D.III.1. Culture primaire de CES et explants .....	183
D.III.2. Co-cultures .....	184
D.IV. Perspectives thérapeutiques .....	192
D.IV.1. Les CES comme cible thérapeutique.....	192
D.IV.2. Stratégies d'inhibition des interactions entre CES et lymphocytes B.....	193
D.IV.3. Stratégies d'inhibition des voies d'induction de la signature IFN .....	193
E. CONCLUSION .....	196
F. REFERENCES .....	197
G. ANNEXE .....	218

## Table des Illustrations

Figure 1: Exemples de mécanismes d'induction d'une réponse auto-immune impliquant les LT .....	5
Figure 2: Représentation de l'anatomie des glandes salivaires .....	14
Figure 3: Organisation histologique d'une glande salivaire .....	15
Figure 4: Représentation schématique des mécanismes génétiques et épigénétiques de susceptibilité au SSp .....	18
Figure 5: Lien entre Alu, SSA et IFN $\alpha$ .....	23
Figure 6: Représentation schématique de l'hypothèse physiopathologique du SSp.....	28
Figure 7: Voies de signalisation de BAFF et APRIL solubles.....	29
Figure 8: Les CES participent à l'activation lymphocytaire B .....	35
Figure 9: Interaction entre cellule épithéliale et lymphocyte T .....	37
Figure 10: Représentation schématique des relations entre l'activité de la maladie et les caractéristiques cellulaires au sein des glandes salivaires .....	44
Figure 11: Viabilité des CES en présence d'inhibiteur de BTK, d'inhibiteur de PI3K ou leflunomide ...	96
Figure 12: : Expression normalisée des gènes <i>TLR3</i> , <i>TLR7</i> , <i>MDA5</i> , <i>RIG1</i> , <i>EPST11</i> et <i>PKR</i> dans les cellules triées à partir de biopsies de glandes salivaires et du sang de patient pSS et de sujets contrôles .....	98
Figure 13: Représentation schématique des différentes cibles visées au cours des expériences d'inhibition. ....	100
Figure 14: Reconnaissance des molécules dérivées de l'expression des HERVs par les PRR (pattern recognition receptors).....	171
Figure 15: Les cibles de l'ARN double brin .....	172
Figure 16: La stimulation par poly(I:C) des CES induit l'expression de BAFF via un mécanisme dépendant de PKR .....	174
Figure 17: Mécanismes clés de la physiopathologie de la maladie coeliaque.....	177
Figure 18: Représentation schématique du mécanisme de maturation des LB induite par les LTfh .	180



## Liste des abréviations

Ac : anticorps

ADCC : Antibody-dependent cellular cytotoxicity, Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des Ac

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ag : antigène

AMA : Anticorps anti-mitochondrie

APRIL : A proliferation-inducing ligand

AQP : aquaporine

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ASSESS : ASSESSment and Evolution of Systemic complications in primary Sjögren's syndrome

BAFF : B-cell activating factor of the TNF family

BAFF-R : BAFF receptor

BCMA : B cell maturation antigen

BCR : B-cell receptor, récepteur à l'antigène du lymphocyte B

bDMARDs : biological Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug

BLK : B-lymphocyte kinase

BST2 : Bone marrow stromal Antigen 2

BTK : Bruton's Tyrosine Kinase

CBP : cirrhose biliaire primitive

CC L/ R : C-C motif ligand / receptor

CD : Cluster de différenciation

CES : cellules épithéliales salivaires

CMV : cytomégalovirus

CPA : cellule présentatrice d'antigène

CXCL / R : C-X-C Motif Chemokine Ligand / receptor

DAMP : danger associated molecular pattern

DMARD : Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug

EBV : Epstein Barr Virus

EIF2AK2 : Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2

EPSTI1 : Epithelial Stromal Interaction 1

ESSDAI : EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index

ESSPRI : EULAR Sjögren's Syndrome Patient Reported Index

EWAS : epigenome-wide association studies

Fc : fragment constant

FR : Facteur rhumatoïde

GWAS : genome-wide association study

HCQ : hydroxychloroquine

HERV : séquence endogène rétrovirale humaine, human endogenous retrovirus

HEVs : high endothelial venules

HLA : Human Leukocyte Ag

HSG : Human submandibular gland

HTLV1 : Human T Lymphotropic Virus type I

ICAM-1 : InterCellular Adhesion molecule

IFITM : interferon induced transmembrane protein

IFN : interféron

Ig : immunoglobuline

IRF : IFN regulatory factor

IL : interleukine

ILC : innate lymphoid cell

JAKi : Janus kinase inhibiteur

LB : lymphocytes B

LFU : leflunomide

LES : lupus érythémateux systémique

LINE : long interspersed nuclear element

LT : lymphocytes T

LTfh : LT follicular helper

LTh : LT helper

LTreg : LT régulateur

MAI : maladie auto-immune

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MALT : mucosa-associated lymphoid tissue

MEC : mucosal epithelial chemokine

MICI : Maladie inflammatoire chronique intestinale

miRNA : microRNA

MMF : mycophénolate mofétil

MPA : mycophenolic acid

MTX : methotrexate

NK: Natural killer

NLR : nucleotide-binding and oligomerization domain-NOD-like receptor

PAMP : pathogen associated molecular pattern

PBMCs : Peripheral blood mononuclear cells

pDC : cellule dendritique plasmacytoïde

PDC-E2 : sus unité E2 du complexe mitochondrial pyruvate déshydrogénase

PI3K : phosphatidyl inositol 3-kinase

PKR : protein kinase RNA-activated

PPR : pathogen recognition receptor

PR : polyarthrite rhumatoïde

RCH : rectocolite hémorragique

RLR : RIG-I-like receptor

RNP : ribonucléoprotéine

ROS : reactive oxygen species

SINE : short interspersed elements

SNP : single nucleotide polymorphism

SR2 : sprue refractaire de type 2

SSA : Sjögren-syndrome-related antigen A, Ro

SSB : Sjögren-syndrome-related antigen B, La

SSp : syndrome de Sjögren primitif

STAT : signal transducer and activator of transcription

TAC1 : transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor

TCR : T-cell receptor, récepteur à l'antigène du lymphocyte T

TLR : Toll like receptor

TNIP1 : TNFAIP3-interacting protein

VCAM : vascular cell adhesion molecule

VHC : virus de l'hépatite C

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

XCI : inactivation du chromosome X

ZM : zone marginale

## A. INTRODUCTION

### A.I. Maladies auto-immunes

#### A.I.1. Auto-immunité et rupture de tolérance

La rupture de la tolérance immunitaire pour les antigènes (Ag) du soi est à l'origine du développement de l'auto-immunité. Les maladies auto-immunes (MAI) sont d'origine multifactorielle reposant à la fois sur des facteurs génétiques et environnementaux. Un facteur déclenchant environnemental, notamment infectieux, est souvent suspecté mais rarement identifié. Les conséquences de cette agression sont pathologiques pour certains individus chez qui un ensemble de prédispositions génétiques participe à l'emballement de la réponse immunitaire innée puis adaptative. Cette réponse du système immunitaire adaptatif peut ensuite se pérenniser conduisant à la destruction ou la modification de cibles cellulaires ou tissulaires par les populations lymphocytaires auto-immunes. Ainsi, le caractère pathologique de la réaction immunitaire au cours des MAI tient à sa cible et à son caractère chronique.

#### A.I.1.a. Tolérance immunologique

Afin d'assurer une protection vis-à-vis des agents infectieux, le répertoire immunologique des lymphocytes T (LT) et lymphocytes B (LB) doit être varié pour reconnaître l'ensemble des Ag étrangers. La plasticité du récepteur à l'Ag du LT (TCR) et du récepteur à l'Ag du LB (BCR) fait suite à des étapes de modifications somatiques des gènes codant pour ces récepteurs. La première étape correspond à la recombinaison des segments géniques V, D et J codant pour les domaines variables du TCR et BCR au cours de la maturation lymphocytaire T et B. La seconde étape concerne uniquement le BCR et a lieu en périphérie suite à la rencontre antigénique. Il s'agit de l'hypermutation somatique, qui permet la production de récepteurs de plus grande affinité. La contrepartie de cette diversité est la production de TCR et BCR reconnaissant des Ag du soi. Ainsi, entre 20 et 50% des TCR et des BCR reconnaissent potentiellement les Ag du soi. La tolérance immunologique est une caractéristique du système immunitaire adaptatif. Elle correspond à l'absence de réactivité immunologique spécifique envers un Ag reconnu. L'inactivation des clones auto-réactifs implique des mécanismes de tolérance immunitaire intéressant les LT et les LB. Classiquement, les mécanismes de tolérance sont classés selon leur localisation anatomique en deux grandes catégories : l'une centrale, survenant dans les organes lymphoïdes centraux (thymus pour les LT et moelle osseuse pour les LB) et l'autre périphérique, prenant place dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques, tissu lymphoïde associé aux muqueuses) (1).

## Tolérance centrale

Les LT quittent la moelle osseuse et colonisent le thymus, où ils vont se multiplier, maturer et acquérir l'expression du TCR à leur surface. L'acquisition de ce récepteur à l'Ag résulte d'un processus de réarrangements de gènes. Les TCR sont générés au hasard ce qui permet une très grande diversité de reconnaissance des Ag, à la fois propres à l'individu et étrangers. La tolérance des LT est induite par délétion clonale, aboutissant à l'apoptose des LT ayant un TCR non fonctionnel (sélection positive) ou reconnaissant les auto-Ag avec une trop forte affinité (sélection négative). Au cours de la sélection positive, seuls les lymphocytes qui expriment un TCR capable de reconnaître une molécule HLA survivent et se multiplient. Les lymphocytes avec un TCR ne reconnaissant pas la protéine HLA sont éliminés car non fonctionnels. Puis, au cours de la sélection négative, les cellules ayant survécu à la sélection positive sont mises à nouveau en présence de complexes « HLA - peptides du soi » exprimés à la surface des cellules thymiques. Cette fois, les cellules qui interagissent fortement avec les auto-Ag meurent. Ainsi, les LT auto-réactifs sont éliminés. Certains LT immatures qui reconnaissent des Ag du soi dans le thymus ne meurent pas mais se transforment en LT régulateurs et gagnent les tissus périphériques (2).

Les LB acquièrent, eux, leur BCR au sein de la moelle osseuse. Comme les TCR, les BCR sont générés au hasard ce qui permet une très grande diversité de reconnaissance des Ag. La sélection négative des LB se fait selon des mécanismes analogues à ceux mis en jeu pour la sélection des LT et aboutit à la sélection de BCR ne reconnaissant pas les Ag du soi. Les LB trop réactifs aux protéines du soi sont éliminés. Certains LB reconnaissant des protéines du soi subissent des modifications de leur BCR pour diminuer leur réactivité aux Ag du soi, ce phénomène est appelé la réédition du BCR (1). Le micro-environnement médullaire, la réactivation des recombinaisons RAG 1-2 et de nombreux facteurs de transcription spécifiques, comme Pax-5 et E2F, permettent la mise en place de nouveaux réarrangements géniques et l'appariement de nouvelles chaînes légères aux chaînes lourdes d'immunoglobulines (Ig). Cette étape est indépendante de la rencontre d'un Ag et conduit au développement de LB matures naïfs, ayant chacun un récepteur de membrane fonctionnel dont la spécificité est unique. Les LB ayant passé avec succès les étapes de délétion clonale et de réédition du récepteur quittent la moelle osseuse pour la périphérie.

## Tolérance périphérique

Les LB et LT qui ont été sélectionnés dans les organes lymphoïdes primaires gagnent ensuite les organes lymphoïdes secondaires périphériques (ganglions, rate, tissu lymphoïde associé aux muqueuses).

Concernant les LT, la tolérance périphérique est induite lorsque des lymphocytes matures reconnaissent des Ag du soi dans les tissus périphériques, entraînant leur inactivation fonctionnelle (anergie) ou leur mort, ou encore lorsque des lymphocytes auto-réactifs sont contrôlés par des LT régulateurs. L'anergie assure la tolérance en permettant un état de non-réponse spécifique. Un LT est rendu anergique par une stimulation antigénique non accompagnée des signaux de co-stimulation habituellement délivrés par certaines molécules membranaires des cellules présentatrices d'Ag (CPA), telles que CD80 et CD86. Dans ces conditions, les TCR peuvent perdre leur aptitude à transmettre des signaux activateurs, ou les LT peuvent engager préférentiellement un de leurs récepteurs inhibiteurs dont font partie CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4) ou PD-1 (programmed [cell] death protein-1). Un autre mécanisme possible est lié à l'action des LT régulateurs capables d'inhiber l'activation des LT naïfs et leur différenciation en cellules T effectrices. Enfin, la reconnaissance d'Ag du soi peut déclencher les voies de signalisation menant à l'apoptose, ce qui aboutit à l'élimination des lymphocytes auto-réactifs, ce mécanisme est appelé « mort cellulaire induite par activation ».

Plusieurs mécanismes cellulaires induisant l'anergie des LB ayant un BCR auto-réactif ont également été décrits. Les LB matures qui rencontrent des auto-Ag présents à fortes concentrations dans les tissus lymphoïdes périphériques deviennent anergiques et ne sont plus en mesure de répondre à nouveau à ces auto-Ag. Par ailleurs, les populations de LB régulatrices sont également impliquées dans la tolérance périphérique et sont capables de réguler les cellules auto-réactives.

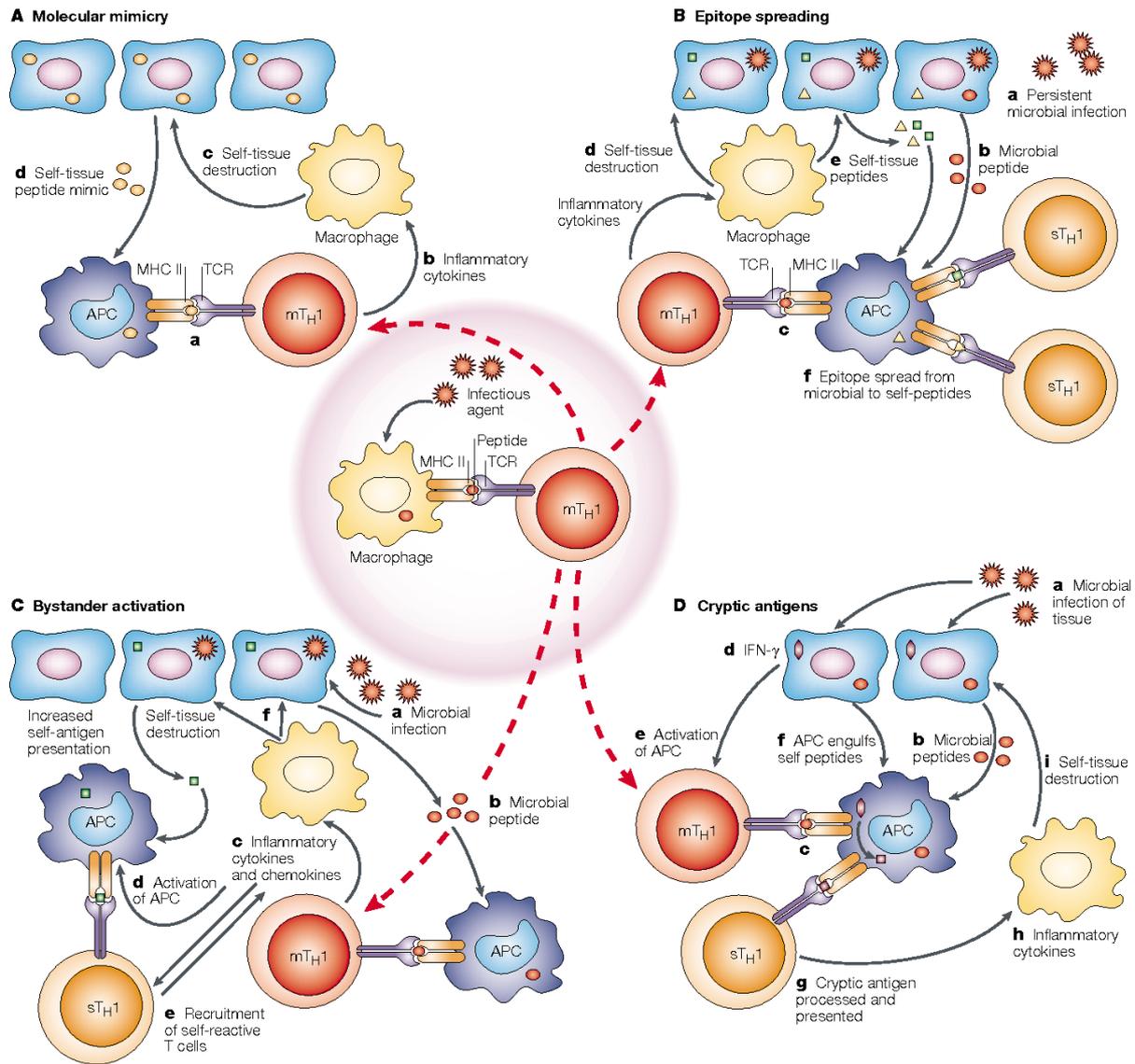
De façon très intéressante, alors que l'on considère habituellement les mécanismes de tolérance comme intervenant tôt au cours du développement des lymphocytes, il semble que ces mécanismes de tolérances existent également, pour la plupart, au sein des centres germinatifs (3). En effet, un LB activé par un Ag étranger peut entrer dans le centre germinatif et modifier son BCR rendant possible l'émergence de LB auto-réactifs. Le contrôle de l'émergence de ces LB auto-réactifs est alors indispensable pour éviter la production d'auto-Ac. L'anergie des LB auto-réactifs est l'un de ces mécanismes et peut intervenir au sein des centres germinatifs. Dans un modèle murin, Burnett et al. ont pu comparer la réponse de LB exprimant un BCR capable de reconnaître des Ag exprimés par des cellules du soi vs des cellules étrangères. L'Ag du soi induisait l'anergie lymphocytaire B, cependant, cette anergie était réversible lors de la stimulation par un Ag étranger. Ceci est lié au fait que les mutations responsables d'une diminution de l'auto-affinité sont sélectionnées rapidement, tandis que les mutations responsables d'une augmentation de l'affinité pour l'Ag étranger sont plus lentes (4). Puisque les LB anergiques peuvent être réactivés pour sécréter des auto-Ac pathogènes, l'avantage conféré par l'anergie pour contrôler la réponse auto-immune reste énigmatique. Ainsi, il a été montré que les LB anergiques peuvent être recrutés dans les centres germinatifs où ils mutent et perdent leur auto-réactivité. Par un mécanisme de « rédemption clonale » ils se transforment en cellules

productrices d'auto-Ac spécifiques d'Ag étrangers. Reed et al. détaillent cette hypothèse de rédemption clonale chez l'humain dans l'exemple de la malade des agglutinines froides au cours de laquelle un auto-Ac composé de la chaîne lourde IGHV4-34\*01 est dirigé contre les poly-*N*-acetyllactosamine carbohydrates présent sur les globules rouges et les LB (5).

#### A.I.1.b. Rupture de tolérance

La rupture de tolérance constitue l'élément fondateur de la MAI.

L'activation des LT auto-réactifs nécessite les mêmes étapes que dans le cas de LT spécifiques d'Ag étrangers. Un premier signal, correspondant à la présentation de l'Ag peptidique par une molécule HLA, et un second signal, requérant l'expression de molécules de co-stimulation, sont associés à des messagers solubles cytokiniques. Dans la majorité des MAI, les mécanismes aboutissant à la rupture de tolérance sont multiples et, le plus souvent, partiellement identifiés. Nous distinguerons l'activation des cellules auto-réactives ignorantes (qui n'ont jamais rencontré l'Ag), de l'activation de cellules auto-réactives anergiques, puis nous détaillerons les possibles mécanismes de défauts de tolérance. Parmi les mécanismes liés à l'activation de cellules auto-réactives ignorantes, nous pouvons citer la rupture de sanctuaire, la présentation d'Ag cryptiques ainsi que la modification des auto-Ag. Concernant les mécanismes conduisant à l'activation de cellules auto-réactives anergiques nous pouvons citer : le mimétisme moléculaire, « l'epitope spreading » (diversification épitopique) ainsi que l'effet bystander (6) (**Figure 1**). Il peut exister des défauts de tolérance centrale (syndrome APECED) ou périphérique (mutation du système FAS-FASL ou de FOXP3) liés à des anomalies génétiques (7), (8), (9), (10). Au-delà de ces modèles extrêmes représentés par les maladies monogéniques, des défauts quantitatifs et/ou qualitatifs des populations lymphocytaires T régulatrices ont été mis en évidence dans de nombreuses MAI.



**Figure 1: Exemples de mécanismes d'induction d'une réponse auto-immune impliquant les LT** (d'après Carol L. Vanderlugt *et al.* (6))

Après une infection microbienne, les LTh1 microbe-spécifiques (mTh1) migrent vers l'organe infecté. **A** : Le **mimétisme moléculaire** correspond à l'activation de LTh1 cross-réactifs qui reconnaissent à la fois l'épitope microbien (mTh1) et l'épitope du soi (sTh1) (a). L'activation du LT cross-réactif résulte en un relargage de cytokines et de chimiokines (b) qui recrutent et activent les monocytes et les macrophages, responsables de lésions tissulaires (c). Le relargage tissulaire d'Ag du soi et leur présentation par les CPA provoque la réaction auto-immune (d). **B** : La diversification d'épitope (**epitope spreading**) implique la présence d'une infection microbienne (a) qui cause l'activation de LTh1 spécifiques des micro-organismes (b, c), ce qui entraîne une lésion tissulaire (d). Ceci entraîne le relargage de peptides du soi, qui sont alors présentés par les CPA aux LTh1 auto-réactifs (f). Les lésions continues et le relargage de peptides du soi aboutissent à la propagation de la réponse immunitaire

auto-réactive contre de multiples épitopes du soi (f). **C : L'activation de voisinage (effet bystander)** est l'activation non spécifique de LTh1 auto-réactifs. L'activation des LTh1 spécifiques de micro-organismes (a, b) conduit au développement de l'inflammation (c, d) et induit une augmentation de l'infiltration des LT au site de l'infection et l'activation de LTh1 auto-réactifs. Les LT auto-réactifs activés de cette façon médient les lésions tissulaires et perpétuent la réponse auto-immune (f). **D : Modèle de l'Ag cryptique.** Suite à une infection microbienne (a), l'interféron (IFN) $\gamma$  est secrété à la fois par les LTh1 microbe-spécifiques (b,c) et par les cellules tissulaires infectées (d). Ceci active les CPA qui peuvent métaboliser des Ag du soi (f). L'activation cytokinique des CPA peut induire une production accrue de protéase et différents processing des auto-Ag capturés, résultant dans la présentation d'épitopes cryptiques. La présentation de ces épitopes cryptiques peut activer les cellules LTh1 auto-réactifs (g), conduisant à la destruction tissulaires (h, i). APC, antigen-presenting cell; MHC II, major histocompatibility complex class II; TCR, T-cell receptor.

La survie du LB naïf mature, rescapé des étapes de sélection négative, nécessite la rencontre de l'Ag reconnu spécifiquement par son BCR. Le LB circule dans les vaisseaux lymphatiques et sanguins, dans la rate, les ganglions, les tissus lymphoïdes des muqueuses. Certains des mécanismes décrits ci-dessus sont aussi impliqués de la rupture de tolérance des LB. Ainsi, le phénomène d'épitope spreading survient quand les LB spécifiques de différents composants d'un complexe antigénique sont stimulés par un LT helper auto-réactif ayant une spécificité unique. Ainsi, de nouveaux clones de lymphocytes dirigés contre de nouveaux épitopes de l'auto-Ag initial sont recrutés et participent à la progression de la réponse auto-immune. De plus, certains auto-Ag, lorsqu'ils sont présentés par les LB, après avoir été internalisés, révèlent des épitopes initialement cachés (appelés épitopes cryptiques), qui sont alors présentés aux LT (2). Dans certains cas, si l'Ag a certaines caractéristiques structurales (présence de motifs répétés), s'il existe une stimulation des récepteurs de l'immunité innée TLR (Toll-like récepteur) ou d'un récepteur de BAFF (TACI, transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor), ou encore, s'il s'agit d'un LB de la zone marginale, ce LB peut être activé sans l'aide d'un LT. Cette réponse T-indépendante peut mener à l'apparition de LB mémoires à IgM, qui peuvent se différencier en plasmocytes sécrétant des IgM de faible affinité pour l'Ag. Ces LB mémoires peuvent ensuite se différencier en plasmocytes de courte durée de vie et pourraient jouer un rôle dans le développement de MAI (11). Le Fc $\gamma$ RIIb est un Fc-récepteur inhibiteur qui régule négativement l'activation lymphocytaire B induite par le BCR. Une diminution de l'expression ou un défaut de fonction de Fc $\gamma$ RIIb est associé à la survenue de MAI. Cependant, il a été montré que Fc $\gamma$ RIIb pouvait avoir un rôle différent en fonction du point de contrôle de tolérance, sa diminution pouvant, par exemple, être responsable de l'expansion de LB auto-réactifs au sein des centres germinatifs (12).

Enfin, il est intéressant de mentionner que la survie des LB est sous la dépendance de la cytokine BAFF (B-cell activating factor of the TNF family) qui est produite en quantité limitée. La fixation de BAFF à son récepteur BAFF-R entraîne une augmentation de la survie des LB en périphérie, notamment *via* l'induction d'expression de BCL2 (13). Un autre mécanisme d'action de BAFF passe par l'induction d'expression de PIM2 (serine thréonine kinase), qui induit la survie des LB en inhibant l'action de la protéine pro-apoptotique BAD (14). La stimulation constante d'un BCR auto-réactif entraîne l'expression de BIM qui est capable d'inhiber BCL2, et a donc un effet pro-apoptotique. Cette induction de BIM augmente la dépendance de la cellule au facteur de survie BAFF (15). BAFF est, en effet, capable de diminuer l'expression de BIM *via* la voie de signalisation ERK (16). Ainsi, BAFF va donner un avantage de survie aux LB auto-réactifs.

## A.I.2. Les maladies auto-immunes

### A.I.2.a. Définition et épidémiologie

Les MAI sont provoquées par une réaction immunitaire vis-à-vis du soi. Elles sont l'expression pathologique du phénomène d'auto-immunité. Cependant, la seule détection d'auto-anticorps (Ac) ne suffit pas à diagnostiquer une MAI ; en effet, la présence d'auto-Ac, généralement à taux faible et non pathogène, est possible chez un sujet sain. Les MAI ne peuvent être définies que sur la présence d'un ensemble de critères cliniques et biologiques. Quatre critères majeurs permettent d'affirmer l'origine auto-immune d'une maladie (17) : 1) la mise en évidence d'une réaction auto-immune (humorale ou cellulaire) dirigée contre l'organe à l'origine des manifestations cliniques ; 2) la démonstration du pouvoir pathogène des effecteurs auto-immuns *in vitro* par des tests fonctionnels ou *in vivo* par des expériences de transfert ; 3) l'induction d'une maladie expérimentale par immunisation avec l'auto-Ag cible ; 4) la prévention ou la suppression de la maladie par l'administration d'un traitement immunosuppresseur. Peu de MAI réunissent l'ensemble de ces critères et, dans de nombreux cas, seuls deux ou trois de ces critères sont présents.

Les MAI affectent 3 à 5% de la population générale, les thyroïdites auto-immunes et le diabète de type I étant les pathologies les plus fréquentes. L'incidence et la prévalence, l'âge de début et le sex ratio varient en fonction du type de MAI, et de l'origine géographique. De façon encore inexpliquée, il existe une prédominance féminine dans la plupart des MAI. Nous pouvons citer, par exemple, la sclérose en plaques (sex ratio femme/homme : 2/1), la cirrhose biliaire primitive (CBP) (10/1), les hépatites auto-immunes (4 à 10/1), le syndrome de Sjögren primitif (SSp) (9/1), le lupus érythémateux systémique (LES) (9/1) ou encore la polyarthrite rhumatoïde (PR) (2/1) (18).

### A.1.2.b. Classification des maladies auto-immunes

Les MAI peuvent être schématiquement divisées en MAI spécifiques d'organe ou de tissus (comme les thyroïdites auto-immunes, la myasthénie et le pemphigus) et MAI non spécifiques d'organes encore appelées maladies systémiques (LES, PR, SSp, syndrome des anti-phospholipides, sclérodermie, dermatopolymyosite, polymyosite). Cependant, la frontière entre ces deux entités n'est pas absolue. Les MAI spécifiques d'organe sont caractérisées par une réponse auto-immune dirigée contre des Ag exprimés spécifiquement par l'organe cible. La réponse auto-immune n'a alors pour cible qu'un seul organe ou type cellulaire. Les MAI systémiques sont, elles, caractérisées par des manifestations pathologiques plus étendues, dont la rupture de tolérance intéresse des auto-Ag ubiquitaires, exprimés dans un grand nombre de tissus. Ces maladies n'en demeurent pas moins Ag-spécifiques et peuvent, paradoxalement, s'exprimer préférentiellement au niveau d'un ou de plusieurs organes comme, par exemple, la PR qui est caractérisée par une atteinte du tissu synovial (19). L'expression des auto-Ag peut se modifier au cours du développement d'un individu et expliquer ainsi la variabilité des atteintes auto-immunes. Par exemple, au cours du SSp, les Ac anti-SSA (anti-Sjögren-syndrome-related antigen A) se lient au système de conduction cardiaque chez le fœtus, pouvant entraîner un bloc auriculo-ventriculaire complet, alors que ce phénomène n'est pas observé chez l'adulte (20).

### A.1.3. Les « épithélites auto-immunes »

Les tissus épithéliaux comme la peau, les muqueuses ou les glandes (exocrines ou endocrines) sont des cibles fréquentes de la réponse immunitaire conduisant à l'apparition de MAI. Un grand nombre de MAI affectent le tissu épithélial. L'épithélium peut également constituer la source de facteurs immunogènes impliqués dans le développement de MAI, c'est le cas, par exemple, des thyroïdites auto-immunes, du diabète de type I, ou encore du SSp (**Tableau 1**). Le tissu épithélial constitue l'interface entre l'environnement extérieur et l'intérieur du corps. Il est la porte d'entrée de nombreux micro-organismes et est susceptible de jouer un rôle important dans la reconnaissance des Ag étrangers et des Ag du soi. Par conséquent, ce tissu est essentiel dans l'initiation de la réponse immunitaire contre les Ag étrangers, mais également dans l'induction de tolérance envers les molécules du soi. Nous nous attacherons à décrire certaines caractéristiques structurales et fonctionnelles des tissus épithéliaux qui en font une cible préférentielle des réactions auto-immunes et le socle potentiel du développement de l'auto-immunité (21).

**Tableau 1 : Principales maladies auto-immunes au cours desquelles il existe une atteinte épithéliale et des facteurs immunogènes identifiés (d'après Rodríguez *et al.* (21)).**

MALADIE AUTO-IMMUNE	ORGANE CIBLE	FACTEUR IMMUNOGENE IDENTIFIE	SOURCE PRINCIPALE DU FACTEUR IMMUNOGENE
Thyroïdite auto-immune	Thyroïde	Thyroglobuline, Thyro-peroxydase, TSH-Récepteur	Epithélium (Thyrocytes)
Syndrome de Sjögren	Glandes exocrines	Ribonucléoprotéine Ro (SSA)/La (SSB)	Epithélium glandulaire exocrine
Lupus érythémateux systémique	Glomérule rénal	Nucléosome	Epithélium
Diabète de type 1	Pancréas	Proinsuline, décarboxylase de l'acide glutamique (GAD), protéine tyrosine phosphatase IA2, transpoteur du zinc 8, protéine IGRP	Epithélium glandulaire endocrine du pancréas
Cirrhose biliaire primitive	Foie	Sous-unité E2 du complexe oxo-acide déshydrogénase (PDC-E2)	Epithélium (cellules épithéliales biliaires)
Vitiligo	Peau	SOX9, SOX10, PMEL (Premelanosomal protein), Tyrosinase, TYRP1 (Tyrosine related protein 1), DDT (D-Dopachrome tautomerase), Rab38, MCHR1 (Melanin-concentrating receptor)	Epithélium (mélanocytes)
Alopecia areata (pelade)	Peau	Structures folliculaires	Epithélium (cellules folliculaires)
Maladie coéliqua	Intestin	Gliadine (gluten)	Origine alimentaire
Maladie de Biermer	Estomac	Récepteur du facteur intrinsèque	Epithélium (cellules pariétales de la muqueuse fundique)

#### A.I.3.a. L'épithélium est une porte d'entrée pour la majorité des micro-organismes

La peau et les muqueuses représentent les portes d'entrées de la majorité des micro-organismes infectieux. Toutes ces surfaces ayant une fonction de barrière sont recouvertes de tissu épithélial. A la surface des tissus épithéliaux, en condition homéostatique, co-existent des micro-organismes commensaux, des Ag du soi et des Ag étrangers. Les cellules épithéliales sont capables d'identifier les dangers grâce à l'expression de récepteurs reconnaissant les PAMP/DAMPs (pathogen associated molecular pattern receptors/danger associated molecular pattern), tels que les TLRs (*Toll like receptors*), NLRs (*Nucleotide-binding and oligomerization domain-NOD-like receptors*) et RLRs (*RIG-I-like receptors*). Ces récepteurs sont fortement exprimés par les épithéliums et

reconnaissent des molécules telles que les lipopolysaccharides, les peptidoglycanes, les acides nucléiques et peuvent ainsi participer au déclenchement de la réponse immune. La dérégulation de la réponse à ces signaux de dangers peut participer au développement d'une réponse auto-immune.

#### A.1.3.b. L'épithélium est une cible des infections virales

Les virus ont un tropisme préférentiel pour les cellules hôtes qui ont une fréquence de cycle de réplication élevée. Ainsi, les cellules épithéliales sont l'une de leur cible préférentielle. L'infection des cellules épithéliales par les virus peut entraîner leur apoptose et l'exposition d'auto-Ag. De plus, en réponse à l'attaque d'un pathogène, l'épithélium peut relarguer des alarmines telles que l'IL18, l'IL33, et l'IL1 $\beta$  ; ces alarmines sont respectivement impliquées dans les réponses Th1, Th2, et Th17. Les cellules infectées peuvent produire des chimiokines et des cytokines telles que l'interféron (IFN) de type I, ce qui attire et active les cellules inflammatoires, initiant alors la réponse immune. Une infection virale peut également être à l'origine du recrutement de cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) qui sont la source principale d'IFN $\alpha$ . Cette production d'IFN entraînera des dommages tissulaires (22).

#### A.1.3.c. Les cellules épithéliales, rôle de cellules présentatrices d'antigènes

Les CPA expriment à leur surface à la fois le complexe HLA-peptide et les molécules de co-stimulation (CD80, CD86) nécessaires à l'expansion clonale des LT naïfs et à leur différenciation en cellules effectrices. Les trois principales CPA présentes dans les organes lymphoïdes périphériques sont les cellules dendritiques, les macrophages et les LB. Les CES sont, elles aussi, capables d'exprimer les HLA de classe I et de classe II sous l'action de stimulations cytokiniques. De plus, il a été montré qu'elles peuvent exprimer des molécules de co-stimulation CD80, CD86 et CD40 ce qui en fait des CPA non-professionnelles potentielles (23), (24).

#### A.1.3.d. Tissu épithélial et apoptose

Les tissus épithéliaux ont un taux de renouvellement élevé. L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus au cours duquel les cellules sont éliminées. L'apoptose est une source majeure d'auto-Ag qui, dans des conditions normales, ne provoque pas de réponse immune. Cependant, dans une condition de stress (inflammation, traumatisme...), elle peut devenir une source

de PAMP/DAMP et d'auto-Ag modifiés qui pourront induire une réponse immune. Il a, par exemple, été montré que l'agent immunogène majeur dans le LES est le nucléosome (structure de stockage de la chromatine) qui peut être relargué par les cellules épithéliales entrant en apoptose à la fin du cycle cellulaire. Dans des conditions normales, les nucléosomes ne sont pas exposés au système immunitaire car les cellules apoptotiques sont phagocytées par les macrophages et les cellules dendritiques. Cependant, dans le cas du LES, un défaut de phagocytose par les macrophages entraîne une exposition des molécules apoptotiques à l'environnement tissulaire et à des modifications post-traductionnelles éventuelles. Les nucléosomes sont alors exposés au système immunitaire, et des Ac anti-ADN sont produits avec formation potentielle de complexes immuns pouvant se déposer dans les tissus (25). Au cours du SSp, l'apoptose des cellules épithéliales acineuses et ductales a été proposée comme mécanisme responsable de la diminution de la fonction sécrétrice (26). Cette apoptose pourrait être induite par les LT cytotoxiques *via* la production de protéases (perforine/granzyme B) ou encore *via* l'axe Fas-FasL. Il a par exemple été montré qu'au cours de l'apoptose, les Ag SSA et SSB sont redistribués dans la cellule et sont localisés à la surface de corps apoptotiques (27). Ainsi, l'apoptose des cellules épithéliales salivaires (CES) pourrait être responsable d'une augmentation de la présentation antigénique *via* les corps apoptotiques ou les exosomes.

#### A.1.3.e. Drainage des antigènes produits par le tissu épithélial

Le tissu épithélial contient peu de vaisseaux sanguins et lymphatiques. Il est nourri par diffusion d'oxygène et de métabolites, à partir des vaisseaux du tissu conjonctif sous-jacent. Les substances produites par l'épithélium glandulaire exocrine sont directement excrétées vers l'extérieur. La plupart des Ag présents dans le tissu épithélial ne passent pas dans la circulation lymphatique sauf en cas de traumatisme ou d'infection. Ces Ag présents dans le tissu ne sont donc habituellement pas exposés aux lymphocytes circulants dans le sang et aux lymphocytes présents dans les organes lymphoïdes. *A contrario*, les organes endocrines drainent leur production dans le sang. Lorsque les cellules meurent par apoptose, celles-ci sont éliminées par des macrophages et des cellules dendritiques présentes dans le tissu conjonctif sous-jacent. Ainsi, en cas de dommage tissulaire, les Ag habituellement séquestrés anatomiquement peuvent être relargués et reconnus par des CPA, puis être transportés *via* les vaisseaux lymphatiques jusqu'aux tissus lymphoïdes associés à la peau et aux muqueuses où la réponse immunologique est initiée. Ceci pourrait expliquer pourquoi les MAI sont fréquentes dans les organes endocrines.

L'ensemble de ces caractéristiques concède au tissu épithélial de véritables fonctions immunitaires. Ainsi, le tissu épithélial peut participer à la mise en place et à la pérennisation de la réponse auto-immune.

## A.II. Le Syndrome de Sjögren

### A.II.1. Définition et épidémiologie

Le SSp est une MAI systémique caractérisée par une infiltration lymphocytaire des glandes lacrymales et salivaires conduisant à l'apparition d'un syndrome sec oculaire et buccal. Le SSp touche principalement les femmes (9 femmes / 1 homme) avec un pic de fréquence autour de 50 ans. Sa prévalence est estimée entre 0,01 et 0,09 % (28). Le syndrome de Sjögren peut survenir seul ou être associé à des MAI spécifiques d'organe telles qu'une thyroïdite, une CBP, une cholangite ou à une autre MAI systémique telle que la PR, le LES, la sclérodémie ou encore la dermatomyosite (29). Les critères de classification du SSp, proposés en 2016 par l'American College of Rheumatology et l'EULAR (30), reposent sur l'association de critères objectifs de sécheresse oculaires et/ou buccale, de signes histologiques évaluant l'infiltration lymphocytaire glandulaire sur une biopsie de glande salivaire, et la présence d'auto-Ac anti-SSA (**Tableau 2**).

**Tableau 2 : Critères de classification du SSp proposés en 2016 par l'American College of Rheumatology et l'EULAR (30).** Les critères de classification du SSp s'appliquent aux individus ayant un score  $\geq 4$  en additionnant les critères suivants, en l'absence de critères d'exclusion (antécédent d'irradiation cervicale, infection par le VHC, Infection par le VIH, sarcoïdose, amylose, réaction du greffon contre l'hôte, maladie associée aux IgG4).

Critères	Points
Sialadénite lymphocytaire avec focus score* $\geq 1$ sur la biopsie de glandes salivaires accessoires	3
Anticorps anti-SSA/Ro positif	3
Ocular Staining Score $\geq 5$ pour au moins un œil	1
Test de Schirmer $\leq 5$ mm/ 5 min pour au moins un œil	1
Flux salivaire sans stimulation $\leq 0,1$ mL / min	1

\*Focus score : nombre d'amas d'au moins 50 cellules lympho-plasmocytaires sur un champ de 4mm<sup>2</sup> de tissu salivaire

Deux scores d'activité ont été développés. L'ESSDAI (EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index) est un score international évaluant l'activité systémique de la maladie. Un seuil d'activité systémique modérée (ESSDAI  $\geq$  5), correspondant à une activité systémique suffisante pour espérer une amélioration sous traitement, a été défini. Le score ESSPRI (EULAR Sjögren's Syndrome Patient Reported Index) a été développé pour permettre une évaluation des symptômes par le patient lui-même (31), (32).

Parmi les maladies auto-immunes, le SSp constitue un modèle d'étude particulièrement intéressant. Cette maladie est, en effet, à la croisée des maladies auto-immunes spécifiques d'organe et des maladies systémiques. Sur le plan physiopathologique, il s'agit d'un modèle d'hyperactivation lymphocytaire B impliquant le système immunitaire inné et adaptatif. Enfin, en pratique, l'accès aux glandes salivaires, tissu cible de la maladie, est aisé et peu invasif.

## A.II.2. Caractéristiques clinique, biologique et histologique

### A.III.2. a. Atteinte glandulaire

Le SSp touche principalement les glandes exocrines oculaires et buccales. Les symptômes fréquents sont une xérophtalmie et une xérostomie. La sécheresse peut également être cutanée, vaginale ou bronchique. Il existe une infiltration progressive du tissu épithélial des glandes oculaires et/ou salivaires par des lymphocytes et des plasmocytes. L'épithélium glandulaire est le siège d'un infiltrat lymphocytaire, conduisant à la diminution de la fonction sécrétrice des glandes.

### A.II.2.b. Manifestations systémiques

Des atteintes extra-glandulaires de la maladie touchant les articulations (arthralgies, polyarthrite), les muscles (myalgies), la peau (purpura), le système nerveux (déficit neurologiques centraux, paralysie des nerfs crâniens, myélopathie et neuropathie périphérique), les poumons (trachéobronchite sèche, bronchectasies, bronchites à répétition, fibrose pulmonaire interstitielle diffuse, pleurésie et pneumonie interstitielle), ou le rein (tubulopathie et plus rarement glomérulopathie) peuvent être présentes chez 30 à 40 % des patients ayant un SSp (29).

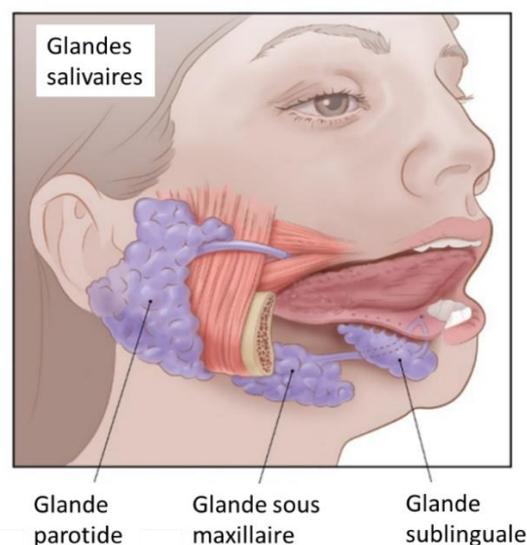
### A.II.2.c. Biologie

La prévalence des Ac anti-nucléaires, dépistés par immunofluorescence indirecte sur cellules Hep-2, varie de 50 à 80 % selon les auteurs au cours du SSp. Les deux Ac les plus utiles pour établir le diagnostic sont les Ac anti-SSA/Ro60 et anti-SSB/La. Les Ac anti-SSA sont présents dans 50 à 90 % des

cas. Ils ne sont pas spécifiques du SSp et sont présents dans environ 30 % des cas de LES. Les Ac anti-SSB apparaissent quasi exclusivement chez des malades ayant déjà des Ac anti-SSA et correspondent à une diversification épitopique. Ils sont retrouvés dans 30 à 60 % des cas de SSp. Les LB producteurs d'Ac anti-SSA et anti-SSB sont présents au sein de l'infiltrat mononucléé des glandes exocrines (33). Des LT spécifiques d'épitopes de ces protéines ont également été décrits dans l'infiltrat (34). Les Ac anti-SSA ont un rôle pathogène direct sur le tissu conducteur cardiaque du fœtus entraînant un bloc auriculo-ventriculaire néonatal. En dehors de cet exemple, les Ac anti-SSA et anti-SSB n'ont pas de rôle pathogène direct connu. Les facteurs rhumatoïdes (FR) sont détectés dans 40 à 80 % des cas de SSp, soit presque aussi fréquemment que dans la PR (35). Il existe souvent une hypergammaglobulinémie détectée chez près de 30 % des patients. Enfin, une lymphopénie T CD4 est observée chez 10 % des patients (35) et est associée au risque de développer un lymphome (29).

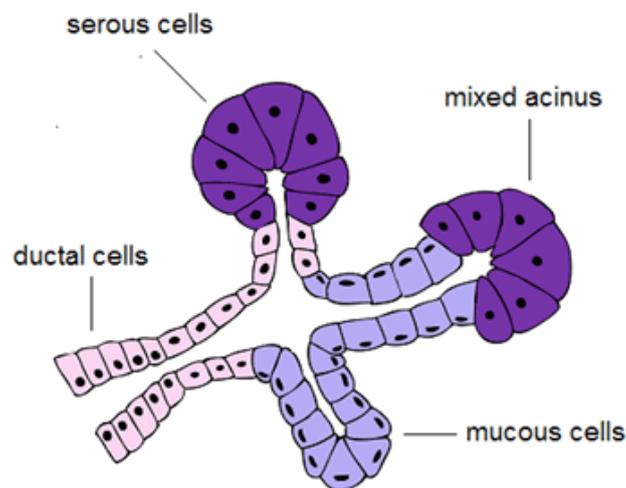
#### A.II.2.d. Spécificité de l'atteinte des glandes salivaires au cours du SSp

La physiopathologie du SSp a longtemps été étudiée à la lumière des découvertes faites dans le LES. Cependant, le tropisme épithélial est une spécificité du SSp et l'étude précise des mécanismes à l'échelle tissulaire est possible grâce à la réalisation de biopsies de glandes salivaires accessoires qui sont réalisées en pratique courante pour le diagnostic. Les glandes salivaires sont des glandes exocrines. Il existe trois paires de glandes salivaires principales : parotides, sous-maxillaires et sous-linguales (**Figure 2**), ainsi que des glandes salivaires accessoires. Les glandes salivaires, annexées à la cavité buccale, produisent environ un litre de salive par jour.



**Figure 2: Représentation de l'anatomie des glandes salivaires** (d'après un schéma de l'American cancer society)

Histologiquement, il s'agit de glandes composées. Le segment excréteur est formé par un canal ramifié dont le calibre est de plus en plus petit. Aux extrémités des ramifications se trouvent les éléments sécréteurs (acini ou tubes) (**Figure 3**). De façon plus précise, les glandes parotides sont des glandes acineuses (glandes séreuses), les glandes sublinguales et annexées à la cavité buccale sont des glandes tubuleuses (glandes muqueuses) et les glandes sous maxillaires sont des glandes mixtes composées de tubes et d'acini. On distingue les canaux intercalaires, striés et excrétoires qui participent tous au transport de la salive vers les surfaces muqueuses. Les cellules acineuses sont responsables de la synthèse des composants de la salive (36). Les cellules myoépithéliales qui enveloppent les formations de cellules acineuses aident à l'excrétion de la salive. La salive est alors transportée dans les petits canaux intercalaires puis dans des canaux de plus gros calibre, les canaux striés, jusqu'à la cavité buccale.



**Figure 3: Organisation histologique d'une glande salivaire** (d'après Kohler *et al.*) (37). Les glandes sont entourées d'une capsule conjonctive d'où partent des cloisons délimitant des lobes et lobules au sein du parenchyme. Dans chaque lobule, il existe des éléments sécréteurs, les acini, drainés par des canaux excréteurs, d'abord intra-lobulaires, puis extra-lobulaires

Au cours du SSp, les glandes salivaires sont le siège d'un infiltrat lymphocytaire autour des canaux striés. Ces infiltrats sont appelés foci périductaux et peuvent être observés dans les glandes salivaires mineures et majeures de la plupart des patients atteints de SSp. Les foci sont principalement composés de LB et LT ainsi que de d'autres cellules mononucléées telles que les macrophages, les cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes, ou encore les cellules dendritiques folliculaires. L'atteinte des glandes salivaires est évaluée en utilisant le focus score. Le focus score est défini par le nombre d'amas d'au moins 50 cellules lympho-plasmocytaires sur un champ de 4mm<sup>2</sup> de tissu

salivaire. Dans les glandes salivaires accessoires, comme dans les glandes parotides, un focus score  $\geq 1$  est le seuil utilisé dans les critères de classification ACR/EULAR. Le focus score est en général stable au cours du temps et ne progresse que lentement (38), (39).

Le score de Chisholm et Masson (grade de 0 à 4) est également basé sur le nombre de foci :

Grade 0 : absence d'infiltrat

Grade 1 : discret infiltrat inflammatoire

Grade 2 : infiltrat modéré ou inférieur à 1 focus

Grade 3 : 1 focus ( $> 50$  lymphocytes) /4 mm<sup>2</sup>

Grade 4 :  $> 1$  focus/4 mm<sup>2</sup>

La suspicion de SSp est forte quand le score est égal à 3 ou 4.

D'autres caractéristiques histologiques sont associées au SSp. Les foci peuvent s'organiser en structures lymphoïdes tertiaires, contenant des LB et LT et des veinules endothéliales, appelées HEVs (high endothelial venules). Ces structures contiennent tous les facteurs nécessaires à l'apparition d'une réponse immune effective. La présence de centres germinatifs ectopiques a été décrite chez 20% à 30 % des patients (40). De plus, des plasmablastes et des plasmocytes sont présents dans les zones bordantes de l'infiltrat (41). Enfin, les lésions lympho-épithéliales correspondent à l'infiltration lymphocytaire des canaux ductaux associée la présence d'une hyperplasie des cellules épithéliales. Cette hyperplasie pourrait conduire à l'occlusion complète des canaux striés. Plus les lésions lympho-épithéliales sont sévères, plus le nombre relatif de LB dans les lésions augmente, suggérant un lien entre LB et cellules épithéliales (42).

### A.III. Physiopathologie du SSp

La pathogénie du SSp implique les systèmes immunitaires inné et adaptatif. Elle n'est pas encore complètement élucidée et combine des facteurs multiples génétiques, environnementaux et hormonaux. Le SSp partage avec le LES de nombreuses caractéristiques physiopathologiques, l'identité des gènes HLA associés aux anti-SSA/SSB, la présence de cellules productrices d'IFN dans les organes cibles et la présence d'une signature IFN. Le SSp illustre la place centrale du LB entre immunité innée et immunité adaptative. Nous détaillerons les différents facteurs impliqués dans la physiopathologie du SSp.

### A.III.1 Déclenchement de la maladie

#### A.III.1.a. Rôle du terrain génétique et épigénétique

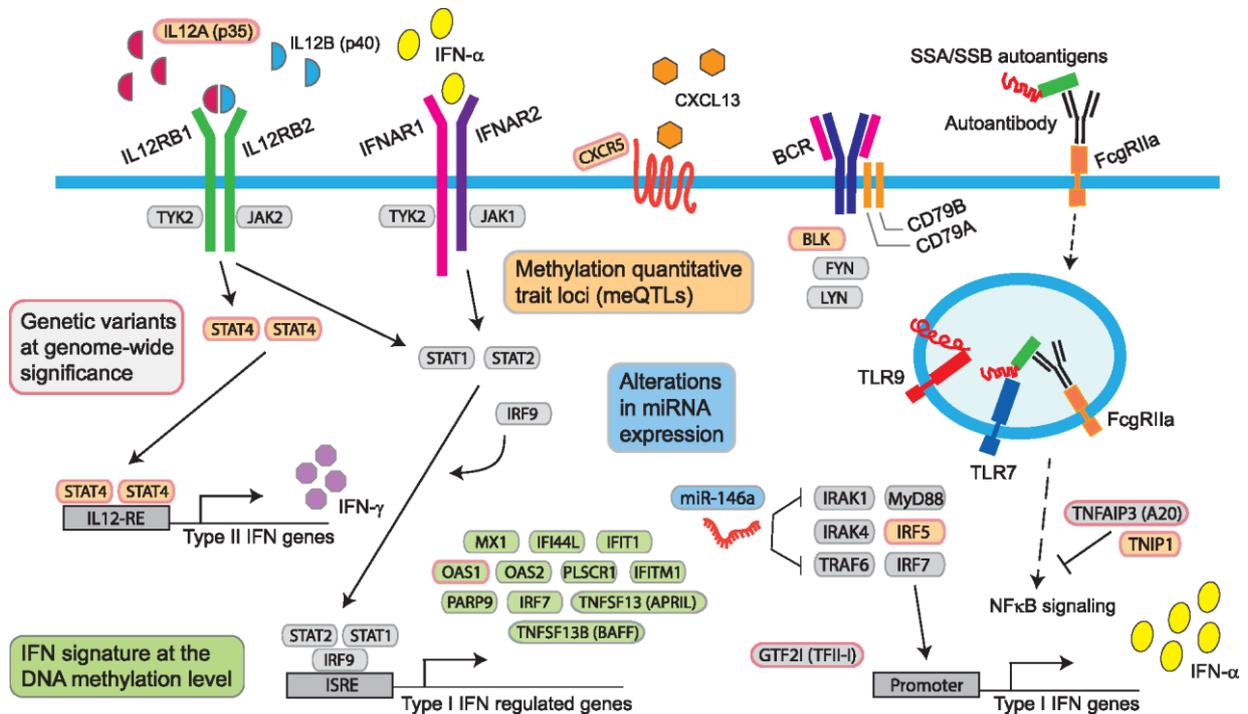
##### Génétique

Plusieurs arguments sont en faveur de l'existence un terrain génétique particulier favorisant le SSp. Les cas familiaux sont, certes, peu fréquents, mais il n'est pas rare de retrouver d'autres MAI dans la famille d'un patient atteint de SSp. Les Ag d'histocompatibilité représentent l'un des éléments clé de cette prédisposition au SSp. Des études d'association pangénomique (GWAS) réalisées dans le SSp ont montré des associations avec plusieurs gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (43), (44). Dans la population caucasienne, il existe une association avec les allèles DR2 et DR3 situés dans le locus DRB1 (45). Une autre étude a identifié trois allèles HLA de classe II associés à la maladie : HLA-DQA1\*05:01, HLA-DQB1\*02:01 et HLA-DRB1\*03:01. De façon intéressante, l'association entre HLA-DRB1\*03, HLA-DQB1\*02 et le SSp apparaissait spécifique des patients avec auto-Ac anti-SSA ± anti-SSB (44). Une autre étude a montré que l'association entre HLA et SSp n'est présente que chez les patients avec auto-Ac anti-SSA et/ou anti-SSB. Dans cette étude, des données suggèrent que le HLA-DR15 est associé à la présence d'anti-SSA tandis que le HLA-DR3 est associé à la présence d'anti-SSA et d'anti-SSB (46). Li *et al.*, ont réalisé une étude montrant une association forte du SSp avec les allèles HLA-DRB1, HLA-DQA1 et HLA-DPB1 (47). Enfin, une méta-analyse de 1166 cas et 6470 contrôles incluant les résultats de 23 études a confirmé l'association entre SSp et les allèles HLA de classe II: DRB1\*03:01, DQA1\*05:01 et DQB1\*02:01 (48).

La présence d'une signature IFN au cours du SSp a conduit plusieurs équipes à explorer d'un point de vue génétique l'existence de polymorphismes pouvant être associés au SSp et leur impact fonctionnel sur la production d'IFN. Certaines susceptibilités génétiques, notamment un polymorphisme du gène *IRF5* ((IFN regulatory factor 5), facteur de transcription impliqué dans la voie IFN, associé au SSp (49)), ou encore un polymorphisme de *STAT4* ((Signal Transducer and Activator of Transcription), facteur de transcription impliqué dans la voie IFN type II et la différenciation Th1), pourraient favoriser la signature IFN (50). Lessard *et al.* ont confirmé ces résultats sur les polymorphismes de *IRF5* et *STAT4* (44). De plus, ils ont mis en évidence un polymorphisme du gène codant pour TNIP1 (TNFAIP3-interacting protein), facteur régulateur de NF-κB *via* son interaction avec la protéine A20, associé au SSp. Enfin, il a été montré, dans cette étude, que des polymorphismes situés sur le locus HLA (*HLA-DQB1*), sur les loci des gènes *BLK* (B-lymphocyte kinase), *IL12A* (sous-unité α IL12) et *CXCR5* sont associés au SSp (44).

Ces résultats suggèrent des mécanismes pathogéniques au cours du SSp impliquant : le système immunitaire inné et notamment la voie IFN (*IRF5*, *STAT-4* et *TNIP1*), l'activation lymphocytaire B

(*CXCR5* et *BLK*) et l'activation T (*HLA* et *IL12*). Un résumé des principaux gènes identifiés comme associés au SSp est présenté dans la **Figure 4**.



**Figure 4: Représentation schématique des mécanismes génétiques et épigénétiques de susceptibilité au SSp (d'après Imgenberg-Kreuz *et al.* (51)).**

Les gènes encadrés en rose sont les gènes pour lesquels des SNP (Single Nucleotide Polymorphism) associés à au SSp ont été mis en évidence (en dehors de la région HLA) : *BLK*, *CXCR5*, *GTF2I*, *IL12A*, *IRF5*, *OAS1*, *STAT4*, *TNFAIP3* et *TNIP1*. Les gènes encadrés en vert sont les gènes induits par l'IFN tels que *MX1*, *IFI44L*, *OAS1*, *OAS2*, *TNFSF13B* et *IRF7* pour lesquels des sites CPG hypométhylés ont été décrits au cours du SSp. Les gènes encadrés en orange sont les meQTLs (methylation quantitative trait loci), correspondant à l'association entre un SNP et le niveau de méthylation, démontré pour *BLK*, *CXCR5*, *IL12A*, *IRF5-TNPO3*, *STAT4* et *TNIP1*. Les microRNA (miRNAs) dont les modifications d'expression ont été identifiées dans le SSp sont encadrés en bleu.

### Épigénétique

Des mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et les ARN non-codants pourraient constituer un lien entre le génome, l'environnement et les manifestations phénotypiques en modulant l'expression de gènes (51).

Plusieurs auteurs se sont intéressés aux modifications de méthylation de l'ADN dans les PBMCs mais aussi dans les glandes salivaires (**Tableau 3**). Miceli *et al.* ont montré que les sites CPG hypométhylés dans les LB de SSp sont présents au niveau des gènes IFN-induits, plus particulièrement chez les patients ayant des auto-Ac anti-SSA et/ou anti-SSB (52). L'utilisation de nouvelles techniques d'étude du méthylome (HM450k bead chip array) a permis d'effectuer des études d'association épigénomiques de type « EWAS » (epigenome-wide association studies) (**Tableau 3**). Ces modifications épigénétiques pourraient notamment avoir un rôle dans l'apparition de la signature IFN chez les patients SSp (**Figure 4**).

**Tableau 3 : Etude de la méthylation de l'ADN chez des patients atteints de SSp** (d'après Imgenberg-Kreuz *et al.* (51)).

Cellules / Tissu	Cas/contrôles (n)	Résultat principal	Références
LT CD4 naïf	11/11	Hypométhylation de <i>LTA</i> et de gènes IFN-induits	Altorok <i>et al.</i> (53)
LT CD4+, LB CD19+	26/22	Plus grande différence de méthylation des LB que des LT	Miceli-Richard <i>et al.</i> (52)
Sang total, LB CD19+, glandes salivaires	100/400, 24/47, 15/13	Hypométhylation de gènes IFN-induits	Imgenberg-Kreuz <i>et al.</i> (54)
Glandes salivaires	13/13	Méthylation différentielle des promoteurs de 57 gènes (dont <i>Lymphotoxin Alpha</i> et <i>CXCR5</i> )	Cole <i>et al.</i> (55)
Cellules épithéliales salivaires	8/4	Hypométhylation de gènes IFN-induits et signal calcique	Charras <i>et al.</i> (56)

Les microRNAs (miRNAs), petits ARNs constitués d'une vingtaine de nucléotides, sont d'autres acteurs importants des modifications épigénétiques. Ils peuvent, par exemple, être responsables d'une dégradation des ARNs messagers (ARNm) ou empêcher leur traduction. Les analyses de glandes salivaires et de PBMCs ont montré une expression différentielle de certains miRNAs entre patients SSp et sujets contrôles (57), (58), (59). De plus, l'analyse des sous-populations lymphocytaires T et B de patients atteints de SSp a permis de montrer l'expression différentielle entre patients SSp et contrôles de plusieurs miRNAs dans les LT CD4 et les LB. De façon intéressante, une corrélation inverse entre l'expression de *BAFF* et de *hsa-miR-30b-5p* dans les LB de patients SSp a été décrite (60).

### A.III.1.b. Rôle de facteurs déclenchants infectieux

#### Infection

Les infections virales ont été le premier facteur environnemental suspecté pour deux raisons principales. D'une part, les glandes exocrines sont, par leur interaction avec le milieu extérieur, particulièrement exposées aux agents infectieux. D'autre part, certaines infections virales, comme les infections par le VHC (virus de l'hépatite C), HTLV1 (Human T Lymphotropic Virus type I) ou le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), sont associées à l'apparition d'un syndrome sec. Un infiltrat lymphoïde salivaire, identique à celui observé dans le SSp, est décrit chez la moitié des patients présentant une hépatite C chronique, mais n'est jamais associé à la présence d'auto-Ac anti-SSA et anti-SSB (61). Les virus HTLV-1 (62), (63) et EBV (Epstein Barr Virus), tous deux associés à la lymphomagenèse ont également été suspectés. Au Japon, en zone d'endémie pour HTLV-I, il a été montré que chez des patients atteints de SSp la fréquence d'une sérologie positive pour HTLV-I est de 25 %, alors qu'elle n'est que de 5 % dans la population générale de la même région et dans une population atteinte de LES (62). Le génome et les protéines de l'EBV sont plus fréquemment retrouvés dans les glandes salivaires de patients SSp que dans celles des contrôles (64). Ce génome est, par exemple, détecté par hybridation *in situ* dans les CES de 50 % des malades *versus* 8 % des contrôles (65). La présence d'Ac anti-EBV de type EA (early antigen) chez les patients SSp est associée à la présence d'auto-Ac anti-SSA/B et à des marqueurs d'activité de la maladie ( $\beta$ 2-microglobuline, chaînes légères libre et taux élevé d'IgG). Cependant, la réponse anti-EBV n'est pas corrélée à la présence d'ADN d'EBV plasmatique, suggérant un contrôle suffisant de l'infection EBV au cours du SSp (66). Par ailleurs, il a été montré que les « EBV-encoded small RNA » pourraient former des complexes avec l'Ag SSB et induire ainsi une signalisation par TLR3, responsable de la production d'IFN de type I (67). De façon intéressante, il a été montré qu'un traitement par poly(I:C), agoniste de TLR3, active l'immunité innée et induit une inflammation des glandes salivaires dans un modèle murin (68), (69). Enfin, l'hypothèse qu'une infection virale entraîne la modification d'une cible favorisant ensuite l'apparition d'une MAI a été évoquée. Il a été montré que l'infection par CMV de souris B6-lpr/lpr déficientes en Fas (génétiquement prédisposées au développement de MAI systémique avec glomérulonéphrite, mais sans atteinte salivaire vers l'âge de 6-8 mois) induit le développement d'une maladie inflammatoire des glandes salivaires proche du syndrome de Sjögren trois mois après l'infection. Ceci survient alors que le virus a été complètement éliminé des glandes salivaires (70).

Il n'existe actuellement pas de démonstration de l'implication directe de ces agents infectieux dans le développement du SSp. Ceci pourrait être dû au fait que l'agent infectieux initialement impliqué n'est plus détectable au moment du diagnostic de la maladie. Une autre explication pourrait être que ce soit

l'expression de séquences endogènes rétrovirales, elle-même liée à des modifications épigénétiques, qui conduise à l'activation de la voie IFN de type I.

### Séquences endogènes rétrovirales

Le génome des eucaryotes est constitué d'un ensemble de séquences d'ADN dont certaines ont une origine particulière, que l'on nomme « éléments transposables ». Ils représentent environ 2/3 du génome humain (71). Parmi les types de rétrotransposons du génome humain, nous pouvons citer, par exemple, les HERV (human endogenous retrovirus), les séquences LINE (long interspersed elements) et les séquences SINE (short interspersed elements). Un rôle des séquences endogènes rétrovirales dans les MAI a été suggéré par la détection d'Ag rétroviraux ou d'Ac spécifiques dans les tissus cibles de la maladie et dans le sérum des patients. L'expression de séquences endogènes rétrovirales pourrait activer les réponses immunitaires innées et adaptatives par différents mécanismes :

- Mimétisme moléculaire avec des auto-Ag ;
- Reconnaissance des HERV par les PRR (pathogen recognition receptors) entraînant l'activation du système immunitaire inné ;
- Super-Ag activant les LT auto-réactifs ;
- Activation/ suppression de gènes impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire.

### *HERV*

Les séquences endogènes rétrovirales HERV constituent une large part de notre génome. Leur transcription peut être induite par des facteurs environnementaux dont les mieux étudiés sont les infections causées par des virus de la famille des herpès virus. Cette activation peut conduire à la synthèse de protéines pathogènes comme des protéines d'enveloppe appartenant aux familles HERV-W et HERV-K décrites, respectivement, dans la sclérose en plaques et la sclérose latérale amyotrophique. Certaines séquences endogènes rétrovirales de la famille HERV sont plus souvent retrouvées chez les patients atteints de SSp (**Tableau 4**).

**Tableau 4 : Séquences endogènes rétrovirales de la famille HERV décrites au cours du SSp**

Séquence endogène rétrovirale	Technique	Principaux résultats	Auteurs
HIAP-1	PCR	HIAP-1 détecté dans les glandes salivaires de patients SSp La majorité des patients SSp ont des Ac sériques dirigés contre HIAP-1	Sander <i>et al.</i> , 2005 (72)
HRES-1	Northern blot, ELISA	Taux élevé d'Ac dirigés contre HRES-1 présents chez les patient SSp	Brookes <i>et al.</i> (73)
HERV-E env protein ( $\lambda$ 4-1)	Western blot	Ac anti-p30gag détectés dans le sérum de patients atteints de LES ou SSp ou connectivite mixte	Hishikawa <i>et al.</i> (74)
HERV-K113	PCR	HERV-K113 présent plus fréquemment chez les patients SSp	Moyes <i>et al.</i> , 2005 (75)

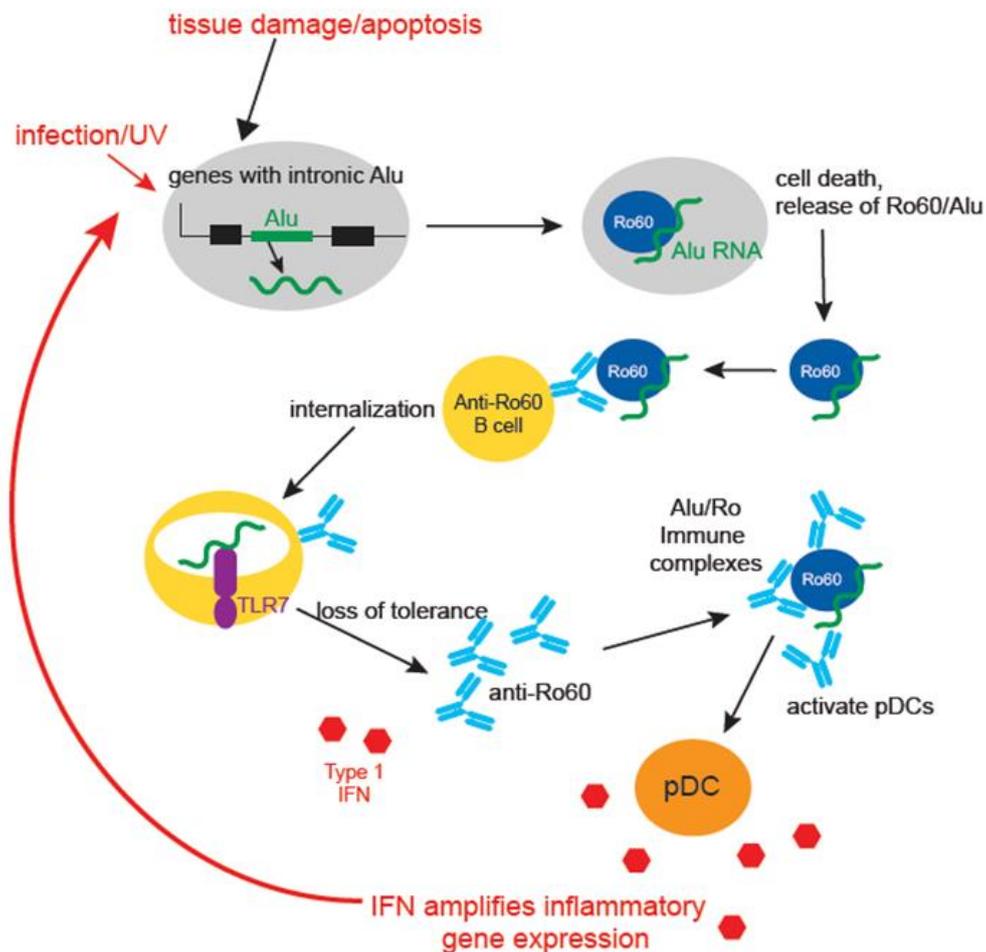
#### LINE

Les rétrovirus endogènes de la famille LINE (long interspersed nuclear element 1) semblent être également une piste intéressante. Un travail récent, a mis en évidence que les CES ductales exprimaient les séquences LINE-1 au cours du SSp. Les retro-éléments LINE-1 stimulent les pDCs, activant la production d'IFN de type I. L'utilisation d'inhibiteurs de la transcriptase de LINE-1 pourrait alors avoir un intérêt dans le traitement du SSp (76). Cette surexpression des séquences LINE pourrait être dûe à une dérégulation épigénétique par hypométhylation des régions régulatrices de leur transcription. Il a, en effet, été montré que des altérations des mécanismes de méthylation au cours du SSp et du LES sont associées à la présence de lymphome ainsi qu'à l'expression de LINE-1 (77).

#### SINE

Les séquences Alu sont des séquences de type SINE caractérisées par un site de reconnaissance unique pour l'enzyme de restriction AluI. Ces séquences Alu pourraient jouer un rôle dans le SSp. Hung *et al.* ont, montré que le motif ARN dérivé d'éléments endogènes Alu peut se lier à l'Ag SSA (Ro60). A partir de deux lignées cellulaires stimulées par IFN $\alpha$ , les auteurs ont identifié par méthode iCLIP (individual nucleotide crosslinking and immunoprecipitation) des séquences Alu liant l'Ag SSA. La délétion de SSA entraînait les mêmes effets qu'une stimulation par IFN $\alpha$ . La transfection de l'ARN contenant des séquences Alu dans des PBMCs de donneurs sains a montré que les séquences Alu sont à l'origine d'une stimulation de la sécrétion de cytokines comprenant l'IFN $\alpha$ , l'IL6 et le TNF $\alpha$ . Les

transcrits Alu sont induits par l'IFN $\alpha$  et peuvent stimuler TLR7 induisant une réponse inflammatoire (Figure 5).



**Figure 5: Lien entre Alu, SSA et IFN $\alpha$**  (d'après Hung et al., (78)). L'absorption endosomique de complexes Ro60 / Alu par des LB naïfs ou anergiques ayant un BCR spécifique de l'épitope Ro60 entraîne une activation du TLR7. Cela conduit à une activation aberrante des LB, à la production de cytokines pro-inflammatoires et à une rupture de la tolérance. Les LB activés génèrent alors des auto-Ac anti-Ro60 facilitant la formation de complexes immuns anti-Ro60 Ab / Ro60 / Alu ARN. Ces complexes alimentent ensuite le cycle de capture de Ro60 / Alu et l'activation des LB et des cellules dendritiques.

## Microbiome

La composition du microbiote dans l'intestin, la peau et d'autres sites peut aussi avoir un impact sur l'équilibre du système immunitaire et le maintien de la tolérance au soi. Les relations

cause/conséquence entre modification du microbiome et développement de l'auto-immunité restent à éclaircir (79). De plus en plus de travaux suggèrent que certains microbiomes pourraient avoir un rôle immuno-régulateur. L'étude des selles de sujets atteints de SSp a mis en évidence une augmentation relative des bactéries *Pseudobutyrvibrio*, *Escherichia/Shigella*, *Blautia*, et *Streptococcus*, tandis qu'il existait une diminution relative de *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Faecalibacterium*, et *Prevotella* par rapport à des sujets contrôles. De plus, la sévérité des symptômes oculaires et systémiques était inversement corrélée à la diversité microbienne. Ces résultats suggèrent l'existence d'une dérégulation du microbiote intestinal chez les patients SSp avec une diminution des bactéries commensales et une augmentation de la présence de bactéries potentiellement pathogènes (80). Par ailleurs, Zaheer *et al.*, ont montré dans un modèle de souris CD25 knock-out (qui développent spontanément une atteinte « Sjögren-like » incluant une dacryoadénite, une sialadénite et une keratoconjonctivite), que les souris élevées en milieu stérile développaient une atteinte des glandes lacrymales de façon plus rapide et plus sévère que les souris élevées en milieu conventionnel. Ce résultat suggère que les bactéries commensales ou les métabolites qu'elles produisent ont des propriétés immuno-régulatrices capables de protéger les glandes exocrines, dans ce modèle (81).

#### A.III.1.c. Autres facteurs

##### Hormones et chromosome X

De nombreuses MAI sont plus fréquentes chez les femmes que chez les hommes, mais le mécanisme par lequel le genre peut affecter la tolérance immunologique ou l'activation lymphocytaire reste inconnu. De plus, les MAI surviennent préférentiellement chez les femmes en période d'activité génitale et la grossesse ou la contraception hormonale peuvent être des facteurs aggravants. De façon générale, les œstrogènes sont impliqués dans le déclenchement de l'auto-immunité et constituent probablement un facteur déclenchant de la maladie sur un terrain auto-immun sous-jacent. Paradoxalement, le SSp survient le plus souvent après 50 ans chez la femme, dans une période de déficit en œstrogènes. McCoy *et al.* ont, par ailleurs, montré que les patientes ayant un SSp avaient eu une exposition plus courte aux œstrogènes et un temps cumulé de cycles menstruels plus court au cours de leur vie comparé à des patientes ayant un syndrome sec sans SSp (82). Certains auteurs suggèrent que le déficit hormonal pourrait favoriser le développement du SSp *via* l'apoptose des cellules épithéliales (83). Il a par exemple été montré qu'un traitement par tamoxifène provoquait l'apoptose de lignées épithéliales salivaires (HSG, Human submandibular gland) et de culture primaire de CES. Cet effet du tamoxifène était annulé par un pré-traitement de ces cellules par des œstrogène (84). L'influence des hormones pourrait s'expliquer en partie par l'existence de mécanismes de

régulation hormono-dépendants de l'expression de gènes de cytokines telles que l'IL6 ou encore l'IFN. Les œstrogènes ont également un rôle important et complexe dans la régulation de la maturation des LB (85). Néanmoins, l'implication des œstrogènes dans la pathologie du SSp reste controversée. Ainsi, d'autres auteurs ont montré une corrélation positive entre le taux de testostérone et le focus score chez des patientes atteintes de SSp comparées à des contrôles. Ils montraient également la présence d'une corrélation négative entre sex-hormone binding globulin (SHBG) et anti-SSA. Cependant, ils ne montraient pas de corrélation entre les taux d'œstrogène et l'activité du SSp (86).

Par ailleurs, des données suggèrent que l'activation du TLR7 contribue à la pathogénie du SSp. Ainsi, les LB de pSS stimulés par un agoniste de TLR7 secrètent plus d'IFN $\alpha$  que des LB de sujets contrôles (87). De plus, la stimulation de LB de SSp par un agoniste de TLR7 induit une augmentation de la différenciation plasmocytaire (88). Le gène de TLR7 est situé sur le chromosome X or, la transcription des gènes de l'un des deux chromosomes X chez la femme (maternel ou paternel) est inhibée par un mécanisme épigénétique appelé inactivation du chromosome X (XCI : X chromosome inactivation). Il a été montré que le TLR7 pouvait échapper à ce mécanisme d'inactivation dans les cellules immunes (89). Une étude récente a montré une surexpression de 58 gènes, dont le locus est situé sur le chromosome X, dans les glandes salivaires de patients atteints de SSp. De façon intéressante, parmi ces gènes, 22 ont été décrits comme pouvant échapper à la XCI, incluant notamment *TLR7* et *BTK* (Bruton's Tyrosine Kinase) (90).

## Médicaments

Certains médicaments induisent l'apparition d'auto-Ac et de manifestations cliniques auto-immunes. Des médicaments tels que l'IFN $\alpha$ , prescrit par exemple dans le traitement des hépatites virales, et les anti-TNF $\alpha$  peuvent induire une auto-immunité biologique qui peut, rarement, s'accompagner de manifestations cliniques. Plus récemment, le développement d'inhibiteurs de checkpoint ciblant CTLA4 et PD1 a permis d'augmenter la survie dans plusieurs types de cancers. Cependant, cette classe thérapeutique induit des effets secondaires immunologiques. Au plan rhumatologique, la survenue de PR a été décrite chez des patients sans pathologie auto-immune préexistante (91). Récemment, l'analyse des données d'un registre international de patients traités par inhibiteurs de checkpoint et ayant développé des événements indésirables immunologiques (ImmunoCancer International Registry, ICIR) a permis de décrire la survenue de syndromes de Sjögren. Un syndrome de Sjögren a été suspecté chez 26 patients, tous traités par inhibiteurs de PD1/PDL1. Ces syndromes de Sjögren associés aux inhibiteurs de checkpoint présentent quelques spécificités

comparativement aux SSp « classiques », notamment la prédominance de l'infiltrat lymphocytaire T et la plus faible fréquence d'Ac anti-SSA, d'Ac anti-SSB et de FR (92).

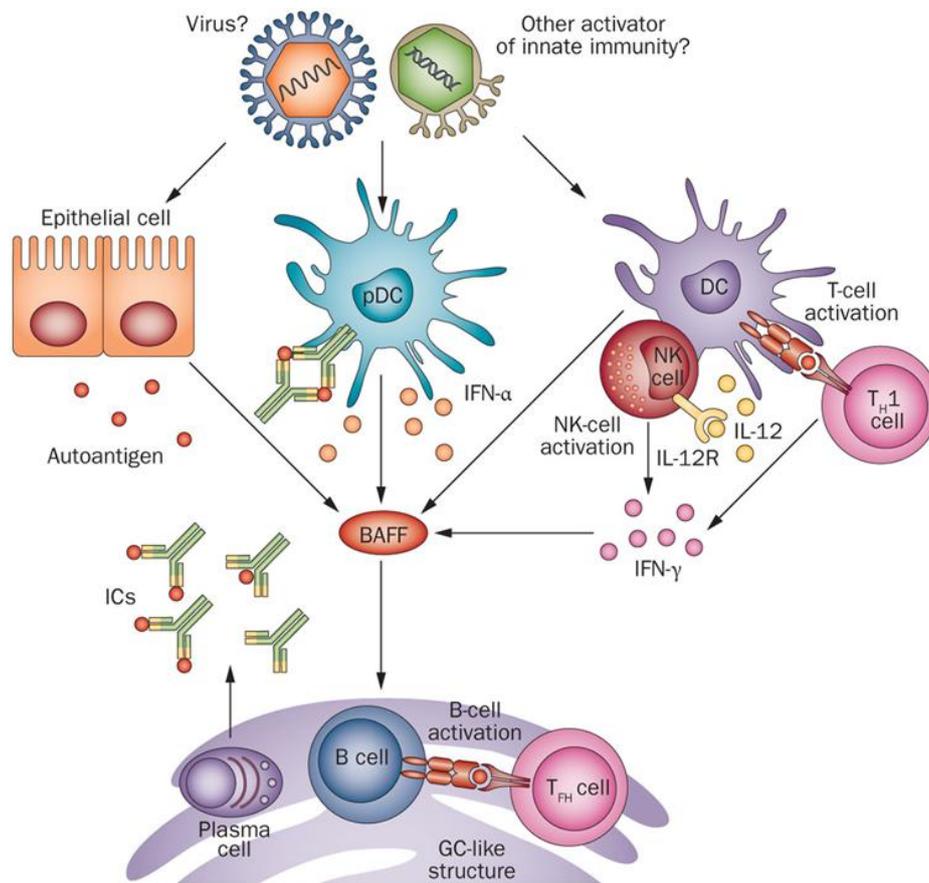
### A.III.2. Mécanismes physiopathologiques et principaux acteurs

#### A.III.2.a. Système immunitaire inné et signature interféron

La présence d'une signature IFN est un élément clé de la physiopathologie du SSp. Plusieurs analyses transcriptomiques de glandes salivaires accessoires et de PBMCs ont permis de montrer une augmentation de l'expression de gènes IFN-induits chez les patients SSp par rapport aux sujets contrôles (93), (94). L'étude menée par Emamian *et al.* sur le sang périphérique de 21 patients et 23 contrôles, puis indépendamment de 17 patients et 22 contrôles, a mis en évidence *IFI35*, *MX1*, *OAS1*, *IRF7*, et *OAS2* parmi les gènes les plus fortement différenciellement exprimés chez les patients SSp (93). De façon intéressante, les auteurs ont montré que le niveau d'expression de la plupart des gènes IFN-induits était positivement corrélé aux titres d'Ac anti-SSA et anti-SSB, suggérant un lien entre immunité innée et activation lymphocytaire B. L'expression différentielle de gènes inductibles par l'IFN de type I a été attribuée en partie à la présence de pDCs (95). Les pDCs sont capables de produire de grandes quantités d'IFN de type I en réponse à l'activation par des PAMPs ou des ligands endogènes. Ces pDCs ont été retrouvées dans l'infiltrat lymphocytaire situé dans les glandes salivaires de patients atteints de SSp. De façon intéressante, une étude menée au sein de la cohorte de patients ASSESS (« ASSESSment and Evolution of Systemic complications in primary Sjögren's syndrome ») a évalué l'expression de certains gènes induits par l'interféron type I : *IFI27*, *IFI44* et *OAS3*. Les auteurs ont montré que la présence d'une signature IFN de type I élevée était associée à une survenue plus précoce de la maladie et à un ESSDAI plus élevé que chez les patients ayant une signature IFN plus faible (96). La signature IFN de type II n'était pas évaluée dans cette étude. Dans une autre étude, Hall *et al.* ont montré que la signature IFN présente chez près de 60% des patients, regrouperait en fait trois profils de patients différents : signature IFN type I prédominante, signature IFN type II prédominante et signature mixte. Les phénotypes des patients décrits dans ces trois groupes n'étaient pas différents cliniquement sauf pour le focus score des glandes salivaires accessoires qui était plus élevé chez les patients « IFN de type-II prédominant » (97). Cependant, d'autres travaux ont permis de distinguer trois groupes définis en fonction d'un niveau d'activité des gènes IFN : IFN inactif (*SMB9*, *NCOA7*, *TAP1*, *ISG20* et *SP140*), IFN type I (*IFI44*, *IFI44L*, *IFIT1*, *IFIT3* et *MxA*) et IFN type I + II (*ZBP1*, *EIFAK2*, *IFIH1*, *PARP9* et *GBP4*). Dans cette étude, les auteurs ne retrouvaient pas de groupe de patients ayant une activité IFN type II isolée. La présence d'une signature IFN active était associée à une plus forte activité du domaine biologique de l'ESSDAI (98). La présence d'une signature IFN impliquant des gènes IFN de type I et de type II a également été mise en évidence dans les glandes salivaires de patients (95). Les gènes mis en lumière par cette analyse regroupaient des gènes de la famille des IFITM (*interferon*

*induced transmembrane protein*) qui ont une action antivirale (*IFITM1*, *IFITM2*, et *IFITM3*) ainsi que les gènes *TLR8* et *TLR9* qui jouent un rôle important dans l'activation de l'immunité innée. Les TLRs peuvent être activés par des complexes immuns type SSA/Ac anti-SSA (99) ou par des molécules virales. L'activation de la voie des TLRs est impliquée dans la production d'IFN par les pDCs. Enfin, la famille des IFN de type III, comprenant IFN- $\lambda$ 1/IL-29, IFN- $\lambda$ 2/IL-28A et IFN- $\lambda$ 3/IL-28B a été décrite plus récemment. L'IFN de type III peut être exprimé notamment par l'épithélium muqueux dans les tissus ayant une fonction de barrière. Apostolou *et al.* ont, par exemple, montré que l'IFN de type III est exprimé au sein des glandes salivaires de SSp et de sujets contrôles avec un syndrome sec sans critères diagnostiques de SSp. De plus, ils ont montré que cette expression est induite par une stimulation par poly(I:C) dans des cellules épithéliales cultivées, suggérant une régulation par le micro-environnement cellulaire (100). Les trois types d'IFN signalent par la voie JAK/STAT, un effet additionnel de ces IFNs pourrait être observé au cours du SSp.

Ainsi, l'hypothèse physiopathologique avancée est qu'une activation initiale du système immunitaire inné, par un facteur déclenchant environnemental, aboutirait à la production d'IFN par les pDCs (IFN type I) et les LT CD8 et Natural killer (IFN $\gamma$ ). Les facteurs activant l'immunité innée (virus ou autre facteur stimulant les TLRs) seraient également capables d'activer les CES. Puis, l'IFN de type I induit la sécrétion de la cytokine BAFF qui joue un rôle clé dans l'activation lymphocytaire B (101). Ainsi, la cytokine BAFF semble être à la croisée de l'activation du système immunitaire inné et adaptatif (102) (**Figure 6**). Nous détaillerons successivement le rôle des LB, LT et CES.



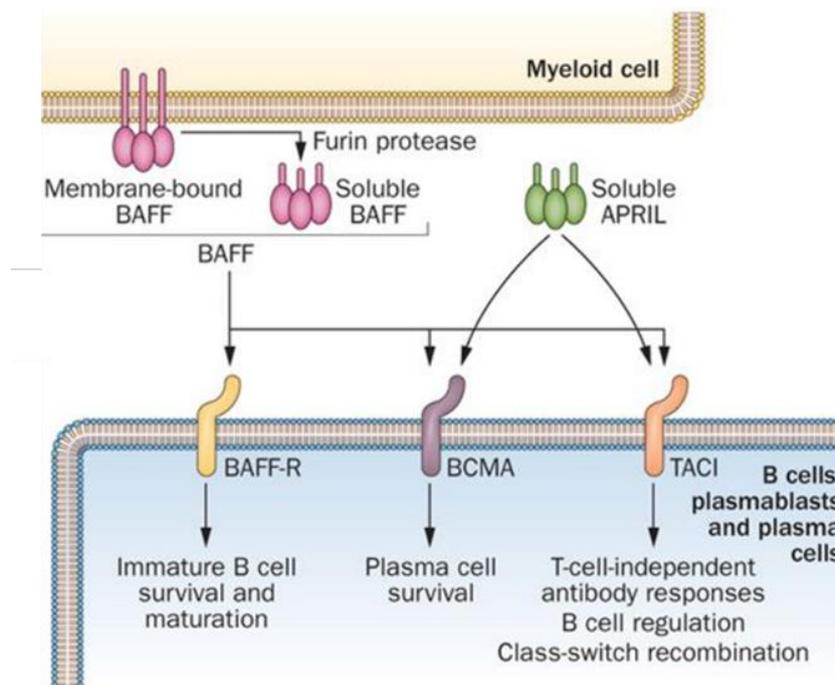
**Figure 6: Représentation schématique de l'hypothèse physiopathologique du SSp (d'après Nocturne G et Mariette X (102)).**

#### A.III.2.b. Rôle central du lymphocyte B

##### Hyperactivation lymphocytaire B au cours du SSp

Une hyperactivation lymphocytaire B est décrite au cours de la maladie. Plusieurs caractéristiques cliniques et biologiques de la maladie témoignent de cette activation, notamment la présence d'auto-Ac (FR, anti-SSA chez 60–80% des patients et anti-SSB chez 30–40% des patients), d'une hypergammaglobulinémie polyclonale, d'une augmentation des taux sériques de chaînes légères libres et d'un sur-risque de lymphome observé chez les patients. Les lymphomes correspondent principalement à des lymphomes du MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) qui se développent dans les glandes salivaires (103). Les mécanismes à l'origine de cette hyperactivation sont probablement multiples et regroupent des facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux. La cytokine BAFF joue un rôle clé, faisant le lien entre la réponse immunitaire innée et la stimulation des LB auto-réactifs. BAFF est présente à la membrane des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques et est sécrétée sous forme soluble après clivage protéolytique. Les LB sont aussi capables d'une sécrétion autocrine de BAFF. Enfin, des cellules non hématopoïétiques sont également capables

de produire BAFF. Notre équipe a montré que les CES sécrètent BAFF après stimulation par IFN ou poly(I:C) (101). Il existe trois récepteurs de BAFF, principalement exprimés par les LB : BAFF-R (BAFF receptor), TACI et BCMA (B cell maturation antigen). Ces récepteurs diffèrent par leur affinité et leur distribution. BAFF-R est exprimé du stade LB transitionnel, au stade LB mémoire, et est absent sur les plasmocytes. BCMA est présent sur les plasmocytes. Enfin, TACI est principalement exprimé à un stade avancé de différenciation et notamment par les LB de la zone marginale (ZM). L'interaction BAFF/BAFF-R induit la survie et la maturation des LB. Les interactions BAFF/TACI et BAFF/BAFF-R sont impliquées dans le phénomène de switch isotypique et les interactions BAFF/BCMA sont impliquées dans la survie à long terme des plasmocytes médullaires (**Figure 7**).



**Figure 7: Voies de signalisation de BAFF et APRIL solubles** (d'après Vincent et al. (104)).

*In vitro*, BAFF agit comme un co-stimulateur du BCR, responsable d'une augmentation de survie du LB, via, notamment, une stimulation des facteurs de transcription inhibiteurs de l'apoptose (105). Stimulés en présence de BAFF et d'Ac anti-IgM de membrane, les LB prolifèrent, se différencient et sécrètent des Ig. BAFF est également capable de conduire à la commutation isotypique indépendamment de CD40 ligand (106). Les souris transgéniques BAFF confirment le rôle de cette cytokine dans la physiopathologie des MAI systémiques. Ces souris développent un phénotype proche du LES et du syndrome de Sjögren, avec des arthrites, une glomérulonéphrite, une infiltration lymphoïde des glandes salivaires, une diminution du flux salivaire, la présence d'auto-Ac (FR et anti-DNA) et une augmentation du risque de lymphome (107). De plus, une augmentation des taux sériques de BAFF a été observée chez des patients atteints de diverses MAI (LES, SSp, granulomatose avec polyangéite).

## Spécificités des populations lymphocytaires B au cours du SSp

Il existe au cours du SSp des différences de répartition des LB mémoires entre sang circulant et glandes salivaires. Le nombre de LB CD27+ mémoires circulants est diminué chez les patients. Une explication à cette observation pourrait être l'augmentation de leur différenciation en plasmablastes. Une augmentation de la population plasmablastique circulante est, en effet, décrite chez les patients SSp (108). Une autre hypothèse pour expliquer la diminution des LB mémoires circulants pourrait être la migration ou la rétention de ces LB mémoires dans les organes cibles de la maladie. Ceci est, par exemple, suggéré par l'augmentation du nombre de LB mémoires dans les glandes salivaires de patients SSp (109). L'analyse en CyTOF (technique de cytométrie de masse) de glandes salivaires de patients SSp a permis de confirmer cette augmentation du nombre de LB mémoires intra-tissulaires et de détecter la présence de plasmocytes au stade de différenciation terminale (110). Les plasmocytes capables de produire des auto-Ac tels que anti-SSA et anti-SSB sont des plasmocytes de haute affinité issus des réactions dans le centre germinatif. Des plasmocytes auto-réactifs ont été détectés dans les glandes salivaires dont l'origine reste non déterminée (111). L'importance de ces plasmocytes à longue durée de vie dans les mécanismes d'auto-immunité a été mise en évidence grâce aux observations faites suite à un traitement par rituximab (Ac monoclonal anti-CD20) dans le LES. Comme attendu, ce traitement entraînait une diminution importante du nombre de LB, mais les taux sériques d'auto-Ac restaient inchangés. Ainsi, il a été proposé qu'au moins une partie de ces auto-Ac était produite non pas par des cellules récemment générées, mais par des plasmocytes à longue durée de vie préexistants, non affectés par le traitement, car n'exprimant pas le CD20 (112). Il a également été montré en immunohistochimie que les plasmocytes des glandes salivaires de patients SSp avec un focus score élevé présentent les caractéristiques phénotypiques de plasmocytes à longue durée de vie : CD138+, non-proliférant, exprimant Bcl-2 (protéine anti-apoptotique). De plus, ces cellules sont détectées dans les zones proches de cellules épithéliales ductales ou acineuses exprimant CXCL12, une chimiokine ayant un rôle attractant pour les lymphocytes (113). L'analyse en CyTOF de sang de patients SSp a mis en évidence une augmentation du nombre absolu de plasmablastes circulants chez les patients SSp avec Ac anti-SSA+ (110).

Enfin, un défaut de la population lymphocytaire B régulatrice pourrait également être impliqué dans la pathogénie du SSp. Les LB régulateurs exercent leur fonction *via* la sécrétion d'IL10. Ils sont capables de contrôler la prolifération des LT Th1 et d'induire l'expansion des LT régulateurs (Treg) (114), (115). Ces fonctions passant par la sécrétion d'IL10 ne semblent pas être impactées dans le SSp (116), (117). Cependant, l'action des LB régulateurs peut impliquer d'autres cytokines, notamment l'IL35. L'IL35 est une cytokine composée de 2 hétérodimères, IL12p35 et EB13, qui a des propriétés immuno-régulatrices. Un travail de notre équipe a permis de mettre en évidence un déséquilibre de la balance

entre la cytokine pro-inflammatoire IL12 et l'IL35 chez les patients atteints de SSp. Les taux sériques d'IL35 étaient diminués chez les patients SSp par rapport aux contrôles tandis que les taux d'IL12 étaient augmentés. De plus, les taux les plus élevés d'IL35 étaient associés à une diminution de l'activité de la maladie et des résultats d'analyse en RNA-seq faisaient supposer que l'IL35 était produite par les LB (118). Ces résultats supportent l'hypothèse d'un défaut des LB régulateurs chez les patients SSp.

### Structures lymphoïdes tertiaires et SSp

L'infiltrat cellulaire dans les glandes salivaires n'est pas uniquement constitué de plasmocytes, mais comporte également des LT et LB, des macrophages, des cellules folliculaires dendritiques, des cellules dendritiques et des pDCs. Chez environ un quart des patients atteints de SSp, l'accumulation de ces cellules forme des structures lymphoïdes tertiaires. Les structures lymphoïdes tertiaires sont des clusters organisés de cellules immunitaires qui se forment préférentiellement au cours de MAI telles que le SSp et la thyroïdite de Hashimoto (119). Les caractéristiques cellulaires, l'organisation spatiale et vasculaire et la fonction de ces structures lymphoïdes tertiaires sont semblables à celles des organes lymphoïdes secondaires. Les structures lymphoïdes tertiaires semblent contribuer à la progression de la maladie et à l'émergence de clone B malins responsables du développement de lymphomes (120).

#### A.III.2.c. Place du lymphocyte T

La lymphopénie est fréquente dans le SSp, mais la répartition lymphocytaire périphérique n'est que peu perturbée. Cependant, il a été montré que la fonctionnalité des lymphocytes était anormale avec, en particulier, une absence de prolifération des LT périphériques après stimulation par un Ac anti-CD2 (33). Au cours du SSp, les données concernant les Treg sont contradictoires (121), (122), (123). Ces différences pourraient être en partie liées aux marqueurs utilisés pour identifier les Treg (124). Les lymphocytes infiltrant les glandes salivaires sont, pour la plupart, des LT CD4 (70-80 %), les autres sous-groupes : cellules LT CD8 (10 %) et LB (10-20 %) sont moins abondants. Le caractère activé des cellules infiltrant les glandes est attesté par la présence de marqueurs de surface, notamment HLA-DR et récepteur de l'IL2 (CD25) (33). Christodoulou *et al.* ont montré que la fréquence des LT FoxP3+ infiltrant les glandes salivaires était notamment corrélée au focus score et à la présence de cellules mononuclées infiltrantes (125). L'une des cytokines majeures impliquées dans la régulation de la population lymphocytaire T est l'IL7. L'IL7 joue un rôle homéostatique de facteur de croissance pour la population lymphocytaire T en fournissant un signal de survie aux LT naïfs et mémoires qui expriment le récepteur

de l'IL7 (IL7R : CD127 et gamma chain) (126). Chez les patients atteints de SSp, Bikker *et al.* ont mis en évidence une augmentation de l'IL7 et de CD127 dans les glandes salivaires accessoires en comparaison à des sujets atteints de syndrome sec sans SSp (127). Cette augmentation était corrélée aux paramètres de la maladie tels que l'infiltration lymphocytaire salivaire évaluée par le focus score. Enfin, d'autres auteurs ont montré que l'axe IL7/IL7R était impliqué dans la formation de centres germinatifs ectopiques dans les glandes salivaires (128).

#### A.III.2.d. Les cellules épithéliales salivaires

Le terme d'épithélite auto-immune est parfois utilisé pour désigner le SSp, insistant sur la place centrale des cellules épithéliales dans la physiopathologie de cette maladie. Cliniquement, en plus de l'atteinte glandulaire exocrine, une atteinte systémique affectant le tissu épithélial d'autres organes tels que les reins ou les poumons peut exister. Enfin, toutes les caractéristiques des CES que nous détaillerons ci-dessous justifient le terme d'épithélite auto-immune, proposé par HM Moutsopoulos (129), (130). Les CES ne sont, en effet, plus uniquement considérées comme des cibles passives de l'auto-immunité mais semblent jouer un rôle actif dans la mise en place et la chronicisation de la maladie, avec notamment, un rôle d'initiation et d'amplification de la réaction inflammatoire. Les CES jouent un rôle dans le maintien de niches au sein des glandes salivaires qui favorisent la rétention des lymphocytes et leur survie.

#### CES et immunité innée

Les CES expriment des Toll-like récepteurs (TLRs). Les TLRs jouent un rôle dans l'activation de la réponse immunitaire innée. Il a précédemment été décrit par notre équipe que les CES salivaires de patients atteints de SSp exprimaient les TLRs 2, 3 et 7 (131). Spachidou *et al.* ont également montré que les CES expriment TLR 1, 2, 3 et 4 (132). D'autres auteurs ont mis en évidence que les CES expriment les TLRs 7, 8 et 9 (133). Ces TLRs reconnaissent les schémas moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) et peuvent conduire à la production de molécules de co-stimulation. La stimulation des CES par les ligands des TLR 2, 3 et 4 induit, en effet, une augmentation des molécules immuno-régulatrices ICAM-1, CD40 et HLA de classe I, mesurée en cytométrie de flux (132).

#### CES et anomalies de l'apoptose

Une augmentation de l'apoptose passant par la voie Fas-Fas ligand a été décrite dans les CES et pourrait être responsable de la destruction de ces cellules (134). Sumida *et al.* ont démontré que les

LT expriment Fas-ligand et pourraient être impliqués dans l'apoptose des CES (135). Une autre hypothèse suggère que ces anomalies de l'apoptose seraient des anomalies intrinsèques aux CES, non induites par l'infiltrat lymphocytaire. En effet, des anomalies de l'apoptose sont décrites dans le modèle murin NOD.scid de syndrome de Sjögren, alors qu'il s'agit de souris dépourvues d'infiltration lymphoïde (136). Cependant, cette hypothèse d'une augmentation de l'apoptose passant par la voie Fas-Fas ligand reste controversée et n'a pas été retrouvée par d'autres auteurs (137). Enfin, certaines CES, et en particulier les CES ductales pourraient résister à l'apoptose en surexprimant la protéine p53 (138).

### CES et anomalies de la jonction neuro-exocrine

Une destruction progressive des glandes salivaires survient au cours du SSp. Cependant, dans la plupart des cas, cette destruction n'excède pas 50 à 70 % des glandes. Les 30 à 50 % de glandes saines persistantes devraient pouvoir produire une quantité minimale de larmes et de salive ; pourtant, les patients présentent un syndrome sec. Pour expliquer cette discordance, l'existence de mécanismes d'inhibition de la sécrétion salivaire et lacrymale par les glandes restantes est supposée. La sécrétion salivaire et lacrymale est sous la dépendance du système nerveux parasympathique, nécessitant la stimulation du récepteur muscarinique M3 de la cellule acineuse par l'acétylcholine. Plusieurs phénomènes pourraient inhiber cette jonction neuro-exocrine. D'une part, des Ac anti-récepteurs muscariniques M3 ont pu être mis en évidence dans le sérum des patients. Ces Ac sont susceptibles d'inhiber la sécrétion salivaire. Cependant, il n'existe pas de test permettant de détecter ces Ac en pratique clinique (139). D'autre part, une distribution anormale de l'aquaporine 5 a été mise en évidence dans les glandes salivaires de patients atteints de SSp. L'aquaporine 5 (AQP5) est un canal à eau qui est habituellement situé à la partie apicale de la cellule acineuse. Chez les patients atteints de SSp, l'AQP5 est détectée à la partie basale de la cellule, ce qui pourrait en impacter la fonction (140).

### Interactions entre CES et lymphocytes B

#### *Sécrétion de BAFF*

La cytokine BAFF est présente en excès dans le sérum (141) et dans les glandes salivaires accessoires de patients atteints de SSp (142). Il a été montré que la stimulation par IFN $\alpha$  des CES de patients SSp augmentait la sécrétion de BAFF de façon significativement plus importante que la stimulation des CES de sujets contrôles (101). De plus, la stimulation des CES par agoniste de TLR3 est responsable d'une augmentation de l'expression de l'ARNm et de la sécrétion de protéine BAFF (131).

Cette sécrétion semble dépendre à la fois de la voie d'activation TLR et de la voie IFN, en effet, l'ajout d'un Ac anti-IFNAR n'inhibe que partiellement l'expression de *BAFF*. La capacité des CES à exprimer et sécréter *BAFF* souligne leur rôle dans la pathogénie du SSp (**Figure 8**).

#### *Sécrétion de cytokines pro-inflammatoires*

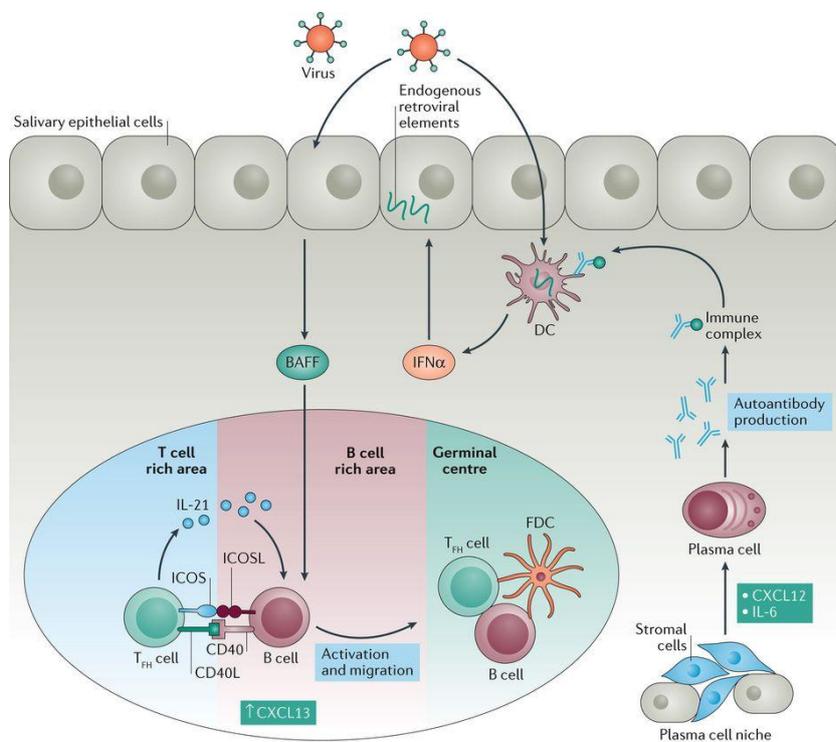
Il existe une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires par les CES de patients atteints de SSp, telles que l'IL1, l'IL6 et le TNF. Hung *et al.* ont montré que le taux salivaire d'IL6 était plus élevé chez les pSS que chez les sujets contrôles (143). D'autres auteurs ont mis en évidence une augmentation des taux salivaires de TNF $\alpha$  (144). Il a été également rapporté que les cellules épithéliales canalaire de patients produisent des niveaux élevés d'IL12 (145) et d'IL18 (146).

#### *Sécrétion de facteurs chimio-attractants*

Des analyses immunohistochimiques de biopsies de glandes salivaires de patients atteints d'un SSp, ont révélé que les CES canalaire et acineuses produisent des molécules immunoactives, telles que des molécules de homing lymphocytaire. Une surproduction de CCL5, CCL3, CCL17, CCL18, CCL19, CCL21, CXCL9, CXCL10, CXCL11 et CXCL13 a été décrite dans des glandes salivaires pouvant contribuer au homing lymphocytaire et à la persistance d'une inflammation chronique. De plus, l'infiltration des glandes exocrines au cours du pSS a été reliée à la présence de chimiokines capables d'attirer les LB et LT (147), (148). Ainsi, CXCL10 (IP-10) est une chimiokine pro-inflammatoire majeure exprimée par l'épithélium canalaire qui est probablement impliquée dans la formation précoce de l'infiltrat périductal. Des taux augmentés de CXCL10 ont été mis en évidence dans la salive, les larmes et le sérum des patients atteints de SSp. CXCL10 se lie à son récepteur CXCR3, qui est exprimé par les LT Th1 (149). Plusieurs autres cellules, dont les LB et les plasmablastes expriment ce récepteur et peuvent également être attirées dans les glandes salivaires (150). De plus, la présence de CXCL10 salivaire a été mise en évidence chez des patients ayant une connectivité asymptomatique mais avec des infiltrats tissulaires nodulaires, suggérant que cette chimiokine pourrait être un biomarqueur salivaire précoce de l'inflammation (151). Par ailleurs, il a été montré que les chimiokines CXCL12 et CXCL13 sont associées au développement de structures de type centre germinatif (**Figure 8**) (147), (152). De façon intéressante, Barone *et al.* ont montré dans un modèle murin que l'IL22 est capable d'induire l'expression de CXCL12 et CXCL13 par les CES et les cellules stromales fibroblastiques (153). Ces chimiokines jouent un rôle essentiel dans le recrutement lymphocytaire B, l'organisation des structures lymphoïdes tertiaires et l'attraction de plasmocytes (154), (155). La même équipe a ensuite montré que les CES associées aux lymphomes expriment préférentiellement CXCL12, contribuant potentiellement à l'infiltration ductale et à la survie des LB (156). De plus, la sécrétion de CXCL12 et IL6 est capable d'attirer et de maintenir une population de plasmocytes qui produisent des auto-Ac tels

que anti-SSA and anti-SSB (157). CXCR4, le récepteur de CXCL12, joue un rôle important dans la réponse immune B, il est notamment impliqué dans la migration des plasmocytes et leur maintien dans la moelle osseuse (158). La présence de CXCL13 est nécessaire et suffisante au sein des centres germinatifs ectopiques pour l'établissement des follicules lymphoïdes (159), (160) et la régulation du fonctionnement de ces centres germinatifs (161).

CCL28, aussi appelée MEC (mucosal epithelial chemokine), est une chimiokine produite par les cellules épithéliales associées aux muqueuses. Cette chimiokine a une activité anti-microbienne (162) et est habituellement sécrétée par les cellules épithéliales dans l'intestin, le colon, les poumons, le sein et les glandes salivaires (163). Son niveau d'expression est modulé par des cytokines pro-inflammatoires. CCL28 pourrait avoir un rôle chemoattractant pour les cellules présentant son récepteur, CCR10, au site d'inflammation colique (164). CCL28 joue également un rôle important dans le recrutement de LT et LB CCR10+ pour initier la production d'IgA (165). L'IgA est l'Ig principalement retrouvée dans la salive et les larmes, où elle joue un rôle important dans la défense contre les infections (166). Au cours du lupus, Mei *et al.* ont montré que les plasmablastes circulants expriment des marqueurs de réaction immune muqueuse : IgA, CCR10 et B7 intégrine étaient, respectivement, présents sur 48%, 40% et 38% des plasmablastes. Enfin, des essais de migration ont montré que ces plasmablastes étaient capables de migrer vers CCL28 et de sécréter des IgA (167).



**Figure 8: Les CES participent à l'activation lymphocytaire B** (d'après Nocturne *et al.* (103)). Les CES expriment des molécules de co-stimulation et sont capables de jouer le rôle de cellules présentatrices d'Ag. Les CES participent à l'activation lymphocytaire B *via* la sécrétion de BAFF après une stimulation virale ou par IFN $\alpha$ . Les LT follicular helper (Tfh) qui secrètent IL21, et l'expression de chimiokines telles que CXCL13 conduisent à la formation de centres germinatifs ectopiques capables de supporter l'activation lymphocytaire B. De plus, les cellules épithéliales et les cellules stromales pourraient participer à la formation de niches plasmocytaires *via*, par exemple la production de CXCL12 et IL6 qui permettent aux plasmocytes à longue durée de vie de survivre dans les tissus. DC, dendritic cell; FDC, follicular dendritic cell; ICOS, inducible T cell co-stimulator; ICOSL, ICOS ligand.

### Interactions entre CES et lymphocytes T

L'une des principales caractéristiques du SSp est la présence d'un infiltrat lymphocytaire au sein des glandes salivaires et particulièrement autour des CES. Les CES pourraient agir comme des CPA non professionnelles, plusieurs arguments sont en faveur de cette hypothèse.

#### *Expression de HLA-DR*

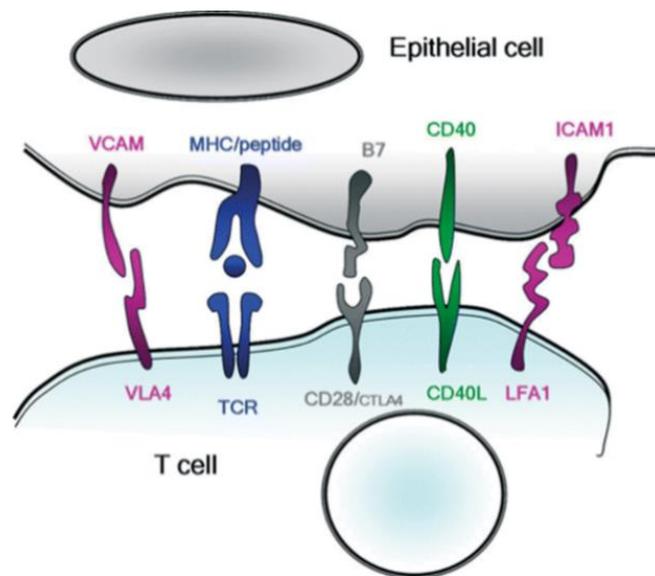
Les CES des glandes salivaires pathologiques expriment de manière aberrante des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (HLA-DR), surtout à proximité des infiltrats de LT helper (168), (169). L'expression d'HLA-DR par ces cellules résidentes leur confère la capacité de présenter des Ag aux lymphocytes T sécréteurs d'IFN $\gamma$  (**Figure 9**). Ces résultats ont été confirmés par Tsunawaki *et al.* qui ont également montré qu'une stimulation par IFN $\gamma$  induisait l'expression d'HLA-DR par les CES (170). Enfin, notre équipe a montré, en CyTOF, que la présence de CES HLADR<sup>+</sup> constituait l'une des clés de la signature glandulaire du SSp (110).

#### *Expression de molécules de co-stimulation*

Les CES expriment les molécules de co-stimulation CD80 et CD86 qui peuvent se lier à CD28 ou CTLA-4 sur les LT (171). Comme décrit précédemment, l'expression de ces molécules de co-stimulation peut être induite par une stimulation des TLRs. La molécule de co-stimulation CD40 est également exprimée par les CES au cours du SSp de manière constitutive et est surexprimée après stimulation par IFN $\gamma$ . En parallèle, le ligand du CD40 (CD40L) est surexprimé par les lymphocytes infiltrant la glande (172) (173).

### Expression de molécules d'adhésion

Les CES expriment également des molécules d'adhésion ICAM-1 (InterCellular Adhesion molecule) et VCAM (vascular cell adhesion molecule) après stimulation par  $IFN\gamma$  ou  $TNF\alpha$ . ICAM-1 et VCAM assurent la stabilisation de la synapse entre CPA et LT (170). Le récepteur d'ICAM-1 (LFA-1) a été détecté sur les LT infiltrant la glande (174).



**Figure 9: Interaction entre cellule épithéliale et lymphocyte T** (d'après Mitsias et al.(130)). La cellule épithéliale exprime toutes les molécules nécessaires à une réponse lymphocytaire T optimale et peut ainsi jouer le rôle de CPA non professionnelle.

Ainsi, Tsunawaki *et al.* ont montré que les CES préalablement stimulées par  $IFN\gamma$  ou  $TNF\alpha$  induisent la prolifération de PBMCs mises en co-culture, ce qui n'était pas reproduit si les CES n'étaient pas pré-stimulées. L'utilisation d'Ac bloquant l'interaction des Ag HLA et des molécules de co-stimulation a permis de montrer que l'effet de l' $IFN\gamma$  dépendait de l'augmentation des Ag HLA de classe I, des Ag HLA-DR et CD80, tandis que l'effet du  $TNF\alpha$  dépendait de l'augmentation des Ag HLA de classe I et de CD80 (170).

Ces capacités acquises de présentation antigénique et de co-stimulation sont susceptibles de faciliter l'activation et la différenciation aberrantes de LT. Ainsi, des expériences *in vitro* ont montré que les CES sont capables de polariser la différenciation de LT vers un phénotype de LT follicular helper (LTfh). Cette fonction a une importance capitale. Les LTfh jouent, en effet, un rôle central dans l'organisation et la maintenance des centres germinatifs, favorisant la survie, l'activation et la maturation des LB (175), (176).

## A. IV. Traitements évalués et pistes thérapeutiques envisagées au cours du SSp

Jusqu'à présent, aucun traitement de fond n'a été approuvé pour le SSp. Cependant, certaines molécules sont utilisées en clinique. Le contrôle de l'hyperactivation lymphocytaire T et B constitue une approche thérapeutique des MAI et certains médicaments ont été testés dans le SSp. Nous ne parlerons pas ici des traitements symptomatiques utilisés en pratique clinique.

### A.IV.1. cs DMARDs (conventional synthetic Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug)

#### Hydroxychloroquine

L'hydroxychloroquine (HCQ) a des propriétés immunomodulatrices. Son efficacité passe par plusieurs mécanismes d'action : inhibition du chimiotactisme et de la phagocytose des polynucléaires, des macrophages et des monocytes ; inhibition de la prolifération lymphocytaire T et de la production de nombreuses cytokines telles que IL1, IL2, IL6, IL17, IL22, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  et enfin, inhibition de certains récepteurs de l'immunité innée, en particulier le TLR7 et le TLR9. L'hydroxychloroquine inhibe, en effet, l'acidification des compartiments endosomaux tardifs, ce qui empêche l'interaction entre les TLR7 et TLR9, et leurs ligands respectifs, l'ARN simple-brin et l'ADN double-brin. L'administration d'HCQ a été testée dans le SSp. Cependant, un essai contrôlé randomisé (étude JOQUER), effectué chez des patients atteints de SSp traités par hydroxychloroquine (400mg /j) pendant 24 semaines n'a pas montré d'amélioration de l'ESSDAI et de l'ESSPRI par rapport au bras placebo (177). A la suite de cette étude, un travail récemment publié a permis de mettre en évidence que le traitement par HCQ permettait de diminuer le score IFN dans le sang total de patients traités par rapport au placebo. Le score IFN était défini en fonction de l'expression relative de 5 gènes: *IFI44*, *IFI44L*, *IFIT1*, *IFIT3* et *MXA*. De plus, cette étude a montré que l'HCQ diminuait les taux d'IgG et d'IgM chez les patients (178). L'efficacité à long terme de l'HCQ sur la prévention de la survenue de complications systémiques reste à étudier. L'HCQ peut être utilisée au cours du SSp pour les atteintes articulaires et cutanées (179).

#### Leflunomide

Le leflunomide (LFU) est une prodrogue qui est métabolisée *in vivo* en son métabolite actif (A 771726), responsable de ses effets pharmacologiques. Le LFU agit comme un inhibiteur de la synthèse des pyrimidines. Il inhibe la dihydroorotate déshydrogénase (DHODH), une enzyme clé de la voie de synthèse de novo des pyrimidines. Il en résulte une diminution du pool de pyrimidine à l'origine d'un arrêt du cycle cellulaire de certaines cellules sensibles, notamment des LT activés. Le LFU a également une action directe sur les LB entraînant une diminution de leur prolifération et de la synthèse d'Ac. Son mécanisme d'action passe par le blocage du cycle cellulaire aux étapes G1/S et G2/mitose (180).

Le LFU peut être utilisé dans les atteintes articulaires au cours du SSp (179). Au cours du SSp, dans un essai pilote ouvert, le LFU (20mg/j) ne permettait d'obtenir qu'un bénéfice modeste chez 15 patients avec diagnostic récent de SSp (181). Cependant, *in vitro*, il a été montré que l'ajout de LFU sur des PBMCs préalablement stimulés par un super-Ag et un agoniste de TLR permettait d'observer une diminution de la prolifération des LB, des LT, de la production de CXCL13, d'IFN $\alpha$  et de la production d'IgG et IgM de façon dose dépendante. Par ailleurs, dans cette même étude, l'ajout d'HCQ diminuait la prolifération lymphocytaire B, la production de CXCL13, d'IFN $\alpha$  et d'IgG et IgM de façon dose dépendante. Enfin, il existait un effet additionnel de la combinaison LFU et HCQ sur l'inhibition de la prolifération lymphocytaire T, B et la production de CXCL13, d'IFN $\alpha$  et des IgG et IgM (182). Cet effet de la combinaison LFU et HCQ, observé *in vitro*, a justifié de tester son effet sur un petit effectif de patients (n=29 : 21 ont reçu la combinaison HCQ + LFU et 9 ont reçu le placebo). La combinaison HCQ + LFU permettait d'obtenir une diminution de l'ESSDAI à 24 semaines par rapport au groupe placebo : -4,35 points (95% CI -7,45 à -1,25, p=0,0078). Ces résultats encourageants justifient la réalisation d'autres essais incluant un plus grand nombre de patients (183), (184).

### Méthotrexate

Le méthotrexate (MTX) est un analogue de l'acide folique, inhibant par compétition la dihydrofolate réductase nécessaire pour la synthèse des acides nucléiques qui est son mode d'action principal en tant que chimiothérapie. Il est également largement utilisé comme immunomodulateurs au cours des MAI à des doses plus faibles de l'ordre de 0,3 mg/kg/semaine. A cette posologie, il semble principalement agir en stimulant la voie de l'adénosine qui possède des propriétés anti-inflammatoires. Le MTX est utilisé dans les manifestations articulaires au cours du SSp (179).

### Azathioprine

L'azathioprine est un immunosuppresseur qui agit en partie par inhibition de la réplication cellulaire *via* un blocage de la synthèse des purines. Tiede *et al.* ont mis en évidence le rôle de l'azathioprine dans l'induction de l'apoptose des LT (185). L'azathioprine peut être utilisé dans le traitement des atteintes extra-glandulaires telles que l'atteinte articulaire, la pneumopathie interstitielle, ou encore l'atteinte rénale (179).

## Mycophenolate mofetil

Le mycophénolate mofétil (MMF) est l'ester 2-morpholinoéthylrique du MPA (mycophenolic acid). Le MPA est un puissant inhibiteur sélectif, non compétitif et réversible de l'inosine monophosphate déshydrogénase ; il inhibe la synthèse *de novo* des nucléotides guanine. La prolifération des LB et LT est dépendante de la synthèse *de novo* des purines, alors que d'autres types cellulaires peuvent utiliser des voies métaboliques de suppléance. Le MMF a donc un effet cytostatique plus marqué sur les lymphocytes que sur les autres types cellulaires. Le MMF peut être notamment utilisé dans les atteintes pulmonaires ou rénales au cours du SSp (179).

### A.IV.2. b DMARDs (biological Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug)

#### A.IV.2.a. Essais négatifs

##### Anti-TNF

Un essai randomisé en double aveugle a testé l'administration d'infliximab (Ac monoclonal anti-TNF) chez des patients atteints de SSp vs placebo. Ce traitement n'a pas permis d'obtenir d'amélioration significative des symptômes articulaires, de la fatigue, et de la sécheresse buccale, oculaire, cutanée, vaginale ou bronchique par rapport au placebo (186). De même, un essai évaluant l'éta nercept (récepteur soluble du TNF) n'a pas montré d'efficacité de ce traitement contre placebo dans le SSp (187).

##### Rituximab

Le rituximab est un Ac monoclonal chimérique anti-CD20. Le CD20 est présent sur tous les LB matures mais n'est exprimé ni sur les lymphocytes pré-B, ni sur les plasmocytes. La fixation du rituximab sur le CD20 entraîne la lyse du LB par un mécanisme de cytotoxicité liée au fragment Fc des immunoglobulines (ADCC), par activation du complément ou par apoptose directe. Les stratégies thérapeutiques visant à contrôler l'hyperactivation lymphocytaire B ont fait la preuve de leur efficacité dans le traitement de la PR et des vascularites à ANCA (188). Dans le SSp, il existe un rationnel important en faveur du ciblage du LB. Les résultats de trois essais ouverts et deux essais randomisés de petits effectifs étaient encourageants. Cependant, deux essais randomisés de grande ampleur ont été réalisés mais n'ont pas permis de mettre en évidence d'efficacité clinique du rituximab. Les critères de jugement primaires : la diminution de la sécheresse et de la fatigue rapportées par les patients n'étaient pas atteints (189),(190). Cette absence d'efficacité pourrait être liée à la présence de taux élevés de BAFF chez les patients (191).

## Abatacept

L'abatacept est une thérapie ciblée visant à inhiber l'activation du LT. Il s'agit d'une protéine de fusion entre la portion extracellulaire du récepteur CTLA-4, et le fragment constant (Fc) d'une IgG humaine. L'abatacept inhibe le signal de co-stimulation CD80/CD86 et bloque l'activation du LT. Cette molécule est notamment utilisée dans le traitement de la PR (192). Une étude menée chez 15 patients montrait une amélioration de l'ESSDAI mais ne modifiait pas le flux lacrymal et les autres symptômes subjectifs (193). Cependant, un essai de phase III récemment mené chez 187 patients (92 dans le groupe abatacept vs 95 dans le groupe placebo) a montré que, malgré un effet sur les biomarqueurs, le traitement par abatacept n'était pas supérieur au placebo pour améliorer les symptômes cliniques de la maladie (194).

## Tocilizumab

Le Tocilizumab est un anticorps monoclonal inhibant le récepteur de l'IL6. L'IL6 joue un rôle important dans l'activation des LB et dans l'équilibre entre LT régulateurs, LTh17 et LT folliculaires. Le taux d'IL6 est augmenté dans le sérum, la salive et les larmes des patients ayant un SSp. Cependant, les résultats préliminaires d'un essai français évaluant le tocilizumab contre placebo (multicentrique, randomisé, en double aveugle) incluant des patients ayant des complications systémiques (ESSDAI  $\geq$  5), n'a pas permis de montrer d'efficacité de ce traitement à 24 semaines (195).

### A.IV.2.b. Essais positifs

#### Belimumab

Il s'agit d'un Ac monoclonal anti-BAFF. Compte tenu de l'importance de BAFF dans l'activation lymphocytaire B au cours des MAI, cette molécule représente une cible thérapeutique intéressante. Ainsi, l'efficacité du belimumab a déjà été démontrée dans le LES (196). Le belimumab a été évalué dans un essai ouvert incluant 30 patients SSp (BELISS) et a montré une diminution de l'ESSDAI à 28 semaines. En revanche, le flux salivaire, le test de Schirmer et le focus score sur la biopsie des glandes salivaires n'étaient pas modifiés. Cependant, il existait une amélioration de l'hypertrophie parotidienne, des arthralgies ainsi que des biomarqueurs lymphocytaires B, incluant le taux d'Ig sérique et de FR (197). Ces résultats sont toutefois à interpréter avec précaution car il s'agissait d'un essai ouvert.

## Anti-CD40

L'inhibition de l'axe CD40-CD40L est une approche très intéressante étant donné l'implication de ces molécules de co-stimulation dans la survie des LB, la formation des centres germinatifs, la différenciation plasmocytaire et la sécrétion d'auto-Ac (198). Un Ac monoclonal non déplétant anti-CD40 (iscalimab, CFZ533) a été testé dans le SSp au cours d'un essai contrôlé randomisé et a permis d'obtenir une diminution significative de l'ESSDAI (réduction moyenne de 5,21 points, IC 95% 0,96-9,46,  $p=0,009$ ) chez les patients SSp lorsqu'il était administré en perfusions intraveineuses (199).

### A.IV.2.c. Essais en cours

#### Belimumab et Rituximab

Après un traitement par rituximab, les taux sériques de BAFF augmentent (200). De plus, un taux élevé de BAFF à l'initiation du traitement est associé à une inefficacité du rituximab (191). Ces résultats suggèrent un rationnel pour combiner le traitement par belimumab au rituximab. Un essai évaluant l'efficacité de la co-administration de belimumab et rituximab par rapport au belimumab en monothérapie, rituximab en monothérapie ou placebo est en cours dans le SSp (201).

#### Anticorps anti-BAFFR

Une étude de phase II récemment présentée par Döner *et al.* a montré l'intérêt thérapeutique potentiel de l'ianalumab, un Ac monoclonal anti-BAFFR, ayant un effet déplétant sur les LB *via* l'induction d'ADCC. L'administration d'ianalumab permettait d'obtenir une diminution de 1.92 points de l'ESSDAI à 24 semaines de traitement vs placebo (202). Les résultats définitifs de cette étude n'ont pas encore été publiés.

Enfin, les tsDMARDs (targeted synthetic Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug) sont des petites molécules synthétiques récemment développées. Au sein de cette famille, les inhibiteurs de JAK, de BTK et de PI3K pourraient avoir un intérêt particulier. Leur utilisation potentielle au cours du SSp sera développée dans la discussion.

## B. OBJECTIFS

Ce travail de thèse a eu pour objectif l'étude du rôle des cellules épithéliales salivaires dans la physiopathologie du SSp. Cette question a été envisagée sous trois angles :

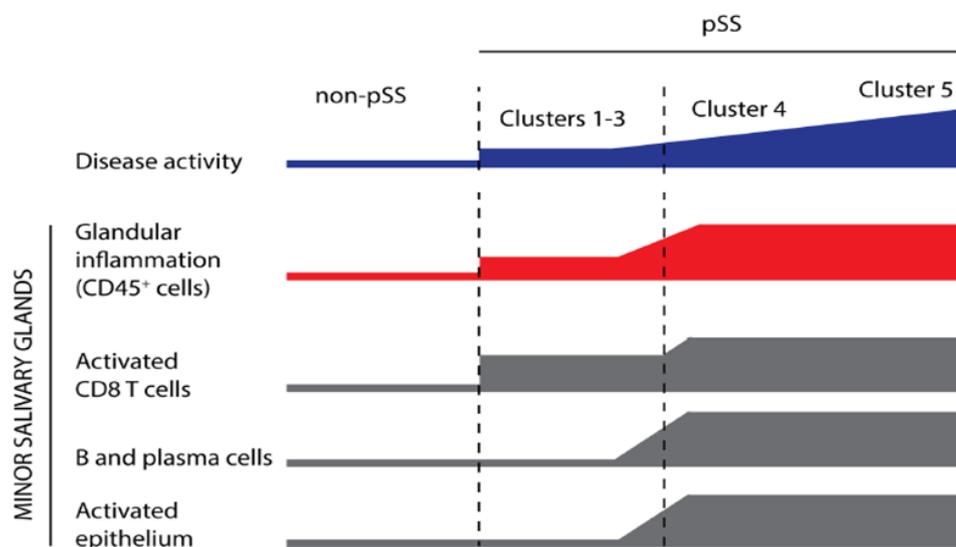
- 1) Etude du rôle des cellules épithéliales salivaires dans la physiopathologie du SSp *via* leur interaction avec les lymphocytes B
  - Analyse transcriptomique de CES et lymphocytes B
  - Modèle de co-culture de CES et lymphocytes B
  - Inhibition des interactions entre CES et lymphocytes B
  
- 2) Etude du rôle des cellules épithéliales salivaires dans la physiopathologie du SSp *via* leur interaction avec les lymphocytes T
  - Développement de l'hypothèse d'une boucle d'auto-amplification passant par l'IL7 et l'IFN
  
- 3) Résultats préliminaires : caractérisation transcriptomique de CES cultivées et stimulées
  - Caractérisation des spécificités transcriptomiques des CES chez les patients SSp

## C. RESULTATS

### C.I. Article 1 : “Salivary gland epithelial cells from patients with Sjögren’s syndrome induce B-lymphocyte survival and activation”

#### C.I.1. Contexte de l’étude

Le SSp est caractérisé par une hyperactivation lymphocytaire B chronique dont témoignent la présence d’auto-Ac (FR, anti-SSA et anti-SSB), d’une hypergammaglobulinémie polyclonale, d’une augmentation des taux sériques de chaînes légères libres et l’augmentation du risque de survenue d’un lymphome. Le rôle de BAFF a bien été décrit au cours du SSp et cette cytokine est impliquée dans l’activation lymphocytaire B. Par ailleurs, plusieurs arguments soutiennent l’hypothèse d’un rôle actif des CES dans le développement de l’auto-immunité au cours du SSp. Les CES sont notamment capables de sécréter la cytokine BAFF, mais aussi des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines. Un travail précédemment publié par notre équipe avait permis de mettre en évidence une signature cellulaire comportant notamment la présence de CES activées HLADR+, de LB et de plasmocytes au sein de glandes salivaires associée à l’activité de la maladie (110) (**Figure 10**).



**Figure 10: Représentation schématique des relations entre l’activité de la maladie et les caractéristiques cellulaires au sein des glandes salivaires (d’après Migueneau et al. )(110)**

Ainsi, nous avons fait l’hypothèse que l’hyperactivation des LB observée au cours de la maladie pouvait être induite localement par les CES. L’objectif de ce travail était d’étudier les interactions entre CES et LB et notamment le rôle des CES dans l’induction de la survie et de l’activation des LB.

**Manuscrit 1 :**

**Salivary gland epithelial cells from patients with Sjögren's syndrome induce B-lymphocyte survival and activation.**

Elodie Rivière, MD,<sup>a,b</sup> Juliette Pascaud, BSc,<sup>a</sup> Nicolas Tchitchek, PhD,<sup>a</sup> Saida Boudaoud, BSc,<sup>a</sup> Audrey Paoletti, PhD,<sup>a</sup> Bineta Ly, BSc,<sup>a</sup> Anastasia Dupré<sup>a</sup>, MD, Hua Chen, MD, PhD,<sup>c</sup> Alice Thai, MSc,<sup>d</sup> Norm Allaire, MSc,<sup>d</sup> Bernd Jagla, PhD,<sup>e</sup> Michael Mingueneau, PhD,<sup>d</sup> Gaetane Nocturne, MD, PhD,<sup>a,f\*</sup> Xavier Mariette, MD, PhD<sup>a,f\*</sup>

<sup>a</sup>Immunology of viral Infections and Autoimmune Diseases, IDMIT, CEA - Université Paris Sud - INSERM U1184, Le Kremlin Bicêtre and Fontenay aux Roses, France. <sup>b</sup>Arthritis R&D, France, <sup>c</sup> Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing <sup>d</sup>Immunology Research, Biogen, Cambridge, MA, USA, <sup>e</sup>Biomarker Discovery Platform UTechS CB, Hub de Bioinformatique et biostatistique C3IB, Institut Pasteur, Paris, France. <sup>f</sup>Rheumatology, APHP, Université Paris Saclay, Le Kremlin Bicêtre, France

\*Co-last authors

**Corresponding author:** Dr Gaetane Nocturne, Department of Rheumatology, Université Paris-Sud, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, INSERM U1184, 78 rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin Bicêtre, France ; phone: +33 1 45 21 37 58, fax : +33 1 45 21 37 57 ; gaetane.nocturne@aphp.fr

**Number of words:** 3630

## **ABSTRACT**

**Objectives:** Primary Sjögren's syndrome (pSS) is characterized by chronic hyperactivation of B lymphocytes. Salivary gland epithelial cells (SGECs) could play a role in promoting B-lymphocyte activation within the target tissue. We aimed to study the interactions between SGECs from pSS patients or controls and B lymphocytes.

**Methods:** Patients had pSS according to 2016 EULAR/ACR criteria. Gene expression analysis of SGECs and B lymphocytes from pSS and controls isolated from salivary gland biopsies and blood was performed by RNA-seq. SGECs from pSS and controls were co-cultured with B lymphocytes sorted from healthy donor blood and stimulated. Transwell and inhibition experiments were performed.

**Results:** Gene expression analysis of SGECs identified an upregulation of interferon signaling pathway and genes involved in immune responses (*HLA-DRA*, *IL7*, *BAFFR*) in pSS. Activation genes CD40 and CD48 were upregulated in salivary gland sorted-B lymphocytes from pSS patients. SGECs induced an increase in B-lymphocyte survival, which was higher for SGECs from pSS patients than controls. Moreover, when stimulated with poly(I:C), SGECs from pSS patients induced higher activation of B lymphocytes than those from controls in a co-culture model. This effect depended on soluble factors. Inhibition with anti-BAFF, anti-APRIL, anti-IL6-R antibodies JAK1/3 inhibitor, or hydroxychloroquine had no effect as compared with leflunomide, BTK or PI3K inhibitors.

**Conclusions:** SGECs from patients with pSS had better ability than those from controls to induce survival and activation of B lymphocytes. Targeting a single cytokine did not inhibit this effect, but leflunomide, BTK or PI3K inhibitors were successful. This gives indications for future therapeutic options in pSS.

**Key words:** Sjögren's syndrome, salivary gland epithelial cells, B lymphocytes, RNA-seq, co-culture

**Key Messages:**

- Primary Sjögren's syndrome (pSS) is characterized by a chronic hyperactivation of B lymphocytes, and salivary gland epithelial cells (SGECs) could be involved in pSS pathophysiology.
- RNA-seq analysis of SGECs sorted from salivary glands showed upregulated IFN signaling pathway, *HLA-DR*, *IL7* and *BAFFR*. RNA-seq analysis of B lymphocytes sorted from salivary glands showed upregulated *CD40* and *CD48*.
- Survival and activation of B lymphocytes was higher with SGECs from pSS patients than controls.
- SGECs interact with B lymphocytes mainly by secretion of soluble factors. Targeting a single cytokine is not sufficient to inhibit this effect, but leflunomide, BTK or PI3K inhibitors were successful, which suggests future therapeutic options in pSS.

## **INTRODUCTION**

Primary Sjögren's syndrome (pSS) is a systemic auto-immune disorder characterized by a lymphocytic infiltrate of exocrine glands. Patients present sicca symptoms, fatigue, and pain, and in 30% to 40% systemic manifestations including involvement of skin, joints, neurological system, lung or kidney[1]. B-lymphocyte hyperactivation is a hallmark of the disease[2], as illustrated by the presence of serum auto-antibodies, hypergammaglobulinemia, increased levels of free light chains, and increased risk of B-cell lymphoma. The peri-epithelial tropism of the lymphocytic infiltration is specific to pSS and justifies the term of auto-immune epithelitis[3].

Several lines of evidence support that salivary gland epithelial cells (SGECs) are not only the target of autoimmunity in pSS patients but may also play a role in the pathology. They could act as non-professional antigen-presenting cells by expressing co-stimulatory molecules such as CD80 and CD86 [4]. In salivary glands from pSS patients, CyTOF immunophenotyping showed a significant upregulation of human leukocyte antigen–DR isotype (HLA-DR) in SGECs associated with disease activity[5]. SGECs could be involved in local B-lymphocyte activation because they can secrete B-cell activating factor (BAFF) [6]. Of note, plasma cells are detected in salivary gland tissue in close contact with C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12)-expressing ductal and acinar epithelium, which suggests potential interactions between these cells [7].

We hypothesized that SGECs could play a supportive role in B-lymphocyte survival and activation. We first focused on gene expression analysis of purified cellular populations sorted from salivary gland biopsies, then developed an in vitro co-culture model including SGECs and B lymphocytes to characterize the cross-talk between both.

## METHODS

### Patients

Minor salivary gland (MSG) biopsies were obtained from consecutive patients referred for suspected pSS to the Rheumatology Department of Groupe Hospitalier Paris-Sud, a tertiary reference center for systemic auto-immune diseases. pSS was defined according to the 2016 EULAR/ACR criteria[8] and controls were patients presenting sicca symptoms without anti-Ro/SSA or anti-La/SSB antibodies and with normal or sub-normal MSGs (i.e., focus score <1). MSG biopsies were used for transcriptomic analysis of sorted cells and co-culture experiments. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) used for transcriptomic analysis were isolated from whole blood of pSS patients and healthy blood donors within 4 hrs of blood sampling. B lymphocytes sorted from blood of healthy donors were used for the co-culture experiments.

A total of 42 pSS patients and 62 controls were included in the study, among whom 26 pSS patients and 27 controls had an MSG biopsy. The characteristics of the patients and controls are presented in **Table 1**. Experimental design showing the number of patients included in each experiment is in **Figure S1A**.

The study received approval from the local ethics committee, and informed consent was obtained from all patients and control subjects. Patients or the public were not involved in the design, or conduct, or reporting, or dissemination plans of our research.

Methods of RNA-sequencing, primary cultures of SGECs[9] and co-cultures of SGECs and B lymphocytes, FACS analysis and assays are described in online **supplementary text**.

### Statistical methods

#### *Statistical analysis of RNA-seq*

Statistical analyses were performed using the DESeq2 package. Comparisons were performed between pSS patients and controls in each cell sub-types based on a non-parametric *t*-test. Cells sorted from

biopsies and from blood in 4 pSS patients with matched samples available underwent paired comparison by non-parametric paired *t*-test.  $p\text{-value} \leq 0.05$  was considered statistically significant to identify differentially expressed genes.

#### *Statistical analysis of co-culture experiments*

The proportion of surviving B lymphocytes was calculated for each culture condition as the difference between the proportion of alive B lymphocytes co-cultured with SGEs and alive B lymphocytes cultured alone. The same strategy was used to assess the proportion of activated B lymphocytes (CD38+ or CD48+ B-lymphocyte percentages and mean fluorescence intensity [MFI]). Statistical analyses involved use of Prism software with Mann-Whitney (unpaired data) and Wilcoxon (paired data) tests.

## RESULTS

### **SGECs from pSS patients over-express interferon (IFN)-induced genes, *HLA-DRA*, Interleukin 7 (*IL7*) and BAFF receptor (*BAFFR*)**

Differential gene expression analysis of SGECs from pSS patients versus controls revealed 494 genes differentially expressed: 280 upregulated and 214 downregulated. *IFI6*, *VGLL2* and *ZNF879* were the most significantly upregulated genes, and *CCL22* was one of the most significantly downregulated genes ( $-\log_{10}(p\text{-value}) > 4$ ) (**Figure 1A**). The identified transcriptional differences were associated with disease status as indicated by the distinct clustering of pSS and control samples in the multidimensional scaling (MDS) plot shown in **Figure 1B**. Functional enrichment analysis of differentially expressed genes highlighted an over-representation of the IFN signaling pathway, B-cell development pathway and IL7 signaling pathway ( $-\log(p\text{-value}) = 3.52, 2.89$  and  $2.51$ , respectively) (**Table S3**). Several IFN-induced genes were upregulated, including *IFI6*, *OAS2*, *STAT1* and *BST2* (bone marrow stromal cell antigen 2) (**Figure 1C**). Among the 280 upregulated genes in pSS SGECs, 18 were IFN-induced genes according to the Interferome database; 8 were induced by type I and II; 9 were induced by type I, II and III; and 1 was induced by type I only. We also observed an upregulation of *HLA-DRA* expression, coding for the alpha chain of the DR major histocompatibility complex, and *IL7* expression in SGECs from pSS patients versus controls ( $p = 0.04$ ,  $p = 0.02$ , respectively) (**Figure 1C and Table S4**). Of note, for all these genes, the highest gene expression was from anti-SSA-positive patients who also had the highest salivary gland infiltration. These results were confirmed by RT-PCR, statistically significant for *BST2* and *IFI6* and with a trend for *HLA-DRA*, *OAS2*, *STAT1* and *IL7* (**Figure S3**). Finally, on RNA-seq, *BAFFR* was upregulated in SGECs from pSS patients versus controls ( $p = 0.01$ ) (**Figure 1C**) and confirmed by flow cytometry of unstimulated SGECs, with no change after poly(I:C) stimulation (**Figure 1D and E**).

## **B-lymphocyte activation at the transcriptome level in salivary gland biopsies and in blood**

When comparing gene expression in sorted B lymphocytes from salivary glands of pSS patients and controls, we detected 620 differentially expressed genes: 397 upregulated and 223 downregulated. The most significantly upregulated genes were *IGHG1* and *HADH* and the most significantly downregulated genes were *MT-RNR2-L12*, *MARCO*, *S100A9*, *ELF4* and *ITGA1* ( $-\log_{10}(p\text{-value}) > 5$ ) (**Figure 2A**). The differentially expressed genes were associated with disease status as indicated by the distinct clustering of pSS and control samples in the MDS plot (**Figure 2B**). Several genes involved in B-lymphocyte activation and differentiation such as *CD40* and *CD48*, both confirmed by RT-PCR (**Figure S3**), and *CD22* ( $p=0.02$ ,  $p=0.01$  and  $p=0.048$ , respectively) were upregulated in pSS patients versus controls (**Figure 2C**). *CD40* and *CD48* but not *CD22* upregulation was confirmed by RT-PCR. The IFN-induced gene, *OAS2*, and IFN $\gamma$  receptor 2 (*IFNGR2*) were also upregulated in B-lymphocytes from pSS patients versus controls ( $p=0.04$  and  $p=0.03$ , respectively), but not confirmed by RT-PCR. The lack of RT-PCR confirmation may be due to lack of power.

In sorted B lymphocytes from blood, 516 genes were differentially expressed between pSS patients and controls: 359 upregulated and 157 downregulated. Functional enrichment pathway analysis highlighted an over-representation of EIF2 signaling and IFN signaling pathways as well as a role for JAK signaling (**Table S3**). *TLR7* and its downstream signaling molecule *IRF7* were upregulated in pSS; additionally, *IL6*, involved in B lymphocyte growth, was upregulated (**Table S4**). The RT-PCR results showed a trend for a higher expression of *TLR7*, *IRF7* and *IL6* in pSS compared to controls.

The paired comparison between B lymphocytes from salivary glands and from blood in 4 pSS patients revealed the upregulated genes *CD138*, a plasma cell marker; *RANK*; and *IL6*. Moreover, *CCR10*, the receptor for CCL28, a mucosal homing chemokine, was upregulated in B lymphocytes from biopsies versus blood (**Table S4**). These results were confirmed for *RANK* and *IL6* by RT-PCR ( $p=0.03$  and  $p=0.03$ ).

### **SGECs increase B-lymphocyte survival and activation**

To analyze the potential interaction between SGECs and B lymphocytes, we used 5-day co-cultures of SGECs from pSS patients or controls with B lymphocytes from healthy donors with or without IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  or poly(I:C) stimulation. B lymphocytes co-cultured with SGECs from pSS patients or controls, showed increased viability under all stimulation conditions ( $p < 0.001$ ) (**Figure 3A and B**). We found no increase in absolute number of B lymphocytes after 5 days of culture. The increase in B-lymphocyte survival was higher with poly(I:C) than IFN $\alpha$  or IFN $\gamma$  co-cultures (**Figure 3A and Figure S4**). Conversely, poly(I:C) did not drive survival of B lymphocytes cultured alone (**Figure 3A and B**). More importantly, survival of B lymphocytes was higher on co-culture of SGECs from pSS patients (stimulated or not with poly(I:C)) than co-culture with SGECs from controls ( $p < 0.05$ ) (**Figure 3C**).

Co-cultures of SGECs with B lymphocytes also increased B-lymphocyte activation, as assessed by increased expression of CD38 on B lymphocytes under all stimulation conditions (**Figure 3D and E**). Moreover, with poly(I:C) stimulation, SGECs from pSS patients were more likely to increase CD38+ B lymphocytes compared to SGECs from controls ( $p < 0.05$  in percentage, a trend in MFI) (**Figure 3F and H**). Poly(I:C) had a minor impact on the proportion and MFI of CD38 on B lymphocytes cultured alone (**Figure 3E and 3G**).

The effect of SGECs from pSS patients on B-lymphocyte viability and CD38 expression was increased by poly(I:C) but not IFN stimulation. Thus, we wondered whether Toll-like receptor 3 (TLR3) signaling might differ between patients and controls. However, on looking at the poly(I:C) signaling pathways in SGECs, we found no difference between pSS and controls in expression of *TLR3*, *TRAF3*, *IRF3*, *RIG1* and *MDA5* (data not shown). However, *PKR* and *IRF7* were upregulated but not significantly in SGECs from pSS patients versus controls (**Figure 1C**). We detected no expression of *TLR3* in B lymphocytes sorted from salivary gland biopsies and from blood.

After co-culture, we observed an increase in CD27+ B lymphocytes percentage, and notably switched memory B lymphocytes defined as CD27+ IgD- after co-culture with poly(I:C) stimulation (**Figure S5A**

**and S5B**). Co-culture with SGECs did not achieve differentiation of B lymphocytes into antibody-secreting cells, as supported by the lack of increase in immunoglobulins (IgM and IgG) production in the co-culture supernatants (**Figure S6A and S6B**).

To sum, co-culture experiments demonstrated that SGECs from pSS patients had a higher ability than SGECs from controls to increase survival and activation of B lymphocytes.

### **Interactions between SGECs and B lymphocytes require mostly soluble factors**

To determine whether the survival and activation of B lymphocytes required direct cell contact or not, we performed transwell experiments. Without stimulation, the transwell separation did not change the proportion of surviving B lymphocytes co-cultured with SGECs, which suggests that B-lymphocytes survival mostly depended on soluble factors (**Figure 4A**). Similar results were obtained for B-lymphocyte activation as assessed by CD38, CD48, and CD40 markers (**Figure 4B-4F**). However, under poly(I:C) stimulation, part of the effect of SGECs on B-lymphocyte survival and activation was reduced with transwell separation, which suggests the additional role of cell contact in this specific condition (**Figure 4A, C, D and E**).

Then, to determine which factors could play a role in the interactions between SGECs and B lymphocytes, we tested potential involved factors (including BAFF, APRIL, IL6) and signaling pathways (including JAK, BTK, PI3K and pathways involved in B-lymphocyte activation and proliferation) by adding specific inhibitors in the co-cultures. Adding belimumab to the co-culture did not inhibit the effect of SGECs on B-lymphocyte survival and activation, even with poly(I:C) stimulation (**Figure 5I and J**). A proliferation-inducing ligand (APRIL) was secreted by cultured SGECs, increased in co-cultures with B lymphocytes in pSS patients and not in controls (**Figure 5A and B**). However, the addition of anti-APRIL antibody did not inhibit the survival of co-cultured B lymphocytes (**Figure 5I and J**). IL6 was secreted by SGECs in co-culture supernatants with a trend for a higher secretion in pSS patients versus controls (**Figure 5C and D**). However, adding tocilizumab in the co-culture did not inhibit B-lymphocyte survival

and activation by SGECs (**Figure 5I and J**). Because several cytokines, including IL7, IL15 and IL21 signal via the JAK/STAT pathway, we tried to inhibit JAK1/JAK3 signaling using tofacitinib, but again without any success (**Figure 5I and J**).

Several chemokines were detected in co-cultures supernatants, which suggests a potential role for homing factors secreted by SGECs supporting B-lymphocyte survival and activation. CXCL10, also known as IFN $\gamma$ -inducible protein 10 (IP-10), and CXCL13 were detected in SGECs cultures and co-cultures supernatants (**Figure 5E and 5G**). CXCL12 was detected at very low levels in the supernatant of only 3 pSS SGEC co-cultures (**Figure 5F**) but not in control SGEC co-cultures. Finally, CCL28, another chemokine involved in mucosal homing was detected in co-culture supernatant, with no difference between pSS patients and controls. Of note, CCL28 level was decreased in the presence of B lymphocytes as compared with SGECs cultured alone (**Figure 5H**).

Given these results, we tried to target multiple immunological pathways at the same time by using BTK and PI3K inhibitors. BTK was targeted by adding ibrutinib, a BTK inhibitor, in the co-cultures. Ibrutinib decreased B-lymphocyte viability in co-culture ( $p < 0.05$ ), but this effect was lost in the presence of poly(I:C) (**Figure 5I and J**). LY294002, a PI3K inhibitor, decreased of B-lymphocyte viability in co-culture ( $p < 0.05$ ) (**Figure 5I**). This effect was maintained but not significantly with poly(I:C) stimulation (**Figure 5J**). Of note, we found no effect of the BTK inhibitor and PI3K inhibitor on SGEC viability as compared with the control condition (DMSO). LY294002 but not leflunomide or ibrutinib also affected B-lymphocyte viability when B lymphocytes were cultured alone (**Figure S7**). Of note, LY294002 was also able to decrease co-cultured B-lymphocyte activation, as assessed by the decrease in CD38 MFI (**Figure 5K**).

Given some recent clinical results, we also looked at the effect of the association of leflunomide and hydroxychloroquine. Leflunomide decreased B-lymphocyte viability in co-culture, but this effect was lost in the presence of poly(I:C) (**Figure 5I and J**). Hydroxychloroquine alone had no effect on co-

cultured B-lymphocyte viability and, combined with leflunomide, did not increase the latter effect **(Figure 5I)**.

## DISCUSSION

Transcriptome analysis of sorted cells from salivary-gland biopsies showed an increased IFN signature in SGECs and a higher activation of tissue and circulating B lymphocytes in pSS patients than controls. Using a co-culture model, SGECs from pSS patients were more efficient to promote survival of B lymphocytes than SGECs from controls. Stimulation with poly(I:C) induced the greatest difference in B-lymphocyte activation between patients and controls. These effects were mainly mediated by soluble factors. Targeting specifically BAFF, APRIL, IL6 and JAK1/3 did not inhibit the effect of SGECs on B lymphocytes, but B-lymphocyte viability was decreased with leflunomide, BTK and PI3K inhibitors. These results suggested that a combination of factors is required or that homing factors are involved. A schematic representation of this hypothesis is presented in **Figure S8**. This is an interesting finding because it could have therapeutic consequences by suggesting that directly targeting B-lymphocyte activation pathways would be more efficient than targeting a single cytokine.

RNA-seq analysis of sorted SGECs demonstrated an IFN signature within these cells. The IFN signature is well known in PBMCs and salivary gland biopsies of pSS patients[10,11] ; however, this is the first time that this IFN signature has been demonstrated in sorted SGECs. The initial triggers responsible for this IFN signature are still not identified. Viral triggers have been suspected without any clear identification. The chronic expression of endogenous retroviral (ERV) sequences could explain the overrepresentation of the IFN signaling pathway in SGECs from pSS patients[12]. Overexpression of *BST2*, a transmembrane protein that inhibits viral particles budding from infected cells, could suggest an overexpression of some ERVs. A recent work highlighted increased mRNA and protein levels of *BST2* in salivary glands from pSS patients[13]. However, in our study, *BST2* overexpression was the consequence of only IFN overexpression because we did not find a differential expression of coding ERV between MSG from pSS patients and controls (*data not shown*).

SGECs could act as non-professional presenting cells by expressing HLA-DR but also adhesion and co-stimulatory molecules [14]. We observed an upregulation of *HLA-DRA*, which codes for one subunit of

HLA-DR. This observation agrees with previously published works showing an aberrant expression of HLA-DR by SGECs[15], which can be induced by a type II IFN stimulation[16].

Type I and II IFN are also able to induce BAFF production by SGECs[6]. BAFF could represent the link between the innate and adaptive immunity in pSS. BAFFR is the most specific receptor of BAFF and is mainly present on B lymphocytes. By using RT-PCR and immunofluorescence, Lahiri et al. showed that BAFFR was expressed by SGECs[17] and that this receptor was involved in SGECs survival owing to an autocrine effect of BAFF. We showed a differential expression of BAFFR on SGECs between pSS and controls. Thus, the BAFF cytokine could play a dual role, having a direct effect on B-lymphocyte survival and also supporting SGEC survival, which in turn may have a feeder effect on B lymphocytes.

B lymphocytes sorted from salivary glands from pSS patients overexpressed activating genes, as expected based on the pSS pathophysiology. Of note, the co-culture between SGECs and B lymphocytes increased the expression of activation markers such as CD38, CD48 and CD40 as compared with B lymphocytes cultured alone. CD40, a co-stimulatory pathway receptor essential for germinal center reactions seems of particular interest. CD40 was already found to be constitutively expressed by lymphocytes, ductal epithelial cells and endothelial cells in salivary gland biopsies [18]. Soluble CD40L was found increased in the serum of patients with pSS[19], as well as at the surface of activated CD4 T cells [20] and in infiltrating lymphocytes in salivary gland biopsies from pSS patients [18]. Moreover, a phase 2 therapeutic trial of an anti-CD40 antibody recently yielded positive results [21]. In our study, CD48, which may enhance the CD40-mediated activating signal for B lymphocytes[22], was upregulated in pSS versus controls. This result was congruent with a work describing soluble CD48 as a biomarker of pSS which was correlated with the biological domain of the ESSDAI[23].

B lymphocytes sorted from blood overexpressed TLR7 and the downstream signaling molecule IRF7. Of note, the upregulation of IRF7 was confirmed by Jin-Lei Sun et al. who recently performed RNA-seq analysis of B lymphocytes sorted from blood, comparing 3 pSS patients to 3 controls ( $\log_2FC = 1.39$  and  $p\text{-value} = 8.59 \cdot 10^{-7}$ ) (**Figure S9**) [24]. Moreover, an RNAseq analysis of B lymphocytes sorted from

blood showed an upregulation of TLR7 as well as IRF7 in pSS patients versus controls (FC = 2.8, p = 5.09. 10<sup>-5</sup> and FC=2.8, p= 5.0 9. 10<sup>-5</sup>, respectively) [25].

Previously, co-culture experimental models with SGECs used allogenic PBMCs and failed because of allogenic reactions[16]. In our co-culture model, we used sorted allogenic B lymphocytes, avoiding the T-lymphocyte allogenic reaction. Moreover, the effect of SGECs on B-lymphocyte survival and activation was maintained even with transwell separation that would have prevented antigen presentation. Co-culture with a human salivary gland cell line and tonsillar B lymphocytes revealed increased apoptosis in epithelial cells [26]. This model using a cancer cell line was more artificial than primary-cultured SGECs from patients or controls.

In our co-culture model, the ability of SGECs from pSS patients to increase B-lymphocyte survival was increased by poly(I:C) rather than IFN $\alpha$  or IFN $\gamma$  stimulation. The transcriptome analysis showed a higher expression of PKR and IRF7, although not significant, in SGECs from pSS patients than controls, whereas the expression of other downstream signaling factors of TLR3 were similar. Thus, poly(I:C) stimulation could mimic a viral trigger and signal through several pathways inducing a positive feedback loop.

We hypothesized that SGECs could provide a favorable environment enhancing B-lymphocyte survival and activation. We observed an increase in memory B-lymphocyte differentiation in co-cultures; however, the SGECs did not achieve differentiation of B-lymphocytes in antibody-secreting cells. Thus, this co-culture model remains partial, and other actors such as CD40L, IL2, IL4, IL21, as showed by McCarthy, using single-cell Nojima cultures could be required[27]. T follicular helper lymphocytes might also be required to obtain differentiated plasma cells.

By analogy with bone-marrow plasma cells niches, in which several survival factors including BAFF, APRIL, IL6 and CXCL12 are required[28], we assessed BAFF, APRIL, IL6, CXCL10, CXCL12, CXCL13, and CCL28 in co-culture supernatants. All were present in co-culture supernatant, CXCL12 at very low level and BAFF only after poly(I:C) stimulation, which agrees with our previous studies [6, 29]. Our experiments with inhibitory molecules showed that a single pathway inhibition (anti-BAFF, anti-APRIL,

anti-IL6R antibody) was not sufficient. Even tofacitinib, which targets numbers of pro-inflammatory cytokines, was not successful. Leflunomide, a pyrimidine synthesis inhibitor that inhibit B-lymphocyte proliferation and cell cycle progression[30, 31], as well as PI3K and BTK inhibitors (targeting at the same time CXCL13, BAFF and IL6 signaling[32]) decreased B-lymphocyte viability in co-cultures. Actually, results may arise from chemokines secretion induced by the SGEC-B lymphocytes co-culture. By analogy with systemic lupus erythematosus, in which circulating plasmablasts express markers of mucosal immune reaction including CCR10 and migrate toward the mucosal chemokine CCL28 [33], we showed that SGECs secrete CCL28 and other chemokines, such as APRIL, IL6, CXCL10 and CXCL13, which could induce survival and activation of B lymphocytes. This mechanism may explain that the only way to inhibit this SGEC-induced B-lymphocyte activation is the use of leflunomide, BTK and PI3K inhibitors that directly target B lymphocytes and inhibit their survival and activation. Finally, PI3K was the only inhibitor to maintain an inhibitory effect under poly(I:C) stimulation, which suggests that in a local inflammatory environment, such as pSS salivary glands, PI3K inhibition might be the most efficient option.

In conclusion, the analysis of SGECs and B lymphocytes sorted from salivary glands from pSS patients showed an upregulation of several genes and pathways that could be involved in their interactions. Our co-culture model showed that stimulation of B-lymphocyte survival and activation was better for SGECs from pSS patients than controls. This effect was mediated mostly by soluble factors. Targeting a single cytokine was not sufficient to inhibit this effect but leflunomide, BTK and PI3K inhibitors were successful. These findings may give indications for the choice of future therapeutic options in pSS.

**Competing interests:** A. T., N.A. and M. M. are employed by Biogen. X.M. received an honorarium for consultancy advice on Sjögren's syndrome from BMS; GSK; Novartis and Servier and a research grant from Servier. The remaining authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

**Contributorship:** E.R. participated in designing research studies, conducting experiments, acquiring

data, analyzing data and writing the manuscript. J.P. participated in designing research studies, conducting experiments, acquiring data and analyzing data. N.T. participated

in analyzing data and writing the manuscript. S.B. participated in designing research studies, conducting experiments and acquiring data. A.P., B.L. and A.D. participated in designing research studies, conducting experiments and acquiring data. H.C., A.T. and N.A. participated in conducting experiments and acquiring data. B.J. participated in acquiring data, analyzing data and writing the manuscript. M.M. participated in designing research studies, acquiring data, analyzing data and writing the manuscript. G.N. and X.M. participated in designing research studies, analyzing data and writing the manuscript.

**Acknowledgements:** We thank C. Le Pajolec, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France; E. Berge, Rheumatology, Université Paris Sud, Le Kremlin Bicêtre, France who participated in the recruiting patients and V. Libri, Center for Translation Research, Institut Pasteur, Paris, France, for expertise in and help with the Biomark experiments. We thank Odile Heidmann, Kevin De Azevedo and Thierry Heidmann, Unité des Rétrovirus Endogènes et Éléments Rétroïdes des Eukaryotes Supérieurs, UMR 8122 CNRS, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France for expertise and work on the endogenous retroviral sequences analysis. We thank Pascal Schneider, Department of Biochemistry, University of Lausanne, Switzerland for providing a human APRIL blocking antibody.

**Funding sources:** Support was obtained from: the Labex in Research on Medication and Therapeutic Innovation (LERMIT) (ANR10), the Fondation pour la Recherche Médicale DEQ20150934719, an unrestricted grant from Biogen to Université Paris-Sud (UPSud/SAIC N 97731) and the Innovative Medicines Initiative 2 Joint Undertaking (JU) (NECESSITY grant agreement No 806975). This JU received support from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program and EFPIA. E.R. is the recipient of a PhD fellowship from Arthritis Fondation Courtin, Arthritis R&D (CIFRE 2016/1406).

**Ethical approval:** The study received approval from the local ethics committee, and informed consent

was obtained from all participants.

**Data availability statement:** Data are available on reasonable request. All data relevant to the study are included in the article or uploaded as online supplementary information. Additional data are available on reasonable request.

**Patients and public involvement:** Patients or the public were not involved in the design, or conduct, or reporting, or dissemination plans of our research.

## REFERENCES

1. Mariette X, Criswell LA. Primary Sjögren's Syndrome. *N Engl J Med*. 2018;378(10):931-9.
2. Brauner S, Folkersen L, Kvarnström M, et al. H1N1 vaccination in Sjögren's syndrome triggers polyclonal B cell activation and promotes autoantibody production. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(10):1755-63.
3. Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome: autoimmune epithelitis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994;72(2):162-5.
4. Manoussakis MN, Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, et al. Expression of B7 costimulatory molecules by salivary gland epithelial cells in patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 1999;42(2):229-39.
5. Mingueneau M, Boudaoud S, Haskett S, et al. Cytometry by time-of-flight immunophenotyping identifies a blood Sjögren's signature correlating with disease activity and glandular inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(6):1809-1821.e12.
6. Ittah M, Miceli-Richard C, Eric Gottenberg J-, et al. B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) is expressed under stimulation by interferon in salivary gland epithelial cells in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(2):R51.
7. Szyszko EA, Brokstad KA, Øijordsbakken G, et al. Salivary glands of primary Sjögren's syndrome patients express factors vital for plasma cell survival. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(1):R2.
8. Shiboski SC, Shiboski CH, Criswell LA, et al. 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*. 2012;64(4):475-87.
9. Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Abu-Helu RF, et al. Establishment of a convenient system for the long-term culture and study of non-neoplastic human salivary gland epithelial cells. *Eur J Oral Sci*. 2002;110(1):21-30.
10. Gottenberg J-E, Cagnard N, Lucchesi C, et al. Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(8):2770-5.
11. Khuder SA, Al-Hashimi I, Mutgi AB, et al. Identification of potential genomic biomarkers for Sjögren's syndrome using data pooling of gene expression microarrays. *Rheumatol Int*. 2015;35(5):829-36.
12. Nocturne G, Mariette X. Advances in understanding the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol*. 2013;9(9):544-56.
13. Chen C, Shi H, Wang B, et al. Aberrant expression of the innate restriction factor bone marrow stromal antigen-2 in primary Sjögren's syndrome. *J Cranio-Maxillo-fac Surg Off Publ Eur Assoc Cranio-Maxillo-fac Surg*. 2018;46(11):1899-904.
14. Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Functional expression of a costimulatory B7.2 (CD86) protein on human salivary gland epithelial cells that interacts with the CD28 receptor, but has reduced binding to CTLA4. *J Immunol Baltim Md*. 1950 2001;166(5):3107-13.

15. Lindahl G, Hedfors E, Klareskog L, et al. Epithelial HLA-DR expression and T lymphocyte subsets in salivary glands in Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol*. 1985;61(3):475-82.
16. Tsunawaki S, Nakamura S, Ohyama Y, et al. Possible function of salivary gland epithelial cells as nonprofessional antigen-presenting cells in the development of Sjögren's syndrome. *J Rheumatol*. 2002;29(9):1884-96.
17. Lahiri A, Varin M-M, Le Pottier L, et al. Specific forms of BAFF favor BAFF receptor-mediated epithelial cell survival. *J Autoimmun*. 2014;51:30-7.
18. Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, et al. CD40 on salivary gland epithelial cells: high constitutive expression by cultured cells from Sjögren's syndrome patients indicating their intrinsic activation. *Clin Exp Immunol*. 2002;127(2):386-92.
19. Goules A, Tzioufas AG, Manousakis MN, et al. Elevated levels of soluble CD40 ligand (sCD40L) in serum of patients with systemic autoimmune diseases. *J Autoimmun*. 2006;26(3):165-71.
20. Belkhir R, Gestermann N, Koutero M, et al. Upregulation of membrane-bound CD40L on CD4+ T cells in women with primary Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol*. 2014;79(1):37-42.
21. The Novel Anti-CD40 Monoclonal Antibody CFZ533 Shows Beneficial Effects in Patients with Primary Sjögren's Syndrome: A Phase IIa Double-Blind, Placebo-Controlled Randomized Trial. 2017 ACR Meeting Abstracts.
22. Klyushnenkova EN, Li L, Armitage RJ, et al. CD48 delivers an accessory signal for CD40-mediated activation of human B cells. *Cell Immunol*. 1996;174(1):90-8.
23. Nishikawa A, Suzuki K, Kassai Y, et al. Identification of definitive serum biomarkers associated with disease activity in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther*. 2016;18(1):106.
24. Sun JL, Zhang HZ, Liu SY, et al. Elevated EPSTI1 promote B cell hyperactivation through NF- $\kappa$ B signalling in patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2020;79(4):518-524.
25. Imgenberg-Kreuz J, Sandling JK, Björk A, 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;87(5):e12662
26. Varin M-M, Guerrier T, Devauchelle-Pensec V, et al. In Sjögren's syndrome, B lymphocytes induce epithelial cells of salivary glands into apoptosis through protein kinase C delta activation. *Autoimmun Rev*. 2012;11(4):252-8.
27. McCarthy KR, Watanabe A, Kuraoka M, et al. Memory B Cells that Cross-React with Group 1 and Group 2 Influenza A Viruses Are Abundant in Adult Human Repertoires. *Immunity*. 2018;48(1):174-184.e9.
28. Wilmore JR, Allman D. Here, There, and Anywhere? Arguments for and against the Physical Plasma Cell Survival Niche. *J Immunol Baltim Md 1950*. 01 2017;199(3):839-45.
29. Ittah M, Miceli-Richard C, Gottenberg J-E, et al. B-cell-activating factor expressions in salivary epithelial cells after dsRNA virus infection depends on RNA-activated protein kinase activation. *Eur J Immunol*. 2009;39(5):1271-9.
30. van der Heijden EH, Hartgring SA, Kruize AA, et al Additive immunosuppressive effect of

leflunomide and hydroxychloroquine supports rationale for combination therapy for Sjögren's syndrome. *Expert Rev Clin Immunol.* 2019;15(7):801-8.

31. Siemasko KF, Chong AS, Williams JW, et al. Regulation of B cell function by the immunosuppressive agent leflunomide. *Transplantation.* 1996;61(4):635-42.
32. Tzenaki N, Papakonstanti EA. p110 $\delta$  PI3 kinase pathway: emerging roles in cancer. *Front Oncol.* 2013;3:40.
33. Mei HE, Hahne S, Redlin A, et al. Plasmablasts With a Mucosal Phenotype Contribute to Plasmacytosis in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* 2017;69(10):2018-28.

**Table1: Characteristics of the patients with primary Sjögren’s syndrome (pSS) and controls.**

	RNA-seq experiments				SGECs used for co-cultures experiments (including transwell and inhibition experiments)	
	SGECs and B lymphocytes sorted from biopsies		B lymphocytes sorted from blood		pSS (n=18)	control (n=21)
	pSS (n=9)	control (n=4)	pSS (n=16)	control (n=7)		
<b>Age (years)</b>	51 (47-71)	64 (55-66)	55 (47-68)	61 (46-82)	52 (42-71)	56 (47-70)
<b>Female sex, no (%)</b>	8 (89)	4 (100)	15 (94)	7 (100)	16 (88)	18(86)
<b>Pathologic Shirmer, n (%)</b>	1 (12.5)	2 (50)	2 (33)	NA	14 (82)	9 (56)
<b>Pathologic salivary flow, n(%)</b>	7 (87.5)	3 (75)	6 (86)	NA	15 (88)	7 (44)
<b>Focus score <math>\geq</math> 1, n (%)</b>	4 (44)	0 (0)	3 (50)	NA	12(66)	0 (0)
<b>SSA, n (%)</b>	7 (78)	0 (0)	13 (81)	NA	13 (72)	0 (0)
<b>ESSDAI</b>	2 (0-4.5)		0.5 (0-2.75)		2 (1-4)	

Data are expressed as median (25th-75th percentiles), unless otherwise specified. All percentages are calculated for patients with available data. SGECs, salivary gland epithelial cells; SSA, Sjögren’s-syndrome-related antigen; ESSDAI: EULAR Sjögren Syndrome Disease Activity Index; NA, data not available.

## Figure legends:

**Figure 1: Salivary gland epithelial cells (SGECs) sorted from salivary gland biopsies express interferon (IFN)-induced genes, *HLA-DRA*, *BAFFR*, *PKR* and *IRF7*.** **A:** Volcano plot of differentially expressed genes in sorted SGECs from patients with primary Sjögren's syndrome (pSS) (n=5) versus controls (n=4). The horizontal red dashed line indicates the cutoff for significance at  $p < 0.05$  and the vertical lines for fold change (FC) in expression  $\geq 1.5$  and  $\leq -1.5$ . **B:** Multidimensional scaling (MDS) representation of the similarities between transcriptomic profiles. Each dot corresponds to a transcriptomic profile, and the distances between the dots are proportional to the transcriptomic distances computed based on the 494 differentially expressed genes. **C:** Normalized counts of genes expressed by SGECs in controls (HC) and pSS patients. Results of RNA-seq of sorted cells: IFN-stimulated genes (*IFI6*, *OAS2*, *STAT1*, *BST2*), *HLA-DRA*, *IL7*, *BAFFR*, *PKR* and *IRF7*. P-values were determined by using DESeq2 software. **D:** Flow cytometry example of BAFFR expression in unstimulated alive SGECs and isotype control from a pSS patient. **E:** Flow cytometry of BAFFR expression in alive SGECs with or without poly(I:C) stimulation. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test, one star corresponds to a p-value  $\leq 0.05$ . SGECs from controls are in green, SGECs from pSS patients are in orange.

**Figure 2: B lymphocytes sorted from salivary gland biopsies from pSS overexpress activation and differentiation genes as compared with controls.** **A:** Volcano plot of differentially expressed genes in sorted B lymphocytes from pSS patients (n=9) versus controls (n=4). The horizontal red line indicates the cutoff for significance at  $p < 0.05$  and the vertical lines  $FC \geq 1.5$  and  $\leq -1.5$ . **B:** MDS representation of similarities between transcriptomic profiles. Each dot corresponds to a transcriptomic profile and distances between the dots are proportional to the transcriptomic distances computed based on the 620 differentially expressed genes. **C:** Normalized counts of *CD40*, *CD22*, *CD48*, *OAS2*, and *IFNGR2* in B lymphocytes sorted from biopsies from controls (HC) and in pSS patients. P-values were determined by using DESeq2.

**Figure 3. SGECs from pSS patients increase B-lymphocyte survival and activation.** **A:** Representative dot plot of B-lymphocyte viability on staining with Live/Dead (Fixable Viability Dye) cultured alone or co-cultured with SGECs with or without poly(I:C). **B:** Proportion of alive B lymphocytes on day 5, cultured alone or co-cultured with SGECs with or without IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  or poly(I:C). **C:** Difference between the proportion of alive B lymphocytes co-cultured with SGECs from pSS patients and controls and that of alive B lymphocytes cultured alone on day 5. **D:** Representative dot plot of B lymphocytes cultured alone and co-cultured with SGECs with or without poly(I:C) and stained for CD38 and CD27. **E:** Proportion of CD38+ B lymphocytes on day 5 under all conditions of culture and stimulation. **F:** Difference between the proportion of CD38+ B lymphocytes in co-culture with SGECs and the percentage of CD38+ B lymphocytes cultured alone on day 5. **G:** Mean fluorescence intensity (MFI) of CD38 in B lymphocytes cultured alone with or without poly(I:C), or B lymphocytes co-cultured with SGECs with or without poly(I:C). **H:** Difference between the MFI for CD38 for B lymphocytes co-cultured with SGECs or cultured alone on day 5.

\* p-value  $\leq 0.05$ , \*\* p-value  $\leq 0.01$  and \*\*\* p-value  $\leq 0.001$ .

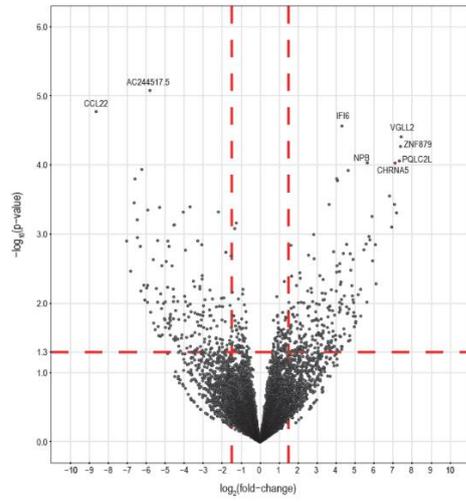
**Figure 4. Increases of B-lymphocyte viability and activation were mainly due to soluble factors.** B lymphocytes were examined on day 5 with and without transwell, with and without poly(I:C) in co-cultures with SGECs from pSS patients and controls **A:** Proportion of alive B lymphocytes **B:** Proportion of CD38+ B lymphocytes **C:** CD38 MFI of B lymphocytes **D:** Proportion of CD48<sup>high</sup> B lymphocytes. **E:** CD48 MFI of B lymphocytes. **F:** CD40 MFI of B lymphocytes. \* p-value  $\leq 0.05$ .

**Figure 5: Assessment of soluble factors in co-cultures supernatants and inhibition experiments.** **A:** Level of APRIL in the supernatants of B lymphocytes cultured alone, SGECs from pSS and controls cultured alone and SGECs co-cultured with B lymphocytes. **B:** Dosage of APRIL in supernatants of SGECs cultured alone or co-cultured with B lymphocytes (after subtraction of APRIL level in supernatants of B

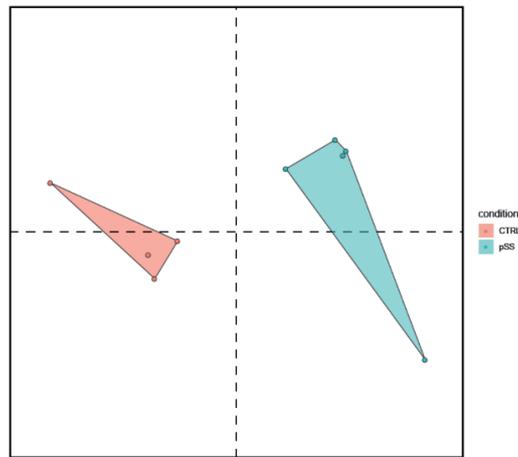
lymphocytes cultured alone). **C**: Level of IL6 in supernatants of B lymphocytes cultured alone, SGECs from pSS and controls cultured alone and SGECs co-cultured with B lymphocytes. **D**: Level of IL6 in supernatants of SGECs cultured alone or co-cultured with B lymphocytes (after subtraction of IL6 level in supernatants of B lymphocytes cultured alone). **E, F, G and H**: Level of CXCL10 (**E**), CXCL12 (**F**), CXCL13 (**G**) and CCL28 (**H**) in supernatants of B lymphocytes cultured alone, SGECs from pSS and controls cultured alone and SGECs co-cultured with B lymphocytes. Dashed line represents the lower limit of detection of the assay. **I, J**: Viability of B lymphocytes co-cultured with SGECs and different inhibitors relative to without the inhibitor and without poly(I:C) (**I**), and with poly(I:C)(**J**). **K**: Effect of leflunomide, ibrutinib (BTK inhibitor) and LY294002 (PI3K inhibitor) on CD38 MFI of B lymphocytes cultured alone and in co-culture with SGECs. \* p-value  $\leq 0.05$ , \*\* p-value  $\leq 0.01$  and \*\*\* p-value  $\leq 0.001$ .

**Figure 1**

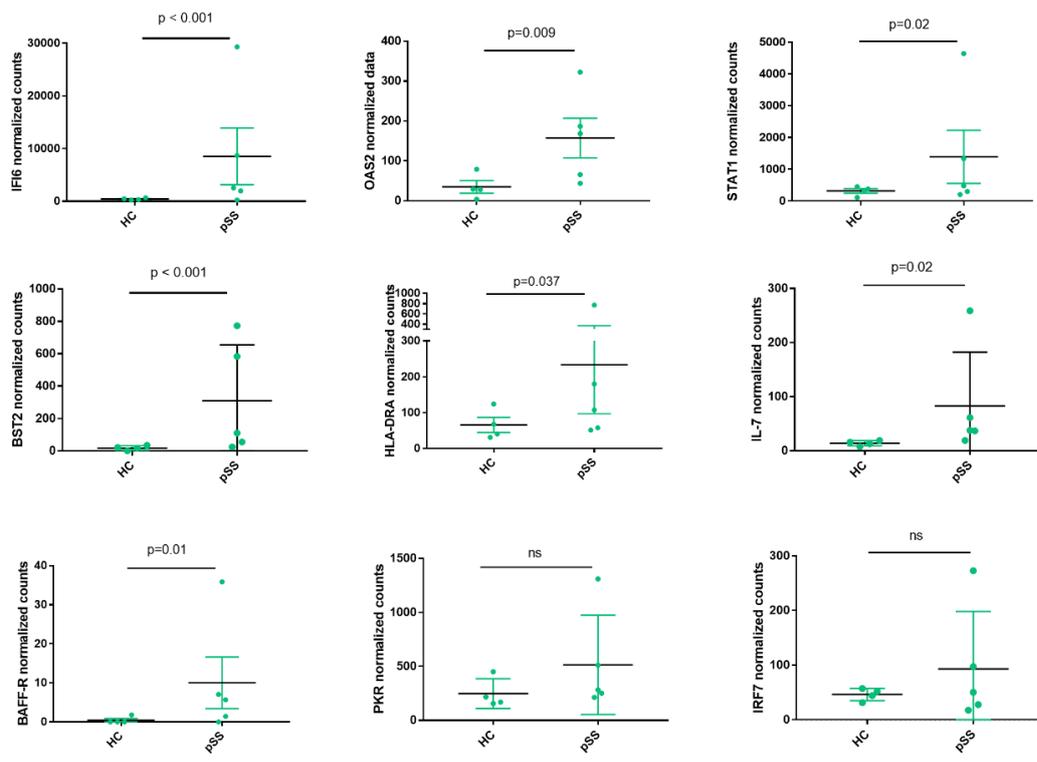
**A**



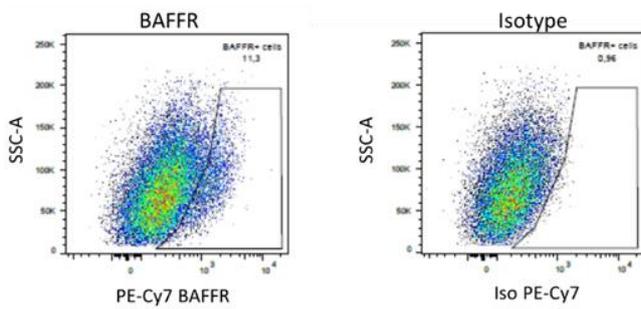
**B**



**C**



**D**



**E**

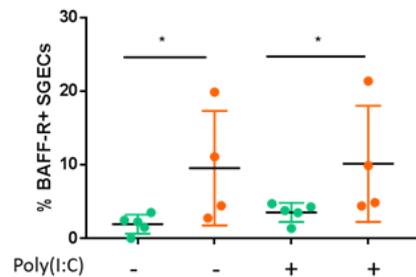
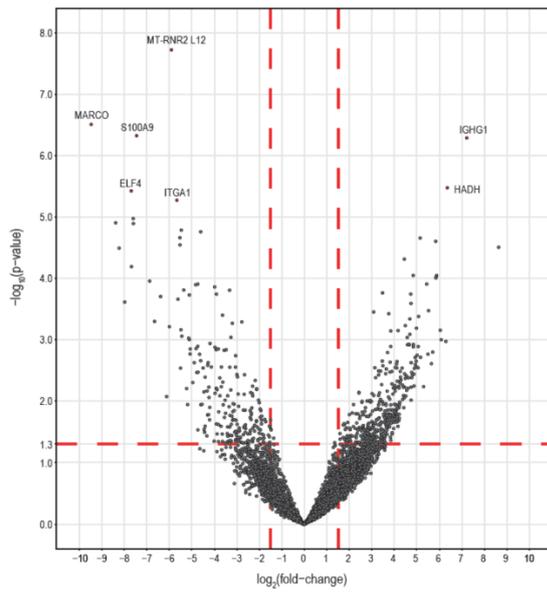
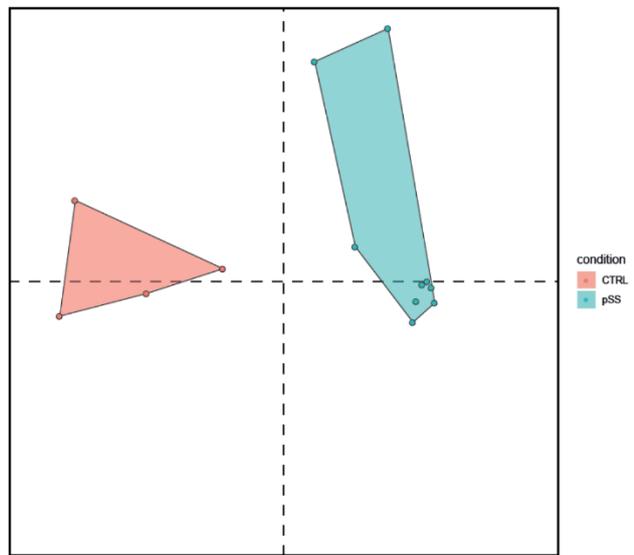


Figure 2

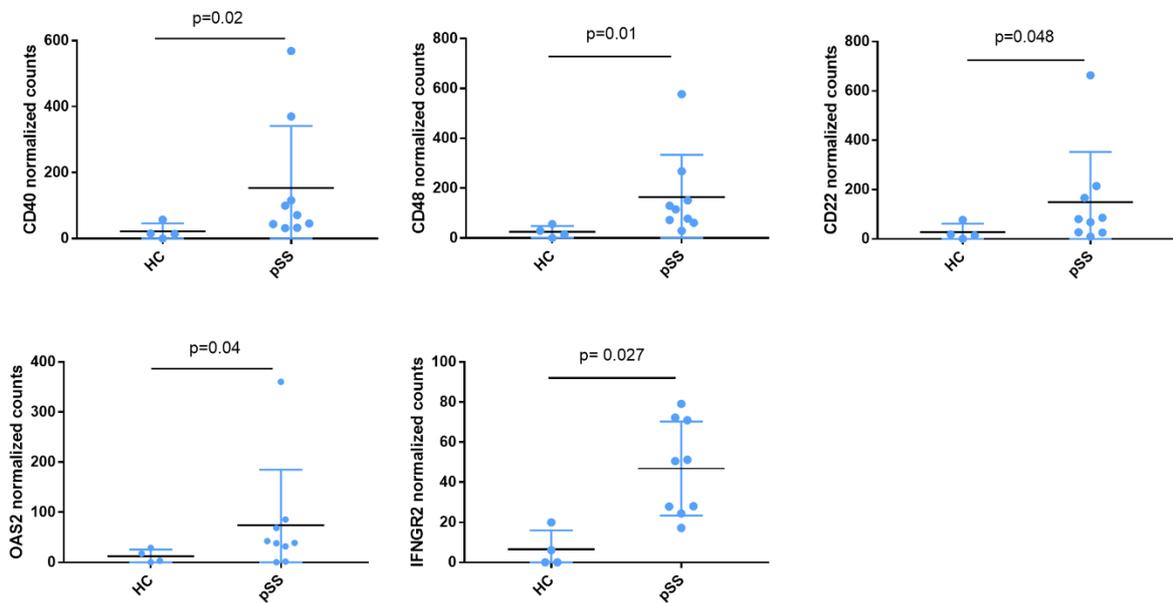
A



B



C



**Figure 3**

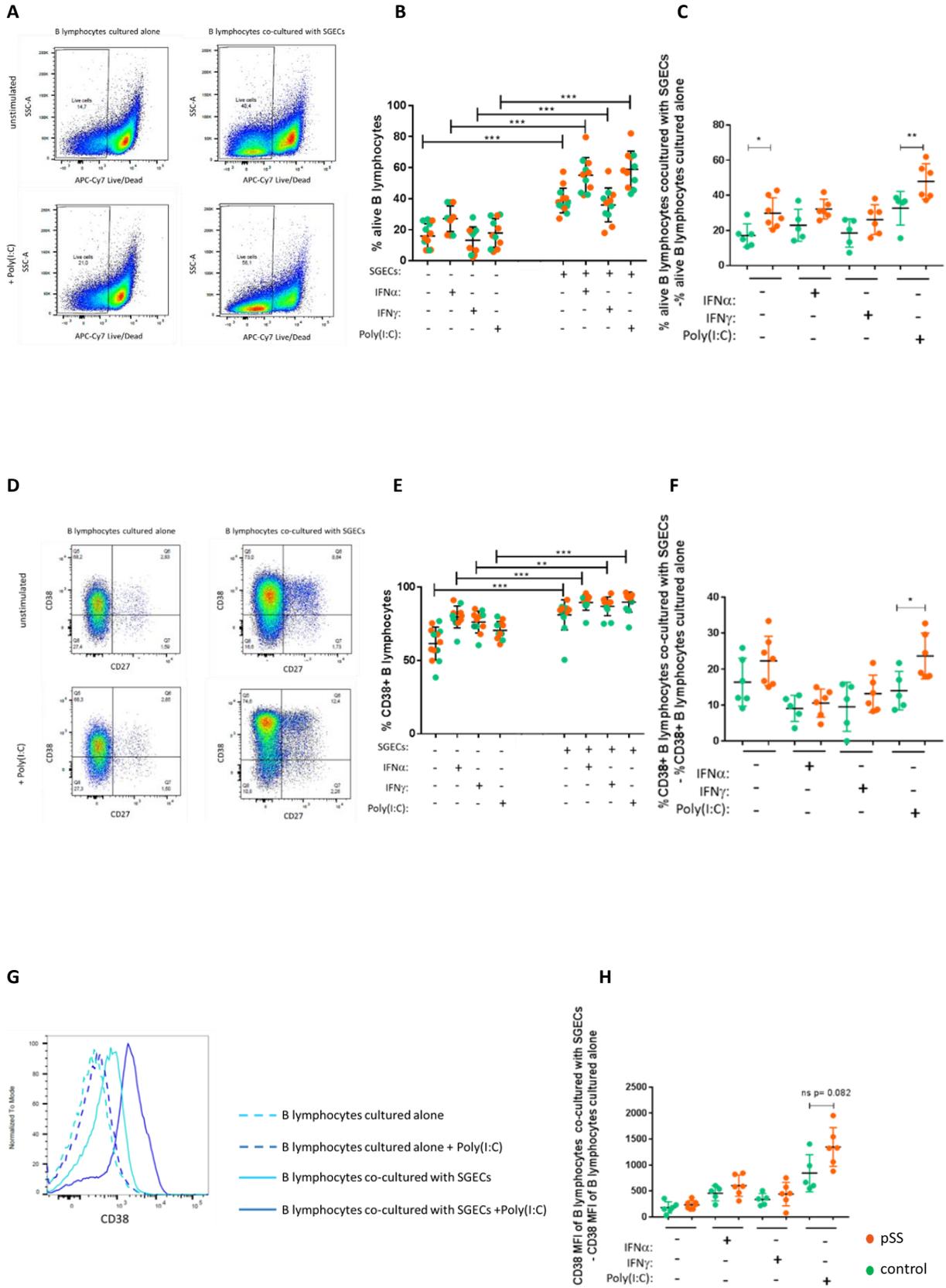
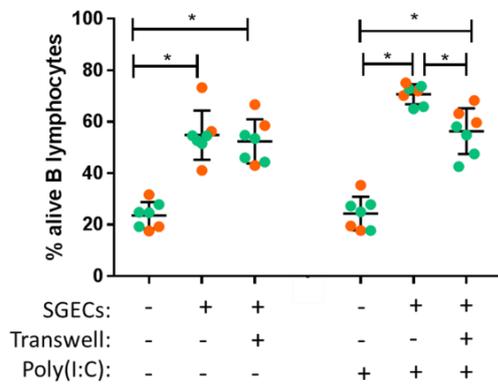
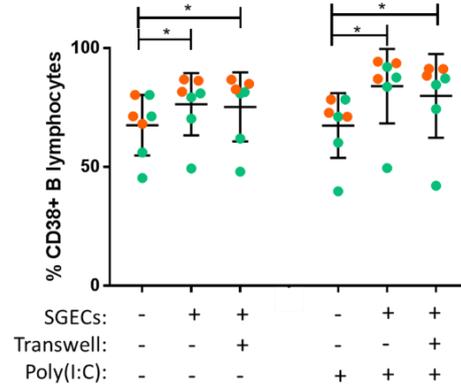


Figure 4

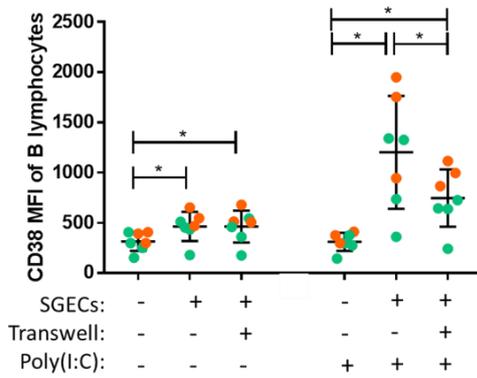
**A**



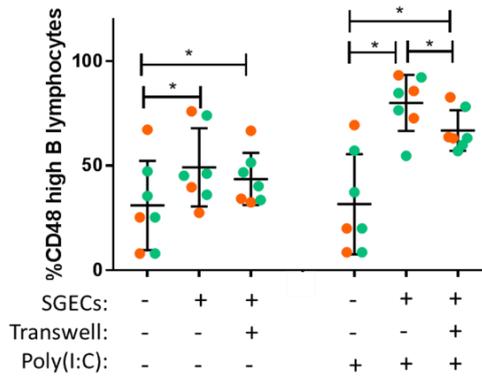
**B**



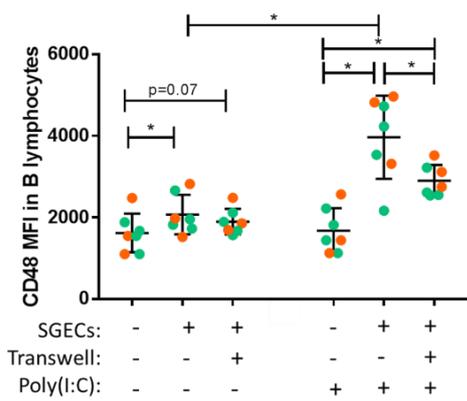
**C**



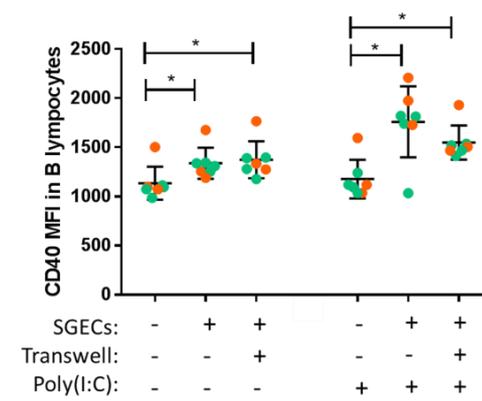
**D**



**E**



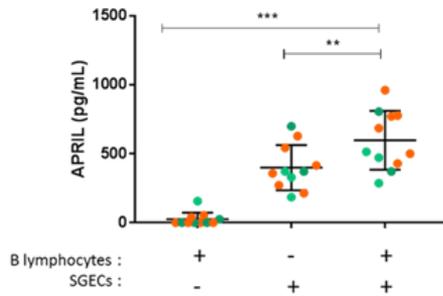
**F**



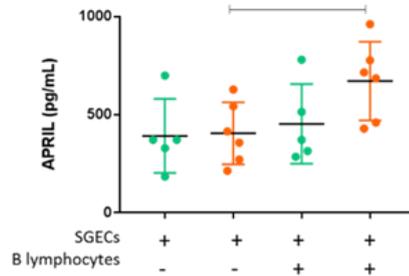
● pSS  
● control

Figure 5 (part 1)

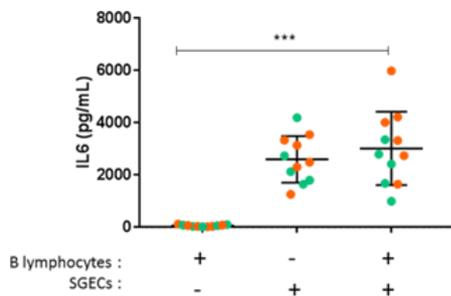
A



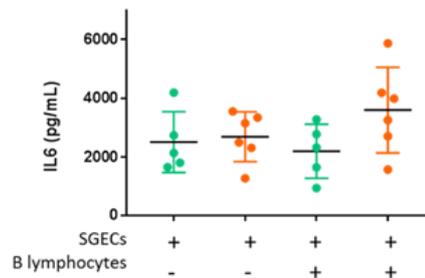
B



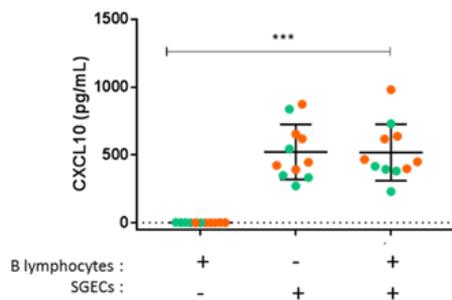
C



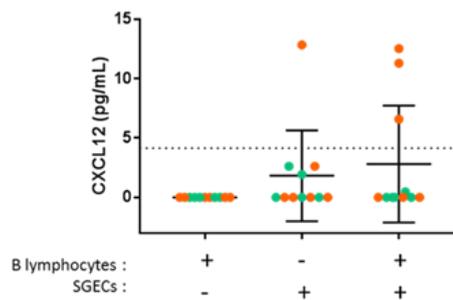
D



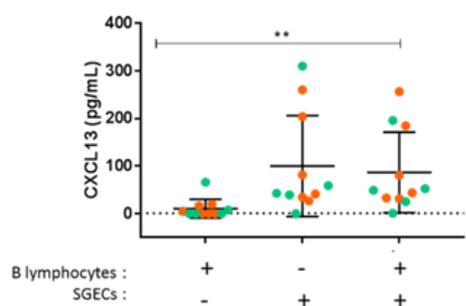
E



F



G



H

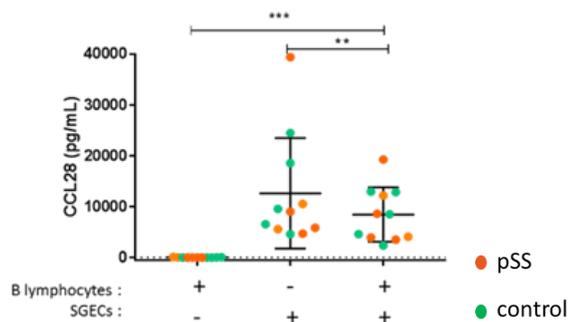
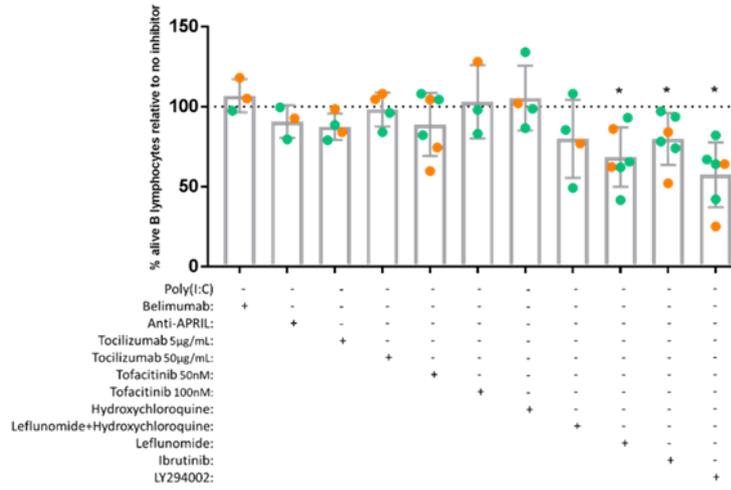
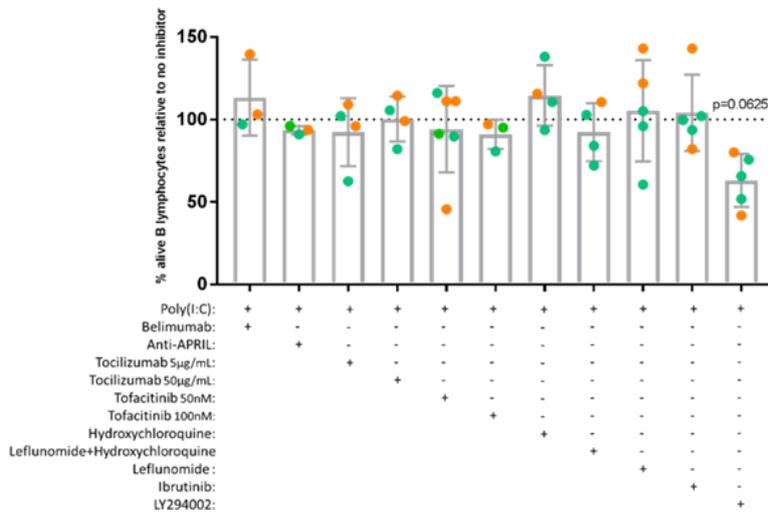


Figure 5 (part 2)

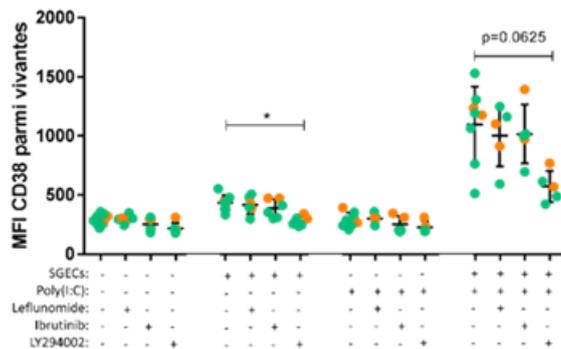
I



J



K



## Supplementary methods:

### RNA sequencing

**Cell isolation:** One to two minor salivary glands (MSGs) were collected in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with antibiotics, sodium pyruvate, nonessential amino acids, and glutamine. Glands were first minced with scissors and enzymatically digested at 37°C under rotating agitation (100 rpm) in DMEM containing 232 U/mL collagenase II (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ) and 8 U/mL DNase I (Sigma, St Louis, MO). After 2 washes in calcium- and magnesium-free PBS containing 1 mmol/L EDTA, cellular aggregates were resuspended in 0.5 mL TrypLE Express Enzyme (Gibco, Carlsbad, CA) and incubated for 2 min at 37°C. Enzyme inactivation was achieved by dilution with 4 mL of DMEM and immediately gentle pipetting with a P1000 to facilitate cell dissociation. The resulting cell suspension was washed twice with medium supplemented with 0.8 U/mL DNase I. Peripheral mononuclear cells were isolated by Ficoll gradient separation.

**Cell sorting:** After isolation, cells were stained with DAPI Pacific Blue (LifeTechnologies) to identify dead cells. After saturation of Fc receptors by incubation with Fcblock (Miltenyi Biotec). CD326 PE+ (Miltenyi Biotec) DAPI- cells [epithelial cells] in salivary gland and CD45+ CD19 PE Cy7+ (Biolegend) DAPI- cells [B lymphocytes], in salivary gland biopsies and in blood were sorted by using a FACS ARIA cell sorter (BD Biosciences). The list of antibodies used is in **Table S1**. Sorted cells were frozen on dry ice and stored at -80°C.

**RNA extraction:** Samples were thawed on ice and RNA extraction was performed according to the manufacturer's instructions (PicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus, Applied Biosystems, Foster City, CA) with the following modifications. Because of low yield of RNA expected for this type of samples, linear acrylamide (Ambion) was diluted in extraction buffer to be spiked-in to a final concentration of 20 ng/μL. RNA quality control was performed on the Agilent 2100 Bioanalyzer with the RNA 6000 Pico Kit (Agilent).

**RNA Sequencing of sorted cells, library Generation and Sequencing methods:** The number of B cells sorted from biopsies difference between pSS ad controls ( $p=0.02$ ). To avoid bias due to this initial difference, we performed RNA-seq with a normalized amount of RNA. An amount of 100pg total RNA was used as input for cDNA preparation by using the SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit (Clontech catalog # 634892). Universal Human Reference RNA (UHRR) was included in the experiment as a positive control, and nuclease-free water was used to dilute the samples as a negative control or non-template control (NTC). Using the concentrations derived from the Ribogreen assay, a normalization plate was made with a final concentration of 10.53 pg/uL per sample. cDNA was prepared according to the manufacturer's instructions, except for the additional spike-in of 1uL diluted ERCC RNA Spike-In Mix (ThermoFisher catalog #4456740) in each sample. After subtracting the averaged concentration of the ERCC spiked NTC from the sample concentration from the Bioanalyzer trace, cDNA samples were normalized to 125pg in 5uL per sample. Library preparation used the Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina catalog # FC-131-1096), and the Nextera XT Index Kit v2 Set A (catalog # FC-131-2001) and Set D (catalog # FC-131-2004), according to the manufacturer's instructions. The High Sensitivity D1000 ScreenTape Assay (Agilent catalog # 5067-5585 and # 5067-5584) was used on the Agilent 4200 TapeStation system to check the libraries for base pair size and molarity. All samples were then pooled to a final concentration of 4nM in an DNA LoBind Microcentrifuge Tubes (Eppendorf catalog # 022431048). The High Sensitivity DNA Assay (Agilent catalog # 5067-4626) was used on the Agilent 2100 Bioanalyzer to analyze the pool, which was then adjusted with Buffer EB (Qiagen catalog # 19086). The 12.5pM denatured library with 1% Phix spike-in was run on the MiSeq with MiSeq Reagent Kit v2 (50 cycles) (Illumina catalog # MS-102-2001), following the manufacturer's instructions. The frequency of identified reads per index was used to adjust individual samples concentration in the pool. The re-adjusted pool was then re-Bioanalyzed and rerun on the MiSeq using the same kit and protocol. The same process of re-adjusting the pool with the new set of MiSeq index data and validation with the Bioanalyzer was performed before running the pool on the Illumina HiSeq 2500 System. The

18pM denatured library with 1% Phix spike-in was clustered on the cBot with the HiSeq PE Cluster Kit v4 (Illumina catalog # PE-401-4001), following Illumina's HiSeq and GAllx Systems Denature and Dilute Libraries Guide, and cBot System Guide, and run on the HiSeq with the HiSeq SBS Kit v4 (Illumina catalog # FC-401-4002), following the HiSeq 2500 System Guide.

Reads were first quality control-filtered and trimmed by using trimmomatic. Paired reads were aligned to the human reference genome (V38.79) by using STAR software (version 2.5.0c). Counting of reads involved use ofHTSeq.

The Interferome v2.01 database was used to identify and characterize interferon (IFN)-induced genes. Functional enrichment analysis of differentially expressed genes was performed for genes with absolute expression fold change  $\geq 1.5$ , by using Ingenuity Pathway Analysis software (Qiagen). Volcano plot representation were performed by using R software and multidimensional scaling representations were generated using the SVD-MDS method.

Data are available upon reasonable request.

**Research of endogenous retrovirus sequences in RNA-seq:** Three separate quantifications were done with three FASTA databases in RNA-seq data from sorted SGECS from pSS and controls and from B lymphocytes sorted from salivary gland and from blood from pSS ad controls:

- one named DB7, compiling endogenous retroviral envelope in humans as described by Vargiu *et al.* (1). The ORFs (open reading frames) of these sequences were extracted from NCBI Gene database using Biopython (2).
- one with all retro-elements annotated by RepeatMasker in the human genome (3)
- one with genes in all viruses present in the ViralZone website (4). Accession numbers of the viruses were extracted from a downloadable table from the website, and ORFs sequenced were extracted by parsing the NCBI gene database for the extracted accession numbers using Biopython.

Then, to perform quantification and differential analysis, Fastq were trimmed using the bbdut tool from the bbtools suite (sourceforge.net/projects/bbmap/ BBMap). Trimmed fastq were quantified using the Salmon tool in the version 0.11.1 (5), using the Bayesian inference method. Quantification was done three times for each fastq, with the three databases above, hence generating three distinct count tables. For each on these tables, differential analysis was performed in R using the DESeq2 library version 1.21 (6) to compare diseased sample against control samples.

### ***PCR validation of the differentially expressed genes***

To confirm the results of RNA-seq on sorted cells, the residual complementary DNA (cDNA) were transferred to a 48.48 Dynamic Array primed chip, and real-time PCR (RT-PCR) was run according to the Fluidigm protocol. The primers tested are in **Table S2**. Data were analyzed by using Fluidigm RT-PCR software. Relative mRNA expression was determined from normalized Ct values by using HPRT1 as housekeeping gene and the  $2^{-\Delta Ct}$  method. To compare means the Mann-Whitney test was applied.

### **Primary cultures of salivary gland epithelial cells (SGECs)**

After 2 to 3 weeks of culture, cells at 70% to 80% confluence were dissociated with 0.125% trypsin-EDTA. Cell suspension was suspended in basal epithelial medium and added at 80 000 cells/cm<sup>2</sup> to a 6-well collagen type I (Institut de Biotechnologies, Reims, France) coated plate and incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere. The basal epithelial medium was changed at day 1 to remove epithelial cells that were not adherent. The epithelial origin of cultured cells was routinely confirmed by staining with monoclonal antibodies against CD326 (Miltenyi Biotec, Paris) an epithelium-specific marker (**Figure S2A**).

### **Positive isolation of B lymphocytes for co-culture experiments**

Peripheral mononuclear cells were isolated from residual blood of apheresis from healthy subjects (French blood donors) by Ficoll gradient separation. B lymphocytes were isolated by CD19 magnetic bead positive selection according to the manufacturer's instructions (CD19 Microbeads human and Fc-Block, Miltenyi Biotec) to achieve a purity of greater than 80% as assessed by FACS analysis (percentage of CD20+ cells).

### **Co-cultures of SGECs and B lymphocytes**

The primary culture of salivary gland biopsy lasted 2 to 3 weeks until we obtained a cell layer. Then we performed only one passage of the SGECs that were harvested by using trypsin and seeded in wells. After 4 days, when cells were 70% confluent in the wells, we added the B cells. The coculture lasted 5 days. B lymphocytes ( $1.5 \times 10^6$  cells) were cultured alone or with SGECs in 2mL RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, and penicillin-streptomycin (1X). Stimuli were added in the medium: IFN $\alpha$  2400 U/mL (Roferon-A, Roche), IFN $\gamma$  5ng/mL (Sigma Aldrich) or poly(I:C) 10 $\mu$ g/mL (Invivogen). After 5 days, B lymphocytes were harvested for immunostaining and flow cytometry. Culture supernatants were collected for cytokine quantification by multiplex assay or ELISA. Schematic representation of co-cultures experimental design is presented in **Figure S1B**.

### **Transwell and inhibition experiments**

Transwell assays were performed with 0.4 $\mu$ m pore sized inserts (Falcon Cell Culture Inserts, 6-well plates). B lymphocytes were placed in the upper chamber, and confluent SGECs in the lower in 4 mL of RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, and penicillin-streptomycin (1X). Poly(I:C) at 10  $\mu$ g/mL (Invivogen) was added in the medium. After 5 days, B lymphocytes were harvested for immunostaining and flow cytometry. Several co-cultures were dedicated to inhibition experiments. Inhibitors or their control were added in the co-culture at day 0: belimumab (GSK)

10µg/mL or IgIV at the same concentration as control, tofacitinib (Pfizer) 50 or 100nM or DMSO at the same concentration as control, anti-APRIL (kindly provided by P. Schneider) or anti-EDA at the same concentration as control, tocilizumab (Roche) 5 or 50 µg/mL or IgIV at the higher concentration as control, ibrutinib (Selleckchem) 1µM, LY294002 (Selleckchem) 20µM, leflunomide (Selleckchem)100µM, hydroxychloroquine (Selleckchem) 10µM or DMSO at the same concentration as control. Concentrations of inhibitors were defined according to manufacturers recommendations or, when not available, were based on the serum levels measured in patients.

### **FACS analysis**

To assess viability of B lymphocytes cultured alone or co-cultured with SGECs in the different conditions of stimulation, B lymphocytes were harvested and stained with Fixable viability Dye APC Vio770 (LifeTechnologies, Paisley, UK). Viability was assessed as the percentage of live B lymphocytes out of all events. The activation of B lymphocytes was assessed by CD38 + B lymphocytes percentage and CD38 MFI. CD27, IgD, CD40 and CD48 were also assessed in B lymphocytes. Then, after two PBS washing, adherent SGECs were harvested after dissociation with 0.125% trypsin-EDTA and stained with anti-BAFFR antibody. The list of the antibodies used in experiments is in **Table S1**. Samples were analyzed by using a BD FACS Canto flow cytometer and BD FACS Diva Software (BD, Becton Dickinson, Germany). The results were analyzed with FlowJo10 software. The percentage of alive cells was determined as the percentage of unstained cells with the Fixable viability Dye marker. The other percentages of positive cells were determined by comparison with the negative isotypic control. The gating strategy is presented in **Figure S2B**.

### **Cytokine assays**

Cell-free supernatants were collected and assayed for IgG and Ig M production by enzyme-linked

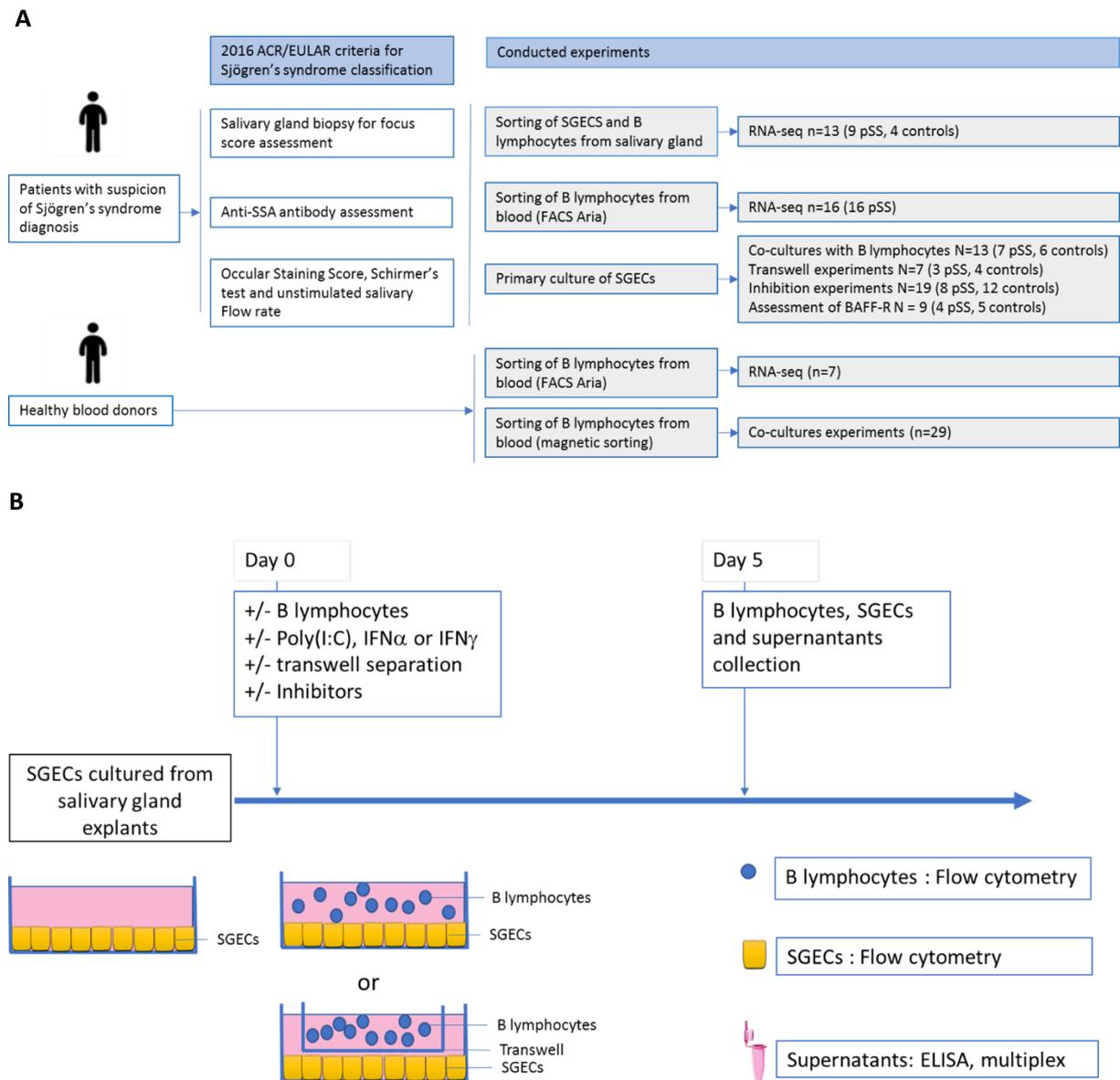
immunosorbent assay (ELISA) (IgG total uncoated ELISA and IgM uncoated ELISA, Life Technologies). The dosage of cytokines and chemokines (BAFF, APRIL, IL-6, CXCL10, CXCL12 and CXCL13) was performed using a multiplex assay (Thermo Fisher Scientific). BAFF and CCL28 levels were assessed by ELISA (R&D system and Thermo Fisher Scientific, respectively).

Anti-Ro/SSA antibodies were assessed by using the ALBIA method (Addressable laser bead immunoassay) with Bioplex 2200 (Biorad). The confirmation was performed by immunodot (Euroimmun Ana3b).

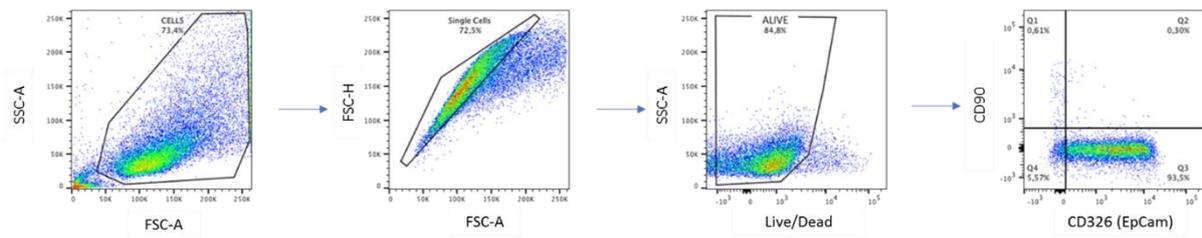
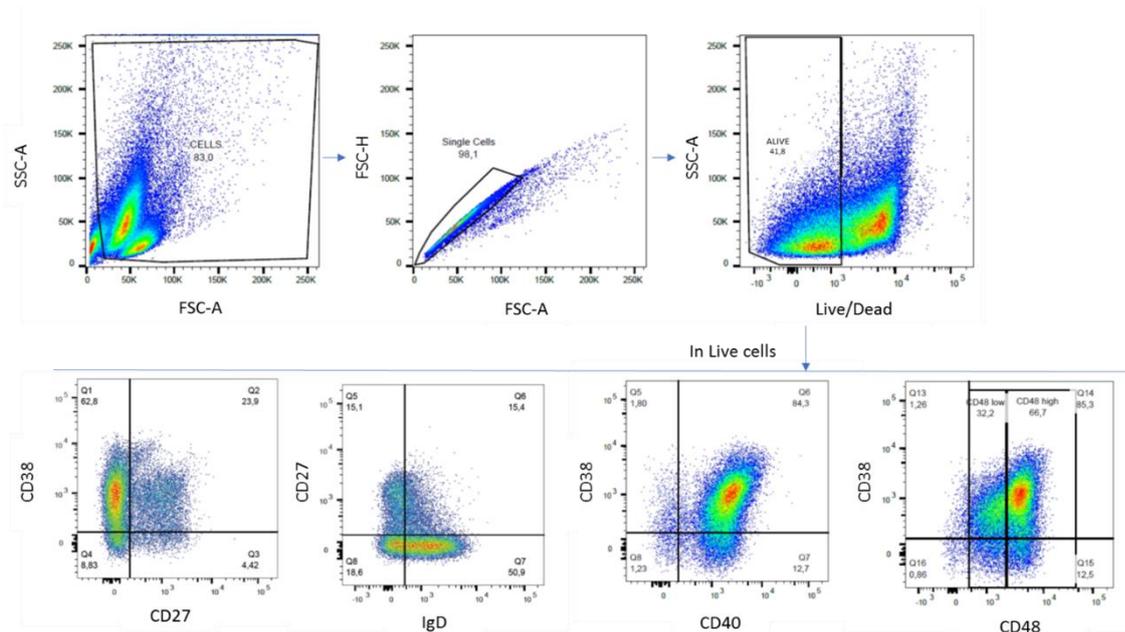
#### **Supplementary References:**

1. Vargiu L, Rodriguez-Tomé P, Sperber GO, et al. Classification and characterization of human endogenous retroviruses; mosaic forms are common. *Retrovirology*. 2016 22;13:7
2. Cock PJ, Antao T, Chang JT, et al. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics*. 2009 1;25(11):1422-3
3. Smit AFA, Hubley R, Green P (1996–2013). RepeatMasker Open-4.0. URL <http://www.repeatmasker.org>. Last accessed: August 2013.
4. Hulo C, de Castro E, Masson P, et al. ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Res*. 2011 Jan;39(Database issue):D576-82.
5. Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods*. 2017;14(4):417-419.
6. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550

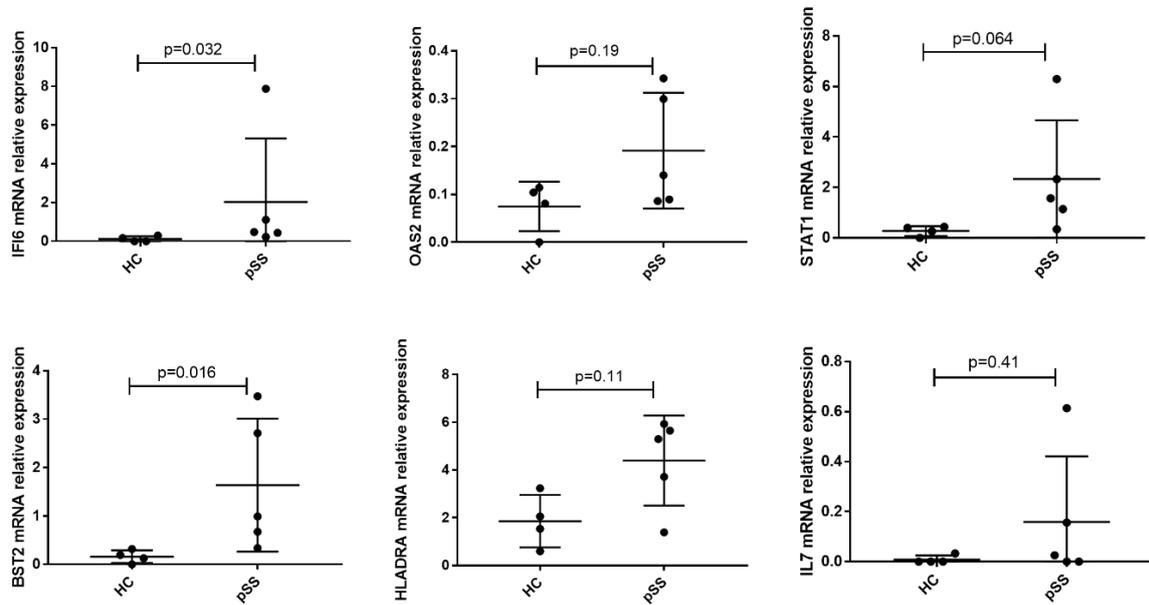
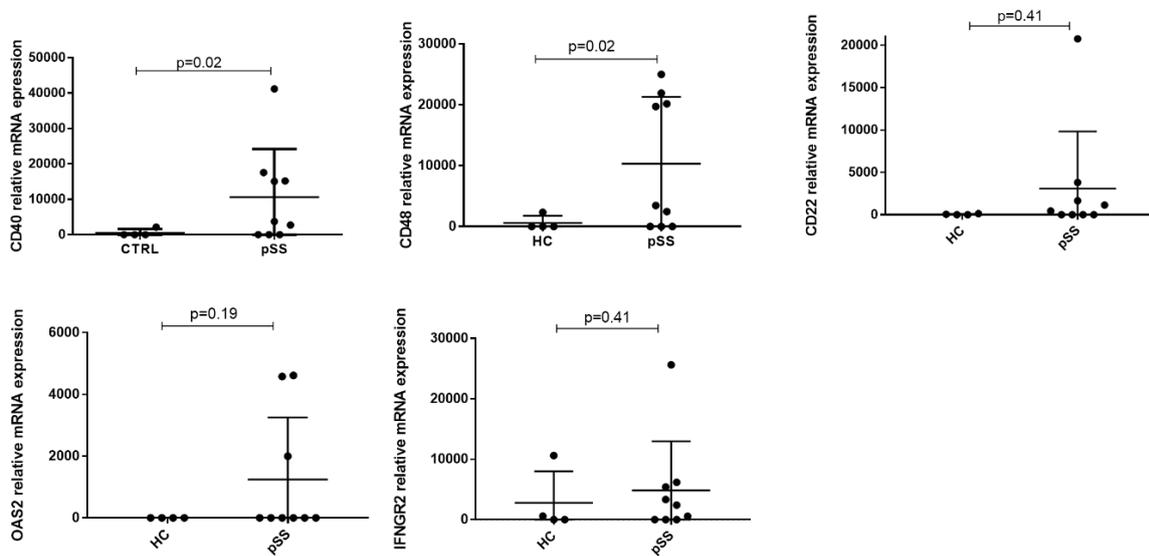
## Supplementary figures:



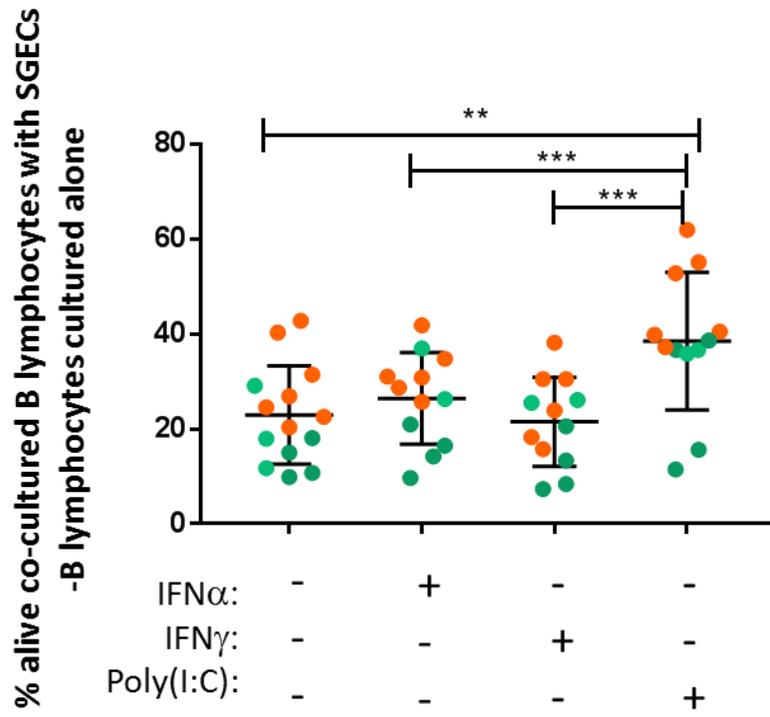
**Figure S1: A:** Experimental design of the study. SGECs, B lymphocytes sorted from biopsies and pSS B lymphocytes sorted from blood used for RNA-seq experiments as well as SGECs used for co-culture experiments were obtained from patients with suspected pSS. pSS was diagnosed according to 2016 EULAR/ACR criteria, and controls presented sicca symptoms without anti-SSA/SSB antibodies and had normal or sub-normal salivary glands. Control B lymphocytes sorted from blood used for RNA-seq experiments and B lymphocytes used for co-cultures, transwell and inhibition experiments were sorted from healthy blood-donors PBMCs. **B:** Schematic representation of co-culture experiments of SGECs and B lymphocytes.

**A****B**

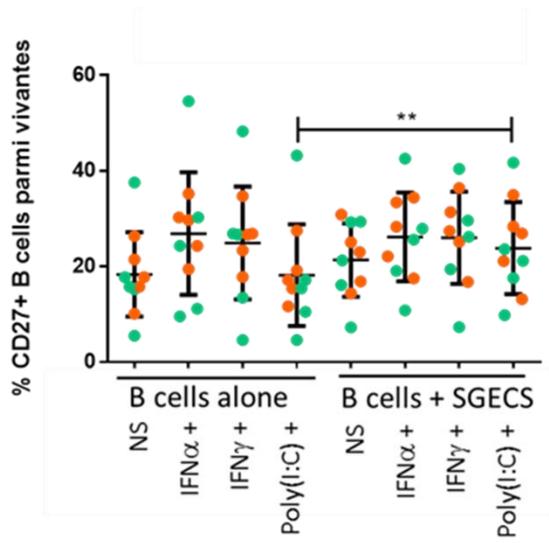
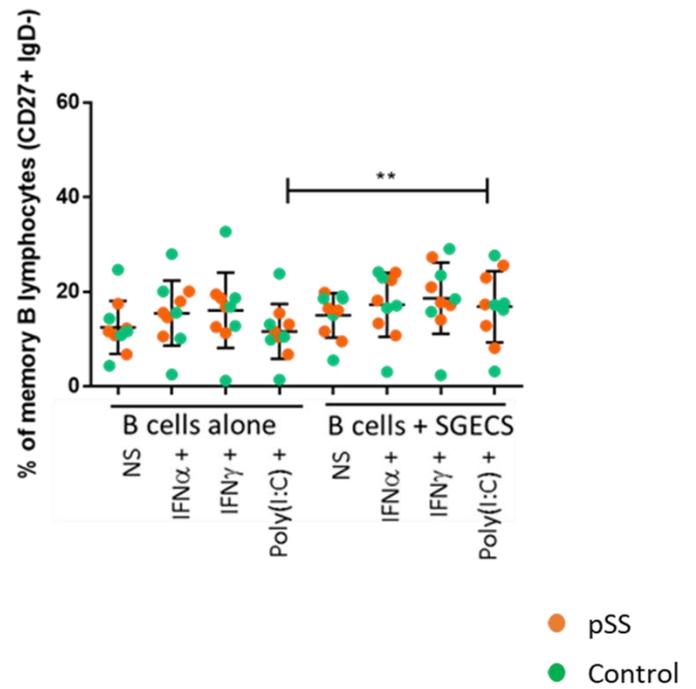
**Figure S2: A:** Gating strategy used to phenotype SGECs. CD326 and CD90 expression on SGECs after 2 weeks of primary culture. **B:** Gating strategy used to phenotype/co-cultured B lymphocytes. Percentages of CD38, CD27, IgD, CD40 and CD48 B lymphocytes were determined among alive B cells. MFI was determined with the same strategy.

**A****SGECs sorted from biopsy****B****B cells from biopsy**

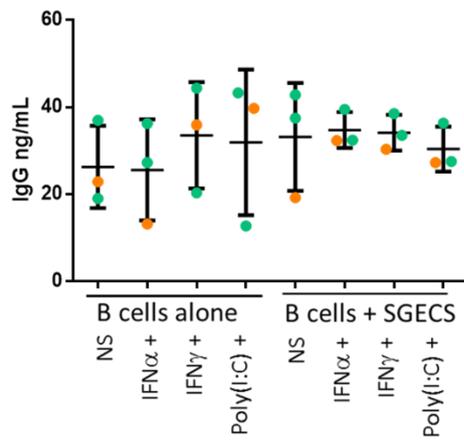
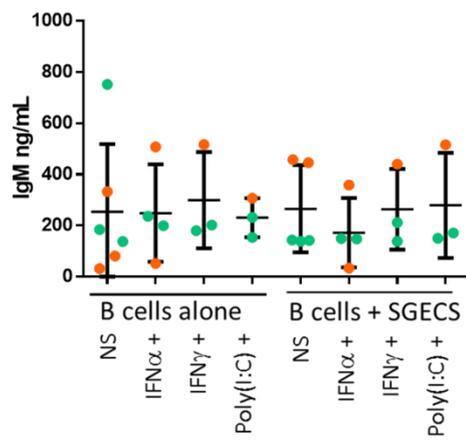
**Figure S3: A:** Validation of the RNA-seq results by RT-PCR. Relative mRNA expression of *IFI6*, *OAS2*, *STAT1*, *BST2*, *HLA DRA* and *IL7* in SGECs. **B:** Relative mRNA expression of *CD40*, *CD48*, *CD22*, *OAS2*, and *IFNGR2* in B lymphocytes sorted from salivary gland biopsy. To compare groups the Mann-Whitney test was applied.



**Figure S4:** Difference between the proportion of alive B lymphocytes on co-culture with SGECs and alive B lymphocytes cultured alone on day 5 stimulated with IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  or poly(I:C). \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

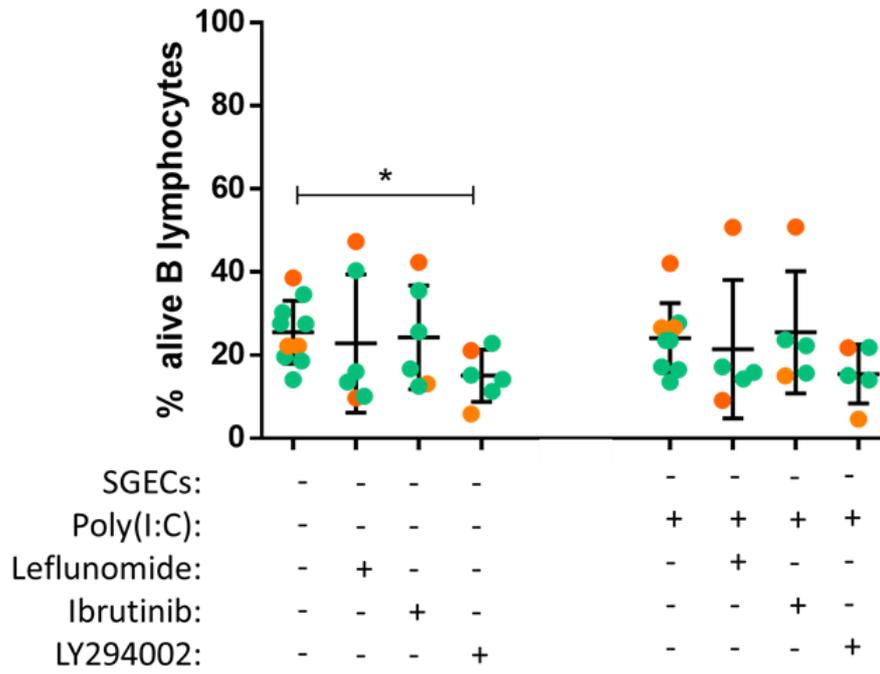
**A****B**

**Figure S5: A:** Percentage of memory B lymphocytes (CD27+) on day 5 under all conditions of culture and stimulation. **B:** Percentage of switched memory B lymphocytes (CD27+ IgD-) on day 5 under all conditions of culture and stimulation. \*\*p<0.01

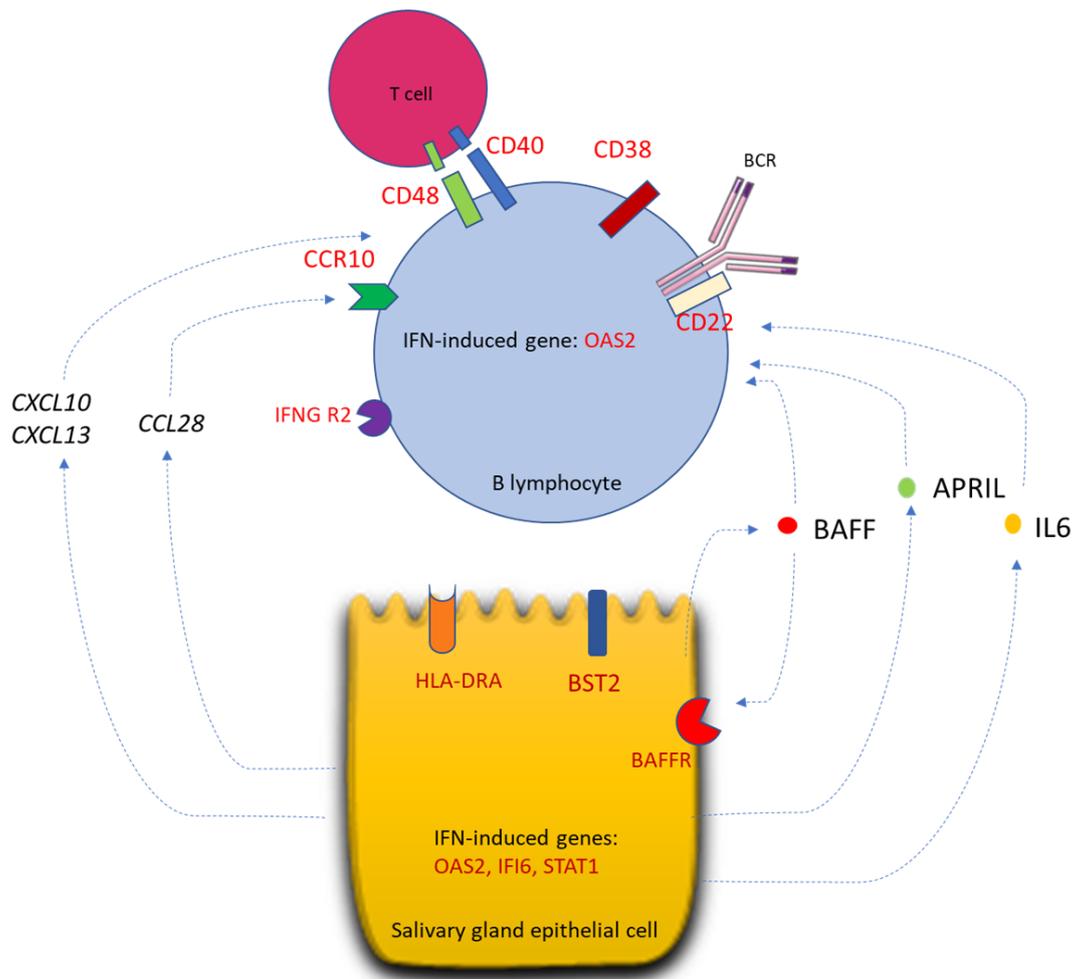
**A****B**

● pSS  
● Control

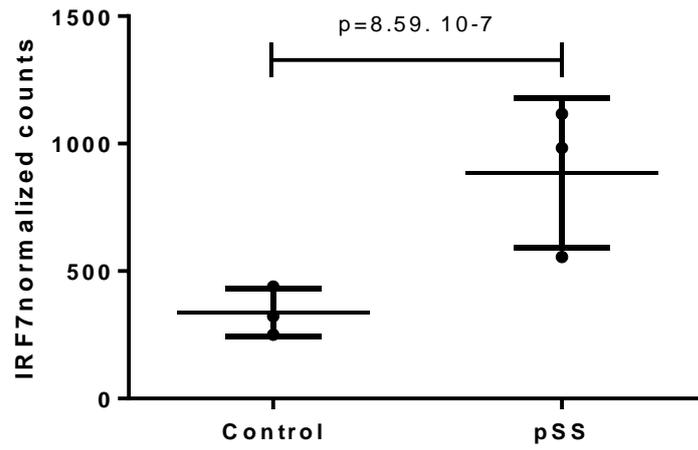
**Figure S6:** Level of IgG (A) and IgM (B) in supernatant of B lymphocytes cultured alone and co-cultured with SGECs for 5 days.



**Figure S7** : Percentage of alive B lymphocytes cultured alone after 5 days in the presence of leflunomide, ibrutinib (BTK inhibitor) or LY294002 (PI3K inhibitor). \*  $p < 0.05$ .



**Figure S8: Figure 8: Schematic representation of hypothesis for mechanisms of interaction between SGECs and B lymphocytes.** Summary of the genes and pathways that were highlighted by transcriptome analysis (CD40, CD48, CD22, CCR10, IFNGR2 and OAS2 for B cells ; HLA-DRA, BST2, BAFFR, OAS2, IFI6, STAT1 for SGECs) or flow cytometry (CD38, CD48 for B cells ; BAFFR for SGECs) or measured in SGEC supernatant (CXCL10, CXCL13, CCL28, APRIL, IL6 and BAFF after poly(I:C) simulation). SGECs secrete cytokines and chemokines potentially involved in B-lymphocytes activation or homing.



**Figure S9:** Normalized counts of IRF7 in B lymphocytes sorted from blood from 3 controls and 3 pSS patients from Jin-Lei Sun *et al.* RNAseq dataset

**Supplementary tables:**

**Table S1: List of antibodies used for FACS experiments on co-cultured cells**

ANTIBODY	CONJUGATED FLUOROCHROME	CLONE	TYPE OF ANTIBODY	SOURCE
<b>Sorting of SGEs and B lymphocytes from salivary gland biopsies</b>				
496-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)	Pacific Blue			Life Technologies
CD45	APC Vio770	HI30	mouse, monoclonal	BioLegend
CD19	PE Cy7	HIB19	mouse, monoclonal	BioLegend
CD326	PE	HEA-125	mouse, monoclonal	Miltenyi Biotec
<b>Co-culture experiments</b>				
Fixable viability Dye	APC Vio770			LifeTechnologies
anti-CD20	PerCpVio700	REA780	recombinant human IgG1	Miltenyi Biotec
anti-CD38	APC	REA572	recombinant human IgG1	Miltenyi Biotec
anti-CD27	PE	REA499	recombinant human IgG1	Miltenyi Biotec
anti-IgD	PEVio770	REA740	recombinant human IgG1	Miltenyi Biotec
anti-CD40	PE	REA733	recombinant human IgG1	Miltenyi Biotec
anti-CD48	PEVio770	REA426	recombinant human IgG1	Miltenyi Biotec
anti-CD326	PE	REA764	recombinant human IgG1	Miltenyi Biotec
anti-HLA-DR	FITC	REA805	recombinant human IgG1	Miltenyi Biotec
anti-BST2	APC	REA202	recombinant human IgG1	Miltenyi Biotec
anti-BAFFR	PEVio770	REA1115	recombinant human IgG1	Miltenyi Biotec
REA-control	PerCpVio700	REA293	recombinant human IgG1	Miltenyi Biotec
REA-control	APC	REA293	recombinant human IgG1	Miltenyi Biotec
REA-control	PE	REA293	recombinant human IgG1	Miltenyi Biotec
REA-control	PEVio770	REA293	recombinant human IgG1	Miltenyi Biotec
REA-control	FITC	REA293	recombinant human IgG1	Miltenyi Biotec

**Table S2: List of primers used for RT-PCR validation of RNA-seq results with Biomark technology purchased from Fluidigm**

Target	Assay Name	Forward Primer	Reverse Primer	Design RefSeq
<b>BST2</b>	BST2_90198_i2	ACATTAAACCATAAGCTTCAGGAC	GCGATTCTCACGCTTAAGAC	NM_004335.N
<b>CCL28</b>	CCL28_90212_i1	GAGCTGATGGGGATTGTGAC	TTGGCAGCTTGCACCTTCA	NM_001301875.N
<b>CCR10</b>	CCR10_90205_i0	GGACGGAGGCCACAGA	AGTGGCTCAGCCGAGTAT	NM_016602.N
<b>CD22</b>	CD22_59645_i9	CTGCCTCGCCATCCTCA	TGGCTGTGTCTCTTCC	NM_001771.3
<b>CD40</b>	CD40_55716_i2	ACTGCCACCAGCACAATAC	TACAGTGCCAGCCTTCTCA	NM_152854.2
<b>CD48</b>	CD48_86944_i0	ATTCGTGTCTGGCTCTGGAA	CGGAGACCACGGTCATATGTA	NM_001256030.N
<b>PKR/EIF2AK2</b>	EIF2AK2_90200_i13	GCGAACAAGGAGTAAGGGAA	AGAGGTCCACTTCTTTCCA	NM_002759.N
<b>HLA-DRA</b>	HLA-DRA_54516_i0	CGCTCAGGAATCATGGGCTA	CGCCTGATTGGTCAGGATTCA	NM_019111.4
<b>HPRT1</b>	HPRT1_5093_i5	GCTTTCCTTGGTCAGGCAGTA	ACTTCGTGGGGTCTTTTCCAC	NM_000194.2
<b>IFI16</b>	IFI16_26848_i8	GTGAATGGGGTGTGAGGTAC	CACCACTTCCATCTCCCTGTA	NM_005531.2
<b>IFI6</b>	IFI6_90203_i1	TGCTACCTGCTGCTTCA	TCAGGGCCTCCAGAACC	NM_022873.N
<b>IFNGR2</b>	IFNGR2_87575_i2	GTGGCCCTGAGCAATAGCA	TGTCGGCCGTAACCATTTA	NM_001329128.N
<b>IL6</b>	IL6_12521_i3	AGAGCTGTGCAGATGAGTACAA	GTTGGGTCAAGGGTGGTTA	NM_000600.3
<b>IL7</b>	IL7_60520_i1	ATTGAAGGTAAGATGGCAAACA	TCATTATTCAGGCAATTGCTACC	NM_000880.3
<b>IRF7</b>	IRF7_25580_i5	GGCAGAGCCGTACCTGTCA	ACCGTGCGGCCCTTGTGA	NM_004031.2
<b>OAS2</b>	OAS2_83324_i0	TGGTGAACACCATCTGTGAC	CCATCGGAGTTGCCTCTTAA	NM_001032731.N
<b>SDC1 (CD138)</b>	SDC1_90204_i2	AAGATGGCTCTGGGGATGAC	GAGCTGCGTGTCTTCCA	NM_001006946.N
<b>STAT1</b>	STAT1_56036_i14	ATGCTGGCACCAGAACGAA	GCTGGCACAATTGGGTTTCAA	NM_007315.3
<b>TLR7</b>	TLR7_67595_i1	TCTTCAACCAGACCTCTACATCC	AGCCCAAGGAGTTTGGAAA	NM_016562.3
<b>TNFRSF13C (BAFFR)</b>	TNFRSF13C_90207_i1	CCCCGACGGAGACAAG	CTGTGGCATCAGAGATTCCC	NM_052945.N
<b>TNFRSF11A (RANK)</b>	TNFRSF11A_90208_i1	TGGGACGGTGTGTAACAAA	CAGGGCAGACATACACTGTCA	NM_003839.N

**Table S3: Pathways over-represented in salivary gland epithelial cells (SGECs) sorted from salivary glands and B lymphocytes sorted from blood, analysis performed with Ingenuity pathway analysis software**

Pathway	-log p-value	Genes
<i>SGECs sorted from salivary gland</i>		
Primary Immunodeficiency Signaling	4.08	<i>PTPRC, BTK, IGHG1, CD8A, TAP1, TNFRSF13C</i>
Interferon Signaling	3.52	<i>IFIT3, OAS1, IFI6, STAT1, TAP1</i>
B Cell Development	2.89	<i>PTPRC, HLA-DRA, CD86, IL7</i>
Role of JAK2 in Hormone-like Cytokine Signaling	2.73	<i>STAT5A, IRS1, SH2B3, STAT1</i>
IL7 Signaling Pathway	2.51	<i>STAT5A, SLC2A1, IRS1, IGHG1, STAT1, IL7</i>
<i>B lymphocytes sorted from blood</i>		
EIF2 Signaling	8,6	<i>PIK3CA,RPLP1,RPL3,RPS23,RPLP2,EIF4G3,EIF4G1,RPL28,PPP1CC,RPL8,EIF4G2,RPL13,UBA52,PIK3C3,RPS9,RPL10,RPS25,RPS2,EIF2AK2,RPS3,RPS12,RPL18,RPL13A,RPL41,RPLP0,RPS14</i>
Interferon Signaling	7,02	<i>IFIT3,OAS1,MX1,TYK2,IFI6,IFI35,STAT2,IFNAR2,STAT1,IFITM1</i>
Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses	4,24	<i>IFIH1,PIK3CA,IRF7,OAS1,OAS2,TICAM1,PIK3C3,TLR7,MAVS,PRKCH,NFKB2,IL6,CCL5,EIF2AK2</i>
Activation of IRF by Cytosolic Pattern Recognition Receptors	3,98	<i>IFIH1,IRF7,MAVS,IKBKE,STAT2,IL6,NFKB2,ADAR,STAT1</i>
mTOR Signaling	3,35	<i>PIK3CA,RPS23,VEGFB,EIF4G3,EIF4G1,RHOG,EIF4G2,PIK3C3,RPS9,RPS6KB2,RPS25,PRKCH,RPS2,RPS12,RPS3,RPS14</i>
Role of JAK1, JAK2 and TYK2 in Interferon Signaling	3,13	<i>TYK2,STAT2,NFKB2,IFNAR2,STAT1</i>

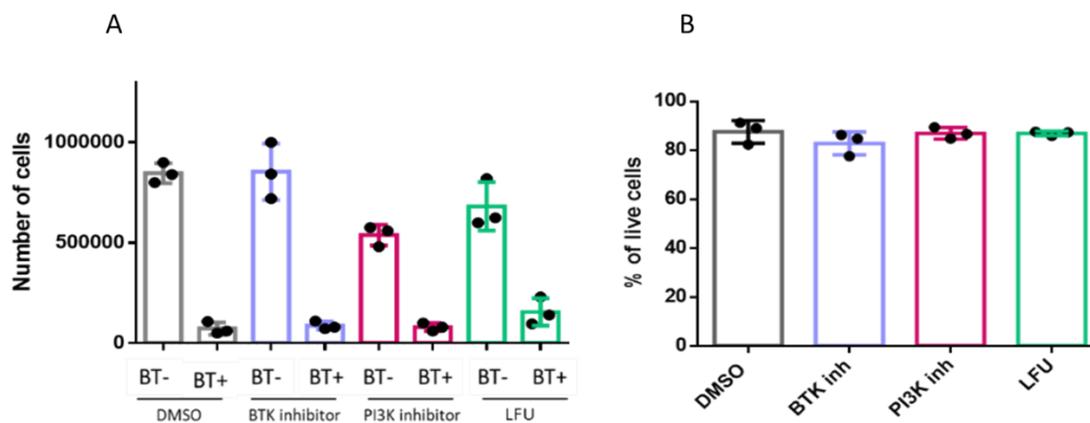
**Table S4: Fold change and p-value for differential gene expression between pSS patients and controls in SGEs and B lymphocytes sorted from salivary gland biopsies and from blood.**

<b>Gene Symbol</b>	<b>Gene ID</b>	<b>log2 fold-change</b>	<b>p-value</b>
<b>SGECs from salivary gland</b>			
<i>HLA-DRA</i>	ENSG00000204287	1.84	0.04
<i>IFI6</i>	ENSG00000126709	4.32	2.7 10 <sup>-5</sup>
<i>STAT1</i>	ENSG00000115415	2.13	0.02
<i>BST2</i>	ENSG00000130303	4.08	<0.01
<i>BAFFR</i>	ENSG00000159958	4.94	0.01
<i>IL7</i>	ENSG00000104432	2.56	<0.01
<i>OAS2</i>	ENSG00000111335	2.18	<0.01
<b>B lymphocytes from salivary gland</b>			
<i>CD48</i>	ENSG00000117091	2.59	0.01
<i>CD22</i>	ENSG00000012124	2.29	.048
<i>CD40</i>	ENSG00000101017	2.64	0.02
<i>IFNGR2</i>	ENSG00000159128	2.28	0.03
<i>OAS2</i>	ENSG00000111335	2.91	0.04
<b>B lymphocytes from salivary gland</b>			
<i>TLR7</i>	ENSG00000196664	1.40	<0.01
<i>IRF7</i>	ENSG00000185507	0.76	0.04
<i>IL6</i>	ENSG00000136244	1.54	<0.01
<b>Salivary gland vs blood B lymphocytes in pSS</b>			
<i>CD138</i>	ENSG00000115884	6.92	9.6 10 <sup>-5</sup>
<i>IL6</i>	ENSG00000136244	3.05	<0.01
<i>CCR10</i>	ENSG00000184451	2,73	<0.01
<i>RANK</i>	ENSG00000141655	6.14	3.7 10 <sup>-5</sup>

## Résultats complémentaires :

### Résultats complémentaires 1 : Etude de la viabilité des CES co-cultivées avec les LB en présence ou absence de BTK inhibiteur, PI3K inhibiteur et leflunomide.

L'ajout d'inhibiteurs dans la co-culture entre CES et LB a permis de montrer que le leflunomide, l'inhibiteur de BTK et l'inhibiteur de PI3K diminuaient la survie des LB. Cet effet peut être dû soit à un effet direct de ces drogues sur les LB, soit à un effet sur les CES, soit à un effet combiné sur ces deux acteurs. Pour avancer dans la réponse à cette question, nous avons mené des expériences complémentaires en ajoutant ces différents inhibiteurs sur les CES, en l'absence de LB et avons évalué la survie des CES. Les résultats de ces expériences sont présentés sur la **Figure 11**.

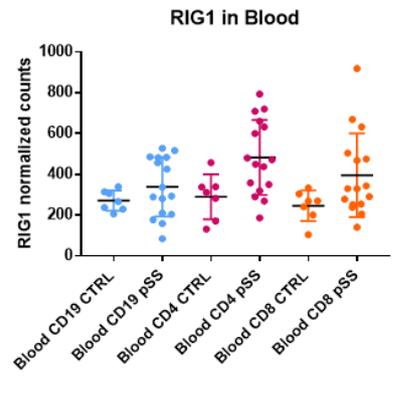
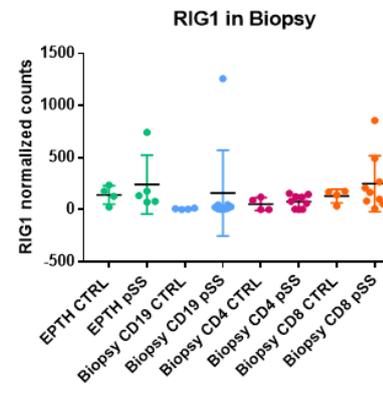
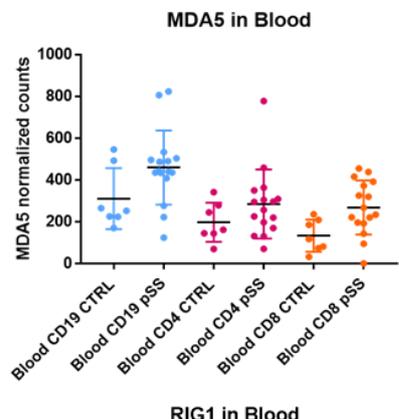
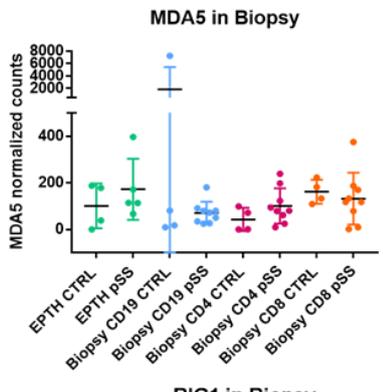
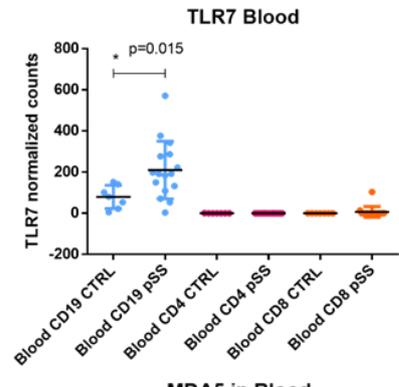
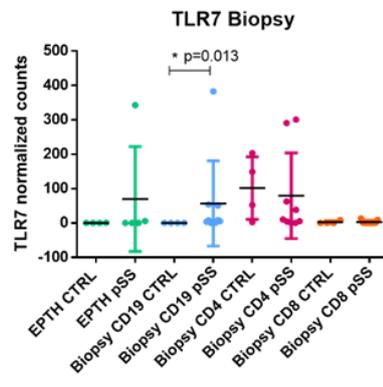
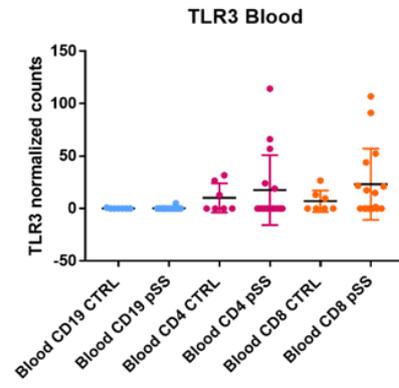
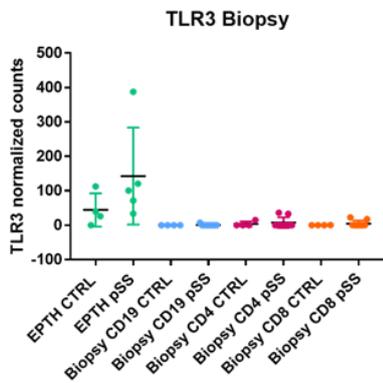


**Figure 1: Viabilité des CES en présence d'inhibiteurs de BTK, d'inhibiteur de PI3K et de leflunomide**

**A :** Comptage des cellules épithéliales vivantes (bleu trypan -) et mortes (bleu trypan +) cultivées pendant 5 jours en présence ou non d'inhibiteur. **B :** Pourcentage de cellules vivantes en cytométrie de flux (marquage Live/Dead) après 5 jours de culture en présence ou non d'inhibiteur.

L'inhibiteur de BTK n'avait aucun effet sur la viabilité des CES par rapport à la condition contrôle. Il existait une diminution non significative du nombre de CES vivantes dans les conditions en présence d'inhibiteur de PI3K et leflunomide. L'analyse en cytométrie de flux ne montrait pas de différence de viabilité des CES à J5 entre les différentes conditions d'inhibition. Ces résultats suggèrent que l'effet de ces trois inhibiteurs serait principalement dû à un effet direct sur les LB.

Résultats complémentaires 2 :



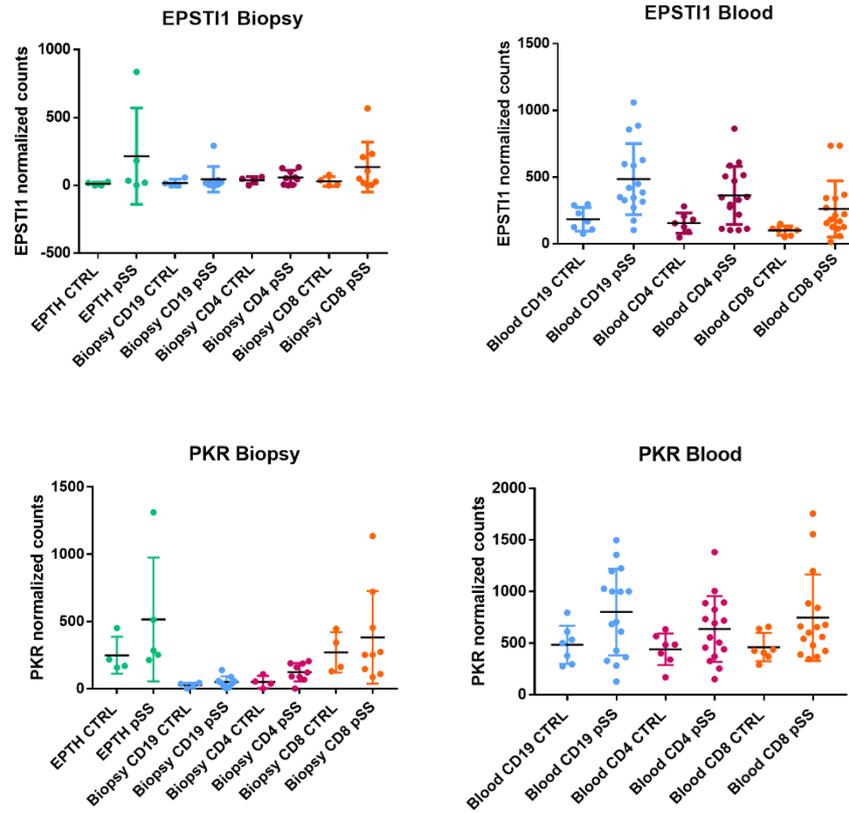


Figure 2: : Expression normalisée des gènes TLR3, TLR7, MDA5, RIG1, EPSTI1 et PKR dans les cellules triées à partir de biopsies de glandes salivaires et du sang de patient pSS et de sujets contrôles.

### C.1.2. Principaux messages

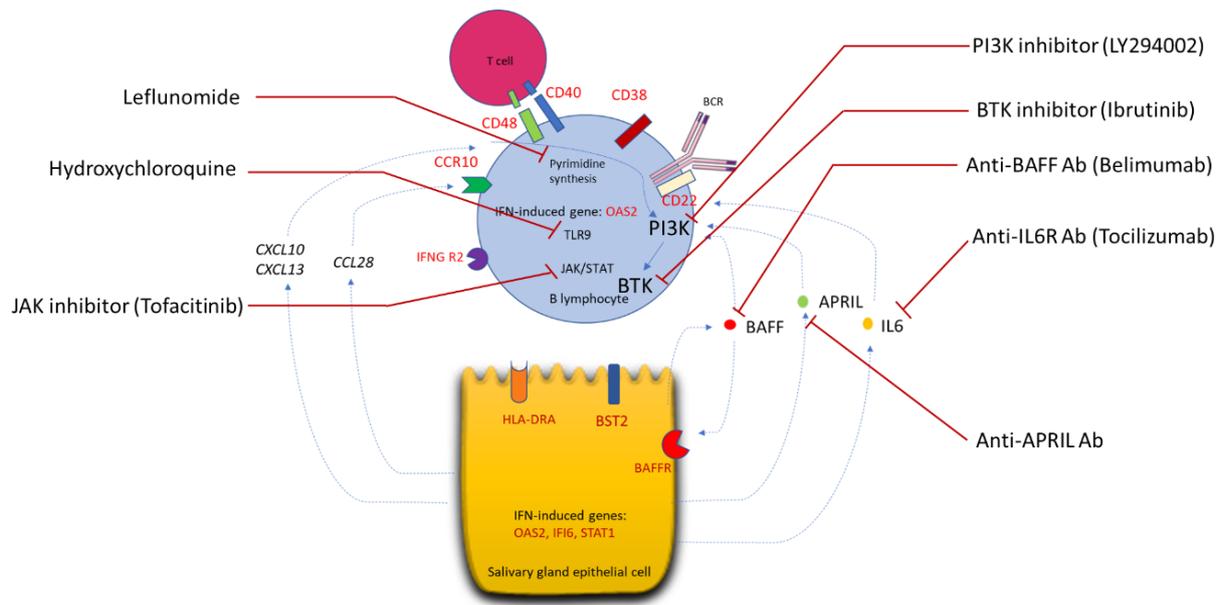
1. L'analyse transcriptomique en RNA-seq des CES et les LB triés à partir des glandes salivaires et du sang de patients SSp et de sujets contrôles a constitué la première partie de ce travail et a permis d'identifier des voies de signalisation et des molécules potentiellement impliquées dans les interactions entre ces deux types cellulaires.

Nous retenons, par exemple, la présence d'une signature IFN dans les CES de patients SSp. De même, une signature IFN a été mise en évidence dans les LB circulants de patients SSp par rapport aux sujets contrôles. Dans les LB triés à partir des biopsies de glandes salivaires, il existe une surexpression de gènes impliqués dans l'activation lymphocytaire B (CD40, CD48). Enfin, la comparaison entre LB triés à partir du tissu et du sang met en évidence l'expression de CCR10 (récepteur de CCL28) surexprimé par les LB tissulaires par rapport aux LB sanguins.

2. Les expériences de co-culture ont permis de montrer que les CES induisent la survie et l'activation des LB. L'effet d'induction de survie est plus important pour les CES issues de patient SSp par rapport aux sujets contrôles. Concernant l'induction d'activation des LB, elle est plus importante pour les CES de SSp comparées aux sujets contrôles dans la condition stimulée par poly(I:C). Ce résultat suggère une plus grande sensibilité des CES de patients SSp à la stimulation TLR, plus encore qu'à la stimulation IFN.

3. L'induction de survie des LB par les CES passe principalement par la sécrétion de facteurs solubles comme montré par les analyses en transwell. En revanche, une partie de l'effet supplémentaire induit par la stimulation par poly(I:C) nécessite des contacts cellule-cellule. Le gain de survie et d'activation (CD38 en MFI, CD48 en pourcentage et MFI) est en effet perdu lorsque les cellules sont séparées par un transwell.

4. L'inhibition sélective de facteurs tels que BAFF, APRIL ou IL6 n'a pas permis d'inhiber l'effet des CES sur la survie des LB. En revanche, des inhibiteurs tels que le leflunomide, les inhibiteurs de BTK et de PI3K, agissant directement sur le métabolisme cellulaire, en aval des récepteurs, permettent de diminuer la survie des LB. Ce résultat suggère que le dialogue entre CES et LB n'est pas dépendant d'une seule molécule mais est le résultat d'une cascade d'activation du système immunitaire. Ce résultat a des conséquences thérapeutiques potentielles importantes, soulignant que des stratégies de mono-inhibition ne sont probablement pas suffisantes pour contrôler la maladie.



**Figure 3: Représentation schématique des différentes cibles visées au cours des expériences d'inhibition.**

## C.II. Article 2: “The Interleukin7/Interferon axis drives T cell and salivary gland epithelial cell interactions in Sjögren’s syndrome”.

### C.II.1. Contexte de l’étude

Après avoir décrit les interactions entre CES et LB, nous avons choisi de nous intéresser à d’autres acteurs majeurs également présents au sein des glandes : les LT. Les LT pourraient avoir un rôle pathogène au cours du SSp notamment en induisant l’activation de LB auto-réactifs. L’une des cytokines majeures pour le maintien de l’homéostasie lymphocytaire T est l’IL7. De façon intéressante, nous avons pu montrer dans l’analyse en RNA-seq de CES triées, précédemment présentée, une sur-représentation de la voie de signalisation de l’IL7 ainsi qu’une surexpression du gène de l’IL7. De plus, certains auteurs ont montré que l’expression d’IL7 était augmentée dans les glandes salivaires de patients SSp (127).

Ainsi, nous avons fait l’hypothèse que les CES pourraient stimuler les LT *via* la sécrétion d’IL7, qui, à leur tour, pourraient participer à l’hyperactivation immunitaire au sein des glandes salivaires des patients.

## Manuscrit 2:

### **Interleukin7/Interferon axis drives T-cell and salivary gland epithelial cell interactions in Sjögren's syndrome.**

Elodie Rivière, MD<sup>1,2\*</sup>, Juliette Pascaud, BSc<sup>1\*</sup>, Alexandre Virone, MD<sup>1</sup>, Anastasia Dupré, MD<sup>1</sup>, Bineta Ly, BSc<sup>1</sup>, Audrey Paoletti, PhD<sup>1</sup>, Raphaële Seror, MD, PhD<sup>1</sup>, Nicolas Tchitchek, PhD<sup>1</sup>, Michael Mingueneau, PhD<sup>3</sup>, Nikaïa Smith, PhD<sup>4</sup>, Darragh Duffy, PhD<sup>4</sup>, Lydie Cassard, BSc<sup>5</sup>, Nathalie Chaput, PhD<sup>5</sup>, Sabrina Pengam, BSc<sup>6</sup>, Vanessa Gauttier, PhD<sup>6</sup>, Nicolas Poirier, PhD<sup>6</sup>, Xavier Mariette, MD, PhD<sup>1\*\*</sup>, Gaetane Nocturne, MD, PhD<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>Université Paris-Saclay, INSERM, CEA, Centre de recherche en Immunologie des infections virales et des maladies auto-immunes; AP-HP. Université Paris-Saclay, Hôpital Bicêtre, Rheumatology department, 94270, Le Kremlin Bicêtre, France, <sup>2</sup>Arthritis R&D, France, <sup>3</sup>Immunology Research, Biogen, Cambridge, United States, <sup>4</sup>Immunobiology of Dendritic Cells laboratory, INSERM U1223/Institut Pasteur, Paris, France, <sup>5</sup>Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, Inserm, CNRS, Analyse moléculaire, modélisation et imagerie de la maladie cancéreuse, Laboratoire d'Immunomonitoring en Oncologie, F-94805, Villejuif, France, <sup>6</sup>OSE Immuno-therapeutics, Nantes, France.

\*the 2 junior authors have equally participated to the work

\*\* the 2 senior authors have equally participated to the work

**Corresponding author:** Dr Gaetane Nocturne, Department of Rheumatology, Université Paris-Sud, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, INSERM U1184, 78 rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin Bicêtre, France, phone: +33 1 45 21 37 58, fax : +33 1 45 21 37 57, e-mail : gaetane.nocturne@aphp.fr

**Financial support:** This study was supported by the Labex in Research on Medication and Therapeutic Innovation (LERMIT) (ANR10), the Fondation pour la Recherche Médicale DEQ20150934719 and an unrestricted grant (UPSud/SAIC N 97731) from Biogen to Université Paris-Sud. E.R. is the recipient of a

PhD fellowship from Arthritis Fondation Courtin, Arthritis R&D (CIFRE 2016/1406). The Laboratoire d'Immunomonitoring en Oncologie is supported by SIRIC SOCRATE 2.0 (INCa-DGOS-INSERM\_12551).

**Disclosure of potential conflict of interest:** M. M. is employed by Biogen. V.G. and N.P. are employed by OSE Immuno-therapeutics, a company owning IL7R antagonists. XM received honorarium from Servier. XM received research grants from OSE Immuno-therapeutics and from Servier.

**Number of words:** 4208

## ABSTRACT

**Objective:** Primary Sjögren's syndrome (pSS) is characterized by a lymphocytic infiltration of salivary glands and the presence of an interferon (IFN) signature. Salivary gland epithelial cells (SGECs) play an active role in pSS pathophysiology. The aim of this work was to study the interactions between SGECs and T cells in pSS and the role of IL7/IFN axis.

**Methods:** Primary cultured SGECs from pSS and controls were stimulated with Poly(I:C), IFN $\alpha$  or IFN $\gamma$ . T cells were sorted from blood and stimulated with IL7. CD25 expression was assessed by flow cytometry. Salivary gland explants were cultured for 4 days with anti-IL7R antagonist antibody (OSE-127) and transcriptomic analysis was performed using nanostring.

**Results:** IL7 serum levels were increased in pSS patients compared to controls and were associated with B-cell biomarkers. There was a decrease of IL7R expression on T cells from pSS compared to controls. SGECs stimulated with Poly(I:C), IFN $\alpha$ , or IFN $\gamma$  secreted IL7. IL7 stimulation increased activation of T cells, as well as IFN $\gamma$  secretion. Transcriptomic analysis of salivary gland explants showed a correlation between *IL7* and *IFN* expression. Lastly, explants cultured with anti-IL7R antibody resulted in a decrease of IFN stimulated gene expression.

**Conclusion:** These results suggest an IL7-IFN $\gamma$  amplification loop involving SGECs and T cells in pSS. IL7 was secreted by SGECs stimulated with type 1 or type 2 IFN and, in turn, activate T cells that secrete type 2 IFN. An anti-IL7R antibody decreased the IFN signature in T cells during pSS and could be of therapeutic interest.

**Key words:** Sjögren's syndrome, Interleukine-7, T cells, Interferon

## INTRODUCTION

Primary Sjögren's syndrome (pSS) is a chronic autoimmune disease characterized by a lymphocytic infiltration of salivary glands. The major components of the salivary gland infiltrate are T and B lymphocytes. Salivary gland epithelial cells (SGECs) can be a driver, and not only a passive culprit, of disease pathophysiology. Autoreactive effector T cells could play a pathogenic role in pSS by different ways, including provision of help for promoting B cell hyperactivity (1). One characteristic of pSS is the presence of an Interferon (IFN) gene signature in circulating leukocytes and in the salivary gland of pSS patients (2-5). However, the initial trigger responsible for this IFN signature is still not identified, as well as the predominant involvement of either type 1 or type 2 IFNs.

Interleukin-7 (IL7) is a pleiotropic cytokine produced by non-hematopoietic cells, such as stromal and epithelial cells, which plays a central role in T lymphocyte homeostasis. Several observations highlighted the potential role of the IL7/IL7R $\alpha$  axis in pSS pathophysiology. The levels of IL7 and its receptor, IL7R $\alpha$ , also known as CD127, are elevated in salivary glands of patients with pSS (6). Bikker *et al.* showed by immunohistochemistry an association between the presence of IL7R $\alpha$  positive T cells in the salivary glands of patients with pSS, and the severity of sialadenitis and IL7 expression (7). Moreover, the IL7/IL7R $\alpha$  axis has been shown to be involved in the formation of ectopic lymphoid structures in salivary glands (8). Interestingly, Jin *et al.* showed that exogenous IL7 administration accelerated pSS onset in a mouse model, whereas blockade of endogenous IL7R $\alpha$  signals prevented its development (9). Lastly, IL7 stimulation of T cells *in vitro* enhanced IL2, IL10 and IFN $\gamma$  production which may also play a role in pSS (10,11).

Based on these findings, we aimed to study the interactions between SGECs and T cells in pSS and the impact of IL7 in this process by using a fully antagonist anti-IL7R monoclonal antibody (12).

## **MATERIALS and METHODS**

### **Patients**

Serum dosage of cytokines and chemokines were performed in patients from the French multicenter 5-year prospective Assessment of Systemic Signs and Evolution of Sjögren's Syndrome (ASSESS) cohort. 395 patients have been included in this cohort. All patients fulfilled the American–European Consensus Group criteria for pSS (13). The baseline characteristics of the patients have been previously described (14). Chemokine levels were also measured in 73 age- and sex-matched control subjects with symptoms of dry eyes and mouth but without any autoantibody and without lymphocytic infiltrates on minor salivary gland biopsy.

Minor salivary gland (MSG) biopsies were obtained from consecutive patients referred for suspicion of pSS to the Rheumatology Department of AP-HP.Université Paris-Saclay hospitals, a tertiary reference center for systemic auto-immune diseases. pSS was defined according to the 2016 ACR/EULAR criteria (15) or American–European Consensus Group criteria for pSS (13). The ESSDAI (EULAR Sjögren Syndrome Disease Activity Index) was used to assess pSS activity. Control subjects were presented with sicca symptoms without anti-SSA/SSB and with normal or sub-normal MSG (i.e. focus score <1).

T lymphocytes used for *in vitro* experiments were sorted from blood of pSS patients and controls.

Experimental design of the study is presented in **Supp Figure 1**.

### **Biological assessment**

Serum samples were obtained at enrollment. All biological samples were immediately frozen, stored and shipped to the Centre de Ressources Biologiques of Bichat Hospital, Paris, which has obtained the French Association for Quality Insurance (AFAQ) (certification number 2009/34457) according to the norm 96900. Serum markers were assessed centrally and blindly from any clinical or other biological data. Rheumatoid factor (RF) was assessed using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), C3 and

C4 using nephelometry (decreased C3 and C4 defined as a value below 0.8 and 0.15 g/l, respectively). Beta2-microglobulin, total Ig levels, kappa and lambda free light chains of Igs were assessed by nephelometry using the Freelite® kit (Binding Site, Birmingham, UK). CD4 and CD8 T cell counts were determined using flow cytometry. CD4+ T lymphocytopenia was defined by an absolute CD4 count lower than 300 cells/ml.

### **Assessment of IL7, CXCL13, CCL19, CXCL10 and IFN levels**

IL7 and CXCL13, serum levels were assessed by ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassays from Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 25 µl of serum was used with the following incubation times: antibody beads, 2 hours at room temperature; detection antibody, 30 min at room temperature; and streptavidin-PE, 30 minutes at room temperature. Data were acquired on a Bio-Plex MAGPIX system (Bio-Rad) using xMAP technology from Luminex and analyzed with Bio-Plex Manager software version 6.1 (Bio-Rad). CCL19 and CXCL10 serum levels were assessed respectively by Human CXCL10/IP-10 DuoSet (DY266) and Human CCL19/MIP-3 beta DuoSet (DY361) (R&D system). IL7 secretion by SGECs was tested in culture supernatants by ELISA (DIACLONE, Besançon, France). Dosage of INF $\alpha$  and IFN $\gamma$  were performed by Single-molecule array (Simoa) digital ELISA technology in T cells supernatants as previously described(16). Briefly, for IFN $\alpha$  the capture antibody clone 8H1 was used at 0.3 mg/ml and the detector antibody clone 12H5 was conjugated at 30x biotin:antibody ratio and used at 0.3 µg/ml. For IFN $\gamma$  the capture antibody (MD-1, BioLegend) was used at 0.3 mg/ml and the detector antibody (25718, R&D systems) was conjugated at 40x biotin:antibody ratio and used at 0.3 µg/ml. Streptavidin- $\beta$ -galactosidase was used at a final concentration of 150 pM. Limit of detection (LoD) was defined as blank + 3SD and was 0.69 fg/ml for IFN $\alpha$  and 11 fg/ml for IFN $\gamma$ . The assays were run on a 2-step configuration on the Simoa HD-1 Analyzer (Quanterix, US).

### **RNA-seq on CD4 and CD8 T cells sorted from salivary gland biopsies and from blood**

IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  and IFN $\lambda$  gene expression were evaluated by RNA-Seq in CD4 and CD8 T cells sorted from salivary gland biopsies and PBMCs. The methods of samples collection, cell isolation and RNA-sequencing are described in **supplementary materials**.

### **PCR validation of RNA-seq differentially expressed genes**

To confirm the results from RNA-seq on sorted cells, the residual complementary DNA (cDNA) were transferred to a 48.48 Dynamic Array primed chip, and real-time PCR (RT-PCR) was run according to the Fluidigm protocol. Data were analyzed by using Fluidigm Real-Time PCR analysis software. Relative mRNA expression was determined from normalized Ct values using HPRT1 as housekeeping gene and 2- $\Delta$ Ct method. To compare means of the RT-PCR measurements the Mann-Whitney test was applied.

### **CD127, ICOS and PD1 assessment on CD4 and CD8 T cells**

Fresh whole blood (100 $\mu$ l) was incubated with fluorochrome-conjugated antibodies for 15 min at room temperature in the dark, followed by 20 min of lysis (Versalyse, Beckman Coulter, Mervue, Galway, Ireland) and washed twice with PBS for surface staining. For Ki67 and FoxP3 staining, cells were fixed and permeabilized after cell surface staining with PerFix-nc kit (Beckman Coulter) according to manufacturer instructions. Stained cells were acquired using a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter). Data were analyzed using Kaluza software (Beckman Coulter). The list of the antibodies used in the experiments is presented in **Supp Table 4**. The gating strategy is presented in **Supp Figure 2**.

### **Isolation of T lymphocytes and IL7 stimulation**

Peripheral mononuclear cells were isolated from residual blood of apheresis from pSS patients or healthy subjects (French blood donors) by Ficoll gradient separation. T lymphocytes were isolated by magnetic bead negative selection according to the manufacturer's instructions (Pan T cells negative isolation kit, Miltenyi Biotec) to achieve a purity of greater than 70% as assessed by FACS analysis (percentage of CD3+ cells in live cells). T cells were seeded at 1million/mL in RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, and penicillin-streptomycin (1X) and stimulated with IL7 0.1ng/mL or 2ng/mL (Peprotech). T cells were harvested at day 1 or day 3 for flow cytometry analysis. Stimulated T lymphocytes were stained with CD3, CD4, CD8, CD127, CD25, Fixable Viability Dye efluor 780. The list of the antibodies used in the experiments is presented in **Supp Table 4**. Samples were analyzed using a BD FACS Canto flow cytometer and BD FACS Diva Software (BD, Becton Dickinson, Germany). The results were analyzed with FlowJo10 software.

### **Primary cultures of SGECs and stimulation**

Primary cultures of SGECs were established from minor salivary glands as previously described (17). After 2-3 weeks of culture, cells at 70–80% confluence were dissociated with 0.125% trypsin-EDTA. Cell suspension was suspended in basal epithelial medium and added at 80 000 cells/cm<sup>2</sup> to a 6-well collagen type I (Institut de Biotechnologies, Reims, France) coated and incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere. The basal epithelial medium was changed at day 1 in order to remove epithelial cells that were not adherent. The epithelial origin of cultured cells was routinely confirmed by staining with monoclonal antibodies against CD326 (Miltenyi Biotec, Paris, France) an epithelium-specific marker. Stimuli were added in the medium: Poly (I:C) 30 µg/mL (Invivogen), IFN-α 600 UI/mL (Roferon-A, Roche), IFN-γ 5 ng/mL (Sigma Aldrich) or IFN-λ (IL28) 25 ng/ml (Peprotech). Supernatants and SGECs were harvested after 72 hours and frozen (-80°C).

## qPCR

Total RNA from 24-hours stimulated and unstimulated SGECs was extracted using the RNeasy Minikit (Qiagen) according to the manufacturer specifications. Contaminating DNA was removed using RNase-free DNase set (Qiagen) according to manufacturer's instructions. 1 $\mu$ g of RNA was used to produce cDNA using the First strand synthesis kit (Sigma Aldrich). The quantification of mRNA expression was determined by Taqman real-Time PCR according to the manufacturer's instructions (Taqman, Life Technologies) with the TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies) using the CFX96 (Biorad). The amount of IL7 was normalized to the endogenous GAPDH. Calculation of mRNA expression levels was performed using the comparative Ct ( $\Delta\Delta$ Ct) method. Data analyses were performed using CFX Biorad Manager software.

## Culture of salivary glands explants

Each minor salivary gland was cut in two parts and cultured for 4 days in 200 $\mu$ L RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, and penicillin-streptomycin (1X) with OSE-127 humanized anti human CD127 mAb (anti-IL7R) (OSE Immunotherapeutics, Nantes (12)) or the control isotype (Ultra LEAF<sup>TM</sup> purified human IgG4 Isotype control recombinant (Biolegend). After 4 days, we separated supernatant from the explant. Supernatant was centrifugated in order to isolate the cells that escaped from the explant (called pellet cells) and the explant itself (called explant cells) (**Supp Figure 3**). The pellet cells and the explant cells were collected in the RLT buffer of the RNeasy Mini kit (Qiagen) supplemented by beta-mercaptoethanol at 1% and frozen (-80°C) before RNA extraction.

## Nanostring gene expression

RNAs from salivary gland biopsies (cells or explants) were extracted using the FastPrep system. Gene expression was quantified with the NanoString nCounter platform using 15 to 50 ng of total RNA,

according to the type of sample, in the nCounter Human Immunology Panel\_V2 (NanoString Technologies). The code set was hybridized with the RNA overnight at 65°C. RNA transcripts were immobilized and counted using the NanoString nCounter Sprint. Normalized expression data were analyzed with the nSolver software.

## **Statistical analysis**

### **IL7 serum level and correlations**

Categorical variables are reported as numbers (percentages) and were compared using a  $\chi^2$  or, when appropriate, Fisher's exact test. Quantitative variables are reported as median with the interquartile range and were compared using the Mann-Whitney test. For correlations analyses between two quantitative variables, Spearman's correlation coefficients were obtained. In univariate analyses, the correlation/association between disease activity, serum chemokine levels, serum B cell biomarkers, and IL7 serum levels was assessed using Spearman's correlation coefficient for continuous data and Mann-Whitney U test for categorical data. All variables with p-value <0.05 in univariate analysis or  $R \geq 0.20$  were entered into a multivariate model to identify the parameters independently associated with IL7 serum levels. Variables were selected using backward selection. Statistical analyses were performed using SAS 9.3 statistical software (SAS Inst., Cary, NC).

### **RNA-seq profiles of sorted cells**

Reads were first QC-filtered and trimmed using trimmomatic(18). Paired reads were aligned to the Ensembl human reference genome (V38.79) (19) using STAR software (version 2.5.0c) (20). Statistical analyses were performed using the DESeq2 package (21). A cut-off of  $p < 0.05$  was applied to call differentially expressed genes. Interferome v2.01 database (22) was used to identify and characterize the IFN-induced genes. Functional enrichment analysis of differentially expressed genes were

performed for genes with absolute fold change value  $\geq 1.5$ , using ingenuity pathway analysis software (Qiagen).

### **Study approval**

The study received approval from the local ethics committee, and informed consent was obtained from all patients and control subjects.

## RESULTS

### Patients

The characteristics of the patients included in the ASSESS cohort for serum cytokine evaluation have been previously described (14). The characteristics of the patients and controls included in the study are presented in **Table 1** and the experimental design of the study is presented in **Supp Figure 1**.

### **IL7 serum levels are increased in pSS and IL7R expression on CD4 and CD8 T cells is decreased in pSS**

Primary Sjogren's syndrome patients had higher serum IL7 levels than controls: 5.47 ng/ml (3.33, 9.08) (median (interquartile range)) versus 3.03 ng/ml (1.90, 5.76);  $p < 0.0001$  (**Figure 1**). A positive correlation with B-cell activation markers, IFN-induced chemokines and disease activity markers was observed (**Supp Table 1**). A univariate analysis of clinico-biological parameters associated with IL7 serum levels identified an association with anti-SSA and anti-SSB antibodies, the presence of rheumatoid factor, lymphopenia, low C4 and past or current lymphoma (**Supp Table 2**). In multivariate analysis, serum IL7 levels were associated with the presence of anti-SSA antibodies, the serum level of CXCL13, the presence of rheumatoid factor, high  $\kappa$  light-chain and low C4 (**Supp Table 2**). Supporting this increase in serum IL7 levels, we observed a decrease of IL7R (CD127) expression on CD4 and CD8 T cells from pSS as compared to controls ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively) (**Figure 2A**), this result being explained by IL7R internalization after IL7 binding (23). Of note, there was no difference of IL7R MFI between pSS and controls CD4 and CD8 T cells (data not shown). There was also no difference in expression of the *IL7R* gene between pSS and controls at the transcriptomic level (**Supp Figure 4A**).

The comparison of PD1 expression on CD8 and CD4 T cells between CD127+ and CD127- T cells showed an increased expression of PD1 on CD127- CD8 and CD127- CD4 T cells from pSS ( $p < 0.05$  and  $p < 0.0001$ , respectively) (**Figure 2B**). There was also an increase of ICOS expression on CD127- CD4 T cells from pSS as compared to CD127+ CD4 T cells ( $p < 0.001$ ) (**Figure 2C**).

### **Salivary gland epithelial cells are a source of IL7**

We showed that SGECs sorted from pSS and control salivary glands, expressed *IL7* RNA and that this expression was higher in SGECs from pSS patients as compared to controls (**Supp Figure 4B**). Given this result, we hypothesized that SGECs could be a source of IL7 in pSS. Primary cultured SGECs from pSS and controls stimulated with Poly(I:C), IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , and IFN $\lambda$  were able to secrete IL7 (**Figure 3A**). IL7 expression was confirmed by quantitative RT-PCR (**Figure 3C**). The level of IL7 mRNA and protein expression after IFNs or poly (I:C) stimulation was the same between pSS and controls in protein and RNA (**Figures 3B and D**).

### **Relationship between IL7 and type 1 and type 2 IFNs in blood and salivary glands**

IL7 stimulation (2 ng/mL) of blood T cells induced an increase in CD25 expression on CD8 and CD4 T lymphocytes as compared to the unstimulated condition both in pSS and in control CD4 and CD8 T cells (**Supp Figure 5A and B**). There was also higher expression of CD25 in pSS CD4 T cells at day 1 (**Supp Figure 5C**), and CD8 T cells at day 3 (**Supp Figure 5D**) after stimulation with IL7 (0.1 ng/mL) as compared to controls ( $p=0.03$ ). IFN $\gamma$  was detected in supernatants from T cells stimulated with IL7 (2 ng/mL) (**Figure 4A**). As expected, T cells stimulated by IL7 did not produce IFN $\alpha$  (**Figure 4B**). Interestingly, in the whole salivary gland tissue, IL7 expression correlated with IFN expression: the nanostring transcriptomic analysis of salivary gland explants from pSS showed a positive correlation between IL7 gene expression and IFN $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$  and  $\gamma$  gene expression ( $R^2= 0.4, 0.5, 0.6$  and  $0.5$ , respectively) (**Figure 4D**).

### **IFN signaling pathway and IFN $\gamma$ expression are upregulated in pSS T cells**

The comparison of gene expression in sorted CD4 T cells from blood of pSS patients and controls showed 474 differentially expressed genes: 312 up-regulated and 162 down-regulated. Functional enrichment pathway analysis highlighted an over representation of the EIF2 and the IFN signaling

pathways, as well as Th1 and Th2 pathways (**Supp Table 3**). IFN induced genes such as IFI27, IFIT1 and IFI44L were among the most significantly up-regulated genes in pSS patients as compared to controls (log<sub>2</sub>Fold change = 3.295, 3.029 and 2.552, respectively). Among the 312 upregulated genes in blood CD4 T cells from pSS patients, we identified 198 IFN regulated genes (Type I =25, Type II = 46, Type I and II = 105 and Types I, II and III =22). Of note, there was an up regulation of the PDCD1 (programmed cell death 1) gene (log<sub>2</sub>Fold change = 2.667) in pSS compared to controls.

When comparing gene expression in sorted CD8 T cells from blood of pSS patients and controls, 532 differentially expressed genes were detected: 325 up-regulated and 207 down-regulated. As in CD4 T cells, functional enrichment pathway analysis highlighted an over representation of EIF2 signaling and IFN signaling pathways (**Supp Table 3**). IFN induced genes such as IFI44L, IFI44, OAS1, IFIT3 and MX1 were up-regulated in pSS patients compared to controls (log<sub>2</sub>Fold change = 4.073, 1.944, 1.735, 1.7 and 1.542, respectively). Among the 325 upregulated genes in blood CD8 T cells from pSS compared to controls, we identified 42 IFN regulated genes (Type I =1, Type I and II = 20 and Types I, II and III =21).

CD8 T cells sorted from salivary glands and from blood expressed *IFN $\gamma$*  and *IFN $\lambda$*  genes (**Supp Figure 6**). Interestingly, *IFN $\gamma$*  expression was upregulated in blood CD8 T cells from pSS compared to controls (log<sub>2</sub>Fold change = 1.809) (**Supp Figure 6**). Expression of *IFN $\gamma$*  was also detected in CD4 T cells from biopsies and from blood. As expected, type I IFN expression (IFN $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 17 and  $\beta$ ) was not detected in CD4 and CD8 T cells from biopsy and from blood (*data not shown*).

In sorted CD4 T cells from biopsies of pSS patients and controls, 539 differentially expressed genes were detected: 305 up-regulated and 234 down-regulated. The enrichment analysis identified only 3 overrepresented pathways: 14-3-3-mediated Signaling, IGF-1 Signaling and Natural Killer Cell Signaling (**Supp Table 3**).

In sorted CD8 T cells from biopsies of pSS patients and controls, 373 differentially expressed genes were detected: 207 up-regulated and 166 down-regulated. The enrichment analysis did not identify significant pathways (**Supp Table 3**).

Lastly, four pSS patients had available data in the same time for T cells sorted from biopsy and from blood. Interestingly, there was an upregulation of *IFN $\gamma$*  expression in CD8 and CD4 T cells sorted from biopsies compared to blood (Log2FC = 3.36, p-value = 0.02 and Log2FC = 3.64, p-value = 0.02, respectively). IFNL1 was upregulated in CD4 T cells sorted from biopsy compared to blood (Log2FC = 6.51, p-value = 0.011).

### **IL7R inhibition decreases IFN signature in salivary glands**

We analyzed the transcriptomic modifications induced by adding an anti-IL7R Ab in the culture of minor salivary gland explants from pSS. The pellet cells corresponded to the cells that escaped from the explant during the culture, the explant cells corresponded to the explant itself. This analysis of the mRNA signature revealed that inhibition of IL7 signaling by OSE-127 (monoclonal antibody that is an antagonist of IL7R) lead to a decrease of the IFN gene signature as assessed by decreased expression of IFITM1 and Mx-1, both in explant and in pellet cells (**Figure 5A**). Looking specifically at the different IFN subtypes, we observed that OSE-127 decreased the expression of IFN $\gamma$  in the pellet cells (**Figure 5B**).

## DISCUSSION

In this study, we showed that IL7 was increased in pSS patients compared to controls with higher IL7 levels in sera from patients and decreased IL7-R expression in circulating T cells. Secondly, we found that IL7 serum levels were associated with B-cell biomarkers and IFN related biomarkers in pSS such as anti-SSA and CXCL13. In addition, we identified SGECs as producers of IL7 upon type 1 and type 2 IFN activation and we showed that T cells stimulated with IL7 secreted IFN $\gamma$ . Lastly, we found that blocking the IL7 pathway with an anti-IL7R mAb was associated with a decrease in IFN related gene expression in salivary gland explants. Given these results, we made the hypothesis of an IFN-IL7 axis in pSS. SGECs stimulated with both types of IFN might produce IL7, which activates T lymphocytes able to secrete IFN $\gamma$  (**Figure 5C**). This vicious circle could be potentially inhibited by an anti-IL7R antibody.

IL7 is a key cytokine involved in T lymphocytes homeostasis. The presence of lymphopenia, impacting mainly T-cells, is one of the hallmarks of some systemic autoimmune diseases like systemic lupus and pSS. In pSS, lymphopenia is included in the biologic criteria used to assess activity in the ESSDAI score and the presence of a lymphopenia is associated with the risk of lymphoma (24). Circulating levels of IL7 are increased in response to lymphopenia. An interesting question in pSS is whether the increase of IL7 is a reaction to lymphopenia or if lymphopoiesis is non-responsive to IL7 stimulation.

IL7 is produced by stromal cells but also by epithelial cells, such as small intestinal epithelial cells (25), or enterocytes (26). We showed that SGECs were able to produce IL7 after stimulation with all types of IFNs or a TLR3 agonist. The IFN/IL7 pathway that we described could be involved in the organization of ectopic lymphoid structures found in pSS salivary glands. Seo *et al.* demonstrated that IL7 plays a pivotal role in T follicular helper (Tfh) generation and germinal center formation *in vivo*, as treatment with an anti-IL7 neutralizing antibody markedly impaired the development of Tfh cells and IgG responses (27). Interestingly, we showed that there was more CD127<sup>+</sup> T cells in pSS compared to controls, probably due to the internalization of CD127, the IL7R, after IL7 binding. Moreover, we showed that CD127<sup>+</sup> CD8 and CD4 T cells from pSS had an increased expression of PD1, and that CD127<sup>+</sup>

CD4 T cells from pSS had a higher expression of ICOS than CD127<sup>+</sup> T cells. These results suggest that IL7 could be involved in CD4 T cell differentiation to Tfh, which are PD1<sup>+</sup>, ICOS<sup>+</sup>. Tfh cells are specialized providers of T-cell help to B cells, and are essential for germinal center formation, affinity maturation, and the development of high affinity antibodies and memory B cells. The impact of IL7 on the Tfh subset could be one hypothesis to explain the correlation between IL7 serum levels and several B cell activation markers, as well as IFN-induced chemokines that we observed. Conversely, the impact of IL7 stimulation on CD8 T cells might drive IFN $\gamma$  production. These differences between CD4 and CD8 T cell involvement requires better characterization. Of note, RNA-seq analysis showed that IFN $\gamma$  expression was higher in CD8 T cells from pSS compared to controls, but not in CD4 T cells from pSS compared to controls.

One limitation of this study is that we made the hypothesis that the action of IL7 was mainly due to its effect on T cells resulting in IFN $\gamma$  secretion. However, IL7 has been demonstrated to contribute to arthritis in RAG deficient mice, which lack T and B cells. Thus, other cells than T and B cells might express IL7R and be sensitive to IL7 signaling. For example, the presence of IL7R<sup>+</sup> macrophages was associated with joint inflammation and IL7 enhanced inflammation and osteoclastogenesis, independently of T and B cells in this mouse model (28). Moreover, innate lymphoid cells (ILCs) express IL7R and are also involved in IL7-mediated inflammation (29). Notably, ILC3s play a role in IL7-mediated lymphoid structure formation. In addition to ILCs, some tissue-resident cells with innate-like properties, such as IL7R<sup>+</sup> mucosal-associated invariant T (MAIT) cells and IL7R<sup>+</sup> CCR9<sup>+</sup> T cells could contribute to IFN $\gamma$  secretion. Interestingly, these cells have been described to be increased in target tissues in several autoimmune diseases and notably the salivary glands of patients with pSS (30).

Lastly, the inhibition of this IL7 stimulation showed interesting results in term of *IFN* gene expression. It was recently demonstrated that the administration of a blocking antibody against the IL7R $\alpha$  chain to female NOD mice improved the pSS characteristics including hyposalivation and leukocyte infiltration of the submandibular glands. Moreover, the authors observed a decrease of IFN $\gamma$  producing CD4 and

CD8 T cells in the submandibular glands (31). The use of OSE-127, an anti-IL7R $\alpha$  mAb, showed interesting results in non-human primates for the control of skin inflammation despite repeated antigen challenges (32), as well as in humanized mice models of colitis and ex-vivo colon explants culture from ulcerative colitis were significant decrease of IFN $\gamma$  has been also observed (33). Of note, no modification in T cell numbers, phenotype, function or metabolism was observed in the peripheral blood in this study.

In conclusion, IL7 secreted by SGECs under the influence of both types of IFN may activate T cells that in turn secrete IFN $\gamma$  amplifying this vicious circle. Given these results and those already described in the “Sjögren like” NOD mouse model, targeting IL7 pathway in pSS could represent an interesting therapeutic option.

**Author contributions:** E.R. participated in designing research studies, conducting experiments, acquiring data, analyzing data and writing the manuscript. J.P. participated in designing research studies, conducting experiments, acquiring data and analyzing data. A.V., A.D., B.L., A.P., R.S.: participated in designing research studies, conducting experiments and acquiring and analyzing data. N.T. participated in analyzing data and writing the manuscript. M.M. participated in designing research studies, acquiring data and analyzing data. N.S., D.D L.C. and N.C. participated in conducting experiments, acquiring and analyzing data. S.P., V.G., N.P. participated in designing research studies, conducting experiments, acquiring and analyzing data. G.N. and X.M. participated in designing research studies, analyzing data and writing the manuscript.

**Acknowledgements:**

We thank C. Le Pajolec, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France; E. Berge, Rheumatology, Université Paris Sud, Le Kremlin Bicêtre, France who

participated in the recruitment of patients. We thank Vincent Bondet, Immunobiology of Dendritic Cells laboratory, INSERM U1223/Institut Pasteur, Paris, France, who participated in SIMOA experiments.

## REFERENCES

1. Singh N, Cohen PL. The T cell in Sjogren's syndrome: force majeure, not spectateur. *J Autoimmun.* 2012;39(3):229-33.
2. 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;63:47-58.
3. 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;103(8):2770-5.
4. Khuder SA, Al-Hashimi I, Mutgi AB, Altorok N. Identification of potential genomic biomarkers for Sjögren's syndrome using data pooling of gene expression microarrays. *Rheumatol Int.* 2015;35(5):829-36.
5. 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;67(9):2437-46.
6. Bikker A, van Woerkom JM, Kruize AA, Wenting-van Wijk M, de Jager W, Bijlsma JWJ, et al. Increased expression of interleukin-7 in labial salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome correlates with increased inflammation. *Arthritis Rheum.* 2010;62(4):969-77.
7. Bikker A, Kruize AA, Wenting M, Versnel MA, Bijlsma JWJ, Lafeber FPJG, et al. Increased interleukin (IL)-7R $\alpha$  expression in salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome is restricted to T cells and correlates with IL-7 expression, lymphocyte numbers and activity. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(6):1027-33.
8. Timmer TCG, Baltus B, Vondenhoff M, Huizinga TWJ, Tak PP, Verweij CL, et al. Inflammation and ectopic lymphoid structures in rheumatoid arthritis synovial tissues dissected by genomics technology: identification of the interleukin-7 signaling pathway in tissues with lymphoid neogenesis. *Arthritis Rheum.* 2007;56(8):2492-502.
9. Jin J-O, Kawai T, Cha S, Yu Q. Interleukin-7 enhances the Th1 response to promote the development of Sjögren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy in mice. *Arthritis Rheum.* 2013;65(8):2132-42.
10. Shmarov VA, Malashchenko VV, Meniailo ME, Gazatova ND, Todosenko NM, Melashchenko OB, et al. Direct effects of interleukin-7 on the function of human T cells in vitro. *Eur Cytokine Netw.* 2016;27(4):102-7.
11. van Roon JAG, Glaudemans K, Bijlsma J, Lafeber F. Interleukin 7 stimulates tumour necrosis factor  $\alpha$  and Th1 cytokine production in joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2003;62(2):113-9.
12. Belarif L, Mary C, Jacquemont L, Mai HL, Danger R, Hervouet J, et al. IL-7 receptor blockade blunts antigen-specific memory T cell responses and chronic inflammation in primates. *Nat Commun.* 2018;9(1):4483.

13. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis*. 2002;61(6):554-8.
14. Gottenberg J-E, Seror R, Miceli-Richard C, Benessiano J, Devauchelle-Pensec V, Dieude P, et al. Serum levels of beta2-microglobulin and free light chains of immunoglobulins are associated with systemic disease activity in primary Sjögren's syndrome. Data at enrollment in the prospective ASSESS cohort. *PLoS One*. 2013;8(5):e59868.
15. Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM, et al. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for primary Sjögren's syndrome: A consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(1):9-16.
16. 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;214(5):1547-55.
17. Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Abu-Helu RF, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Establishment of a convenient system for the long-term culture and study of non-neoplastic human salivary gland epithelial cells. *Eur J Oral Sci*. 2002;110(1):21-30.
18. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinforma Oxf Engl*. 2014;30(15):2114-20.
19. Cunningham F, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Amode M, Armean I, et al. Ensembl 2019. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D745-51.
20. Dobin A, Davis C, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinforma Oxf Engl*. 2013;29(1):15-21.
21. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550.
22. Rusinova I, Forster S, Yu S, Kannan A, Masse M, Cumming H, et al. Interferome v2.0: an updated database of annotated interferon-regulated genes. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D1040-1046.
23. Henriques CM, Rino J, Nibbs RJ, Graham GJ, Barata JT. IL-7 induces rapid clathrin-mediated internalization and JAK3-dependent degradation of IL-7Ralpha in T cells. *Blood*. 2010;115(16):3269-77.
24. Nocturne G, Virone A, Ng W-F, Le Guern V, Hachulla E, Cornec D, et al. Rheumatoid Factor and Disease Activity Are Independent Predictors of Lymphoma in Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2016;68(4):977-85.
25. Madrigal-Estebas L, McManus R, Byrne B, Lynch S, Doherty DG, Kelleher D, et al. Human small intestinal epithelial cells secrete interleukin-7 and differentially express two different interleukin-7 mRNA Transcripts: implications for extrathymic T-cell differentiation. *Hum Immunol*. 1997;58(2):83-90.

26. Laky K, Lefrançois L, Lingenheld EG, Ishikawa H, Lewis JM, Olson S, et al. Enterocyte expression of interleukin 7 induces development of gammadelta T cells and Peyer's patches. *J Exp Med*. 2000;191(9):1569-80
27. Seo YB, Im SJ, Namkoong H, Kim SW, Choi YW, Kang MC, et al. Crucial Roles of Interleukin-7 in the Development of T Follicular Helper Cells and in the Induction of Humoral Immunity. *J Virol*. 2014;88(16):8998-9009
28. Kim S-J, Chang HJ, Volin MV, Umar S, Van Raemdonck K, Chevalier A, et al. Macrophages are the primary effector cells in IL-7-induced arthritis. *Cell Mol Immunol*. 2019
29. Hinrichs AC, van Roon JAG. Do IL-7 R+ innate cells orchestrate autoimmune pathology? *Nat Rev Rheumatol*. 2019;15(11):640-2.
30. Blokland SLM, Hillen MR, Kruize AA, Meller S, Homey B, Smithson GM, et al. Increased CCL25 and T Helper Cells Expressing CCR9 in the Salivary Glands of Patients With Primary Sjögren's Syndrome: Potential New Axis in Lymphoid Neogenesis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2017;69(10):2038-51.
31. Zhou J, Yu Q. Anti-IL-7 receptor- $\alpha$  treatment ameliorates newly established Sjögren's-like exocrinopathy in non-obese diabetic mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018;1864(7):2438-47.
32. Belarif L, Mary C, Jacquemont L, Mai HL, Danger R, Hervouet J, et al. IL-7 receptor blockade blunts antigen-specific memory T cell responses and chronic inflammation in primates. *Nat Commun*. 2018;9(1):4483.
33. Belarif L, Danger R, Kermarrec L, Nerrière-Daguin V, Pengam S, Durand T, et al. IL-7 receptor influences anti-TNF responsiveness and T cell gut homing in inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 2019;129(5):1910-25.

## Figure legends:

**Figure 1: IL7 serum level is increased in pSS compared to controls.** Assessment of IL7 in serum from 372 pSS (ASSESS cohort) and 73 controls by ELISA. Statistical analysis was made using Mann-Whitney test. \*\*\*\* corresponds to  $p < 0.0001$ .

**Figure 2: The percentage of IL7R+ CD4 and CD8 T cells is decreased in pSS compared to controls and CD127- CD4 T cells express more PD1 and ICOS than CD127+ CD4 T cells.** **A:** Expression of CD127 in CD4 and CD8 T cells in pSS patients and controls. **B:** Expression of PD1 in CD127+ and CD127- CD4 and CD8 T cells in pSS patients. **C:** Expression of ICOS in CD127+ and CD127- CD4 and CD8 T cells in pSS patients. \*corresponds to  $p < 0.05$ , \*\*corresponds to  $p < 0.01$ , \*\*\*corresponds to  $p < 0.001$ , \*\*\*\* corresponds to  $p < 0.0001$ . Each color corresponds to the same patient throughout the figure.

**Figure 3: A:** Secretion of IL7 by SGECs in different conditions of stimulation (ELISA) in pSS and controls mixed. **B:** Secretion of IL7 by SGECs in different conditions of stimulation in pSS and controls (ELISA). **C:** Expression of *IL7* RNA in SGECs in different conditions of stimulation relative to unstimulated condition (qPCR) pSS and controls mixed. **D:** Expression of *IL7* RNA in SGECs in different conditions of stimulation in pSS and controls relative to unstimulated condition (qPCR). \*\*\*\* corresponds to  $p < 0.0001$ . Controls are represented in green and pSS patients in orange.

**Figure 4: Relations between IL7 and IFN in blood and salivary glands.** Detection of IFN $\gamma$  protein (**A**) and IFN $\alpha$  protein (**B**) in supernatants from T cells stimulated with IL7 0.1 and 2 ng/mL. **C:** Correlation between *IL7* gene expression and *IFN $\alpha$ 1*, *IFN $\alpha$ 2*, *IFN $\beta$*  and *IFN $\gamma$*  gene expression in salivary glands explant cells from pSS (n=9). \*\*corresponds to  $p < 0.01$ . Open circles correspond to controls and closed circles correspond to pSS T cells.

**Figure 5 A:** Volcano plot representations of differentially expressed genes after treatment with anti-IL7-R Ab (OSE-127) compared to a control isotype in explant cells and in pellet cells. **B:** Effect of anti-IL7-R Ab (OSE-127) on IFN gene expression in pellet cells and in explants cells compared to a control isotype. \*corresponds to  $p < 0.05$ . **C:** Schematic representation of the IL7/IFN axis hypothesis between SGECs and T cells in pSS pathophysiology.

Figure 1

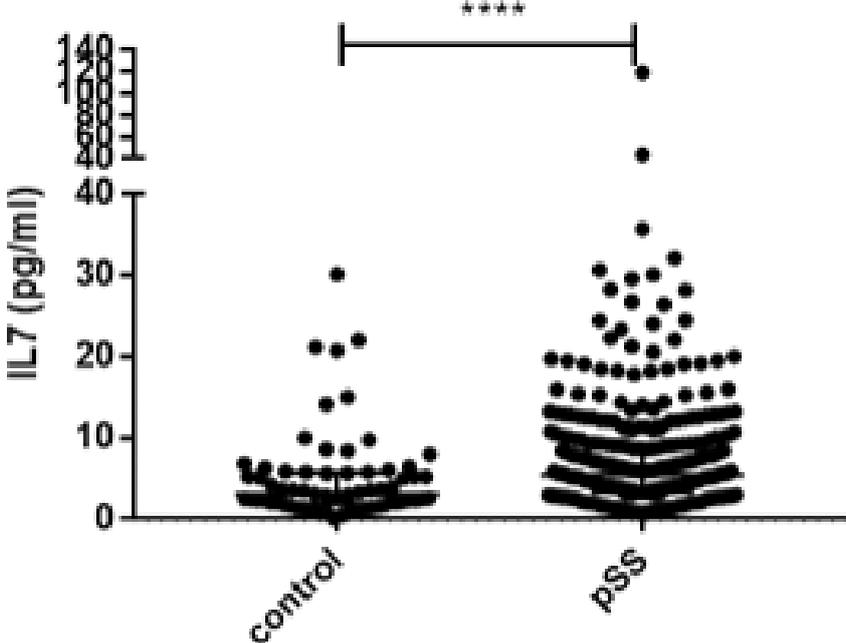


Figure 2

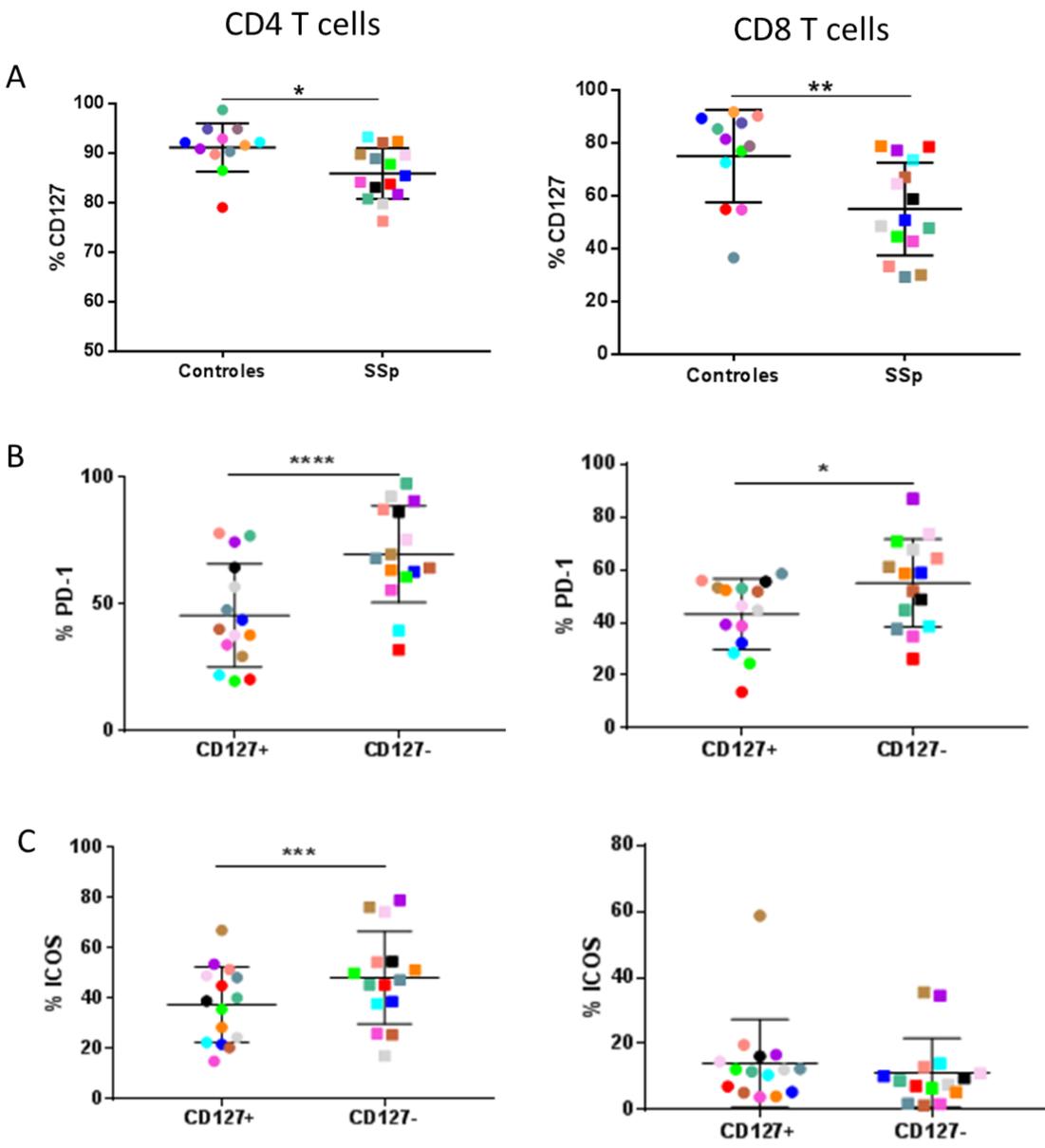


Figure 3

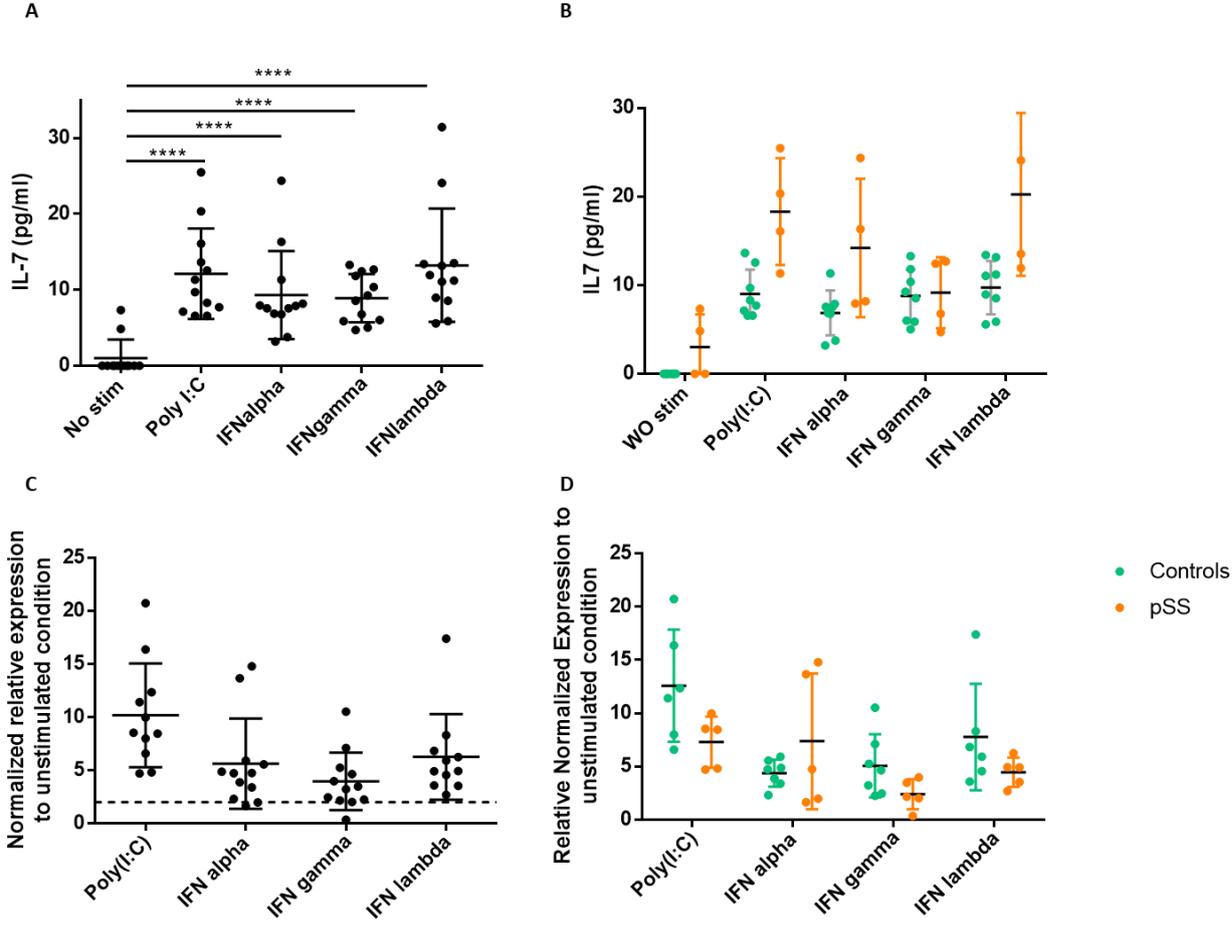
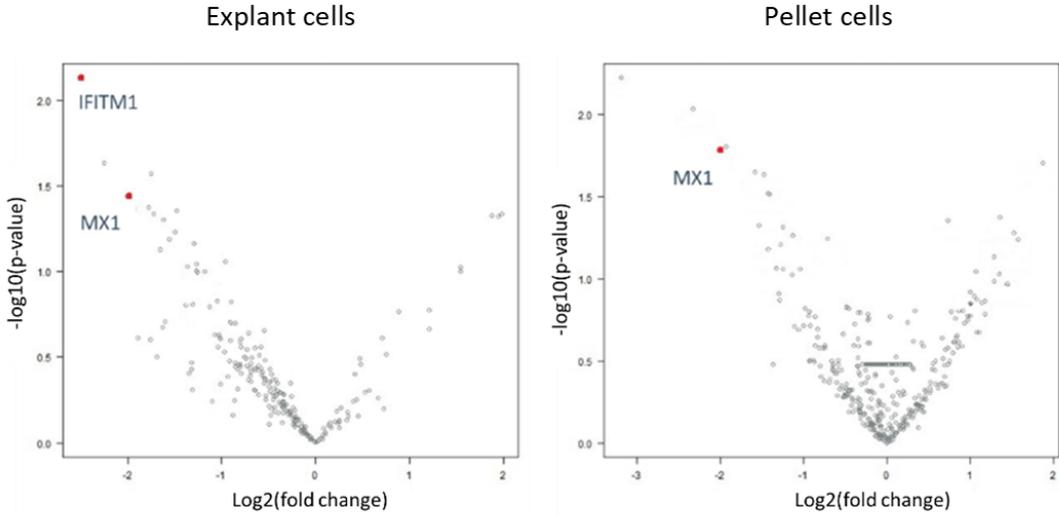


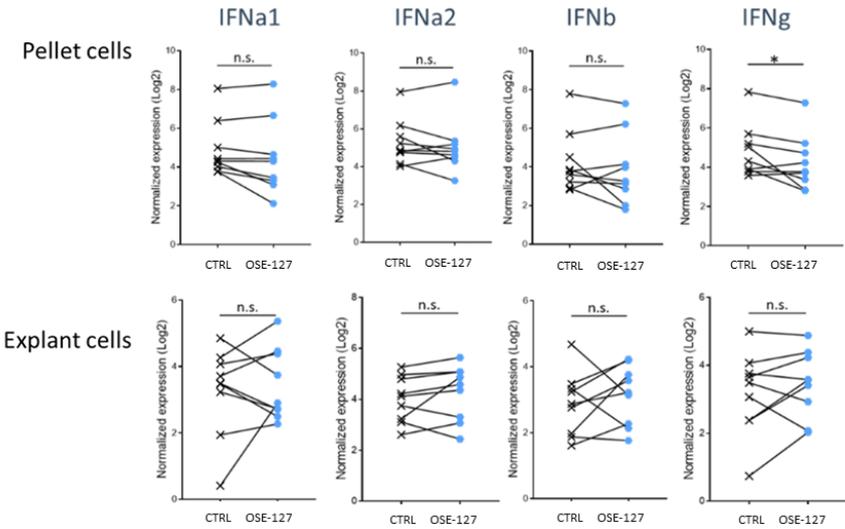


Figure 5

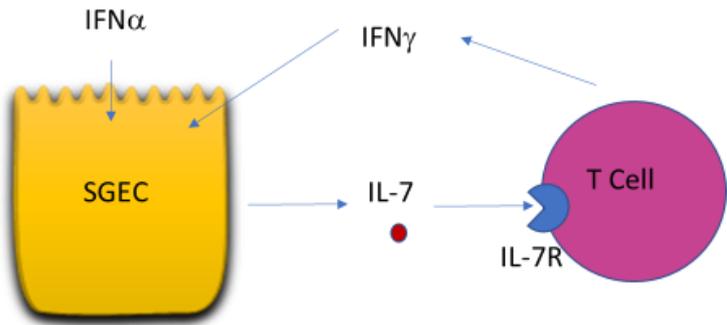
A



B



C



**Table 1: Characteristics of patients and controls included in the study**

	<b>CD127 and PD1 assessment on T cells</b>	<b>RNASeq on biopsy sorted cells</b>	<b>RNASeq on blood sorted cells</b>	<b>T cells stimulated with IL7</b>	<b>Primary cultured SGECs for IL7 dosage</b>	<b>Salivary gland explants for nanosttring</b>
	pSS (n=15)	pSS (n=9)	pSS (n=16)	pSS (n=12)	pSS (n=5)	pSS (n=9)
<b>Median age (min-max)</b>	59(40-59)	51 (47-71)	55 (47-68)	65 (38-88)	50(40-64)	41(38-52)
<b>Female sex, n (%)</b>	13(86)	8 (89)	15 (94)	12 (100)	4(80)	9(100)
<b>Focus score <math>\geq</math> 1, n (%)</b>	4/4(100)	4 (44)	3/6 (50)	NA	4(80)	5(55)
<b>SSA, n (%)</b>	10(71)	7 (78)	13 (81)	9 (75)	4(80)	8(88)
<b>Median ESSDAI (min-max)</b>	5(2-8)	2 (0-4.5)	1 (0-2.75)	3 (0-15)	3 (2-12)	2 (1-4)

## **Supplementary material :**

### **Collection and isolation of cells used for RNA-seq**

One to two MSG were collected in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with antibiotics, sodium pyruvate, nonessential amino acids, and glutamine. Glands were first minced with scissors and enzymatically digested at 37°C under rotating agitation (100 rpm) in DMEM containing 232 U/mL collagenase II (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ) and 8 U/mL DNase I (Sigma, St Louis, Mo). After 2 washes in calcium- and magnesium-free PBS containing 1 mmol/L EDTA, cellular aggregates were resuspended in 0.5 mL of TrypLE Express Enzyme (Gibco, Carlsbad, Calif) and incubated for 2 minutes at 37°C. Enzyme inactivation was achieved by means of dilution with 4 mL of DMEM and immediately followed by gentle pipetting with a P1000 to facilitate cell dissociation. The resulting cell suspension was washed twice with medium supplemented with 0.8 U/mL DNase I.

PBMCs used for transcriptomic analysis were isolated from whole blood of pSS patients and healthy blood donors within 4 hours of blood draw. After isolation, cells were stained using DAPI Pacific Blue (LifeTechnologies) to identify dead cells. Staining was performed after saturation of Fc receptors by means of incubation with Fcblock (Miltenyi Biotec). CD45+ CD3+, CD4+, DAPI cells [CD4 lymphocytes] and CD45+ CD3+ CD8+ DAPI– cells [CD8 lymphocytes] in salivary gland biopsy and in blood were sorted with a FACS ARIA cell sorter (BD Biosciences). The list of the antibodies used in the experiments is presented in **Supp Table 1**. Sorted cells were frozen on dry ice and stored at -80°C until use.

### **RNA extraction and cDNA preparation**

Samples were then thawed on ice and RNA extraction was performed according to manufacturer's instructions (PicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus, Applied Biosystems, Foster City, Calif) with the following modifications. Because of low yield of RNA expected for this type of samples, linear acrylamide (Ambion) was diluted in extraction buffer to be spiked-in to a final concentration of 20 ng/μL. RNA QC was performed on the Agilent 2100 Bioanalyzer with the RNA 6000 Pico Kit (Agilent). RNASeq was performed by M. Mingueneau at Biogen, US. 100pg of total RNA was used as input for

cDNA preparation using the SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit (Clontech catalog # 634892). Universal Human Reference RNA (UHRR) was included in the experiment as positive control, nuclease-free water used to dilute the samples as negative control or non-template control (NTC). Using the concentrations derived from the Ribogreen assay, a normalization plate was made with a final concentration of 10.53 pg/uL per sample. cDNA was prepared according to manufacturer's instructions, except for the additional spike-in of 1uL of diluted ERCC RNA Spike-In Mix (ThermoFisher catalog #4456740) in each sample. After subtracting the averaged concentration of the ERCC spiked NTC from the sample concentration from the Bioanalyzer trace, cDNA samples were normalized to 125pg in 5uL per sample.

### **Library preparation and RNA-sequencing**

Library Preparation used the Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina catalog # FC-131-1096), and the Nextera XT Index Kit v2 Set A (catalog # FC-131-2001) and Set D (catalog # FC-131-2004), according to manufacturer's instructions. The High Sensitivity D1000 ScreenTape Assay (Agilent catalog # 5067-5585 and # 5067-5584) was used on the Agilent 4200 TapeStation system to check the libraries for base pair size and molarity. All samples were then pooled to a final concentration of 4nM in an DNA LoBind Microcentrifuge Tubes (Eppendorf catalog # 022431048). The High Sensitivity DNA Assay (Agilent catalog # 5067-4626) was used on the Agilent 2100 Bioanalyzer to analyze the pool which was then adjusted with Buffer EB (Qiagen catalog # 19086). The 12.5pM denatured library with 1% Phix spike-in was run on the MiSeq with MiSeq Reagent Kit v2 (50 cycles) (Illumina catalog # MS-102-2001), following manufacturer's instructions. The frequency of identified reads per index was used to adjust individual samples concentration in the pool. The re-adjusted pool was then re-Bioanalyzed and rerun on the MiSeq using the same kit and protocol. The same process of re-adjusting the pool with the new set of MiSeq index data and validation with the Bioanalyzer was done before running the pool on the Illumina HiSeq 2500 System. The 18pM denatured library with 1% Phix spike-in was clustered on the cBot with the HiSeq PE Cluster Kit v4 (Illumina catalog # PE-401-4001), following Illumina's HiSeq and

GAllx Systems Denature and Dilute Libraries Guide, and cBot System Guide, and run on the HiSeq with the HiSeq SBS Kit v4 (Illumina catalog # FC-401-4002), following the HiSeq 2500 System Guide.

**Supp Table 1: IL7 serum level is correlated to B cells activation markers, IFN-induced chemokines and disease activity markers**

<b>Parameters</b>	<b>Spearman correlation coefficient</b>	<b>p-value</b>
<b>CXCL13</b>	r=0.35	<0.0001
<b>CCL19 (MIP-3b)</b>	r=0.20	<0.0001
<b>CXCL10 (IP-10)</b>	r=0.23	0.0002
<b>Gammaglobulines</b>	r=0.27	<0.0001
<b>Total IgG</b>	r=0.28	<0.0001
<b>Kappa Light Chain</b>	r=0.30	<0.0001
<b>Lambda Light Chain</b>	r=0.28	<0.0001
<b>β2microglobuline</b>	r=0.27	<0.0001
<b>Rheumatoid Factor</b>	r=0.32	<0.0001
<b>Level of lymphocytes</b>	r= -0.28	<0.0001
<b>C4 level</b>	r= -0.22	<0.0001

**Supp Table 2: Clinico-biological parameter associated with IL7 serum level in univariate analysis and multivariate analysis**

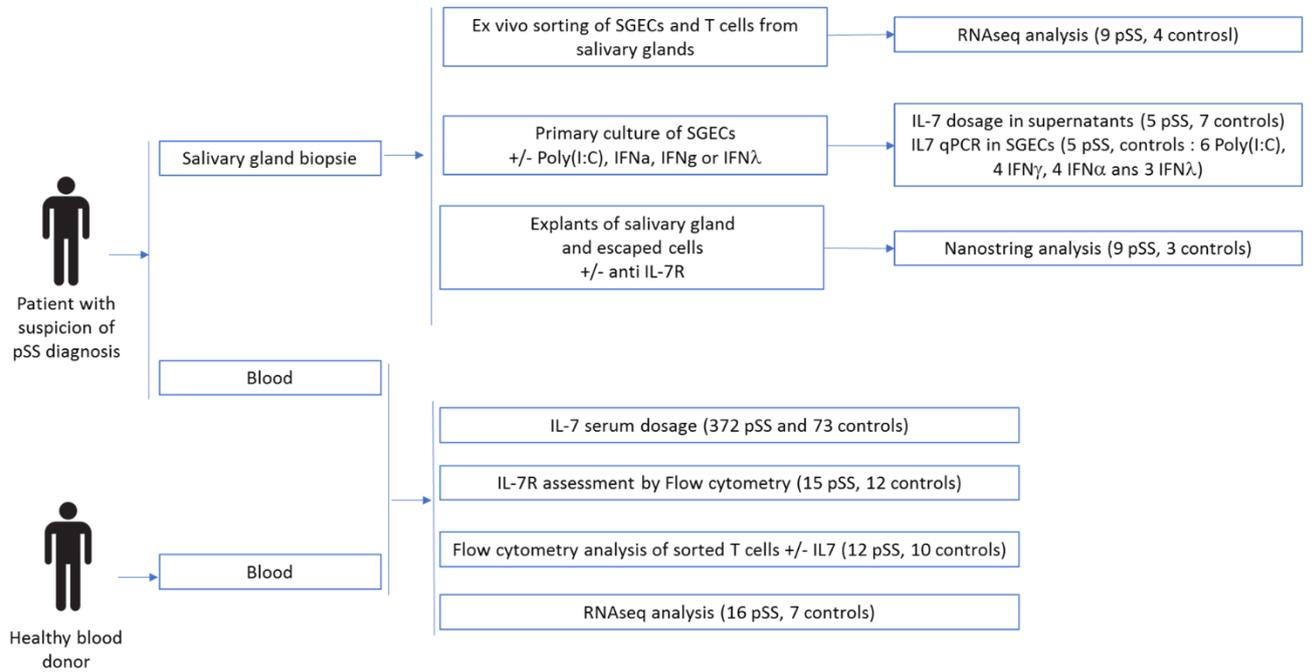
<b>Parameter</b>	<b>p-value</b>
<b>UNIVARIATE ANALYSIS</b>	
<b>Anti-SSA</b>	p<0.0001
<b>Anti-SSB</b>	p<0.0001
<b>RF</b>	p<0.0001
<b>Lymphopenia</b>	p=0.0002
<b>Low C4</b>	p<0.0001
<b>Lymphoma</b>	p=0.005
<b>MULTIVARIATE ANALYSIS</b>	
<b>Anti-SSA</b>	p=0.019
<b>CXCL13</b>	p=0.043
<b>Rheumatoid Factor</b>	p=0.003
<b>kappa Light Chain</b>	p=0.024
<b>Low C4</b>	p=0.024

**Supp Table 3: Enrichment pathway analysis of CD4 and CD8 T cells sorted from salivary gland biopsies and from blood**

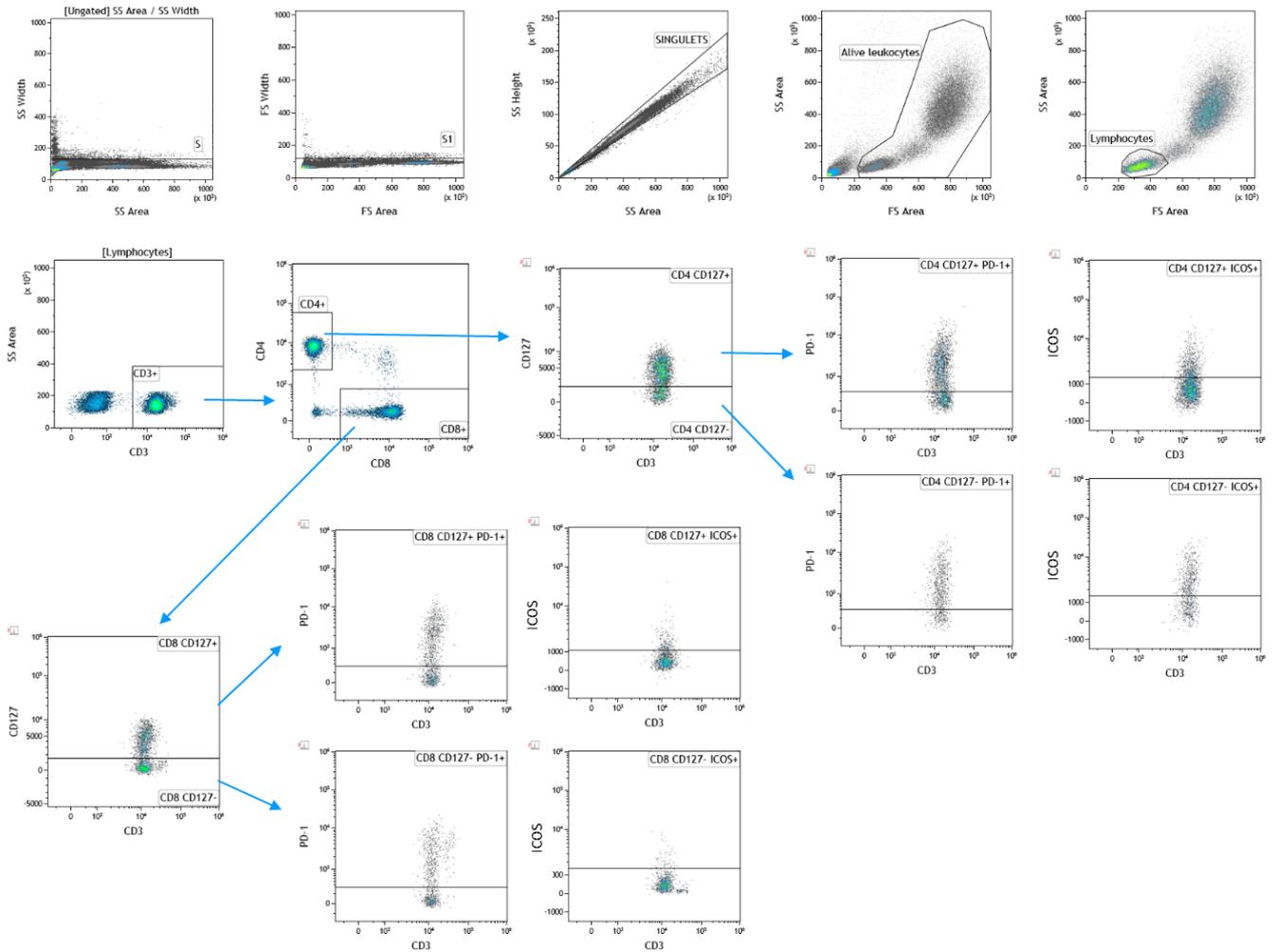
<b>Ingenuity Canonical Pathway</b>	<b>-log(p-value)</b>	<b>Genes</b>
<b>CD4 T cells from salivary gland biopsies</b>		
<b>14-3-3-mediated Signaling</b>	4,12	<i>TUBA1B,CBL,TUBA1A,BAD,YWHAH,MAPK3,TSC2,TUBA4A,PIK3CB,MAP2K1,PRKD3,PRKCZ</i>
<b>IGF-1 Signaling</b>	3,61	<i>BAD,YWHAH,MAPK3,PIK3CB,IGFBP5,IGFBP7,CYR61,SOCS7,MAP2K1,PRKCZ</i>
<b>Natural Killer Cell Signaling</b>	3,18	<i>KLRD1,MAPK3,INPP5B,FCER1G,PIK3CB,MAP2K1,PRKD3,FCGR3A/FCGR3B,PRKCZ,CD300A</i>
<b>CD4 T cells from blood</b>		
<b>Interferon Signaling</b>	8,05	<i>IFIT3,IFIT1,OAS1,PTPN2,MX1,IFI6,STAT2,STAT1,TAP1,IFNAR1,ISG15</i>
<b>EIF2 Signaling</b>	7,74	<i>RPS23,RPLP2,EIF4A2,RPL7A,EIF2S1,EIF3B,RPL13,UBA52,SOS1,RPS9,RPL19,RPS2,RPS12,RPS3,RPL18,RPL3,PTPN11,MT-TM,RPL10,RPS27A,RPS25,RPS15A,RPL13A,RPS14,EIF3K</i>
<b>Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling</b>	4,48	<i>PPP2CA,RPS23,EIF4A2,EIF2S1,EIF3B,PTPN11,SOS1,RPS9,RPS27A,RPS25,RPS15A,RPS2,RPS12,RPS3,EIF3K,RPS14</i>
<b>Th1 and Th2 Activation Pathway</b>	3,67	<i>IL2RG,TNFRSF4,IL12RB1,HLA-B,IL6R,MAF,LGALS9,PTPN11,ICOS,S1PR1,IL10RB,VAV1,IL27RA,GATA3,STAT1,IFNAR1</i>
<b>Th1 Pathway</b>	3,04	<i>PTPN11,IL12RB1,HLA-B,IL6R,ICOS,IL10RB,LGALS9,VAV1,IL27RA,STAT1,GATA3,IFNAR1</i>
<b>CD8 T cells from blood</b>		
<b>EIF2 Signaling</b>	32,3	<i>RPL11,RPS27,RPS23,RPLP2,RPS11,EIF4G2,RPS20,RPL13,RPS13,RPL23A,RPL19,RPL21,RPS2,RPL36,RPL32,RRAS,RPL3,RPS8,RPL29,RPL37A,RPS6,RPL8,EIF4A3,CDK11A,RPL10,RPS15A,RPS25,RPL13A,RPL41,RPLP1,RPL36A,RPS18,RPS4X,RPL27A,RPL35,RPL18A,UBA52,RPS9,RPS17,RPS12,RPS5,RPS3,RPL18,RPS19,RPL4,RPL34,RPL17,RPL30,RPS10,FAU,RPS15,RPS16,RPS27A,EIF2AK2,RPS14</i>
<b>Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling</b>	14,1	<i>RPS27,PPP2R2A,RPS23,RPS18,RPS4X,RPS11,RPS20,EIF4G2,RPS13,RPS9,RPS2,RPS17,RPS5,RPS12,RPS3,RPS19,RRAS,RPS8,RPS10,PPP2R5A,FAU,RPS6,RPS15,RPS16,PTPA,EIF4A3,RPS27A,RPS15A,RPS25,RPS14</i>
<b>mTOR Signaling</b>	12,7	<i>RPS27,PPP2R2A,RPS23,RPS18,PRKAG1,RPS4X,RPS11,RPS20,EIF4G2,RPS13,RPS9,RPS2,RPS17,RPS5,RPS12,RPS3,RPS19,PLD3,RRAS,RPS8,RPS10,PPP2R5A,FAU,RPS6,RPS15,RPS16,PTPA,EIF4A3,RPS27A,RPS15A,RPS25,RPS14</i>
<b>Interferon Signaling</b>	4,65	<i>IFIT3,IFNG,OAS1,MX1,IFI6,STAT1,TAP1,ISG15</i>
<b>Oxydative Phosphorylation</b>	3,08	<i>ATP5G2,MT-ND1,NDUFB4,NDUFB11,NDUFS8,ATP5O,MT-CO3,SDHC,CYB5A,MT-ND2,COX4I1</i>
<b>Phagosome Maturation</b>	3,05	<i>ATP6VOC,VPS39,HLA-B,VAMP3,RAB7A,ATP6V1G1,ATP6V1A,TUBB,TAP1,NAPA,TSG1O1,PRDX6,PRDX2</i>

**Supp Table 4: List of the antibodies used for the FACS experiments**

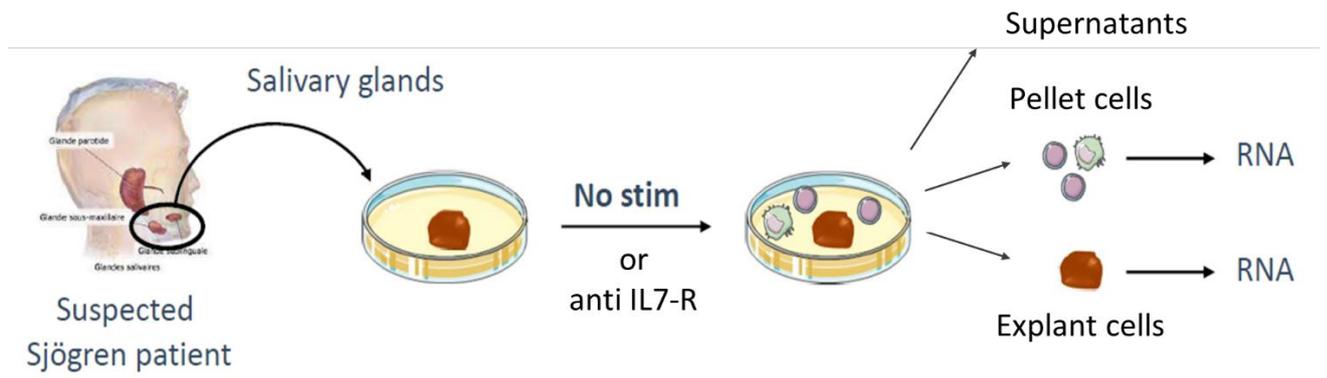
ANTIBODY	CONJUGATED FLUOROCHROME	SOURCE
<b>Sorting of T CD4 and CD8 lymphocytes from salivary gland biopsies</b>		
496-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)	Pacific Blue	Life Technologies
CD45	APC Vio770	BioLegend
CD3	Alexa Fluor	BioLegend
CD4	APC	BioLegend
CD8	PerCpCy5	BioLegend
<b>IL7 stimulated T lymphocytes</b>		
CD3	FITC	BioLegend
CD4	PerCp Cy5	BioLegend
CD8a	PE Cy5	BioLegend
CD127	PE	BioLegend
CD25	APC	BioLegend
Fixable Viability Dye efluor 780	APC Cy7	Invitrogen
<b>Whole blood staining</b>		
Ki67	B56	Biosciences
FoxP3	259D	Beckman
CD4	RPA-T4	Biosciences
CD8	B9.11	Beckman
CD127	R34.34	Beckman
PD1	PD1.3	Beckman
ICOS	ISA-3	Beckman



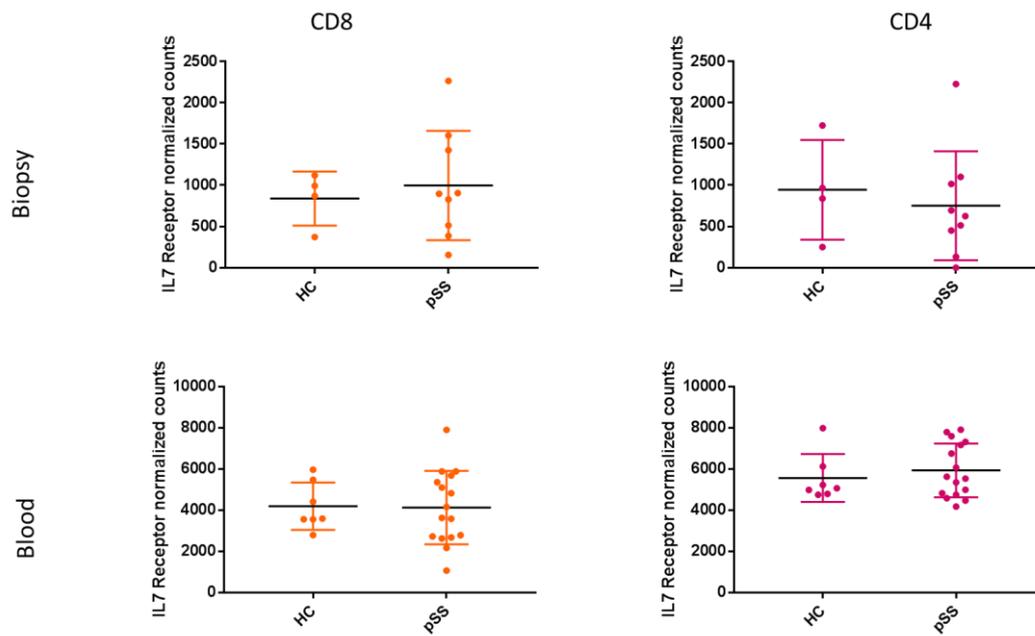
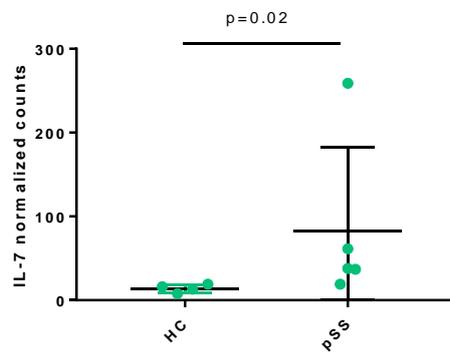
**Supp Figure 1: Experimental design of the study**



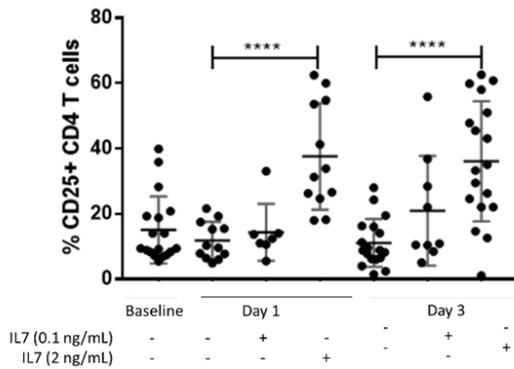
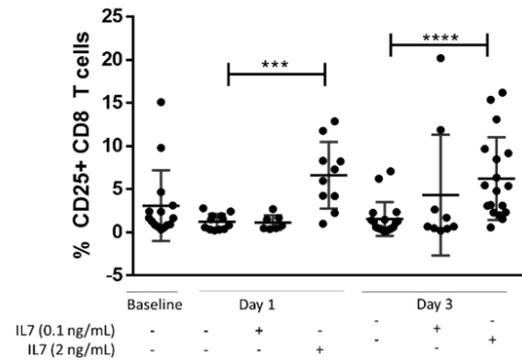
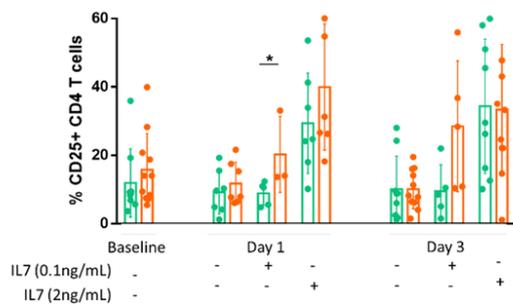
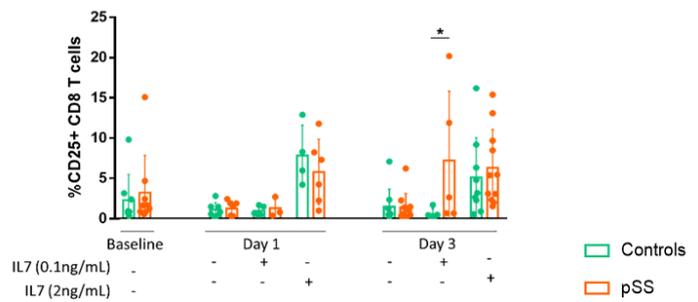
**Supp Figure 2:** Gating strategy for circulating CD4 and CD8 T cells (CD127, PD1 and ICOS markers) analysis



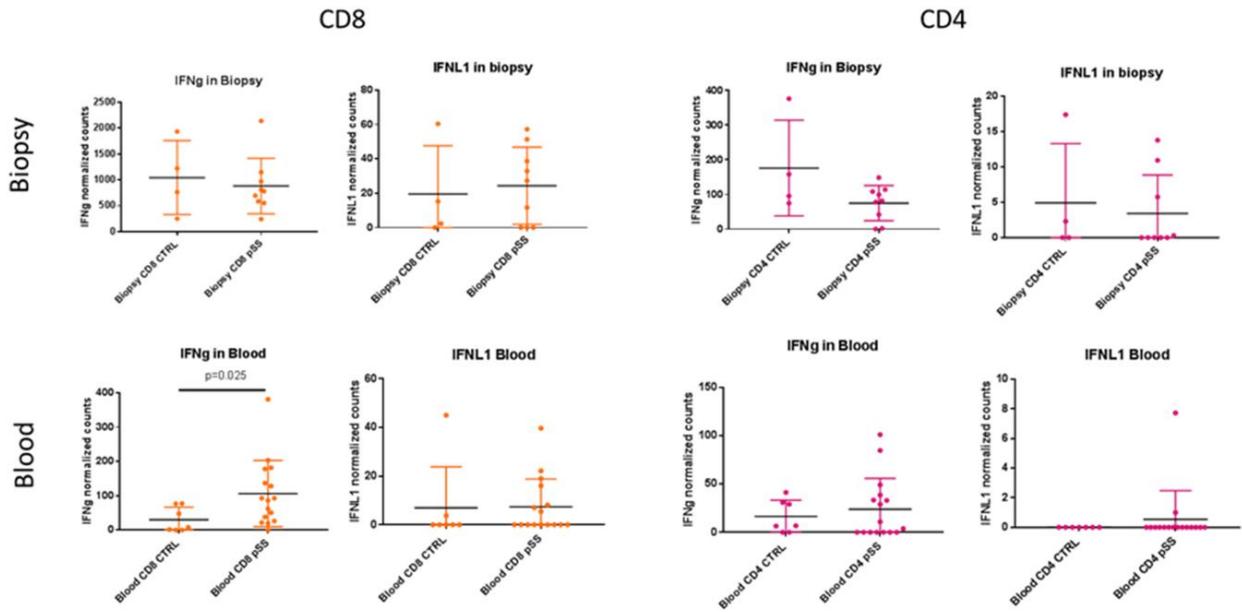
**Supp Figure 3:** Schematic representation of the protocol used for nanosting experiments.

**A****B**

**Supp Figure 4: A:** IL7R expression in CD8 and CD4 T cells sorted from biopsy and from blood in pSS and in controls (RNA-seq analysis). **B:** IL7 expression in SGECs sorted from salivary glands in pSS and in controls (RNA-seq analysis).

**A****B****C****D**

**Supp Figure 5: T cells are activated by IL7 stimulation.** Percentage of CD25+ T lymphocytes stimulated by IL7 at day 1 and day 3 in CD4 T cells (**A**) and CD8 T cells (**B**). Percentage of CD25+ T lymphocytes stimulated by IL7 at day 1 and day 3 in pSS (in orange) and controls (in green) CD4 T cells (**C**) and CD8 T cells (**D**). \* corresponds to  $p < 0.05$ , \*\*\* corresponds to  $p < 0.001$ , \*\*\*\* corresponds to  $p < 0.0001$ . Controls are represented in green and pSS patients are represented in orange.



**Supp Figure 6:** Expression of *IFN $\gamma$*  is increased in blood CD8 T cells from pSS compared to controls. RNA-seq results of sorted CD4 and CD8 T cells from salivary gland biopsies and from blood of pSS and controls.

### C.II.2. Principaux messages

1. Le taux d'IL7 est augmenté dans le sérum de patients SSp par rapport aux sujets contrôles. Les taux sériques d'IL7 sont associés à des marqueurs d'activation lymphocytaires B (présence d'anticorps anti-SSA, de FR et de chaînes légère libres) et des paramètres d'activité de la maladie (lymphopénie, baisse du complément C4).
2. Les CES sont capables de sécréter de l'IL7 après stimulation par poly(I:C), IFN $\alpha$  ou IFN $\gamma$ .
3. L'IL7 induit l'activation des lymphocytes T CD4 et CD8, mesurée par l'expression de CD25, ainsi que la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les LT.
4. Des cultures de biopsies de glandes salivaires non dissociées pendant 4 jours en présence ou non d'anticorps anti-IL7R ont été réalisées. L'analyse transcriptomique de ces biopsies et des cellules qui s'en étaient échappées collectées dans le surnageant a permis de montrer que l'Ac anti-IL7R est responsable d'une diminution de l'expression de certains gènes IFN-induits.
5. L'ensemble de ces résultats suggère l'existence d'un axe IL7 – IFN au cours du SSp. Ainsi, la signature IFN présente au cours du SSp pourrait expliquer, au moins en partie, l'augmentation de l'IL7 notamment *via* l'induction d'une production d'IL7 dans le micro-environnement tissulaire par les CES. Cet IL7 produit localement peut à son tour participer à l'activation lymphocytaire T et notamment à la production d'IFN de type II dans les glandes salivaires. Ainsi, l'axe IL7/IL7R dans les glandes salivaires de patient SSp pourrait être une cible thérapeutique intéressante.

### C.III. Résultats préliminaires: “RNA-seq analysis of primary cultured salivary gland epithelial cells and response to poly(I:C), IFN $\alpha$ and IFN $\gamma$ stimuli”.

#### C.III.1. Contexte de l'étude

L'analyse transcriptomique des CES triées à partir de biopsies de glandes salivaires de patients atteints de SSp et de sujets contrôles a permis de mettre en évidence des gènes différentiellement exprimés. Nous avons montré que ces gènes ainsi que des voies de signalisations identifiées pourraient jouer un rôle dans la physiopathologie du SSp et notamment dans les interactions entre CES et LB ou LT. Par ailleurs, les expériences de co-culture entre CES et LB ont montré qu'il existait une différence d'induction de survie des LB par les CES de SSp par rapport aux contrôles. Un autre résultat intéressant de ces expériences de co-cultures était que l'induction d'activation des LB était plus importante pour les CES de SSp comparées aux contrôles dans la condition stimulée par poly(I:C). Ce résultat suggérait une plus grande sensibilité des CES de patients à la stimulation du TLR, plus encore qu'à la stimulation IFN.

L'une des limites des résultats obtenus en co-culture est liée au fait que les CES ont été cultivées 2 à 3 semaines avant d'être utilisées pour les expériences. Afin de déterminer si cette étape de culture longue avait un impact sur les caractéristiques transcriptomiques des CES, nous avons réalisé une analyse transcriptomique de CES après culture +/- stimulation par poly(I:C), IFN $\gamma$  et IFN $\alpha$ . Nous avons ainsi pu comparer les CES de SSp par rapport aux sujets contrôles sans stimulation, puis analyser l'effet des différentes stimulations sur les modifications transcriptomiques des CES.

## **Résultats préliminaires:**

### **RNA-seq analysis of primary cultured salivary gland epithelial cells and response to poly(I:C), IFN $\alpha$ and IFN $\gamma$ stimuli**

#### **BACKGROUND**

Salivary gland epithelial cells (SGECs) play an active role in primary Sjögren syndrome (pSS) pathophysiology. They are not only the victim of autoimmunity but also participate to the over activation of the immune system. The origin of this specific capacity of SGECs to support stimulation of immune system is still unknown. SGECs may play an early role in the initiation of the disease and intrinsic characteristics of SGECs from pSS may explain this capacity to promote activation of the immune system. Of note, SGECs are one of the first barriers against infectious agents that have been suspected to play a role as triggers in pSS. Thus, SGECs from pSS patients could also have a specific sensitivity to molecular actors of the innate immune system and could be prone to over-react to TLR and IFN stimulations. In this study, we aimed to assess if SGECs from pSS patients might present a specific transcriptomic signature at baseline and after stimulation with key actors of viral defense such as IFNs and TLR agonist.

The objectives of this study were:

- To study the transcriptomic characteristics of primary cultured SGECs from pSS patients compared to controls.
- To study the effect of poly(I:C), IFN $\gamma$  and IFN $\alpha$  on primary cultured SGECs from pSS and from controls.

#### **METHODS**

##### **Patients**

Minor salivary gland (MSG) biopsies were obtained from consecutive patients referred for suspicion of pSS to the Rheumatology Department of AP-HP, Paris-Saclay hospitals, a tertiary reference center for systemic auto-immune diseases. pSS was defined according to the 2016 ACR/EULAR criteria (1) or American–European Consensus Group criteria for pSS (2). In order to compose a homogenous group, all included pSS patients presented a focus score  $\geq 1$  and positive anti-SSA. The EULAR Sjögren Syndrome Disease Activity Index (ESSDAI) was used to assess pSS activity. Controls subjects were presented with sicca symptoms without anti-SSA/SSB and with normal or sub-normal MSG (i.e. focus score <1).

### **Primary cultures of SGECs and stimulation**

Primary cultures of SGECs were established from MSGs as previously described (3). After 2 to 3 weeks of culture, cells at 70–80% confluence were dissociated with 0.125% trypsin-EDTA. Cell suspension was suspended in basal epithelial medium and added at 80 000 cells/cm<sup>2</sup> to a 6-well collagen type I (Institut de Biotechnologies, Reims, France) coated and incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere. The basal epithelial medium was changed at day 1 in order to remove epithelial cells that were not adherent. Stimuli were added in the medium: poly(I:C) 30 µg/mL (Invivogen), IFN $\alpha$  2400 U/mL (Roferon-A, Roche) or IFN $\gamma$  5ng/mL (Sigma Aldrich). Supernatants and SGECs were harvested after 24 hours and frozen (-80°C).

### **RNA extraction**

Total RNA from 24-hours stimulated and unstimulated SGECs was extracted using the RNeasy Minikit (Qiagen) according to the manufacturer specifications. Contaminating DNA was removed using RNase-free DNase set (Qiagen) according to manufacturer's instructions. An amount of 1µg RNA was reverse-transcribed in cDNA using the First strand synthesis kit (Sigma Aldrich). After RNA extraction, RNA concentrations were obtained using a fluorometric Qubit RNA HS assay (Life Technologies, Grand Island, New York, USA). The quality of the RNA (RNA integrity number 8.2) was determined on the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) as per the manufacturer's instructions.

### **Library construction and sequencing**

To construct libraries, 1 µg of high-quality total RNA sample (RIN >8) was processed using Truseq stranded total RNA kit (Illumina) according to manufacturer instructions. Briefly, after removal of human ribosomal RNA (using Ribo-zero rRNA) confirmed by quality control on pico chip on the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), total RNA molecules were fragmented and reverse-transcribed using random primers. Replacement of dTTP by dUTP during the second strand synthesis allowed to achieve the strand specificity. Addition of a single A base to the cDNA was followed by ligation of adapters.

Libraries were quantified by qPCR using the KAPA Library Quantification Kit for Illumina Libraries (KapaBiosystems, Wilmington, MA) and library profiles were assessed using the DNA High Sensitivity LabChip kit on an Agilent Bioanalyzer. Libraries were sequenced on an Illumina Nextseq 500 instrument using 75 base-lengths read V2 chemistry in a paired-end mode. After sequencing, a primary analysis based on AOZAN software (ENS, Paris) was applied to demultiplex and controls the quality of the raw

data (based of FastQC modules / version 0.11.5). Obtained fastq files were then aligned using Star algorithm (version 2.5.2b) and quality control of the alignment realized with Picard tools (version 2.8.1). Reads were then counted using Feature count (version Rsubread 1.24.1) and the statistical analyses on the read counts were performed with the DESeq2 package version 1.14.1 to determine the proportion of differentially expressed genes between two samples. Absolute FC value >1.5 and p-value<0.05 was applied to identify up and down-regulated genes.

### **Study approval**

The study received approval from the local ethics committee, and informed consent was obtained from all patients and control subjects.

## **RESULTS**

### **1. Patients characteristics**

The characteristics of the patients and controls included in the study are in **Table 1**.

### **2. Primary cultured SGECs maintain differential gene expression profiles between pSS and controls**

*Ex vivo*, assessment of transcriptome of SGECs has revealed specific features in pSS patients compared to controls (**Article 1**). However, primary culture of SGECs is a long-term procedure that needs 2 to 3 weeks of culture. Thus, we first wanted to assess if differences between pSS patients and controls would be still present after these 2 to 3 weeks of culture. The comparison of gene expression in primary cultured unstimulated SGECs of pSS compared to controls showed 511 differentially expressed genes: 251 upregulated and 260 downregulated (**Figure 1A**). Functional enrichment pathway analysis highlighted an over-representation of the Inhibition of Matrix Metalloproteases signaling pathway (**Table 2**). Among the most upregulated genes, using string DB software, we identified hubs corresponding to genes involved in extracellular matrix formation (**Figure 2**). Among them, there were several collagen genes: *COL3A1* and *COL1A2* with the higher fold-change (FC) ( $\log_2FC = 2.40$ ,  $\log_2FC = 2.12$ , respectively). There were also several ADAMTSS genes (A Disintegrin and Metalloproteinases with a Thrombospondin motif) related genes such as *ADAMTS2*, *ADAMTS16*, *ADAMTS12* ( $\log_2FC = 2.09$ ,  $\log_2FC = 1.57$ ,  $\log_2FC = 1.31$ , respectively). Other genes that might have a role in saliva secretion such as *CFTR* and *AQP6* were differentially expressed; *CFTR* was upregulated ( $\log_2FC=1.67$ ), whereas *AQP6* was downregulated ( $\log_2FC=-1.44$ ). Few immune pathways related genes were identified. There was an upregulation of *HLA-C* ( $\log_2FC=0.63$ ), as well as *CCR7* ( $\log_2FC=1.26$ ). Lastly, we identified an upregulation of the *androgen receptor* gene ( $\log_2FC=1.71$ ). A schematic representation of these most

interesting genes and their potential role in SGECs is presented in **Figure 3A**.

### **3. The stimulation of SGECs with poly(I:C), IFN $\gamma$ or IFN $\alpha$ change their transcriptomic profile: comparison between stimulated and unstimulated SGECs**

Genes involved in B cell-SGEC crosstalk were found to be expressed by cultured SGECs without any stimulation at H24. However, *BAFF*, *CXCL10*, *CXCL12* and *CXCL13* RNA expression levels were very low without any stimulation. Poly(I:C) stimulation induced *BAFF*, *APRIL*, *IL6* and *CXCL10* expression in SGECs (**Figure 4**). We performed a differential analysis of the gene expression between pSS SGECs stimulated with poly(I:C), IFN $\gamma$  or IFN $\alpha$  compared to the unstimulated condition. Concerning the number of differentially expressed genes, poly(I:C) was the one that led to the highest number of differentially expressed genes both in pSS (**Figure 1B**) and in controls (**Figure 1C**) compared to IFN $\gamma$  and IFN $\alpha$ . The results of the enrichment analyses of the comparisons between stimulated and unstimulated SGECs in pSS patients are presented in **Table 3**. In the poly(I:C) stimulated condition compared to the unstimulated condition: interferon signaling, EIF2 Signaling, Th1 and Th2 Activation pathways ( $-\log(p\text{-value}) = 7.23$ ,  $-\log(p\text{-value}) = 5.94$ ,  $-\log(p\text{-value}) = 5.5$ , respectively) were identified. In the IFN $\gamma$  stimulated condition, the antigen presentation and the interferon signaling pathways were the most significant pathways ( $-\log(p\text{-value}) = 10.19$ ,  $-\log(p\text{-value}) = 9.82$ , respectively). Lastly, in the IFN $\alpha$  stimulated condition, the EIF2 Signaling, interferon signaling, and antigen-presentation pathways were over-represented ( $-\log(p\text{-value}) = 10.34$ ,  $-\log(p\text{-value}) = 7.46$ ,  $-\log(p\text{-value}) = 4.14$ , respectively). Similar results were obtained when performing the enrichment analysis between the different conditions of stimulation and the unstimulated condition in controls subjects (**Table 4**). Of note, the IFN pathway was over-represented, as expected, in the conditions of IFN $\alpha$  and IFN $\gamma$  stimulation, but also in the condition of poly(I:C) stimulation in pSS patients and in controls (**Tables 3 and 4**).

Looking more precisely at the differentially expressed genes after poly(I:C) stimulation in pSS SGECs, we identified an upregulation of numerous IFN-induced genes, including *MX1* ( $\log_2\text{FC}=4.22$ ), *OAS1* ( $\log_2\text{FC}= 4.825$ ), *IFI6* ( $\log_2\text{FC} = 4.585$ ) and *IFI35* ( $\log_2\text{FC}=5.244$ ). There was also an upregulation of genes involved in T cell chemotaxis as *CXCL10* ( $\log_2\text{FC}=5.99$ ) and *CXCL11* ( $\log_2\text{FC}=7.28$ ); and T cell interaction such as *CD40* ( $\log_2\text{FC}=2.61$ ). Moreover, there was an upregulation of genes involved in B cell activation as *BAFF* ( $\log_2\text{FC}=6.82$ ) and *BST2* ( $\log_2\text{FC}=6.46$ ). As expected, several genes involved in innate immunity and anti-viral reaction were upregulated including *TLR3* ( $\log_2\text{FC}=3.199$ ), *BST2* ( $\log_2\text{FC}=6.46$ ) and *OAS1* ( $\log_2\text{FC}=4.825$ ). Lastly, there was an upregulation of numerous HLA molecules class I and class II, including for example *HLA-A* ( $\log_2\text{FC}= 2.91$ ), *HLA-B* ( $\log_2\text{FC}=3.66$ ), *HLA-C*

(log<sub>2</sub>FC=3.013), *HADRB5* (log<sub>2</sub>FC= 1.098) and *HLA-DRA* (log<sub>2</sub>FC= 2.963). A schematic representation of these most interesting genes and their potential role in SGECs is presented in **Figure 3B**.

#### **4. Comparison of the impact of the stimulation on SCEGs from pSS patients versus controls**

##### **4.1. Comparison between pSS and controls SGECs in the different conditions of stimulation**

The comparison between pSS and controls SGECs stimulated with poly(I:C) identified 3213 differentially expressed genes (1637 upregulated and 1576 downregulated); whereas the comparison between pSS and controls SGECs stimulated with IFN $\gamma$  identified 470 differentially expressed genes (176 upregulated and 294 downregulated); and the comparison between pSS and controls SGECs stimulated with IFN $\alpha$  identified 528 differentially expressed genes (243 upregulated and 285 downregulated). The unsupervised primary component analysis showed a clustering of the samples according to the type of stimulation but did not allow to discriminate pSS patients from controls (**Figure 5**). The enrichment analysis of the differentially expressed genes between pSS patients and controls in the different conditions of stimulation highlighted several interesting pathways (**Table 2**). For example, in the poly(I:C) stimulated condition, there was an over representation of the IL15 signaling pathway (-log(p-value) = 6.46) and the JAK/STAT signaling pathway (-log(p-value) = 4.37). In the IFN $\gamma$  stimulated condition, one example of the highlighted pathways was the Inhibition of Matrix Metalloproteases pathway, which was also present in the unstimulated condition (-log(p-value) = 2.87). Lastly, in the IFN $\alpha$  stimulated condition, the pathway of Mitochondrial Dysfunction (-log(p-value) = 4.42), as well as PPAR Signaling (-log(p-value) = 3.01) and Inhibition of Matrix Metalloproteases (-log(p-value) = 2.83) were over represented.

##### **4.2. Some genes are differentially expressed in SGECs from pSS compared to controls and their expression is not modified after stimulation.**

The comparison between unstimulated SGECs from pSS and controls highlighted several interesting genes as mentioned above, including *CFTR*, *COL3A1*, *COL1A2*, *ADAMTS2*, *ADMATS12* and *ADAMTS16*. Interestingly, the different stimulations had no effect on the expression of these genes and the differences between pSS and controls were maintained (**Figure 6**).

## DISCUSSION

The comparison between primary cultured SGECs from pSS and controls without any stimulation highlighted several interesting genes. The pathways identified by the enrichment analysis were different from the pathways we identified in the RNA-seq analysis from *ex vivo* sorted SGECs comparing pSS and controls. Of note, there were fewer immune response related genes. This was not very surprising given that the SGECs analyzed in this study were cultured for 2 to 3 weeks. However, we still identified differentially expressed genes between pSS and controls including genes involved in the extracellular matrix formation and fibrosis as *ADAMTS* genes and collagen genes. Moreover, the expression of some differentially expressed genes between pSS and controls, such as *CFTR*, *COL1A*, *COL3A*, *ADAMTS2*, *ADAMTS12*, *ADAMTS16*, *AQP6* was not affected by the poly(I:C), IFN $\gamma$  and IFN $\alpha$  stimulations, and the differential expression between pSS and controls was maintained under the different stimulations. We hypothesize that these genes might be representative of inherent abnormalities of SGECs which are not submitted to the environmental stimuli. The upregulation of several collagen genes suggested a role for SGECs in salivary gland fibrosis induction. Leehan *et al.* showed that pSS subjects had significantly more fibrotic tissue in their MSG than controls. This salivary gland fibrosis was related to focus score and was not solely attributable to age (4). Moreover, there was an upregulation of several *ADAMTS* gene expression. These genes code for complex extracellular proteases that can be secreted by cancer and stromal cells and contribute to modify the tumor microenvironment. *ADAMTS* enzymes can cleave or interact with a wide range of extracellular matrix components or regulatory factors, and therefore affect cell adhesion, migration, proliferation and angiogenesis (5). These results support the hypothesis of a role for SGECs in salivary gland fibrosis development, which deserve to be further explored. The mechanism of saliva secretion defect during pSS is still not well understood. We observed a downregulation of the *AQP6* gene. Aquaporins are small membrane proteins which function as water channels in cells. The molecular mechanisms of saliva secretion involve acinar cells, which secrete a large volume of isotonic-like fluid rich in NaCl. The generation of a trans-epithelial osmotic gradient drives water flow through apical *AQP5* and possibly paracellular pathways. Modifications in *AQPs* expression and/or distribution have been reported in xerostomic conditions (6). A potential role of *AQP5* abnormal localization on saliva secretion in pSS has already been described (7). Moreover, the presence of anti-*AQP5* antibodies has been described in pSS patients and was associated with serologic and histopathological features of pSS (8). Of note, *AQP6* is usually described in kidney and its potential involvement in pSS pathophysiology has, to our knowledge, never been described.

Surprisingly, *CFTR* (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) gene which codes for an ABC transporter-class ion channel protein that conducts chloride ions across epithelial cell membranes was

upregulated in SGECs from pSS compared to controls. Mutations of this gene lead to a dysregulation of epithelial fluid transport in the lung, pancreas and other organs, resulting in cystic fibrosis. Mei Zeng et al. showed, in a NOD mice model, that treatment with C18, a CFTR corrector, restored salivation, rescued CFTR expression and localization, and nearly eliminated the inflammation and tissue damage (9). The *CFTR* upregulation we observed in pSS could be reactive to the salivary gland damage and hypofunction.

Lastly, the *androgen receptor* (AR) gene was upregulated in pSS compared to controls. Steroid hormone receptors are ligand-activated transcription factors that regulate gene expression and affect cellular proliferation and differentiation in target tissues. In the innate immunity, the interaction androgen/AR is required for function of neutrophils; androgen/AR also regulates wound healing processes through macrophage recruitment and pro-inflammatory cytokine production. In adaptive immunity, androgen/AR exerts suppressive effects on development and activation of T and B cells. The androgen/AR axis plays distinct roles in individual immune cells, and targeting androgen/AR may help in treatment and management of immune-related diseases (10). The involvement of sex hormones in pSS pathophysiology has been suspected, however, the role of androgen receptor need to be further explored.

Interestingly, these RNA-seq results on stimulated SGECs showed a higher effect of the poly(I:C) stimulation in term of differentially expressed genes number between pSS and controls compared to the other stimuli (IFN $\gamma$  and IFN $\alpha$ ). As we previously showed a higher effect of SGECs on B lymphocytes survival when stimulated with poly(I:C), we looked at the expression of the different factors we suspected to be involved in SGECs and B cells interactions. The RNA-seq analysis of cultured SGECs after 24 hours of stimulation with poly(I:C) was congruent with the results we obtained after 5 days of SGECs culture (Article 1). We observed that poly(I:C) stimulation of SGECs induced an upregulation of IFN induced genes (such as *MX1*, *OAS1*, *IFI6* and *IFI35*). Moreover, poly(I:C) stimulation induced an upregulation of *CXCL10*, *CXCL11*, *CD40* and several class I and class II *HLA* molecules which are involved in T cells chemotactic and interactions. Several genes involved in B cells activation such as *BAFF* and *BST2* were also upregulated. Lastly, the upregulation of *TLR3*, *BST2* and *OAS1* highlighted a role for innate immunity reaction. Of note, IFN $\gamma$  and IFN $\alpha$  stimulations had a lower effect in term of number of differentially expressed genes than the poly(I:C) stimulation.

The comparison between pSS and controls in the different conditions of stimulation, also highlighted a higher number of differentially expressed genes in the condition stimulated with poly(I:C) compared to the IFN stimulated conditions. These results might suggest a higher sensitivity of SGECs from pSS compared to controls to poly(I:C) compared to the IFN stimuli. However, looking more precisely to

*TLR3* expression, there was no differential expression between pSS and controls at baseline (**Figure 6**). Of note, we observed that poly(I:C) stimulation was, as the IFNs stimulations, responsible of the induction of IFN signaling pathways. The involvement of *TLR3* pathway in pSS has been highlighted in animal models. The activation of TLRs in both animals with a genetic predisposition to develop auto-immune disease, as well as in healthy animals, results in Sjögren's-like disease. For example, the NZB/WF1 strain is a Sjögren's mice model which develops spontaneous lupus and Sjögren's syndrome (11). When NZB/WF1 mice are given poly(I:C), they develop Sjögren's-like disease at an accelerated rate. Furthermore, *TLR3* agonism upregulated type I IFN (*IFN $\beta$* ) and IFN-responsive genes and inflammatory mediators in salivary gland tissue, including *IL6*, *IL1 $\beta$* , and *CCL5* (12), (13). *TLR* activation in healthy mice also leads to the development of Sjögren's syndrome; C57BL/6 mice given the *TLR* agonists, lipopolysaccharide or poly(I:C), display loss of salivary and tear flow and increased expression of pro-inflammatory cytokines in submandibular salivary glands and lacrimal tissue (14).

Lastly, one of the pathways highlighted in the comparison between pSS and controls under poly(I:C) stimulation was the *IL15* signaling pathway. *IL15* is a pro-inflammatory cytokine that is presented on the cell surface under conditions of stress and inflammation (15). Interestingly, *IL15* has been described in active coeliac disease and is upregulated in both the lamina propria and in intestinal epithelial cells. *IL15* has a role in the expansion of intestinal epithelial lymphocytes with a cytotoxic phenotype (16). The comparison between pSS and other auto-immune diseases affecting epithelial cells could provide interesting perspectives for pathophysiological mechanisms understanding and therapeutic axis.

The differentially expressed genes identified in this RNA-seq analysis need to be confirmed by qPCR. These results open the perspective of new potential pathogenic pathways involved in pSS, suggesting the involvement of SGEs in extracellular matrix and fibrosis constitution. Moreover, these results emphasized the differential effects of poly(I:C), *IFN $\gamma$*  and *IFN $\alpha$*  stimulations on SGEs.

## REFERENCES

1. Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM, et al. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for primary Sjögren's syndrome: A consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(1):9-16.
2. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis*. 2002;61(6):554-8.

3. Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Abu-Helu RF, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Establishment of a convenient system for the long-term culture and study of non-neoplastic human salivary gland epithelial cells. *Eur J Oral Sci.* 2002;110(1):21-30.
4. Leehan KM, Pezant NP, Rasmussen A, Grundahl K, Moore JS, Radfar L, et al. Minor salivary gland fibrosis in Sjögren's syndrome is elevated, associated with focus score and not solely a consequence of aging. *Clin Exp Rheumatol.* 2018;36 Suppl 112(3):80-8.
5. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(12):786-801.
6. Delporte C, Steinfeld S. Distribution and roles of aquaporins in salivary glands. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1758(8):1061-70.
7. Yoshimura S, Nakamura H, Horai Y, Nakajima H, Shiraishi H, Hayashi T, et al. Abnormal distribution of AQP5 in labial salivary glands is associated with poor saliva secretion in patients with Sjögren's syndrome including neuromyelitis optica complicated patients. *Mod Rheumatol.* 2016;26(3):384-90.
8. Jeon S, Lee J, Park S-H, Kim H-D, Choi Y. Associations of Anti-Aquaporin 5 Autoantibodies with Serologic and Histopathological Features of Sjögren's Syndrome. *J Clin Med.* 2019;8(11).
9. Zeng M, Szymczak M, Ahuja M, Zheng C, Yin H, Swaim W, et al. Restoration of CFTR Activity in Ducts Rescues Acinar Cell Function and Reduces Inflammation in Pancreatic and Salivary Glands of Mice. *Gastroenterology.* 2017;153(4):1148-59.
10. Lai J-J, Lai K-P, Zeng W, Chuang K-H, Altuwaijri S, Chang C. Androgen receptor influences on body defense system via modulation of innate and adaptive immune systems: lessons from conditional AR knockout mice. *Am J Pathol.* 2012;181(5):1504-12.
11. van Blokland SCA, Versnel MA. Pathogenesis of Sjögren's syndrome: characteristics of different mouse models for autoimmune exocrinopathy. *Clin Immunol Orlando Fla.* 2002;103(2):111-24.
12. Deshmukh US, Nandula SR, Thimmalapura P-R, Scindia YM, Bagavant H. Activation of innate immune responses through Toll-like receptor 3 causes a rapid loss of salivary gland function. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol.* 2009;38(1):42-7.
13. Nandula S-R, Scindia YM, Dey P, Bagavant H, Deshmukh US. Activation of innate immunity accelerates sialoadenitis in a mouse model for Sjögren's syndrome-like disease. *Oral Dis.* 2011;17(8):801-7.
14. Nandula S-R, Dey P, Corbin KL, Nunemaker CS, Bagavant H, Deshmukh US. Salivary gland hypofunction induced by activation of innate immunity is dependent on type I interferon signaling. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol.* 2013;42(1):66-72.
15. Jabri B, Abadie V. IL-15 functions as a danger signal to regulate tissue-resident T cells and tissue destruction. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(12):771-83.
16. Setty M, Discepolo V, Abadie V, Kamhawi S, Mayassi T, Kent A, et al. Distinct and Synergistic Contributions of Epithelial Stress and Adaptive Immunity to Functions of Intraepithelial Killer Cells and Active Celiac Disease. *Gastroenterology.* 2015;149(3):681-691.e10.

**Table 1: Characteristics of the patients included in the study**

	<b>RNA-seq experiments on primary cultured SGECs</b>	
	<b>pSS (n=5)</b>	<b>control (n=5)</b>
<b>Median age (min-max)</b>	31 (23-53)	52 (34-56)
<b>Female sex, n (%)</b>	5 (100)	5 (100)
<b>Pathologic Schirmer</b>	2 (50)	2 (50)
<b>Pathologic salivary flow</b>	0 (0)	0 (0)
<b>Focus score <math>\geq</math> 1, n (%)</b>	5 (100)	0 (0)
<b>SSA, n (%)</b>	5 (100)	0 (0)
<b>Mean ESSDAI (min-max)</b>	4 (2-10)	

**Table 2: Enrichment pathway analysis of primary cultured SGECs from pSS compared to controls in different conditions of stimulation.** Selection of the 10 most significant when more than 10 pathways were defined.

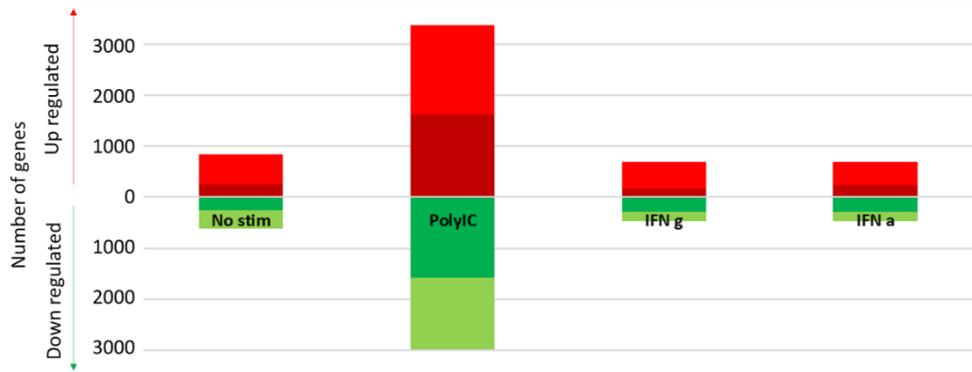
<b>Ingenuity Canonical Pathways</b>	<b>-log(p-value)</b>
<b>Comparison between unstimulated pSS and controls SGECs</b>	
Inhibition of Matrix Metalloproteases	3.85
Stearate Biosynthesis I (Animals)	3.46
Glycine Biosynthesis I	2.76
Superpathway of Serine and Glycine Biosynthesis I	2.65
$\gamma$ -linolenate Biosynthesis II (Animals)	2.34
Mitochondrial L-carnitine Shuttle Pathway	2.34
Folate Transformations I	2.3
Glycine Betaine Degradation	2.16
GP6 Signaling Pathway	2.06
Acyl-CoA Hydrolysis	2.03
<b>Comparison between poly(I:C) stimulated pSS and controls SGECs</b>	
IL15 Production	6.46
Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	5.69
Ephrin Receptor Signaling	5.4
Colorectal Cancer Metastasis Signaling	5.07
fMLP Signaling in Neutrophils	4.76
TNFR2 Signaling	4.58
Sirtuin Signaling Pathway	4.54
JAK/Stat Signaling	4.37
Protein Ubiquitination Pathway	4.34
Purine Nucleotides De Novo Biosynthesis II	4.31
<b>Comparison between IFN<math>\gamma</math> stimulated pSS and controls SGECs</b>	
Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	5.03
Superpathway of Serine and Glycine Biosynthesis I	4.44
Serine Biosynthesis	3.48
Heparan Sulfate Biosynthesis	2.91
Inhibition of Matrix Metalloproteases	2.87
Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	2.69
Atherosclerosis Signaling	2.12
<b>Comparison between IFN<math>\alpha</math> stimulated pSS and controls SGECs</b>	
Mitochondrial Dysfunction	4.42
Oxidative Phosphorylation	4.38
Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	3.86
PPAR Signaling	3.01
Inhibition of Matrix Metalloproteases	2.83
Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	2.65
VDR/RXR Activation	2.39
Neuroinflammation Signaling Pathway	2.22

**Table 3: Enrichment pathway analysis of primary cultured SGECs from pSS stimulated with poly(I:C), IFN $\gamma$  or IFN $\alpha$  and compared to the unstimulated condition.** Selection of the 10 most significant when more than 10 pathways were defined.

<b>Ingenuity Canonical Pathways</b>	<b>-log(p-value)</b>
<b>Comparison between poly(I:C) stimulated and unstimulated SGECs from pSS</b>	
Interferon Signaling	7.23
Neuroinflammation Signaling Pathway	6.8
Granulocyte Adhesion and Diapedesis	6.08
Agranulocyte Adhesion and Diapedesis	5.95
EIF2 Signaling	5.94
Osteoarthritis Pathway	5.94
Th1 and Th2 Activation Pathway	5.5
Th1 Pathway	5.5
Tec Kinase Signaling	5.18
Leukocyte Extravasation Signaling	5.03
<b>Comparison between IFN<math>\gamma</math> stimulated and unstimulated SGECs from pSS</b>	
Antigen Presentation Pathway	11.9
Interferon Signaling	9.82
Type I Diabetes Mellitus Signaling	4.48
Inflammasome pathway	4.39
Death Receptor Signaling	4.28
T Helper Cell Differentiation	3.89
Neuroinflammation Signaling Pathway	3.84
OX40 Signaling Pathway	3.47
Cdc42 Signaling	3.35
Th1 Pathway	3.26
<b>Comparison between IFN<math>\alpha</math> stimulated and unstimulated SGECs from pSS</b>	
EIF2 Signaling	13.4
Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling	7.67
Interferon Signaling	7.46
mTOR Signaling	7.39
Death Receptor Signaling	4.75
$\alpha$ -Adrenergic Signaling	4.73
ILK Signaling	4.66
Polyamine Regulation in Colon Cancer	4.41
Antigen Presentation Pathway	4.14
Fc $\gamma$ Receptor-mediated Phagocytosis in Macrophages and Monocytes	3.82

**Table 4: Enrichment pathway analysis of primary cultured SGECs from controls stimulated with poly(I:C), IFN $\gamma$  or IFN $\alpha$  and compared to the unstimulated condition.**

<b>Ingenuity Canonical Pathways</b>	<b>-log(p-value)</b>
<b>Comparison between poly(I:C) stimulated and unstimulated SGECs from controls</b>	
Granulocyte Adhesion and Diapedesis	12.1
Neuroinflammation Signaling Pathway	9.56
Th1 Pathway	8.32
Agranulocyte Adhesion and Diapedesis	8.29
Th1 and Th2 Activation Pathway	7.76
Interferon Signaling	7.65
Osteoarthritis Pathway	7.51
Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	7.46
Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	6.3
NF- $\kappa$ B Signaling	6.17
<b>Comparison between IFN<math>\gamma</math> stimulated and unstimulated SGECs from controls</b>	
Antigen Presentation Pathway	12.4
Interferon Signaling	9.17
Death Receptor Signaling	6.33
T Helper Cell Differentiation	5.17
Protein Ubiquitination Pathway	4.61
Th1 and Th2 Activation Pathway	4.35
Allograft Rejection Signaling	4.28
OX40 Signaling Pathway	4.26
Inflammasome pathway	4.26
Neuroinflammation Signaling Pathway	4.25
<b>Comparison between IFN<math>\alpha</math> stimulated and unstimulated SGECs from controls</b>	
EIF2 Signaling	16.6
Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling	8.4
Interferon Signaling	7.43
mTOR Signaling	6.82
Mitochondrial Dysfunction	6.36
Antigen Presentation Pathway	6.12
Remodeling of Epithelial Adherens Junctions	5.81
Oxidative Phosphorylation	5.67
Huntington's Disease Signaling	5.57
ILK Signaling	5.38

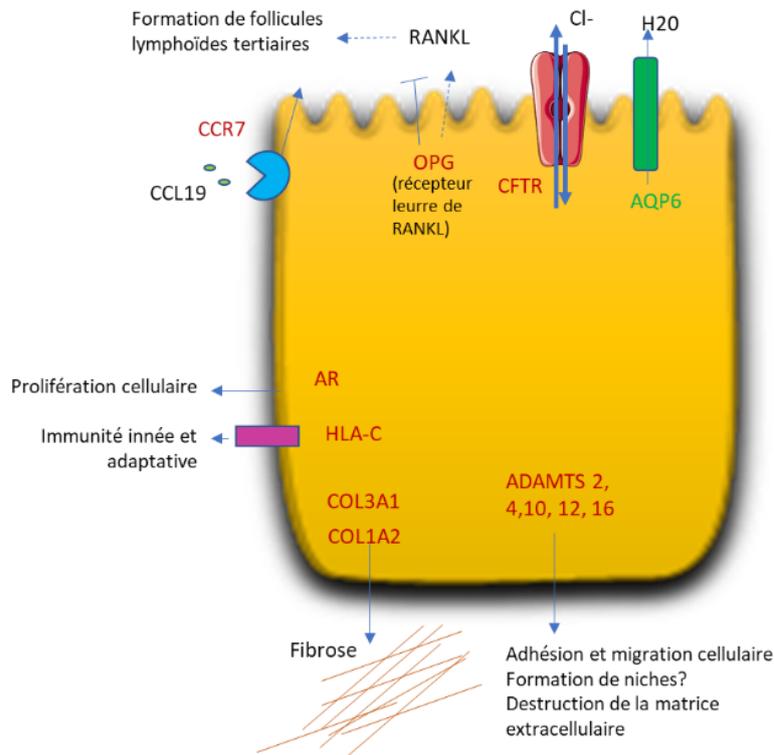
**A****B****C**

- Up regulated genes no FC cut off
- Up regulated genes FC > 1.5
- Down regulated genes FC < 1.5
- Down regulated genes no FC cut off

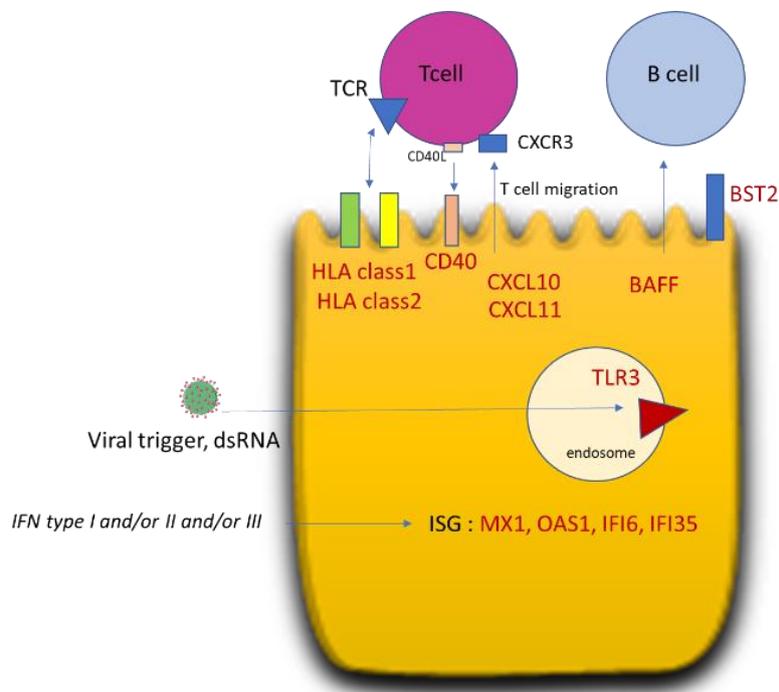
**Figure 1: Graphical representation of the number of differentially expressed genes A:** between the pSS patients and controls in the different conditions of stimulation. **B:** between the stimulated conditions and the unstimulated condition in pSS patients. **C:** between the stimulated conditions and the unstimulated condition in controls.



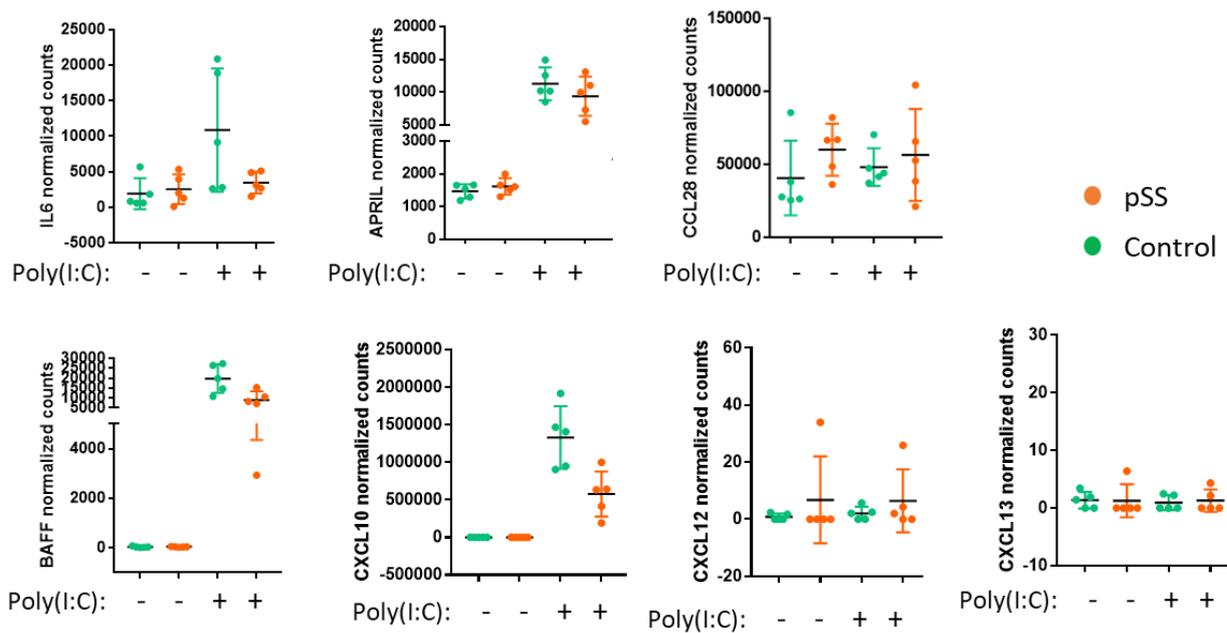
**A**



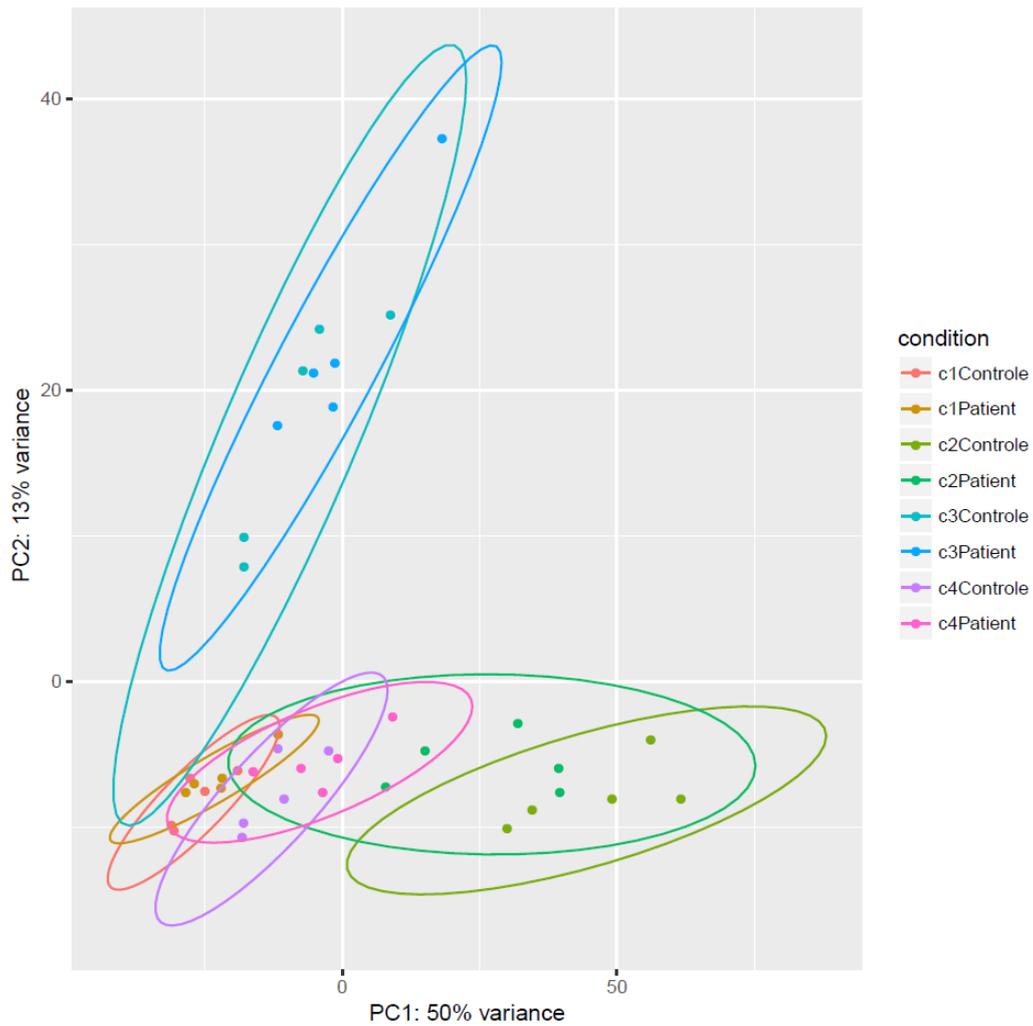
**B**



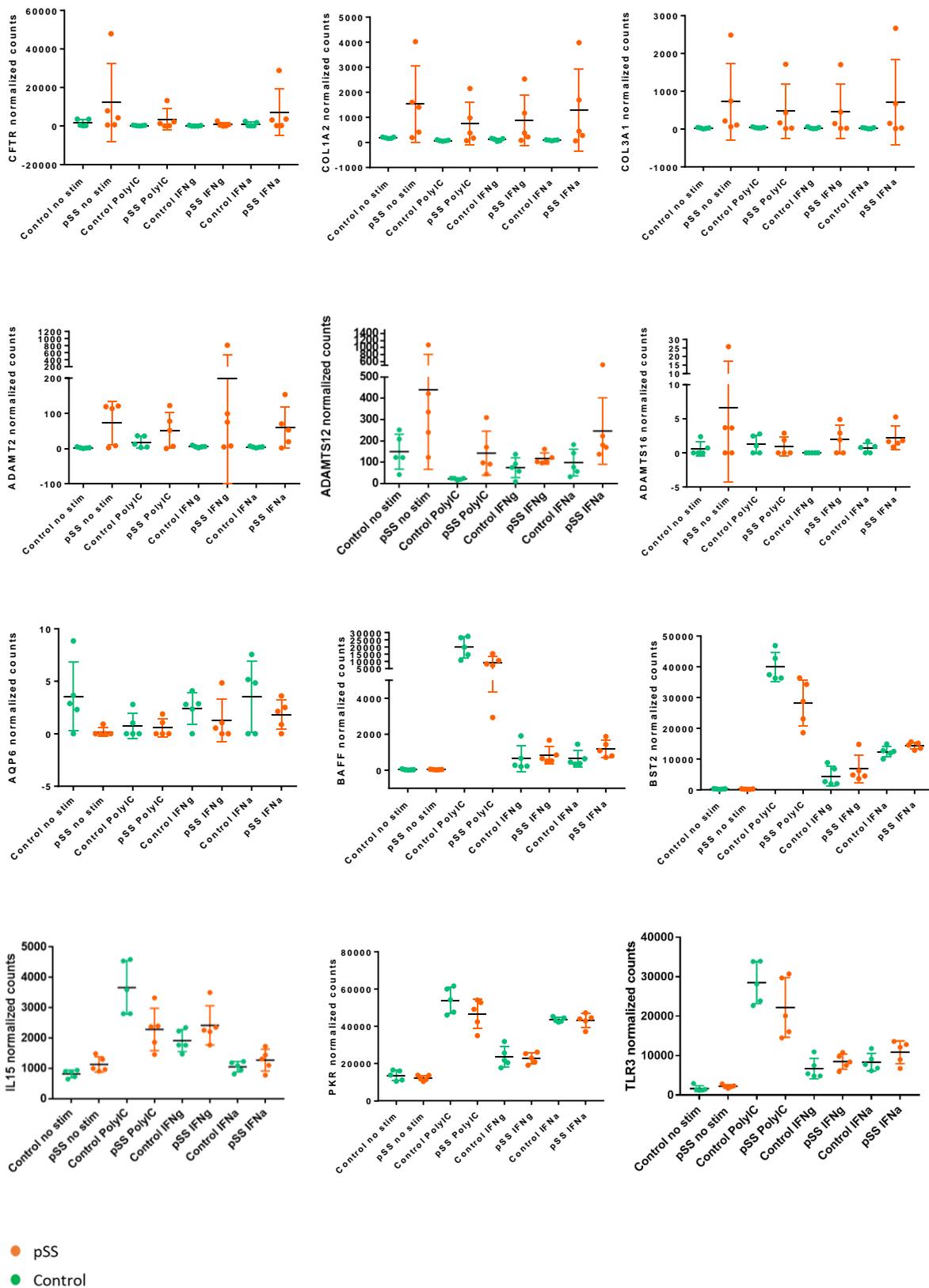
**Figure 3A:** Schematic representation of the differentially expressed genes between **A:** pSS and controls in primary cultured SGECs unstimulated. **B:** Interesting differentially expressed genes between poly(I:C) stimulated SGECs compared to the unstimulated condition in pSS.



**Figure 4: Normalized expression of IL6, APRIL, CCL28, BAFF, CXCL10, CXCL12 and CXCL13 in cultured SGECs unstimulated or with poly(I:C) stimulation. In green are represented the controls and in orange the pSS.**



**Figure 5: Principal component analysis showing the similarities between transcriptomic profiles.** PCA of the pSS and controls samples in the conditions: unstimulated (C1), stimulated with poly(I:C) (C2), stimulated with IFN $\gamma$  (C3) and stimulated with IFN $\alpha$  (C4). Each dot corresponds to a transcriptomic profile and the distances between the dots are proportional to the transcriptomic distances computed based on the list of all differentially expressed gene.



**Figure 6: Normalized number of counts of CFTR, COL1A2, COL3A1, ADAMT2, ADAMTS12, ADAMTS16, AQP6, BAFF, BST2, IL15,PKR, TLR3 in primary cultured SGECs, in presence or absence of poly(I:C), IFN $\gamma$  or IFN $\alpha$ . In green are represented the controls and in orange the pSS.**

### C.III.2. Principaux messages

L'analyse transcriptomique de CES cultivées à partir de biopsies de glandes salivaires de patients SSp et de sujets contrôles, stimulées ou non par poly(I:C), IFN $\alpha$  ou IFN $\gamma$  a permis d'identifier des gènes et voies de signalisation potentiellement impliqués dans la physiopathologie du SSp. De plus, cette analyse a permis de comparer l'effet de plusieurs stimuli différents sur les CES.

1. Les gènes identifiés comme différentiellement exprimés entre SSp et contrôles au cours de cette analyse transcriptomique sont différents de ceux identifiés dans les CES triées, *ex vivo*, à partir des biopsies de glandes salivaires.

2. La comparaison de CES non stimulées entre SSp et contrôles a montré une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la formation de la matrice extracellulaire tels que *COL3A1*, *COL1A2*, *ADAMTS2*, *ADAMTS12* et *ADAMTS16*. La différence d'expression entre SSp et contrôles persiste indépendamment des différents stimuli. De plus, il existe aussi une expression différentielle de certains gènes potentiellement impliqués dans la sécrétion salivaire, tels que *CFTR* et *AQP6*.

3. La stimulation par poly(I:C) est responsable de l'induction d'un plus grand nombre de gènes différentiellement exprimés par rapport à la condition sans stimulation, que les stimulations par IFN $\gamma$  ou IFN $\alpha$ .

4. La stimulation par poly(I:C), comme les stimulations par IFN $\gamma$  et IFN $\alpha$ , induit un enrichissement de la voie de signalisation IFN. De plus, la stimulation par poly(I:C) est responsable de l'induction de l'expression de gènes impliqués dans le chimiotactisme des LT et leur activation (*CXCL10*, *CXCL11*, *CD40*) ainsi que les interactions avec les LB (*BAFF*). De plus, elle induit l'expression de gènes impliqués dans l'immunité innée (*TLR3*) ainsi qu'une surexpression de molécules HLA.

## D. DISCUSSION

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence un rôle pathogène clé des CES au cours du SSp. Nous avons ainsi pu démontrer leur rôle de soutien pour la survie et l'activation lymphocytaire B. Nous avons également pu démontrer l'existence d'une boucle d'activation entre CES et LT passant par un axe IL7-IFN et pouvant participer à l'activation lymphocytaire intra-tissulaire. Nous avons choisi de centrer la discussion sur ces concepts :

- Anomalies des CES au cours du SSp : réponse à des stimuli extrinsèques ou anomalies intrinsèques ?
- Autres modèles d'épithélites auto-immunes ;
- Avantages et limites des modèles de culture primaire et de co-cultures ;
- Perspectives thérapeutiques soulevées par ces résultats.

### D.I. Rôle actif des CES dans la physiopathologie du SSp

Ce travail conforte le rôle actif des CES dans la physiopathologie du SSp. Ces CES ne sont pas seulement des victimes passives de l'auto-immunité au cours de la maladie mais participent activement à son développement et à son maintien. Nous avons pu montrer que les CES sont capables d'interagir avec les LB et les LT dans des modèles *in vitro*. Ce travail de thèse permet d'avancer dans la compréhension de l'origine des anomalies des CES au cours du SSp avec une part liée à divers stimuli extrinsèques, mais également un rôle majeur d'anomalies intrinsèques aux CES chez les patients SSp.

#### D.I.1. Stimuli extrinsèques

Parmi les stimuli extrinsèques potentiellement responsables d'une activation des CES, des agents infectieux viraux ont été recherchés. Une infection virale pourrait en effet induire une réponse IFN telle qu'elle est observée au cours du SSp. Cependant, comme nous l'avons détaillé en introduction, aucune association causale n'a pu être démontrée entre un virus et la survenue du SSp jusqu'à maintenant.

D'autres facteurs extrinsèques potentiellement impliqués dans l'activation des CES sont les complexes immuns. La formation de ces complexes est due à la production d'auto-Ac dirigés contre une grande variété d'auto-Ag, dont beaucoup sont des complexes de protéines et d'acides nucléiques. Des exemples d'auto-Ag sont les protéines SSA et SSB qui peuvent s'associer avec des petits ARN non-codants (hY1RNA), ou encore les snRNP tels que U1-snRNP qui forme un complexe avec le U1-snRNA

(small nuclear RNA). Lövgren *et al.* ont montré que les hY1RNA et U1-snRNA sont capables d'induire la production d'IFN $\alpha$  par des monocytes mais pas par des pDCs. En revanche, la stimulation de pDCs par des complexes immuns IgG-U1 snRNA est capable d'induire la production d'IFN $\alpha$  (203). De plus, Hung *et al.*, ont pu montrer que des complexes immuns anti-Ro60 /Ro60/Alu pourraient participer à l'activation des LB et des cellules dendritiques (78). Ainsi, des auto-Ag associés à des séquences d'ARN peuvent former des complexes immuns responsables de l'induction de la production d'IFN par les pDCs et pourraient jouer un rôle dans la physiopathologie du SSp.

Les microparticules pourraient représenter un autre type de stimulus potentiel. Les microparticules sont des fragments de membrane plasmique détachés de cellules activées. Elles appartiennent à la famille des vésicules circulantes, incluant également les corps apoptotiques et les exosomes. Une augmentation des taux plasmatiques de microparticules a été mise en évidence chez les patients atteints de SSp, de PR et de LES par rapport à des sujets contrôles (204). Ces microparticules pourraient, notamment, jouer un rôle dans l'activation des cellules stromales. Au cours de la PR, il a été par exemple montré qu'elles sont capables d'activer les fibroblastes synoviaux (205). Le rôle des microparticules au cours du SSp reste à déterminer, une hypothèse serait qu'elles puissent activer les CES.

## D.1.2. Anomalies intrinsèques

### D.1.2.a. Les CES et la matrice extracellulaire

L'analyse transcriptomique de CES en culture primaire a montré que les CES de patients SSp surexprimaient certains gènes potentiellement impliqués dans la formation ou la destruction de la matrice extra-cellulaire tels que les gènes de la famille du collagène ou des métalloprotéinases. De façon intéressante, l'expression différentielle de ces gènes entre SSp et contrôles n'était pas impactée par les différents stimuli (poly(I:C), IFN $\gamma$  et IFN $\alpha$ ). Une hypothèse est que les CES pourraient jouer un rôle voisin de celui des fibroblastes dans la synthèse et le remodelage de la matrice extra-cellulaire. Les CES pourraient, par exemple, participer à la formation de la fibrose parfois observée dans les glandes salivaires au cours du SSp. La fibrose ne constitue pas un élément diagnostique pour le SSp mais il a été montré qu'elle était associée au focus score (206).

Par ailleurs, des altérations structurales des canaux ductaux et des acini ainsi que des modifications de l'expression et de l'activation des métalloprotéinases ont été décrites au cours du SSp (207). Les métalloprotéinases sont notamment impliquées dans le remodelage de la membrane basale. Ainsi, une altération de la membrane basale et de la polarisation cellulaire pourrait précéder l'infiltration lymphocytaire périductale (208). Le remodelage de la matrice extra-cellulaire pourrait notamment

permettre la formation de niches de soutien pour les LB et les plasmocytes. Des expériences fonctionnelles complémentaires seraient nécessaires pour étudier le rôle des CES sur la matrice extracellulaire. De façon intéressante, l'une des observations faites sur les altérations de polarisation cellulaire est la perte de la localisation apicale de l'AQP5 (209). L'expression de l'AQP5 est régulée par BMP6 (bone morphogenetic protein 6), protéine impliquée dans le défaut de fonction des glandes salivaires et l'augmentation de l'infiltrat lymphocytaire chez la souris. Nous avons observé une diminution de l'expression d'une autre aquaporine, l'AQP6 dans les CES de patients SSp. Un travail de Lai et al. a montré, dans un modèle murin (souris C57BL6 transfectées par BMP6), que la restauration de la perméabilité à l'eau des glandes salivaires, en induisant l'expression de AQP1 par thérapie génique, permettait d'améliorer la fonction sécrétrice de la glande ainsi que l'inflammation locale (210). Enfin, nous avons observé une augmentation de l'expression du gène *CFTR* dans les CES de patient SSp par rapport aux sujets contrôle. L'étude plus précise de la fonctionnalité des canaux chlore au cours du SSp pourrait être intéressante. Il a, en effet, été montré dans un modèle murin NOD que le traitement par C18, correcteur de la fonction de CFTR, permettait d'augmenter la production de salive et diminuait l'inflammation et les dommages tissulaires (211).

Ainsi, il semble exister des liens étroits entre les CES, la fonction des différents canaux impliqués dans la sécrétion salivaire et les modifications tissulaires au cours du SSp.

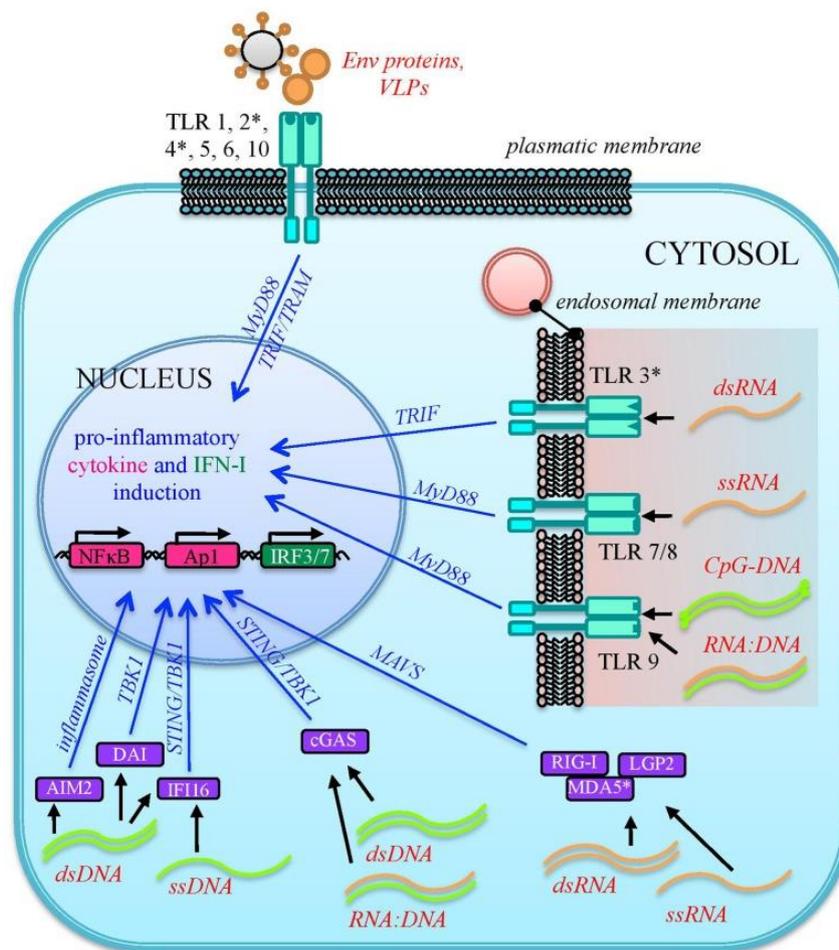
#### D.1.2.b. Expression des séquences endogènes rétrovirales

Nous avons mis en évidence une surexpression de gènes IFN-induits dans les CES de patients SSp par rapport aux sujets contrôles. Parmi les gènes IFN-induits différenciellement exprimés, *BST2* (Bone marrow stromal Antigen 2) est un gène codant pour une protéine transmembranaire, appelée tetherin. Cette protéine est connue pour son rôle d'inhibiteur de la diffusion de particules rétrovirales au cours du VIH, notamment, en empêchant les particules virales de se détacher des cellules infectées (212). Elle a initialement été identifiée dans le myélome multiple, exprimée par les LB au stade de différenciation terminale (213). De plus, son expression par des cellules stromales de la moelle osseuse a été rapportée et il a été montré qu'elle pouvait jouer un rôle dans la croissance lymphocytaire pré-B (214). Nous nous sommes interrogés sur le fait que la surexpression de *BST2* pouvait avoir un lien avec la surexpression des séquences endogènes virales. Néanmoins, ce lien n'a pas pu être établi au cours de notre travail et l'une des hypothèses alternatives serait que la surexpression de *BST2* soit le reflet de la signature IFN. Un travail récent de Chen *et al.* a mis en évidence une augmentation de l'expression de l'ARN de *BST2* dans les glandes salivaires de patients SSp ainsi qu'une augmentation de l'expression de la protéine en immunohistochimie au sein de lymphocytes infiltrants et des cellules épithéliales

ductales (215). L'augmentation de l'expression de *BST2* au sein des CES n'est peut-être qu'une conséquence de l'activation IFN. Néanmoins, on peut s'interroger sur les conséquences fonctionnelles de la surexpression de *BST2*. Ainsi, il serait intéressant de déterminer si *BST2* joue un rôle dans l'inhibition du relargage de particules rétrovirales dans les CES. En effet, une hypothèse serait que *BST2* soit responsable du maintien de séquences endogènes virales à l'intérieur des CES qui sont alors détectées par les senseurs intra-cellulaires et conduisent à l'induction d'une réponse IFN.

Le facteur déclenchant responsable de la signature IFN au cours du SSp n'est pas identifié. L'expression de séquences endogènes rétrovirales pourrait jouer un rôle dans l'activation de la réponse IFN. Ces séquences sont capables d'activer certains senseurs cellulaires impliqués dans l'activation des LT et des LB (102). Cependant, la recherche d'expression de séquences endogènes virales menée dans les CES triées à partir de glandes salivaires n'a pas permis de mettre en évidence de différence d'expression entre SSp et contrôles. Cette analyse a été réalisée sur un petit nombre d'échantillons (5 SSp et 4 contrôles), ce qui a pu être à l'origine d'un manque de puissance. Une autre hypothèse intéressante serait qu'il existe une surexpression de séquences endogènes virales dans les LB des glandes salivaires et du sang périphérique. Là encore, l'analyse n'a pas permis de mettre en évidence de différence entre les LB de patients SSp et de contrôles.

S'il n'existe pas de différence d'expression de séquences endogènes virales, une différence d'expression des senseurs pourrait, elle aussi, conduire à la suractivation des voies à l'origine de la signature IFN. Les séquences endogènes rétrovirales humaines peuvent coder pour des protéines qui, d'un point de vue immunologique sont à la frontière entre molécules du soi et Ag microbiens. Les molécules dérivées de l'expression des séquences endogènes virales peuvent ainsi, en fonction du type cellulaire dans lequel elles sont exprimées, être tolérées par le système immunitaire ou, au contraire, stimuler la réponse immunologique. Globalement, les voies de l'immunité innée activées par les molécules dérivées des séquences endogènes virales sont proches de celles impliquées dans la défense antivirale. On distingue les PRR (pattern recognition receptors) transmembranaires, tels que les TLRs, et les PRR présents dans le cytosol (216) (**Figure 14**). Ces récepteurs initient alors la transduction du signal qui résulte en une production d'IFN de type I et III et de cytokines pro-inflammatoires conduisant ensuite à une réponse immune adaptative (217). Dans l'hypothèse d'une dérégulation de ces PRR, nous avons regardé l'expression de certains TLRs tels que *TLR3* et *TLR7* par les CES. Le *TLR3* était exprimé par les CES, avec une tendance, non significative, pour une plus forte expression par les CES de SSp par rapport aux sujets contrôles (**Figure 12**). L'expression du *TLR7* n'était pas différente entre les CES de SSp et de sujets contrôles. Enfin, il n'y avait pas de différence d'expression de *RIG1* et *MDA5* entre CES de patients SSp et de sujets contrôles (**Figure 12**).

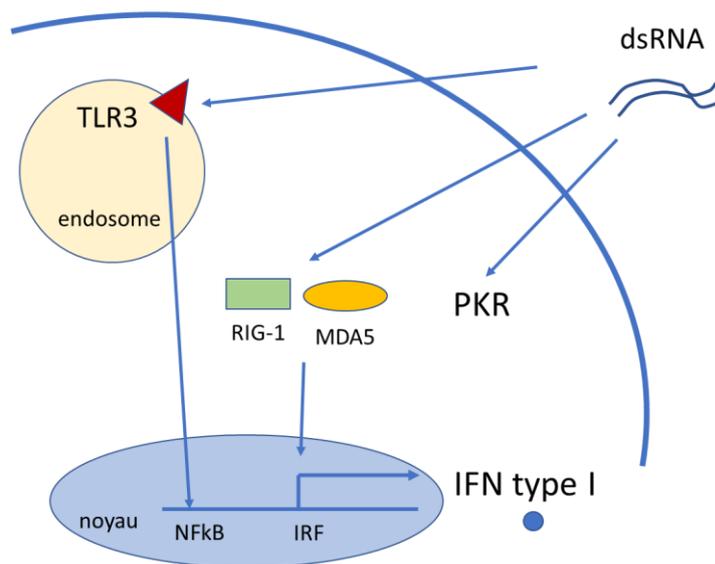


**Figure 1: Reconnaissance des molécules dérivées de l'expression des HERVs par les PRR (pattern recognition receptors).** Différentes protéines et acides nucléiques provenant des HERV peuvent théoriquement être détectés comme des PAMPs ou DAMPs par les senseurs transmembranaires ou cytosoliques. La reconnaissance de ces molécules virales par les PRR active une cascade de signalisation qui conduit à l'activation de la transcription de gènes codant pour des effecteurs pro-inflammatoires, représentés par des cytokines et l'IFN de type I. Les PRR pour lesquels une interaction directe avec des molécules dérivées des HERV a été décrite sont marqués par un astérisque.

#### D.I.2.c. Hyperréactivité des CES aux stimuli exogènes

Nous avons observé que la capacité des CES de SSp à augmenter la survie des LB était augmentée par une stimulation par poly(I:C), tandis que les stimulations par IFN $\alpha$  ou IFN $\gamma$  n'induisaient pas de différence par rapport à la condition non stimulée. Le poly(I:C) est un analogue synthétique d'ARN double brin, reconnu par le TLR3, RIG-I/MDA5 et PKR (Protein kinase RNA-activated). Sa

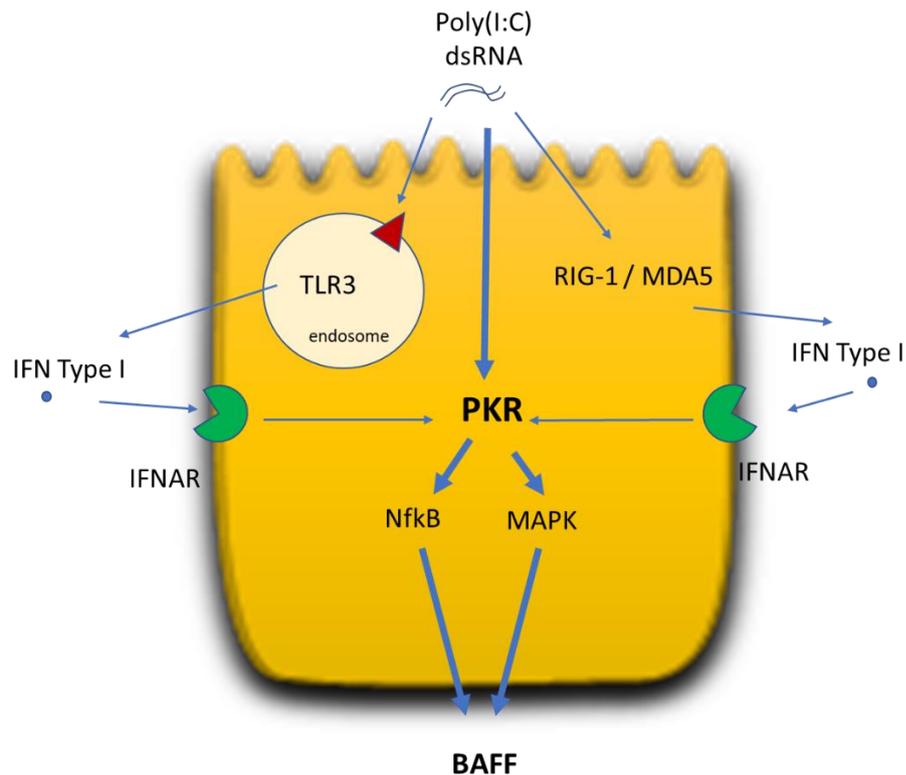
reconnaissance est à l'origine de l'activation de plusieurs voies de signalisation antivirales et pro-inflammatoires, incluant NFκB et IRF. L'activation de IRF induit la transcription d'IFN de type I qui se lie à son récepteur et conduit à l'activation de la transcription de gènes IFN-induits, tels que IRF7. IRF7 stimule ensuite la transcription des IFNα et IFNβ, ce qui constitue une boucle d'auto-amplification (218) (Figure 15).



**Figure 2: Les cibles de l'ARN double brin** (d'après Levitski) (218). Le TLR3 reconnaît l'ARN double brin (ARNdb) dans les compartiments endosomaux. Le domaine TIR de TLR3 est associé à la molécule d'adaptation TRIF, qui active les protéines kinases TBK-1 et IKKe. IRF-3 est phosphorylée par TBK-1 et IKKe, ce qui conduit à sa dimérisation et à sa translocation dans le noyau. L'IRF-3 induit alors la transcription d'IFN-β. L'ARN double brin intracellulaire est reconnu par l'ARN hélicase RIG-I (ou MDA5), qui active TBK-1 et IKKe, conduisant également à l'activation de l'IRF-3. Ces deux voies activent aussi NFκB. L'IFN-β sécrété se lie au récepteur IFN, ce qui entraîne l'activation transcriptionnelle des gènes IFN-induits, tels que l'IRF-7. L'IRF-7 stimule alors la transcription d'IFN-α et -β. En plus de ces cibles, qui sont responsables de l'activation du système immunitaire, l'ARNdb se lie à la protéine kinase PKR (Protein kinase RNA-activated). L'activation de la PKR conduit à la phosphorylation de la eIF2a, ce qui entraîne l'inhibition de la traduction des protéines. dsRNA : ARN double brin.

L'analyse transcriptomique des CES de patients SSp comparée aux sujets contrôles a montré une tendance pour une surexpression de *PKR* et d'*IRF7* alors que l'expression des facteurs impliqués dans d'autres voies (*RIG1/MDA5*) n'était pas différente entre SSp et sujets contrôles (**Figure 12**). La stimulation par poly(I:C) pourrait mimer un facteur déclenchant infectieux et induire un signal *via* différentes voies, responsable du déclenchement d'une boucle d'auto-amplification induisant la production d'IFN de type I et de gènes IFN-induits. Ce mécanisme pourrait expliquer en partie le fait que la stimulation par poly(I:C) des CES soit responsable d'un effet plus important sur la survie et l'activation B que les stimulations par IFN $\alpha$  ou IFN $\gamma$ .

PKR, aussi connue sous le nom de EIF2AK2 (eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2), est une enzyme IFN-induite. PKR phosphoryle la protéine eIF2a, ce qui entraîne une inhibition de la traduction. De façon intéressante, un précédent travail publié par notre équipe avait mis en évidence que la production de BAFF par les CES, induite par une infection avec un virus à ARN double-brin, passait par un mécanisme dépendant de PKR (219) (**Figure 16**). Il a par ailleurs été montré qu'au cours de l'infection par le VHC, EPST11 (Epithelial Stromal Interaction 1), protéine IFN-induite, était capable d'activer PKR et d'induire l'expression de plusieurs gènes PKR-dépendants, tels que *IFN- $\beta$* , *IFIT1*, *OAS1*, et *RNase L*, qui sont impliqués dans l'activité antivirale de EPST11 (220). Récemment, il a été montré que le gène *EPST11* était surexprimé dans les LB de SSp par rapport aux sujets contrôles. Cette surexpression entraînait une activation de la voie de signalisation par TLR9 et contribuait à l'hyperactivation des LB *via* l'activation du signal NF $\kappa$ B (221). Nos résultats montrent qu'outre les LB, *EPST11* est également surexprimé par les CES et les LT CD4 et CD8 triés à partir du sang chez les patients SSp par rapport aux sujets contrôles ( $\log_2FC = 4,24 ; 1,39 ; 1,21$  et  $1,28$ , respectivement) (**Figure 12**). *EPST11* fait partie des gènes IFN-induits. Ainsi, certains gènes considérés comme témoins d'une réponse IFN-induite sont susceptibles d'avoir un rôle propre dans la pathogénie du SSp.



**Figure 3: La stimulation par poly(I:C) des CES induit l'expression de BAFF via un mécanisme dépendant de PKR (d'après Ittah *et al.*)(219). Les autres senseurs potentiellement impliqués dans l'induction de PKR sont TLR3 et les senseurs RIG I et MDA5 via un mécanisme IFN dépendant. L'induction de PKR entraîne l'activation des voies NFκB et MAPK responsables de l'induction de BAFF.**

En parallèle, l'analyse transcriptomique de CES cultivées à partir de biopsies de glandes salivaires de patients SSp et de sujets contrôles, stimulées ou non par poly(I:C), IFN $\alpha$  ou IFN $\gamma$ , permet d'apporter d'autres éléments de réponse. Ces cellules sont, en effet, extraites du micro-environnement glandulaire pendant la culture qui dure 2 à 3 semaines. Cette longue étape de culture permet de se mettre dans des conditions indépendantes des stimuli pro-inflammatoires présents dans les glandes salivaires. Les gènes identifiés comme différentiellement exprimés entre SSp et contrôles au cours de cette analyse transcriptomique sont différents de ceux identifiés dans les CES triées *ex vivo* à partir des biopsies de glandes salivaires. Notamment, il n'y avait pas de surexpression de la voie de signalisation IFN dans les CES cultivées de SSp par rapport aux sujet contrôles. Concernant l'expression de *PKR*, comme attendu, elle était induite par la stimulation par poly(I :C) mais également par IFN $\gamma$  et IFN $\alpha$  dans des proportions moindres (**Article 2, Figure 5**). Le fait que les CES soient différentiellement activées par ces stimuli suggère une réponse inadaptée au micro-environnement inflammatoire des CES de SSp par rapport aux sujets contrôles.

### D.1.3. CES et niches plasmocytaires

La présence de plasmocytes a été décrite dans les glandes salivaires de patients SSp. Des études antérieures suggèrent que le micro-environnement glandulaire pourrait produire les facteurs nécessaires à la survie de ces plasmocytes, tels que l'IL6 et CXCL12. Nous avons pu montrer que les CES sont capables de produire des cytokines et des chimiokines impliquées dans la survie lymphocytaire B ainsi que leur activation. Les CES pourraient ainsi jouer le rôle de cellules de soutien pour les LB au sein des glandes salivaires. Nous avons également pu observer que les CES étaient capables d'induire une augmentation de la différenciation en LB dans les co-cultures de CES et LB. Cependant, les CES ne permettaient pas d'induire la différenciation en cellules productrices d'Ac dans ce modèle. Nous discuterons ensuite des limites de ce modèle et notamment du fait que d'autres cellules pourraient être nécessaires pour induire une différenciation plasmocytaire. Par analogie avec les niches plasmocytaires de la moelle osseuse au sein desquelles plusieurs facteurs tels que BAFF, APRIL (A proliferation-inducing ligand), IL6 et CXCL12 sont requis (222), (223), nous avons mesuré BAFF, APRIL, IL6, CXCL10, CXCL12, CXCL13, et CCL28 dans les surnageants de co-culture. De façon étonnante, alors que BAFF semblait être un bon candidat pour expliquer la survie et l'activation lymphocytaire B, cette cytokine n'était pas présente dans les surnageants de CES non stimulées. Dans un modèle murin surexprimant BAFF, Ding *et al.* ont pu observer une augmentation du nombre de LB infiltrant le tissu glandulaire. Cependant, ils n'ont observé qu'une faible augmentation du nombre de LB proliférants et de centres germinatifs ectopiques dans les glandes salivaires. Cette observation pourrait suggérer qu'un autre facteur pourrait être requis (224). De façon intéressante, nos résultats suggèrent également que BAFF pourrait ne pas être la seule cytokine responsable de l'induction de survie des LB. Son inhibition par le belimumab n'a, en effet, pas permis d'annuler l'effet des CES sur la viabilité des LB dans notre modèle de co-culture. D'autres facteurs sont probablement impliqués, redondants ou associés à BAFF. Ainsi, par exemple, APRIL qui est un facteur important dans l'induction de la survie plasmocytaire pourrait participer à l'activation lymphocytaire B. Cependant, les expériences d'inhibition menées dans le modèle de co-culture de CES et LB n'ont pas montré d'effet inhibiteur de l'Ac anti-APRIL testé. Il pourrait être intéressant d'inhiber en même temps BAFF et APRIL, ou encore de cibler, en aval, les récepteurs communs à ces cytokines tels que BCMA ou TACI.

Les différentes expériences d'inhibition menées n'ont pas permis d'identifier une cytokine ou chimiokine unique responsable de l'effet des CES sur la survie des LB. En revanche, nous avons pu identifier trois inhibiteurs potentiels de la survie lymphocytaire B dont les cibles sont situées en aval, au sein même du métabolisme cellulaire des LB. Il s'agit du leflunomide, de l'inhibiteur de PI3K et de l'inhibiteur de BTK. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'absence d'identification d'un facteur

unique impliqué dans l'interaction entre les CES et les LB. Cette interaction pourrait, en effet, impliquer plusieurs facteurs redondants, ou un facteur non identifié dans le surnageant, ou encore des microvésicules produites par les CES. Les microvésicules mesurent environ 30 à 100 nm de diamètre, sont secrétées par les cellules et sont capables de transporter des ARN messagers et des micro-ARNs. Certains auteurs ont détecté la présence de micro-ARN dans les microvésicules sériques et salivaires de patients SSp et de sujets contrôles, en particulier dans les exosomes (225). D'autres auteurs ont montré que les exosomes peuvent être relargués par les CES. De façon intéressante, ces résultats suggèrent que les exosomes isolées par ultracentrifugation à partir des surnageants de cultures de CES contiennent des auto-Ag tels que SSA, SSB, et Sm RNPs. Ainsi, le relargage d'exosomes pourrait participer à la présentation d'auto-Ag au système immunitaire (226).

## D.II. Comparaison des mécanismes physiopathologiques du SSp avec d'autres épithélites auto-immunes

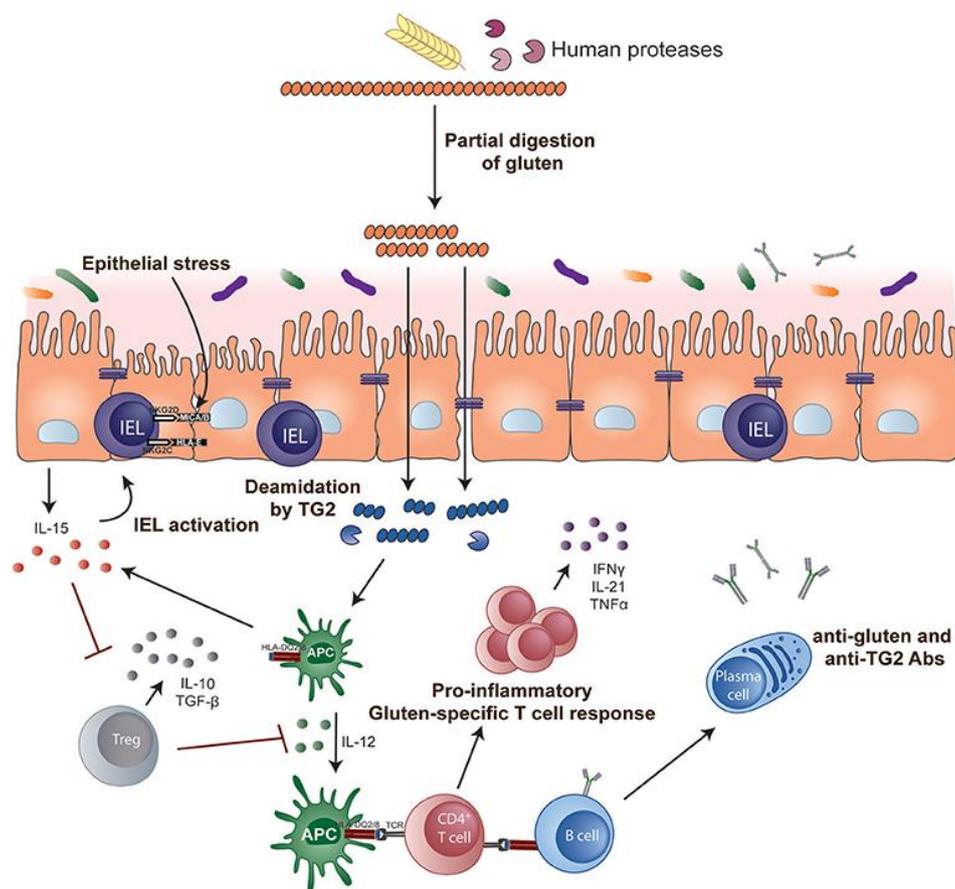
Cette thèse nous donne des arguments supplémentaires pour parler d'épithélite auto-immune. Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, une atteinte des cellules épithéliales peut être observée au cours d'autres MAI ou inflammatoires, au sein de divers organes. La comparaison entre les caractéristiques de l'atteinte épithéliale au cours du SSp et les atteintes décrites dans ces autres pathologies permet de mettre en perspective les différents mécanismes impliqués dans ces pathologies. Nous décrivons brièvement les principaux mécanismes physiopathologiques et les modifications histologiques décrits dans la maladie cœliaque, la cirrhose biliaire primitive et les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), puis nous les mettrons en perspective avec le SSp.

### D.II.1. Maladie cœliaque et rôle de l'IL15

La maladie cœliaque résulte d'une hypersensibilité à un Ag contenu dans le gluten alimentaire : la gliadine. Dans la lamina propria de la muqueuse digestive, une réaction de déamination de la gliadine par l'enzyme appelée transglutaminase est responsable d'une augmentation de son immunogénicité. Les macrophages de la muqueuse digestive présentent le complexe transglutaminase/gliadine aux LT CD4+. Les LT activés vont alors stimuler la production d'Ac anti-gliadine et d'auto-Ac anti-transglutaminase par les plasmocytes à IgA contenus dans la muqueuse. Les Ac sont ensuite capables d'induire des lésions digestives par ADCC et par activation du complément. Il existe également, dans les muqueuses, une expansion des LT intra-épithéliaux capables de sécréter des cytokines, en

particulier l'IFN $\gamma$ . L'activation cellulaire (macrophages, lymphocytes, plasmocytes) et la synthèse locale de cytokines sont à l'origine des lésions histologiques observées au cours de la maladie cœliaque (**Figure 17**). La lésion histologique caractéristique comprend une atrophie villositaire, une hypertrophie des cryptes, une dystrophie entérocytaire, une lymphocytose intraépithéliale et un infiltrat de neutrophiles, éosinophiles et plasmocytes dans la lamina propria. Enfin, la maladie cœliaque peut se compliquer de lymphome T non Hodgkinien de localisation le plus souvent digestive et de cancers épithéliaux (grêle, pharynx et œsophage).

L'IL15 est une cytokine pro-inflammatoire dont l'expression est augmentée au cours de la maladie cœliaque dans la lamina propria et dans les cellules épithéliales intestinales. L'IL15 joue un rôle important dans l'expansion des lymphocytes intra-épithéliaux cytotoxiques au cours de la maladie (227). Récemment, Abadie *et al.* ont montré dans un modèle murin le rôle prépondérant de l'IL15 ainsi que du HLA DQ8 dans la pathogénèse de la maladie cœliaque. Ils ont également montré que l'IFN $\gamma$  et l'enzyme transglutaminase 2 étaient impliqués dans la destruction tissulaire (228).



**Figure 4: Mécanismes clés de la physiopathologie de la maladie cœliaque (d'après Tye-Din *et al.*)(229).**

La transglutaminase catalyse la déamination des peptides de gluten, qui peuvent alors se lier aux molécules HLA DQ des cellules présentatrices d'antigène. Les LT CD4 spécifiques secrètent alors des

cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN $\gamma$  et l'IL21 qui contribuent aux lésions intestinales et entraînent l'activation des lymphocytes intra-épithéliaux ainsi que la stimulation d'une réponse lymphocytaire B. Les lymphocytes intra-épithéliaux se transforment en « cellules NK-like » cytolytiques qui médient la destruction des entérocytes. L'IL15 rend les LT effecteurs résistants à l'effet immunosuppresseur des Tregs et, dans la lamina propria, dote les cellules dendritiques de propriétés inflammatoires, entraînant une réponse pro-inflammatoire.

Un Ac monoclonal anti-IL15 (AMG 714) a été testé dans la maladie cœliaque réfractaire de type II ou sprue réfractaire de type 2 (SR2), qui correspond à un sous-type particulier, touchant 1 à 5% des patients atteints de maladie cœliaque. La SR2 est caractérisée par la présence d'une population clonale de lymphocytes intra-épithéliaux de phénotype anormal (CD3-, CD8-). Une progression vers un lymphome T invasif est observée dans environ 50 % des cas. L'administration d'AMG 714 semble être associée à un bénéfice clinique et une diminution de la progression de la clonalité chez les patients atteints de SR2 (230).

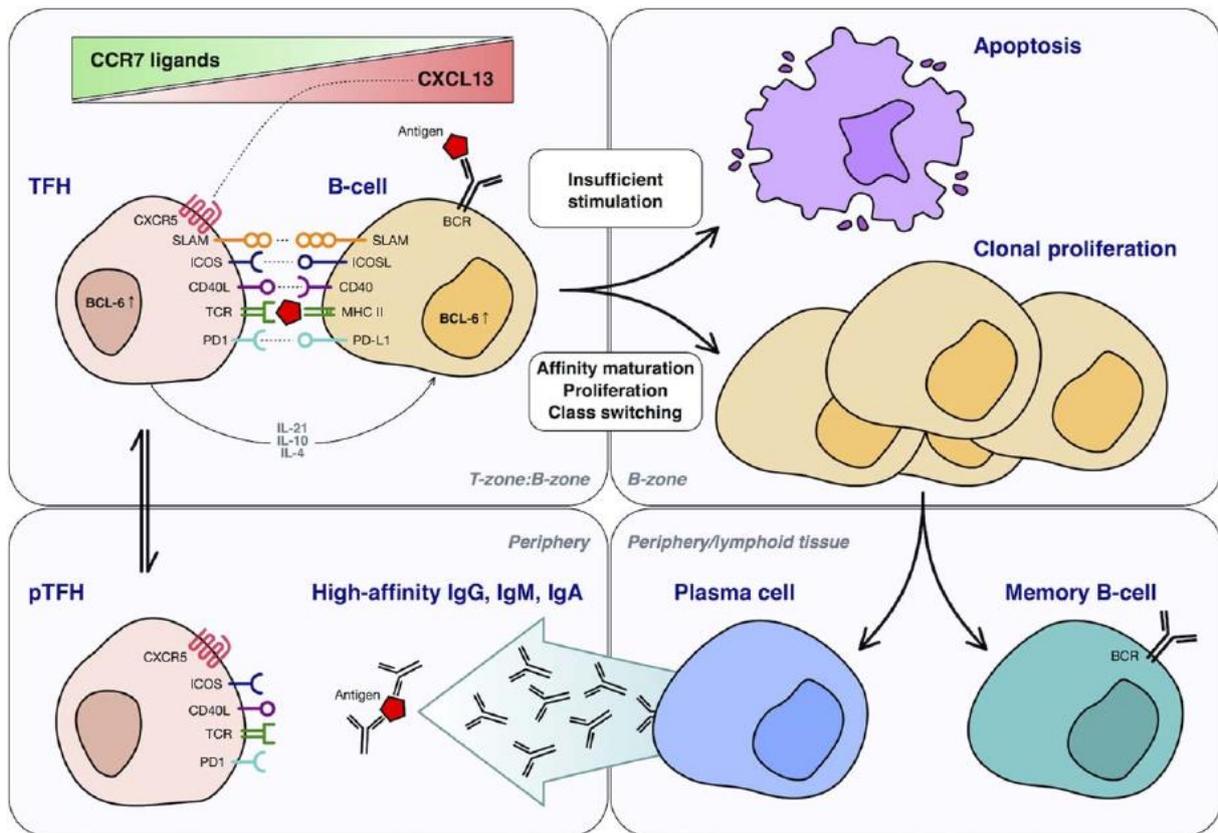
La mise en perspective de cette pathologie avec le SSp apporte certains éléments de réflexion. Il existe au cours de la maladie cœliaque, une activation lymphocytaire T, entraînant un sur-risque de lymphome T. En comparaison, le SSp est caractérisé par une hyperactivation lymphocytaire B et un sur-risque de lymphomes B. Au cours de la maladie cœliaque, les cellules épithéliales intestinales jouent un rôle de soutien aux LT notamment *via* la sécrétion d'IL15, responsable de l'expansion des lymphocytes intra-épithéliaux et de la résistance des LT à l'effet immunosuppresseur des Tregs. La compréhension du rôle de l'IL15 a permis le développement d'un Ac thérapeutique anti-IL15. Au cours du SSp, nous avons observé que les CES de patients SSp cultivées exprimaient l'IL15 et que la stimulation par poly(I :C) induisait un enrichissement de la voie de l'IL15. Ainsi, certains mécanismes physiopathologiques pourraient être communs au SSp et à la maladie cœliaque, impliquant notamment l'IL15.

#### D.II.2. Cirrhose biliaire primitive, complexes immuns et centres germinatifs

La cirrhose biliaire primitive (CBP) est caractérisée par une destruction inflammatoire des petites et moyennes voies biliaires intra-hépatiques. La nature auto-immune de la CBP est soutenue par la présence d'Ac anti-mitochondrie (AMA) et d'une réponse lymphocytaire B et T auto-réactive dirigée contre les Ag mitochondriaux du soi. L'exposition à un facteur environnemental mimant la sous-unité E2 modifiée du complexe mitochondrial pyruvate déshydrogénase (PDC-E2) conduit à une réponse immunitaire ciblant les cellules épithéliales biliaires. Malgré la nature ubiquitaire de cet auto-Ag, le fait que les voies biliaires soient la cible préférentielle de l'auto-immunité serait lié à une

modification aberrante du PDC-E2 mitochondrial au sein des cellules épithéliales biliaires apoptotiques. Après l'activation de la réponse immunitaire adaptative par des CPA, les plasmocytes produisent des Ac anti-mitochondrie spécifiques de la maladie ciblant PDC-E2. L'apoptose de cellules épithéliales biliaires conduit à l'exposition du PDC-E2 (231). Ce complexe antigénique est alors reconnu par les Ac anti-mitochondrie circulants et entraîne la formation d'un complexe Ag-Ac qui contribue aux lésions cellulaires. La lésion histologique caractéristique de la CBP est une destruction des cholangiocytes des petites voies biliaires et la présence d'un infiltrat inflammatoire portal constitué principalement de lymphocytes, de plasmocytes et de macrophages. Il a également été décrit qu'au cours de la CBP, les cellules épithéliales biliaires expriment à leur surface les molécules HLA de classe II, ce qui n'est pas le cas à l'état normal (232). Les cellules biliaires expriment également les molécules d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) et vasculaire-1 (VCAM-1)(233).

La présence de centres germinatifs est décrite dans le foie au cours de la CBP (234). Dans les centres germinatifs, les LTfh aident à la prolifération des LB et à la sélection positive des LB de haute affinité. Les LTfh contribuent au développement de cellules sécrétrices d'Ac ou de LB mémoires à longue durée de vie (**Figure 18**). De façon intéressante, Wang *et al.* ont mis en évidence une augmentation de la fréquence des LTfh circulants (CXCR5+, CD4+) chez les patients atteints de CBP par rapport à des patients atteints d'autres MAI hépatiques (sans AMA) et par rapport aux sujets contrôles. De plus, concernant leur fonctionnalité, les LTfh de patients CBP produisent plus d'IL21 et ont une plus grande capacité à induire la maturation des LB et la production d'auto-Ac que les LTfh de sujets contrôles (235).



**Figure 5: Représentation schématique du mécanisme de maturation des LB induite par les LTfh** (d'après Webb *et al.* ) (236). Les LTfh sont présents en bordure de la zone T en raison de l'expression de CXCR5 (récepteur de CXCL13) et de l'expression diminuée de CCR7. Les LTfh reconnaissent les Ag présentés par les LB activés, envoient un signal de co-stimulation et sécrètent les interleukines IL4, IL10 et IL21. Les étapes d'hypermutation somatique des BCR, et de switch isotypique ont lieu. Ces LB qui ont des récepteurs de haute affinité sont sélectionnés pour proliférer. Par la suite, une étape de maturation des LB induit la formation de plasmocytes sécrétant des Ac ou de LB mémoires. Abbreviations: TFH: T follicular helper, pTFH: peripheral TFH, BCR, B-cell receptor; ICOSL, ICOS ligand; PD-L1, PD-1 ligand 1; SLAM, signaling lymphocytic activation molecule; TCR, T-cell receptor.

Le traitement de la CBP est basé sur l'administration d'acide ursodésoxycholique qui stimule la sécrétion de bile et a une action protectrice sur les voies biliaires. D'autres molécules sont susceptibles d'être utilisées dans la CBP telles que les agents ciblant la fibrose, l'inflammation ou la réponse immune. Certains essais de petits effectifs ont évalué l'administration de rituximab ; ils n'ont pas montré d'efficacité suffisante de ce traitement dans la CBP (237).

Certaines caractéristiques décrites au cours de la CBP peuvent être mises en parallèle avec les observations faites au cours du SSp. Ainsi, les cellules épithéliales biliaires au cours de la CBP, tout

comme les CES au cours du SSp, expriment des molécules HLA de classe II à leur surface, ce qui peut leur conférer un rôle de CPA non professionnelles. De plus, la présence de plus de Tfh circulants, de centres germinatifs ectopiques intra-hépatiques et de plasmocytes infiltrants a été décrite au cours de la CBP. De façon intéressante, la CBP peut être associée à un syndrome de Sjögren (238). Par analogie avec la CBP, une piste thérapeutique pourrait être l'utilisation de traitements inhibiteurs de mTOR aux propriétés anti-fibrotiques tels que le sirolimus par exemple. Des données préliminaires d'un essai mené sur 28 patients atteints de SSp montrent une tendance pour une augmentation du nombre de Tregs circulants chez les patients traités, ainsi qu'une diminution du ratio Th17/Treg (239). Enfin, sous réserve d'études de petits effectifs, le rituximab n'a pas montré d'efficacité dans la CBP tout comme dans le SSp.

### D.II.3. Maladies inflammatoire chroniques intestinales, IL7 et ILC

Bien qu'il ne s'agisse pas d'une MAI, l'atteinte de l'épithélium au cours des MICI présente des caractéristiques intéressantes. Les MICI, incluant la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (RCH), sont caractérisées par des atteintes intestinales inflammatoires sévères sans cause clairement identifiée. L'étude des gènes de susceptibilité a montré l'association à des gènes impliqués dans la reconnaissance et la présentation antigénique tels que *HLADR B1* (240) ou encore *IL23R*, *IL12B*, *STAT3* et *NKX2-3* (241). La mise en évidence d'une perte d'homéostasie de la flore commensale chez les patients a conduit à formuler l'hypothèse que des bactéries commensales pathogènes et des agents infectieux provoquent la rupture de la barrière épithéliale intestinale et participent ainsi à l'établissement d'un processus inflammatoire chronique chez un individu présentant une vulnérabilité génétique. Il en résulte une réponse immunitaire adaptative inappropriée ayant pour conséquence la perte de tolérance à la flore commensale ainsi que l'amplification et l'entretien de la réaction inflammatoire aux pathogènes intestinaux. Histologiquement, il existe au cours de la maladie de Crohn des pertes de substance muqueuse, des distorsions glandulaires, une infiltration lympho-plasmocytaire du chorion muqueux, souvent sous forme de nodules lymphoïdes. Dans 20 à 30 % des cas, des granulomes épithélioïdes et géantocellulaires peuvent être présents. Au cours de la RCH, les lésions histologiques les plus évocatrices sont les bifurcations et distorsions glandulaires et l'infiltrat surtout lympho-plasmocytaire du chorion éloignant la musculaire muqueuse du fond des cryptes (**Tableau 5**).

Le rôle des ILC (Innate lymphoid cells), lymphocytes qui s'accumulent préférentiellement dans les tissus muqueux et sont impliqués dans la réponse immune, a été suggéré dans la physiopathologie des MICI. La famille des ILCs se divise en plusieurs sous-groupes dont la définition est basée sur l'expression

de cytokines effectrices et de facteurs de transcription. Ces sous-populations ressemblent aux sous-groupes de LT CD4+, incluant les Th1, Th2 et Th17. Certaines ILCs secrètent de l'IL22, ayant ainsi un rôle dans l'homéostasie des cellules épithéliales intestinales (242). Les ILCs répondent rapidement aux signaux environnementaux, tels que les cytokines, les modifications métaboliques ou encore les agents infectieux. Ces ILCs produisent des cytokines qui peuvent avoir un rôle dans la physiopathologie des MICI, telles que TNF, IL17, IL22 et IFN $\gamma$  (243).

Par ailleurs, l'analyse du transcriptome de 500 patients atteints de MICI et 100 contrôles a montré que la voie de l'IL7R était sur-représentée dans le tissu colique des patients les plus sévèrement atteints, ne répondant pas aux traitements immunosuppresseurs, anti-TNF et anti- $\alpha 4\beta 7$ . L'IL7 agit comme un facteur de homing lymphocytaire T au sein du tissu digestif. L'IL7 peut être produite par les cellules épithéliales intestinales après notamment une stimulation par IFN $\gamma$  (244). Le blocage de l'IL7R diminue le homing des LT dans l'intestin et le colon dans un modèle de souris humanisées. Ainsi, au cours des MICI, l'IL7R pourrait représenter une cible thérapeutique intéressante (245).

Là encore, le parallèle avec le SSp est intéressant. L'implication des ILCs, cellules capables de produire de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et d'interagir avec les cellules épithéliales, a été soulignée au cours des MICI. Nous détaillerons plus bas le rôle potentiel de ces cellules dans la physiopathologie du SSp. De plus, l'implication potentielle de la voie de l'IL7R au cours des MICI est intéressante. Nous avons pu développer au cours de ce travail une hypothèse physiopathologique basée sur l'axe IL7 – IFN au cours du SSp. Le fait que la voie de l'IL7 puisse être impliquée dans les MICI apporte un argument supplémentaire pour un rôle de cette cytokine dans la physiopathologie des épithélites auto-immunes.

Nous avons vu que le tissu épithélial possède de véritables fonctions immunologiques et peut participer à la mise en place et à la pérennisation de la réponse auto-immune. Les exemples de la maladie cœliaque, la CBP, ou encore les MICI renforcent cette idée et permettent de constater certaines similitudes avec le SSp (**Tableau 5**). Chacune de ces pathologies comporte des caractéristiques propres liées à l'environnement particulier constitué par les organes cibles et/ou à l'origine de la pathologie.

**Tableau 5 : Caractéristiques communes entre certaines pathologies auto-immunes / inflammatoires avec atteinte épithéliale et le SSp**

	<b>Maladie cœliaque</b>	<b>Cirrhose biliaire primitive</b>	<b>MICI</b>
<b>Sex ratio F&gt;H</b>	Oui	Oui	Non
<b>Auto-anticorps</b>	Ac anti-gliadine, Ac anti-endomysium, Ac anti-transglutaminase	Ac anti-mitochondrie	
<b>Génétique</b>	HLA DQ2 et DR3	HLA de classe II DRB1*08, IL12A et IL12RB2	HLA-DRB1*01:03
<b>Histologie, infiltration lymphocytaire</b>	Lymphocytose intraépithéliale et infiltrat de neutrophiles, éosinophiles et plasmocytes dans la lamina propria.	Infiltrat inflammatoire portal de lymphocytes, de plasmocytes et de macrophages. Présence de centres germinatifs.	Crohn : infiltrat lympho plasmocytaire, parfois granulome épithélioïde RCH : infiltrat lympho plasmocytaire
<b>Rôle de l'épithélium</b>	Sécrétion d'IL15	Exposition du complexe antigénique PDC-E2 Expression de HLA	Sécrétion d'IL7
<b>Acteurs lymphocytaires</b>	Défaut de l'action des Tregs, activation de lymphocytes intra-épithéliaux	Augmentation de LTfh sécrétant IL21	Présence d'ILCs

### D.III. Avantages et limites des modèles de culture primaire et de co-culture

#### D.III.1. Culture primaire de CES et explants

Une des forces de notre équipe est de maîtriser la culture primaire de CES issues de patients et non de lignées cellulaires qui sont des cellules éloignées de la physiologie, souvent d'origine cancéreuse et/ou immortalisées. Le recours à des cultures primaires a pour avantage d'être plus proche de la pathologie et de permettre de comparer les CES de patients SSp et de sujets contrôles. Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, les glandes salivaires sont composées de plusieurs types de cellules épithéliales : les cellules acineuses, les cellules myoépithéliales, les cellules ductales des canaux intercalaires ou des canaux striés. Nos cultures de CES contiennent des cellules ductales et acineuses, ces sous-types cellulaires ne pouvant pas être triés ou dissociés au cours de la culture. En revanche, nous avons veillé à éliminer les contaminations éventuelles par des cellules fibroblastiques.

Une limite de notre technique est liée au fait que les CES utilisées dans les co-cultures ont été cultivées deux à trois semaines avant de pouvoir être utilisées. Cette étape de culture longue pourrait être responsable d'une modification du phénotype de ces cellules. Le phénotype de ces cellules est, en effet, influencé par le micro-environnement glandulaire. Cette limite est cependant aussi une force. En effet, le fait d'observer même après trois semaines de co-culture un effet différentiel des CES de SSp par rapport aux CES de sujets contrôles sur l'induction de survie des LB suggère qu'il existe une modification intrinsèque des CES, indépendante du micro-environnement glandulaire.

Des cultures d'organoïdes, correspondant à des structures 3D formées à partir de cellules souches, au sein desquels les différents types cellulaires spécifiques s'organisent et constituent des versions miniatures de glandes salivaires sont en cours de développement par d'autres équipes. Ces organoïdes pourraient permettre une étude plus précise des mécanismes conduisant à l'hyposalivation au cours du SSp (246).

### D.III.2. Co-cultures

#### D.III.2.a. Développement d'un modèle de co-culture

Au cours de ce travail de thèse, nous avons développé un modèle de co-culture de CES et de LB qui a permis de montrer que les CES sont capables d'induire la survie des LB. Il existe dans la littérature peu d'autres modèles de co-culture entre CES et lymphocytes. Dans un modèle de co-culture de CES et de PBMCs, Tsunawaki *et al.* ont pu observer que les CES pré-stimulées par IFN de type II ou par TNF étaient capables d'induire la prolifération des PBMCs (170). Cependant, dans ce modèle, le blocage de HLA-DR inhibait la prolifération des PBMCs, suggérant que cette prolifération pouvait être expliquée par une réponse allogénique responsable de l'activation des LT.

Dans le cadre de l'étude des interactions entre CES et LT, nous avons essayé de réaliser des co-cultures entre CES et LT. Ces expériences n'ont pas été poursuivies car il existait une réaction allogénique des LT contre les CES. Cet écueil était évité en réalisant des co-cultures avec des LT autologues. Cependant, pour des raisons techniques (chronologie des prélèvements et nombre faible de cellules), nous n'avons pas pu poursuivre ces co-cultures.

Concernant les co-cultures de CES et LB, nous avons utilisé des LB triés à partir de PBMCs allogéniques. Ce choix a été motivé par des raisons techniques : le nombre de LB requis pour réaliser les expériences de co-cultures étant élevé, il nécessitait l'utilisation de résidus d'anneaux de cytophèrese et des prélèvements de sang périphérique réalisés chez les patients n'auraient pas permis de réaliser l'ensemble des expériences. Ce choix a été validé par l'absence de mise en évidence de réaction allogénique entre CES et LB.

#### D.III.2.b. Avantages et limite du développement de modèles simplifiés

La stratégie de simplification des modèles d'étude a permis la compréhension de certains mécanismes d'interaction entre CES et LB puis CES et LT. Nous avons choisi de nous intéresser particulièrement aux LB et aux LT qui sont des acteurs clés de la physiopathologie du SSp. Le souci de simplification qui a conduit à ce choix a permis de définir des mécanismes d'interaction entre ces

cellules et les CES. Les résultats que nous avons obtenus supportent l'hypothèse de l'existence de mécanismes spécifiques au sein des glandes salivaires à l'origine du SSp et incitent à poursuivre l'étude de ce tissu. Cependant, au sein des glandes salivaires, il existe de nombreux autres types cellulaires susceptibles d'interagir avec les CES, tels que les cellules dendritiques, ou les macrophages. La réalisation d'une étude en single-cell RNA-seq des glandes salivaires de patients et de contrôles permettrait d'obtenir une cartographie plus précise des différents acteurs impliqués dans la physiopathologie du SSp au sein des glandes salivaires. Il sera, par ailleurs, intéressant de développer un modèle de co-culture intégrant les CES, les LB et les LT autologues afin, notamment, d'étudier la différenciation lymphocytaire B en plasmocytes et des LT en LTfh.

Enfin, outre les co-cultures de CES et de LB, nous avons pu développer un modèle de culture d'explants de glandes salivaires (**Article 2**). Cette technique fournit un modèle global réunissant l'ensemble des acteurs constituant les glandes salivaires. Ainsi, nous avons pu utiliser ce modèle pour étudier l'effet d'un traitement, l'anticorps monoclonal anti-IL7R. Une des limites de ce modèle est le fait que l'analyse est ensuite faite sur l'ensemble des cellules, ne permettant pas de distinguer l'effet spécifique des traitements sur les différents sous-types cellulaires. Une façon de répondre à cette question sera de réaliser une analyse en single-cell RNA-seq après l'étape de culture en présence ou non des traitements.

#### D.III.2.c. Autres acteurs à considérer : LTfh, ILCs, cellules stromales et centres germinatifs

##### Rôle des LT follicular helper

Nous avons pu montrer que les taux sériques d'IL7 étaient augmentés chez les patients SSp par rapport aux sujets contrôles. De façon intéressante, il existait une association avec certains marqueurs d'activation lymphocytaires B, tels que la présence d'Ac anti-SSA, de FR et de chaînes légères libres. Pour expliquer le lien entre IL7 et marqueurs B, une hypothèse serait que l'IL7 ait un effet inducteur d'une différenciation des LT en LT follicular helper (LTfh), eux même essentiels à la formation de centres germinatifs. Un travail mené au laboratoire a permis de confirmer l'augmentation des LTfh et de décrire l'augmentation des LT peripheral helper (LTph) chez les patients SSp par rapport aux sujets contrôles (**Annexe 1**). De façon intéressante, dans cette étude, la présence de ces sous-populations était corrélée au pourcentage de plasmablastes. Par ailleurs, Gong *et al.* ont montré que les CES étaient capables d'induire la différenciation de LT CD4 en LTfh, *via* l'expression d'IL6 et d'ICOSL. Les LTfh étaient caractérisés par l'expression de Bcl-6, ICOS et CXCR5 et la sécrétion d'IL21 et étaient également capables d'augmenter la survie des LB (175). Enfin, certaines données suggèrent que les LTfh sont capables de sécréter des cytokines caractéristiques d'autres sous-types de LT effecteurs, telles que

l'IL4 et IFN $\gamma$  (247). Des résultats contradictoires sont présents dans la littérature concernant l'induction potentielle d'un phénotype LTfh par une stimulation IL7 (248), (249), (250). Cependant, si l'induction d'un phénotype LTfh par l'IL7 était confirmée, ces cellules seraient susceptibles d'expliquer l'association observée entre l'IL7 et l'hyperactivation lymphocytaire B. Ainsi, l'hypothèse d'une modification du phénotype des LT en LTfh induite par les CES *via* la sécrétion d'IL7 pourrait être l'une des clés pour expliquer l'association entre taux sériques d'IL7 et marqueurs B ainsi que la présence d'une signature IFN. Il serait alors intéressant de mieux caractériser le phénotype des LT stimulés par IL7 et capables de produire l'IFN. La co-culture de CES et LB n'a pas permis d'obtenir des LB différenciés en plasmablastes. Une hypothèse serait que cette différenciation requière l'aide des LT, et plus particulièrement des LTfh.

### Rôle des ILCs

Les ILCs (innate lymphoid cells) sont des effecteurs tissulaires qui se distinguent des LB et LT par l'absence de TCR. Elles se répartissent en deux groupes : les ILC cytotoxiques (NK) qui dépendent d'Eomes et de T-bet et produisent de l'IFN- $\gamma$ , et les ILC auxiliaires (ILC1, ILC2, ILC3) qui dépendent respectivement de T-bet, GATA-3 ou ROR $\gamma$ T et produisent de l'IFN- $\gamma$ , de l'IL5/IL13 ou de l'IL17/IL22. Les ILC ont un tropisme particulier pour les muqueuses ce qui suggère un rôle potentiel du microbiote dans leur activation (251). De façon intéressante, il a été montré récemment que la fréquence des ILC1 était corrélée à l'activité de la maladie au cours du SSp, mesurée par l'ESSDAI. La fréquence des populations ILC2 ou ILC3 n'était pas différente entre les patients SSp et les sujets contrôles. Cependant, les patients qui avaient une signature IFN élevée (évaluée par le score IFN calculé sur l'expression de *IFI44*, *IFI44L*, *MX1*, *Ly6E* et *IFIT3*) exprimaient des niveaux élevés de Fas sur les ILC2 et ILC3, ce qui coïncidait avec la diminution de la fréquence de ces populations dans le sang (252). Par ailleurs, les NK22, un sous-type d'ILCs, sont situés dans les muqueuses et sont capables de sécréter de l'IL22 en réponse à une stimulation par l'IL23. Ces cellules sont également capables de sécréter BAFF ce qui suggère qu'elles pourraient avoir un rôle dans l'activation lymphocytaire B (253).

### Le concept de cellules stromales

Asam *et al.* ont décrit la catégorie des cellules stromales, incluant les cellules endothéliales, épithéliales, les cellules nerveuses et les fibroblastes. Plusieurs observations suggèrent que les interactions entre ces cellules stromales et les lymphocytes infiltrant la glande sont impliquées dans la physiopathologie du SSp (254). Au cours du SSp, le tissu glandulaire est à la fois la cible et la source des

auto-Ag pour les lymphocytes infiltrant la glande. Nous nous sommes focalisés au cours de ce travail sur le rôle joué par les CES. Cependant, les cellules stromales non hématopoïétiques pourraient également être impliquées dans la physiopathologie du SSp. Nous décrivons successivement les cellules endothéliales, les cellules nerveuses et les fibroblastes.

### *Les cellules endothéliales*

Les cellules endothéliales sont impliquées dans la circulation lymphocytaire et dans le transport des Ag. Les HEVs présents dans les glandes salivaires contrôlent la migration et le trafic des lymphocytes naïfs vers l'intérieur des centres germinatifs, attirés par des chimiokines (255). L'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales est augmentée au cours du SSp. Par ailleurs, l'expression d'ICAM-1 et de VCAM-1 est augmentée suite à une stimulation par des cytokines pro-inflammatoires (256). Ces molécules modulent l'adhésion des lymphocytes et sont impliquées dans la diapédèse, les lymphocytes infiltrent alors le tissu. L'accumulation tissulaire de lymphocytes dans les glandes salivaires au cours du SSp et dans d'autres tissus glandulaires pourrait être due à leur recrutement depuis la circulation, ou bien être secondaire à une prolifération de clones activés préalablement recrutés dans les centres germinatifs (257).

Concernant les vaisseaux lymphatiques, leur angiogenèse est médiée par l'expression d'IL7 et de lymphotoxine  $\alpha 1\beta 2$  (LT $\alpha 1\beta 2$ ) ainsi que de CCL21 (258). En condition normale, les vaisseaux lymphatiques permettent l'efflux des lymphocytes activés hors de l'organe où a eu lieu la présentation antigénique. Ce phénomène est conditionné par un gradient de chimiokines qui peut être modifié par les fibroblastes et les cellules épithéliales (259), (260), entraînant alors la rétention de CPA et de lymphocytes activés dans les glandes salivaires. Alunno *et al.* ont montré une augmentation de la néovascularisation lymphatique dans les glandes salivaires au cours du SSp. Cette lymphangiogénèse aberrante pourrait être soutenue par l'IL17, cytokine pro-inflammatoire qui participe à l'induction et au maintien de l'inflammation glandulaire au cours du SSp (261).

### *Les cellules nerveuses*

L'innervation des glandes salivaires est assurée par les systèmes nerveux autonomes sympathique et parasympathique. Les fibres nerveuses parasympathiques libèrent de l'acétylcholine, la substance P, le peptide intestinal vasoactif ; tandis que les fibres sympathiques relarguent de la noradrénaline et le neuropeptide Y. Ces peptides assurent la communication interneuronale et sont libérés localement près des acini épithéliaux et des vaisseaux sanguins, où ils assurent la médiation de

la sécrétion de salive (262). De façon intéressante, des auto-Ac dirigés contre les récepteurs muscariniques M3 ont été observés chez des patients atteints de SSp. Leur présence a été associée à une production réduite de salive et à une production accrue de molécules pro-inflammatoires (263).

### *Les fibroblastes*

Les fibroblastes sont une population hétérogène, dont le phénotype dépend de la localisation tissulaire. La fonction structurale des fibroblastes consistant à synthétiser et remodeler la matrice extra-cellulaire est bien connue. Au sein des glandes salivaires, les fibroblastes sont localisés dans l'interstitium. Au cours du SSp, les cibles de l'infiltrat inflammatoire sont principalement les cellules épithéliales. Les fibroblastes interviennent secondairement dans les phénomènes de réparation tissulaire élaborant des fibres élastiques, de réticuline et de collagène, conduisant à l'apparition d'une fibrose séquellaire. De façon intéressante, les fibroblastes jouent aussi un rôle moins connu dans les mécanismes immunologiques *via* la sécrétion de cytokines, de chimiokines et de facteurs de croissance. Les fibroblastes sont capables d'influencer le recrutement de cellules immunitaires au cours de l'inflammation (264). Ils sont également capables d'exprimer des molécules de co-stimulation, telles que PDL1, CD40 et CD80/CD86 (265). Cependant, les niveaux d'expression de ces molécules par les fibroblastes sont plus faibles qu'au sein des CPA et des cellules épithéliales. Enfin, comme les CES, les fibroblastes ont été identifiés comme producteurs de chimiokines, telles que CXCL13 et CCL19 (266), impliquées respectivement dans le recrutement de LB CXCR5+ et de LT CXCR7+.

La distinction entre fibroblastes et CES se fait sur l'expression de marqueurs de surface : les CES sont EpCam+ (CD326) tandis que les fibroblastes sont EpCam-. De plus, nous avons également utilisé un marqueur de surface fibroblastique CD90 afin de conforter la distinction entre ces deux types cellulaires. Les principaux travaux effectués sur les fibroblastes au cours du SSp ont utilisé la définition phénotypique des fibroblastes suivante : CD45- EpCam- CD31- (avec CD31 comme marqueur de cellules endothéliales). Le milieu de culture utilisé dans ces travaux sur les fibroblastes est différent de celui que nous avons utilisé pour les cultures primaires de CES (153).

Les différents types de cellules stromales décrits ci-dessus ainsi que les CES co-existent au sein des glandes salivaires et contribuent de façon synergique au développement de structures lymphoïdes tertiaires. L'action combinée de ces différentes cellules stromales conduit à l'infiltration de lymphocytes dans les glandes salivaires. L'organisation de l'infiltrat lymphocytaire au sein des structures lymphoïdes tertiaires répond aux gradients chimiotactiques établis notamment par les

cellules stromales. Le micro-environnement pathogène favorisant l'initiation et le maintien de la réponse auto-immune dans le SSp est ainsi créé.

### Les centres germinatifs

Alors que les organes lymphoïdes secondaires (les ganglions lymphatiques, les amygdales, la rate et les plaques de Peyer) se développent au cours de l'embryogénèse, les structures lymphoïdes tertiaires, elles, se développent en réponse à des signaux inflammatoires, aux sites d'infection, d'inflammation (auto-immunité, maladies inflammatoires) ou à proximité de tumeurs solides, dans les organes et tissus périphériques non lymphoïdes (266). Bien que cela constitue un avantage dans le cancer (267), les structures lymphoïdes tertiaires agissent comme un micro-environnement pro-inflammatoire spécialisé, et leur présence est souvent associée à un mauvais pronostic dans les maladies inflammatoires ou auto-immunes telles que la sclérose en plaques (268), la néphrite lupique (269), la PR (270) et le SSp (103). Le développement des structures lymphoïdes tertiaires fait intervenir une séquence d'événements qui débute par une différenciation des fibroblastes résidents en immuno-fibroblastes, dont les caractéristiques sont proches de celles des populations stromales des organes lymphoïdes secondaires. Les cellules immunitaires initiatrices (macrophages, cellules dendritiques ou LT) activent les cellules stromales et les précurseurs potentiels des immuno-fibroblastes, *via* la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF $\alpha$  et l'IL6. Ceci provoque une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion cellulaires, telles que ICAM-1 et VCAM-1, ainsi que de chimiokines, telles que CXCL12 et CXCL13, par les CES et les fibroblastes, responsable d'une majoration de l'infiltration lymphocytaire. Par la suite, l'organisation des agrégats lymphocytaires et la ségrégation topographique des lymphocytes en zones de cellules T et B distinctes, se produisent en réponse aux chimiokines CXCL12, CXCL13 et CCL19 sécrétées par les CES et les fibroblastes. En réponse à ces gradients de chimiokines, les LB peuvent s'organiser au sein des structures lymphoïdes tertiaires en micro-structures appelées centres germinatifs (271). Ils subissent alors un processus de maturation d'affinité et de recombinaison de classe, donnant naissance à une population de LB matures, de plasmablastes et de plasmocytes (266), (272). Environ 25% des patients atteints de SSp présentent des organes lymphoïdes tertiaires contenant des structures de type centres germinatifs. Ces patients présentent également un focus score plus élevé, une prévalence plus élevée de FR, des titres plus élevés d'anti-SSA et d'anti-SSB (273) et un risque accru de lymphome (274).

La présence de centres germinatifs ectopiques a été décrite au cours du SSp mais également dans d'autres pathologies en situation d'inflammation chronique. C'est le cas par exemple au cours de la CBP où des centres germinatifs intra-hépatique sont décrits, ou encore au cours de la sclérose en

plaque, de la néphrite lupique et de la PR. Au cours du SSp, ces centres germinatifs jouent probablement un rôle pathogène ; ils participent, en effet, à la maturation lymphocytaire B et produisent des auto-Ac *in situ*. Ces auto-Ac peuvent ensuite former des complexes immuns qui, comme nous l'avons décrit plus haut, pourraient jouer un rôle pathogène dans le SSp. Nous avons pu montrer que les CES sont capables de sécréter des cytokines et chimiokines telles que l'IL7, l'IL6 et CXCL13 qui pourraient jouer un rôle dans la formation de ces centres germinatifs. Cependant, d'autres expériences de co-culture seraient nécessaires car le modèle de co-culture simplifié impliquant des CES et des LB ne permettait pas de tenir compte du rôle d'autres acteurs potentiellement impliqués. Ainsi, les CES pourraient participer à la mise en place de ces centres germinatifs mais l'action d'autres cellules présentes dans le micro-environnement glandulaires telles que les fibroblastes, les macrophages ou encore les ILCs, semble également nécessaire.

Au sein de ces structures lymphoïdes tertiaires, les lymphocytes activés sont soutenus par des interactions complexes avec d'autres lymphocytes et avec des cellules stromales non hématopoïétiques. Bien que le rôle des cellules stromales ait été sous-estimé, il est maintenant clair que les cellules stromales et, en particulier épithéliales, sont impliquées dans le développement de la réponse immunitaire adaptative et de sa persistante. Ainsi, il semble qu'une approche thérapeutique combinée tenant compte à la fois des lymphocytes et des cellules stromales qui les soutiennent pourrait être intéressante.

#### D.III.2.d. Différences entre cellules circulantes et cellules intra-tissulaires

Les modifications phénotypiques et transcriptomiques observées dans les cellules du sang périphériques sont souvent considérées comme un reflet des événements intra-tissulaires. Cependant, il existe des différences entre cellules périphériques et cellules intra-tissulaires que notre travail a permis de préciser. Nous pouvons citer l'exemple de la signature IFN. L'analyse transcriptomique réalisée sur des populations cellulaires triées a permis, pour la première fois, de préciser dans quelles sous-populations cellulaires la signature IFN était présente au cours du SSp. Les CES dans les glandes salivaires ainsi que les LB, les LT CD4 et CD8 triés à partir du sang de patients SSp surexprimaient des gènes IFN-induits par rapport aux sujets contrôles. En revanche, cette signature IFN n'a pas été identifiée dans les sous-populations de LB, LT CD4 et LT CD8 triées à partir des glandes salivaires. Dans cette analyse, il n'a pas été possible de déterminer quel était le type de signature IFN prédominante (type I, type II ou type III), en effet, de nombreux gènes étaient communs aux trois signatures. De façon intéressante, l'analyse spécifique de l'expression des gènes IFN $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  dans ces sous-types cellulaires

montrait l'absence de détection d'expression d'*IFN* $\alpha$  (1, 2 et 17) et d'*IFN* $\beta$ . En revanche, l'*IFN* $\gamma$  et l'*IFN* $\lambda$ 1 étaient exprimés par les LT CD4 et CD8 triés à partir des glandes salivaires et du sang. Il existait une différence d'expression d'*IFN* $\gamma$  entre SSp et contrôles uniquement pour les LT CD8 triés à partir du sang (**Article 2**). Ces résultats renforcent l'hypothèse du rôle des LT CD8 dans l'expression d'*IFN* de type II au cours du SSp. Enfin, concernant l'expression d'*IFN* de type I, les données du RNA-seq n'ont pas permis de déterminer quelles cellules en étaient la source. Une des sources majeures d'*IFN* $\alpha$  identifiée au cours du SSp sont les pDCs (275). Une analyse en single-cell RNA-seq de biopsies de glandes salivaires pourrait permettre de déterminer précisément quels sont les sous-types cellulaires qui expriment les différents sous-types d'*IFN*s.

Un autre exemple de ces différences entre cellules circulantes dans le sang périphérique et cellules intra-tissulaires concerne les LB. L'analyse transcriptomique en RNA-seq de LB triés à partir des glandes salivaires et du sang chez 4 patients SSp a permis de montrer une surexpression du gène CD138 dans les LB tissulaires par rapport aux LB circulants. Ce résultat intéressant est à mettre en parallèle avec les résultats obtenus par une analyse en CyTOF de glandes salivaires de patients SSp et de sujets contrôles qui montrait la présence de plasmocytes au stade de différenciation terminale dans les glandes salivaires de patients SSp, confirmée en immunohistochimie. L'origine de ces plasmocytes reste en revanche une question en suspens. S'agit-il de LB ou de plasmablastes du sang périphérique qui viennent achever leur maturation dans les glandes salivaires ? Ou s'agit-il de plasmocytes résidents issus de la moelle osseuse qui sont attirés par des molécule de homing dans les glandes salivaires ? Szyszko *et al.* ont montré que le micro-environnement glandulaire contient des facteurs nécessaires à la survie prolongée des plasmocytes. CXCL12 et IL6 sont, en effet, fortement exprimés dans l'épithélium salivaire et par les cellules mononuclées infiltrantes. De plus, les plasmocytes présents dans les glandes salivaires ont des caractéristiques de plasmocytes à longue durée de vie. Ainsi, ces résultats suggèrent qu'au cours du SSp, le micro-environnement des glandes salivaires constitue une niche riche en facteurs de survie pour les plasmocytes (113). De façon intéressante, la déplétion lymphocytaire B par rituximab n'entraînait pas de diminution des taux des auto-Ac anti-SSA et anti-SSB au cours du SSp. Cette constatation est un argument pour penser que ces auto-Ac sont produits non pas par des plasmocytes récemment générés mais par des plasmocytes à longue durée de vie préexistants. Les plasmocytes à longue durée de vie ne sont, en effet, pas affectés par le traitement car ils n'expriment pas le CD20. Ainsi, la persistance de production d'auto-Ac après le traitement par rituximab indique qu'il s'agit de plasmocytes capables de survivre plusieurs mois, en l'absence de régénération à partir de précurseurs de lymphocytes B mémoire CD20+ (276).

Par ailleurs, *CCR10*, gène codant pour le récepteur de CCL28 (chimiokine de homing muqueux), est également surexprimé dans les LB tissulaires par rapport aux LB circulants. De façon intéressante, nous

avons pu montrer que les CES sont capables de sécréter CCL28. Une étude réalisée chez des patients lupiques a montré la présence de plasmablastes à IgA circulants exprimant CCR10 (167).

Ces modifications transcriptomiques et phénotypiques des LB et LT en fonction de leur localisation tissulaire ou périphériques sont à prendre en compte pour la compréhension de la physiopathologie du SSp et pour le développement de stratégies thérapeutiques.

#### D.IV. Perspectives thérapeutiques

Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'origine du SSp est la clé pour permettre de proposer des stratégies thérapeutiques efficaces dans cette pathologie. Comme nous l'avons présenté dans l'introduction, plusieurs options thérapeutiques ont déjà été testées dans le SSp avec, le plus souvent, des résultats négatifs. Plusieurs nouvelles stratégies ont émergé récemment. Le blocage de la co-stimulation par l'administration d'inhibiteurs de molécules telles que CD40, le blocage de la fonction des LB par blocage de la voie de signalisation du BCR, et des facteurs de survie des LB ainsi que de la formation de centres germinatifs ectopiques sont actuellement considérés comme les principales stratégies thérapeutiques. A ce jour, l'Ac monoclonal anti-CD40 a permis d'obtenir une amélioration de l'ESSDAI chez les patients atteints de SSp. Une étude récemment publiée par Dörner *et al.* a montré l'intérêt thérapeutique potentiel de l'ianalumab, un anticorps anti-BAFFR, ayant un effet déplétant sur les LB *via* l'induction d'ADCC (277). Enfin, un essai combinant l'hydroxychloroquine et le leflunomide a permis d'obtenir des résultats intéressants en diminuant l'activité de la maladie (184).

##### D.IV.1. Les CES comme cible thérapeutique

Nous avons montré que les CES jouent un rôle actif dans la physiopathologie du SSp. Il est alors légitime de se demander si cibler l'épithélium pourrait avoir un intérêt dans le traitement du SSp. Cependant, la difficulté d'une telle stratégie réside dans le fait que les CES sont indispensables au bon fonctionnement des glandes salivaires et notamment à la sécrétion salivaire. Ainsi, l'objectif serait de rétablir leur fonctionnement et d'éviter les conséquences de leurs interactions pathologiques avec les lymphocytes, tout en évitant un effet toxique sur leur viabilité. Certains auteurs ont montré une plus grande sensibilité des CES de patients SSp à l'apoptose dépendante de Fas. Cette apoptose était provoquée par la liaison de CD40 qui active les voies MAPK (Mitogen-activated protein kinases), NFkB et Fas, initiant l'apoptose (278). Réguler l'apoptose des CES pourrait représenter une stratégie thérapeutique intéressante au cours du SSp. Cependant, l'apoptose fait partie des mécanismes de

régulation normaux permettant de maintenir l'homéostasie dans les glandes salivaires, les CES sénescents étant alors remplacés par de nouvelles CES issues de progéniteurs. Ainsi, l'inhibition de l'apoptose des CES par l'utilisation de petites molécules anti-apoptotiques pourrait avoir des conséquences négatives sur le renouvellement normal de l'épithélium salivaire. Il n'existe à ce jour pas de données expérimentales ayant testé l'action d'un traitement anti-apoptotique. De façon plus générale, alors que les stratégies ayant pour objectif de cibler les interactions entre cellules immunitaires et parenchyme semblent prometteuses, il est important de ne pas négliger les effets délétères potentiels sur l'épithélium et, notamment, d'en prévenir la destruction.

#### D.IV.2. Stratégies d'inhibition des interactions entre CES et lymphocytes B

Parmi les différents traitements déjà testés, certains permettaient d'obtenir une diminution des marqueurs d'activation lymphocytaires B tels que les taux d'Ig sérique et de FR ou encore de CXCL13. Cependant, ces effets biologiques n'étaient pas corrélés à la réponse clinique. Ainsi, l'impact sur certains marqueurs biologiques décrits comme associés à l'activité de la maladie semble être indépendant de l'amélioration clinique de la maladie. Les résultats que nous avons obtenus *in vitro* concernant les interactions entre CES et LB suggèrent qu'une inhibition directe des LB semble nécessaire. Les voies impliquées dans leur survie et activation sont, en effet, probablement multiples et redondantes, et les traitements ne ciblant qu'un seul facteur à la fois se sont révélés insuffisants. Le BCR joue un rôle crucial dans le développement, la survie, la prolifération, la différenciation fonctionnelle et la migration des LB. Cibler la voie de signalisation du BCR, dont font partie l'isoforme delta de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K $\delta$ ) et la Bruton tyrosine kinase (BTK), semble être une piste intéressante dans le SSp.

La PI3K est une kinase régulatrice dont il existe 4 sous-unités (alpha, beta, gamma et delta). La voie de signalisation PI3K joue un rôle fondamental dans la transduction du signal du BCR. Le développement d'un inhibiteur sélectif de la sous-unité delta, l'idelalisib, a permis d'obtenir des résultats intéressants dans certaines pathologies lymphoïdes malignes (279). L'idelalisib, semble agir en modifiant le signal reçu par le micro-environnement tumoral. De façon intéressante, Nayar *et al.* ont montré dans un modèle murin que le seletalisib, inhibiteur sélectif de PI3K $\delta$ , diminuait l'accumulation de lymphocytes et plasmablastes dans les glandes salivaires (280). Enfin, un autre inhibiteur de PI3K $\delta$ , le leniolisib, a fait l'objet d'un essai thérapeutique incluant 30 patients SSp ayant un ESSDAI  $\geq$  6, ESSPRI  $\geq$  5 et un flux salivaire stimulé  $>$  0 mL/min. Sur le plan biologique, ce traitement entraînait une diminution des taux sériques de CXCL13 et des LTfh circulants. Cependant, cet essai n'a pas permis de mettre en évidence

une amélioration de l'ESSPRI et de l'ESSDAI chez les patients traités après 12 semaines de traitement (281).

BTK constitue également une cible potentielle. Les souris qui surexpriment BTK (molécule impliquée dans la transduction du signal du BCR), dans les LB, développent une infiltration lymphocytaire des glandes salivaires. Par ailleurs, une augmentation de BTK a été montrée dans les LB de patients avec SSp. Cette augmentation était corrélée aux taux sériques de FR et à l'infiltration glandulaire. Enfin, une surexpression de BTK a récemment été mise en évidence chez des patients ayant un SSp avant la survenue d'une complication lymphomateuse dans la cohorte prospective ASSESS (282). Un essai de phase 2 est actuellement en cours pour évaluer l'efficacité et la tolérance d'un inhibiteur de BTK (283).

Enfin, l'utilisation concomitante de plusieurs molécules telles que l'HCQ et le LFU pourrait être une option intéressante. Un essai contrôlé, randomisé en double aveugle incluant 29 patients a permis d'obtenir des résultats encourageants et justifie la réalisation d'autres essais incluant un plus grand nombre de patients (184).

#### D.IV.3. Stratégies d'inhibition des voies d'induction de la signature IFN

Nos résultats ont confirmé l'existence d'une signature IFN dans les CES des glandes salivaires et dans les lymphocytes circulants au cours du SSp. Concernant plus précisément le type d'IFN impliqué, un travail récent a permis de montrer que la signature IFN de type I était associée à une maladie plus active et à des marqueurs d'activation lymphocytaires B chez des patients de la cohorte ASSESS (96). Alors que l'IFN de type I joue un rôle majeur au cours du SSp, les résultats que nous avons obtenus concernant l'analyse de LT stimulés par IL7 suggèrent l'implication de l'IFN de type II. L'une des hypothèses pour expliquer cette discordance serait que l'implication des différents types d'IFN varie avec la localisation : IFN de type I dans les cellules circulantes et IFN de type II dans les glandes salivaires, ou encore avec la durée d'évolution de la maladie : IFN de type II au début de la pathologie relayé par une signature IFN de type I, elle-même corrélée à l'activité de la maladie. Enfin, l'IFN de type III pourrait également jouer un rôle dans la physiopathologie du SSp. Nous avons pu montrer que l'IFN $\lambda$  est exprimé par les LT CD8 tissulaires et triés à partir du sang périphérique. De plus, l'IFN $\lambda$  induit également la production d'IL7 par les CES.

Le blocage des voies IFN est une piste thérapeutique prometteuse. Ainsi, un essai utilisant l'ustekinumab, anticorps monoclonal dirigé contre la sous unité p40 commune à l'IL12 et à l'IL23, est en cours dans le SSp (284). L'IL12 et l'IL23 sont respectivement responsables de l'activation des voies

Th1 et Th17, capables de sécréter l'IFN de type II. De même, les inhibiteurs de JAK pourraient être intéressants dans le SSp. Les inhibiteurs de JAK, tels que le tofacitinib ou le baricitinib, sont déjà utilisés dans le traitement de la PR. Au cours du SSp, il existe des arguments expérimentaux en faveur de l'utilisation des inhibiteurs de JAK. *In vitro*, Charras *et al.* ont pu montrer que le ruxolitinib, inhibiteur de JAK1/2, était capable d'inhiber l'induction d'expression d'ICAM 1 et PDL-1 par des cellules épithéliales de la lignée HSG (human submandibular gland) après une stimulation par ROS (reactive oxygen species) (285). De plus, Lee *et al.* ont montré que le filgotinib (inhibiteur de JAK1) diminuait la transcription de gènes IFN-induits et de BAFF dans des CES humaines en culture primaire. Ils ont également pu montrer dans un modèle murin (NOD/ShiLtJ), une augmentation du flux salivaire et une diminution de l'infiltrat lymphocytaire des glandes salivaires (246). Le filgotinib a été évalué au cours d'un essai dont les résultats ne sont pas encore publiés (286). Enfin, l'inhibition spécifique des voies IFN type I en utilisant, par exemple, le sifalimumab (Ac monoclonal anti-IFN $\alpha$ ) ou l'anifrolumab (Ac monoclonal anti-IFN $\alpha$  récepteur) pourrait être une option intéressante. L'anifrolumab a déjà été testé dans le lupus et a permis d'obtenir une réponse à 52 semaines évaluée par le critère composite BICLA (British Isles Lupus Assessment Group (BILAG)-based Composite Lupus Assessment) (287).

Par ailleurs, nos résultats ont permis d'identifier l'axe IL7/IFN comme cible thérapeutique potentielle au cours du SSp. Les expériences que nous avons menées *in vitro* ont permis de montrer que l'inhibition de l'axe IL7-IL7R par un anticorps anti-IL7R était responsable d'une diminution de l'expression de certains gènes IFN-induits. Ces résultats sont prometteurs et suggèrent un intérêt à l'utilisation de cet anticorps anti-IL7R dans le SSp. Il a été montré que l'administration d'un Ac bloquant la chaîne alpha de l'IL7R à des souris NOD améliorait les symptômes du SSp tels que l'hyposalivation et l'infiltration lymphocytaire des glandes salivaires, et entraînait une diminution de la production d'IFN $\gamma$  par les LT CD4 et CD8 dans les glandes salivaires (288). De façon intéressante, Belarif *et al.* ont montré récemment que l'Ac monoclonal anti-IL7R (OSE-127) était capable de diminuer significativement la fréquence des LT Ag-spécifiques producteurs d'IFN $\gamma$  après une restimulation antigénique *in vitro*. *In vivo*, chez des primates non-humains, cet inhibiteur est capable de contrôler une inflammation cutanée déclenchée par des stimulations antigéniques répétées sans modifier le nombre de LT, leur phénotype et leur fonction (289). Ainsi, l'Ac monoclonal anti-IL7R pourrait contrôler la réponse lymphocytaire T Ag-spécifique chronique, permettant d'obtenir et de maintenir une rémission dans des maladies inflammatoires chroniques médiées par la réponse lymphocytaire T.

Enfin, compte tenu de l'hétérogénéité clinique des patients atteints de SSp, l'identification de cibles thérapeutiques spécifiques au sein des glandes salivaires reste un défi majeur. Les événements moléculaires favorisant la présentation de l'Ag, la co-stimulation, la fonction et la survie des LB, ainsi que la formation de centres germinatifs ectopiques, sont actuellement considérés comme des acteurs

clés de la pathogenèse de la maladie et donc des cibles thérapeutiques prometteuses. Cibler les interactions entre lymphocytes et cellules stromales, en particulier les CES, représente une option intéressante dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

## **E. CONCLUSION**

L'objectif de ce travail de thèse était de comprendre le rôle des CES dans la physiopathologie du SSp. Les principaux résultats que nous avons obtenus montrent que les CES sont capables d'interagir à la fois avec les LB et les LT. Nous avons pu observer un effet différentiel des CES de SSp et de sujets contrôles puisque, en co-culture, les CES de SSp étaient capables d'induire une meilleure survie des LB comparées aux CES de sujets contrôles. L'interaction entre CES et LB semble passer principalement par la sécrétion de facteurs solubles. Les expériences d'inhibition ciblant individuellement ces facteurs solubles n'ont pas permis de déterminer lequel pouvait être responsable de l'effet des CES sur les LB. Une hypothèse serait que plusieurs facteurs redondants soient impliqués. En revanche, l'ajout de leflunomide, d'un inhibiteur de BTK ou d'un inhibiteur de PI3K ont permis d'inhiber l'induction de viabilité des LB par les CES. Concernant l'interaction entre CES et LT, nous avons montré que les CES secrètent de l'IL7 après stimulation par IFN, l'IL7 étant elle-même capable d'induire la production d'IFN par les LT. Ces mécanismes pourraient induire et/ou entretenir localement, d'une part l'hyperactivation lymphocytaire B chronique présente au cours du SSp et, d'autre part la signature IFN décrite dans les glandes salivaires au cours du SSp. Ainsi, ces résultats confirment l'hypothèse que les CES ont une responsabilité dans la pathogénie du SSp. La meilleure compréhension de leurs mécanismes d'action pourrait permettre de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques au cours du SSp.

## F. REFERENCES

1. Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B, Vinuesa CG. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature*. 2 juin 2005;435(7042):590-7.
2. Murphy K, Weaver C. *Janeway's Immunobiology*. Garland Science; 2016. 925 p.
3. Brink R, Phan TG. Self-Reactive B Cells in the Germinal Center Reaction [Internet]. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052510>. Annual Reviews; 2018 [cité 24 mai 2020]. Disponible sur: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-immunol-051116-052510>
4. Burnett DL, Langley DB, Schofield P, Hermes JR, Chan TD, Jackson J, et al. Germinal center antibody mutation trajectories are determined by rapid self/foreign discrimination. *Science*. 13 avr 2018;360(6385):223-6.
5. Reed JH, Jackson J, Christ D, Goodnow CC. Clonal redemption of autoantibodies by somatic hypermutation away from self-reactivity during human immunization. *J Exp Med*. 27 juin 2016;213(7):1255-65.
6. Vanderlugt CL, Miller SD. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. févr 2002;2(2):85-95.
7. Zuklys S, Balciunaite G, Agarwal A, Fasler-Kan E, Palmer E, Holländer GA. Normal thymic architecture and negative selection are associated with Aire expression, the gene defective in the autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED). *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 août 2000;165(4):1976-83.
8. Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, Dale JK, Elkon KB, Rösen-Wolff A, et al. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood*. 01 2001;98(1):194-200.
9. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. janv 2001;27(1):20-1.
10. Brusko TM, Putnam AL, Bluestone JA. Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunol Rev*. juin 2008;223:371-90.
11. Fagarasan S, Honjo T. T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science*. 6 oct 2000;290(5489):89-92.
12. Espéli M, Bashford-Rogers R, Sowerby JM, Alouche N, Wong L, Denton AE, et al. FcγRIIb differentially regulates pre-immune and germinal center B cell tolerance in mouse and human. *Nat Commun*. 29 2019;10(1):1970.
13. Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:231-64.

14. Fox CJ, Hammerman PS, Cinalli RM, Master SR, Chodosh LA, Thompson CB. The serine/threonine kinase Pim-2 is a transcriptionally regulated apoptotic inhibitor. *Genes Dev.* 1 août 2003;17(15):1841-54.
15. Lesley R, Xu Y, Kalled SL, Hess DM, Schwab SR, Shu H-B, et al. Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity.* avr 2004;20(4):441-53.
16. Craxton A, Draves KE, Gruppi A, Clark EA. BAFF regulates B cell survival by downregulating the BH3-only family member Bim via the ERK pathway. *J Exp Med.* 21 nov 2005;202(10):1363-74.
17. Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today.* sept 1993;14(9):426-30.
18. Wang L, Wang F-S, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med.* oct 2015;278(4):369-95.
19. Matsumoto I, Staub A, Benoist C, Mathis D. Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science.* 26 nov 1999;286(5445):1732-5.
20. Buyon JP, Tseng CE, Di Donato F, Rashbaum W, Morris A, Chan EK. Cardiac expression of 52beta, an alternative transcript of the congenital heart block-associated 52-kd SS-A/Ro autoantigen, is maximal during fetal development. *Arthritis Rheum.* avr 1997;40(4):655-60.
21. Rodríguez ÉG, Morán GAG. Are autoimmune diseases autoimmune epithelitis? [Internet]. *Autoimmunity: From Bench to Bedside* [Internet]. El Rosario University Press; 2013 [cité 15 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459469/>
22. Lande R, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Ann N Y Acad Sci.* janv 2010;1183:89-103.
23. Mitsias DI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. The role of epithelial cells in the initiation and perpetuation of autoimmune lesions: lessons from Sjogren's syndrome (autoimmune epithelitis). *Lupus.* 2006;15(5):255-61.
24. Manoussakis MN, Kapsogeorgou EK. The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *J Autoimmun.* nov 2010;35(3):219-24.
25. Pradhan V, Borse V, Ghosh K. PTPN22 gene polymorphisms in autoimmune diseases with special reference to systemic lupus erythematosus disease susceptibility. *J Postgrad Med.* sept 2010;56(3):239-42.
26. Manganelli P, Fietta P. Apoptosis and Sjögren syndrome. *Semin Arthritis Rheum.* août 2003;33(1):49-65.
27. Rosen A, Casciola-Rosen L, Ahearn J. Novel packages of viral and self-antigens are generated during apoptosis. *J Exp Med.* 1 avr 1995;181(4):1557-61.
28. Maldini C, Seror R, Fain O, Dhote R, Amoura Z, De Bandt M, et al. Epidemiology of primary Sjögren's syndrome in a French multiracial/multiethnic area. *Arthritis Care Res.* mars 2014;66(3):454-63.
29. Mariette X, Criswell LA. Primary Sjögren's Syndrome. *N Engl J Med.* 8 mars 2018;378(10):931-9.

30. Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM, et al. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for primary Sjögren's syndrome: A consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. *Ann Rheum Dis.* janv 2017;76(1):9-16.
31. Seror R, Bootsma H, Saraux A, Bowman SJ, Theander E, Brun JG, et al. 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.* févr 2016;75(2):382-9.
32. Seror R, Theander E, Brun JG, Ramos-Casals M, Valim V, Dörner T, et al. Validation of EULAR primary Sjögren's syndrome disease activity (ESSDAI) and patient indexes (ESSPRI). *Ann Rheum Dis.* mai 2015;74(5):859-66.
33. Fox RI, Kang HI. Pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am.* août 1992;18(3):517-38.
34. Sumida T, Namekawa T, Maeda T, Nishioka K. New T-cell epitope of Ro/SS-A 52 kDa protein in labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *Lancet Lond Engl.* 14 déc 1996;348(9042):1667.
35. Gottenberg J-E, Seror R, Miceli-Richard C, Benessiano J, Devauchelle-Pensec V, Dieude P, et al. Serum levels of beta2-microglobulin and free light chains of immunoglobulins are associated with systemic disease activity in primary Sjögren's syndrome. Data at enrollment in the prospective ASSESS cohort. *PloS One.* 2013;8(5):e59868.
36. Barrera MJ, Bahamondes V, Sepúlveda D, Quest AFG, Castro I, Cortés J, et al. Sjögren's syndrome and the epithelial target: a comprehensive review. *J Autoimmun.* mai 2013;42:7-18.
37. Kohler DC. Collège universitaire et hospitalier des histologistes, embryologistes, cytologistes et cytogénéticiens (CHEC). :200.
38. Fisher BA, Brown RM, Bowman SJ, Barone F. A review of salivary gland histopathology in primary Sjögren's syndrome with a focus on its potential as a clinical trials biomarker. *Ann Rheum Dis.* sept 2015;74(9):1645-50.
39. Kapsogeorgou EK, Christodoulou MI, Panagiotakos DB, Paikos S, Tassidou A, Tzioufas AG, et al. Minor salivary gland inflammatory lesions in Sjögren syndrome: do they evolve? *J Rheumatol.* sept 2013;40(9):1566-71.
40. Risselada AP, Looije MF, Kruize AA, Bijlsma JWJ, van Roon JAG. The role of ectopic germinal centers in the immunopathology of primary Sjögren's syndrome: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum.* févr 2013;42(4):368-76.
41. Bombardieri M, Lewis M, Pitzalis C. Ectopic lymphoid neogenesis in rheumatic autoimmune diseases. *Nat Rev Rheumatol.* mars 2017;13(3):141-54.
42. Kroese FGM, Haacke EA, Bombardieri M. The role of salivary gland histopathology in primary Sjögren's syndrome: promises and pitfalls. *Clin Exp Rheumatol.* juin 2018;36 Suppl 112(3):222-33.

43. Taylor KE, Wong Q, Levine DM, McHugh C, Laurie C, Doheny K, et al. Genome-Wide Association Analysis Reveals Genetic Heterogeneity of Sjögren's Syndrome According to Ancestry. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2017;69(6):1294-305.
44. Lessard CJ, Li H, Adrianto I, Ice JA, Rasmussen A, Grundahl KM, et al. Variants at multiple loci implicated in both innate and adaptive immune responses are associated with Sjögren's syndrome. *Nat Genet*. nov 2013;45(11):1284-92.
45. Cobb BL, Lessard CJ, Harley JB, Moser KL. Genes and Sjögren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am*. nov 2008;34(4):847-68, vii.
46. Gottenberg J-E, Busson M, Loiseau P, Cohen-Solal J, Lepage V, Charron D, et al. In primary Sjögren's syndrome, HLA class II is associated exclusively with autoantibody production and spreading of the autoimmune response. *Arthritis Rheum*. août 2003;48(8):2240-5.
47. Li Y, Zhang K, Chen H, Sun F, Xu J, Wu Z, et al. A genome-wide association study in Han Chinese identifies a susceptibility locus for primary Sjögren's syndrome at 7q11.23. *Nat Genet*. nov 2013;45(11):1361-5.
48. Cruz-Tapias P, Rojas-Villarraga A, Maier-Moore S, Anaya J-M. HLA and Sjögren's syndrome susceptibility. A meta-analysis of worldwide studies. *Autoimmun Rev*. févr 2012;11(4):281-7.
49. 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*. juill 2009;60(7):1991-7.
50. 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*. janv 2009;10(1):68-76.
51. Imgenberg-Kreuz J, Sandling JK, Nordmark G. Epigenetic alterations in primary Sjögren's syndrome - an overview. *Clin Immunol Orlando Fla*. 2018;196:12-20.
52. Miceli-Richard C, Wang-Renault S-F, Boudaoud S, Busato F, Lallemand C, Bethune K, et al. Overlap between differentially methylated DNA regions in blood B lymphocytes and genetic at-risk loci in primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. mai 2016;75(5):933-40.
53. Altorok N, Coit P, Hughes T, Koelsch KA, Stone DU, Rasmussen A, et al. Genome-wide DNA methylation patterns in naive CD4+ T cells from patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. mars 2014;66(3):731-9.
54. Imgenberg-Kreuz J, Sandling JK, Almlöf JC, Nordlund J, Signér L, Norheim KB, et al. Genome-wide DNA methylation analysis in multiple tissues in primary Sjögren's syndrome reveals regulatory effects at interferon-induced genes. *Ann Rheum Dis*. nov 2016;75(11):2029-36.
55. Cole MB, Quach H, Quach D, Baker A, Taylor KE, Barcellos LF, et al. Epigenetic Signatures of Salivary Gland Inflammation in Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2016;68(12):2936-44.
56. Charras A, Konsta OD, Le Dantec C, Bagacean C, Kapsogeorgou EK, Tzioufas AG, et al. Cell-specific epigenome-wide DNA methylation profile in long-term cultured minor salivary gland epithelial cells from patients with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. mars 2017;76(3):625-8.

57. Alevizos I, Alexander S, Turner RJ, Illei GG. MicroRNA expression profiles as biomarkers of minor salivary gland inflammation and dysfunction in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* févr 2011;63(2):535-44.
58. Peng L, Ma W, Yi F, Yang Y-J, Lin W, Chen H, et al. MicroRNA profiling in Chinese patients with primary Sjögren syndrome reveals elevated miRNA-181a in peripheral blood mononuclear cells. *J Rheumatol.* nov 2014;41(11):2208-13.
59. Shi H, Zheng L, Zhang P, Yu C. miR-146a and miR-155 expression in PBMCs from patients with Sjögren's syndrome. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol.* nov 2014;43(10):792-7.
60. Wang-Renault S-F, Boudaoud S, Nocturne G, Roche E, Sigrist N, Daviaud C, et al. Deregulation of microRNA expression in purified T and B lymphocytes from patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* janv 2018;77(1):133-40.
61. Haddad J, Deny P, Munz-Gotheil C, Ambrosini JC, Trinchet JC, Pateron D, et al. Lymphocytic sialadenitis of Sjögren's syndrome associated with chronic hepatitis C virus liver disease. *Lancet Lond Engl.* 8 févr 1992;339(8789):321-3.
62. Terada K, Katamine S, Eguchi K, Moriuchi R, Kita M, Shimada H, et al. Prevalence of serum and salivary antibodies to HTLV-1 in Sjögren's syndrome. *Lancet Lond Engl.* 22 oct 1994;344(8930):1116-9.
63. Mariette X, Agbalika F, Zucker-Franklin D, Clerc D, Janin A, Cherot P, et al. Detection of the tax gene of HTLV-I in labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome and other diseases of the oral cavity. *Clin Exp Rheumatol.* juin 2000;18(3):341-7.
64. Fox RI, Pearson G, Vaughan JH. Detection of Epstein-Barr virus-associated antigens and DNA in salivary gland biopsies from patients with Sjögren's syndrome. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 nov 1986;137(10):3162-8.
65. Mariette X, Gozlan J, Clerc D, Bisson M, Morinet F. Detection of Epstein-Barr virus DNA by in situ hybridization and polymerase chain reaction in salivary gland biopsy specimens from patients with Sjögren's syndrome. *Am J Med.* mars 1991;90(3):286-94.
66. Sanosyan A, Daien C, Nutz A, Bollore K, Bedin A-S, Morel J, et al. Discrepancy of Serological and Molecular Patterns of Circulating Epstein-Barr Virus Reactivation in Primary Sjögren's Syndrome. *Front Immunol.* 2019;10:1153.
67. Iwakiri D, Zhou L, Samanta M, Matsumoto M, Ebihara T, Seya T, et al. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3. *J Exp Med.* 28 sept 2009;206(10):2091-9.
68. Nandula S-R, Scindia YM, Dey P, Bagavant H, Deshmukh US. Activation of innate immunity accelerates sialoadenitis in a mouse model for Sjögren's syndrome-like disease. *Oral Dis.* nov 2011;17(8):801-7.
69. Deshmukh US, Nandula SR, Thimmalapura P-R, Scindia YM, Bagavant H. Activation of innate immune responses through Toll-like receptor 3 causes a rapid loss of salivary gland function. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol.* janv 2009;38(1):42-7.

70. Fleck M, Kern ER, Zhou T, Lang B, Mountz JD. Murine cytomegalovirus induces a Sjögren's syndrome-like disease in C57Bl/6-lpr/lpr mice. *Arthritis Rheum.* déc 1998;41(12):2175-84.
71. Hancks DC, Kazazian HH. Roles for retrotransposon insertions in human disease. *Mob DNA.* 2016;7:9.
72. Sander DM, Szabo S, Gallaher WR, Deas JE, Thompson JJ, Cao Y, et al. Involvement of human intracisternal A-type retroviral particles in autoimmunity. *Microsc Res Tech.* nov 2005;68(3-4):222-34.
73. Brookes SM, Pandolfino YA, Mitchell TJ, Venables PJ, Shattles WG, Clark DA, et al. The immune response to and expression of cross-reactive retroviral gag sequences in autoimmune disease. *Br J Rheumatol.* nov 1992;31(11):735-42.
74. Hishikawa T, Ogasawara H, Kaneko H, Shirasawa T, Matsuura Y, Sekigawa I, et al. Detection of antibodies to a recombinant gag protein derived from human endogenous retrovirus clone 4-1 in autoimmune diseases. *Viral Immunol.* 1997;10(3):137-47.
75. Moyes DL, Martin A, Sawcer S, Temperton N, Worthington J, Griffiths DJ, et al. The distribution of the endogenous retroviruses HERV-K113 and HERV-K115 in health and disease. *Genomics.* sept 2005;86(3):337-41.
76. Kalogirou E-M, Piperi EP, Tosios KI, Tsiambas E, Fanourakis G, Sklavounou A. Ductal cells of minor salivary glands in Sjögren's syndrome express LINE-1 ORF2p and APOBEC3B. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol.* févr 2018;47(2):179-85.
77. 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;88:75-82.
78. 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.* 23 oct 2015;350(6259):455-9.
79. Silverman GJ, Azzouz DF, Alekseyenko AV. Systemic Lupus Erythematosus and dysbiosis in the microbiome: cause or effect or both? *Curr Opin Immunol.* déc 2019;61:80-5.
80. de Paiva CS, Jones DB, Stern ME, Bian F, Moore QL, Corbiere S, et al. Altered Mucosal Microbiome Diversity and Disease Severity in Sjögren Syndrome. *Sci Rep.* 18 avr 2016;6:23561.
81. Zaheer M, Wang C, Bian F, Yu Z, Hernandez H, de Souza RG, et al. Protective role of commensal bacteria in Sjögren Syndrome. *J Autoimmun.* 2018;93:45-56.
82. McCoy SS, Sampene E, Baer AN. Sjögren's Syndrome is Associated With Reduced Lifetime Sex Hormone Exposure: A Case-Control Study. *Arthritis Care Res.* 24 juin 2019;
83. Hayashi Y, Arakaki R, Ishimaru N. Apoptosis and estrogen deficiency in primary Sjögren syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* sept 2004;16(5):522-6.
84. Ishimaru N, Arakaki R, Watanabe M, Kobayashi M, Miyazaki K, Hayashi Y. Development of autoimmune exocrinopathy resembling Sjögren's syndrome in estrogen-deficient mice of healthy background. *Am J Pathol.* oct 2003;163(4):1481-90.

85. Peeva E, Zouali M. Spotlight on the role of hormonal factors in the emergence of autoreactive B-lymphocytes. *Immunol Lett.* 15 nov 2005;101(2):123-43.
86. Brennan MT, Sankar V, Leakan RA, Grisius MM, Collins MT, Fox PC, et al. Sex steroid hormones in primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol.* juin 2003;30(6):1267-71.
87. Karlsen M, Jonsson R, Brun JG, Appel S, Hansen T. TLR-7 and -9 Stimulation of Peripheral Blood B Cells Indicate Altered TLR Signalling in Primary Sjögren's Syndrome Patients by Increased Secretion of Cytokines. *Scand J Immunol.* déc 2015;82(6):523-31.
88. Brauner S, Folkersen L, Kvarnström M, Meisgen S, Petersen S, Franzén-Malmros M, et al. H1N1 vaccination in Sjögren's syndrome triggers polyclonal B cell activation and promotes autoantibody production. *Ann Rheum Dis.* oct 2017;76(10):1755-63.
89. Souyris M, Cenac C, Azar P, Daviaud D, Canivet A, Grunenwald S, et al. TLR7 escapes X chromosome inactivation in immune cells. *Sci Immunol.* 26 2018;3(19).
90. Mougeot J-L, Noll BD, Bahrani Mougeot FK. Sjögren's syndrome X-chromosome dose effect: An epigenetic perspective. *Oral Dis.* mars 2019;25(2):372-84.
91. Belkhir R, Burel SL, Dunogeant L, Marabelle A, Hollebecque A, Besse B, et al. Rheumatoid arthritis and polymyalgia rheumatica occurring after immune checkpoint inhibitor treatment. *Ann Rheum Dis.* oct 2017;76(10):1747-50.
92. Ramos-Casals M, Maria A, Suárez-Almazor ME, Lambotte O, Fisher BA, Hernández-Molina G, et al. Sicca/Sjögren's syndrome triggered by PD-1/PD-L1 checkpoint inhibitors. Data from the International ImmunoCancer Registry (ICIR). *Clin Exp Rheumatol.* juin 2019;37 Suppl 118(3):114-22.
93. 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.* juin 2009;10(4):285-96.
94. 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.* mai 2005;52(5):1534-44.
95. 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.* 21 févr 2006;103(8):2770-5.
96. Type I High-IFN Gene Signature in Associated with Higher ESDAI at Enrollment and Follow-up in the Prospective Multicenter Assess Cohort of 395 Patients. ACR Meeting Abstracts. <https://acrabstracts.org/abstract/type-i-high-ifn-gene-signature-in-associated-with-higher-essdai-at-enrollment-and-follow-up-in-the-prospective-multicenter-assess-cohort-of-395-patients/>
97. 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.* sept 2015;67(9):2437-46.
98. 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.* 01 2018;57(5):921-30.

99. 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.* avr 2005;52(4):1185-95.
100. Apostolou E, Kapsogeorgou EK, Konsta OD, Giotakis I, Saridaki MI, Andreacos E, et al. Expression of type III interferons (IFN $\lambda$ s) and their receptor in Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol.* déc 2016;186(3):304-12.
101. Ittah M, Miceli-Richard C, Eric Gottenberg J-, Lavie F, Lazure T, Ba N, et al. B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) is expressed under stimulation by interferon in salivary gland epithelial cells in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(2):R51.
102. Nocturne G, Mariette X. Advances in understanding the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol.* sept 2013;9(9):544-56.
103. Nocturne G, Mariette X. B cells in the pathogenesis of primary Sjögren syndrome. *Nat Rev Rheumatol.* 2018;14(3):133-45.
104. Vincent FB, Morand EF, Schneider P, Mackay F. The BAFF/APRIL system in SLE pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol.* juin 2014;10(6):365-73.
105. Hikida M, Johmura S, Hashimoto A, Takezaki M, Kurosaki T. Coupling between B cell receptor and phospholipase C-gamma2 is essential for mature B cell development. *J Exp Med.* 18 août 2003;198(4):581-9.
106. Yamada T, Zhang K, Yamada A, Zhu D, Saxon A. B lymphocyte stimulator activates p38 mitogen-activated protein kinase in human Ig class switch recombination. *Am J Respir Cell Mol Biol.* mai 2005;32(5):388-94.
107. Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, Ambrose C, Baetscher M, Schneider P, et al. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med.* 6 déc 1999;190(11):1697-710.
108. Mielle J, Tison A, Cornec D, Le Pottier L, Daien C, Pers J-O. B cells in Sjögren's syndrome: from pathophysiology to therapeutic target. *Rheumatol Oxf Engl.* 15 févr 2019;
109. Hansen A, Odendahl M, Reiter K, Jacobi AM, Feist E, Scholze J, et al. Diminished peripheral blood memory B cells and accumulation of memory B cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* août 2002;46(8):2160-71.
110. Mingueneau M, Boudaoud S, Haskett S, Reynolds TL, Nocturne G, Norton E, et al. Cytometry by time-of-flight immunophenotyping identifies a blood Sjögren's signature correlating with disease activity and glandular inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(6):1809-1821.e12.
111. Tengné P, Halse AK, Haga HJ, Jonsson R, Wahren-Herlenius M. Detection of anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibody-producing cells in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* déc 1998;41(12):2238-48.
112. Anolik JH, Barnard J, Cappione A, Pugh-Bernard AE, Felgar RE, Looney RJ, et al. Rituximab improves peripheral B cell abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* nov 2004;50(11):3580-90.

113. Szyszko EA, Brokstad KA, Oijordsbakken G, Jonsson MV, Jonsson R, Skarstein K. Salivary glands of primary Sjögren's syndrome patients express factors vital for plasma cell survival. *Arthritis Res Ther.* 7 janv 2011;13(1):R2.
114. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity.* 29 janv 2010;32(1):129-40.
115. Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J Autoimmun.* mai 2011;36(3-4):228-38.
116. Candando KM, Lykken JM, Tedder TF. B10 cell regulation of health and disease. *Immunol Rev.* mai 2014;259(1):259-72.
117. Menon M, Blair PA, Isenberg DA, Mauri C. A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity.* 15 mars 2016;44(3):683-97.
118. Fogel O, Rivière 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.
119. Aloisi F, Pujol-Borrell R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* mars 2006;6(3):205-17.
120. Pitzalis C, Jones GW, Bombardieri M, Jones SA. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* juill 2014;14(7):447-62.
121. Gottenberg J-E, Lavie F, Abbed K, Gasnault J, Le Nevot E, Delfraissy J-F, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells are not impaired in patients with primary Sjögren's syndrome. *J Autoimmun.* mai 2005;24(3):235-42.
122. Liu M-F, Lin L-H, Weng C-T, Weng M-Y. Decreased CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>bright T cells in peripheral blood of patients with primary Sjogren's syndrome. *Lupus.* janv 2008;17(1):34-9.
123. Li X, Li X, Qian L, Wang G, Zhang H, Wang X, et al. T regulatory cells are markedly diminished in diseased salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol.* déc 2007;34(12):2438-45.
124. Verstappen GM, Kroese FGM, Bootsma H. T cells in primary Sjögren's syndrome: targets for early intervention. *Rheumatol Oxf Engl.* 15 févr 2019;
125. Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos NM, Moutsopoulos HM. Foxp3<sup>+</sup> T-regulatory cells in Sjogren's syndrome: correlation with the grade of the autoimmune lesion and certain adverse prognostic factors. *Am J Pathol.* nov 2008;173(5):1389-96.
126. Kondrack RM, Harbertson J, Tan JT, McBreen ME, Surh CD, Bradley LM. Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J Exp Med.* 15 déc 2003;198(12):1797-806.
127. Bikker A, Kruize AA, Wenting M, Versnel MA, Bijlsma JWJ, Lafeber FPJG, et al. Increased interleukin (IL)-7R $\alpha$  expression in salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome is restricted to T cells and correlates with IL-7 expression, lymphocyte numbers and activity. *Ann Rheum Dis.* juin 2012;71(6):1027-33.

128. Timmer TCG, Baltus B, Vondenhoff M, Huizinga TWJ, Tak PP, Verweij CL, et al. Inflammation and ectopic lymphoid structures in rheumatoid arthritis synovial tissues dissected by genomics technology: identification of the interleukin-7 signaling pathway in tissues with lymphoid neogenesis. *Arthritis Rheum.* août 2007;56(8):2492-502.
129. Moutsopoulos HM, Kordossis T. Sjögren's syndrome revisited: autoimmune epithelitis. *Br J Rheumatol.* mars 1996;35(3):204-6.
130. Mitsias DI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome: why autoimmune epithelitis? *Oral Dis.* nov 2006;12(6):523-32.
131. Ittah M, Miceli-Richard C, Gottenberg J-E, Sellam J, Eid P, Lebon P, et al. Viruses induce high expression of BAFF by salivary gland epithelial cells through TLR- and type-I IFN-dependent and -independent pathways. *Eur J Immunol.* avr 2008;38(4):1058-64.
132. Spachidou MP, Bourazopoulou E, Maratheftis CI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG, et al. Expression of functional Toll-like receptors by salivary gland epithelial cells: increased mRNA expression in cells derived from patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol.* mars 2007;147(3):497-503.
133. Zheng L, Zhang Z, Yu C, Yang C. Expression of Toll-like receptors 7, 8, and 9 in primary Sjögren's syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* juin 2010;109(6):844-50.
134. Kong L, Ogawa N, Nakabayashi T, Liu GT, D'Souza E, McGuff HS, et al. Fas and Fas ligand expression in the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* janv 1997;40(1):87-97.
135. Sumida T, Matsumoto I, Murata H, Namekawa T, Matsumura R, Tomioka H, et al. TCR in Fas-sensitive T cells from labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 janv 1997;158(2):1020-5.
136. Masago R, Aiba-Masago S, Talal N, Zuluaga FJ, Al-Hashimi I, Moody M, et al. Elevated proapoptotic Bax and caspase 3 activation in the NOD.scid model of Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* mars 2001;44(3):693-702.
137. Ohlsson M, Skarstein K, Bolstad AI, Johannessen AC, Jonsson R. Fas-induced apoptosis is a rare event in Sjögren's syndrome. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* janv 2001;81(1):95-105.
138. Mariette X, Sibilia J, Roux S, Meignin V, Janin A. A new defensive mechanism to prevent apoptosis in salivary ductal cells from patients with Sjögren's syndrome: over-expression of p53 and p21. *Rheumatol Oxf Engl.* janv 2002;41(1):96-9.
139. Zuo J, Williams AEG, Park Y-J, Choi K, Chan AL, Reeves WH, et al. Muscarinic type 3 receptor autoantibodies are associated with anti-SSA/Ro autoantibodies in Sjögren's syndrome. *J Immunol Methods.* 2016;437:28-36.
140. Steinfeld S, Cogan E, King LS, Agre P, Kiss R, Delporte C. Abnormal distribution of aquaporin-5 water channel protein in salivary glands from Sjögren's syndrome patients. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* févr 2001;81(2):143-8.
141. Gottenberg J-E, Busson M, Cohen-Solal J, Lavie F, Abbed K, Kimberly RP, et al. Correlation of serum B lymphocyte stimulator and beta2 microglobulin with autoantibody secretion and systemic involvement in primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* juill 2005;64(7):1050-5.

142. Daridon C, Devauchelle V, Hutin P, Le Berre R, Martins-Carvalho C, Bendaoud B, et al. Aberrant expression of BAFF by B lymphocytes infiltrating the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* avr 2007;56(4):1134-44.
143. Hung YH, Lee YH, Chen PP, Lin YZ, Lin CH, Yen JH. Role of Salivary Immune Parameters in Patients With Primary Sjögren's Syndrome. *Ann Lab Med.* janv 2019;39(1):76-80.
144. Karabulut G, Kitapçioğlu G, Özçaka Ö, Alpöz E, Nalbantsoy A, Koçanaoğulları H, et al. Saliva levels of caspase-1, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  in primary Sjögren's syndrome: oral mucosal abnormalities revisited. *Turk J Med Sci.* 14 juin 2018;48(3):554-9.
145. Horiuchi M, Yamano S, Inoue H, Ishii J, Nagata Y, Adachi H, et al. Possible involvement of IL-12 expression by Epstein-Barr virus in Sjögren syndrome. *J Clin Pathol.* nov 1999;52(11):833-7.
146. Bombardieri M, Barone F, Pittoni V, Alessandri C, Conigliaro P, Blades MC, et al. Increased circulating levels and salivary gland expression of interleukin-18 in patients with Sjögren's syndrome: relationship with autoantibody production and lymphoid organization of the periductal inflammatory infiltrate. *Arthritis Res Ther.* 2004;6(5):R447-456.
147. Xanthou G, Polihronis M, Tzioufas AG, Paikos S, Sideras P, Moutsopoulos HM. « Lymphoid » chemokine messenger RNA expression by epithelial cells in the chronic inflammatory lesion of the salivary glands of Sjögren's syndrome patients: possible participation in lymphoid structure formation. *Arthritis Rheum.* févr 2001;44(2):408-18.
148. Ogawa N, Kawanami T, Shimoyama K, Ping L, Sugai S. Expression of interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (CXCL11) in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Clin Immunol Orlando Fla.* sept 2004;112(3):235-8.
149. Mitsias DI, Tzioufas AG, Veiopoulou C, Zintzaras E, Tassios IK, Kogopoulou O, et al. The Th1/Th2 cytokine balance changes with the progress of the immunopathological lesion of Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol.* juin 2002;128(3):562-8.
150. Muehlinghaus G, Cigliano L, Huehn S, Peddinghaus A, Leyendeckers H, Hauser AE, et al. Regulation of CXCR3 and CXCR4 expression during terminal differentiation of memory B cells into plasma cells. *Blood.* 15 mai 2005;105(10):3965-71.
151. Hernández-Molina G, Michel-Peregrina M, Hernández-Ramírez DF, Sánchez-Guerrero J, Llorente L. Chemokine saliva levels in patients with primary Sjögren's syndrome, associated Sjögren's syndrome, pre-clinical Sjögren's syndrome and systemic autoimmune diseases. *Rheumatol Oxf Engl.* juill 2011;50(7):1288-92.
152. Salomonsson S, Larsson P, Tengnér P, Mellquist E, Hjelmström P, Wahren-Herlenius M. Expression of the B cell-attracting chemokine CXCL13 in the target organ and autoantibody production in ectopic lymphoid tissue in the chronic inflammatory disease Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol.* avr 2002;55(4):336-42.
153. Barone F, Nayar S, Campos J, Cloake T, Withers DR, Toellner K-M, et al. IL-22 regulates lymphoid chemokine production and assembly of tertiary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 sept 2015;112(35):11024-9.
154. Luther SA, Bidgol A, Hargreaves DC, Schmidt A, Xu Y, Paniyadi J, et al. Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 juill 2002;169(1):424-33.

155. Allen CDC, Ansel KM, Low C, Lesley R, Tamamura H, Fujii N, et al. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol.* sept 2004;5(9):943-52.
156. Barone F, Bombardieri M, Rosado MM, Morgan PR, Challacombe SJ, De Vita S, et al. CXCL13, CCL21, and CXCL12 expression in salivary glands of patients with Sjögren's syndrome and MALT lymphoma: association with reactive and malignant areas of lymphoid organization. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 avr 2008;180(7):5130-40.
157. Szyszko EA, Brun JG, Skarstein K, Peck AB, Jonsson R, Brokstad KA. Phenotypic diversity of peripheral blood plasma cells in primary Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol.* janv 2011;73(1):18-28.
158. Biajoux V, Natt J, Freitas C, Alouche N, Sacquin A, Hemon P, et al. Efficient Plasma Cell Differentiation and Trafficking Require Cxcr4 Desensitization. *Cell Rep.* 27 2016;17(1):193-205.
159. Luther SA, Lopez T, Bai W, Hanahan D, Cyster JG. BLC expression in pancreatic islets causes B cell recruitment and lymphotoxin-dependent lymphoid neogenesis. *Immunity.* mai 2000;12(5):471-81.
160. Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Förster R, Sedgwick JD, et al. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature.* 20 juill 2000;406(6793):309-14.
161. Beltman JB, Allen CDC, Cyster JG, de Boer RJ. B cells within germinal centers migrate preferentially from dark to light zone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24 mai 2011;108(21):8755-60.
162. Hieshima K, Ohtani H, Shibano M, Izawa D, Nakayama T, Kawasaki Y, et al. CCL28 has dual roles in mucosal immunity as a chemokine with broad-spectrum antimicrobial activity. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 févr 2003;170(3):1452-61.
163. Pan J, Kunkel EJ, Gossler U, Lazarus N, Langdon P, Broadwell K, et al. A novel chemokine ligand for CCR10 and CCR3 expressed by epithelial cells in mucosal tissues. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 sept 2000;165(6):2943-9.
164. Ogawa H, Iimura M, Eckmann L, Kagnoff MF. Regulated production of the chemokine CCL28 in human colon epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* nov 2004;287(5):G1062-1069.
165. Wilson E, Butcher EC. CCL28 controls immunoglobulin (Ig)A plasma cell accumulation in the lactating mammary gland and IgA antibody transfer to the neonate. *J Exp Med.* 20 sept 2004;200(6):805-9.
166. Wehmeyer A, Das PK, Swaak T, Gebhart W, Kijlstra A. Sjögren syndrome: comparative studies in local ocular and serum immunoglobulin concentrations with special reference to secretory IgA. *Int Ophthalmol.* mai 1991;15(3):147-51.
167. Mei HE, Hahne S, Redlin A, Hoyer BF, Wu K, Baganz L, et al. Plasmablasts With a Mucosal Phenotype Contribute to Plasmacytosis in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* 2017;69(10):2018-28.
168. Lindahl G, Hedfors E, Klareskog L, Forsum U. Epithelial HLA-DR expression and T lymphocyte subsets in salivary glands in Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol.* sept 1985;61(3):475-82.

169. Moutsopoulos HM, Hooks JJ, Chan CC, Dalavanga YA, Skopouli FN, Detrick B. HLA-DR expression by labial minor salivary gland tissues in Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* août 1986;45(8):677-83.
170. Tsunawaki S, Nakamura S, Ohyama Y, Sasaki M, Ikebe-Hiroki A, Hiraki A, et al. Possible function of salivary gland epithelial cells as nonprofessional antigen-presenting cells in the development of Sjögren's syndrome. *J Rheumatol.* sept 2002;29(9):1884-96.
171. Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Functional expression of a costimulatory B7.2 (CD86) protein on human salivary gland epithelial cells that interacts with the CD28 receptor, but has reduced binding to CTLA4. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 mars 2001;166(5):3107-13.
172. Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. CD40 on salivary gland epithelial cells: high constitutive expression by cultured cells from Sjögren's syndrome patients indicating their intrinsic activation. *Clin Exp Immunol.* févr 2002;127(2):386-92.
173. Manoussakis MN, Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Xanthou G, Paikos S, Polihronis M, et al. Expression of B7 costimulatory molecules by salivary gland epithelial cells in patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* févr 1999;42(2):229-39.
174. Kapsogeorgou EK, Dimitriou ID, Abu-Helu RF, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Activation of epithelial and myoepithelial cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome: high expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM.1) in biopsy specimens and cultured cells. *Clin Exp Immunol.* avr 2001;124(1):126-33.
175. Gong Y-Z, Nititham J, Taylor K, Miceli-Richard C, Sordet C, Wachsmann D, et al. Differentiation of follicular helper T cells by salivary gland epithelial cells in primary Sjögren's syndrome. *J Autoimmun.* juin 2014;51:57-66.
176. Lisi S, Sisto M, D'Amore M, Lofrumento DD. Co-culture system of human salivary gland epithelial cells and immune cells from primary Sjögren's syndrome patients: an in vitro approach to study the effects of Rituximab on the activation of the Raf-1/ERK1/2 pathway. *Int Immunol.* avr 2015;27(4):183-94.
177. 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.* 16 juill 2014;312(3):249-58.
178. Bodewes ILA, Gottenberg J-E, van Helden-Meeuwse CG, Mariette X, Versnel MA. Hydroxychloroquine treatment downregulates systemic interferon activation in primary Sjögren's syndrome in the JOQUER randomized trial. *Rheumatol Oxf Engl.* 1 janv 2020;59(1):107-11.
179. Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Bombardieri S, Bootsma H, De Vita S, Dörner T, et al. EULAR recommendations for the management of Sjögren's syndrome with topical and systemic therapies. *Ann Rheum Dis.* janv 2020;79(1):3-18.
180. Siemasko KF, Chong AS, Williams JW, Bremer EG, Finnegan A. Regulation of B cell function by the immunosuppressive agent leflunomide. *Transplantation.* 27 févr 1996;61(4):635-42.

181. van Woerkom JM, Kruize AA, Geenen R, van Roon EN, Goldschmeding R, Verstappen SMM, et al. Safety and efficacy of leflunomide in primary Sjögren's syndrome: a phase II pilot study. *Ann Rheum Dis.* août 2007;66(8):1026-32.
182. van der Heijden EH, Hartgring SA, Kruize AA, Radstake TR, van Roon JA. Additive immunosuppressive effect of leflunomide and hydroxychloroquine supports rationale for combination therapy for Sjögren's syndrome. *Expert Rev Clin Immunol.* 2019;15(7):801-8.
183. Clinical Efficacy of Leflunomide/Hydroxychloroquine Combination Therapy in Patients with Primary Sjögren's Syndrome: Results of a Placebo-Controlled Double-Blind Randomized Clinical Trial ACR Meeting Abstracts.
184. Heijden EHM van der, Blokland SLM, Hillen MR, Lopes APP, Vliet-Moret FM van, Rosenberg AJWP, et al. Leflunomide–hydroxychloroquine combination therapy in patients with primary Sjögren's syndrome (RepurpSS-I): a placebo-controlled, double-blinded, randomised clinical trial. *Lancet Rheumatol* [Internet]. 26 mars 2020 [cité 6 avr 2020];0(0). Disponible sur: [https://www.thelancet.com/journals/lanrhe/article/PIIS2665-9913\(20\)30057-6/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lanrhe/article/PIIS2665-9913(20)30057-6/abstract)
185. Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, et al. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest.* avr 2003;111(8):1133-45.
186. Mariette X, Ravaud P, Steinfeld S, Baron G, Goetz J, Hachulla E, et al. Inefficacy of infliximab in primary Sjögren's syndrome: results of the randomized, controlled Trial of Remicade in Primary Sjögren's Syndrome (TRIPSS). *Arthritis Rheum.* avr 2004;50(4):1270-6.
187. Sankar V, Brennan MT, Kok MR, Leakan RA, Smith JA, Manny J, et al. Etanercept in Sjögren's syndrome: a twelve-week randomized, double-blind, placebo-controlled pilot clinical trial. *Arthritis Rheum.* juill 2004;50(7):2240-5.
188. Isenberg DA. B cell targeted therapies in autoimmune diseases. *J Rheumatol Suppl.* mai 2006;77:24-8.
189. Devauchelle-Pensec V, Mariette X, Jousse-Joulin S, Berthelot J-M, Perdriger A, Puéchal X, et al. Treatment of primary Sjögren syndrome with rituximab: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 18 févr 2014;160(4):233-42.
190. Bowman SJ, Everett CC, O'Dwyer JL, Emery P, Pitzalis C, Ng W-F, et al. Randomized Controlled Trial of Rituximab and Cost-Effectiveness Analysis in Treating Fatigue and Oral Dryness in Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* 2017;69(7):1440-50.
191. Cornec D, Costa S, Devauchelle-Pensec V, Jousse-Joulin S, Marcorelles P, Berthelot J-M, et al. Blood and salivary-gland BAFF-driven B-cell hyperactivity is associated to rituximab inefficacy in primary Sjögren's syndrome. *J Autoimmun.* févr 2016;67:102-10.
192. Genovese MC, Becker J-C, Schiff M, Luggen M, Sherrer Y, Kremer J, et al. Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition. *N Engl J Med.* 15 sept 2005;353(11):1114-23.
193. Meiners PM, Vissink A, Kroese FGM, Spijkervet FKL, Smitt-Kamminga NS, Abdulahad WH, et al. Abatacept treatment reduces disease activity in early primary Sjögren's syndrome (open-label proof of concept ASAP study). *Ann Rheum Dis.* juill 2014;73(7):1393-6.

194. Baer A, Gottenberg J-E, E WSC, Sumida T, Takeuchi T, Seror R, et al. Op0039 Efficacy and Safety of Abatacept in Active Primary Sjögren's Syndrome: Results of a Randomised Placebo-Controlled Phase Iii Trial. *Ann Rheum Dis.* 1 juin 2019;78(Suppl 2):89-90.
195. IL-6 Receptor Inhibition in Primary Sjögren Syndrome : Results from a Randomized Multicenter Academic Double Blind Placebo-controlled Trial of Tocilizumab in 110 Patients [Internet]. ACR Meeting Abstracts. <https://acrabstracts.org/abstract/il-6-receptor-inhibition-in-primary-sjogren-syndrome-results-from-a-randomized-multicenter-academic-double-blind-placebo-controlled-trial-of-tocilizumab-in-110-patients/>
196. Wallace DJ, Stohl W, Furie RA, Lisse JR, McKay JD, Merrill JT, et al. A phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 15 sept 2009;61(9):1168-78.
197. De Vita S, Quartuccio L, Seror R, Salvin S, Ravaud P, Fabris M, et al. Efficacy and safety of belimumab given for 12 months in primary Sjögren's syndrome: the BELISS open-label phase II study. *Rheumatol Oxf Engl.* déc 2015;54(12):2249-56.
198. Lai J-H, Luo S-F, Ho L-J. Targeting the CD40-CD154 Signaling Pathway for Treatment of Autoimmune Arthritis. *Cells.* 18 2019;8(8).
199. Fisher BA, Szanto A, Ng W-F, Bombardieri M, Posch MG, Papas AS, et al. Assessment of the anti-CD40 antibody iscalimab in patients with primary Sjögren's syndrome: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study. *Lancet Rheumatol.* 1 mars 2020;2(3):e142-52.
200. Pollard RPE, Abdulahad WH, Vissink A, Hamza N, Burgerhof JGM, Meijer JM, et al. Serum levels of BAFF, but not APRIL, are increased after rituximab treatment in patients with primary Sjogren's syndrome: data from a placebo-controlled clinical trial. *Ann Rheum Dis.* janv 2013;72(1):146-8.
201. Safety and Efficacy Study of Subcutaneous Belimumab and Intravenous Rituximab Co-administration in Subjects With Primary Sjogren's Syndrome - Full Text View - ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02631538>
202. Ianalumab (VAY736), a Dual Mode of Action Biologic Combining BAFF Receptor Inhibition with B Cell Depletion, for Treatment of Primary Sjögren's Syndrome: Results of an International Randomized, Placebo Controlled Dose Range Finding Study in 190 Patients [Internet]. ACR Meeting Abstracts. <https://acrabstracts.org/abstract/ianalumab-vay736-a-dual-mode-of-action-biologic-combining-baff-receptor-inhibition-with-b-cell-depletion-for-treatment-of-primary-sjogrens-syndrome-results-of-an-international-randomized/>
203. Lövgren T, Eloranta M-L, Kastner B, Wahren-Herlenius M, Alm GV, Rönnblom L. Induction of interferon-alpha by immune complexes or liposomes containing systemic lupus erythematosus autoantigen- and Sjögren's syndrome autoantigen-associated RNA. *Arthritis Rheum.* juin 2006;54(6):1917-27.
204. Sellam J, Proulle V, Jünger A, Ittah M, Miceli Richard C, Gottenberg J-E, et al. Increased levels of circulating microparticles in primary Sjögren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(5):R156.

205. Jünger A, Distler O, Schulze-Horsel U, Huber LC, Ha HR, Simmen B, et al. Microparticles stimulate the synthesis of prostaglandin E(2) via induction of cyclooxygenase 2 and microsomal prostaglandin E synthase 1. *Arthritis Rheum.* nov 2007;56(11):3564-74.
206. Leehan KM, Pezant NP, Rasmussen A, Grundahl K, Moore JS, Radfar L, et al. Minor salivary gland fibrosis in Sjögren's syndrome is elevated, associated with focus score and not solely a consequence of aging. *Clin Exp Rheumatol.* juin 2018;36 Suppl 112(3):80-8.
207. Pérez P, Goicovich E, Alliende C, Aguilera S, Leyton C, Molina C, et al. Differential expression of matrix metalloproteinases in labial salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* déc 2000;43(12):2807-17.
208. Páez M-C, González M-J, Serrano NC, Shoenfeld Y, Anaya J-M. Physiological and pathological implications of laminins: from the gene to the protein. *Autoimmunity.* mars 2007;40(2):83-94.
209. Yoshimura S, Nakamura H, Horai Y, Nakajima H, Shiraishi H, Hayashi T, et al. Abnormal distribution of AQP5 in labial salivary glands is associated with poor saliva secretion in patients with Sjögren's syndrome including neuromyelitis optica complicated patients. *Mod Rheumatol.* 2016;26(3):384-90.
210. Lai Z, Yin H, Cabrera-Pérez J, Guimaro MC, Afione S, Michael DG, et al. Aquaporin gene therapy corrects Sjögren's syndrome phenotype in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 17 mai 2016;113(20):5694-9.
211. Zeng M, Szymczak M, Ahuja M, Zheng C, Yin H, Swaim W, et al. Restoration of CFTR Activity in Ducts Rescues Acinar Cell Function and Reduces Inflammation in Pancreatic and Salivary Glands of Mice. *Gastroenterology.* 2017;153(4):1148-59.
212. Neil SJD, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature.* 24 janv 2008;451(7177):425-30.
213. Goto T, Kennel SJ, Abe M, Takishita M, Kosaka M, Solomon A, et al. A novel membrane antigen selectively expressed on terminally differentiated human B cells. *Blood.* 15 sept 1994;84(6):1922-30.
214. Ishikawa J, Kaisho T, Tomizawa H, Lee BO, Kobune Y, Inazawa J, et al. Molecular cloning and chromosomal mapping of a bone marrow stromal cell surface gene, BST2, that may be involved in pre-B-cell growth. *Genomics.* 10 avr 1995;26(3):527-34.
215. Chen C, Shi H, Wang B, Cao N, Yu C, Zheng L. Aberrant expression of the innate restriction factor bone marrow stromal antigen-2 in primary Sjögren's syndrome. *J Cranio-Maxillo-fac Surg Off Publ Eur Assoc Cranio-Maxillo-fac Surg.* nov 2018;46(11):1899-904.
216. Hurst TP, Magiorkinis G. Activation of the innate immune response by endogenous retroviruses. *J Gen Virol.* juin 2015;96(Pt 6):1207-18.
217. Bannert N, Hofmann H, Block A, Hohn O. HERVs New Role in Cancer: From Accused Perpetrators to Cheerful Protectors. *Front Microbiol.* 2018;9:178.
218. Levitzki A. Targeting the Immune System to Fight Cancer Using Chemical Receptor Homing Vectors Carrying Polyinosine/Cytosine (PolyIC). *Front Oncol.* 2012;2:4.

219. Ittah M, Miceli-Richard C, Gottenberg J-E, Sellam J, Lepajolec C, Mariette X. B-cell-activating factor expressions in salivary epithelial cells after dsRNA virus infection depends on RNA-activated protein kinase activation. *Eur J Immunol.* mai 2009;39(5):1271-9.
220. Meng X, Yang D, Yu R, Zhu H. EPSTI1 Is Involved in IL-28A-Mediated Inhibition of HCV Infection. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:716315.
221. Sun J-L, Zhang H-Z, Liu S-Y, Lian C-F, Chen Z-L, Shao T-H, et al. Elevated EPSTI1 promote B cell hyperactivation through NF- $\kappa$ B signalling in patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* avr 2020;79(4):518-24.
222. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol.* mars 2015;15(3):160-71.
223. Wilmore JR, Allman D. Here, There, and Anywhere? Arguments for and against the Physical Plasma Cell Survival Niche. *J Immunol Baltim Md 1950.* 01 2017;199(3):839-45.
224. Ding J, Zhang W, Haskett S, Pellerin A, Xu S, Petersen B, et al. BAFF overexpression increases lymphocytic infiltration in Sjögren's target tissue, but only inefficiently promotes ectopic B-cell differentiation. *Clin Immunol Orlando Fla.* 2016;169:69-79.
225. Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One.* 2012;7(3):e30679.
226. Kapsogeorgou EK, Abu-Helu RF, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Salivary gland epithelial cell exosomes: A source of autoantigenic ribonucleoproteins. *Arthritis Rheum.* mai 2005;52(5):1517-21.
227. Setty M, Discepolo V, Abadie V, Kamhawi S, Mayassi T, Kent A, et al. Distinct and Synergistic Contributions of Epithelial Stress and Adaptive Immunity to Functions of Intraepithelial Killer Cells and Active Celiac Disease. *Gastroenterology.* sept 2015;149(3):681-691.e10.
228. Abadie V, Kim SM, Lejeune T, Palanski BA, Ernest JD, Tastet O, et al. IL-15, gluten and HLA-DQ8 drive tissue destruction in coeliac disease. *Nature.* 2020;578(7796):600-4.
229. Tye-Din JA, Galipeau HJ, Agardh D. Celiac Disease: A Review of Current Concepts in Pathogenesis, Prevention, and Novel Therapies. *Front Pediatr.* 2018;6:350.
230. Cellier C, Bouma G, van Gils T, Khater S, Malamut G, Crespo L, et al. Safety and efficacy of AMG 714 in patients with type 2 refractory coeliac disease: a phase 2a, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* déc 2019;4(12):960-70.
231. Gulamhusein AF, Hirschfield GM. Primary biliary cholangitis: pathogenesis and therapeutic opportunities. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020;17(2):93-110.
232. Van den Oord JJ, Sciort R, Desmet VJ. Expression of MHC products by normal and abnormal bile duct epithelium. *J Hepatol.* 1986;3(3):310-7.
233. Yasoshima M, Nakanuma Y, Tsuneyama K, Van de Water J, Gershwin ME. Immunohistochemical analysis of adhesion molecules in the micro-environment of portal tracts in relation to aberrant expression of PDC-E2 and HLA-DR on the bile ducts in primary biliary cirrhosis. *J Pathol.* mars 1995;175(3):319-25.

234. Hirschfield GM, Gershwin ME. The immunobiology and pathophysiology of primary biliary cirrhosis. *Annu Rev Pathol.* 24 janv 2013;8:303-30.
235. Wang L, Sun Y, Zhang Z, Jia Y, Zou Z, Ding J, et al. CXCR5+ CD4+ T follicular helper cells participate in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* Baltim Md. févr 2015;61(2):627-38.
236. Webb GJ, Hirschfield GM. Follicles, germinal centers, and immune mechanisms in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* Baltim Md. févr 2015;61(2):424-7.
237. Myers RP, Swain MG, Lee SS, Shaheen AAM, Burak KW. B-cell depletion with rituximab in patients with primary biliary cirrhosis refractory to ursodeoxycholic acid. *Am J Gastroenterol.* juin 2013;108(6):933-41.
238. Purohit T, Cappell MS. Primary biliary cirrhosis: Pathophysiology, clinical presentation and therapy. *World J Hepatol.* 8 mai 2015;7(7):926-41.
239. Hao Z, Miao M, Guo Y, Zhang X, Li X, Gao C, et al. AB0536 Rapamycin attenuates symptom and restores the balance of th17/treg in refractory primary sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 1 juin 2018;77(Suppl 2):1425-1425.
240. Goyette P, Boucher G, Mallon D, Ellinghaus E, Jostins L, Huang H, et al. High-density mapping of the MHC identifies a shared role for HLA-DRB1\*01:03 in inflammatory bowel diseases and heterozygous advantage in ulcerative colitis. *Nat Genet.* févr 2015;47(2):172-9.
241. Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* juin 2008;8(6):458-66.
242. Zhang X, Liu S, Wang Y, Hu H, Li L, Wu Y, et al. Interleukin-22 regulates the homeostasis of the intestinal epithelium during inflammation. *Int J Mol Med.* avr 2019;43(4):1657-68.
243. Goldberg R, Prescott N, Lord GM, MacDonald TT, Powell N. The unusual suspects--innate lymphoid cells as novel therapeutic targets in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* mai 2015;12(5):271-83.
244. Oshima S, Nakamura T, Namiki S, Okada E, Tsuchiya K, Okamoto R, et al. Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 distinctively up-regulate gene expression and production of interleukin-7 in human intestinal epithelial cells. *Mol Cell Biol.* juill 2004;24(14):6298-310.
245. Belarif L, Danger R, Kermarrec L, Nerrière-Daguin V, Pengam S, Durand T, et al. IL-7 receptor influences anti-TNF responsiveness and T cell gut homing in inflammatory bowel disease. *J Clin Invest.* 02 2019;129(5):1910-25.
246. 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.
247. Fazilleau N, Mark L, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity.* 20 mars 2009;30(3):324-35.
248. Zhang Z-H, Jiang B-C, Liu X-H, Zhang M-X, Li Z-S-N, Zhu G-Z. Interleukin-7 Regulates T Follicular Helper Cell Function in Patients with Chronic Hepatitis C. *Viral Immunol.* août 2018;31(6):417-25.

249. Seo YB, Im SJ, Namkoong H, Kim SW, Choi YW, Kang MC, et al. Crucial roles of interleukin-7 in the development of T follicular helper cells and in the induction of humoral immunity. *J Virol*. août 2014;88(16):8998-9009.
250. McDonald PW, Read KA, Baker CE, Anderson AE, Powell MD, Ballesteros-Tato A, et al. IL-7 signalling represses Bcl-6 and the TFH gene program. *Nat Commun*. 8 janv 2016;7:10285.
251. Cherrier DE, Serafini N, Di Santo JP. Innate Lymphoid Cell Development: A T Cell Perspective. *Immunity*. 19 2018;48(6):1091-103.
252. Blokland SLM, van den Hoogen LL, Leijten EFA, Hartgring SAY, Fritsch R, Kruize AA, et al. Increased expression of Fas on group 2 and 3 innate lymphoid cells is associated with an interferon signature in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Rheumatol Oxf Engl*. 01 2019;58(10):1740-5.
253. Cella M, Otero K, Colonna M. Expansion of human NK-22 cells with IL-7, IL-2, and IL-1 $\beta$  reveals intrinsic functional plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 juin 2010;107(24):10961.
254. Asam S, Neag G, Berardicurti O, Gardner D, Barone F. The role of stroma and epithelial cells in primary Sjögren's syndrome. *Rheumatol Oxf Engl*. 3 mars 2019;
255. Aziz KE, McCluskey PJ, Montanaro A, Wakefield D. Vascular endothelium and lymphocyte adhesion molecules in minor salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *J Clin Lab Immunol*. janv 1992;37(1):39-49.
256. Saito I, Terauchi K, Shimuta M, Nishiimura S, Yoshino K, Takeuchi T, et al. Expression of cell adhesion molecules in the salivary and lacrimal glands of Sjogren's syndrome. *J Clin Lab Anal*. 1993;7(3):180-7.
257. Stranford S, Ruddle NH. Follicular dendritic cells, conduits, lymphatic vessels, and high endothelial venules in tertiary lymphoid organs: Parallels with lymph node stroma. *Front Immunol*. 2012;3:350.
258. Nayar S, Campos J, Chung MM, Navarro-Núñez L, Chachlani M, Steinthal N, et al. Bimodal Expansion of the Lymphatic Vessels Is Regulated by the Sequential Expression of IL-7 and Lymphotoxin  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 in Newly Formed Tertiary Lymphoid Structures. *J Immunol Baltim Md 1950*. 01 2016;197(5):1957-67.
259. Amft N, Curnow SJ, Scheel-Toellner D, Devadas A, Oates J, Crocker J, et al. Ectopic expression of the B cell-attracting chemokine BCA-1 (CXCL13) on endothelial cells and within lymphoid follicles contributes to the establishment of germinal center-like structures in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. nov 2001;44(11):2633-41.
260. Cyster JG, Ansel KM, Reif K, Ekland EH, Hyman PL, Tang HL, et al. Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol Rev*. août 2000;176:181-93.
261. Alunno A, Ibba-Manneschi L, Bistoni O, Rosa I, Caterbi S, Gerli R, et al. Mobilization of lymphatic endothelial precursor cells and lymphatic neovascularization in primary Sjögren's syndrome. *J Cell Mol Med*. avr 2016;20(4):613-22.
262. Ferreira JN, Hoffman MP. Interactions between developing nerves and salivary glands. *Organogenesis*. sept 2013;9(3):199-205.

263. Waterman SA, Gordon TP, Rischmueller M. Inhibitory effects of muscarinic receptor autoantibodies on parasympathetic neurotransmission in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* juill 2000;43(7):1647-54.
264. Buckley CD, Pilling D, Lord JM, Akbar AN, Scheel-Toellner D, Salmon M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol. avr* 2001;22(4):199-204.
265. Zhang Q, Vignali DAA. Co-stimulatory and Co-inhibitory Pathways in Autoimmunity. *Immunity.* 17 2016;44(5):1034-51.
266. Barone F, Gardner DH, Nayar S, Steinthal N, Buckley CD, Luther SA. Stromal Fibroblasts in Tertiary Lymphoid Structures: A Novel Target in Chronic Inflammation. *Front Immunol.* 2016;7:477.
267. Dieu-Nosjean M-C, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, et al. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 sept 2008;26(27):4410-7.
268. Pikor NB, Prat A, Bar-Or A, Gommerman JL. Meningeal Tertiary Lymphoid Tissues and Multiple Sclerosis: A Gathering Place for Diverse Types of Immune Cells during CNS Autoimmunity. *Front Immunol.* 2015;6:657.
269. Kang S, Fedoriw Y, Brenneman EK, Truong YK, Kikly K, Vilen BJ. BAFF Induces Tertiary Lymphoid Structures and Positions T Cells within the Glomeruli during Lupus Nephritis. *J Immunol Baltim Md 1950.* 01 2017;198(7):2602-11.
270. Weyand CM, Goronzy JJ. Ectopic germinal center formation in rheumatoid synovitis. *Ann N Y Acad Sci. avr* 2003;987:140-9.
271. Allen CDC, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity.* août 2007;27(2):190-202.
272. Buckley CD, Barone F, Nayar S, Bénézec C, Caamaño J. Stromal cells in chronic inflammation and tertiary lymphoid organ formation. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:715-45.
273. Theander E, Vasaitis L, Baecklund E, Nordmark G, Warfvinge G, Liedholm R, et al. Lymphoid organisation in labial salivary gland biopsies is a possible predictor for the development of malignant lymphoma in primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* août 2011;70(8):1363-8.
274. Nocturne G, Mariette X. Sjögren Syndrome-associated lymphomas: an update on pathogenesis and management. *Br J Haematol.* févr 2015;168(3):317-27.
275. 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.* 2019;10:2096.
276. Hale M, Rawlings DJ, Jackson SW. The long and the short of it: insights into the cellular source of autoantibodies as revealed by B cell depletion therapy. *Curr Opin Immunol.* 2018;55:81-8.
277. Dörner T, Posch MG, Li Y, Petricoul O, Cabanski M, Milojevic JM, et al. Treatment of primary Sjögren's syndrome with ivalumab (VAY736) targeting B cells by BAFF receptor blockade

- coupled with enhanced, antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Ann Rheum Dis.* 2019;78(5):641-7.
278. Ping L, Ogawa N, Zhang Y, Sugai S, Masaki Y, Weiguo X. p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- $\kappa$ B facilitate CD40-mediated salivary epithelial cell death. *J Rheumatol.* juin 2012;39(6):1256-64.
279. Burger JA, Okkenhaug K. Haematological cancer: idelalisib-targeting PI3K $\delta$  in patients with B-cell malignancies. *Nat Rev Clin Oncol.* avr 2014;11(4):184-6.
280. Nayar S, Campos J, Smith CG, Iannizzotto V, Gardner DH, Colafrancesco S, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase delta pathway: a novel therapeutic target for Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2019;78(2):249-60.
281. Dörner T, Zeher M, Laessing U, Chaperon F, Buck SD, Hasselberg A, et al. OP0250 A randomised, double-blind study to assess the safety, tolerability and preliminary efficacy of leniolisib (CDZ173) in patients with primary sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 1 juin 2018;77(Suppl 2):174-174.
282. BTK Overexpression Is Associated with the Risk of Lymphoma in Primary Sjögren's Syndrome: Data from Whole Blood Transcriptome of 346 Patients Followed-up Prospectively for 10 Years <https://acrabstracts.org/abstract/btk-overexpression-is-associated-with-the-risk-of-lymphoma-in-primary-sjogrens-syndrome-data-from-whole-blood-transcriptome-of-346-patients-followed-up-prospectively-for-10-years/>
283. A Phase 2 Study to Evaluate the Safety and Efficacy of LOU064 in Patients With Moderate to Severe Sjögren's Syndrome - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cité 21 mars 2020]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04035668>
284. Pilot Trial of Ustekinumab for Primary Sjögren's Syndrome - Full Text View - ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04093531>
285. Charras A, Arvaniti P, Le Dantec C, Dalekos GN, Zachou K, Bordron A, et al. JAK Inhibitors and Oxidative Stress Control. *Front Immunol.* 2019;10:2814.
286. Study to Assess Safety and Efficacy of Filgotinib, Lanraplenib and Tirabrutinib in Adults With Active Sjogren's Syndrome - Full Text View - ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03100942>
287. Morand EF, Furie R, Tanaka Y, Bruce IN, Askanase AD, Richez C, et al. Trial of Anifrolumab in Active Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med.* 16 2020;382(3):211-21.
288. Zhou J, Yu Q. Anti-IL-7 receptor- $\alpha$  treatment ameliorates newly established Sjögren's-like exocrinopathy in non-obese diabetic mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* juill 2018;1864(7):2438-47.
289. Belarif L, Mary C, Jacquemont L, Mai HL, Danger R, Hervouet J, et al. IL-7 receptor blockade blunts antigen-specific memory T cell responses and chronic inflammation in primates. *Nat Commun.* 26 2018;9(1):4483.

## G. ANNEXE

### Role Of T Follicular Helper Cells And T Peripheral Helper Cells In The Activation of B Cells in primary Sjögren Syndrome

Anastasia Dupré, MD<sup>a</sup>, Juliette Pascaud, BSc<sup>a</sup>, Elodie Rivière, MD<sup>a</sup>, Audrey Paoletti, PhD<sup>a</sup>, Bineta Ly, BSc<sup>a</sup>, Asmaa Mamoune, PhD<sup>a</sup>, Michael Mingueneau, PhD<sup>b</sup>, Xavier Mariette, MD, PhD<sup>a,c</sup>, Gaétane Nocturne, MD, PhD<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Immunology of viral Infections and Autoimmune Diseases (IMVA), IDMIT, Université Paris Sud – Université Paris-Saclay - INSERM UMR 1184, Le Kremlin Bicêtre, <sup>b</sup>Immunology Research, Biogen, Cambridge, United States, <sup>c</sup>Rheumatology, AP-HP.Université Paris-Saclay, Le Kremlin Bicêtre, France

Corresponding author: gaetane.nocturne@aphp.fr

Subject areas: Rheumatology, Immunology

Section head: Sjögren Syndrome

Keywords: Auto-immunity, Sjögren's syndrome, T cells, B cells

Key messages:

- T follicular helper cells (Tfh) are elevated in the blood of patients with primary Sjögren Syndrome, are correlated with disease activity and percentage of plasmablasts.
- T peripheral helper (Tph) cells and activated Tph are elevated in the blood of patients with pSS, and are correlated with percentage of plasmablasts.
- As Tfh and Tph might promote disease activity in pSS, they could be a potential therapeutic target in this disease

## **ABSTRACT**

### Background:

Primary Sjögren's Syndrome (pSS) is a rare systemic autoimmune disease characterized by a hyperactivation of B cells. We have studied the role of two T-cell populations involved in the cooperation with B cells: T follicular helper (Tfh) and T peripheral helper (Tph) cells.

### Materials and methods:

We used mass cytometry (CyTOF) and flow cytometry to quantify cell populations in pSS (according to ACR/EULAR 2016 criteria) and in controls. Tfh were defined as CD4+CXCR5+PD1+ and Tph as CD4+CXCR5-PD1+.

### Results:

We showed a peripheral expansion of Tfh in patients with pSS compared to controls in CyTOF and flow cytometry: 5.6% vs 3.1% ( $p = 0.0005$ ) and 10.8% vs 5.7% ( $p=0.0006$ ), respectively. Similarly, patients with pSS had higher blood levels of Tph with both techniques: 8.0% versus 5.4% ( $p = 0.008$ ) and 25.6% vs 13.6% ( $p=0.0007$ ), respectively. There was a positive correlation between plasmablast and Tfh ( $r = 0.43$ ,  $p=0.002$ ) and Tph levels ( $r=0.47$ ,  $p=0.0004$ ) in CyTOF. In flow cytometry, there was a positive correlation between Tfh and ESSDAI score ( $r=0.69$ ,  $p=0.006$ ), as well as between activated Tfh (ICOS+) and ESSDAI score ( $r=0.69$ ,  $p=0.008$ ), but not with Tph. Activated Tfh defined by flow cytometry were significantly higher in patients with hypergammaglobulinemia: 4.8% vs 2.3% ( $p=0.03$ ) and activated Tph were significantly higher in patients with rheumatoid factor: 11.7% vs 5.5% ( $p=0.001$ ).

### Conclusion:

Tfh and Tph were increased in pSS compared to controls and were correlate with plasmablast level. Tfh and Tph could play a role in the hyperactivation of B cells in pSS. Therefore, they could be interesting new therapeutic targets.

## 1. BACKGROUND

Primary Sjögren syndrome (pSS) is a systemic auto-immune disease, characterized by an infiltration of the exocrine glands, leading to sicca syndrome (dryness of mouth, eyes, and other mucosal surfaces) (1). It can be complicated by extra-glandular systemic involvements (such as pulmonary, renal or neurological involvement) in about 30% of patients (2). One of the most severe complications is the occurrence of B cell lymphoma in 5 to 10% of the patients (3).

The pathophysiology of pSS is still incompletely understood. pSS is characterized by a chronic B cell activation, as evidenced by the presence of anti-SSA/SSB auto-antibodies, rheumatoid factor and hypergammaglobulinemia (4). Ectopic germinal centers (EGC) in minor salivary glands are present in about one quarter of the patients, and could enhance local production of auto-antibodies (5). Using mass cytometry, we showed an expansion of plasma cells in minor salivary gland and an expansion of circulating plasmablasts in pSS patients, compared to healthy controls (6). Interestingly, the presence of EGC is associated with B cell activity markers (7), and is a risk factor for developing non-Hodgkin lymphoma in pSS patients (8). T cells also participate to the pathophysiology of pSS, as suggested by the presence of a T lymphocyte infiltrate within the patients' minor salivary gland biopsies (9), as well as the association of pSS with several HLA class II alleles (10). In this genome wide association study (GWAS), it was also found an association between pSS and SNP located in the CXCR5 gene, coding for a protein specific of T follicular helper (Tfh) cells.

Regarding the role of B and T cells in pSS, two subsets of T cells deserve specific assessment: Tfh and T peripheral cells (Tph). Tfh are a subset of T lymphocytes specialized in providing help to B cells, and are essential for EGC formation, recruitment (via CXCL13) and activation of B cells, affinity maturation and development of memory B cells and plasmablasts (via IL21). They are CXCR5<sup>+</sup>, PD-1<sup>+</sup> and ICOS<sup>+</sup>, the latter being considered as an activation marker (11,12). Several studies supported their involvement in pSS: increased levels of Tfh within minor salivary glands and blood from pSS compared to controls (13,14) (especially in patients with extra-glandular involvement (15)), with a correlation between disease activity (ESSDAI) and activated Tfh (14), elevation of serum and salivary levels of IL-21 (16), correlated with disease activity and autoantibodies (15,17), ability of the epithelial cells to

induce Tfh (17). T peripheral helper cells (Tph), are characterized by CD4<sup>+</sup>PD1<sup>hi</sup>CXCR5<sup>-</sup>. They have recently been described in the peripheral inflamed tissues, but also in the blood of patients with rheumatoid arthritis (18). Then, two studies showed their peripheral expansion in systemic sclerosis (19) and systemic lupus erythematosus (SLE) (20). These cells, although lacking CXCR5, can also express IL-21, CXCL13, ICOS, and induce plasmablasts differentiation in vitro (18). In SLE, their expansion is correlated with disease activity (20). These Tph cells have not been studied in pSS yet.

We aimed to study the role of Tfh and Tph in pSS by assessing their presence, their activation profile and their association with disease characteristics.

## **2. PATIENTS AND METHODS**

### **Patients and controls samples for mass cytometry and flow cytometry**

Patients were referred to the Department of Rheumatology of Hôpitaux Universitaires Paris-Sud (France), a tertiary center, reference center for systemic autoimmune diseases. All patients with pSS fulfilled the American European Consensus criteria (AECG) or the 2016 ACR / EULAR criteria. Patients who received an anti-CD20 therapy in the previous year or were treated with steroids > 10 mg of prednisone per day were excluded. Clinical (sex, age, treatment, ESSDAI score, lymphoma, cryoglobulinemic vasculitis), biological (anti-SSA or SSB antibodies, gammaglobulin level, rheumatoid factor (RF)) and pathological (result of the minor salivary gland biopsy) data were available in the patients' medical file. Control subjects were either healthy volunteer (blood collected at the Etablissement français du sang (EFS), Paris) or patients with sicca syndrome without autoimmune disease (absence of autoantibodies and normal minor salivary gland biopsy). The study was approved by the local research ethics committee, and informed consent was obtained from all patients and control subjects. Blood samples were collected in heparinized tubes.

### **Mass cytometry analysis**

PBMCs were isolated by Ficoll gradient from whole blood. Single-cell suspensions from blood were resuspended at  $10 \cdot 10^6$ /mL in PBS and fixed in 2% methanol-free formaldehyde (Electron Microscopy

Sciences, Hatfield, Pa) for 20 minutes at room temperature. After 2 washes in PBS–0.5% BSA–0.02% sodium azide, cells were resuspended in PBS, and aliquots containing a maximum of  $2 \cdot 10^6$  cells each were quickly frozen on dry ice and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until shipment to Biogen (Cambridge, Mass) for mass cytometry analysis. Samples were stained and prepared for CyTOF analysis, by using an optimized cocktail of 34 metal-conjugated antibodies designed to identify 40 major and minor human blood cell subsets as previously described (6). After acquisition on a CyTOF II (Fluidigm, South San Francisco, Calif), data were normalized to internal bead standards.

### **Flow cytometry analysis**

PBMCs were isolated by Ficoll gradient from whole blood and stained with fluorochrome-conjugated antibodies detailed in supplementary. Cells were analysed on a BD FACSCanto II flow cytometer. Data were analysed using Flow Jo, version 10. A dot plot example is provided in supplementary.

### **Statistical analysis**

Data were expressed as means  $\pm$  SD. Comparisons between groups were done by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test. Correlations were analyzed using Spearman's rank correlation coefficients. All analyses were performed using GraphPad Prism V7.02 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). A p-value  $< 0.05$  was considered as statistically significant.

## **3. RESULTS**

### **Patients' characteristics (Table 1)**

We included 29 patients for mass cytometry analysis (cohort I). Patients were women (100%), with a mean age of 54.0 years. The median ESSDAI score was 2. Patients had auto-antibodies against SSA (71.4%), rheumatoid factor (52.9%), and hypergammaglobulinemia (mean gammaglobulins level = 15.3 g/L). Thirty per cent of patients were treated with hydroxychloroquine.

A second cohort including 15 patients was used for flow cytometry analysis (cohort II). Patients were women (100%), with a mean age of 55.9 years. The median ESSDAI score was 4. Patients had anti-SSA

antibodies (73.3%), rheumatoid factor (46.7%) and hypergammaglobulinemia (mean gammaglobulins level = 14.0 g/L).

### **Expansion of Tfh and Tph in blood of patients with primary Sjögren's syndrome**

We analyzed circulating T follicular helper cells (Tfh) (CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>) and T peripheral helper cells (Tph) (CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup>PD1<sup>+</sup>) in cohort I using mass cytometry. The percentage of CD4<sup>+</sup> Tfh was significantly higher in patients with pSS compared to controls: 5.6 +/- 2.6% versus 3.1 +/- 1.2% (p = 0.0005) (*figure 1a*), as well as the percentage of CD4<sup>+</sup> Tph: 8.0 +/- 4.0% versus 5.4 +/- 3.3% (p = 0.0075) (*figure 1b*).

We confirmed these results in cohort II using flow cytometry. The percentage of CD4<sup>+</sup> Tfh and CD4<sup>+</sup> Tph were increased in blood of patients with pSS compared to healthy controls, respectively: 10.8 +/- 5.4% vs 5.7 +/- 3.2% (p=0.0006) for Tfh (*figure 1c*) and 25.6 +/- 11.7% vs 13.6 +/- 8.45% (p=0.0007) for Tph (*figure 1d*).

Then, we evaluated in cohort II, by flow cytometry, the activation status of these cell populations, and we defined activated Tfh as CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> and activated Tph as CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup>PD1<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>. Activated Tfh were increased in patients with pSS compared to healthy controls: 4.1 +/- 2.5% vs 1.9 +/- 1.6% (p=0.001) (*figure 1e*), as well as activated Tph: 8.6 +/- 4.7% vs 3.7 +/- 2.8% (p=0.0003) (*figure 1f*).

### **Association of Tfh and Tph with disease activity (ESSDAI) and B cell activation markers**

We next wondered whether there was an association between the percentage of Tfh, Tph, activated Tfh, activated Tph and the disease activity, defined by the ESSDAI score. We found in cohort II a positive significant correlation between Tfh and ESSDAI score (r=0.69, p=0.0058) (*figure 2a*), as well as between activated Tfh (ICOS<sup>+</sup>) and ESSDAI score (r=0.69, p=0.0077) (*figure 2c*). On the opposite, no significant correlation was found between Tph and ESSDAI score (r=0.28, p=0.3077) (*figure 2b*) and between activated Tph and ESSDAI score (r=0.41, p=0.1484) (*figure 2d*).

Then, we looked for an association between Tfh (CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>), Tph (CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup>PD1<sup>+</sup>), activated Tfh (CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>), activated Tph (CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup>PD1<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>) and plasmablasts (defined as

CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD38<sup>hi</sup>) and B-cell activation markers such as hypergammaglobulinemia, anti-SSA antibodies, and rheumatoid factor.

In CyTOF, there was a positive significant correlation between Tfh and plasmablasts ( $r=0.43$ ,  $p=0.002$ ) (*figure 3a*) and between Tph and plasmablasts ( $r=0.47$ ,  $p=0.0004$ ) (*figure 3b*).

In flow cytometry, plasmablasts characterization was difficult for technical issues. However, activated Tfh defined by flow cytometry were significantly higher in patients with hypergammaglobulinemia: 4.8 +/- 2.6% vs 2.3 +/- 0.8% ( $p=0.0240$ ) (*figure 3d*), and there was a trend toward a higher level of Tfh in patients with rheumatoid factor: 5.2 +/- 2.9% vs 2.9 +/- 1.5% ( $p=0.0973$ ) (*figure 3e*). Activated Tph percentages were significantly higher in patients with rheumatoid factor: 11.7 +/- 5.6% vs 5.5 +/- 1.8% ( $p=0.0012$ ) (*figure 3h*) but not in patients with hypergammaglobulinemia (*figure 3g*). Activated Tfh and Tph were not different between patients with or without anti-SSA antibodies (*figure 3c et 3f*).

#### 4. DISCUSSION

Our study demonstrated that Tfh and Tph, as well as activated Tfh and Tph are expanded in the blood of patients with pSS. These two subsets are likely to be involved in pSS pathogeny as supported by the correlation between Tfh and activated Tfh and disease activity on one hand, and between activated Tph and Tfh and B-cell markers on the other hand.

Our results regarding Tfh in pSS are consistent with previous studies that showed a peripheral expansion of Tfh (14,15) and a correlation between activated Tfh and disease activity (14).

In addition, our study focused on Tph in pSS, and highlighted their potential role in B-cell activation and differentiation. Tph have now been explored in many auto-immune or inflammatory diseases, such as systemic erythematosus lupus (20–22), systemic sclerosis (19), rheumatoid arthritis (18), or IgG4-related disease (23).

The main limit of our study is the definition of Tph, which is different depending on the studies (CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD1<sup>hi</sup>). We have chosen to define them as CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup> in our study because this definition was more easily reproducible. However, this definition lacks of

specificity, as these cells could include other types of activated helper CD4 or pre-Tfh (as Tfh express PD1 before expressing CXCR5 (11)).

The values of Tfh and Tph percentages are different between CyTOF and flow cytometry. This is due to the differences between these two techniques, and to a weak staining with CXCR5 and PD1 in CyTOF. However, we were able to detect the same difference between patients and controls using these two techniques.

Another limitation is linked to the fact that our study explored Tfh and Tph in peripheral blood, which might not reflect what happens in the tissues targeted by the disease. Thus looking at these two subsets in minor salivary glands would be interesting to confirm their involvement in pSS pathogeny.

In conclusion, our study demonstrates that Tfh and Tph are increased in the blood of patients with pSS, might promote disease activity, and thus could be potential new therapeutic targets in this disease.

## TABLES

Table 1 – Patients' characteristics

	<b>Cohort I (n = 29)</b>	<b>Cohort II (n = 15)</b>
Sex (female) n (%)	29 (100%)	15 (100%)
Age (mean +/- standard deviation), years	54.0 +/- 16.4	55.9 +/- 17.2
ESSDAI score (median, extremes)	2 (0 - 40)	4 (0 – 11)
Anti-SSA Ab	20/28 (71.4%)	11/15 (73.3%)
Rheumatoid factor	9/17 (52.9%)	7/15 (46.7%)
Gammaglobulins levels (mean +/- standard deviation)	15.3 +/- 6.3 g/L	14.0 +/- 4.4 g/L
Lymphocytes (mean +/- standard deviation)	1.4 +/- 0.6 G/L	1.7 +/- 0.7 G/L
<b>Current treatment</b>	-	-
- Corticosteroids < 10mg/day	1 (3.5%)	1 (6.7%)
- Hydroxychloroquine	9 (31%)	1 (6.7%)
- Rituximab (> 6 months before)	1 (3.5%)	4 (26.6%)
- Belimumab (> 6 months before)	1 (3.5%)	0 (0%)

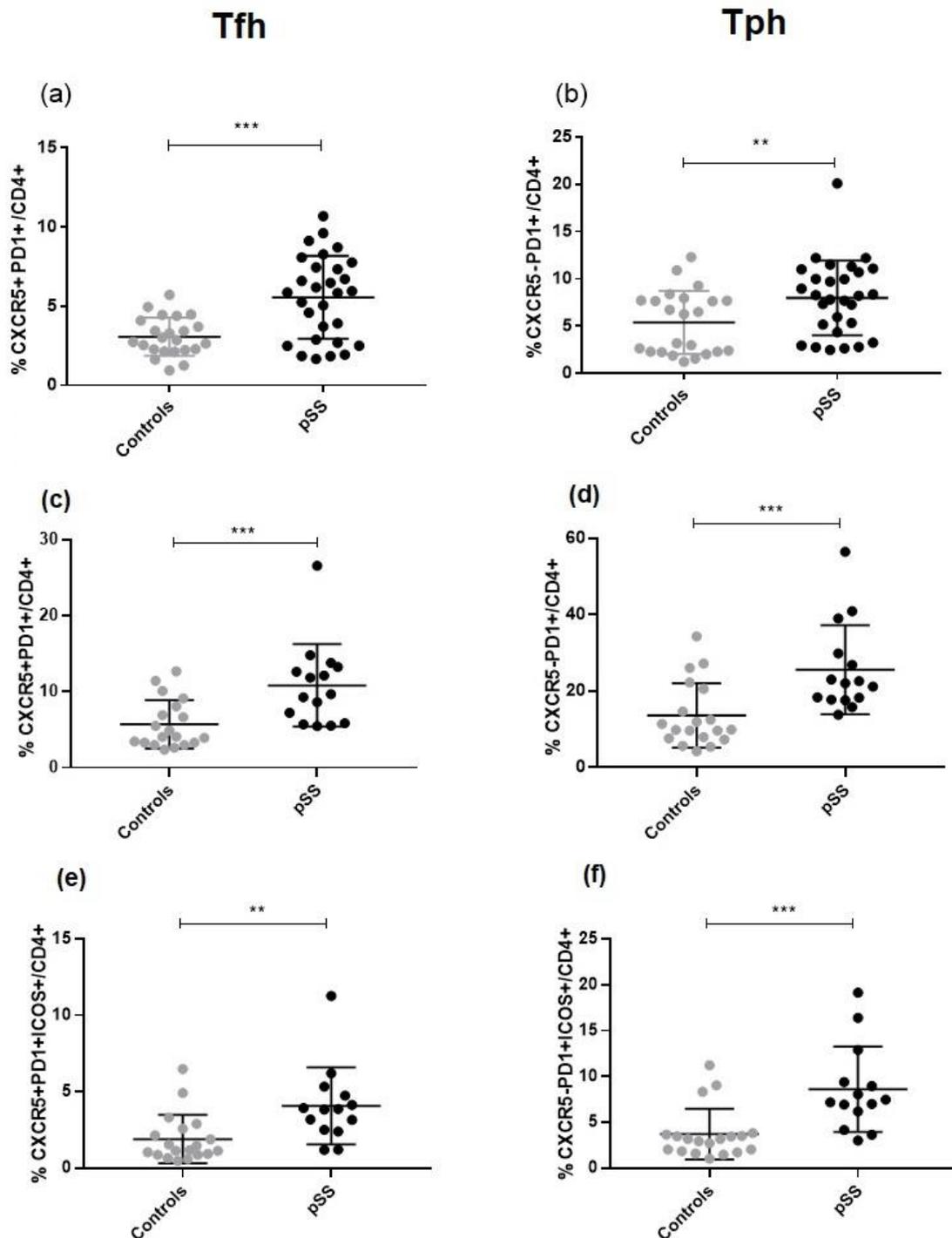


Figure 1 –Tfh and Tph are expanded in the blood of patients with primary Sjögren syndrome (pSS). (a) Percentage of Tfh among CD4+ in the blood of patients with pSS (n = 29) and in healthy controls (HC) (n = 23) in mass cytometry. (b) Percentage of Tph among CD4+ in the blood of patients with pSS (n = 29) and in HC (n = 23) in mass cytometry. (c). Percentage of Tfh among CD4+ in the blood of patients with pSS (n = 15) and in HC (n = 19) in flow cytometry. (d) Percentage of Tph among CD4+ in the blood of patients with pSS (n = 15) and in HC (n = 19) in flow cytometry. (e). Percentage of activated Tfh among CD4+ in the blood of patients with pSS (n = 14) and in HC (n = 19) in flow cytometry. (f) Percentage of activated Tph among CD4+ in the blood of patients with pSS (n = 14) and in HC (n = 19) in flow cytometry. Data represent the mean with SD; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 by Mann-Whitney U test.

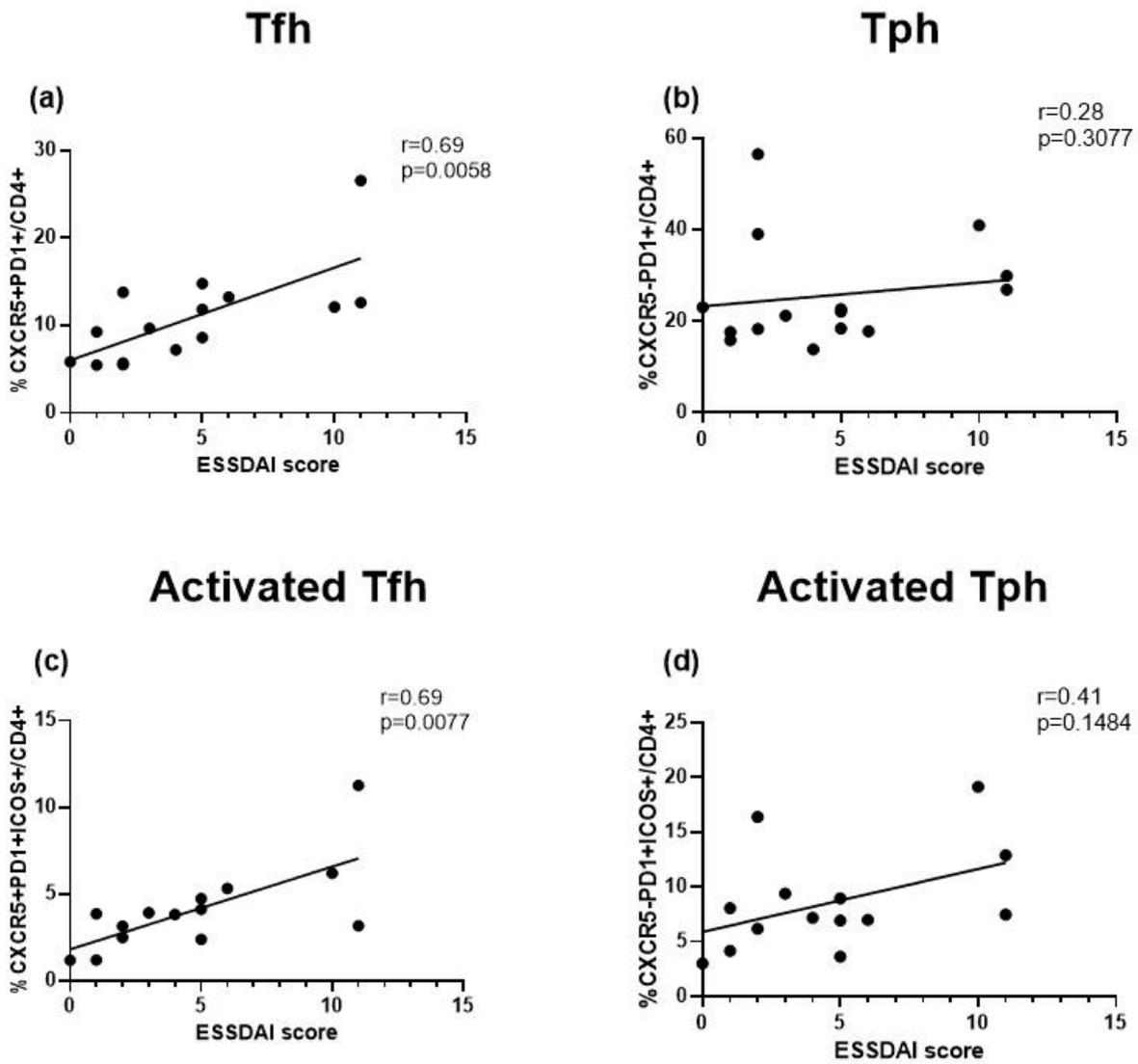


Figure 2 – **Circulating Tfh and activated Tfh are associated with disease activity.** Correlations between circulating Tfh (2a), activated Tfh (2c), Tph (2b), activated Tph (2d), assessed in flow cytometry, and ESSDAI score, in patients with pSS (n = 15 for Tfh and Tph, n = 14 for activated Tfh and Tph) Correlation were made using Spearman test.

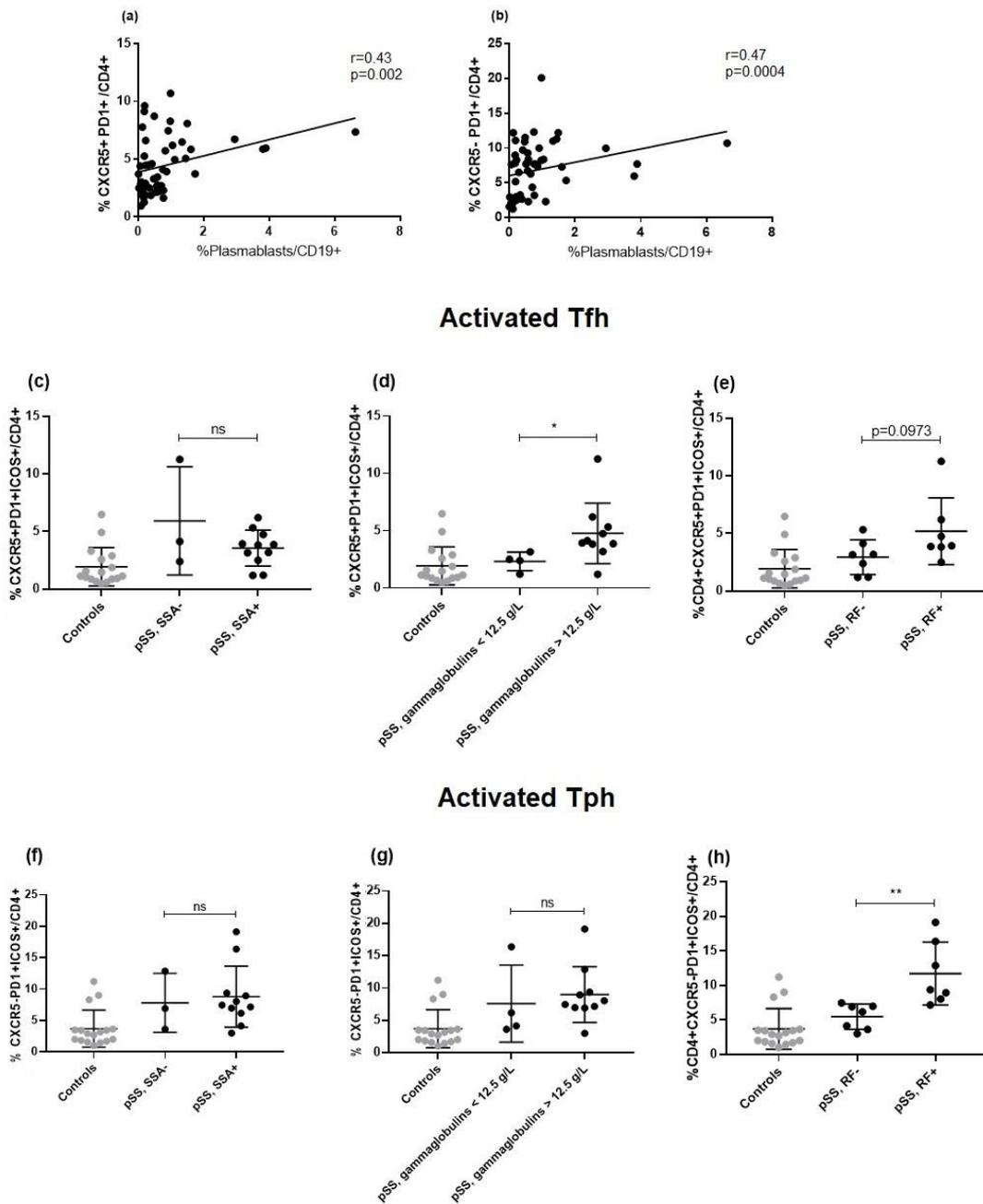


Figure 3 – **Levels of Tfh and Tph are correlated with plasmablasts.** Correlations between Tfh and plasmablasts (3a) and between Tph and plasmablasts (3b). Circulating activated Tfh according to anti-SSA antibodies status (3c), gammaglobulinemia level (3d) and rheumatoid factor status (3e). Circulating activated Tph according to anti-SSA antibodies status (3f), gammaglobulinemia level (3g) and rheumatoid factor status (3h). Data represent the mean with SD; \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  by Mann-Whitney U test. Correlations were made using Spearman test.

## REFERENCES

1. Brito-Zerón P, Baldini C, Bootsma H, Bowman SJ, Jonsson R, Mariette X, et al. Sjögren syndrome. *Nat Rev Dis Primer*. 2016 Jul 7;2:16047.
2. Mariette X, Criswell LA. Primary Sjögren's Syndrome. Solomon CG, editor. *N Engl J Med*. 2018 Mar 8;378(10):931–9.
3. Nocturne G, Mariette X. Sjögren Syndrome-associated lymphomas: an update on pathogenesis and management. *Br J Haematol*. 2015 Feb;168(3):317–27.
4. Nocturne G, Mariette X. B cells in the pathogenesis of primary Sjögren syndrome. *Nat Rev Rheumatol*. 2018 Feb 8;14(3):133–45.
5. Risselada AP, Looije MF, Kruize AA, Bijlsma JWJ, van Roon JAG. The Role of Ectopic Germinal Centers in the Immunopathology of Primary Sjögren's Syndrome: A Systematic Review. *Semin Arthritis Rheum*. 2013 Feb;42(4):368–76.
6. Mingueneau M, Boudaoud S, Haskett S, Reynolds TL, Nocturne G, Norton E, et al. Cytometry by time-of-flight immunophenotyping identifies a blood Sjögren's signature correlating with disease activity and glandular inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Jun;137(6):1809-1821.e12.
7. He J, Jin Y, Zhang X, Zhou Y, Li R, Dai Y, et al. Characteristics of germinal center-like structures in patients with Sjögren's syndrome. *Int J Rheum Dis*. 2017 Feb;20(2):245–51.
8. Theander E, Vasaitis L, Baecklund E, Nordmark G, Warfvinge G, Liedholm R, et al. Lymphoid organisation in labial salivary gland biopsies is a possible predictor for the development of malignant lymphoma in primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2011 Aug 1;70(8):1363–8.
9. Fox RI, Adamson TC, Fong S, Young C, Howell FV. Characterization of the phenotype and function of lymphocytes infiltrating the salivary gland in patients with primary Sjogren syndrome. *Diagn Immunol*. 1983;1(3):233–9.
10. Cruz-Tapias P, Rojas-Villarraga A, Maier-Moore S, Anaya J-M. HLA and Sjögren's syndrome susceptibility. A meta-analysis of worldwide studies. *Autoimmun Rev*. 2012 Feb;11(4):281–7.
11. Crotty S. T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. *Immunity*. 2014 Oct;41(4):529–42.
12. Gensous N, Charrier M, Duluc D, Contin-Bordes C, Truchetet M-E, Lazaro E, et al. T Follicular Helper Cells in Autoimmune Disorders. *Front Immunol*. 2018;9:1637.
13. Jin L, Yu D, Li X, Yu N, Li X, Wang Y, et al. CD4+CXCR5+ follicular helper T cells in salivary gland promote B cells maturation in patients with primary Sjogren's syndrome. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(5):1988–96.
14. Fonseca VR, Romão VC, Agua-Doce A, Santos M, López-Presa D, Ferreira AC, et al. The Ratio of Blood T Follicular Regulatory Cells to T Follicular Helper Cells Marks Ectopic Lymphoid Structure Formation While Activated Follicular Helper T Cells Indicate Disease Activity in Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol*. 2018 May;70(5):774–84.
15. Szabo K, Papp G, Barath S, Gyimesi E, Szanto A, Zeher M. Follicular helper T cells may play an important role in the severity of primary Sjögren's syndrome. *Clin Immunol*. 2013 May;147(2):95–104.

16. Kang K, Kim H-O, Kwok S-K, Ju J, Park K-S, Sun D-I, et al. Impact of interleukin-21 in the pathogenesis of primary Sjogren's syndrome: increased serum levels of interleukin-21 and its expression in the labial salivary glands. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(5):R179.
17. Gong Y-Z, Nititham J, Taylor K, Miceli-Richard C, Sordet C, Wachsmann D, et al. Differentiation of follicular helper T cells by salivary gland epithelial cells in primary Sjögren's syndrome. *J Autoimmun*. 2014 Jun;51:57–66.
18. Rao DA, Gurish MF, Marshall JL, Slowikowski K, Fonseka CY, Liu Y, et al. Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature*. 2017 Feb;542(7639):110–4.
19. Ricard L, Jachiet V, Malard F, Ye Y, Stocker N, Rivière S, et al. Circulating follicular helper T cells are increased in systemic sclerosis and promote plasmablast differentiation through the IL-21 pathway which can be inhibited by ruxolitinib. *Ann Rheum Dis*. 2019 Apr;78(4):539–50.
20. Makiyama A, Chiba A, Noto D, Murayama G, Yamaji K, Tamura N, et al. Expanded circulating peripheral helper T cells in systemic lupus erythematosus: association with disease activity and B cell differentiation. *Rheumatology* [Internet]. 2019 Mar 15 [cited 2019 Apr 30]; Available from: <https://academic.oup.com/rheumatology/advance-article/doi/10.1093/rheumatology/kez077/5382093>
21. Lin J, Yu Y, Ma J, Ren C, Chen W. PD-1+CXCR5–CD4+T cells are correlated with the severity of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* [Internet]. 2019 Jun 10 [cited 2019 Oct 7]; Available from: <https://academic.oup.com/rheumatology/advance-article/doi/10.1093/rheumatology/kez228/5513262>
22. Bocharnikov AV, Keegan J, Wacleche VS, Cao Y, Fonseka CY, Wang G, et al. PD-1hi CXCR5- T peripheral helper cells promote B cells responses in lupus via MAF and IL-21. *JCI Insight* [Internet]. 2019 Sep 19 [cited 2019 Oct 7]; Available from: <http://insight.jci.org/articles/view/130062>
23. Kamekura R, Yamamoto M, Takano K, Yabe H, Ito F, Ikegami I, et al. Circulating PD-1+CXCR5–CD4+ T cells underlying the immunological mechanisms of IgG4-related disease. *Rheumatol Adv Pract* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2019 Oct 7];2(2). Available from: <https://academic.oup.com/rheumap/article/doi/10.1093/rap/rky043/5133613>

## **ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE**

The study was approved by the local research ethics committee, and informed consent was obtained from all patients and control subjects.

## **ACKNOWLEDGEMENTS:**

We thank all patients and controls that accepted to participate in this study.

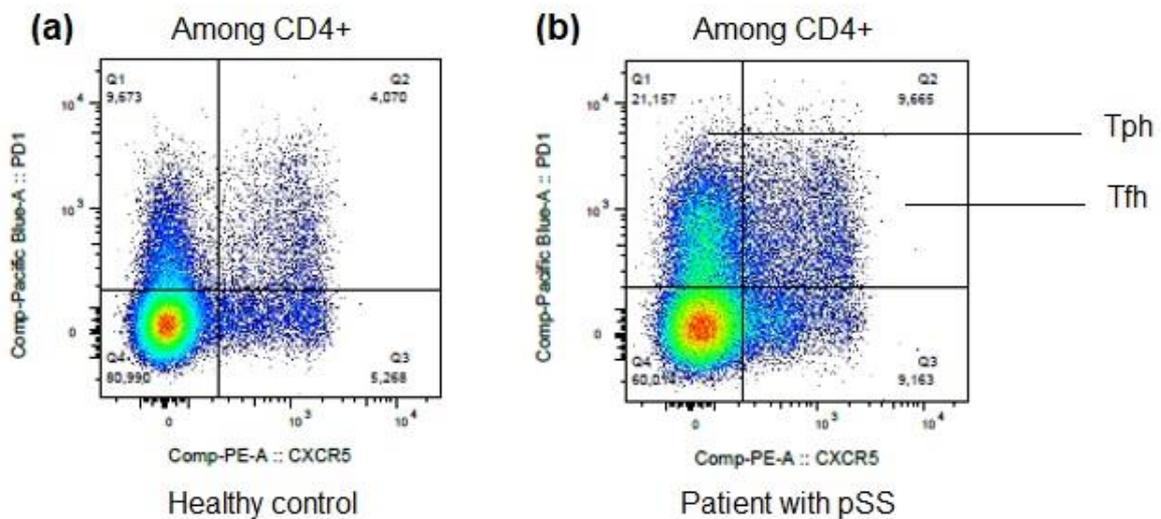
**SUPPLEMENTARY :**

Material and methods:

Flow cytometry analysis:

PBMCs were isolated by Ficoll gradient from whole blood and stained with fluorochrome-conjugated antibodies : CD3-BV-510 (BioLegend, clone OKT3), CD4-Per-CP (BioLegend, clone OKT4), CXCR5-PE (eBioscience, clone MU5UBEE), ICOS-FITC (BioLegend, clone C3984A), PD1-BV-421 (BioLegend, clone EH12.2H7), CD19-FITC (Milteny, clone REA 675), anti-CD27-PE (Milteny, clone REA 499), CD20-APC (BioLegend, clone 2H7), CD38-APC (Milteny, clone REA 572), CD38-BV510 (BioLegend, clone HB-7), Live/Dead-APC-H7 (LifeTechnologies).

Figure 1 – Supplémentary



**Titre :** Rôle des cellules épithéliales salivaires dans la physiopathologie du syndrome de Sjögren primitif

**Mots clés :** Syndrome de Sjögren, cellules épithéliales salivaires, lymphocytes B, lymphocytes T, Interleukine 7

**Résumé :** Le syndrome de Sjögren primitif (SSp) est une maladie auto-immune caractérisée par une infiltration lymphocytaire des glandes lacrymales et salivaires conduisant à l'apparition d'un syndrome sec oculaire et buccal. L'objectif de ce travail était de comprendre le rôle des cellules épithéliales salivaires (CES) dans la physiopathologie du SSp, *via*, notamment, leurs interactions avec les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T (LT).

Nous avons montré que les CES de SSp étaient capables d'induire une meilleure survie des LB comparées aux CES de sujets contrôles. L'interaction entre CES et LB était médiée principalement par la sécrétion de facteurs solubles. Notre hypothèse est que cette interaction implique plusieurs facteurs solubles agissant en synergie. L'inhibition individuelle de ces facteurs solubles ne permettait pas de bloquer l'effet de soutien des CES aux LB. En revanche, l'ajout de leflunomide, d'un inhibiteur de BTK ou d'un inhibiteur de PI3K a permis d'inhiber l'augmentation de viabilité des LB induite par les CES.

Concernant l'interaction entre CES et LT, nous avons montré que les CES sécrètent de l'interleukine 7 (IL7) après stimulation par IFN de type I ou II. Nous avons également montré que l'IL7 est capable d'induire la production d'IFN de type II par les LT, suggérant l'existence d'une boucle d'amplification entre IL7 et IFN. L'utilisation d'un anticorps monoclonal inhibant le récepteur de l'IL7 (anti-IL7R) permettait de diminuer l'expression de gènes IFN-induits dans les glandes salivaires en culture.

Ces mécanismes pourraient induire et/ou entretenir localement, d'une part l'hyperactivation lymphocytaire B chronique présente au cours du SSp et, d'autre part, la signature IFN décrite dans les glandes salivaires. Ainsi, ces résultats confirment l'hypothèse que les CES ont un rôle pathogène direct au cours du SSp. La meilleure compréhension de leurs mécanismes d'action pourrait permettre de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques au cours du SSp.

**Title:** Role of salivary gland epithelial cells in primary Sjögren's syndrome pathophysiology

**Keywords:** Sjögren's syndrome, salivary gland epithelial cells, B lymphocytes, T lymphocytes, Interleukin 7

**Abstract:** Primary Sjögren's syndrome (pSS) is an auto-immune disease characterized by a lymphocytic infiltration of lacrimal and salivary glands leading to an ocular and oral dryness. The objective of this work was to understand the role of salivary gland epithelial cells (SGECs) in the pathophysiology of pSS and especially *via* their interactions with B and T lymphocytes.

We observed a differential effect of SGECs from pSS and controls subjects since, in coculture, SGECs from pSS were able to induce a better survival of B lymphocytes compared to SGECs from controls. The interaction between SGECs and B lymphocytes involved mainly soluble factors. Our hypothesis is that several factors are involved and act in synergy. Indeed, inhibition of one of each soluble factor individually did not block the support of SGECs to B lymphocytes. In contrast, the addition of leflunomide, or a BTK inhibitor or a PI3K inhibitor inhibited the induction of B lymphocytes viability by SGECs.

Regarding the interactions between SGECs and T lymphocytes, we showed that SGECs secrete interleukin 7 (IL7) after type I or II IFN stimulation. In turn, IL7 is able to induce the production of type II IFN by T lymphocytes, suggesting the existence of an amplification loop between IL7 and IFN. The addition of a monoclonal antibody inhibiting the IL7 receptor (anti-IL7R) downregulated the expression of IFN induced genes in cultured salivary glands explants.

These mechanisms could induce and/or maintain, locally, the chronic B lymphocytes hyperactivation during pSS, as well as, the IFN signature described in the salivary glands. Thus, these results confirmed the hypothesis that SGECs play an active role in the pathogenesis of pSS. A better understanding of their mechanisms of action could help to define new therapeutic strategies in pSS.